

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ana Parabucki

**AKTIVNOST KOMPONENTI
ADENOZINSKOG SIGNALNOG
SISTEMA ASTROCITA U MODELU
MOŽDANE POVREDE *IN VIVO* I *IN
VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ana Parabucki

**ACTIVITY OF THE ASTROCYTES'
ADENOSINE SIGNALING SYSTEM
COMPONENTS IN MODEL
OF TRAUMATIC BRAIN INJURY *IN VIVO*
AND *IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

Dr Ivana Bjelobaba, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

Članovi komisije:

Dr Mirjana Stojiljković, redovni profesor i naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Dr Aleksandra Isaković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet.

Dr Danijela Laketa, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

Datum odbrane: _____2013. Godine

Hvala vam:

Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za Neurohemiju, Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (projekat III41014), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod neposrednim rukovodstvom prof dr Mirjane Stojiljković.

Hvala mojoj profesorki, dr Mirjani Stojiljković, na inspiraciji, na sjajnim predavanjima, na tome što mi je pre šest godina otvorila vrata svoje laboratorije i čudesnog sveta neuronauka.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Ivani Bjelobabi, koja me je tokom svih ovih godina učila (i nadam se ponečemu i naučila) kako se radi i još važnije - kako se ne radi. Hvala joj što je imala strpljenja, što je ostajala sa mnom u laboratoriji i 31-og decembra uveče, na kvalitetnom druženju i najpre hvala na prijateljstvu.

Ništa manje hvala ništa manjem mentoru, prof dr Nadeždi Nedeljković na podršci, na sugestijama koje su oblikovale ovaj rad, na pruženim prilikama. Pre svega hvala na svim kritikama, čiji značaj tek sada razumem.

Prof dr Aleksandri Isaković se zahvaljujem na sugestijama koje su dodatno oblikovale ovaj rad. Takođe, hvala na razgovorima tokom (nažalost) malobrojnih susreta na konferencijama koji su bili inspiracija za neke delove ove teze.

Dr Danijeli Laketi hvala na tome što je bila izvanredan asistent, divna koleginica, prijatelj, i konačno član Komisije.

Dr Danijeli Savić hvala na tome što me je naučila radu u kulturi, na sjajnom timskom radu u laboratoriji, na svim savetima i svim kafama, na beskrajnim razgovorima (posebno onim kojima smo radovale mobilne operatore), a najviše na iskrenosti.

Posebnu zahvalnost dugujem Jasmini Savić na tome što me je učila UPLC metodi, na njenoj predanosti, na tome što je radila sa mnom na delu ove teze kao da je njena. Hvala joj što je podelila sa mnom svoj entuzijazam prema nauci, cveću i vožnji.

Dr Sanji Peković hvala na pomoći kad god je ista bila potrebna, na savetima, i dobroj atmosferi i smehu.

Veliko hvala mojim koleginicama bez kojih bi u laboratoriji (u najmanju ruku) bilo dosadno; Ireni, Ivi, Sanji i Anji hvala na kolegijalnosti, prijateljstvu, sjajnoj atmosferi.

Posebno se zahvaljujem prof dr Markus Kipp-u na prilici da radim i učim u njegovom timu u Ahenu. Hvala Timu, Katharini i Jonu na tome što sam se u njihovoj laboratoriji osećala kao u svojoj. Hvala im i na prijateljstvu koje je po svoj prilici dugoročno.

Hvala devojkama iz laboratorije 32, bez kojih bi sve bilo drugačije, a psiho-kafe ne bi postojale. Hvala mojim saborcima Marjani i Divni.

Hvala Milmi, Peđi, Aleksandru i Mariji, mojim kolegama i prijateljima sa Fakulteta.

Hvala prof dr Tanji Ćirković Veličković i njenim saradnicama na tome što su mi otvorile vrata svoje laboratorije za sve što mi je trebalo, u svako doba dana (i noći), a najviše hvala na tome što su me učinile da se osećam delom njihovog tima.

Veliko hvala Istraživačkoj Stanici Petnici na svemu što jeste i na svemu što mi je pružila. Čini mi se da nikad neću uspeti da se odužim. Pre svega hvala na Nemanji, Nikoli, Tomici, Bobi, Igoru, Acku, Voinu, Milošu, Luki i Milanu. Hvala Petničarima.

Posebno hvala divnom kolektivu IBISS-a, zbog kojih je bilo teško otići iz Srbije. Hvala Mariji i Jeli. Veliko hvala dr Mirjani Mihailović i dr Pavlu Pavloviću na divnoj saradnji, što čine IBISS drugačijim, i konačno hvala na pomoći u izradi ove teze.

Ceo ovaj proces bi bio značajno drugačiji da nije bilo Dušice Briševac. Hvala joj na Ahenu, Amsterdamu, Berlinu, palačinkama, kašičicama, noćima u labu, idejama, savetima, prijateljstvu, i ostalim koještarijama koje je čine nezamenjivom.

Hvala mojim prijateljima i kolegama Luki, Dragoljubu, Sergeju, Jeci, Strahi. Niko nije imao bolje kolege.

Hvala dr Romanu Shustermanu na poverenju i razumevanju koje je imao dok sam u njegovoj laboratoriji dovršavala pisanje teze.

Hvala mojim dragim izraelskim prijateljima Eliranu i Dimi na podršci, pauzama, večerama, šetnjama, i što čine sve da se osećam kao kod kuće.

Hvala onima koji su uvek bili tu za mene, mojoj kumi Tanji, Marku, Milici, Ani, Mirku, Dragani, Ani, Mariji, Danki, Lomi, Uni, Mili, mojim Mitrovićima. Hvala im što su još uvek tu.

Hvala mojoj kolegici, prijateljici, sestri, cimerki Jani. Sa njom je sve bilo mnogo zabavnije.

Najveću zahvalnost dugujem onima koji su me podržavali uvek i u svemu, bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće, niti bi imalo smisla - mojim roditeljima Bobanu i Jeleni i mojoj sestri Ivi.

Ovaj rad posvećujem mom deda Aci.

**Aktivnost komponenti adenozienskog signalnog sistema astrocita u modelu
moždane povrede *in vivo* i *in vitro***

SAŽETAK

Glavno obeležje traumatske povrede mozga (TPM) je reaktivna astroglioza koja, između ostalog, uzrokuje i promene u signalizaciji purinima. Posebno važan aspekt purinske signalizacije u patološkim procesima centralnog nervnog sistema predstavlja dinamika promena vanćelijskih koncentracija neuroprotektora adenzina. Stoga je cilj ove doktorske teze bio ispitivanje ekspresije i funkcije komponenti adenozienskog signalnog sistema astrocita u *in vivo* i *in vitro* modelu moždane povrede, sa posebnim osvrtom na ulogu ekvilibrišućih nukleozidnih transportera (ENT).

U *in vivo* studiji, izvedenoj na modelu ubodne lezije kore prednjeg mozga pacova, je pokazano da povreda dovodi do dinamičnih promena u ekspresiji ENT, ektonukleotidaza i adenozienskog A₁ receptora. Sem toga, povreda uzrokuje i ćelijsku re-distribuciju ENT1/2 i ushodnu regulaciju transportera na reaktivnim astrocitima, što je posebno izraženo sedmog dana nakon ozlede.

Uloga astrocita u orkestraciji adenozienskog signalnog sistema nakon povrede je detaljnije ispitana *in vitro*, nakon skarifikacije astrocitnog jednosloja. Rezultati su pokazali da skarifikacija povećava ekspresiju ENT1 i ENT2 tek u kasnijim vremenima. Bifazna promena u ekspresiji ekto-5'-nukleotidaze (e-5NT) je iskazana prvobitnim smanjenjem i potom povećanjem ekspresije u kasnijim vremenima nakon skarifikacije. Pored toga, skarifikacija astrocitnog jednosloja vodi promenama u koncentracijama adenzina i njegovih metabolita u ćelijskom medijumu. Naime, porast koncentracija adenzina u ranim vremenima nakon povrede, bio je praćen padom u kasnijim vremenima. Blokiranje ENT dipiridamolom (DPM) je dovelo do promena u koncentracijama adenzina nakon

skarifikacije, ukazavši na ulogu ENT1/2 u kontroli vanćelijskih koncentracija ovog nukleozida.

Kako bi se nagovestili mogući putevi regulacije ENT, kultura astrocita je podvrgnuta tretmanima adenzinom, ATP, DPM i blokatorom A₁ receptora DPCPX. Rezultati su pokazali da ATP ushodno reguliše oba transportera i e-5NT, dok adenzin povećava ekspresiju ENT2 a smanjuje ekspresiju ENT1. Takođe, drugačiji efekat na ekspresiju ENT1/2 su imali i DPM i DPCPX, potvrdivši da su ova dva transportera regulisana drugačijim putevima.

Na kraju smo želeli da uporedimo efekte mehaničke povrede i CoCl₂ izazvane hipoksije nakon četvoročasovnog na aktivnost komponenti adenzinskog sistema. Za razliku od skarifikacije, CoCl₂ vodi ranom povećanju ekspresije ENT2, e-5NT i HIF-1 α , kao i daleko većem povećanju vanćelijskih koncentracija adenzina.

Dobijeni rezultati predstavljaju pregled ekspresije i aktivnosti najvažnijih komponenti adenzinskog sistema astrocita nakon povrede, dajući dobru osnovu za dalja ispitivanja uloge astrocita u kontroli kruženja adenzina u fiziološkim i patološkim stanjima, kao i potencijalne kandidate za buduće terapije TPM.

KLJUČNE REČI: astrociti, adenzin, ekvilibrišući nukleotidni transporteri, traumatska povreda mozga, ektonukleotidaze, ćelijska kultura, purinska signalizacija.

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Neurobiologija

UDK BROJ: 616.8:615.27

Activity of the astrocytes' adenosine signaling system components in the model of traumatic brain injury *in vitro* and *in vivo*

ABSTRACT

Reactive astrogliosis is a hallmark of traumatic brain injury (TBI), which, among the others alterations, causes changes in purinergic signaling. Due to its neuroprotective features, fluctuations of adenosine extracellular concentration are particularly important aspect of purinergic signaling in brain pathology. Hence, herein given thesis aimed to investigate expression and function of astrocytes' adenosine signaling system components after brain injury *in vitro* and *in vivo*, with special regard to the role of equilibrative nucleoside transporters (ENT).

In vivo study, performed on a model of cortical stab injury of rat forebrain, showed that injury caused dynamic changes in expression of ENTs, ectonucleotidases, and adenosine A₁ receptor. Moreover, injury induced cell redistribution of ENT1/2 and upregulation of transporters on reactive astrocytes, which is especially pronounced seven day after the impact.

The role of astrocytes in orchestration of adenosine signaling system after the injury was examined in more details *in vitro*, after scratch wound injury of astrocytic monolayer. Results have shown that scarification induced upregulation of ENT1 and ENT2 in later time points. Biphasic alteration in expression of e-5NT was shown in early downregulation followed by upregulation of the enzyme in later time points after the induction of scratch wound. Beside, scarification of astrocytic monolayer caused changes in concentration of adenosine and its metabolites in extracellular medium. The rise of adenosine concentration was noted early after the injury, which was followed by drop of the concentration in later time points examined. Blocking of ENT with dipyridamole (DPM) resulted in changes of observed adenosine concentration after the scarification, pointing out

that ENT1/2 have significant role in controlling extracellular concentration of this nucleoside.

In order to identify possible regulation pathways for ENT, astrocytes were treated with adenosine, ATP, DPM and DPCPX, antagonist of A₁ receptor. Results have shown that ATP upregulates both transporters as well as e-5NT, while adenosine enhances expression of ENT2 and diminishes expression of ENT1. Moreover, DPM and DPCPX have shown different effect on ENT1/2 expression, confirming that regulation of these two transporters depends on different pathways.

Toward the end, we wanted to compare effects of mechanical injury to those caused by chemically induced hypoxia after 4-hour CoCl₂ treatment, on activity of the components of adenosine system. Unlike the scratch wound injury, CoCl₂ causes early upregulation of ENT2, e-5NT and HIF-1 α , as well as much greater increase in extracellular adenosine concentration.

Herein given results represent an overview of activity and expression the most important components of adenosine signaling system after the injury, therefore giving good foundation for future research of astrocyte role in control of adenosine in both physiological and pathological conditions, as well as for investigation of potential candidates for future TBI therapies.

KEY WORDS: astrocytes, adenosine, equilibrative nucleoside transporter, traumatic brain injury, ectonucleotidases, cell culture, purinergic signaling.

RESEARCH AREA: Biology

RESEARCH FIELD: Neurobiology

UDC Number: 616.8:615.27

SKRAĆENICE

ATP - adenzin trifosfat

Ado - adenzin

NT - nukleozidni transporter

GABA - gama-aminobuterna kiselina

TPM - traumatska povreda mozga

ADP - adenzin difosfat

AMP - adenzin monofosfat

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

CNS - centralni nervni sistem

NMDA - N-metil-D-aspartat

TBM - traumatska povreda mozga

PLC - fosfolipaza C

IP₃ - inozitol 3-fosfat

IB-MECA - 2-(1-heksinil)-N-metiladenosin

SAH - S-adenozilhomocistein

ADA - adenzin deaminaza

AK - adenzin kinaza

IMP - inozin monofosfat

e-5NT - ekto-5`-nukleotidaza

CNT - koncentrišući nukleozidni transporteri

ENT - ekvilibrišući nukleozidni transporteri

HX - hipoksantin

PNP - purin-nukleozid fosforilaza

HPGRT - hipoksantin-guanin fosforibozil transferaza

PNP - purin-nukleozid fosforilaza

NAD⁺ - nikotinamid adenin dinukletid

GPI - glikozilfosfatidilinozitol

AP - alkalna fosfataza

TNAP - tkivno-nespecifična alkalna fosfataza

AOPCP - α,β -metilen adenzin difosfat

e-NPP-aza - ekto-nukleozidpirofosfataze i/ili fosfodisteraza

e-NTPD-aza - ekto-nukleotid-5`-trifosfat difosfohidrolaza

NBMPR - nitrobenziltioinozin

DPM - dipiridamol

DPCPX - 8-ciklopentil-1,3-dipropilksantin

HIF-1 α - hipoksijom inducibilni faktor 1 alfa

SW - povreda skarifikacijom, engl. „*scratch wound*“

Ino - inozin

X - ksantin

HO - ksantin oksidaza

SADRŽAJ

I UVOD	1
1. Komponente adenozienskog sistema	2
1.1. Adenozin u centralnom nervnom sistemu.....	2
1.2. Signalizacija adenoziinom i adenoziinski receptori	3
1.3. Transport adenoziina.....	6
1.4. Metabolizam adenoziina	11
2. Purinski nukleotidi u centralnom nervnom sistemu	13
2.1. Signalizacija purinskim nukleotidima i purinergički receptori	14
2.2. Vanćelijski metabolizam purinskih nukleotida	16
3. Traumatska povreda mozga.....	19
3.1. Glijski ožiljak.....	20
3.2. Modeli traumatske povrede mozga	21
3.3. Uloga adenoziina u povredi i oporavku centralnog nervnog sistema	22
II Ciljevi rada	25
III Materijal i metode.....	27
1. Eksperimentalne životnje	27
2. Reagensi	27
2.1. Rastvori i medijumi	27
2.2. Antitela.....	34
2.3. Prajmeri.....	36
3. Ubodna lezija leve somatosenzorne kore – <i>in vivo</i> model povrede	37
3.1. Eksperimentalne grupe	38
3.2. Priprema životinjskog tkiva	38
3.3. Određivanje koncentracije proteina.....	39
4. Priprema ćelijske kulture.....	39
4.1. Skarifikacija ćelijskog monosloja.....	41
4.2. Tretmani ćelija.....	42
5. Izolacija RNK	42
6. DNKazni tretman i reakcija reverzne transkripcije.....	45
7. PCR u realnom vremenu (qRT-PCR).....	46
8. SDS-poliakril amid elektroforeza i razdvajanje proteina.....	47

9. Western blot analiza	49
10. Imunohistohemijsko obeležavanje tkiva.....	50
11. Imunocitohemijsko obeležavanje ćelija.....	52
12. Testovi vijabilnosti	52
13. Protočna citofluorimetrija	54
14. Tečna hromatografija ultra-visokih performansi.....	56
14.1. Priprema uzoraka.....	57
14.2. Hromatografsko odvajanje	57
14.3. Identifikacija i određivanje koncentracije adenzina i njegovih metabolita u ćelijskom medijumu.....	58
15. Statistička analiza podataka	59
IV Rezultati.....	60
4.1. Promene ekspresije komponenti adenzinskog signalnog sistema u modelu povrede mozga pacova	60
4.1. Analiza ENT1 ekspresije na genskom i proteinskom nivou	60
4.2. Analiza ENT2 ekspresije na genskom i proteinskom nivou	67
4.3. Analiza genske ekspresije za NTPD1-3, NPP1-2 i e-5NT.....	74
4.4. Analiza genske ekspresije za A1 receptor.....	76
4.5. Zastupljenost transkripata ispitivanih komponenti adenzinskog signalnog sistema u korteksu mozga pacova	77
4.2. Aktivnost komponenti adenzinskog signalnog sistema nakon skarifikacije astrocita u kulturi.....	77
4.2.1. Vijabilnost ćelija u kulturi.....	78
4.2.2. Opšte karakteristike mešovite glijske kulture i SW modela povrede.....	80
4.2.3. Analiza ekspresije ENT1 u različitim vremenima nakon povrede skarifikacijom ili tretmana	86
4.2.4. Analiza ekspresije ENT2 u različitim vremenima nakon povrede skarifikacije ili tretmana	92
4.2.5. Analiza ekspresije e-5NT u različitim vremenima nakon povrede skarifikacije ili tretmana.....	98
4.2.6. Analiza genske ekspresije za A1 receptor 24 sata nakon skarifikacije i Ado, DPM ili DPCPX tretmana	104
4.2.7. FACS analiza ekspresije HIF-1 α u astrocitima.....	105
4.2.8. UPLC analiza promena koncentracija adenzina i njegovih metabolita u ćelijskom medijumu nakon skarifikacije.....	107

4.2.9. Uticaj hemijski izazvane hipoksije kobalt-hloridom (CoCl ₂) na aktivnosti komponenti adenzinskog signalnog sistema.....	120
V Diskusija	126
1. Skarifikacija astrocitnog jednosloja kao model povrede - studija ekspresije hondroitin-sulfatnih proteoglikana	127
2. Uticaj skarifikacije astrocitnog sloja i različitih tretmana na vanćelijsku koncentraciju Ado i njegovih metabolita	129
3. Ekspresija i ćelijska distribucija ENT1 i ENT2.....	132
4. Ektonukleotidaze u povredi mozga.....	139
4.1. Ekspresija e-5NT nakon povrede mozga <i>in vivo</i> i skarifikacije astrocita <i>in vitro</i>	139
4.2. Ekspresija odabranih ektonukleotidaza nakon ubodne lezije kore mozga pacova.....	141
5. Ekspresija A1 receptora nakon <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> povrede i tretmana	143
6. Uticaj hemijski izazvane hipoksije kobalt-hloridom na aktivnosti komponenti adenzinskog signalnog sistema	145
VI Zaključci.....	148
VII Literatura.....	151

I UVOD

Koncept purinske signalizacije je prvi put predstavio Geoffry Burnstock 1972. godine [1]. Ideja da je najvažniji energetski molekul, adenzin trifosfat (ATP), posrednik u međucelijskoj komunikaciji je osporavana narednih 20 godina. Burnstock je otišao i korak dalje, hrabro sugerisući da je ATP kotransmiter, što je bilo u suprotnosti sa tada široko prihvaćenim Dejlovim principom – jedan nerv jedan transmiter [2]. Devedesetih godina, nakon što su purinski receptori farmakološki identifikovani i klonirani, ideja purinske signalizacije konačno biva u potpunosti prihvaćena od strane naučne javnosti [3, 4]. Do danas je objavljeno preko 19 500 radova u oblasti purinske signalizacije u različitim oblastima, uključujući i fiziologiju biljaka.

Signalizacija adeninskim nukleotidima i nukleozidima, koji svoje dejstvo ostvaruju preko P1 i P2 receptora, je evolutivno vrlo konzervirana. Takođe, neosporna je njihova uloga u orkestriranju fizioloških stanja kao što su embrionalno i rano postnatalno razviće, sinaptička plastičnost i različite kognitivne funkcije [5]. Osim toga, nukleotidi i nukleozidi su važni učesnici u patološkim procesima vezanim za traumatsku povredu centralnog nervnog sistema, ishemiju, neurodegenerativne bolesti, neuroinflamaciju, epilepsiju i neuropatski bol [6].

Posebno mesto u patologiji nervnog sistema pripada adenzinu, pre svega zbog njegovih neuroprotektivnih svojstava. Upravo zato brojne komponente adenzinskog signalnog sistema predstavljaju potencijalne mete farmakoloških manipulacija.

Ova doktorska teza, kao nastavak prethodnih istraživanja naše grupe, daje doprinos boljem razumevanju adenozienskog signalnog sistema nakon traumatske povrede mozga, sa posebnim osvrtom na ulogu astrocita u kruženju adenzina.

1. Komponente adenozienskog sistema

1.1. Adenzin u centralnom nervnom sistemu

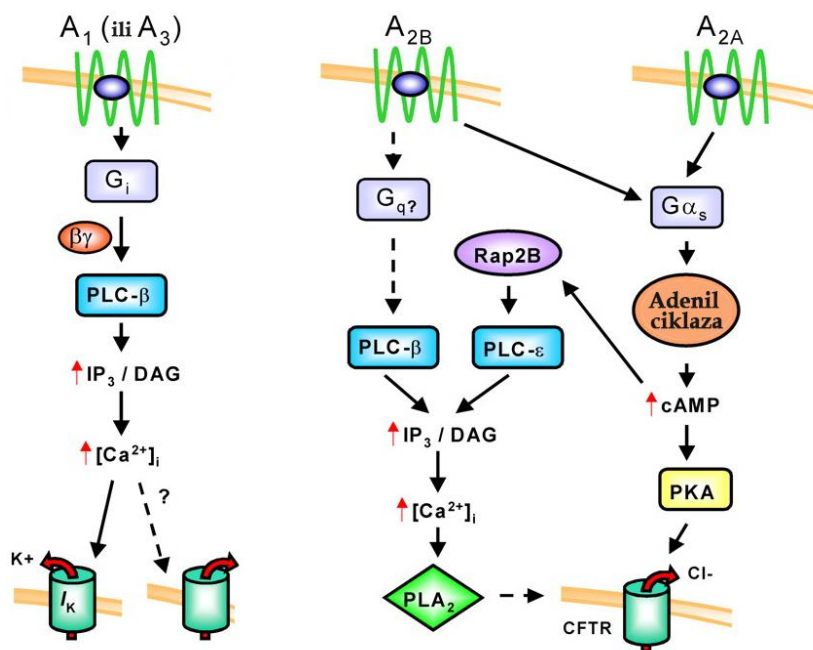
Nukleozid adenzin (Ado) je prisutan u svim ćelijama i telesnim tečnostima živih organizama gde ostvaruje raznovrsne fiziološke efekte. Uloga Ado kao senzora metaboličkog stanja i modulatora bioloških funkcija u brojnim tipovima ćelija, tkivima, organima i fiziološkim procesima je dobro poznata ali mehanizmi njegovog delovanja nisu u potpunosti razjašnjeni. Ado ima važne uloge u kardiovaskularnom sistemu [7], CNS-u [8-12], prenosu informacija o oštećenju tkiva i medijaciji osećaja bola [13], gastro-intestinalnom traktu [14], i imunskom sistemu [15]. U srcu i mozgu, delovanje Ado je u najvećoj meri zasnovano na kontroli nadražljivosti.

U CNS-u Ado se ponaša kao neuromodulator, kontrolišući mnoge funkcije mozga uključujući budno stanje i spavanje, lokomociju, anksioznost, kogniciju i memoriju [16]. Produkcija Ado, i unutar i vanćelijska, je usko povezana sa energetske procesima; do povećanja vanćelijskog nivoa Ado dolazi tokom pojačanog utroška energije u ćeliji. U fiziološkim uslovima, Ado se u vanćelijskoj sredini nalazi u niskim nanomolarnim koncentracijama (30-300nM) [17]. Metabolički stres povezan sa patološkim događajima u CNS-u, vodi brzom povećanju vanćelijskog Ado do 10-50 μ M [18]. Vanćelijski Ado svoje efekte ispoljava modifikujući potencijal membrane i sledstveno tome, sinaptičku transmisiju [19]. Disfunkcija u signalizaciji posredovanoj Ado u CNS-u je povezana

sa mnogim neuropatijama, posebno sa moždanim udarom, epilepsijom, Parkinsonovom bolešću, depresijom, anksioznošću i šizofrenijom [20].

1.2. Signalizacija adenozinom i adenzinski receptori

Efekti Ado su posredovani P1 familijom membranskih receptora. Do sada su identifikovana četiri receptora spregnuta sa proteinom G - A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃ (Slika 1). Inhibitorni receptori, A₁ i A₃, inhibiraju adenil ciklazu, to jest smanjuju nivo cAMP-a [21]. U CNS-u najzastupljeniji su A₁ i A_{2A} receptori [16, 19].



Slika 1. Šematski prikaz P1 receptora. A₁ i A₃ receptori su inhibitorni, a svoje efekte ostvaruju aktivirajući βγ subjedinicu G_i zavisne kaskade. Njihova aktivacija vodi efluksu K⁺ i smanjenju ekscitabilnosti neurona. A_{2A} i A_{2B} su spregnuti sa G_s proteinima, i njihova aktivacija rezultuje povećanju unutarćelijskog cAMP i aktivaciji PKA. Takođe je primećen porast unutarćelijskog Ca²⁺ nakon aktivacije A_{2B} receptora uparenspregnutog sa G_q proteinom.

Modifikovano prema R. Elaine Bucheimer i Joel Linden-u [22].

1.2.1. *A₁ receptor*

U poređenju sa drugim podtipovima Ado receptora, *A₁* receptor ima najveći afinitet za Ado i snažno je eksprimiran na neuronima kore, hipokampusa, malog mozga i u dorzalnoj sivoj masi kičmene moždine [16]. *A₁* se, osim na neuronima [23, 24], eksprimira i na astrocitima [25], mikrogliji [26] i oligodendrocitima [27]. Aktivacija *A₁* receptora izaziva smanjenje aktivnosti ekscitatornih sinapsi, pokretanjem *G_i* i *G_o* zavisnih puteva i smanjenju aktivnosti adenil ciklaze [19, 28]. Aktivacija *A₁* receptora s jedne strane dovodi do hiperpolarizacije neurona otvaranjem K^+ kanala kao i do inaktivacije nekoliko tipova presinaptičkih Ca^{2+} kanala, što rezultira smanjenim oslobađanjem neurotransmitera kao što su glutamat, acetilholin, dopamin, noradrenalin i serotonin. Pored smanjene nadražljivosti, inhibicija adenil ciklaze vodi i smanjenju metaboličkih procesa u neuronima [17, 29–31]. Povećanje koncentracije vanćelijskog Ado i njegovo delovanje preko *A₁* receptora bi moglo predstavljati neuroprotektivni pristup u tretmanima ishemije, traume i sličnih patoloških stanja.

1.2.2. *A_{2A} receptor*

Prisustvo *A_{2A}* receptora je posebno izraženo u nekim tkivima, kao što su imunske ćelije, endotel ili glatke mišićne ćelije krvnih sudova. Takođe, iRNK za *A_{2A}* je u visokoj meri prisutna u slezini, oku, skeletnim mišićima, srcu, plućima, i materici [32, 33]. U CNS-u sisara, *A_{2A}* receptor je visoko eksprimiran u dopaminom bogatim regionima, kao što su strijatum, globus pallidus, nucleus accumbens, olfaktrone tuberkule [34]. *A_{2A}* receptor je vezan za stimulatorni *G_s* protein što, po aktivaciji receptora, vodi stimulaciji adenil ciklaze. Stimulacija *A_{2A}* receptora aktivira Ca^{2+} kanale, Na^+ kanale i NMDA receptore u strijatumu [35–37]. Aktivacija

A_{2A} receptora takođe je povezana sa povećanim oslobađanjem glutamata, acetilholina i serotonina [19]. Za razliku od A₁ posredovane neuroprotekcije, A_{2A} agonisti doprinose povredi u ishemičnim i ekscitotoksičnim modelima i smatra se da se ekscitotoksična smrt neurona, u izvesnoj meri može pripisati aktivnosti A_{2A} [17, 38].

A_{2A} signalizacija se dovodi u vezu sa nizom oboljenja kao što su Parkinsonova, Hantingtonova i Alcahmerova bolest, zatim šizofrenija, fobije, depresija, i bipolarni poremećaji.

1.2.3. A_{2B} receptor

A_{2B} receptori se mogu naći na svim ćelijama i imaju nizak afinitet za Ado. Iako je nisko eksprimiran, A_{2B} je široko rasprostranjen u mozgu [32].

A_{2B} je takođe ekscitatorni receptor, koji povećava aktivnost adenil ciklaze aktivirajući G_q i G_s proteine [39]. U CNS-u ovaj receptor može stupiti u interakciju sa inflamatornim citokinima prilikom traumatske povrede mozga (TBM) i u [40]. Fiziološke uloge A_{2B} receptora su opisane u astrocitima, fibroblastima, gastrointestinalnom traktu, i krvnim sudovima.

1.2.4. A₃ receptor

A₃ receptor je poznat po svojoj specifičnoj distribuciji i ekspresiji u različitim vrstama. Tako je, na primer, A₃ najzastupljeniji kod ovce, zatim čoveka a najmanje je prisutan kod glodara. Pri tome, farmakološki profil A₃ receptora kod ljudi je sličniji onome kod ovce [41, 42]. Kod čoveka, ekspresija A₃ je vrlo visoka u plućima i jetri dok je najniža u aorti i mozgu [42]. U CNS-u, A₃ receptor je eksprimiran na neuronskim i glijskim ćelijama [43]. Umerena ekspresija je nađena u malom mozgu

i hipokampusu a nešto niža u drugim delovima mozga [44]. A₃ receptor je spregnut sa inhibitornim G_{iα2}, G_{iα3} i G_{q/11} proteinima, i negativno utiče na aktivnost adenil ciklaze [45]. Aktivacija A₃ receptora stimuliše fosfolipazu C (PLC) i povećava nivo inozitol 3-fosfata (IP₃) i unutarćelijskog Ca²⁺.

U poređenju sa ostalim adenozijskim receptorima, najmanje se zna o A₃ receptoru. Što se tiče neuroprotekcije, pokazano je da A₃ receptor ima funkcionalnu vezu sa A₁ receptorom: aktivacija A₃ receptora dovodi do prekida inhibicije ekscitatorne transmisije posredovane A₁ receptorom [46]. Smatra se da A₃ receptor može imati dvojnu prirodu po pitanju neuroprotekcije i neurodegeneracije: dodavanje A₃ agonista kod pustinjskog miša značajno pojačava posledice ishemije, iako hronična stimulacija ima zaštitnu ulogu u modelu moždanog udara, dok kod A₃-nokaut miševa pokazana smanjena sposobnost neuroprotekcije [47, 48]. *In vitro* studije takođe govore u prilog neuroprotektivnog efekta nakon aktivacije A₃ – niske koncentracije agonista ovog receptora, IB-MECA, su iskazale protektivno svojstvo u primarnim kortikalnim kulturama podvrgnutim deprivaciji kiseonika i glukoze [48]. Ipak, više koncentracije IB-MECA aktiviraju kaspaze i indukuju apoptozu astrocita [49] ili neurona u kulturi [50].

1.3. Transport adenzina

Vanćelijski Ado može nastati vanćelijskom defosforilacijom ATP i drugih adeninskih nukleotida od strane ekto-nukleotidaza ili oslabljanjem Ado iz ćelija putem transportera.

Unutarćelijska produkcija Ado se bazira na tri moguća izvora: adenozijski nukleotidi, cAMP ili S-adenozilhomocistein (SAH). Najveći deo Ado nastaje defosforilacijom ATP do AMP posredstvom citosolnih nukleotidaza. Nešto manje je poreklom od reverzibilne konverzije SAH do Ado delovanjem SAH hidrolaze ili konverzijom cAMP do Ado fosfodiesterazama [51].

Sve je više dokaza koji ukazuju na važnost nukleozidnih transportera (NT) u regulaciji vanćelijske koncentracije Ado. Jednom formiran, Ado se brzo uklanja iz vanćelijskog miljea pasivnim ili aktivnim transportom preko NT-ova, podeljenih na ekvilibrišuće nukleozidne transportere (ENT) i koncentrišuće nukleozidne transportere (CNT) [52–54].

1.3.1. Ekvilibrišući nukleozidni transporteri

Do danas su opisana klonirana i identifikovana kod čoveka, pacova i miša četiri tipa ENT, [55–58]. ENT posreduju u pasivnom, dvosmernom transportu olakšanom difuzijom različitih purina i pirimidina kroz ćelijske membrane. Pre identifikacije specifičnih gena, ENT su klasifikovani prema osetljivosti na nitrobenziltioinozin (NBPMR): es (NBPMR osetljivi) i ei (NBPMR neosetljivi) [59].

ENT1

U klasičnoj nomenklaturi, ENT1 je identifikovan kao „es“, to jest, nitrobenziltioinozin (NBMPR) osetljiv transporter i označen kao SLC29A1 [60]. ENT1 je inhibiran pri nanomolarnim koncentracijama NBMPR kao i u prisustvu dipiridamola (DPM) i dilazepa [60]. ENT1 je takođe inhibiran tirozin- i serin/treonin-kinaznim inhibitorima [61] ali i niskopotentim benzodiazepinima [62]. Humani ENT1 (hENT1) transportuje širok spektar purina ili piramidina ali ne i uridin [55, 56, 63]. Poznato je da hENT1 može igrati važnu ulogu u transportu pojedinih lekova, kao na primer antitumorskih i antiviralnih nukleozidnih lekova [52, 64]. Ekspresija ENT1 je primećena na membrani mnogih tipova ćelija ali i na jedarnoj [62] i mitohondrijskoj membrani [65]. Distribucija hENT1 korelira sa distribucijom A₁ receptora u ljudskom mozgu [66]. U CNS-u glodara i čoveka najveći procenat ENT1 je nađen u čeonj i temenoj kori; umereno prisutan u

talamusu i bazalnim ganglijama, dok je najslabije eksprimiran u hipokampusu i malom mozgu [66].

ENT2

ENT2 (hENT2; SLC29A2) je NBMPR neosetljiv („ei“ transporter), i za razliku od ENT1, inhibira se u prisustvu mikromolarnih koncentracija NBMPR. Inhibitori ENT2 su isti kao i za ENT1, sa nekim razlikama u potenciji. ENT2 je takođe široko selektivan za purine i pirimidine, i transportuje HX i druge nukleobaze [55, 56, 60, 67]. Pored toga, pokazano je da antivirusni i antitumorski nukleozidni i nukleobazni analozi u ćeliju ulaze kroz hENT2 [68, 69].

Iako se ENT2 ko-eksprimira sa ENT1, aktivnost ENT2 je znatno manja. Pored toga, farmakologija i fiziologija ENT2 je daleko manje poznata, najviše zbog toga što ne postoji selektivni farmakološki agens za ENT2. ENT2 se nalazi u mnogim tkivima, uključujući srce, placentu, timus, pankreas, prostatu [56, 70]. U CNS-u, hENT2 distribucija je potvrđena u talamusu, meduli, ponsu i malom mozgu [66, 71].

ENT3

ENT3 (hENT3; SLC29A3) se ne eksprimira na ćelijskoj membrani, već je uglavnom lokalizovan na lizozomima [57, 72, 73] i mitohondrijama [74]. Zanimljivo je pomenuti da proteinska sekvenca ENT3 sadrži hidrofilni N-terminalni region sačinjen od 51 aminokiselinskog ostatka, koji je karakterističan za endozomske i lizozomske sekvence. Uklanjanjem ove sekvence dolazi do izmeštanja ENT3 na ćelijsku membranu [57, 75]. Inhibitori hENT1, NBMPR, DPM ili diltazem, nemaju uticaja na hENT3 [57]. hENT3 transportuje mnoge purinske i pirimidinske nukleozide uključujući adenin, ali ne i HX. Pored toga, hENT3 vrši transport hemoterapeutskih i antitumorskih lekova kao što su kladribin i fludarabin [57]. hENT3 je u najvećoj meri eksprimiran u placenti, ali je potvrđena

njegova ekspresija i u mozgu [57, 76]. Aktivnost hENT3 je zavisna od protona, tako da je transporter funkcionalan pri niskim pH vrednostima, što odgovara njegovoj lokalizaciji na lizozomima. Iako je nedovoljno proučena, uloga ENT3 bi mogla da bude u recikliranju nukleozida i nukleobaza poreklom od degradiranih nukleinskih kiselina [72].

ENT4

ENT4 (hENT4; SLC29A4) je genetski najudaljeniji od ostalih podtipova ENT. Ekspirira se na membrani ćelija srca i mozga, i pokazano je da iskazuje mali afinitet ka transportu Ado [58, 60, 77]. Transport nukleozida ovim transporterom se aktivira pri niskim pH. ENT4 nije blokiran mikromolarnim koncentracijama NBMPR, iako je delimično inhibiran DPM ili dilazepamom [58]. U srcu, ENT4 može doprineti regulaciji koncentracija Ado nakon ishemije, kada se pH sredine pomera ka kiselim vrednostima [58]. U CNS-u ekspresija ENT4 je uglavnom detektovana na neuronima i u neuropilima [78]. Imunohistohemijom je pokazano prisustvo ENT4 u kori prednjeg mozga, hipokampusu, bazalnim ganglijama, malom mozgu, talamusu i hipotalamusu miša [78].

Iako se do skora mislilo da su od četiri tipa ENT, samo ENT1 i ENT2 ekspimirani u mozgu [71, 79, 80], novije studije su pokazale da se i ENT3 i ENT4 ekspimiraju u moždanom tkivu. Međutim, zbog opisanih specifičnosti ENT3 i ENT4, kao i njihove manje zastupljenosti, nije upotpunosti opisan njihov doprinos transportu nukleozida u CNS-u. Mnogo više pažnje je do sada posvećeno ispitivanju uloge ENT1 i ENT2, posebno nakon što je pokazano da se tokom događaja kao što je ishemija, intraćelijski ATP brzo troši što vodi formiranju Ado koji napušta ćelije putem ENT1 i ENT2 [31]. Dr Parkison i saradnici su tokom poslednjih godina pokazali da u hipoksičnim uslovima u kulturi neuroni otpuštaju Ado, dok astrociti doprinose formiranju Ado putem e-5NT [81]. Sa druge strane, *in*

vitro studije iste grupe rađene na presecima hipokampusa u kulturi su pokazale da neuronski transporter ENT1 posreduje preuzimanju vanćelijskog Ado u hipoksiji/ishemiji [53, 82-84]. Neslaganja u rezultatima dobijenim u različitim eksperimentalnim postavkama ostavljaju otvorenim pitanje koji tip moždanih ćelija i u kojoj meri doprinosi kruženju adenozina nakon povrede.

1.3.2. Koncentrišući nukleozidni transporteri (CNT)

Druga familija nukleozidnih transportera predstavlja koncentrišuće nukleozidne transportere (CNT; SLC28) koju čine tri podtipa CNT1, CNT2 i CNT3 [52]. Zajedno sa ENT, CNT igraju ulogu u transportu purina, pirimidina i nukleozidnih analoga (lekova). Dok su ENT posrednici dvosmerne translokacije purina kroz membranu, CNT-ovi posreduju jednosmeran transport purina i pirimidina. Ovo je energetski zahtevan proces, koji se obavlja uz utrošak natrijumovog jona [85-87]. CNT podležu konformacionoj promeni zavisnoj od Na⁺ ili H⁺, što je praćeno vezivanjem i prenosom supstrata [86, 87]. Odnos razmene natrijuma za nukleozid kod hCNT1/2 je 1:1 [85, 87], dok su hCNT3 potrebna dva jona natrijuma (2:1) po molekulu nukleozida [88].

Svaki podtip CNT ima specifične afinitete prema različitim supstratima ali su svi CNT sposobni da transportuju uridin. Čovečji CNT1 je selektivan za pirimidinske nukleozide, pa iako može da veže Ado sa visokim afinitetom, ne može da ga translocira kroz membranu [85, 89]. hCNT2 je selektivan za purinske nukleozide, dok hCNT3 transportuje i purinske i pirimidinske nukleozide [86, 88, 90, 91]. Sva tri CNT vrše transport antitumorskih i antivirusnih nukleozidnih analoga (lekova).

Distribucija CNT varira u zavisnosti od podtipa, ali sva tri CNT su eksprimirana u mozgu. CNT3 ima široku rasprostranjenost, dok CNT1/2 se mahom nalaze u unutarćelijskim odeljcima [88, 92]. U CNS-u CNT1 je visoko

ekspimiran u kori mozga, nešto manje u horoidnom pleksusu, hipotalamusu i hipokampusu, i najmanje u strijatumu pacova [93]. Ekspresija CNT2 u mozgu je ujednačena [93, 94]. *In vitro* kulture mišjih neurona i astrocita su pokazale da je CNT2 prisutan na ova dva tipa glijških ćelija [69, 80]. Kod miša [76] i čoveka [88], CNT3 je slabo ekspimiran u mozgu, dok u pacovskim kulturama neurona i astrocita CNT3 nije detektovan [69].

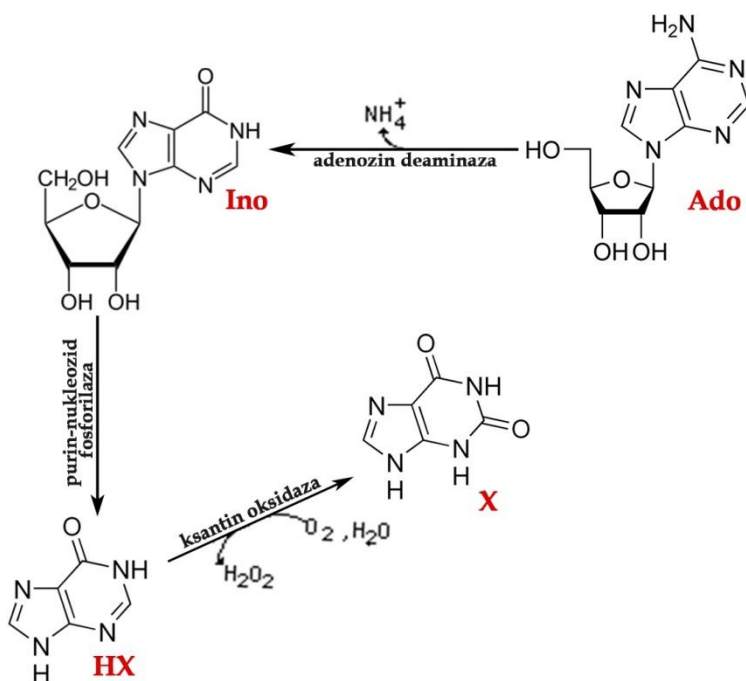
1.4. Metabolizam adenzina

Ado se metaboliše posredstvom dva enzima - adenzin deaminazom (ADA) i adenzin kinazom (AK). Deaminacijom nastaje inozin (Ino), čije su ćelijske koncentracije u fiziološkim uslovima obično bliske koncentracijama Ado. Drugi put uključuje adenzin kinazu (AK), koja fosforiliše Ado do AMP. Aktivnost AK zahteva magnezijum i ATP [95], pa do inhibicije AK dolazi kada su koncentracije Mg^{2+} i ATP niske [96] ili kada su koncentracije Ado visoke [97].

ADA ireverzibilno deaminuje Ado do Ino (Slika 2). U CNS-u, ADA je u najvećoj meri ekspimirana u horoidnom pleksusu, hipotalamusu, mirisnoj kvržici i gornjim kvržicama srednjeg mozga, a manje u hipokampusu i žuljevitom telu [98]. Takođe je zapaženo da je aktivnost ADA daleko veća u primarnim kulturama astrocitima nego neurona [99, 100]. Kod čoveka postoje tri izoforme ADA - dve solubilne (ADA1 i ADA2) i ekto-enzim (ekto-ADA) [101, 102].

Ranije se smatralo da produkti metabolizma Ado nemaju značajnije uloge. Ipak za Ino se danas zna da poseduje imunomodulatorne i neuroprotektivne efekte [103]. Kao i Ado, Ino je uključen u vanćelijsku signalizaciju, kako u fiziološkim tako i u patološkim procesima. Ino se može formirati unutar ili van ćelije. U prvom slučaju, visoki nivoi unutarćelijskog ili vanćelijskog Ado (asocirani sa ćelijskim stresom usled ishemije ili hipoksije) se deaminacijom prevode u Ino [104]. U drugom slučaju, Ino nastaje kao produkt aktivnosti ekto-ADA ili defosforilacijom

inozin monofosfat (IMP) ekto-5`-nukleotidazom (e-5NT) [105]. Transport Ino iz vanćelijskog ili unutarćelijskog prostora je posredovan koncentrišućim ili ekvilibrišućim nukleozidnim transporterima (CNT ili ENT). Za ove transportere Ado i Ino su kompetitivni supstrati [106]. Kao Ado, i vanćelijske koncentracije Ino se povećavaju u metabolički stresnim stanjima, kao što su inflamacija ili ishemija [44, 107].



Slika 2. Metabolizam Ado. Ado je supstrat za enzim ADA, koji ga konvertuje do Ino. Ino se dalje može metabolisati purin-nukleozid fosforilazom do HX, koji dalje ksantin oksidaza prevodi u X.

Inozinski receptori do sada nisu indentifikovani; ipak pokazano je da mikromolarne koncentracije Ino aktiviraju A_{2A} i A_3 receptore [108–110]. Postoji nekoliko radova koji sugerišu da Ino doprinosi neuroprotekciji utičući na bolje preživljavanje astrocita u kulturi nakon deprivacije glukoze i kiseonika [111], kao i da Ino promoviše izrastanje aksona nakon povrede kod pacova [112]. Pored toga, smatra se da je Ino potencijalni kandidat u terapiji multiple skleroze [113], Turetovog sindroma [114] i moždane ishemije.

Inozin je supstrat za enzim purin-nukleozid fosforilazu (PNP), koji konvertuje Ino do hipoksantina (HX) i ribozo-1-fosfata (Slika 2). HX se dalje može metabolisati dalje ksantin-oksidadom do ksantina (X) ili, alternativno, može biti konvertovan do IMP posredstvom hipoksantin-guanin fosforibozil transferaze (HPGRT). Zabeleženo je da su tokom moždane ishemije nivoi HX povećani, ali je pokazano i da HX nema neuroprotektivna svojstva [111]. Sasvim suprotno, pokazano je da akumulacija HX doprinosi oksidativnom stresu nakon reoksigenacije tkiva; visoki nivoi HX su verovatno posledica povećanog utroška energije koja rezultira visokim nivoom metabolizma purina [115].

2. Purinski nukleotidi u centralnom nervnom sistemu

Dok sam ATP ima ekscitatorne efekte, njegovom degradacijom van ćelije se akumulira Ado koji povećava inhibitorni tonus u CNS-u [116–118]. U različitim regionima CNS-a, ATP je prisutan u različitim koncentracijama van ćelije, koje variraju od 2 do 4 mmol/kg [119].

ATP se otpušta u vanćelijsku sredinu posredstvom nekoliko do sada prepoznatih mehanizama: 1) egzocitozom, 2) vezikularnim nukleotidnim transporterom (VNUT) iz neurona ali i iz astrocita [120, 121], 3), kao kotransmiter sa drugim neurotransmiterima [122–124], 4) ATP-vezujućim kasetnim transporterima, 5) koneksinima ili paneksinima (hemikanali), 6) voltažno-zavisnim anjonskim kanalima, 7) dilatiranim P2X7 receptorima [125, 126].

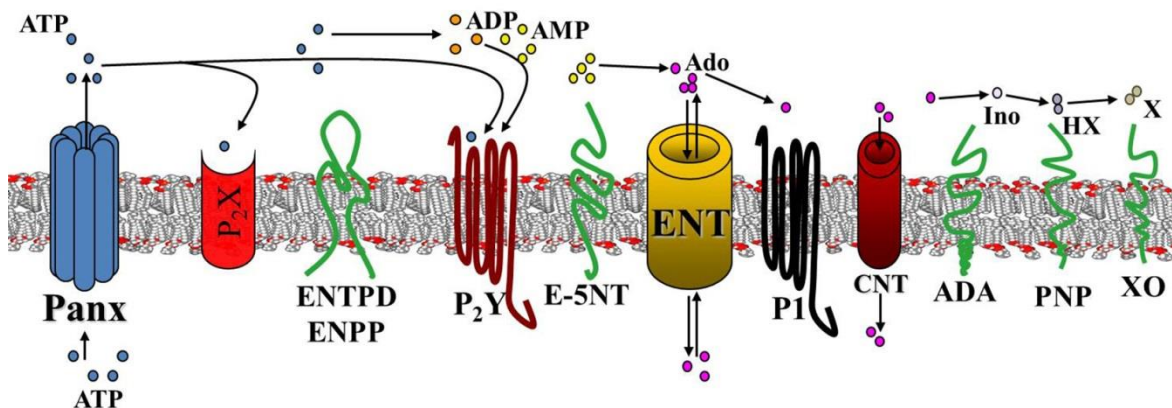
ATP i ostali adeninski nukleotidi u vanćelijskom prostoru predstavljaju supstrate za nekoliko familija ektonukleotidaza: ekto-nukleotid-5'-trifosfat difosfohidrolaze (e-NTPDaza), ekto-nukleozidpirofosfataze i/ili fosfodisteraza (e-NPP), alkalne fosfataze i ekto-5' nukleotidaze (e-5NT). Ovi ekto-enzimi imaju ključnu ulogu u kontroli purinske signalizacije određujući dostupnost liganada za P1 i P2 receptore.

2.1. Signalizacija purinskim nukleotidima i purinski receptori

Efekti adeninskih jedinjenja na biološke funkcije su pokazani još 1929-te godine [127], i vremenom je utvrđeno da među purinima adenozin trifosfat (ATP) i adenozin (Ado) ostvaruju najznačajnije efekte.

Pored toga što je sinonim za izvor energije u ćelijama, ATP je jednako važan signalni molekul. Iako se dugo smatralo da je prisustvo ATP u vanćelijskom prostoru usko povezano sa patološkim procesima, danas se zna da je signalizacija ATP-om u velikoj meri prisutna i u fiziološkim uslovima. U nervnom sistemu, ATP je prepoznat kao kotransmiter i neurotransmiter [2, 5, 21]. ATP se "pakuje" u vezikule i otpušta u sinaptički prostor samostalno ili sa drugim neurotransmiterima (na primer sa gama-aminobuternom kiselinom (GABA), glutamatom, dopaminom, noradrenalinom) [125, 128]. Iz glijskih ćelija, osim vezikularne egzocitoze, ATP-a se oslobađa posredstvom transportera, hemikanala ili dilatiranih P2X7 receptora [21, 125, 128, 129]. ATP i ostali purini se takođe otpuštaju iz oštećenih i umirućih ćelija i predstavljaju signal ćelijske smrti [21]. Nakon što se nađe u vanćelijskom prostoru, ATP biva brzo hidrolizovan od strane enzima ektonukleotidaza [130] do adenozin difosfata (ADP), adenozin monofosfata (AMP) i konačno Ado. Ovaj proces je fiziološki veoma važan jer su produkti ove degradacije molekuli koji takođe učestvuju u purinskoj signalizaciji. Štaviše, orkestracija svih učesnika u purinskoj signalizaciji utiče na vanćelijske koncentracije purina i samim tim na odgovor ćelija koji se ostvaruje aktivacijom dve klase purinskih receptora (Slika 3). Metabotropni P1 receptori su rezervisani za adenozin, dok se nukleotidni P2 receptori dele na dve podklase: P2Y i P2X receptore [107].

Vanćelijski prostor



Unutarćelijski prostor

Slika 3. Šematski prikaz učesnika purinske transmisije. ATP se u vanćelijskoj sredini može naći posredstvom hemikanala paneksina (Panx), gde ostvaruje efekte preko P₂ receptora i predstavlja supstrat za ektonukleotidaze (ENTPD, ENPP), koje vrše hidrolizu do ADP, AMP, i konačno adenzina (Ado). U vanćelijskoj sredini, Ado preko P₁ receptora pokreće kaskadu reakcija u zavisnosti od tipa adenzinskog receptora koji je izražen na membrani. Ado se transportuje shodno koncentracionom gradijentu putem ENT, ili u ćeliju (uz utrošak Na⁺) putem CNT. Adenzin deaminaza (ADA) vrši deaminaciju Ado do inozina (Ino), koji takođe predstavlja supstrat za nukleozidne transportere. Ino biva konvertovan do hipoksantina (HX) purin-nukleozid fosforilazom (PNP), a ksantin oksidaza (XO) dalje prevodi HX u ksantin (X).

2.1 P₂X receptori

P₂X receptori su ligand-zavisni jonski kanali, propustljivi za Ca²⁺, Na⁺ i K⁺ [21, 107]. Do danas je klonirano i farmakološki identifikovano sedam podtipova, P₂X₁₋₇, koji dele 30-50% homologije u sekvenci. P₂X receptore čine tri subjedinice koje formiraju homo- ili heteromultimere [131, 132]. U mozgu P₂X receptori su u najvećoj meri ekspimirani na neuronima, zatim astrocitima i oligodendrocitima [5].

Po aktivaciji, P2X receptori posreduju u ulasku Ca^{2+} u neurone, izazivaju depolarizaciju membrane [133] i iniciraju Ca^{2+} zavisnu signalizaciju [134], uključujući i oslobađanje neurotransmitera [135]. Propustljivost za kalcijum zavisi od kombinacije subjedinica, to jest od toga koji je podtip P2X receptora aktiviran. Aktivacija P2X receptora se smatra važnom u regulaciji sinaptičke plastičnosti [134].

2.2. P2Y receptori

Familija P2Y receptora obuhvata metabotropne receptore, funkcionalno spregnute sa proteinom G. U zavisnosti od proteinske sekvence i tipa proteina G za koji su vezani razlikuje se osam podtipova P2Y [136]. Prva podgrupa (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, i P2Y₁₁) je spregnuta za G_q/G₁₁ koji aktivira PLC, IP₃ i pokreće unutarćelijsku Ca^{2+} signalizaciju [21]. Druga podgrupa (P2Y₁₂, P2Y₁₃, i P2Y₁₄) je vezana za G_{i/o}, i aktivacijom ovih receptora dolazi do smanjenja nivoa adenil ciklaze i menjajući signalizaciju posredovanu cikličnim AMP-om (cAMP) [136, 137]. Ligandi P2Y receptora pored ATP uključuju i ADP, UTP i UDP, šećerne nukleotide, ali i skoro identifikovane cisteinil-leukotriene [128]. P2Y receptori su veoma zastupljeni u CNS-u, i na neuronima i na astrocitima [138]. Kao i kod P2X receptora, i P2Y mogu formirati homo- ili heterodimere sa drugim podtipovima P2Y receptora [139] ili P1 receptorima [140]. P2Y receptori interferiraju i sa signalnim putevima nishodno od receptora spregnutih sa tirozin-kinazom, kao što su Trk receptori za neurotrofine [141, 142].

2.2. Vanćelijski metabolizam purinskih nukleotida

e-NTPDaze

Do danas je opisano 8 tipova e-NTPDaza, od kojih su samo e-NTPDaze 1-3 i 8 membranski enzimi. e-NTPDaza1 (CD39, ekto-apiraza, ekto-ATP difosforilaza) kao supstrate koristi ATP ili ADP [143, 144] defosforilišući ih do AMP. e-

NTPDaza1 se može naći na mikroglijskim, endotelnim kao i glatkim mišićnim ćelijama [145]. Naši prethodni rezultati ukazali su na to da je osim na mikrogliji e-NTPDaza1 ispoljena i na neuronima [146]. U CNS-u visoko je eksprimirana u talamusu, putamenu, i hipokampusu [147]. e-NTPDaza2 je selektivna za ATP i identifikovana je na progenitorima neurona i ne-mijelinizirajućim Švanovim ćelijama [148]. Aktivnost e-NTPDaze2 je najveća u oblasti dentatnog girusa, subventrikularne zone i rostralnog migratornog puta [147]. e-NTPDaza3 koristi ATP i ADP kao supstrate, i uglavnom je eksprimirana u hipotalamusu i korteksu [147]. Podtipovi e-NTPDaza5 i 6 su locirani u citosolu ćelije, a 4 i 7 se nalaze na luminalnoj strani Goldžijevog aparata, lizozoma i autofagih vakuola [149, 150].

e-NPPaze

Danas je poznato sedam varijanti e-NPP enzima, sa širokom supstratnom specifičnošću u hidrolizi pirofosfatnih i fosfodiestarskih veza. Tri člana ove familije (1-3) defosforilišu ATP, ADP, nikotinamid adenin dinukletid (NAD⁺) i dinukleotid polifosfate. Kod čoveka, e-NPPaza1-3 su eksprimirani u većini tkiva. U CNS-u, e-NPPaza1 je lociran na endotelu moždanih kapilara ali ne i na astrocitima ili neuronima [151]. Ekspresija e-NPPaze2 u CNS-u je ograničena na ćelije horoidnog pleksusa, cerebrospinalnu tečnost [152] i nezrele oligodendrocite [147, 153]. E-NPPaza3 je detektovan na glijskim ćelijama tokom razvića, zatim u prekursorima ali ne i u zrelim astrocitima [154].

Alkalna fosfataza

AP je najmanje proučena familija ektonukleotidaza. Široko je eksprimirana i takođe poseduje široku supstratnu specifičnost i može da hidrolizuje nukleozid 5'-tri-, di-, monofosfate [143, 155]. AP hidrolizuje ATP do Ado uz oslobađanje neorganskog fosfata. AP mogu biti membranski enzimi, ukotvljeni za membranu

glikozil-fosfatidilinozitol (GPI) vezom, ili solubilne u serumu. Druge izoforme AP, kao što je tkivno-nespecifična AP (TNAP), su široko eksprimirane u CNS [147, 156, 157]. Fiziološka uloga TNAP u kontroli prometa Ado je još uvek pod znakom pitanja. Iako je optimalna aktivnost enzima na baznim pH, on takođe može da hidrolizuje ATP do Ado i na fiziološkim pH. Skorašnja studija je pokazala da inhibicija TNAP levamizolom u olfaktornom bulbusu miša smanjuje komunikaciju između neurona i astrocita [158]. Prema ovome, može se zaključiti da TNAP igra značajnu a još uvek nedovoljno ispitanu ulogu u signalizaciji purinima.

Ekto-5'-nukleotidaza (e-5NT, CD73)

U mozgu, e-5NT je mahom locirana na membrani astrocita, mikroglije i oligodendrocita [159, 160]. Ovaj enzim ima visok afinitet za AMP i kompetitivno je inhibiran sa ATP, ADP i α,β -metilen adenozin difosfatom (AOPCP) [143, 161]. e-5NT je ukotvljen za membranu GPI vezom, ili vanćelijski solubilisan nakon isecanja fosfatidil-inozitol fosfolipazom C [155, 162, 163].

e-5NT igra centralnu ulogu u generisanju vanćelijskog Ado od otpuštenih adeninskih nukleotida u mozgu. U CNS-u, e-5NT je opisan kao marker oligodendrocita [164–166], astrocita i aktivirane mikroglije [165–167]. U nezrelim neuronima, e-5NT je eksprimirana tokom razvića [168]. Iz naših rezultata je takođe očigledno da je e-5NT eksprimirana i na neuronima [146].

Smatra se da u ishemičnim stanjima e-5NT ima protektivnu ulogu, generisanjem Ado koji ograničava aktivnost ekscitatornih neurotransmitera i samim tim sprečava neuronsku smrt [169]. Naši prethodni rezultati su pokazali da e-5NT ispoljava bifazne promene u aktivnosti i ekspresiji nakon ubodne povrede kore mozga u vidu ranog smanjenja [170], praćeno ushodnom regulacijom ekspresije i aktivnosti enzima do 2 nedelje nakon povrede [171, 172]. Takođe smo

pokazali da nakon povrede kore mozga dolazi do gubitka e-5NT na membrani neurona i povećanja ekspresije u e-5NT-pozitivnim reaktivnim astrocitima [171].

3. Traumatska povreda mozga

Naše razumevanje procesa koji se nalaze u osnovi traumatske povrede mozga (TPM) je danas svakako daleko bolje nego pre jedne decenije. Ipak, i dalje postoji jaz između znanja i domena kliničke upotrebe. Iako je procena neurološkog ishoda i saniranje povrede danas na daleko višem nivou, mnogi prognostički i terapijski pristupi i dalje nisu klinički ispitani ili se retko koriste. TPM stoga ostaje jedan od vodećih uzroka invaliditeta i smrtnosti među radno sposobnim stanovništvom razvijenih zemalja i globalno predstavlja, ne samo ozbiljan medicinski, već i ozbiljan ekonomski problem [173].

TPM karakterišu dve faze - primarna i sekundarna povreda. Primarna povreda je rezultat delovanja mehaničke sile, koja je zapravo okidač kaskade reakcija koje su objedinjene u koncept sekundarne povrede. Sekundarna povreda evoluirala tokom vremena i može trajati danima i mesecima, uzrokujući dalja oštećenja u mozgu i degeneraciju neurona. Stoga se TPM može smatrati hroničnim oboljenjem a sekundarna povreda glavnom terapijskom metom [174].

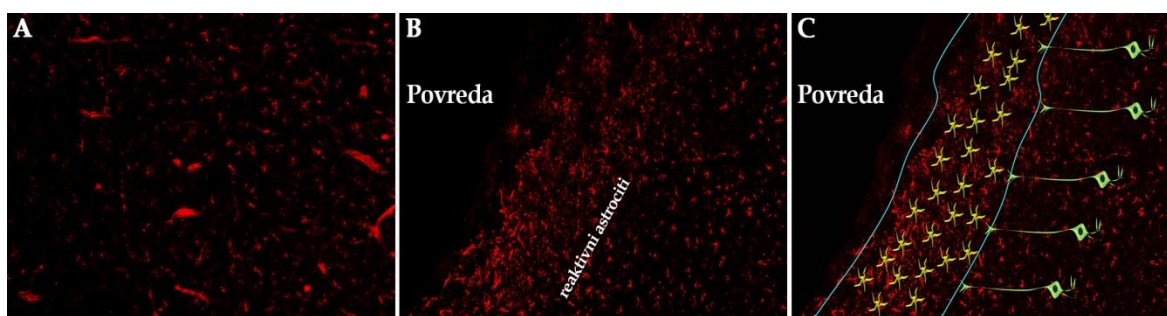
Sekundarna povreda predstavlja kombinaciju ishemičnih, inflamatornih i citotoksičnih procesa. Jedan od najznačajnijih faktora koji uzrokuju sekundarnu povredu mozga je preterano oslobađanje ekscitatornih aminokiselina kao što su glutamat i aspartat [175, 176]. Inflamatorni procesi traju od nekoliko dana do više nedelja, u zavisnosti od veličine i mesta povrede, i često nisu ograničeni na mozak, već imaju sistemske efekte. Najvažniji molekuli u ovoj kaskadi su faktori rasta, kateholamini, neurokini, citokini i hemokini [177].

3.1. Glijski ožiljak

Jedan od događaja u danima nakon povrede CNS-a je formiranje glijskog ožiljka kojim se oštećeno mesto izoluje od okolnog tkiva. Nekoliko ćelijskih tipova, astrociti, mikroglija i prekursori oligodendrocita, odgovaraju na povredu proliferacijom, povećanom ekspresijom specifičnih ćelijskih markera i morfološkim promenama [175]. Glijski ožiljak je rezultat upravo procesa koji se zove reaktivna gliozna. Iako sprečava širenje sekundarne povrede, glijski ožiljak istovremeno predstavlja barijeru koja sprečava regeneraciju aksona na mestu lezije.

Prve ćelije na mestu povrede su makrofagi, a kroz 24 časa dolazi do aktivacije mikroglije [178]. Aktivna ameboidna mikroglija, zajedno sa makrofagima učestvuje u otklanjanju debrisu.

Najvažnije mesto u nastanku glijskog ožiljka imaju astrociti (Slika 4). Oni zamenjuju mikrogliju oko lezije i upravo ove ćelije formiraju tkivo barijere. Poznate uloge reaktivnih astrocita su brojne i obuhvataju ograničavanje ozleđenog tkiva i restrikciju inflamacije, stimulaciju oporavka krvno-moždane barijere, zaštitu neurona i oligodendrocita, ali i neurotoksičnost, inhibiciju regeneracije aksona [176, 177].



Slika 4. *Reaktivna astrogliozna.* Astrociti (crveno)obeleženi GFAP-om su prisutni u kori mozga pacova (A). Nakon povrede, astrociti prelaze u reaktivnu formu, dele se i morfološki menjaju, i migriraju na mesto povrede (B). Tokom vremena, reaktivni astrociti formiraju glijski ožiljak, koji onemogućava neurone da premoste povredu (C).

Reaktivni astrociti se odlikuju visokim sadržajem glijskog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) kao i drugim indtermedijarnim filamentima kao što je vimentin. GFAP i vimentin imaju važnu ulogu u procesu reaktivne astroglioze. Pokazano je da dupli „knockout“ miševi (GFAP^{-/-}, VIM^{-/-}) ne mogu da formiraju normalan fenotip CNS-a kao ni glijski ožiljak nakon povrede [179]. Pored pomenutog, u astrocitima je zabeležena ushodna regulacija drugih proteina, uključujući hondroitin sulfat proteoglikane (CSPG) [180–182]. U adultnom mozgu, CSPG su neophodni, s obzirom da održavaju strukturu vanćelijskog matriksa, stabilizuju sinapse i pravilno grananje aksona, te tako doprinose plastičnosti [183, 184]. Smatra se da svi tipovi moždanih ćelija doprinose produkciji ovih fizioloških nivoa CSPG [184]. Međutim, u patološkim stanjima, dolazi do izražene ushodne regulacije CSPG i ona je uglavnom pripisana aktivaciji astrocita [185].

3.2. Modeli traumatske povrede mozga

U poslednjih nekoliko decenija uložen je napor da se uspostave adekvatni animalni modeli TPM. U najvećem broju istraživanja u ovom polju koriste se glodari, pre svega zbog sličnosti koje dele sa čovekom u funkcionalnoj organizaciji kortikalnih i subkortikalnih struktura, ekonomičnosti i odgovarajuće dužine životnog veka i vremena generacije.

Brojni *in vivo* i *in vitro* modeli opisani su sa ciljem da se rasvetle patobiološki procesi koji su osnova TPM i testiraju potencijalni tretmani. Imajući u vidu da je TPM kompleksno oboljenje, ovi modeli se međusobno razlikuju shodno aspektu TPM koji se ispituje. *In vivo* modeli orijentisani su ka ispitivanju i tretmanu sekundarne povrede, koja je u najvećoj meri okarakterisana procesom reaktivne astroglioze. Ubodna lezija somatosenzornog korteksa pacova, animalni *in vivo* model TPM koji je odabran za ovaj rad, spada u kategoriju akutne povrede koja

podrazumeva neposrednu mehaničku ozledu lobanje i mozga [186]. Ova povreda nema očigledne uticaje na promene u ponašanju životinje, a karakteriše se umerenom astrogliozom (Slika 4).

Brojni *in vitro* modeli su takođe osmišljeni kako bi se reprodukovale karakteristike od interesa u izolovanom sistemu i dozvolile manipulacije, monitoring na više nivoa u realnom vremenu, u kontrolisanim uslovima [187, 188]. Jedan od takvih modela je i je i povreda ćelijskog jednosloja skarifikacijom (engl. „scratch wound“ esej, SW), isprva ustanovljen kao ponovljiv, jeftin test za analizu ćelijske migracije *in vitro* [189]. SW model je ubrzo široko prihvaćen u ispitivanju različitih aspektata odgovora astrocita na mehaničku povredu [190–193]. Stoga je i u ovom radu detaljnije ispitan i korišćen SW model u kulturi primarnih kortikalnih astrocita pacova.

3.3. Uloga adenzina u povredi i oporavku centralnog nervnog sistema

Astrociti se smatraju ključnim regulatorima endogenog adenzina [194, 195]. Astrociti predstavljaju veliki izvor ATP-a koji se može osloboditi u sinaptički prostor [196, 197], gde se brzo metaboliše ektonukleotidazama do adenzina [54, 128]. U svojim pionirskim eksperimentima na retini pacova, Newman je pokazao da aktivacija glijskih ćelija smanjuje aktivnost neurona koji iskazuju spontanu aktivnost [198]. Ovaj efekat se gubi nakon dodavanja antagonista A₁ receptora ili inhibitora ekto-ATP-aza [199]. Ovi rezultati su demonstrirali da aktivirani astrociti mogu da inhibiraju neurone otpuštanjem ATP, odnosno njegovom konverzijom u Ado ektonukleotidazama i aktivacijom adenzinskih receptora na neuronima.

U elegantnoj seriji eksperimenata Haydon i saradnici su pokazali da je ATP poreklom od astrocita regulator sinaptičke veze i plastičnosti [197]. U ovim eksperimentima autori su selektivno eksprimirali dominantno-negativni SNARE

domen u astrocitima miševa i time blokirali gliotransmisiju, uključujući i otpuštanje ATP-a. Kod kontrolnih miševa, astrociti su tonično suprimirali sinaptičku transmisiju otpuštanjem ATP-a kao prekursora Ado, dok je ovaj efekat izostao kod transgenih miševa.

Ovi i slični rezultati na temu kontrolisanog otpuštanja ATP kroz lizozomalnu egzocitozu od strane astrocita [121], ukazuju na to da astrociti – regulacijom otpuštanja prekursora Ado, to jest ATP-a – igraju važnu i suštinsku ulogu u regulaciji koordinacije sinaptičke veze, plastičnosti, i sinaptičkih mreža [197, 200].

Još jedan potencijalan mehanizam koji bi mogao da reguliše vanćelijske koncentracije Ado je mehanizam posredovan NT. Astrociti poseduju dva tipa ekvilibrišućih transportera, ENT1 i ENT2, [71], koji omogućavaju brzo uspostavljanje ravnoteže vanćelijskog i unutarćelijskog nivoa Ado [194, 195]. Korišćenjem tehnike mikrodijalize pokazano je da inhibitori transportera (DPM, NBMPR i lidoflazin) povećavaju vanćelijske koncentracije Ado u strijatumu pacova [201]. U *in vitro* studijama je pokušano da se dođe do odgovora koje tip moždanih ćelija doprinosi kruženju adenzina putem ENT. Tako je pokazano da neuroni u kulturi otpuštaju Ado u hipoksičnim uslovima, a ovaj efekat je poništen dodavanjem DPM. Međutim, sasvim suprotan efekat je primećen u hipokampalnim slajs kulturama i *in vivo* studijama – neuroni su putem hENT1 preuzimali Ado iz vanćelijske sredine [82]. S obzirom na značajnu ekspresiju ENT1 i ENT2 na astrocitima, ostaje nepoznato kakva je uloga ovih transportera u putu adenzina posredovanom astrocitima.

Za razliku od neurotransmitera za čije ponovno preuzimanje iz sinaptičkog prostora odvija uz utrošak energije, takav sistem ne postoji za Ado. Nasuprot, unutarćelijski [202] astrocitni enzim AK izgleda da kompenzuje tu ulogu, u vidu metabolički aktivnog sistema za preuzimanje Ado [203].

Dok se mozak razvija, AK je prisutna primarno u neuronima, međutim u adultnom mozgu ekspresija AK je karakteristika citosola astrocita. Vanćelijski Ado se NT-ima preuzima u astrocite, gde biva fosforilisana u AMP od strane AK. Iako AK nije studirana u TPM, pokazano je da je AK značajan faktor u mnogim neurološkim poremećajima [194]. Tako je, na primer, u ishemiji ushodna regulacija AK povezana sa lošim ishodom [204], dok su hronične bolesti kao što je epilepsija povezane sa astrogliozom i ushodnom regulacijom AK u brojnim modelima [195].

Pokazano je da astrocitna AK reguliše bazalne sinaptičke nivoe Ado i kao i one zabeležene pri epileptičnim napadima, ali ne i otpuštanje Ado u hipokampusu zavisno od neuronske aktivnosti [205, 206].

Ako uzmemo u obzir da su astrociti važni regulatori gotovo svih neuroloških (fizioloških i patoloških) procesa, očigledno je da je važno razjasniti koji put i pod kojim uslovima astrociti koriste u orkestriranju vanćelijskih koncentracija Ado. Upravo ovaj mehanizam bi mogao da predstavlja mesto terapije nakon TPM ali i u drugim oboljenjima CNS-a. Pored toga, astrociti su sastavni deo tripartitne sinapse, te bi se rasvetljavanjemnačinana koje astrociti regulišu nivoe neuromodulatora Adodoprinelyo razumevanju jednog od najvažnijih pitanja neuronauka – plastičnosti CNS-a.

II Ciljevi rada

Imajući u vidu uloge adenzina u fiziološkim i patofiziološkim procesima u CNS-u, zadatak ove doktorske teze je bio da se ustanovi uticaj mehaničke povrede kore mozga na funkciju komponenti adenzinskog sistema. U tom smislu, definisani su sledeći ciljevi:

- S obzirom na to da u literaturi ne postoje podaci o šablonu ekspresije ENT1 i ENT2 na nivou iRNK i proteina, kao ni podaci o ćelijskoj distribuciji ovih transportera u korteksu pacova nakon povrede, prvi cilj bilo je rasvetljavanje ovih pitanja. Dalje, zbog svoje uloge u regulisanju koncentracija vanćelijskih nukleotida i adenzina u ciljeve smo uvrstili i ispitivanje promena ekspresije enzima ektonukleotidaza.
- Poznato je da astrociti u velikoj meri doprinose regulaciji vanćelijskih koncentracija adenzina kako u fiziološkim tako i u patološkim stanjima, iako su mehanizmi i dalje nepotpuno razjašnjeni. Stoga je sledeći cilj bio ispitivanje ekspresije ENT1 i ENT2 na nivou RNK i proteina u primarnoj kulturi kortikalnih astrocita i *in vitro* modelu povrede. Kako bi se dobila kompletnija slika o ulozi astrocita u regulaciji vanćelijskih koncentracija nukleotida, ispitane su i promene u ekspresiji e-5NT, enzima odgovornog za hidrolizu AMP do adenzina.
- Kako bi se opisala uloga astrocita u kontroli nivoa adenzina i adenzinskih metabolita u vanćelijskom prostoru, praćene su promene njihovih koncentracija u ćelijskom medijumu, u različitim vremenima nakon povrede ili tretmana. U cilju davanja odgovora na pitanje da li i na koji način ENT1 i ENT2 doprinose tim procesima u astrocitima,

koncentracije adenzina i njegovih metabolita merene su nakon farmakoloske blokade ovih transportera.

- Kako bismo uporedili odgovor astrocita na mehaničku i hipoksičnu povredu, poseban cilj bio je ispitivanje aktivnosti komponenti adenzinskog sistema u uslovima hemijski izazvane hipoksije u kulturi astrocita.

Rezultati ovog istraživanja u velikoj meri doprinose boljem razumevanju statusa pojedinih komponenti adenzinskog sistema nakon povrede nervnog tkiva. Pored toga, izneseni rezultati bi mogli biti od značaja i sugerisati mesta farmakoloških manipulacija u budućim terapijskim pristupima lečenja traumatske povrede mozga.

III Materijal i metode

1. Eksperimentalne životnje

U *in vivo* eksperimentima su korišćeni su mužjaci pacova Wistar soja, starosti 12 nedelja i prosečne težine 200 – 250 g. Tokom eksperimenta životinje su bile smeštene u kavezima (3 – 5 po kavezu, odnosno po 2 u post-operativnom periodu), pri standardnim uslovima u prostoriji (temperatura: 23 ± 2 °C; relativna vlažnost vazduha: 60 – 70 %), sa slobodnim pristupom vodi i briketiranoj hrani, i svetlosnom režimu 12 časova dan/12 časova noć.

Za *in vitro* eksperimente tj. za pripremu primarnih glijskih kultura korišćeni su pacovi istog soja starosti do 3 dana.

Životinje su uzgajane u odgajalištu Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. Svi eksperimenti su bili odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (rešenje broj 2-34/11).

2. Reagensi

2.1. Rastvori i medijumi

Tabela 1. Reagensi

Naziv	Proizvođač
BSA	eng. <i>Bovine Serum Albumin</i> , Goveđi serum albumin, (Sigma, Nemačka)

EDTA	Etilendiaminotetra-sirćetna kiselina-dinatrijumova so, dihidrat, (Kemika, Hrvatska)
Fluorescentna boja za jedra	DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol, Invitrogen, USA)
HEPES	2-Hidroksietil piperazin-N'-2-etan sulfonska kiselina, (SERVA Electrophoresis, Nemačka)
NaOH	Natrijum hidroksid, (Merck, Nemačka)
BCA kit za određivanje koncentracije proteina	Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, SAD)
Saharoza	(Sigma, Nemačka)
Tris	Tris (hidroksimetil) amino-metan (SERVA Electrophoresis, Nemačka)
LDH kit	Promega, Nemačka
MTT kit	Sigma, Nemačka

Tabela 2. Rastvori za nesterilni rad

Naziv	Sastav i proizvođač
0,01 M PBS	<u>Rastvor Na-fosfatnog pufera:</u> 50 ml 0,2 M PB 8,7 g NaCl (Merck, Nemačka) do 1000 ml mqH ₂ O
0,2 M PB (eng. <i>Phosphate buffer</i>)	<u>0,2 M Fosfatni pufer:</u> 0,2 M NaH ₂ PO ₄ (Merck, Nemačka) 0,2 M Na ₂ HPO ₄ (Merck, Nemačka) mqH ₂ O pH 7,4
Citratni pufer	<u>1M Citratni pufer, pH 6</u>

	1 g citratne kiseline 6.1 g tri-natrijum citrata do 500 ml m _q H ₂ O
2-metil butan	(Sigma, Nemačka)
4 % PFA, pH 7,4	40 g paraformaldehid (Sigma, Nemačka) 500 ml dH ₂ O 1M NaOH 500 ml 0,2 M PB
Etanol	100 %, 96 %, 70 %, (Moss Hemos, Srbija)
Triton-X100	0.3% rastvor
Zoletil	Tiletamine-zolazepam, anestetik, (Virbac, Francuska)
Fiziološki rastvor	0,9 % NaCl, (Hemofarm, Srbija)
RIPA pufer	50 mM Tris-Cl pH 7.5 150 mM NaCl 1% NP-40 0.1% SDS 10 mM EDTA 10 mM EGTA 0.5% Triton X-100
H ₂ O ₂	33 % (Centrohém, Beograd)
Rastvor luminola	<u>Za 100ml radnog rastvora:</u> 1 ml 0.1g luminola (Sigma, Nemačka) 0.44 ml p-kumarinske kiseline u DMSO (Sigma, Nemačka) 10 ml 1M TRIS-HCl, pH 8.5

	88.6 ml ddH ₂ O
Gel za razdvajanje proteina	<p>SDS denaturišući poliakrilamidni gelovi</p> <p><u>Gel za razdvajanje:</u> 7.5% akrilamid/bisakrilamid (29:1, Sigma);</p> <p>0,375 M Tris pH 8,8;</p> <p>0,1% SDS</p> <p><u>Gel za koncentrisanje:</u> 5% akrilamid/bisakrilamid (29:1, Sigma);</p> <p>0,125 M Tris pH 6,8;</p> <p>0,1% SDS</p> <p><u>Polimerizacija:</u> 50 µl 10% amonijum persulfata (ICN) i 5 µl TEMED-a (Serva) na 10 ml rastvora</p>
Pufer za elektroforezu proteina	<p>192 mM glicin;</p> <p>25 mM Tris pH 8,3;</p> <p>0,1% SDS</p>
Pufer za transfer proteina	<p>20% methanol;</p> <p>192 mM glicin;</p> <p>25 mM Tris pH 8,3</p>
Ponceau S boja	<p><u>Radni rastvor:</u></p> <p>1% Ponceau S boje;</p> <p>5% glacijalna sirćetna kiselina;</p> <p>destilovana voda.</p>
Coomassie Brilliant Blue boja	<p>0,25% Coomassie Brilliant Blue R250;</p> <p>10% glacijalna sirćetna kiselina;</p> <p>45% metanol;</p> <p>destilovana voda.</p>

TBS-T pufer	Tris pufer sa dodatkom deterdženta - 0.5% Tween, pH 7.4, (eng. <i>Tris buffered saline-tween, TBS-T</i>)
Mowiol	9,6 g Mowiol-a (Calbiochem, EMD Millipore, SAD) 24 ml glicerola (Lach Ner, Češka)
Sirćetna kiselina	min. 99,5 %, (Kemika, Hrvatska)
TCA	eng. <i>trichloroacetic acid</i> , trihlor-sirćetna kiselina, (Kemika, Hrvatska)
Tripan plavo 0.4 % rastvor	eng. <i>Trypan Blue solution</i> , 0.4%, tečan, sterilan, pogodan za ćelijsku kulturu (Sigma, Nemačka)
FACS pufer	1% FCS 0.2% BSA 2mM EDTA u PBS-u
pFACS pufer	FACS pufer za permeabilizaciju, sa dodatkom 0.2% Tween
Adenozin, ≥99.0%	Sigma, Nemačka
Inozin, ≥99.0%	Sigma, Nemačka
Hipoksantin, ≥99.0%	Sigma, Nemačka
Ksantin, ≥99.5%	Sigma, Nemačka
FACS fiksativ	FACS pufer 4% paraform u odnosu 1:1

Tabela 3. Sterilni rastvori za izolaciju RNK i analizu genske ekspresije

Naziv	Sastav i proizvađač
-------	---------------------

DEPC	dietil-pirokarbonat, potentni inhibitor RNKaze, (Sigma, Nemačka)
DEPC tretirana voda	dodati 1ml 0,1% dietil-pirokarbonata u 1000 ml dH ₂ O, promešati, autoklavirati
Rastvori za izolaciju RNK	TRIZOL® (Invitrogen, SAD) ; PeqGold, (Peqlab, Biotechnologie, Nemačka); hloroform, (Zorka, Srbija); izopropanol (J.T. Baker, SAD); 70 % etanol napravljen u DEPC
Gel za razdvajanje RNK (1% agaroz)	Agaroz (Bioline, Velika Britanija) u TBE puferu
TBE pufer (1x)	<u>Tris-Borat-EDTA pufer (1 L 5x štoka)</u> 54 g Tris-a 27.5 g borne kiseline 20 ml 0.5 M EDTA sterlina, dejonizovana voda do 1 L pH 8
Etidijum-bromid (0.5 µg/ml)	Rastvor etidijum-bromida (10 mg/ml, Bio-Rad, SAD)
Komplet za DNazni tretman	(Fermentas, Litvanija) 10x reakcioni pufer sa MgCl ₂ DNaza I/bez RNaze 25 mM EDTA
Komplet za sintezu cDNK	High Capacity cDNA reverse Transcription Kit, (Applied Biosystems, SAD): 10× RT pufer 10× RT nasumični prajmeri

	25× dNTP Mix
	MultiScribe™ Reverzna Transkriptaza
SYBR Green	eng. <i>PCR Master Mix gene expression assay</i> (Applied Biosystems, UK)
Ultra čista destilovana voda bez DNaze i RNaze	upH ₂ O, eng. <i>UltraPure™ DNase /RNase Free Distilled Water</i> (Invitrogen™/GIBCO, USA)
Rastvor EDTA (za FACS)	10mM EDTA u PBS-u, zagrejati na 37°C

Tabela 4. Medijumi i reagensi za kulturu

Naziv	Sastav i proizvođač
10X PBS, sterilni	Dulbecco-ov bez Ca ²⁺ i Mg ²⁺ , (PAA Laboratories, Austrija)
1X PBS, sterilni	900 ml streilne vode 100 ml 10X PBS sterilnog bez Ca ²⁺ i Mg ²⁺
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, (Gibco, InvitrogenCo, SAD)
DNaza I bez RNaze	(Sigma, Nemačka)
FCS	eng. <i>Fetal Calf serum</i> , Fetalni teleći serum, (PAA Laboratories, Austrija), inaktiviran od 44°C - 53°C u periodu od 10 min
kDMEM (medijum za primarnu mešovitu glijsku kulturu)	DMEM 10 % FCS 1 % streptomycin/penicilin
bkDMEM (medijum za primarnu mešovitu glijsku kulturu)	DMEM bez fenol crvenog (bezbojni) 10 % FCS 1 % streptomycin/penicilin
Rastvor za disocijaciju	<u>za 6 životinja:</u>

	10 ml DMEM; 0,024 g HEPES; 0,002 g EDTA; 0,020 g tripsina
Sterilna voda	(PAA Laboratories, Austrija)
strep/pen	smeša antibiotika streptomicina i penicilina, 100X, (PAA Laboratories, Austrija)
Tripsin	tip XI, iz goveđeg pankreasa (Sigma, Nemačka)
Radni rastvor tripsina	0.25% tripsin, 0.02% EDTA u PBS-u
rastvor PLL-a	10 ml 0.1% Poli-L-lizina (Sigma, Nemačka) u dejonizovanoj vodi 90 ml sterilne, dejonizovane vode

2.2. Antitela

Tabela 5. Primarna antitela

Specifično za	poreklo	reaktivnost na vrste	Proizvođač	Razblaženje
ENT1	zec poliklonsko	pacov	dobijeno od Lauri Alanko	<i>in vivo</i> 1:500
ENT1	zec poliklonsko	pacov, miš, čovek	ProteinTech	<i>in vivo</i> 1:500 <i>in vitro</i> 1:200 FACS 1:200 WB 1:1000
ENT2	zec poliklonsko	pacov	dobijeno od Lauri Alanko	<i>in vivo</i> 1:500
ENT2	miš monoklonsko	pacov, čovek	Santa Cruz Biotechnology	<i>in vivo</i> 1:300 <i>in vitro</i> 1:200 FACS 1:200 WB 1:600
e-5NT	koza poliklonsko	pacov, miš, čovek, pas	Santa Cruz Biotechnology	<i>in vivo</i> 1:200 <i>in vitro</i> 1:200 FACS 1:200
Fosfakan	miš monoklonsko	miš, pacov, svinja, krava, čovek	Chemicon	<i>in vitro</i> 1:400

Brevikan	koza poliklonsko	pacov, čovek, pas	miš,	Santa Cruz Biotechnology	<i>in vitro</i> 1:400
Neurokan	miš monoklonsko	pacov, čovek, pas	miš,	Santa Cruz Biotechnology	<i>in vitro</i> 1:400
HIF1-alfa	miš monoklonsko	miš, svinja, čovek	pacov, krava,	Abcam	FACS 1:200
GFAP	zec poliklonsko	miš, mačka, ovca, čovek	pacov, pas, krava,	Dako	<i>in vivo</i> 1:700 <i>in vitro</i> 1:500 FACS 1:400
GFAP	miš monoklonsko	miš, svinja, čovek	pacov, krava,	Abcam	<i>in vivo</i> 1:400
Vimentin	miš monoklonsko	pacov, čovek, pas	miš,	Dako	<i>in vitro</i> 1:200
Iba1	koza poliklonsko	pacov, prase, čovek	morsko svinja,	Abcam	<i>in vitro</i> 1:700
NeuN	miš monoklonsko	pacov, čovek, gušter	miš, ptica,	Millipore	<i>in vivo</i> 1:500
beta-Aktin	miš monoklonsko	miš, mačka, ovca, čovek	pacov, pas, krava,	Invitrogen	WB 1:7000

Tabela 6. Sekundarna antitela

specifičnost za vrstu	Konjugovano sa	Poreklo	Proizvođač	razblaženje
anti-zečje	HRP (peroksidaza rena)	magarac	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
anti-mišje	HRP (peroksidaza rena)	magarac	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
anti-kozje	Alexa Fluor 488	magarac	Invitrogen	1:250
anti-zečje	Alexa Fluor 488	magarac	Invitrogen	1:250

anti-zečje	Alexa Fluor 555	magarac	Invitrogen	1:250
anti-mišje	Alexa Fluor 488	magarac	Invitrogen	1:250
anti-mišje	Alexa Fluor 555	koza	Invitrogen	1:250
TSA™ Komplet	<i>eng.</i> - Tyramide signal amplification KIT (Invitrogen, USA), tiramid signalni amplifikujući komplet, sadrži: Alexa Fluor 488 tiramid (komponenta A), Dimetilsulfoksid (DMSO; komponenta B) anti-zečje HRP konjugovano sekundarno antitelo IgG iz koze (komponenta C) Blokirajući reagens (komponenta D) Pufer za amplifikaciju (komponenta E; sadrži 0.02% timerosal) Vodonik- peroksid (30% H ₂ O ₂ ; komponenta F), stabilan rastvor			

2.3. Prajmeri

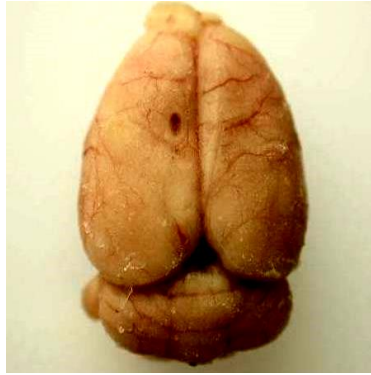
Tabela 7. Prajmeri za transkripte

Geni	Sekvence prajmera 5'→3'	Dužina (bp)	Temperatura vezivanja, At
ENT1	f CACTTCCTTCGCTGTTAGGG r TGTCCCCCTACCACTCTGAC	144	60°C
ENT2	f CCCTCATGACCTTCTTCCTG r CCAAGAGACCCGGTATAGCA	166	60°C
β-actin	f AGATTACTGCCCTGGCTCCT r ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	120	59°C
e-5NT	f CAA ATC TGC CTC TGG AAA GC	119	59°C

	r ACC TTC CAG AAG GAC CCT GT		
Ciklofilin- A	f GGCAAATGCTGGACCAAACAC r AGAGTTGTCCACAGTCGGAGATG	194	60°C
GFAP	f CTCCTATGCCTCCTCCGAGACGAT r GCTCGCTGGCCCGAGTCTCTT	170	60°C
Brevikan	f CCTCAGGAAGCTGTGGAGAG r CTTGCCCCATCTGGAGTAGA	152	59°C
Fosfakan	f TTGACAAGTGATGAAGAGAGTGG r AATCAGCACATCTCGTTCTATCC	207	60°C
Neurokan	f TTTCAGTCCACAGCGATCAG r AGGAGAGGGATACAGCAGCA	171	60°C
A1 receptor	f GGCGATCTTCAGCTCCTTCCCGTA r GTA CTT CTG GGG GTC ACC GGA	207	60°C

3. Ubodna lezija leve somatosenzorne kore - *in vivo* model povrede

Životinje su anestezirane zoletilom (Virbac) prema instrukcijama proizvođača. Potom je životinji fiksirana glava u stereotaksičkom ramu a prednji deo glave obrijan kako bi se oslobodio pristup koži. Nakon operativnog zahvata na koži, reza dužine oko 1.5 cm, na lobanji je određen položaj somatosenzornog korteksa prema stereotaksičkom atlasu. Unilateralna ubodna lezija izvedena je zubarskom bušilicom sa nastavkom promera 1 mm, po sledećim koordinatama: 1.5 mm iza bregme, 2.5 mm levo od središnje linije i 2 mm u dubinu (slika 5). Koža glave zašivena je hirurškim koncem. U postoperativnom periodu životinje su držane po dve u kavezu.



Slika 5. *Položaj ubodne lezije u levom somatosenzornom korteksu pacova*

3.1. Eksperimentalne grupe

Eksperimentalnim planom predviđene su tri grupe životinja. Prvu grupu činile su životinje koje su podvrgnute operativnom zahvatu, u kojem su zadobile povredu levog senzomotornog korteksa (L). U post-operativnom periodu, životinje nisu podvrgavane nikakvom tretmanu. Drugu grupu činile su životinje koje su podvrgnute anesteziji i rasecanju kože, ali ne i kraniotomiji. Ova grupa označena je kao lažno operisana grupa šam (Š) kontrola. Operisane životinje i šam kontrole žrtvovane su 2 dana (L2) i 7 dana (L7) nakon zahvata. Grupa intaktnih životinja odgovarajuće starosti poslužila je kao fiziološka kontrola (FK). Za svaku vremensku tačku i za grupu intaktne kontrole odvojeno je po 11 životinja. Sve životinje su žrtvovane prekomernom dozom anestetika i transkardijalno perfundovane hladnim fiziološkim rastvorom (za izolaciju RNK i proteina) i potom hladnim 4% PFA (za imunohistohemijsko obeležavanje).

3.2. Priprema životinjskog tkiva

Za analizu genske ekspresije uzeto je po četiri pacova iz svake grupe. Odmah nakon transkardijalne perfuzije hladnim fiziološkim rastvorom, mozak je izolovan iz lobanje i korteksi su izdvojeni na ledu, izolovano je kortikalno tkivo mozga ozleđenih životinja oko centra lezije, površine ~4 mm². Kod lažno operisanih šam i kontrolnih životinja uzorkovana je jednaka, odgovarajuća

površina levog korteksa. Nakon određivanja mase, tkivo je zamrznuto u tečnom azotu i do izolacije čuvano na -80°C .

Za imunoblot analizu su uzete po četiri životinje iz svake grupe. Procedura izolacije tkiva je bila ista kao i u prethodno opisanoj pripremi tkiva za analizu genske ekspresije. Nakon izolacije i merenja, tkivo korteksa je homogenizovano teflonskim homogenizerom sa 20 zaveslaja na ledu, u 10 težinskih zapremina RIPA pufera (Tabela 2) u koji je na 10 ml dodata po jedna tableta komercijalno nabavljenog koktela proteaznih inhibitora (Mini Protease Inhibitors Cocktail, Boehringer M, Nemačka). Nakon 30 minuta inkubacije na ledu, lizati su centrifugirani (30 minuta na $14\ 000 \times g$ na 4°C), posle čega su supernatanti odliveni i do dalje analize čuvani na -80°C .

3.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina određena je metodom po Pierce-u pomoću komercijalno nabavljenog kompleta, prema uputstvu proizvođača. Koncentracija uzoraka određena je izna osnovu standardne krive dobijene upotrebom poznatih koncentracija proteina goveđeg serum albumina.

4. Priprema ćelijske kulture

Primarna mešovita glijska kultura astrocita i mikroglije dobijena je iz mozgovia pacova starih do tri dana. Mozak je izolovan i uklonjene su moždane ovojnice, a hemisfere su isprane tri puta u hladnom i sterilnom PBS-u. Tkivo je zatim mehanički homogenizovano u 35-mm Petri posudama (3 do 4 hemisfere u 2 ml PBS-a). Homogenat je prebačen u tube zapremine 15 ml, staložen gravitacionom sedimentacijom, i ostavljen u rastvoru za disocijaciju 30 min u inkubatoru ($37^{\circ}\text{C} / 5\ \% \text{CO}_2$). Po uklanjanju rastvora za disocijaciju, u homogenat je dodato 2 ml kDMEM zagrejanog na 37°C uz dodatak DNaze I. Dalja mehanička

homogenizacija izvršena je provlačenjem tkiva kroz staklene Pasterove pipete, čime je homogenat disociran do nivoa ćelija. Ovako pripremljeni ćelijski homogenati prebačeni su u T-75 flaskove za kulturu i u svaki je dodato 10 ml kDMEM-a (37°C). Ćelije su gajene u inkubatoru, na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO₂. Medijum je prvi put promenjen 4 dana nakon izolacije, a posle toga je menjan na svaka dva dana. Ovako pripremljena kultura je mešovita kultura mikroglije i astrocita. Deset do 14 dana nakon izolovanja, mikroglijske ćelije odvajane su od astrocita trešenjem flaska, nakon čega se veći deo mikroglije izdvaja sa medijumom, dok astrociti ostaju zalepljeni za podlogu zajedno sa manjim procentom mikroglijskih ćelija.

Nakon 14 dana na svetlosnom mikroskopu se vrši procena konfluentnosti ćelija i eventualne kontaminacije. Ukoliko su astrociti pokrili dno flaska i nije uočena kontaminacija kulture, flaskovi su rasejavani u laminaru. Flaskovi su isprani PBS-om (da bi se odstranile slabo zalepljene ćelije i ostaci medijuma), i potom se izlažu delovanju tripsina u trajanju do 5 minuta (3 ml radnog rastvora tripsina), koji na temperaturi od 37°C raskida međućelijske veze i veze ćelija sa podlogom flaska . Flaskovi sa tripsinom se odlažu u inkubatoru, i pod mikroskopom se proverava da li su se ćelije odlepile. Potom se u flaskove dodaje po 4 ml kDMEM-a (FCS prekida aktivnost tripsina), ukupna zapremina ćelijskog medijuma se pokupi i rasporedi u 50 ml tube, a zatim centrifugira na 500 × g tokom 5 minuta. Nakon što se supernatant odlije, talog svake tube se resuspenduje u po 20 ml kDMEM-a provlačenjem kroz 23G iglu. Pre rasejavanja, ćelije se prebrojavaju metodom bojenja sa supravitalnom bojom, tripan plavim.

Broj ćelija je određen bojenjem u 0,4 % rastvoru tripan-plavog u Neubauer komorici za brojanje na invertnom mikroskopu. Tripan-plavo je boja koja prodire kroz ćelije koje su izgubile membranski integritet tj. mrtve ćelije. Na taj način, se vijabilne ćelije razlikuju od mrtvih ćelija u toku brojanja. Ćelije resuspendovane u kDMEM-u i pomešane su sa 0,4 % rastvorom tripan plavog u odnosu 1:1 (faktor

dilucije = 2, razblaženje ćelija u odnosu na boju). Po 10 μ l obojene ćelijske suspenzije ubrizgano je u obe izbrazdane Neubauer komorice i ćelije su prebrojane tokom perioda od tri do pet minuta. Svaka komorica ima devet kvadrata, a površina svakog kvadrata je 1 mm². Ćelije su izbrojane u po četiri kvadrata obe komorice, na osnovu čega je dobijen prosečan broj ćelija po mm². Zapremina koju ćelije zauzimaju preko jednog kvadrata je 1 μ l. Broj vijabilnih ćelija/ml medijuma preračunat je prema sledećoj formuli:

$$\frac{\text{Broj ćelija po 1 kvadratu} \times 10^4 \times \text{faktor dilucije}}{1 \text{ ml}}$$

Za imunocitohemijske analize, ćelije su zasejane u gustini od 4×10^5 na okruglim 25-mm stakalcima u pločama sa 6 bunarića u 2 ml kDMEM-a. Prethodno, stakalca su prevučena PLL-om i sterilisana UV svetlom tokom 2 sata.

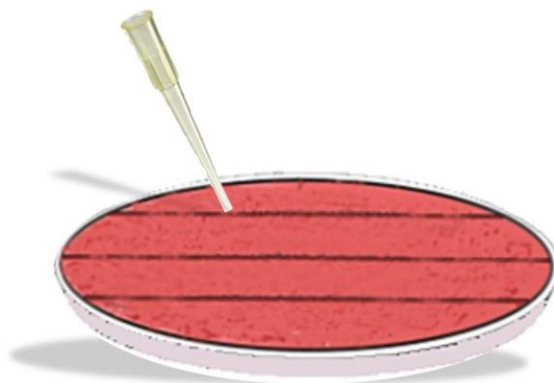
Za gensku, FACS i UPLC analizu, kao i za LDH test vijabilnosti, ćelije su sađene u gustini od 8×10^5 po bunariću u pločama sa 6 bunarića u 2 ml kDMEM-a.

Za test vijabilnosti MTT esejem, ćelije su zasejane u gustini od 12 500 po bunariću, u mikrotitar pločama sa 96-otvora, u 200 μ l kDMEM.

Astroцити су изоловани и засејани у одговарајућим посудама и одговарајућем броју, као што је наведено у претходном одељку, а потом су инкубирани у CO₂ инкубатору на 37 °C током 1-2 дана. Пре скарификације или третмана, астрочитима је укидан FCS из медијума (инкубација са 0,1% FCS у DMEM-у) како би се зауставила ћелијска деоба. Након 24 h по укидању FCS-а, ћелије су третиране на следећи начин:

4.1 Skarifikacija ćelijskog monosloja

Skarifikacija aстрочитног једнослоја извршена је стерилним nastavkom за pipetu (200 μ l), povlačenjem 3 паралелне линије преко ћелијског једнослоја (Slika 6). Након тога медијум је замењен, а астрочити су враћени у инкубатор током 0.5, 1, 4, 8, 24 или 48 сата.



Slika 6. Šematski prikaz povrede skarifikacijom.

4.2. Tretmani ćelija

Astrocitne kulture su tretirane adenozinom (Ado), u koncentraciji od 50 μM , ATP-om u koncentraciji od 100 μM , ENT-inhibitorom dipiridamolom (DPM) u koncentraciji od 5 μM i selektivnim antagonistom A1 receptora (8-Ciklopentil-1,3-dipropilksantin, DPCPX) u koncentraciji od 1 μM . Sva razblaženja su pravljena u medijumu sa 0.1% FCS-om, i dodavana ćelijama uz zamenu medijuma. Za DPM i DPCPX su korišćeni pre-tretmani u istim koncentracijama kao i kod tretmana, u trajanju od 30 minuta. Nakon pre-tretmana, medijum zamenjen sa odgovarajućim tretmanom i astrociti su držani u inkubatoru 4 ili 24 sata.

Hemijski izazvana hipoksija je vršena upotrebom kobalt-hlorida (CoCl_2) pri koncentraciji od 300 μM . CoCl_2 je rastvaran u medijumu sa 0.1% FCS-om i dodavan ćelijama uz zamenu medijuma, nakon čega su ćelije vraćane u inkubator tokom 4 sata.

5. Izolacija RNK

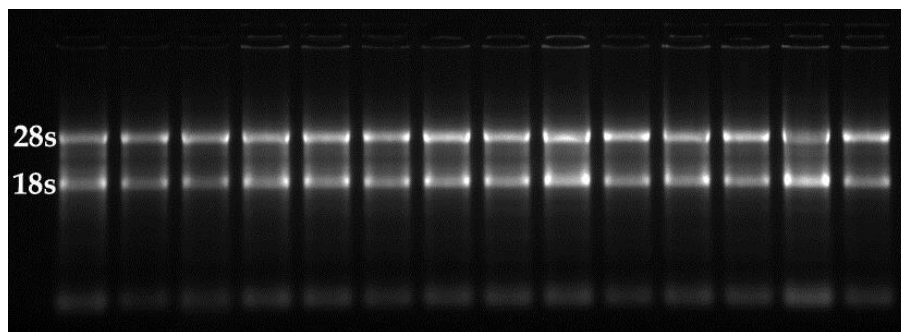
Ukupna RNK izolovana je iz tkiva levog korteksa eksperimentalnih životinja (masa oko 100 mg), dodavanjem TRIzol reagensa (monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata) prema uputstvu proizvođača.

Za eksperimente u ćelijskoj kulturi, ukupna RNK izolovana je iz 8×10^5 ćelija po eksperimentalnoj grupi, primenom peqGold reagensa i fenol/hloroform ekstrakcije. Ćelije su lizirane dodavanjem 800 μ l peqGold-a i homogenizovane provlačenjem lizata kroz pipetu nekoliko puta. Homogenizovani uzorci su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi, a potom je dodato 160 μ l hloroforma na 800 μ l peqGold-a. Tube su vorteksovane dok rastvor nije postao beo, a potom je usledila desetominutna inkubacija na ledu. Uzorci su zatim centrifugirani 5 min na $12\ 000 \times g$, na 4 °C. Smeša se na taj način razdvaja na žutu fenol-hloroformsku fazu, interfazu i gornju bezbojnu vodenu fazu u kojoj se nalaze RNK molekuli. Gornja faza iznosi oko 50% volumena zapremine peqGold-a korišćenog za homogenizaciju. Gornja faza je prenetu u nove tubice u koje je dodato 400 μ l izopropanola, a potom su tubice snažno izvorteksovane. Uzorci su inkubirani 15 min na ledu, a onda centrifugirani 5 min na $12\ 000 \times g$, na 4 °C. RNK se na ovaj način staložila na dnu tubica u vidu beličastog taloga.

Specifikacija rastvora korišćenih za izolaciju RNK data je u Tabeli 3. Postupak izolacije se sastojao iz sledećih koraka:

1. **Homogenizacija** – tkivo je lizirano dodavanjem 1 ml TRIzola na 100 mg tkiva i homogenizovano u staklenom homogenizeru. Ovako lizirani i homogenizovani uzorci se mogu čuvati do mesec dana na -70 °C.
2. **Razdvajanje faza** - homogenizovani uzorci su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi, da bi nukleoproteinski kompleksi u potpunosti disosovali, a potom je dodato 200 μ l hloroforma na 1 ml TRIzola. Tube su vorteksovane dok rastvor nije postao beo, a potom je usledila desetominutna inkubacija na ledu. Uzorci su potom centrifugirani 5 min na $12\ 000 g$, na 4 °C. Smeša se na taj način razdvaja na žutu fenol-hloroformsku fazu, interfazu i gornju bezbojnu vodenu fazu u kojoj se nalaze RNK molekuli. Gornja faza iznosi oko 50% zapremine TRIzola korišćenog za homogenizaciju.

3. **Precipitacija RNK** – gornja faza je prenetu u nove tubice u koje je dodato 500 μ l izopropanola, a potom su tubice snažno izvrtložene. Uzorci su smrznuti na -80°C preko noći. Nakon odleđivanja, uzorci su centrifugirani 1 min na $12000 \times g$, na 4°C . RNK se na ovaj način staložila na dnu tubica u vidu beličastog taloga.
4. **Ispiranje taloga RNK** – iz tubica je pažljivo uklonjen supernatant. Talog RNK je ispran sa 0.5 ml hladnog 75 % etanola (napravljen u 0,1 % DEPC), nakon čega je usledilo centrifugiranje 5 min na $7500 \times g$, na 4°C . Ispiranje u etanolu je ponovljeno još jednom. Na ovom koraku procedura može da se prekine i RNK u 70 % etanolu može da se čuva na -20°C i do godinu dana.
5. **Rastvaranje RNK** – etanol je odličen, a tubice su ostavljene do 30 min, da se talog osuši. Talog ne sme da se presuši, jer se time smanjuje njegova rastvorljivost. Nakon sušenja, RNK je rastvorena u 70 μ l upH₂O, provlačenjem kroz pipetu nekoliko puta. Tubice su potom držane 30 min na 55°C u termomikseru na 1200 rpm, nakon čega je usledilo kratko centrifugiranje i na kraju skladištenje na -20°C .
6. **Provera kvaliteta RNK** - pre daljeg rada, kvalitet RNK je proveravan na 1% agaroznom gelu sa etidijum-bromidom, a trake za 28S i 18S ribozomsku RNK (Slika 7) su vizuelizovane na UV-transiluminatoru (Molecular Imager® Gel Doc™, Bio-Rad, SAD).



Slika 7. Procena kvaliteta RNK na osnovu izgleda ribozomske RNK na agaroznom gelu

7. **Određivanje koncentracije RNK** -- koncentracije RNK su određivanje spektrofotometrijski (Eppendorf BioPhotometer Spectrophotometer UV/VIS, Beč, Austrija).

6. DNKazni tretman i reakcija reverzne transkripcije

Pre reakcije reverzne transkripcije (RT), izolovana ukupna RNK tretirana je DNazom I kako bi se uklonila sva eventualno zaostala DNK, koja pri PCR reakciji može da pokaže lažan rezultat u pogledu genske ekspresije. Tretman DNazom I je izveden po protokolu proizvođača, tako što je 1 µg ukupne RNK inkubiran sa 1U DNaze I, tokom 30 min na 37 °C. DNaza I je inaktivirana dodavanjem 25 mM EDTA i inkubacijom 10 min na 65 °C. Konačna zapremina po uzorku, posle DNaznog tretmana, je 10 µl u kojoj se nalazi 1 µg RNK (tj. 0,1 µg RNK/ µl uzorka). Nakon ove reakcije može se započeti RT reakcija, bez dodatnih prečišćavanja.

Reverzna transkripcija je reakcija u kojoj se na osnovu RNK molekula kao matrice, sintetiše komplementarni lanac molekula DNK (cDNK). Za reakciju sinteze cDNK neophodan je enzim reverzna transkriptaza (RNK zavisna DNK polimeraza), dezoksiribonukleotidi, inhibitor enzima RNaze i prajmer za početak sinteze molekula cDNK. Kao prajmeri mogu poslužiti nasumični (eng. *random*) heksameri, 3' prajmeri i oligo-dT niz od 12 - 18 dTTP nukleotida. Za RT korišćen je komplet za sintezu cDNK sa nasumičnim heksamerima. Reakciona smeša u zapremini od 20 µl je sadržala: 2 µl 10 x RT pufera, 0,8 µl 25 x dNTP Mix-a (100 mM), 2 µl 10 x nasumičnih RT prajmera, 1 µl MultiScribe reverzne transkriptaze, 4,2 µl DEPC-om tretirane vode i 10 µl uzorka koji sadrži 1 µg RNK. Potom je reakciona smeša prošla kroz 4 termalna ciklusa za sintezu cDNK:

- 10 min/25 °C
- 120 min/37 °C

- 5 min/85 °C
- cDNK je skladištena na 4 °C.

7. PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)

Polimerazna lančana reakcija (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) je postupak umnožavanja ciljne sekvence DNK ili RNK, koji se zasniva na lančanoj reakciji polimeraze. Za ovu reakciju je potrebna DNK matrica ili iRNK (kada se uključuje korak reverzne transkripcije kako bi se dobila cDNK, a takav PCR se naziva RT-PCR), amplimeri, dezoksiribonukleotidi, pufer i enzim DNK zavisna DNK polimeraza koji katalizuje ugradnju nukleotida u novi lanac DNK.

U ovom eksperimentu urađena je analiza promena na nivou iRNK metodom semikvantitativnog rt-PCR u realnom vremenu (eng. *quantitative real time polymerase chain reaction*, Q-PCR/qRT-PCR). Metoda najpre obuhvata korak reverzne transkripcije u kome se ukupna iRNK prevodi u cDNK, i potom korak umnožavanja dela cDNK od interesa. Proces umnožavanja se izvodi u seriji cikličnih izmena temperatura čime se obezbeđuje denaturacija molekula DNK, hibridizacija amplimera sa matricom i njegova elongacija. Kod PCR-a u realnom vremenu u svakom ciklusu PCR-a se prati zastupljenost sintetisanog produkta, što omogućava pouzdanu kvantifikaciju nivoa ekspresije ispitivanog gena.

Metodom qRT-PCR-om je određen nivo ekspresije gena od interesa u odnosu na nivo ekspresije nekog kontrolnog gena. Ovaj kontrolni gen se još naziva endogena ili interna kontrola i predstavlja gen koji pokazuje konstitutivnu ekspresiju konstantnog nivoa u jednom tipu ćelija ili tkivu, nezavisno od sredinskih faktora, stanja u kome se ćelija nalazi ili eksperimentalne procedure kojoj je podvrgnuta. Primena endogene kontrole neutrališe tehničke greške u proceni ekspresije gena od interesa.

Za praćenje ekspresije različitih gena, koristili smo fluorescentnu boju SYBR green, koja se vezuje samo za dvolančanu, ali ne i jednolančanu DNK. Reakciona smeša za amplifikaciju ciljnih gena i endogene kontrole (β -aktin ili ciklofilin-A) je sadržala: SYBR Green, cDNK (tj 10 ng iRNK prevedene u cDNK), i prajmere za transkripte prikazane u Tabeli 7. Za reakcije lančane polimerizacije je korišćen aparat ABI Prism 7000 i sledeći program amplifikacije:

- 2 min na 50 °C
- 10 min na 95 °C
- 40 ciklusa po 15 sekundi na 95 °C
- 1 minut na temperaturi vezivanja (eng. *annealing temperature, At*), specifične za svaki prajmer i date u Tabeli 7.

Potom je određena vrednost eksperimentalnog praga reakcije (eng. *threshold*), a na osnovu njega Ct vrednost (eng. *cycle at threshold*). Rezultati su prikazani kao razlika u broju ciklusa kojim se dostiže vrednost eksperimentalnog praga reakcije za ispitivane gene u odnosu na nivo ekspresije β -aktina (endogeni referentni standard): ($\Delta Ct = Ct_{\text{ciljni gen}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$). Kvantifikacija je urađena $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodom i rezultati su izraženi kao stepen promene u odnosu na kontrolnu grupu – kontrolna grupa životinja u *in vivo* modelu ili nestimulisana/netretirana kultura astrocita u *in vitro* modelu povrede. Kontrolnoj grupi je dodeljena vrednost od 100 % (srednja vrednost \pm standardna greška).

8. SDS-poliakril amid elektroforeza i razdvajanje proteina za imunoblot analizu

Nakon što su određene koncentracije proteina i, u svakom uzorku, svedene na 2 mg/ml, izvršena je optimizacija za svaki protein pomoću krivih sa sukcesivnim serijskim razblaženjima proteina, a sa koncentracijama primarnog

antitela preporučenim od strane proizvođača. Kao optimalna količina proteina uzeta je ona koja se nalazi u linearnom opsegu krive zavisnosti intenziteta signala i količine nanetih proteina.

Svi ispitivani uzorci su pripremani za elektroforezu na sledeći način: u 20 µg uzorka je dodata jednaka količina pufera (2 × Laemmli pufer, Bio-Rad) i 5% 2-merkaptetanola. Ovako pripremljeni uzorci su pre nalivanja dodatno denaturisani kuvanjem 5 min/ 100°C. Kao standard za molekulska težina proteina od interesa korišćen je obojeni marker širokog opsega (Fermentas, Nemačka). Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj težini vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (Tabela 2) na aparatu za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad, SAD). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu (Tabela 2) pod konstantnim naponom od 120 V na sobnoj temperaturi.

Prenos (transfer) proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF membrane (poliviniliden-fluorid membrane, Bio-Rad, SAD) je rađen korišćenjem sistema za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, SAD). Nakon završene elektroforeze, gel za razdvajanje je pažljivo uklonjen sa staklene ploče i prenet u posudu sa puferom za transfer (Tabela 2). PVDF membrana (isečena u dimenzijama gela) je prvo aktivirana u metanolu tokom 15 sekundi, zatim isprana u destilovanoj vodi 2 minuta i potom prebačena u posudu sa puferom za transfer, gde je ekvilibrisana narednih 10 minuta. Pomoćne komponente (filter papir, Watman papir, sunđer) su takođe pripremljene potapanjem u pufer za transfer 30 minuta. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer i ulaganja u tank sa puferom, elektrotransfer proteina je vršen preko noći na 6°C, pod konstantnim naponom od 30 V. Po završenom transferu membrane su bojene Ponceau S bojom a gelovi Coomassie Brilliant Blue bojom (Tabela 2), u cilju dobijanja vizuelne potvrde uspešnosti transfera. Membrane su zatim odbojene ispiranjem u destilovanoj vodi.

9. Western blot analiza

Nakon transfera proteina, postupak imunoblot analize se odvijao na sledeći način:

- Blokiranje nespecifičnih mesta rađeno je inkubacijom PVDF membrane u rastvoru za blokiranje – 5% BSA u TBS-T puferu;
- Inkubacija u primarnom antitelu preko noći na +4°C (razblaženja su data u Tabeli 5). Sva antitela razblaživana su u TBS-T-u;
- Ispiranje nevezanih primarnih antitela u TBS-T-u (3 × 10 min);
- Inkubacija u sekundarnom antitelu (1 h), razblaživanom u TBS-T-u (razblaženja su data u Tabeli 6);
- Ispiranje nevezanih sekundarnih antitela u TBS-T-u (3 × 10 min).

PVDF membrane su inkubirane na električnoj mešalici da bi se obezbedilo podjednako vezivanje primarnih i sekundarnih antitela. Nakon poslednjeg ispiranja, membrane su inkubirane u rastvoru luminola (Tabela 2), koji reaguje sa molekulom HRP ostatkom na sekundarnom antitelu i emituje svetlosni signal koji se prenosi na fotografski film (Kodak). Filmovi su razvijani i fiksirani (Ilford) u mračnoj komori, i nakon sušenja skenirani.

Intenzitet signala dobijenih na autoradiografskom filmu je kvantifikovan denzitometrijski, korišćenjem programskog paketa za analizu signala (ImageQuant 5.0). Vrednosti dobijene za ciljne proteine su normalizovane u odnosu na vrednosti koje su dobijene za odgovarajući aktin, koji je služio kao merilo ravnomerno nanete količine proteina. Tako dobijene relativne vrednosti ekspresije proteina su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

10. Imunohistohemijsko obeležavanje tkiva

Nakon transkardijalne perfuzije hladnim fiziološkim rastvorom i 4% PFA, mozgovi su brzo i pažljivo izolovani iz lobanja pacova i umerziona fiksirani u 4% paraformaldehidu u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7.4, preko noći. Fiksativ je potom zamenjen saharozom u 0.2 M fosfatnom puferu, pH 7.4, u rastućim koncentracijama (10%, 20%, 30%), radi dehidratacije i krioprotekcije. Zamrzavanje je izvedeno u 2-metil butanu, mozgovi zavijeni u parafilm i čuvani u zamrzivaču na -80°C do upotrebe. Koronalni preseki mozgovca debljine 25 µm su pravljani na kriostatu, na temperaturi od -23 °C. Preseci su montirani na prethodno pripremljena želatinizirana predmetna stakla, i potom ostavljeni nekoliko sati da se osuše na sobnoj temperaturi. Do upotrebe su čuvani na -20 °C.

Za vizualizaciju reakcije antigen-antitelo, na kojoj se zasniva imunohistohemijsko obeležavanje, korišćeno je dvojno fluorescentno bojenje, gde je primarno antitelo neobeleženo, a sekundarno je nosilac fluorescentne boje, koja daje bojenu reakciju nakon ekscitacije odgovarajućom talasnom dužinom. Metod je podrazumevao sledeće korake:

- Nakon temperiranja na sobnoj temperaturi, pločice sa kriopresecima su isprane u 0,01 M PBS-u.
- Demaskiranje antigena se vršilo zagrevanjem pločica sa presecima u 0.1 M citratnom puferu pH 6 u mikrotalasnoj pećnici tokom 10 minuta na 350 Watt, pre postupka imunohistohemijskog bojenja.
- Nakon postupka demaskiranja antigena, preseci su inkubirani sa 1 % BSA tokom 1 h, čime su blokirana mesta nespecifičnog vezivanja antitela.
- Potom su preseci inkubirani preko noći sa primarnim antitelima (Tabela 5), u vlažnoj komori na 4 °C.

- Antitela koja se nisu vezala za odgovarajući antigen uklonjena su dužim ispiranjem u 0,01 M PBS-u, nakon čega su preseki inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (Tabela 6).
- Nakon ispiranja 0,01 M PBS-u, pločice su potapane u rasvor DAPI fluorescentne boje koja obeležava jedra ćelija vezivajući se specifično za dvolančanu DNK i emitujući plavu svetlost.
- Nakon ispiranja 5 x 3 minuta, pločice su pokrивane Moviolom i do analize na mikroskopu čuvane na 4°C.
- U slučaju kada je signal poreklom od sekundarnog antitela bio slab, primenjen je komercijalni Tiramid kit za ampifikaciju signala (Tabela 2), umesto fluorescentno obeleženog sekundarnog antitela, a prema instrukcijama proizvođača.

Velika pažnja je posvećena odabiru primarnih i sekundarnih antitela i proverene su njihove kombinacije u smislu ukrštenih i nespecifičnih reakcija. Kontrola bojenja je rađena po iznad opisanom postupku, u odsustvu primarnog antitela.

Preseci su analizirani na Zeiss Axiovert invertovanom fluorescentnom mikroskopu, i fotografisani odgovarajućim digitalnim kamerama sa uvećanjima objektivna EC Plan-Neofluar 10x, Plan-Apochromat 20x, EC Plan-Neofluar 40x, EC Plan-Neofluar 63x i 100x Plan-Apochromat. Fluorescentne mikrografije slikane su AxioCam monohromatskom kamerom te su različitim kanalima naknadno pridružene odgovarajuće boje. Vreme ekspozicije za pojedinačne kanale određivano je na početku svakog mikroskopiranja i u toku rada nije značajno menjano.

Sva merenja su izvršena u mikroskopu pridruženom softverskom paketu AxioVision, dok su same mikrografije (u rezoluciji 300 piksela/inču) obrađene u programu Adobe Photoshop CS6. Radi lakšeg praćenja rezultata, mikrografije koje

su prikazane u ovoj doktorskoj tezi slikane su približno u istim regionima korteksa svih grupa životinja. Za lokalizaciju pojedinih regiona mozga korišćen je atlas i nomenklatura Paxinosa i Watsona [207].

11. Imunocitohemijsko obeležavanje ćelija

Princip imunocitohemijske analize je sličan postupku imunohistohemijskog obeležavanja tkiva, tako da će ovde biti date ključne razlike.

Po završetku tretmana, ćelije su prvo fiksirane 20 min u 4 % PFA na 4 °C, a potom isprane dva puta u sterilnom PBS-u na sobnoj temperaturi. Potom su ćelije permeabilisane u 0,25 % Triton X - 100, 10 min, pa isprane u PBS-u. Blokiranje je vršeno inkubacijom u 5 % BSA, tokom 45 min.

Kako bi se odredio odnos astrocita i mikroglije u ćelijskoj kulturi, brojanje ćelija je rađeno u sedam kvadrata (0.38 mm²) po uzorku iz tri nezavisna eksperimenta.

12. Testovi vijabilnosti

Preživljavanje ćelija nakon tretmana je određivano pomoću MTT i/ili LDH testa.

MTT test je kolorimetrijski test, baziran na redukciji žutog MTT-ja (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) do ljubičastog formazana u mitohondrijama živih ćelija. Mitohondrijska dehidrogenaza vijabilnih ćelija iseca tetrazolijumski prsten, dajući ljubičaste MTT formazanske kristale koji su nerastvorljivi u vodi. Test je izveden iz tri nezavisna eksperimenta u triplikatu, a vijabilnosti tretiranih ćelija izražena u procentima u odnosu na kontrolu koju su činile netretirane ćelije (100%).

- Ćelijama zasejanim na pločama sa 96 bunarića je u medijum dodat 10% MTT (5 mg/ml) i potom su inkubirane 3 h na 37°C.
- Nakon isteka ovog perioda, u svaki bunarić nalivano je 50 µl DMSO kako bi se rastvorio nastali formazan.
- Očitavanje je apsorbance je vršeno na 540 nm.

LDH test je takođe kolorimetrijski esej. Oštećene ćelije gube integritet membrane i pritom u okolni medijum oslobađaju dehidrogenazu mlečne kiseline (LDH). LDH dalje katalizuje reakciju konverzije mlečne kiseline u pirogrožđanu, uz nastanak NADH. U prisustvu diaforaze i resazurina, NADH oksiduje formirajući crveni formazan. Test je izveden u triplikatu, a vijabilnosti tretiranih ćelija izražena u procentima u odnosu na kontrolu koju su činile lizirane ćelije (100%).

- 45 minuta pre početka eseja, u dva bunarića sa ćelijama dodato je 10 µl na 100µl medijuma komercijalnog rastvora za liziranje (10 x). Medijum ovako liziranih ćelija je dalje služio kao 100% kontrola.
- Nakon tretmana, astrocitima gajenim na pločama sa 6 bunarića je uziman medijum, centrifugiran na 250 ×g tokom 4 minuta.
- 50 µl supernatanta je pipetirano u ploču sa 96 bunarića, čemu je dodato 50 µl rekonstituisanog supstratnog miksa. Ploča se poklopi, zaštiti od svetla i inkubira tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi.
- Po isteku 30 minuta, dodaje se 50 µl rastvora za prekidanje reakcije i očitavanje apsorbance se vrši na 490 nm.

13. Protočna citofluorimetrija

Protočna citofluorimetrija (eng., *fluorescence-activated cell sorting*, FACS) je metoda koja pruža brzu i kvantitativnu analizu pojedinačnih ćelija u tečnom medijumu. Merenje emisije fluorescentnog signala poreklom od obeleženih ćelija se vrši skeniranjem po njihovom prolasku pored izvora ekscitacije. FACS je široko korišćena metoda u karakterizaciji individualnih ćelija mereći intezitet fluorescence koji produkuju fluorescentno obeležena antitela vezana za protein od interesa.

U ovom radu je korišćen protokol indirektno FACS metode koji podrazumeva 2 koraka: inkubaciju ćelija sa primarnim i potom sa odgovarajućim sekundarnim antitelima. Takođe, korišćen je i protokol koji omogućava obeležavanje markera iskazanih samo na površini ćelije. Ovakav protokol omogućio je da se izbegne detekcija proteina od interesa u unutrašnjosti ćelije i da se kvantifikuje fluorescentni signal isključivo poreklom od membranskih proteina. Protokol je podrazumevao sledeće korake:

- Po završetku tretmana, ćelije (8×10^5 po bunariću) su skidane sa podloge korišćenjem zagrejanog rastvora EDTA (1 ml po bunariću tokom 10 minuta), nakon čega su pipetom prebačene u 12 mm x 75 mm falkon tube (BD Biosciences) i dodato im je još 1 ml hladnog FACS pufera (tripsin se izbegava u ovom protokolu, jer postoji mogućnost da iseče membranske proteine od interesa).
- Materijal raspoređen FACS tubama se centrifugira 3 min na $700 \times g$, nakon čega se pažljivo odlije supernatant.
- Resuspendovanje ćelija se vrši u 350 μ l FACS pufera. U ovom koraku se razdvajaju kontrolne grupe (Tabela 8). Kako bi kontrole bile što verodostojnije, one su predstavljale smešu svih grupa, to jest – od svih

grupa je uzimano 50 μ l ćelijske suspenzije, koja je prebačena i raspoređena u zasebne FACS tube.

Tabela 8.

Kontrolna grupa	Opis
Neobeležene ćelije	Negativna kontrola, prema kojoj se vrše podešavanja na FACS aparatu, kako bi se uzela u obzir autofluorescenca ćelija. Ove ćelije su prošle istu proceduru kao i ostale, samo bez primarnog i sekundarnog antitela.
Ćelije + primarna At	Kontrola sa samo primarnim antitelima kako bi se potvrdilo da ista ne odaju nikakav detektabilni signal.
Ćelije + sekundarna At	Kontrola sa samo sekundarnim antitelima kako bi se potvrdila specifičnost njihovog vezivanja.

- Nakon centrifugiranja 3 min na $700 \times g$, uzorci su inkubirani sa primarnim antitelom (200 μ l/tubi, razblaženja su data u Tabeli 5), i inkubirana 45 minuta na ledu. S obzirom da je HIF1 α unutarćelijski lokalizovan protein, za ove eksperimente je pre inkubacije sa antitelom, rađena pre-fiksacija FACS fiksativom i permeabilizacija sa pFACS puferom. Po isteku ovog vremena, ispiranje se vrši 2 puta u FACS puferu uz centrifugiranje ($700 \times g$, 3 min), nakon čega se ćelije inkubiraju sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (200 μ l/tubi, razblaženja su data u Tabeli 6) na ledu, tokom 30 minuta nakon čega je usledio korak ispiranja. Kako bi se ispitala ekspresija membranskih proteina u astrocitima, rađeno je dvojno obeležavanje sa markerom astrocita GFAP-om. S obzirom na to da

se GFAP nalazi unutar ćelije, svi prethodni koraci su rađeni isto ali sa pFACS puferom (sadrži deterdžent koji permebilizuje membranu).

- Nakon ispiranja 2 x u pFACS puferu uz centrifugiranje ($700 \times g$, 3 min) ćelije se fiksiraju u FACS fiksativu tokom 30 minuta na ledu (zaštićene od svetla).
- Nakon koraka ispiranja, ćelije se resuspenduju u FACS puferu (300 μ l) i ovako post-fiksirane mogu da se čuvaju u frižideru (zaštićene od svetla) najmanje 2 dana.

Snimanje ćelija i kvantifikacija signala rađeni su na FACS Calibur aparatu i pridruženom softveru (BD Biosciences). Broj analiziranih ćelija po eksperimentu je iznosio 50 000 (broj događaja), dok je statistička obrada rezultata urađena iz tri nezavisna eksperimenta.

14. Tečna hromatografija ultra-visokih performansi

Tečna hromatografija ultra-visokih performansi (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) je hromatografska tehnika koja se koristi da se izdvoje, identifikuju i kvantifikuju komponente u smeši. Ukratko, metoda se zasniva na prolasku tečnog uzorka kroz čvrsti, adsorbujući materijal upakovanog u kolonu (partikule različite veličine), korišćenjem odgovarajućeg rastvarača. Svaki analit u uzorku stupa u interakciju sa adsorbujućim materijalom na nešto drugačiji način - ukoliko je interakcija slaba analit će izaći sa kolone brže, i obrnuto. Ono što posebno izdvaja UPLC je mali dijametar partikula, koji doprinosi kvalitetu rezultata i efikasnosti (boljem i bržem razdvajanju analita). Protokol korišćen tokom ovde opisanih eksperimenata je podrazumevao nekoliko koraka:

14.1. Priprema uzoraka

Za potrebe UPLC eksperimenta, korišćen je bezbojni DMEM (bkDMEM) i ćelije su gajene u 1.5 ml medijuma. Po završetku tretmana, ćelijski medijum je uziman i centrifugiran $10\ 000 \times g$ tokom 5 minuta i supernatant je smrznut na -80°C do upotrebe. Pre UPLC analize, uzorci su dodatno prečišćeni od proteina i ostalog što bi moglo da utiče na kvalitet hromatograma ali i na samu kolonu. Na 1 ml uzorka je dodato $400\ \mu\text{l}$ $0.6\ \text{M}$ perhlorne kiseline, nakon čega je uzorak centrifugiran na $14000 \times g$ tokom 10 minuta. Kako bi se uzorci neutralisali, u supernatante ($1100\ \mu\text{l}$) je dodato po $100\ \mu\text{L}$ $4\ \text{N}$ KOH i uzorci su centrifugirani $14\ 000 \times g$ tokom 15 minuta. Vrednost pH pojedinačnih uzoraka je naknadno proveravana i iznosila je između 7.2 i 7.4. Finalne koncentracije analita u ispitivanim uzorcima su nakon ove procedure bile smanjene za 28% usled razblaženja, što je u kasnijem računu uzeto u obzir.

14.2. Hromatografsko odvajanje

Kvalitativna i kvantitativna analiza prethodno pripremljenih uzoraka je rađena na Waters ACQUITY UPLC sistemu sa TUV (engl. *tunable ultra-violet*) detektorom. Injektovano je $4\ \mu\text{L}$ svakog uzorka, i analiti u uzorku su razdvajani na Luna C18(2) $100\ \text{mm} \times 2.0\ \text{mm}$ koloni (Phenomenex) sa partikulama dijametra $3\ \mu\text{m}$ (stacionarna faza). Mobilna faza se sastojala od rastvarača A ($4\ \text{mM}$ tetrabutilamonijum hidroksid (TBAH) u $4\ \text{mM}$ fosfatnom puferu) i rastvarača B (methanol), pri konstatnom protoku od $0.45\ \text{mL}/\text{min}$ i uslovima gradijenta datim u Tabeli 9. Tokom hromatografskoj razdvajanja, temperatura kolone je održavana na $35\ ^{\circ}\text{C}$, a vreme ciklusa 17 minuta, od čega je samo prvih 3 minuta korišćeno za potrebe ove teze (vreme izlaska adenzina, inozina, hipoksantina i ksantina). Svi hromatogrami su snimani na $254\ \text{nm}$.

Tabela 9. Linerni gradijent korišćen za hromatografsko razdvajanje.

t (min)	% B
0 - 1.2	7- 12
1,2 - 3,6	11 - 20
3,6 - 4.5	20 - 25
4,5 - 8	25 - 35
8 - 9	35 - 38

Pod ovim uslovima, adenzin (Ado), inozin (Ino), hipoksantin (HX) i ksantin (X) su razdvojeni i identifikovani korišćenjem prethodno spremljenih standarda poznatih koncentracija. Standardi su takođe spremeni u bezbojnom medijumu, i prošli su kroz istu proceduru pripreme kao i uzorci. Ovi standardi su korišćeni za uspostavljanje metode i određivanje retencionih vremena (kvalitativna analiza) i za konstruisanje kalibracionih krivih (zavisnost površine signala - pika od koncentracije), koje su kasnije korišćene za kvantitativnu analizu. Sve koncentracije su preračunate na početnu zapreminu uzorka i izražene u $\mu\text{mol/L}$ (μM).

Statistička obrada rezultata je dobijena iz 3 nezavisna eksperimenta, sa po 3-5 uzoraka po grupi analiziranih u duplikatu.

14.3. Identifikacija i određivanje koncentracije adenzina i njegovih metabolita u ćelijskom medijumu

Za svaki ispitivani metabolit najpre je određeno vreme zadržavanja na koloni, primenom komercijalnih standarda. Radna razblaženja standarda su pravljena po uputstvu proizvođača, a konačna u ćelijskom medijumu (DMEM) kako bi profili hromatograma bio što bliži onima poreklom od uzoraka.

Trenutak pojave šiljka na hromatogramskom zapisu predstavlja momenat izlaska datog molekula sa kolone - retenciono vreme (min) i njegove spektrofotometrijske detekcije na 254 nm.

Nakon uspostavljanja odgovarajuće metode odabirom optimalnih uslova (zapremina uzorka, pritisak, retenciono vreme), određivane su koncentracije adenzina i njegovih metabolita u ćelijskom medijumu uzoraka. Za svaki analizirani molekul, najpre je hromatogramskim razdvajanjem serije rastvora komercijalnog standarda različitih koncentracija, konstruisana kalibraciona kriva, koja je korišćena za određivanje nepoznate koncentracije metabolita u uzorku. Primeri kalibracionih krivih za Ado, Ino, X i HX, prikazani su na Slici 41.

15. Statistička analiza podataka

Rezultati su prikazivani kao srednja vrednost \pm standardna greška iz najmanje tri nezavisna eksperimenta od kojih je svaki uzveden u triplikatu. Za analizu statističke značajnosti razlike između dobijenih rezultata korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey-ovim testom za višestruka poređenja. Vrednosti parametra P manja od 0.05, 0.01 i 0.001 smatrane su statistički značajnim.

IV Rezultati

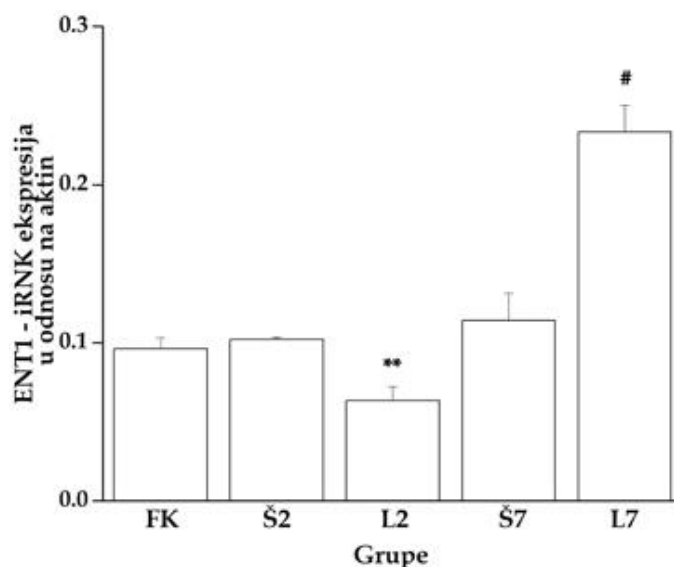
Vodeći se prethodno određenim ciljevima, u ovom radu su ispitivane promene u ekspresiji i funkciji komponenti adenozienskog sistema u modelu povrede mozga pacova i povrede astrocitnog sloja skarifikacijom. Posebna pažnja posvećena je ekspresiji ekvilibrišućih nukleozidnih transportera, kao i promenama koncentracije vanćelijskog adenzina i njegovih metabolita nakon povrede astrocitnog jednosloja.

4.1. Promene ekspresije komponenti adenozienskog signalnog sistema u modelu povrede mozga pacova

4.1. Analiza ENT1 ekspresije na genskom i proteinskom nivou

Rezultati analize genske ekspresije za ENT1 nakon povrede mozga prikazani su na Slici 8.

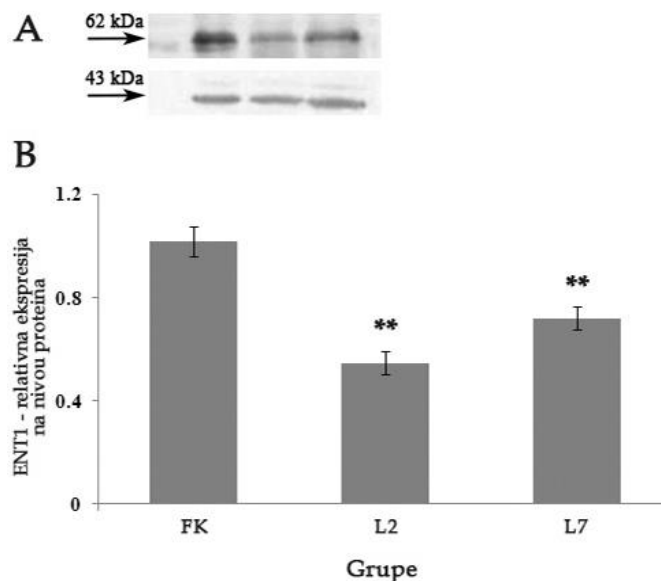
Dva dana nakon povrede nivo ekspresije transkripta za ENT1 smanjio se upola (0.06 ± 0.01 , $P < 0.01$) u odnosu na odgovarajuću šam kontrolu (0.11 ± 0.02). Sedam dana nakon povrede, nivo iRNK za ENT1 povećao se približno dva puta (0.24 ± 0.02 , $P < 0.001$) u odnosu na šam kontrolu (0.13 ± 0.04).



Slika 8. Analiza genske ekspresije za ENT1 i ENT2.

Ekspresija iRNK za ENT2 je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkripata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za β -aktin. Rezultati prikazani stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM 4 uzorka po grupi (n = 4). Nivo statističke značajnosti između grupa: **P < 0.01, #P < 0.001.

Za anti-ENT1 antitelo dobijena je jedna specifična traka na 62 kDa, i reprezentativni imunoblot za ENT1 u uzorcima korteksa prikazan je na slici 9A. Rezultati ove analize su pokazali da se količina ENT1 proteina dvostruko smanjila dva dana nakon ubodne lezije, kao i da je nivo ENT1 ostao nizak i sedmog dana nakon povrede u odnosu na fiziološku kontrolu (Slika 9B). Nije bilo značajnih razlika u ekspresiji ENT1 u šam kontrolama u odnosu na fiziološku kontrolu (podaci nisu prikazani).



Slika 9. *Imunoblot analiza ekspresije ENT1.*

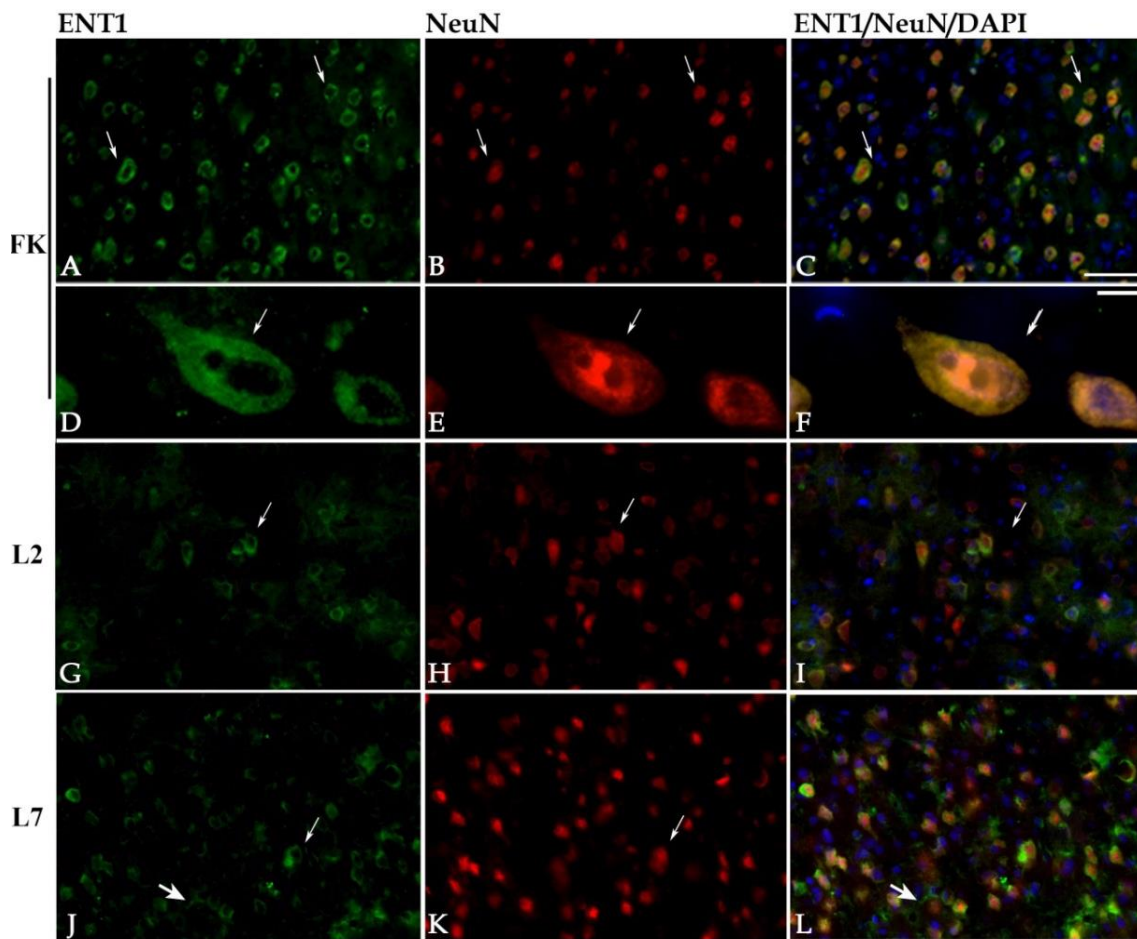
A: Reprezentativni snimak imunoblota za ENT1 i β -aktin. U bunariće je nalivano 30 μ g proteina. Antitelo na ENT1 na imunoblotu daje jednu specifičnu traku na 62 kDa.

B: Kvantitativna analiza ekspresije ENT1 u fiziološkoj kontroli (FK), kao i dva (L2) i sedam (L7) dana nakon povrede. Vrednosti optičkih gustina traka na imunoblotu korigovane su prema odgovarajućim optičkim gustinama za β -aktin u istom bunariću, a potom normalizovane u odnosu na šam kontrolu (arbitrarno predstavljena kao 1.0). Rezultati prikazani stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM iz 5 nezavisnih eksperimenata. Nivo statističke značajnosti između grupa **P < 0.01.

Potom je ispitana ekspresija i ćelijska distribucija ENT1 korišćenjem imunohistohemije. Između fizioloških preseka i preseka šam kontrola nije bilo uočljive razlike (rezultati nisu prikazani), tako da su sva poređenja ozleđenih grupa vršena u odnosu na preseke dobijene iz kontrolnih životinja.

Primenom imunofluorescentnog bojenja na ENT1 u kombinaciji sa imunofluorescentnim bojenjem na NeuN (koji specifično obeležava tela neurona) ili fluorescentnog bojenja na DAPI (koji obeležava jedra) ispitana je relativni udeo ekspresije ENT1 na neuronima u odnosu na druge tipove ćelija, a rezultati su prikazani na Slici 10. Utvrđeno je da na kontrolnim presecima većina NeuN pozitivnih ćelija (crveno) eksprimira ENT1 (zeleno), (Slika 10A-F, strelice).

Dva dana nakon povrede uočava se značajno smanjenje ENT1 imunoreaktivnosti i ovaj transporter se može uočiti na neuronima tek sporadično (Slika 10G-I, strelice). Sedam dana nakon povrede, pored retkih ENT1-imunopozitivnih neurona, uočavaju se ćelije koje ispoljavaju ENT1 i morfološki odgovaraju astrocitima.



Slika 10. Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje ENT1 (zeleno) i markera neurona NeuN (crveno) nakon povrede. Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo).

Na kontrolnim presecima tela neurona i nastavci su intezivno obeleženi na ENT1 (strelice).

D–F: Veće uveličanje ukazuje na distribuciju ENT1 na membrani i u citoplazmi neurona (strelice).

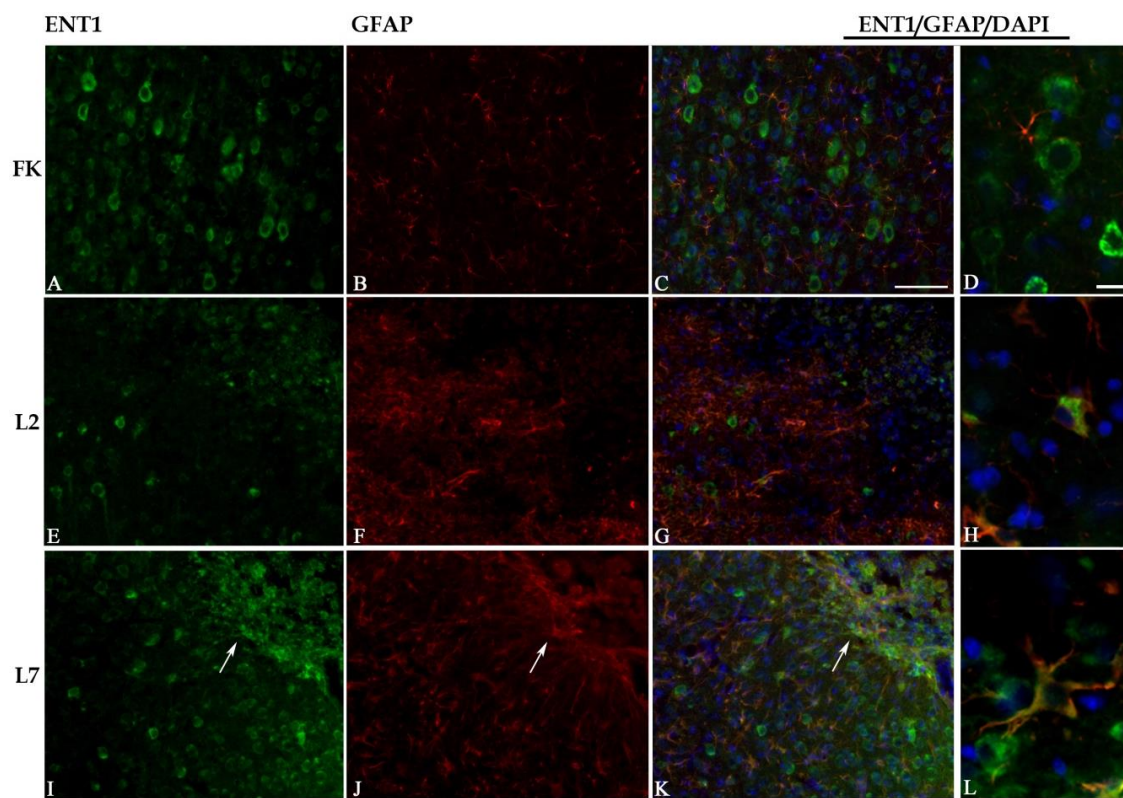
G–I: Dva dana nakon povrede intezitet fluorescencije za ENT1 na neuronima se značajno smanjuje (strelice).

J–L: Sedam dana nakon povrede u blizini lezije uočavaju se ENT1-pozitivne ćelije koje po morfologiji odgovaraju astrocitima (deblje strelice). Strelice ukazuju na retke ENT1 imunopozitivne neurone.

Dužine skala: A–C, 25 μm ; G–L, 5 μm .

Dvojno imunofluorescentno obeležavanje na ENT1 i GFAP urađeno je sa ciljem da se potvrdi prisustvo ENT1 na astrocitima u povređenom korteksu, a rezultati ove analize predstavljeni su panelom na Slici 11.

Na kontrolnim presecima (Slika 11A–D) nije uočeno prisustvo ENT1 (zeleno) na GFAP (crveno) pozitivnim astroцитima. Dva dana nakon povrede u neposrednoj blizini mesta lezije, primećeni su retki ENT1 imunopozitivni astroцитi (Slika 11E–H). Znatno veći broj ENT1 imunoreaktivnih astroцита uočen je sa razvojem astroglioze, sedmog dana nakon povrede, (Slika 11I–L, strelice).



Slika 11. Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje ENT1 (zeleno) i markera astroцита GFAP (crveno) nakon povrede. Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo).

A–D: Na kontrolnim presecima nisu uočeni ENT1⁺ astroцити.

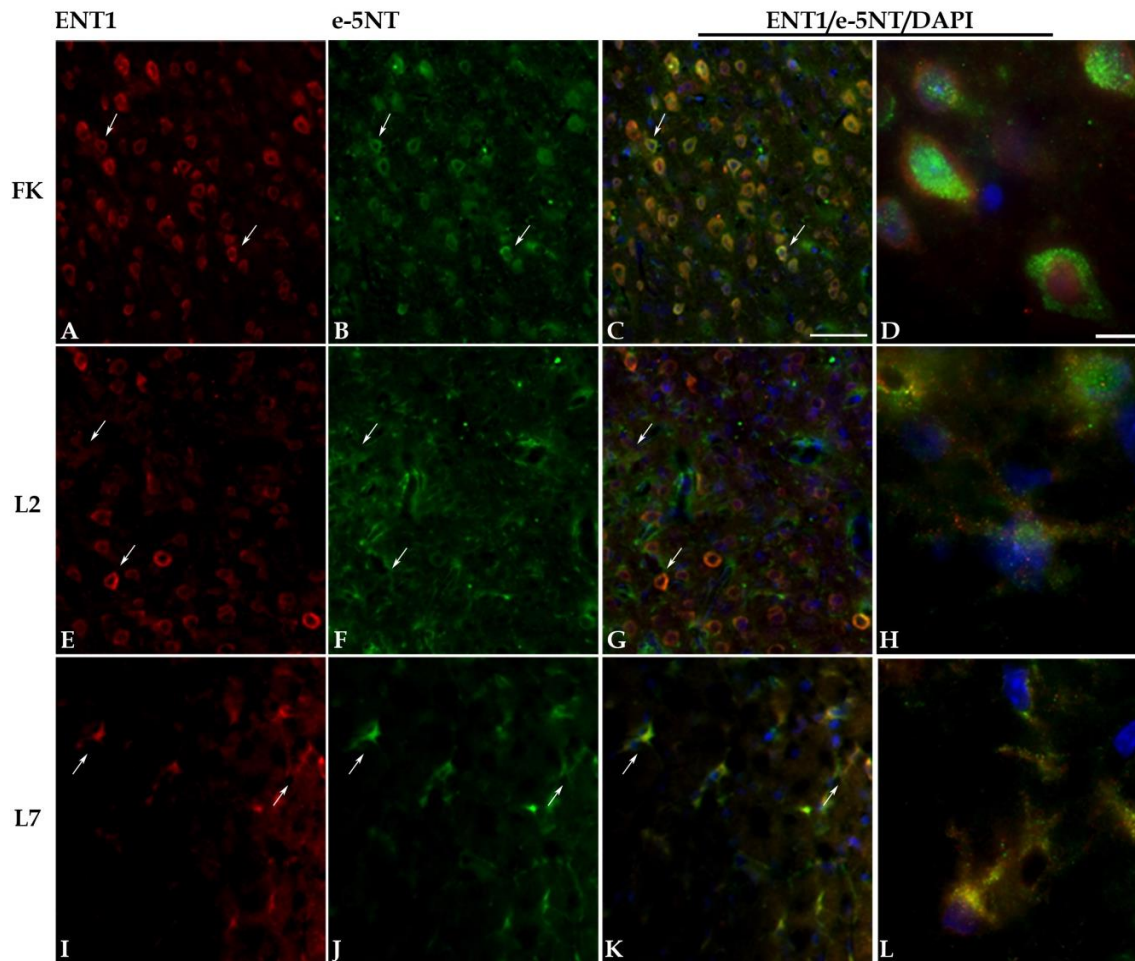
E–H: Dva dana nakon povrede smanjuje se intezitet imunofluorescence za ENT1. Retki ENT1⁺/GFAP⁺ reaktivni astroцити uočeni su u blizini mesta lezije.

I–L: Sedam dana nakon povrede uočava se veći broj ENT1⁺/GFAP⁺ astroцита u blizini lezije (strelice).

Dužine skala: A–C, E–G i I–K, 25 μm; D, H i L, 5 μm.

S obzirom na to da su naša prethodna istraživanja pokazala da ekto-5'-nukleotidaza prati sličan obrazac ekspresije kao i ENT1, urađeno je dvojno imunofluorescentno bojenje na ENT1 i ekto-5'-nukleotidazu (Slika 12).

Na kontrolnim presecima, većina ENT1 pozitivnih neurona (zeleno) eksprimira i e-5NT (Slika 12A–D, strelice). Dva dana nakon povrede morfologija obeleženih ćelija ukazuje i na neuronalnu i na ne-neuronalnu ekspresiju ova dva proteina (Slika 12E–H). Sedmog dana nakon povrede ENT1 i e-5NT ekspimiraju se na brojnim, hipertrofiranim reaktivnim astrocitima čiji se broj uvećava u neposrednoj oblasti ozlede (Slika 12I–L, strelice).



Slika 12. Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje ENT1 (crveno) i e-5NT (zeleno) nakon povrede. Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo).

A–D: Ekspresija ENT1 i e-5NT kontrolnim presecima (strelice).

E–H: Dva dana nakon povrede intezitet fluorescence za ENT1 i e-5NT (strelice) se smanjuje, dok se nešto izraženiji intezitet fluorescence za e-5NT uočavana ćelijama čija morfologija podseća na astrocite .

I–L: Sedam dana nakon povrede uočavaju se brojne ENT1+/e-5NT+ ćelije u blizini lezije (strelice), čija opšta morfologija ukazuje da se radi o astrocitima.

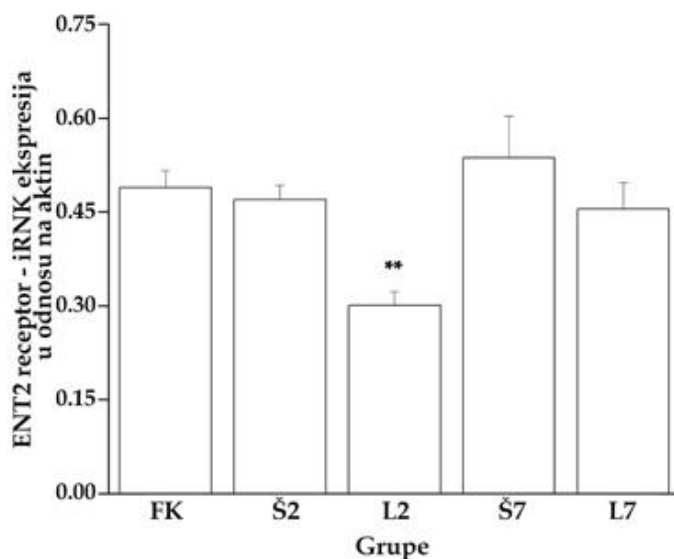
Dužine skale: A–C, E–G i I–K –25 μ m; D, H i L – 5 μ m.

4.2. Analiza ENT2 ekspresije na genskom i proteinskom nivou

Rezultati analize genske ekspresije za ENT2 nakon povrede mozga pacova prikazani su na Slici 13.

Analiza ekspresije gena za ENT2 je pokazala je da 2 dana nakon povrede (0.29 ± 0.05 , $P < 0.01$, Slika 13) dolazi do smanjenja ekspresije transkripta u odnosu

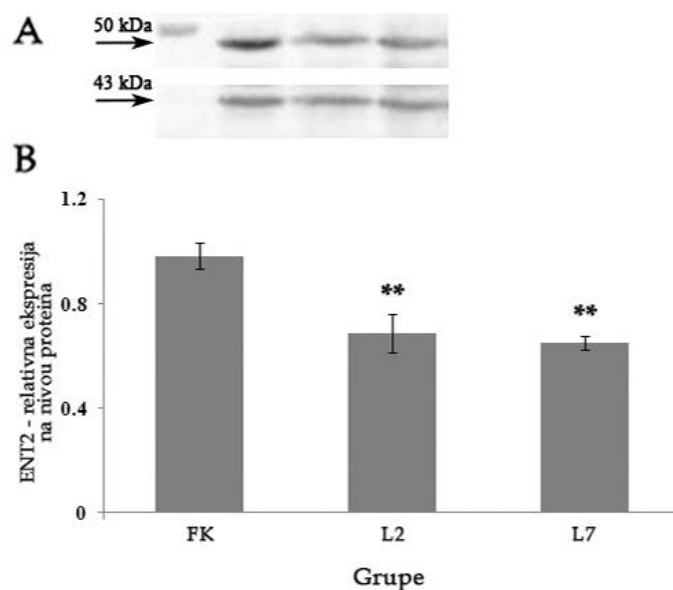
na odgovarajuću šam kontrolu (0.47 ± 0.04), dok se sedam dana nakon povrede nivo iRNK vratio na vrednost šam kontrole (0.52 ± 0.06).



Slika 13. Analiza genske ekspresije za ENT2.

Ekspresija iRNK za ENT2 je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkripata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za β -aktin. Rezultati prikazani stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM 4 uzorka po grupi ($n = 4$). Nivo statističke značajnosti između grupa: ** $P < 0.01$.

Kako bi se opisala ekspresija ENT2 u datim vremenima nakon povrede korteksa pacova, urađena je imunoblot analiza. Za anti-ENT2 antitelo dobijena je jedna specifična traka na 50 kDa (Slika 14A). Nije bilo značajnih razlika u ekspresiji ENT2 u šam kontrolama u odnosu na fiziološku kontrolu (podaci nisu prikazani). U poređenju sa fiziološkom kontrolom, ekspresija ENT2 proteina je bila značajno niža u uzorcima izolovanim iz ozleđenih korteksa dva i sedam dana nakon povrede (Slika 14B).



Slika 14. *Imunoblot analiza ekspresije ENT2.*

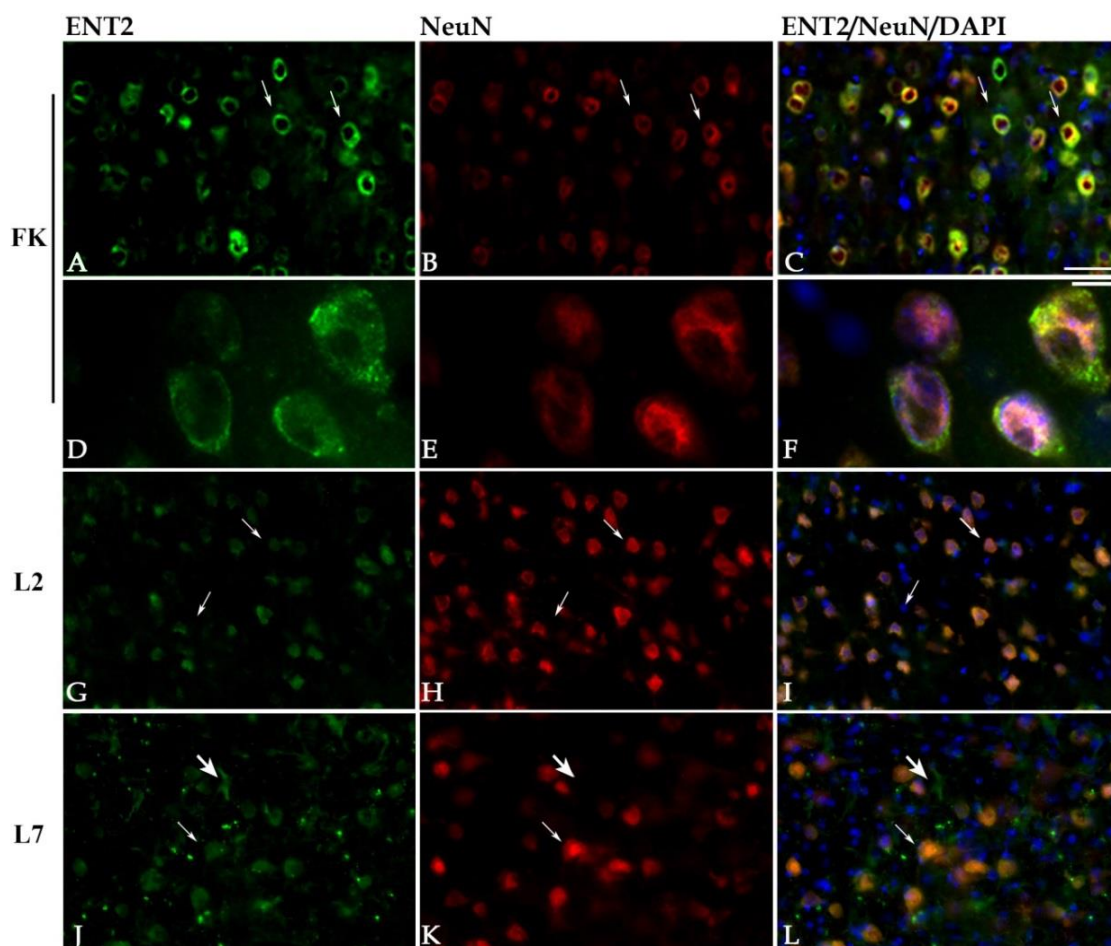
A: Reprezentativni snimak imunoblota za ENT2 i β -aktin. U bunariće je naneto 30 μ g proteina. Antitelo na ENT2 na imunoblotu daje jednu specifičnu traku na 50 kDa.

B: Imunoblot analiza ekspresije ENT2 u fiziološkoj kontroli (FK), dva (L2) i sedam (L7) dana nakon povrede. Vrednosti relativnih optičkih gustina traka na imunoblotu korigovane su prema odgovarajućim optičkim gustinama za β -aktin, a potom normalizovane u odnosu na fiziološku kontrolu (arbitrarno predstavljena kao 1.0). Rezultati prikazani stubićima predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM iz 5 nezavisnih eksperimenata. Nivo statističke značajnosti između grupa **P < 0.01.

Ekspresija i ćelijska distribucija ENT2 ispitana je imunohistohemijski. Između fizioloških i preseka šam kontrola nije bilo uočljive razlike (rezultati nisu prikazani), tako da su sva poređenja ozleđenih grupa vršena u odnosu na preseke dobijene iz kontrolnih životinja.

Lokalizacija ENT2 na neuronima u kori ispitana je dvojnim bojenjem na ENT2 u kombinaciji sa NeuN, kao markerom tela neurona i DAPI fluorescentne boje koja obeležava jedra svih ćelija (Slika 15). Dobijeni rezultati su potvrdili da je ENT2 eksprimiran na neuronima u korteksu kontrolnih životinja (Slika 15A–C, strelice), obeležavajući membranu i citoplazmu nervnih ćelija (Slika 15D–F, strelice). Dva dana nakon povrede, ENT2 imunoreaktivnost na neuronima slabi (Slika 15G–I, strelice), a isto se primećuje i sedmog dana nakon povrede (Slika 15J–

L, strelice). Međutim, u istoj vremenskoj tački, jasno se vide ENT2 imunopozitivne ćelije koje morfološki odgovaraju astrociticima (Slika 15J–L, deblje strelice).



Slika 15. Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje ENT2 (zeleno) i NeuN (crveno) nakon povrede. Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo).

A–C: Neuronska ćelijska tela i nastavci su intezivno obeležena na ENT2 (strelice) na kontrolnim presecima.

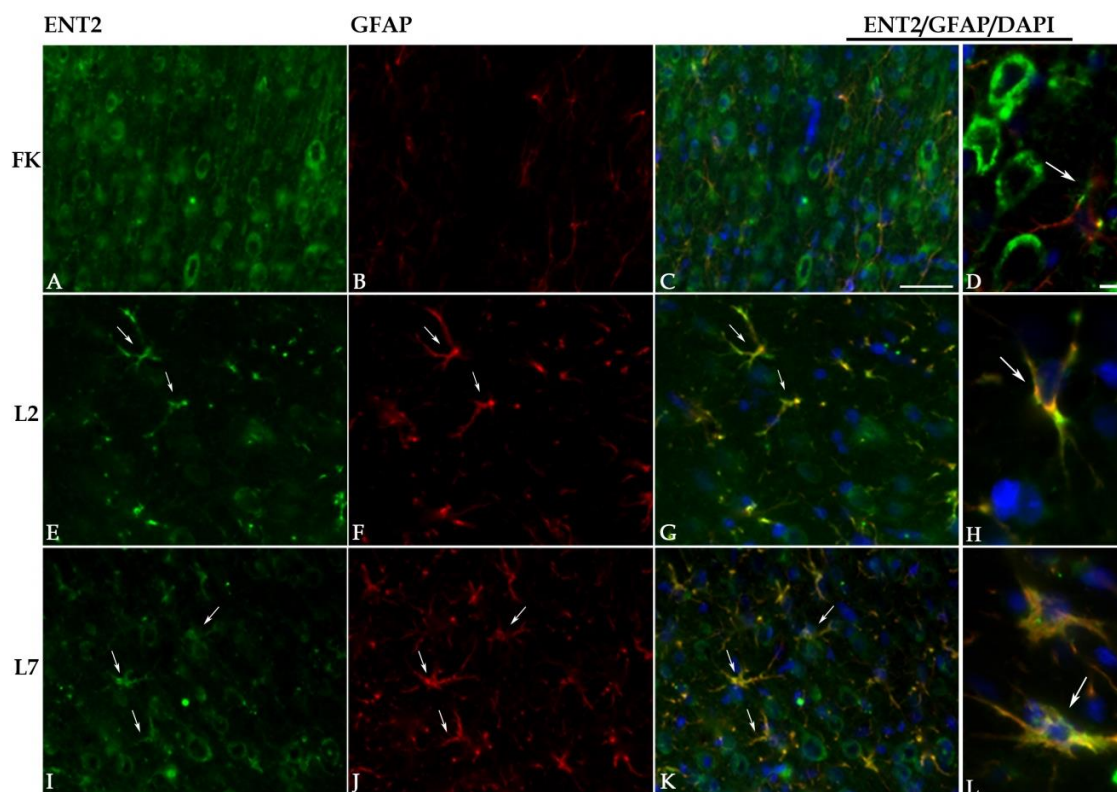
D–F: Veće uveličanje ukazuje na distribuciju ENT2 i na membrani i u citoplazmi neurona (strelice).

G–I: Dva dana nakon povrede intezitet fluorescentnog signala za ENT2 na neuronima se smanjuje (strelice).

J–L: Sedam dana nakon povrede u blizini lezije uočavaju se ENT2 pozitivne ćelije čija morfologija odgovara reaktivnim astrociticima (gornje strelice). Donje strelice ukazuju na retke ENT2 imunopozitivne neurone.

Dužine skala: A–C i G–L, 25 μ m; D–F, 5 μ m.

Dvojno imunofluorescentno bojenje na ENT2 (zeleno) i GFAP (crveno) urađeno je kako bi se bolje opisala distribucija ENT2 na reaktivnim astrocitima. Ovi rezultati su prikazani panelom na Slici 16. Na kontrolnim presecima ENT2 je eksprimiran na retkim kortikalnim astrocitima (Slika 16A–D, strelica). Dva dana nakon povrede veći broj GFAP pozitivnih astrocita u neposrednoj blizini lezije intezivnije je obeležen na ENT2 (Slika 16E–H, strelice). Sedmog dana nakon povrede, ENT2⁺ astrociti bili su brojniji (Slika 16I–K, strelice). ENT2 se jasno ispoljava na telu i nastavcima astrocita, a na većem uveličanju se moglo primetiti da se ne nalazi samo na membrani već i u citoplazmi astrocita (Slika 16L, strelica).



Slika 16. Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje ENT2 (zeleno) i markera astrocita GFAP (crveno) nakon povrede. Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo).

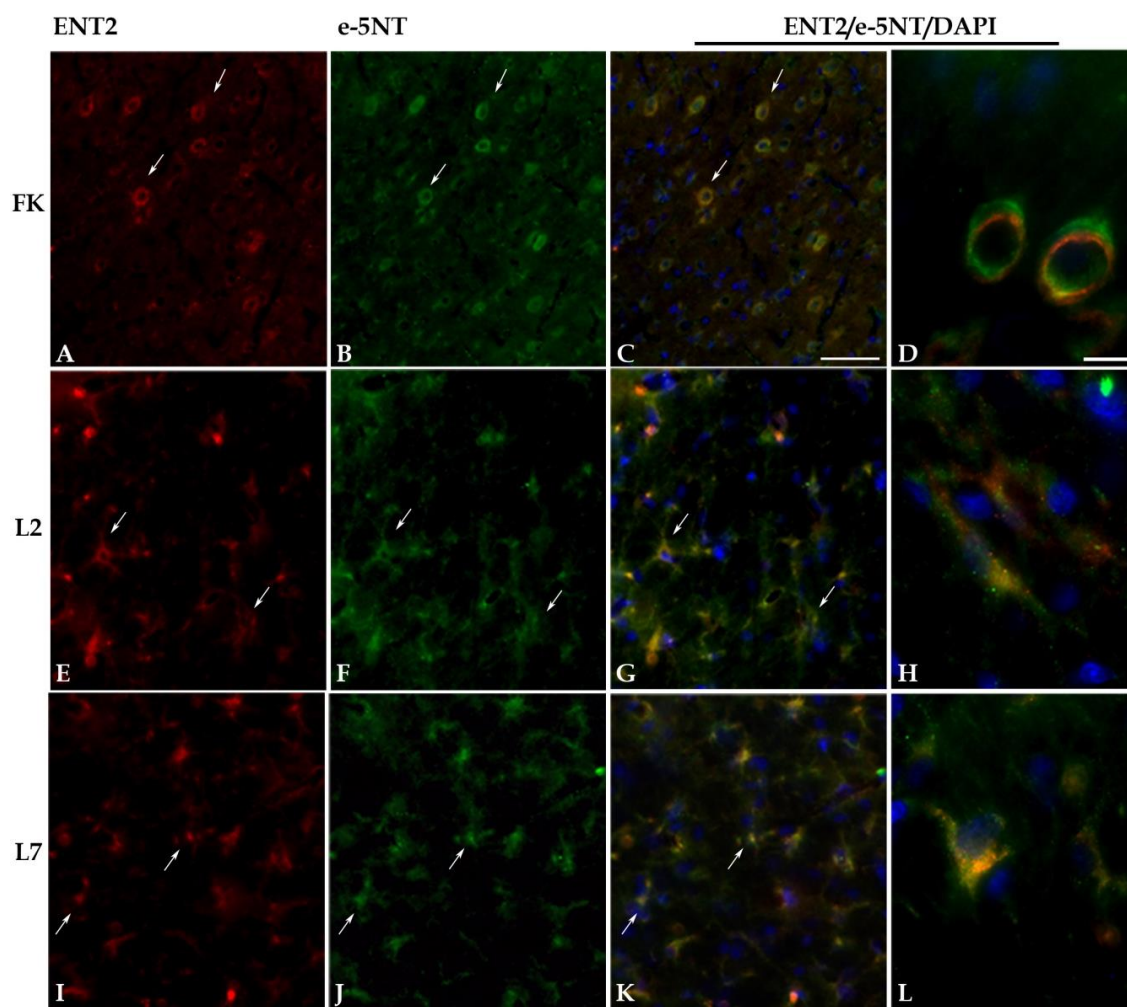
A–D: Na kontrolnim presecima ENT2 se eksprimira na retkim astrocitima.

E–H: Dva dana nakon povrede uočavaju se ENT2 pozitivni astrociti u blizini lezije (strelice) dok se ukupan intezitet fluorescence za ENT2, verovatno na neuronima, značajno smanjuje.

I–L: Sedam dana nakon povrede uočavaju se brojni ENT2⁺ reaktivni astrociti (strelice). Dužina skala: A–C, E–G i I–K, 25 μ m; D, H i L, 5 μ m.

Dalje, želeli smo da ispitamo eventualno preklapanje ekspresije ENT2 i e-5NT, što je predstavljeno na Slici 17, koja daje rezultate dvojnog imunofluorescentnog obeležavanja sa ENT2 (crveno) i e-5NT (zeleno).

Analiza imunofluorescence na presecima kontrolnih životinja pokazala je brojne ćelije, koje po obliku liče na neurone, a koje ispoljavaju i ENT2 i e-5NT (Slika 17A–D, strelice). Broj ENT2⁺/e-5NT⁺ ćelija se značajno smanjio dva dana nakon povrede. Međutim, u isto vreme broj ćelija koje ispoljavaju ENT2 i e-5NT, a koje podsećaju na reaktivne astrocite višestruko se povećao (Slika 17F–I, strelice). Još intenzivniji signal poreklom od ENT2 i e-5NT mogao se primetiti u predelu lezije sedam dana nakon povrede (Slika 17J–M, strelice).



Slika 17. Dvojno imunohistochemijsko obeležavanje ENT2 (crveno) i e-5NT (zeleno) nakon povrede. Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo).

A–D: Preklapanje ENT2 i e-5NT ekspresije na ćelijama na kontrolnim presecima (strelice).

E–H: Dva dana nakon povrede ćelije u blizini lezije, čija morfologija ukazuje na reaktivne astrocite, eksprimiraju ENT2 i e-5NT (strelice), dok ukupan intezitet fluorescence za ENT2 i e-5NT, smanjuje.

I–L: Sedam dana nakon povrede uočavaju se brojni ENT2/e-5NT pozitivni astrociti u blizini lezije (strelice).

Dužine skala: A–C, E–G i I–K, 25 μ m; D, H i L, 5 μ m.

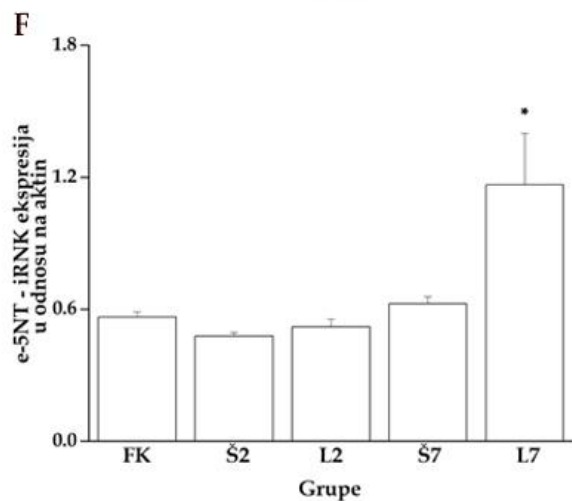
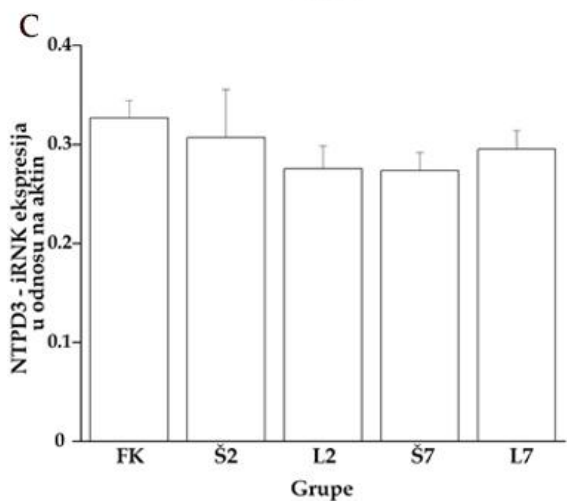
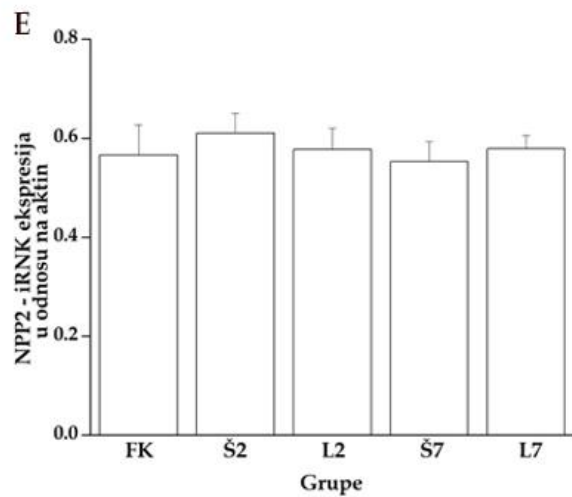
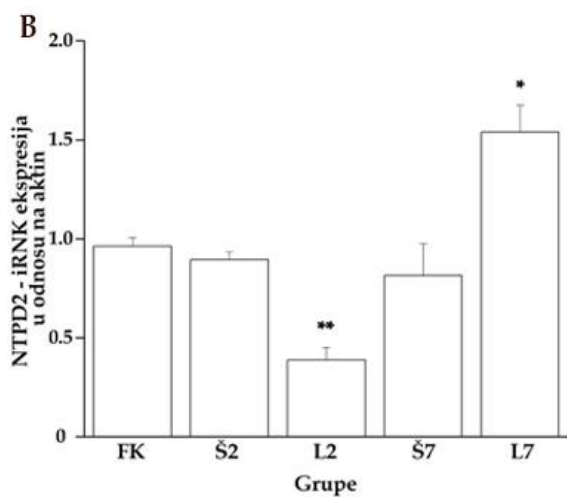
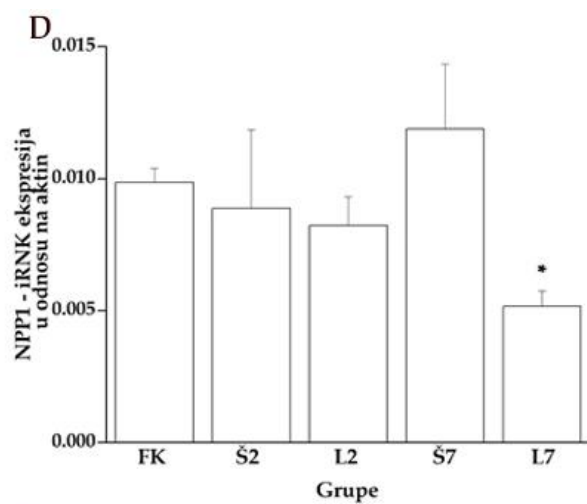
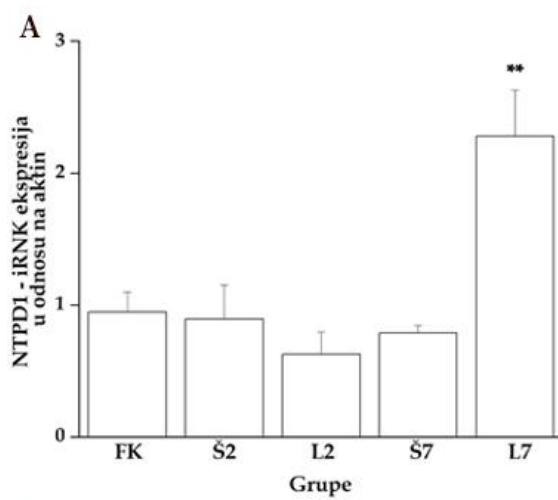
4.3. Analiza genske ekspresije za NTPD1-3, NPP1-2 i e-5NT

Na Slici 18 predstavljeni su rezultati ekspresije transkripata za ektonukleotidaze NTPD-aza1-3, NPP1-3 i e-5NT.

Dva dana nakon povrede, uočeno je značajno smanjenje ekspresije iRNK za NTPD2 (0.40 ± 0.16 , $P < 0.01$, Slika 18B) u odnosu na odgovarajuću šam kontrolu (0.98 ± 0.05). Nasuprot tome, sedam dana nakon povrede uočeno je povećanje ekspresije iRNK za NTPD1 (2.31 ± 0.93 , $P < 0.01$, Slika 18A) i NTPD2 (1.55 ± 0.16 , $P < 0.05$, Slika 18B) za oko 3, odnosno 2 puta u odnosu na odgovarajuće šam kontrole kontrolu (0.95 ± 0.15). Ekspresija iRNK za NTPD3 ostala je nepromenjena u ispitivanim vremenima nakon povrede (Slika 18C).

Na slici 18D-E prikazana je ekspresija transkripata za NPP1 i NPP2. Samo se sedam dana nakon povrede uočava statistički značajno smanjenje ekspresije, NPP1 transkripta (0.005 ± 0.002 , $P < 0.05$, Slika 18D) u odnosu na vrednost šam kontrole (0.013 ± 0.003 , $P < 0.05$, Slika 3D), dok se ekspresija NPP2 ne menja nakon povrede (Slika 18E). Ekspresija gena za NPP3 bila je je ispod granice detekcije (rezultati nisu prikazani).

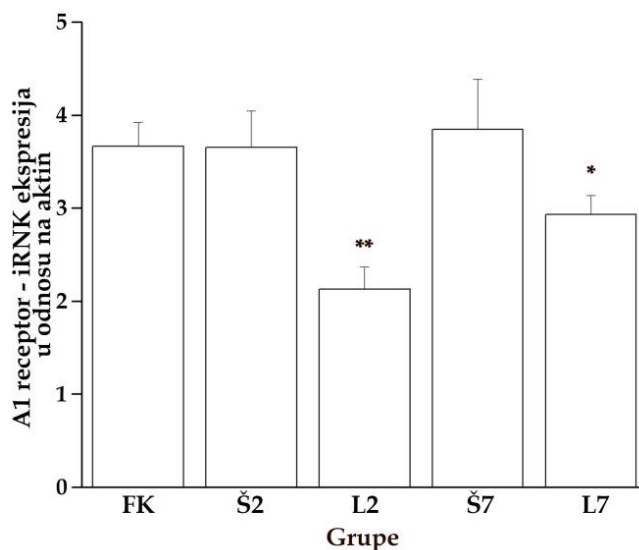
Ekspresija iRNK za e-5NT prikazana je na Slici 18F. Drugog dana nakon povrede zastupljenost iRNK za e-5NT bila je na nivou šam kontrole, dok je sedmog dana povećana oko 2 puta (1.22 ± 0.41 , $P < 0.05$, Slika 18F) u odnosu na šam kontrolu (0.58 ± 0.51).



Slika 18. qRT-PCR analiza genske ekspresije za NTPD1-3, NPP1-2 i e-5NT. Ekspresija iRNK za NTPD1 (A), NTPD2 (B), NTPD3 (C), NPP1 (D), NPP2 (E) i e-5NT (F) određena je qRT-PCR analizom. Nivoi transkripata u svakoj grupi su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za β -aktin. Rezultati prikazani stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM jedne probe sa 4 uzorka po grupi (n = 4). Statistička značajnost razlika između grupa *P < 0.05, **P < 0.01.

4.4. Analiza genske ekspresije za A1 receptor

Na Slici 19 prikazani su rezultati genske ekspresije za A1 receptor dva i sedam dana nakon povrede. Dva dana nakon povrede nivo iRNK za A1 receptor je gotovo prepolovljen (2.12 ± 0.61 , $P < 0.01$) u odnosu na odgovarajuću šam kontrolu (3.72 ± 0.33). Nivo iRNK za A1 receptor ostaje ispod nivoa šam kontrole (3.83 ± 0.38) i sedam dana nakon povrede (2.93 ± 0.40 , $P < 0.05$).



Slika 19. qRT-PCR analiza genske ekspresije za A1 receptor. Ekspresija iRNK za A1 receptor je određena qRT-PCR analizom. Nivo ekspresije transkripta u svakoj grupi prikazan je relativno u odnosu na nivo ekspresije transkripta za β -aktin. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz 4 uzorka po grupi (n = 4). Statistička značajnost *P < 0.05; **P < 0.01.

4.5. Zastupljenost transkripata ispitivanih komponenti adenozienskog signalnog sistema u korteksu mozga pacova

Shodno dobijenim vrednostima ekspresije komponenti adenozienskog signalnog sistema izraženim relativno u odnosu na β -aktin, najzastupljeniji od ovde ispitivanih je transkript za A1 receptor. Najzastupljenije ektonukleotidaze u korteksu mozga pacova su NTPD1 i NTPD2, dok su ostale ispitivane ektonukleotidaze eksprimirane u daleko manjoj meri. Dalje, analizom nivoa ekspresije transkripata utvrđeno je da je ENT2 oko 3 puta zastupljeniji od transkripta za ENT1.

Poređenje zastupljenosti transkripata ispitivanih komponenti adenozienskog signalnog sistema u intaktnom korteksu mozga pacova može se predstaviti sledećim redosledom:

A1 receptor > NTPD2 \approx NTPD1 > NPP2 \approx e-5NT \geq ENT2 > NTPD3 \geq ENT1 > NPP1 >>NPP3

4.2. Aktivnost komponenti adenozienskog signalnog sistema nakon skarifikacije astrocita u kulturi

Budući da je u modelu povrede mozga pacova uočena značajna promena aktivnosti i ekspresije komponenti adenozienskog signalnog sistema na astrocitima, u drugom delu teze ispitali smo odgovor astrocita na povredu. Opređelili smo se za model povrede skarifikacijom ćelijskog jednosloja (engl. *scratch wound*, SW). Jedan deo eksperimenata izveden je sa ciljem da se okarakteriše model u pogledu ekspresije odabranih hondroitin-sulfat proteoglikana (engl. *chondroitin sulfate proteoglycans* - CSPG) i markera GFAP-a, na genskom i proteinskom nivou. Dalje je analiziran odgovor astrocita pod uticajem različitih tretmana. Praćene su promene u genskoj i proteinskoj ekspresiji nekoliko odabranih komponenti adenozienskog

signalnog sistema i promene vanćelijskog metabolizma adenoizina u medijumima ćelijskih kultura.

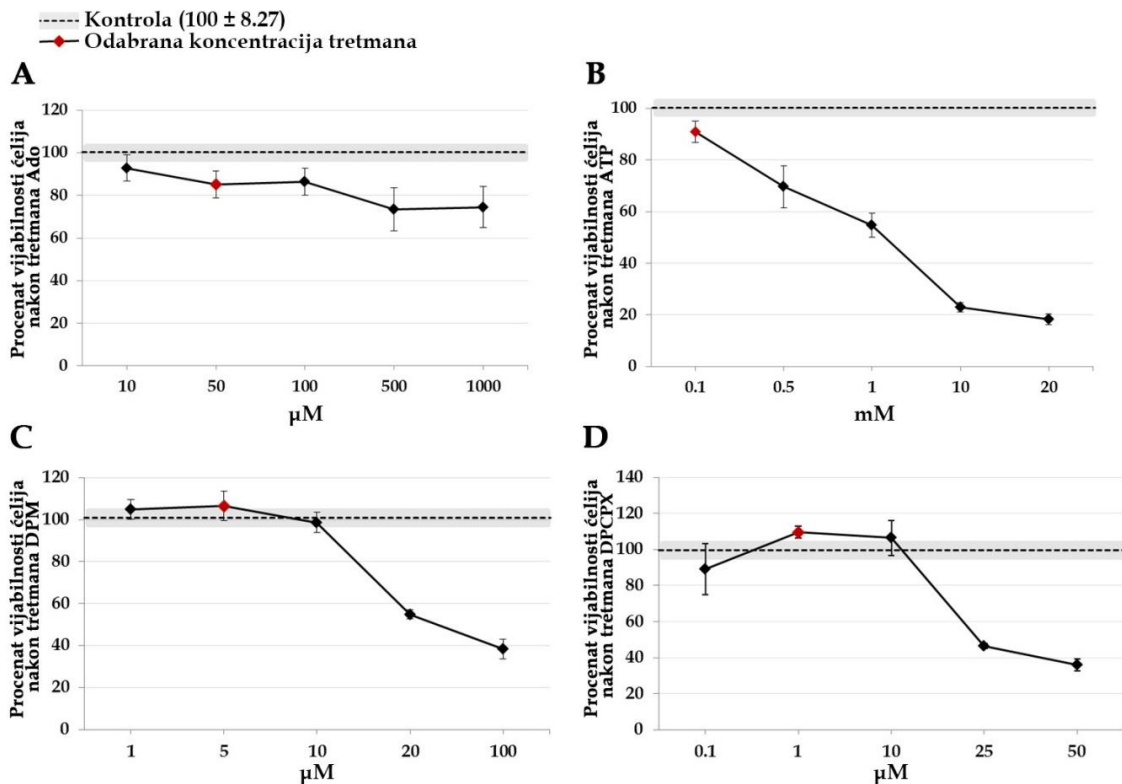
4.2.1. Vijabilnost ćelija u kulturi

Vijabilnost ćelija u kulturi nakon 24 h tretmana rastućim koncentracijama Ado, ATP, DPCPX i DPM, određena je MTT testom (Slika 20).

Uticaj Ado ispitan je u opsegu koncentracija 10-1000 $\mu\text{mol/l}$. U navedenom opsegu Ado ispoljava mali, ali statistički značajan uticaj na preživljavanje ćelija u kulturi, koji se kreće od $12 \pm 3\%$ ćelijske smrtnosti pri koncentraciji od 50 $\mu\text{mol/l}$ ($P < 0.05$) do $23 \pm 5\%$ pri koncentraciji od 1000 $\mu\text{mol/l}$ ($P < 0.05$) u odnosu na kontrolne kulture (Slika 20A).

Uticaj ATP na vijabilnost ćelija u kulturi ispitana je u opsegu koncentracija od 0.1 – 20 mmol/l. ATP izaziva značajan porast ćelijske smrti u svim primenjenim dozama, izazivajući čak $81 \pm 2\%$ ćelijske smrtnosti pri najvećoj testiranoj dozi od 20 mmol/l ($P < 0.001$).

Uticaj DPM na vijabilnost ćelija u kulturi ispitana je u opsegu koncentracija 1-100 $\mu\text{mol/l}$ (Slika 20C). Značajno povećanje smrtnosti ćelija uočeno je pri koncentraciji od 20 $\mu\text{mol/l}$ ($43 \pm 1\%$, $P < 0.001$) i 100 $\mu\text{mol/l}$ ($61 \pm 3\%$, $P < 0.001$). Uticaj DPCPX, antagoniste A1 receptora, na preživljavanje ćelija u kulturi ispitan je u opsegu koncentracija 0.1 do 50 $\mu\text{mol/l}$. DPCPX izaziva značajan stepen ćelijske smrti pri koncentracijama od 25 $\mu\text{mol/l}$ ($52 \pm 1\%$, $P < 0.001$) i 50 μmol ($61 \pm 2\%$, $P < 0.001$) (Slika 20D).



Slika 20. Uticaj tretmana na vijabilnost ćelija.

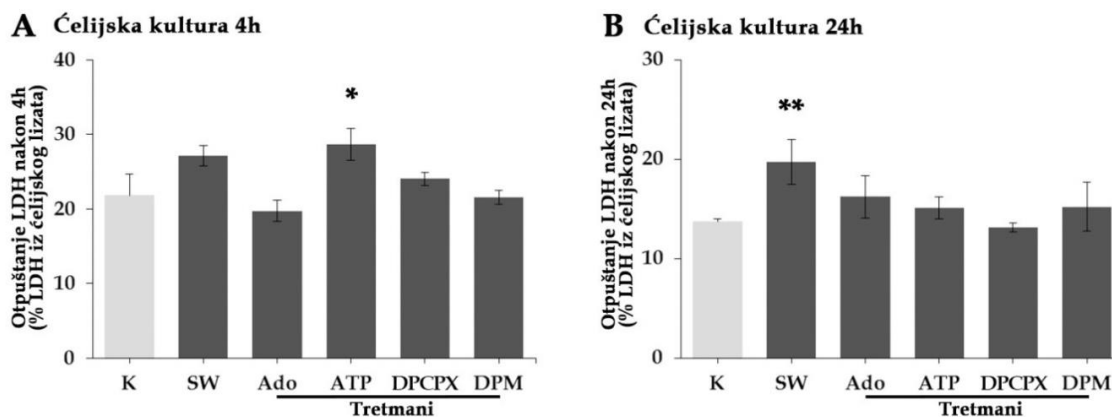
Uticaj različitih koncentracija Ado (A), ATP (B), DPM (C) i DPCPX (D) na vijabilnost ćelija određen je MTT testom. Efekti primenjenih tretmana prikazani su kao procenat od kontrole (100%), koja je definisana kao kolorimetrijsko očitavanje u kulturi netretiranih astrocita.

Rezultati prikazani tačkama su srednje vrednosti \pm SEM iz 3 nezavisna eksperimenta.

Citotoksični potencijal u kulturi ćelija nakon skarifikacije glijskog jednosloja, odnosno nakon tretmana prethodno odabranim koncentracijama Ado ($50 \mu\text{M}$), ATP ($100 \mu\text{M}$), DPM ($5 \mu\text{M}$) i DPCPX ($1 \mu\text{M}$), ispitivan je primenom LDH testa 4 i 24 sata nakon odgovarajućeg tretmana (Slika 21).

U kulturi ćelija 4 h nakon skarifikacije primećeno je neznatno povećanje ćelijske smrtnosti ($27 \pm 2\%$) u odnosu na kontrolu ($22 \pm 3\%$). U istoj vremenskoj tački, od svih ispitivanih tretmana samo je ATP značajno smanjio vijabilnost ćelija ($29 \pm 2.1\%$, $P < 0.05$), (Slika 21A).

Dvadeset četiri časa nakon SW povrede vijabilnost ćelija se smanjila ($20 \pm 2.25\%$, $P < 0.01$) u odnosu na kontrolu ($14 \pm 1\%$). Ostali tretmani nisu imali uticaja na ćelijsku vijabilnost (Slika 21B).



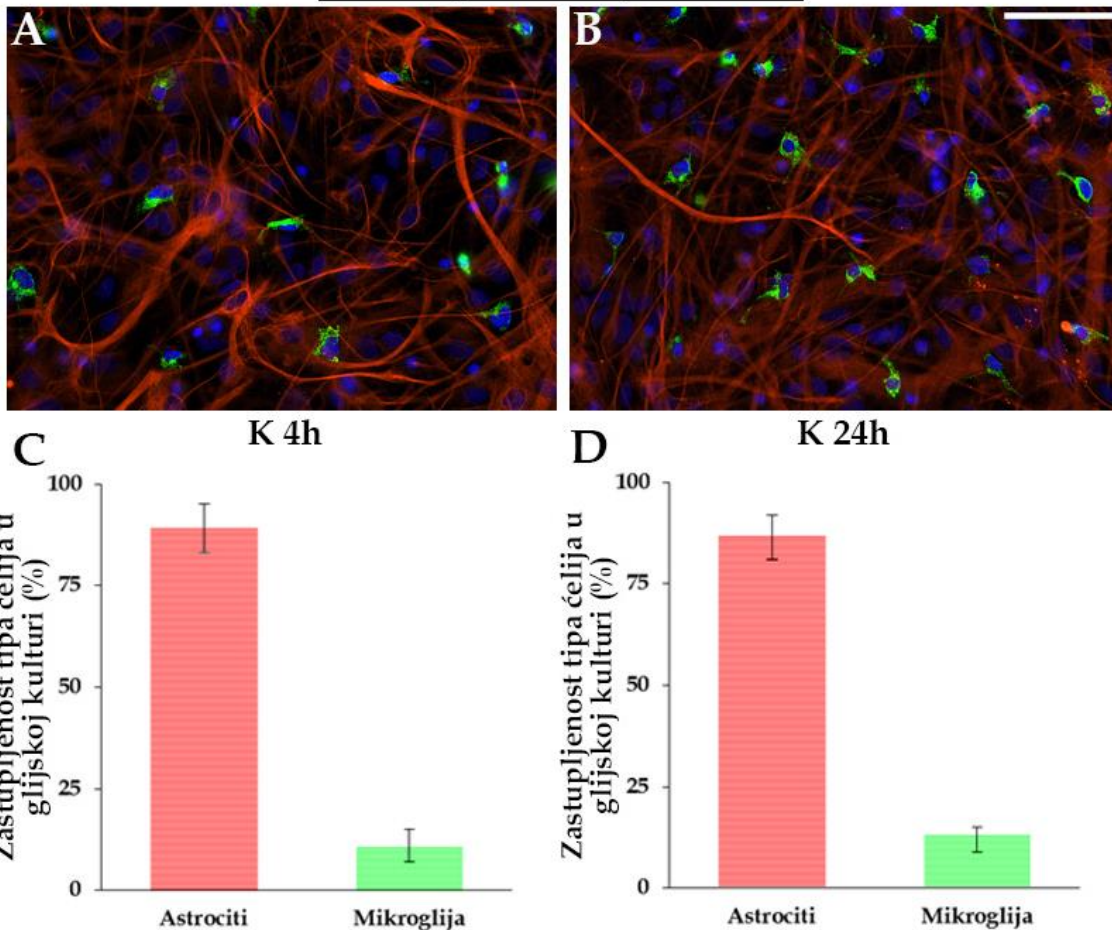
Slika 21. Uticaj SW i tretmana na ćelijsku vijabilnost.

Uticaj različitih SW i tretmana Ado ($50 \mu\text{M}$), ATP ($100 \mu\text{M}$), DPM ($5 \mu\text{M}$) i DPCPX ($1 \mu\text{M}$), na ćelijsku vijabilnost *in vitro* određen je LDH testom nakon 4–h (A) i 24–h (B) tretmana. Svi efekti predstavljeni su kao procenat otpuštanja LDH u odnosu na apsolutnu kontrolu (100%) maksimalnog otpuštanja LDH iz liziranih ćelija. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz 3 nezavisna eksperimenta.

4.2.2. Opšte karakteristike mešovite glijske kulture i SW modela povrede

Odnos astrocita/mikroglije u mešovitoj glijskoj kulturi, određen je dvojnim imunofluorecentnim obeležavanjem markera mikroglije IBA1 i markera astrocita vimentina (Slika 22A,B). Rezultati su pokazali da je da je ovaj odnos približno isti u kulturama starim 4 i 24 h, i to 9:1 u korist astrocita (Slika 22C,D).

IBA1/Vimentin/DAPI

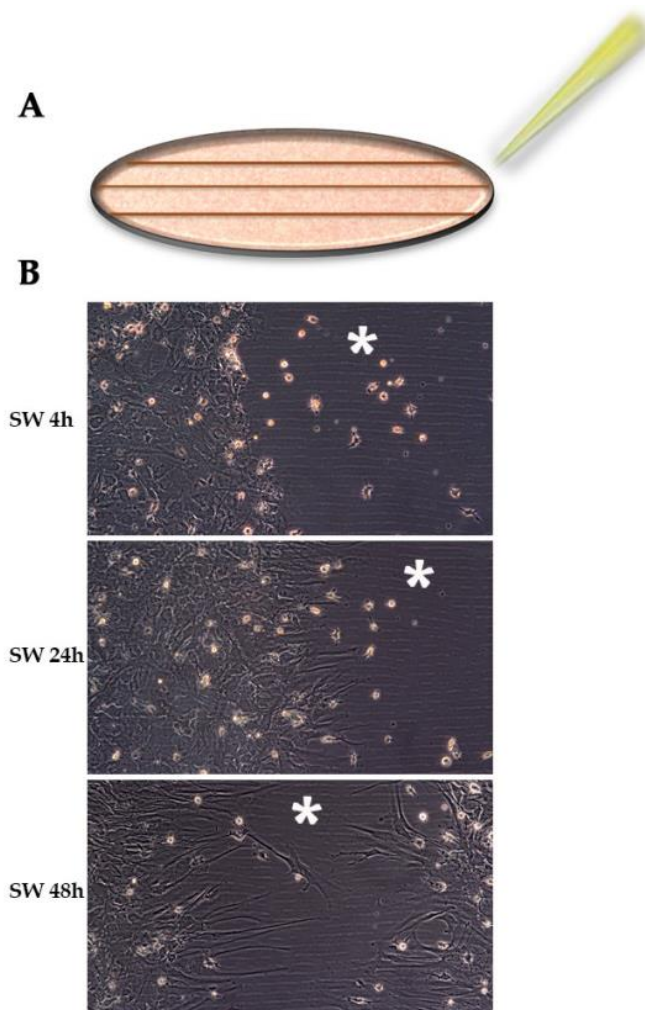


Slika 22. Odnos astrocita i mikroglije u mešovitoj glijskoj kulturi.

A, B: Dvojno imunofluorescentno bojenje na vimentin (crveno) i IBA1 (zeleno). Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo), u kulturama starim 4 i 24 sata. Skala: 30 μ m.

C, D: Odnos astrocita/mikroglije iznosio 9:1 (n = 3).

Mešovita glijska kultura je ispitivana tokom 48 h nakon povrede skarifikacijom (za šematski prikaz, videti Sliku 23A), korišćenjem fazno-kontrastne mikroskopije (Slika 23B). Dobijeni rezultati su pokazali karakteristične morfološke odlike i trend migracije astrocita ka mestu skarifikacije u datim vremenskim tačkama (4, 24 i 48 sati nakon SW).

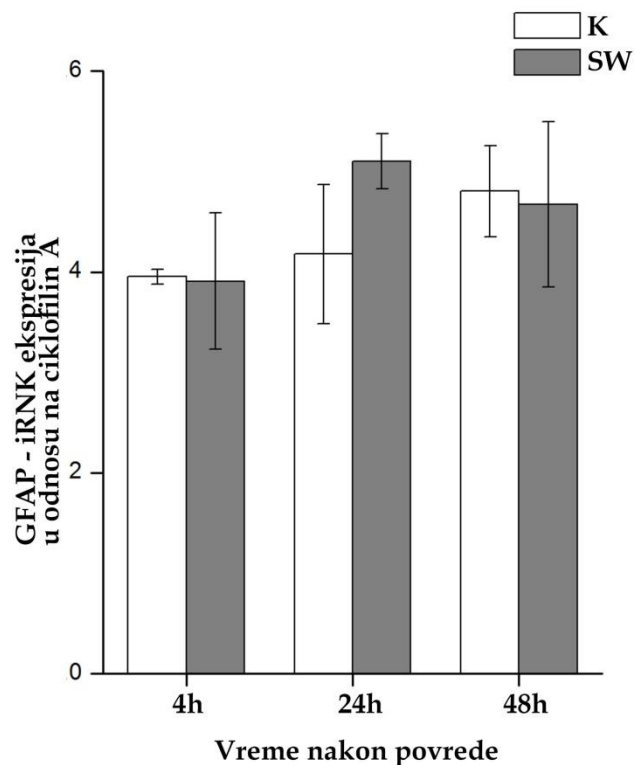


Slika 23. Opšte karakteristike SW modela mešovite glijske kulture.

A: Šematski prikaz SW povrede.

B: Fazno-kontrastni prikaz povrede skarifikacijom. Mesto povrede je označeno zvedicom.

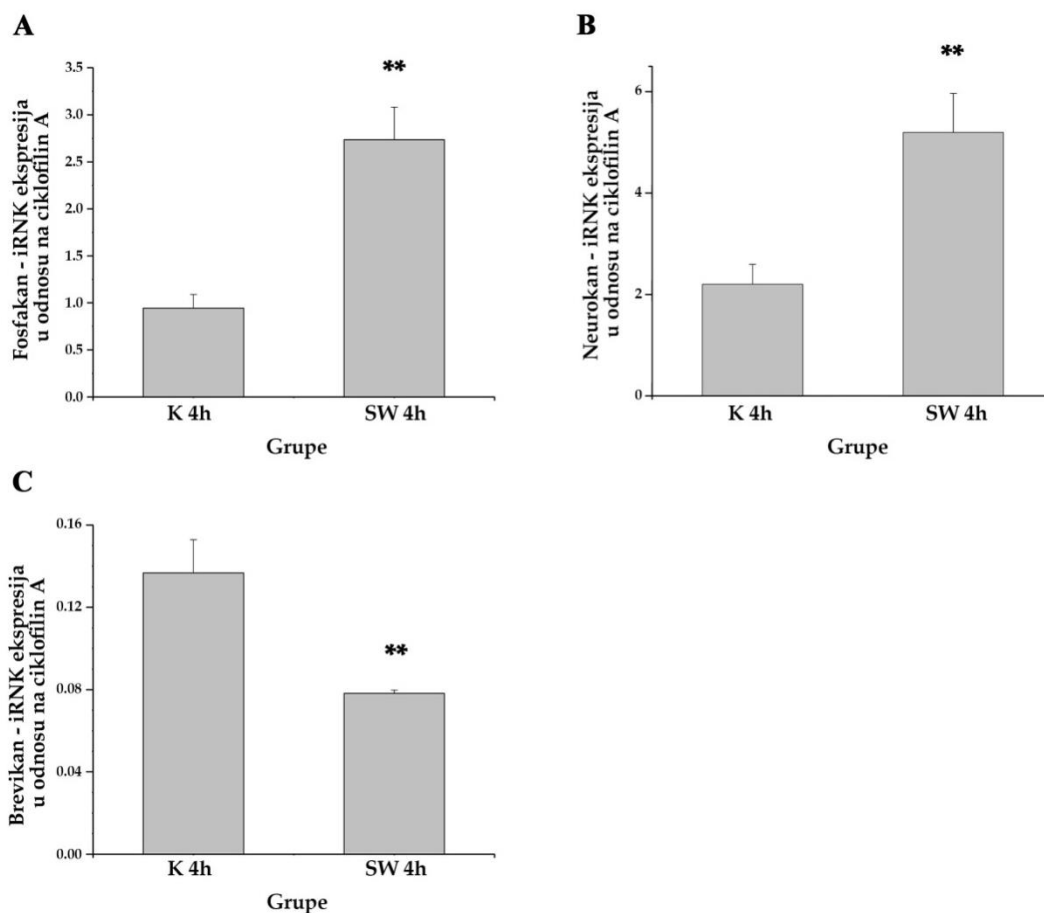
qRT-PCR analiza je pokazala da se nivo iRNK GFAP-a 4, 24 i 48 sati nakon povrede nije menjao (Slika 24).



Slika 24. Analiza genske ekspresije za GFAP 4, 24 i 48 h nakon SW povrede.

Ekspresija iRNK za GFAP određena je qRT-PCR analizom. Nivo ekspresije transkripta u svakoj grupi prikazan je relativno u odnosu na nivo ekspresije transkripta za ciklofilin-A. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz 6 uzoraka po grupi.

Analiza genske ekspresije je pokazala da su sva tri ispitivana proteoglikana – fosfakan, neurokan i brevikan, eksprimirani u mešovitoj glijskoj kulturi astrocita i mikroglije (Slika 25). qRT-PCR analiza je takođe pokazala i razlike u zastupljenosti transkripata za iRNK ova tri proteoglikana: iRNK za neurokan je 2 puta više zastupljena u odnosu na iRNK za fosfakan i 14 puta više u odnosu na iRNK za brevikan. Sem toga, 4 sata nakon skarifikacije nivoi transkripata za fosfakan i neurokan su bili značajno povećani (2.73 ± 0.66 , odnosno 5.20 ± 1.20 , $P < 0.01$) u poređenju sa kontrolom (0.94 ± 0.27 , odnosno 2.2 ± 0.76). Sa druge strane, nivo transkripta za brevikan se posle povrede značajno smanjio (0.08 ± 0.007 , $P < 0.01$) u odnosu na kontrolu (0.17 ± 0.11).



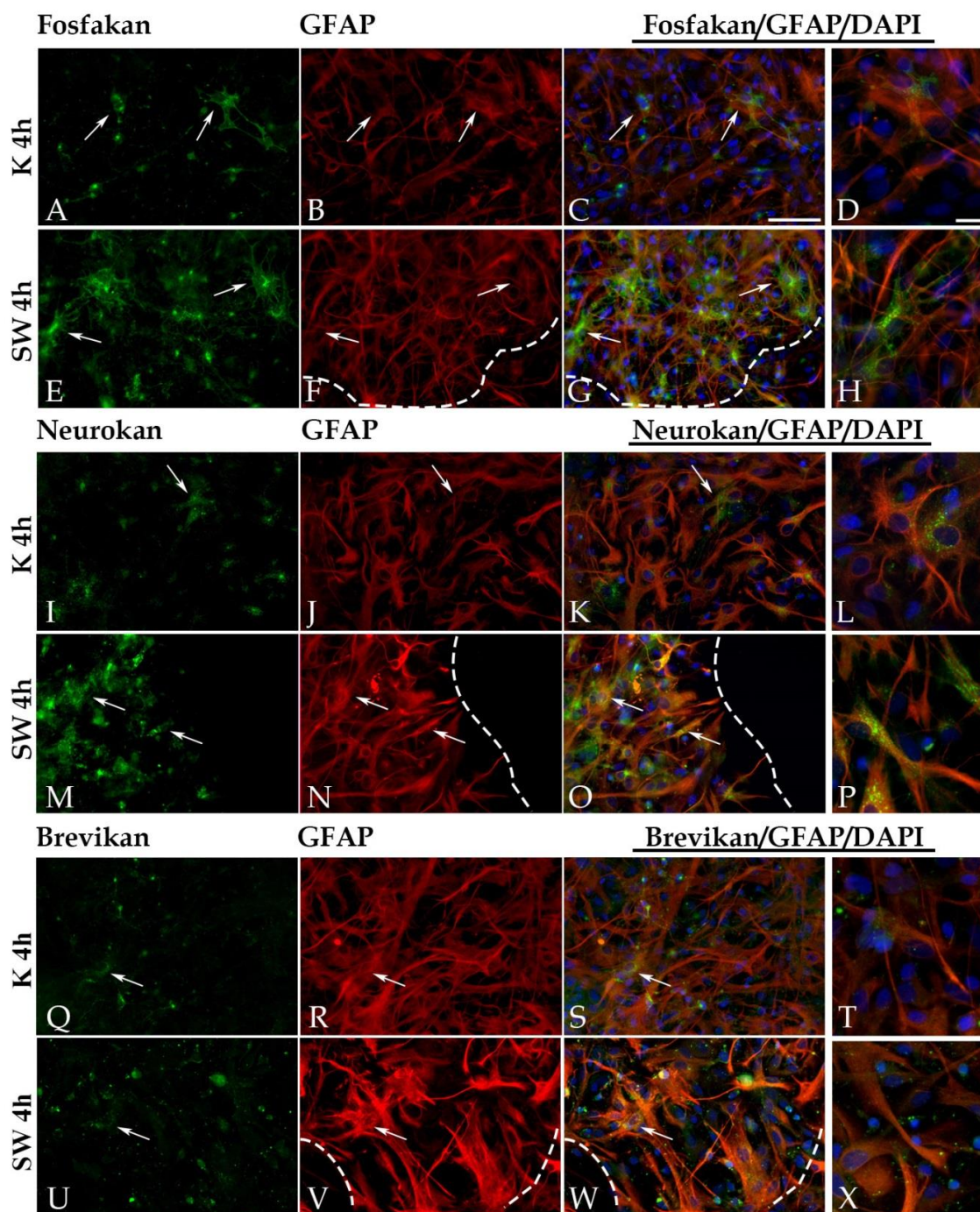
Slika 25. Zatupljenost iRNK za fosfakan, neurokan i brevikan 4 h nakon SW povrede.

Ekspresija iRNK za fosfakan (A), neurokan (B) i brevikan (C), određena je qRT-PCR analizom. Nivo ekspresije transkripta u svakoj grupi prikazan je relativno u odnosu na nivo ekspresije transkripta za ciklofilin-A. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz 3 uzorka po grupi. Statistička značajnost: $**P < 0.01$.

Ekspresija neurokana, fosfkana i brevikana nakon SW povrede ispitana je dvojnim imunofluorescentnim bojenjem i kontrastnim bojenjem jedara DAPI bojom (Slika 26). U kontrolim kulturama, fosfakan i neurokan su detektovani u citoplazmi GFAP⁺ astrocита (Slika 26A–D, I–L). U skladu sa niskom ekspresijom na nivou iRNK, brevikan je bio slabo detektovan u astrocitima kontrolnih grupa (Slika 26Q–T).

Imunofluorescentni signal za fosfakan i neurokan je bio pojačan 4 sata nakon SW, kada je primećeno intezivno bojenje većine astrocита oko mesta

skarifikacije (Slika 26E–H, M–P). U isto vreme, nisu primećene razlike u intezitetu imunofluorescence za brevikan (Slika 26U–X).

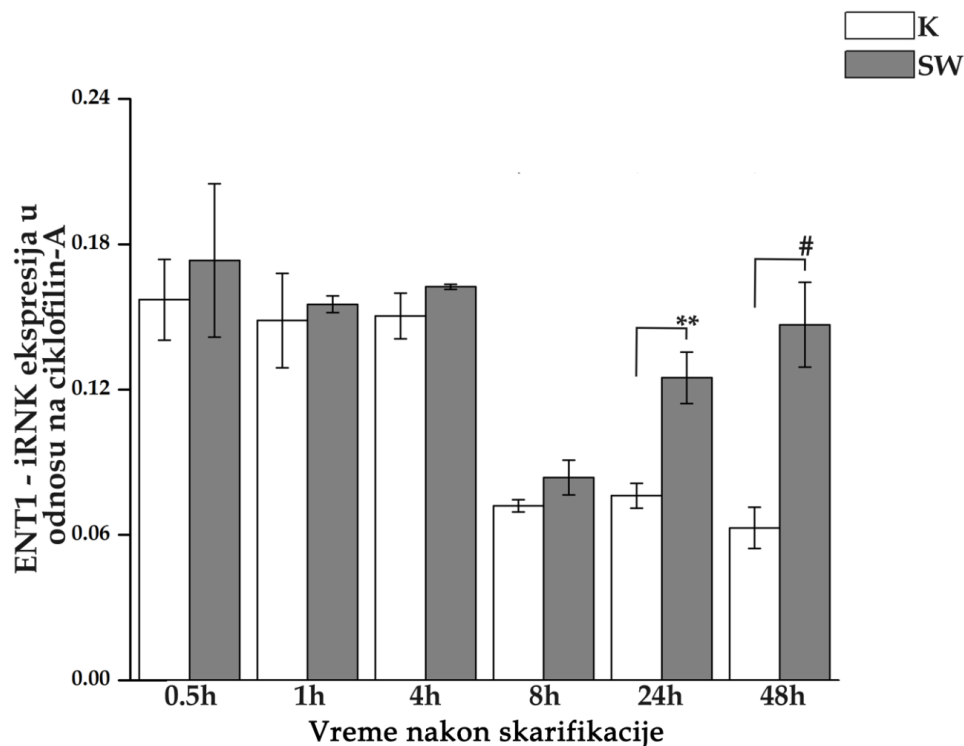


Slika 26. Dvojno imunocitohemijsko obeležavanje fosfakana, neurokana i brevikana (zeleno) i GFAP (crveno) nakon SW povrede. Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo). **A-C, I-K:** U kontrolnim grupama, fosfakan i neurokan su prisutni u citoplazmićelijskihcitoplazmi ćelijskih tela astrocita I manje u nastavcima (strelice), što je očiglednije na većem uveličanju (**D, L**). **Q-T:** Brevikan je u kontrolnim uzorcima bio slabo prisutan (strelice). **E-H, M-P:** Četiri sata nakon skarifikacije, u većini astrocita oko mesta povrede uočava se porast imunoreaktivnosti na fosfakan i neurokan (strelice), ali i na GFAP. Fosfakan i neurokan su snažno eksprimirani i u telima astrocita ali i brojnim nastavcima. **U-X:** U poređenju sa kontrolom, imunofluorescenca poreklom od brevikana se nije značajno menjala (strelice). Mesto skarifikacije je označeno isprekidanom linijom. Dužine skala: 30 μm i 10 μm .

4.2.3. Analiza ekspresije ENT1 u različitim vremenima nakon povrede skarifikacijom ili tretmana

iRNK za ENT1 praćena je 0.5, 1, 4, 8, 24 i 48 sati nakon skarifikacije (Slika 27). Kao kontrola svake grupe uzete su intaktne ćelije iste vremenske tačke.

Prvih 24 sata nakon skarifikacije ne zapažaju se značajne promene ekspresije ENT1 u odnosu na odgovarajuće kontrolne kulture. Nakon tog vremena uočava se povećanje ekspresije iRNK za ENT1 za oko 70% (0.12 ± 0.001 , $P < 0.01$) u odnosu na kontrolu (0.07 ± 0.005), i 100% 48 h nakon povrede (0.15 ± 0.017 , $P < 0.001$), u odnosu na odgovarajuću kontrolu (0.07 ± 0.009).

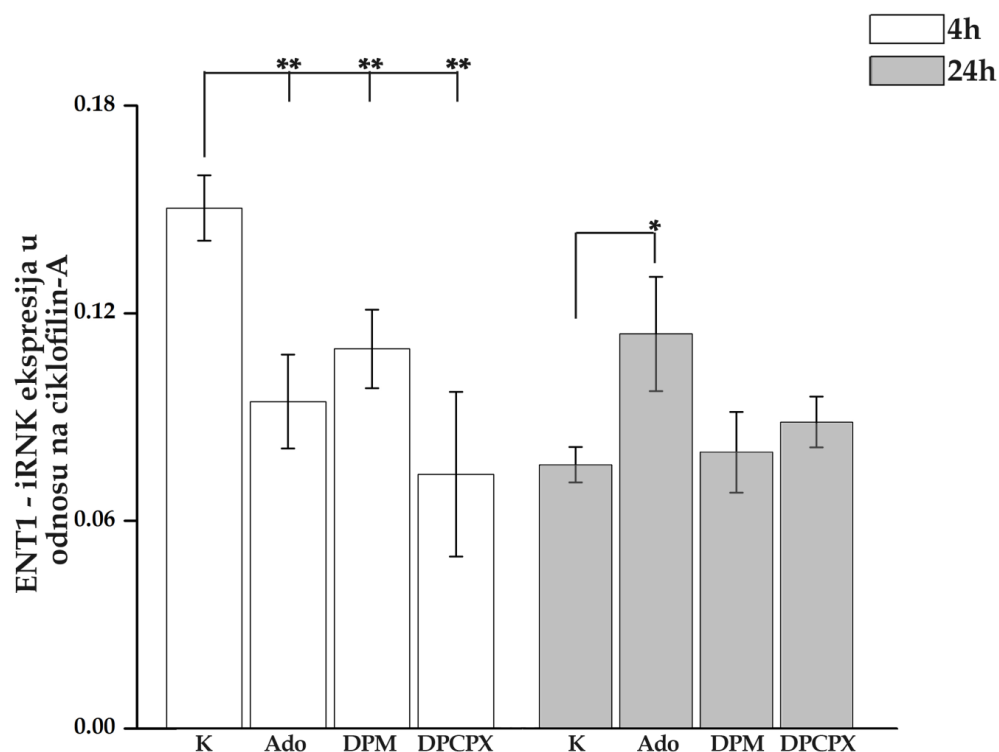


Slika 27. Analiza genske ekspresije za ENT1 u različitim vremenskim tačkama nakon skarifikacije.

Ekspresija iRNK za ENT1 je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkripata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za ciklofilin-A. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi. Nivo statističke značajnosti između grupa: ** $P < 0.01$; # $P < 0.001$.

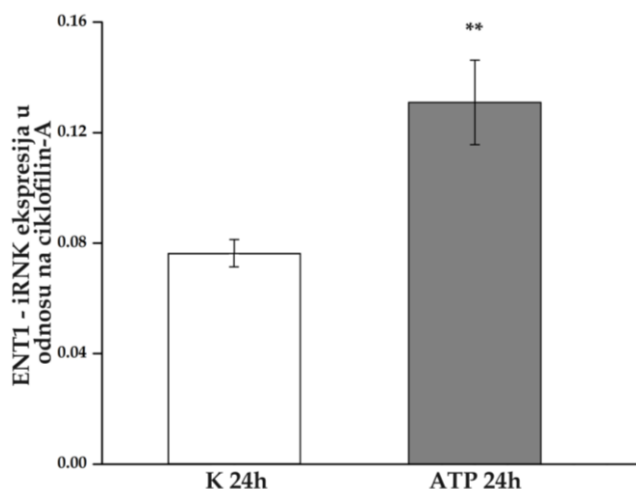
U daljem toku rađena je analiza genske ekspresije za ENT1 4 i 24 h nakon tretmana Ado (50 μ M), DPM (5 μ M) i DPCPX (1 μ M), (Slika 28). Kao kontrola svake grupe uzete su netretirane ćelije iste vremenske tačke.

Rezultati su pokazali da svi tretmani značajno smanjuju ekspresiju ENT1 4 h nakon aplikacije. Dodavanje Ado smanjuje ekspresiju ENT1 za oko 40% (0.09 ± 0.01 , $P < 0.01$), DPM za 35% (0.11 ± 0.01 , $P < 0.01$) i DPCPX za 50% (0.07 ± 0.02 , $P < 0.01$) u odnosu na kontrolu (0.15 ± 0.09). Nakon 24 h, samo je Ado tretman imao uticaja na promenu ekspresije ENT1, povećavajući je za oko 35% (0.11 ± 0.02 , $P < 0.05$) u poređenju sa odgovarajućom kontrolom (0.08 ± 0.005).



Slika 28. Analiza genske ekspresije za ENT1 4 i 24 h nakon Ado, DPM ili DPCPX tretmana. Ekspresija iRNA za ENT1 je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkripata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za ciklofilin-A. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi. Nivo statističke značajnosti između grupa: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Analiza genske ekspresije za ENT1 rađena je 24 h nakon ATP tretmana (100 μ M), (Slika 29). Rezultati su pokazali da tretman ATP-om povećava ekspresiju ENT1 za 60% (0.13 ± 0.02 , $P < 0.01$) u poređenju sa kontrolom (0.08 ± 0.005).



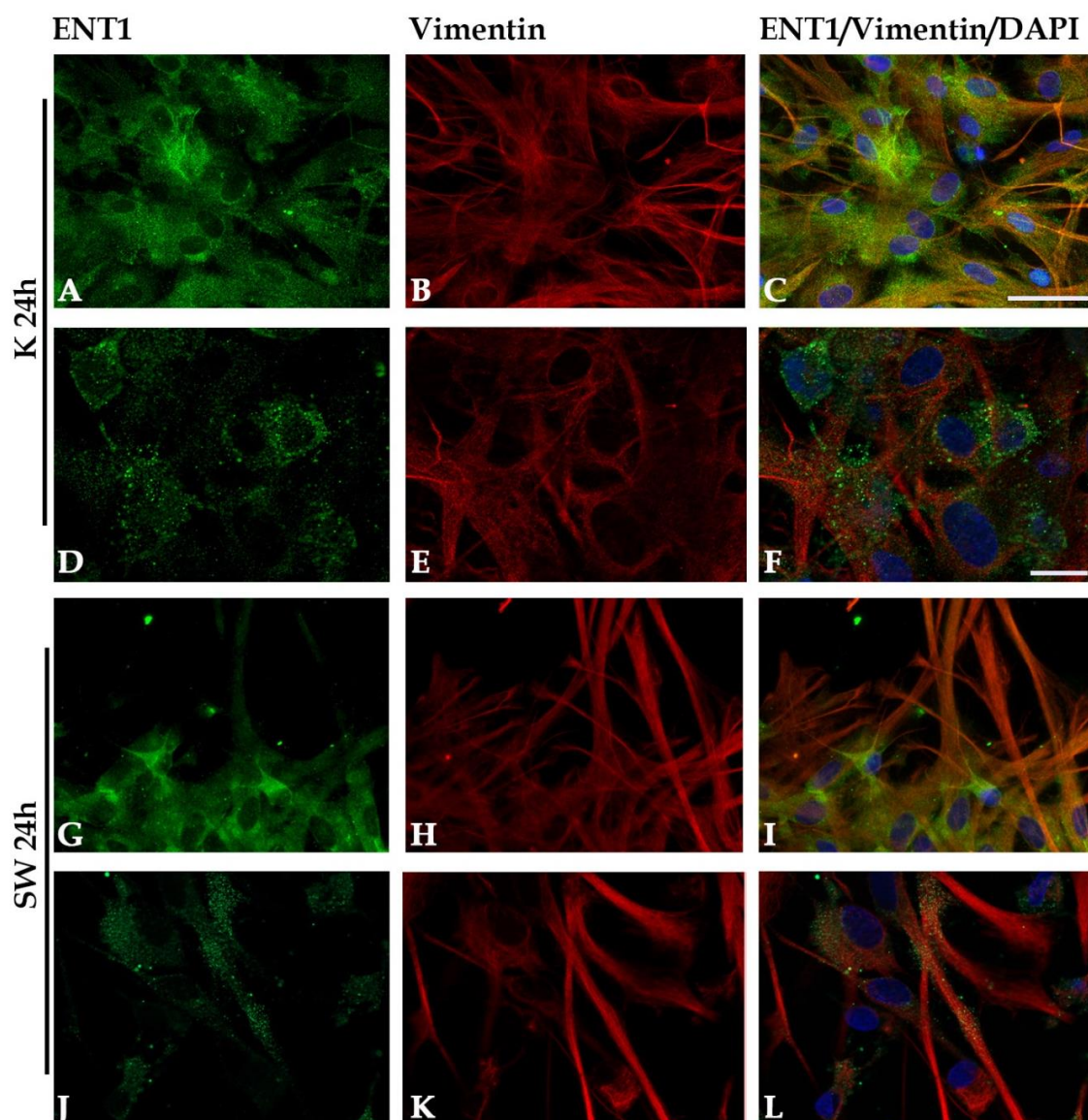
Slika 29. Analiza genske ekspresije za ENT1 24 h nakon ATP tretmana.

Ekspresija iRNK za ENT1 je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkripata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za ciklofilin-A. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi. Nivo statističke značajnosti između grupa: $**P < 0.01$.

Na Slici 30 prikazano je dvojno imunofluorescentno bojenje na ENT1 (zeleno) i vimentin (crveno) i kontrastno bojenje jedara primenom fluorescentne DAPI boje (plavo) kod kontrolnih i ćelija izloženih skarifikaciji.

Imunocitohemijska analiza je pokazala da je ENT1 u velikoj meri eksprimiran na vimentin-pozitivnim astrocitima (Slika 30A–C). Na većem uveličanju (Slika 30D–F), primećuje se da je specifična reakcija prisutna na membrani astrocita.

Nakon skarifikacije moglo se videti intenzivnije obeležavanja nastavaka astrocitima neposredno oko mesta povrede (Slika 30G–L) u poređenju sa kontrolnim ćelijama gde je ENT1 prisutan mahom na telima ćelija. Imunocitohemijsko obeležavanje nije ukazalo na promene u intezitetu ekspresije ENT1 nakon skarifikacije.



Slika 30. Dvojno imunocitohemijsko obeležavanje ENT1 (zeleno) i vimentina (crveno) 24 h nakon skarifikacije. Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo).

A-C: Intenzivno obeležava astrocite u kontrolnim kulturama.

D-F: Veće uveličanje ukazuje na membransku distribuciju ENT1 na ćelijskim telima astrocitima.

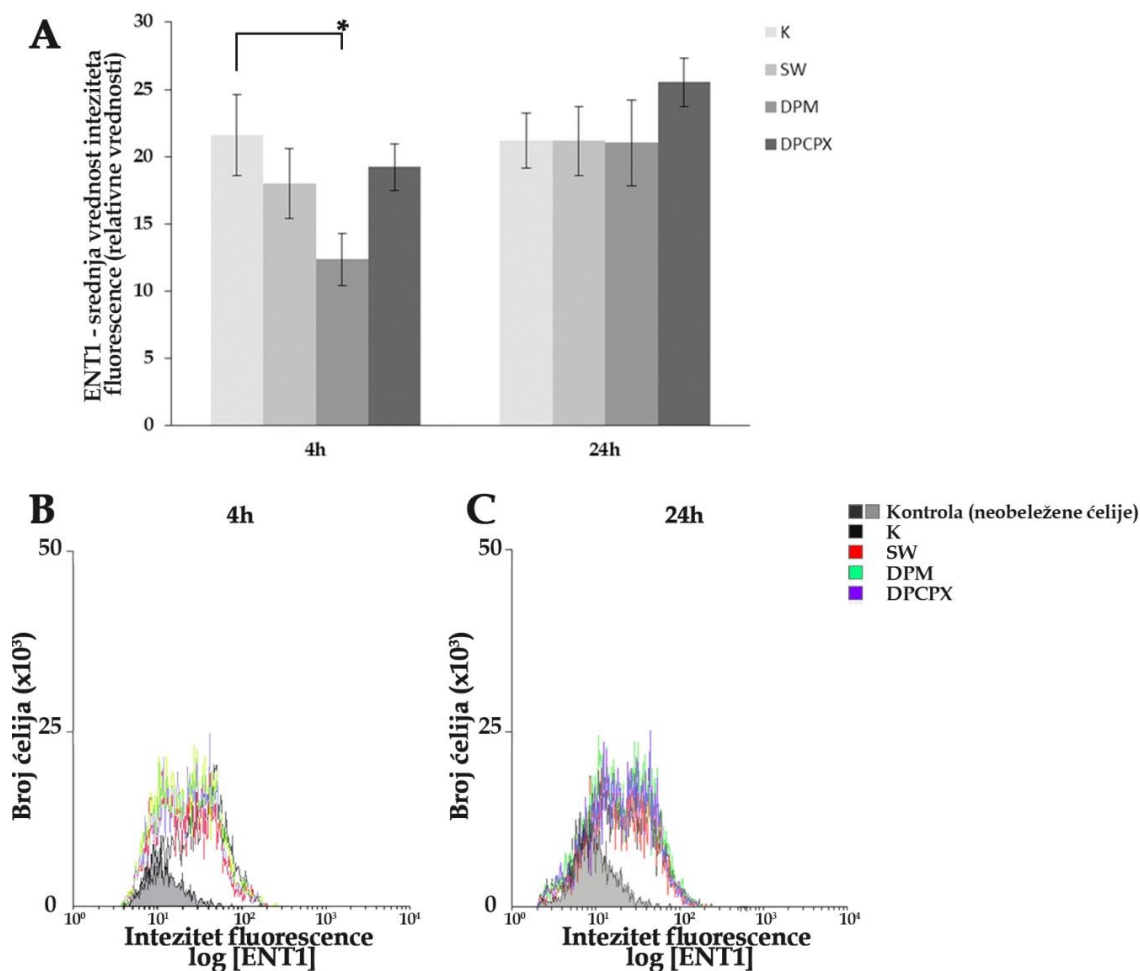
G-I: Nakon skarifikacije, ENT1 je prisutan na vimentin-pozitivnim astrocitima blizu mesta povrede.

J-L: Na većem uveličanju se uočavaju ENT1 pozitivni astrocitni nastavci.

Dužine skala: 30 μ m i 10 μ m.

Preciznija analiza promena ekspresije ENT1 na proteinskom nivou urađena je FACS analizom (Slika 31). U obe analizirane vremenske tačke nakon skarifikacije

i DPCPX tretmana, nije bilo značajnih razlika u ekspresiji ENT1 u odnosu na kontrolu. DPM je doveo do smanjenja ekspresije ENT1 za 40%, 4h nakon tretmana (12.37 ± 0.57 , $P < 0.05$) u odnosu na kontrolu (21.62 ± 1.08). Posle 24 h, vrednost ekspresije ENT1 pod svim tretmanima odgovara kontrolnom nivou.



Slika 31. Efekat povrede astrocita skarifikacijom ili tretmanima DPM i DPCPX na membransku ekspresiju ENT1.

A: Relativne srednje vrednosti inteziteta fluorescence poreklom od ENT1 izražene su u odnosu na kontrolu, 4 i 24 h nakon povrede ili tretmana.

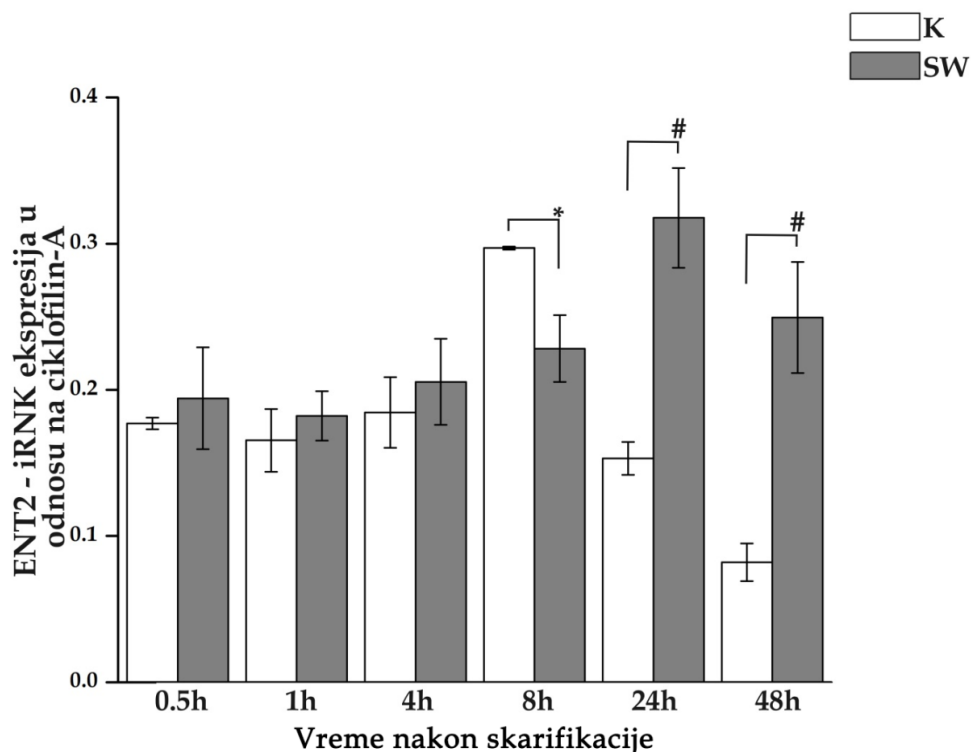
B, C: Preklopljeni reprezentativni histogrami inteziteta fluorescence u funkciji broja ENT1 pozitivnih ćelija. Neobeležene ćelije su prikazane sivim histogramom, i predstavljaju negativnu kontrolu.

Nivo statističke značajnosti između grupa: $*P < 0.05$.

4.2.4. Analiza ekspresije ENT2 u različitim vremenima nakon povrede skarifikacijom ili tretmana

Prikazani su rezultati genske ekspresije za ENT2 u različitim vremenima nakon skarifikacije i tretmana sa Ado, ATP, DPM i DPCPX. Promena ekspresije iRNK za ENT2 praćena je 0.5, 1, 4, 8, 24 i 48 sati nakon skarifikacije, qRT-PCR (Slika 32).

Do 8 h nakon skarifikacije nije bilo značajnih promena u ekspresiji ENT2, kada je primećen pad nivoa transkripta za 25% (0.23 ± 0.002 , $P < 0.05$) u odnosu na kontrolu (0.30 ± 0.001). U kasnijim vremenima ovaj trend se menja, i ekspresija ENT2 se povećava za 100% 24 h (0.32 ± 0.03 , $P < 0.001$) i za 200% 48 h (0.24 ± 0.012 , $P < 0.001$) nakon povrede, u odnosu na odgovarajuće kontrole (0.15 ± 0.011 i 0.08 ± 0.01).

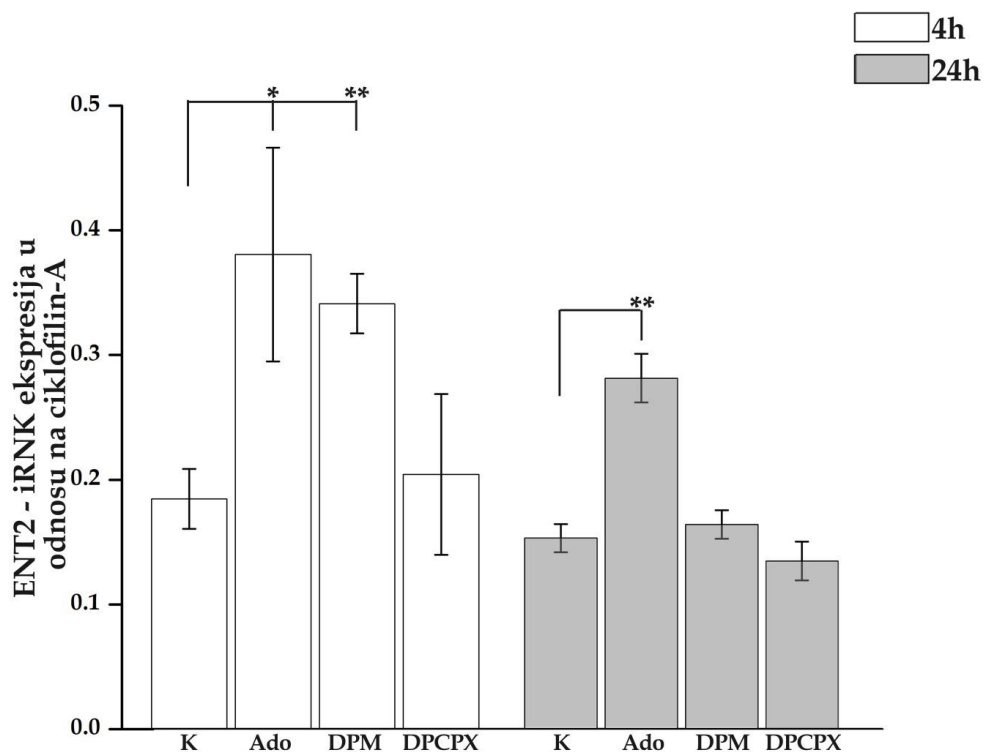


Slika 32. Analiza genske ekspresije za ENT2 u različitim vremenima nakon skarifikacije. Ekspresija iRNK za ENT2 je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkripta svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za ciklofilin-A. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi. Nivo statističke značajnosti između grupa: ** $P < 0.01$; # $P < 0.001$.

Nadalje je urađena analiza genske ekspresije ENT2 4 i 24 h nakon tretmana Ado (50 μ M), DPM (5 μ M) i DPCPX (1 μ M), (Slika 33). Kao kontrola svake grupe uzete su netretirane ćelije iste vremenske tačke.

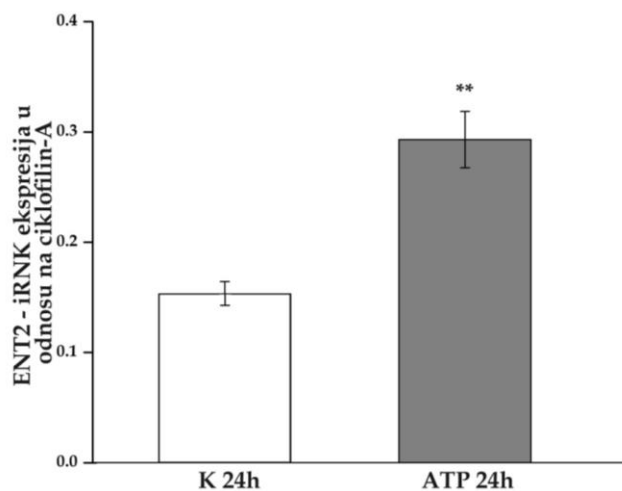
Rezultati su pokazali da Ado i DPM tretmani značajno povećavaju ekspresiju iRNK za ENT2 4 h nakon aplikacije, dok DPCPX tretman ne utiče na promenu ENT2 u ovoj vremenskoj tački. Tretman Ado povećava ekspresiju ENT2 za 110% (0.38 ± 0.09 , $P < 0.05$), a DPM za 85% (0.34 ± 0.02 , $P < 0.01$) u odnosu na kontrolu (0.18 ± 0.02).

Nakon 24 h, samo je Ado tretman imao uticaja na promenu ekspresije iRNK za ENT1, povećavajući je za oko 90% (0.28 ± 0.02 , $P < 0.01$) u poređenju sa odgovarajućom kontrolom (0.15 ± 0.01).



Slika 33. Analiza genske ekspresije za ENT2 4 i 24 h nakon Ado, DPM ili DPCPX tretmana. Ekspresija iRNK za ENT2 je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkripata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za ciklofilin-A,. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi. Nivo statističke značajnosti između grupa: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Analiza genske ekspresije za ENT2 rađena je 24 h nakon ATP tretmana (100 μ M), (Slika 34). Kao kontrola svake grupe uzete su netretirane ćelije iste vremenske tačke. Rezultati su pokazali da tretman ATP-om značajno povećava ekspresiju ENT2 za 100% (0.29 ± 0.03 , $P < 0.01$) u poređenju sa kontrolom (0.15 ± 0.01).



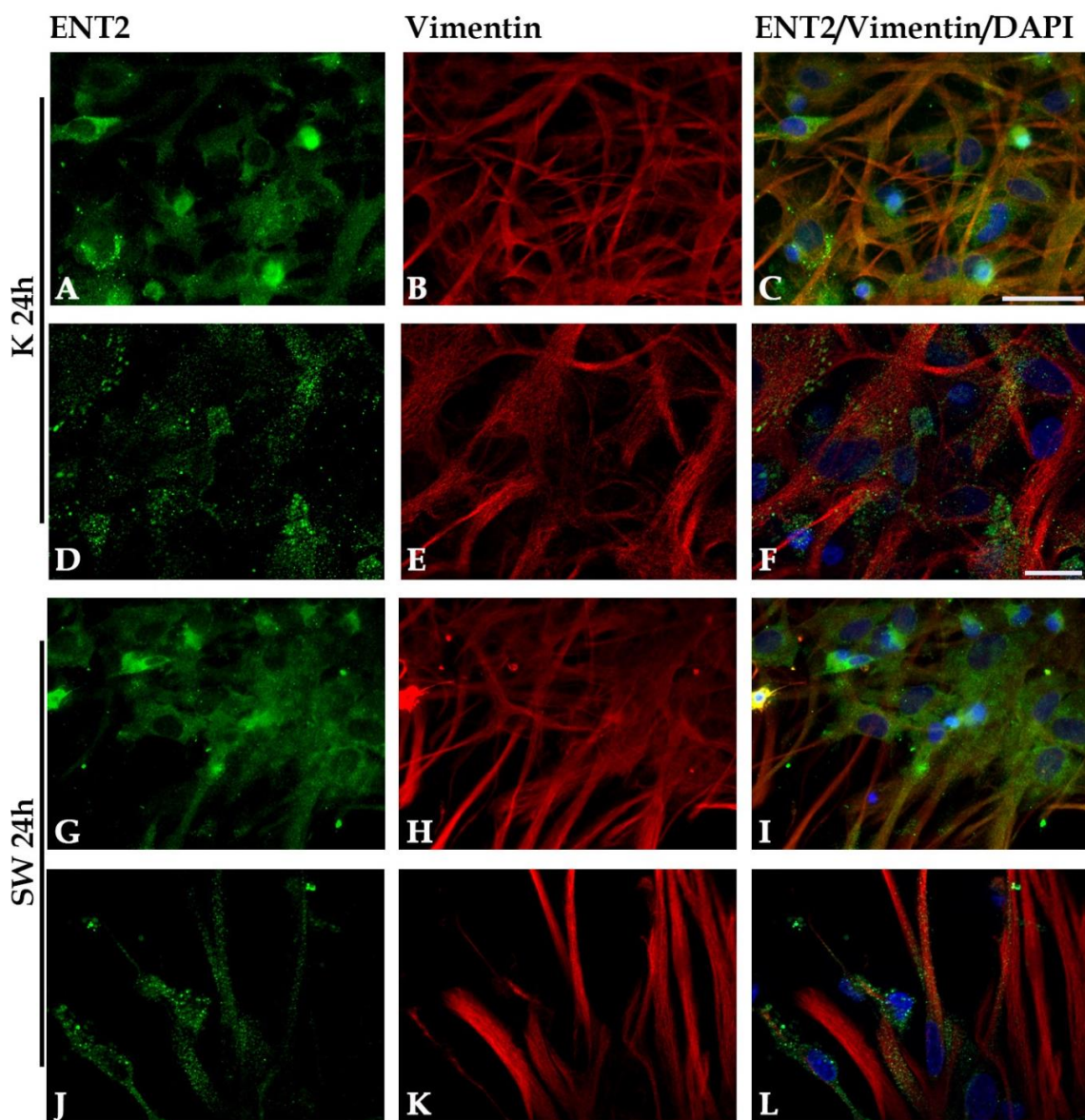
Slika 34. Analiza genske ekspresije za ENT2 24 h nakon ATP tretmana.

Ekspresija iRNK za ENT2 je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkriptata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za ciklofilin-A. Rezultati prikazani stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi. Nivo statističke značajnosti između grupa: $**P < 0.01$.

Na Slici 35 prikazano je dvojno imunofluorescentno bojenje na ENT2 (zeleno) i vimentin (crveno) i kontrastno bojenje jedara primenom fluorescentne DAPI boje (plavo) kod kontrolnih kultura i kultura izloženih skarifikaciji.

Slično kao i kod ENT1, imunocitohemijska analiza je pokazala da je ENT2 u velikoj meri eksprimiran na vimentin-pozitivnim astrocitima (Slika 35A-C). Na većem uveličanju (Slika 35D-F), vidi se da je ENT2 prisutan na membrani astrocita.

Nakon skarifikacije primećuje se intenzivnije obeležavanja astrocitnih nastavaka, neposredno oko mesta povrede (Slika 35J-L). Na osnovu imunocitohemijske analize nije bilo moguće zaključiti više o promeni inteziteta ekspresije ENT2 (Slika 35G-L).



Slika 35. Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje ENT2 (zeleno) i vimentina (crveno) 24 h nakon skarifikacije. Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo).

A-C: ENT2 imunofluorescencija je intenzivno obeležava ćelijska tela astrocita.

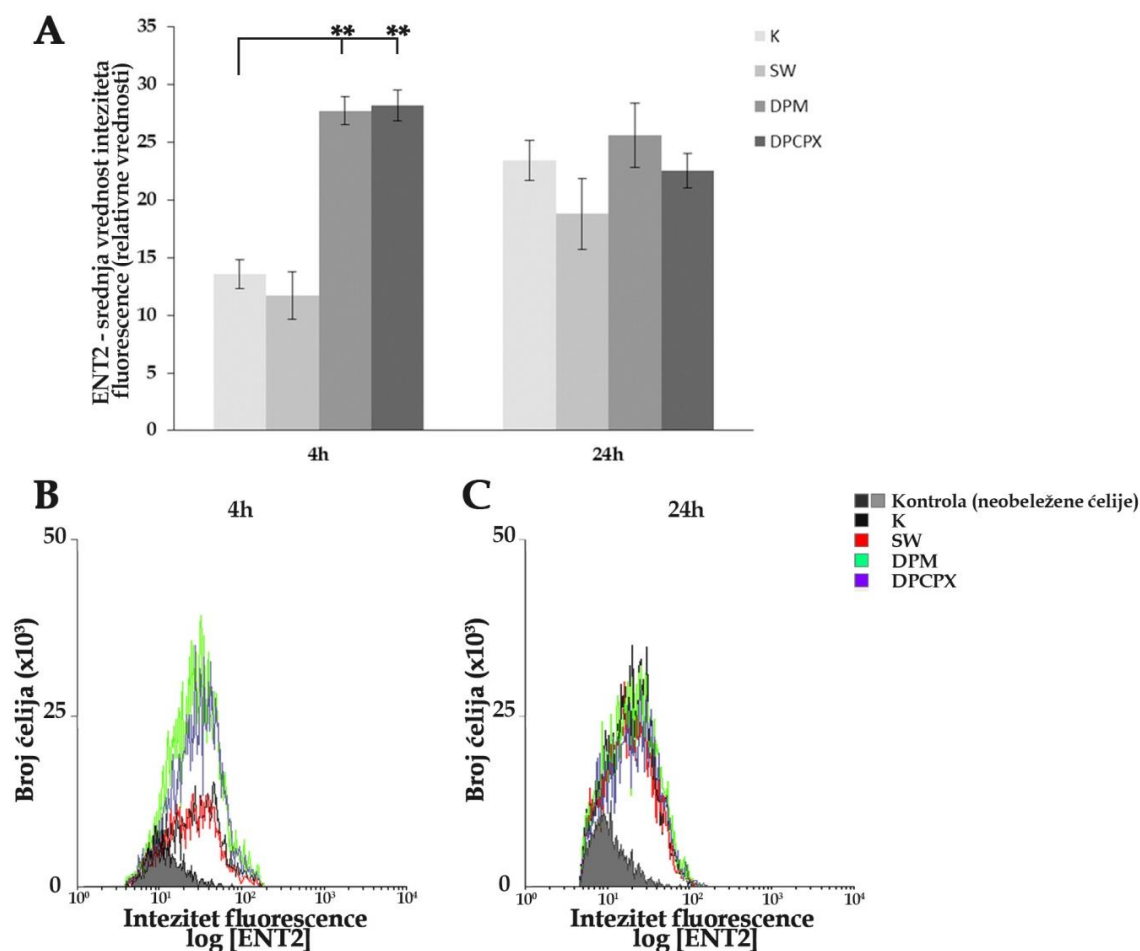
D-F: Veće uveličanje ukazuje na membransku distribuciju ENT2 na astrocitima.

G-I: ENT2 je intenzivno eksprimiran na astrocitima na ivici povrede, a uočava se snažna imunoreakcija na izduženim nastavcima astrocita koji izrastaju prema mestu povrede blizu mesta povrede.

J-L: Nakon skarifikacije, ENT2 je prisutan na nastavcima astrocita u blizini mesta povrede.

Dužine skala: 30 μm i 10 μm .

Na Slici 36 je prikazana kvantitativna analiza ekspresija ENT2 na proteinskom nivou. Membranska ekspresija ENT2 je ostala nepromenjena 4 i 24 h nakon skarifikacije u poređenju sa kontrolama istih vremenskih tački. DPM i DPCPX tretmani su doveli do povećanja u ekspresiji ENT2 za 100% nakon 4 h (27.74 ± 2.04 , 28.21 ± 2.08 , $P < 0.01$) u odnosu na kontrolu (13.57 ± 1.10). Posle 24 h nakon oba tretmana, vrednost ekspresije ENT2 se vratila na nivo kontrole.



Slika 36. Efekat povrede astrocita skarifikacijom ili tretmanima DPM i DPCPX na membransku ekspresiju ENT2.

A: vrednosti inteziteta fluorescence poreklom od ENT2 izražene su u odnosu na kontrolu, 4 i 24 h nakon povrede ili tretmana.

B, C: Preklapljeni reprezentativni histogrami inteziteta fluorescence u funkciji broja ENT2 pozitivnih ćelija. Neobeležene ćelije su prikazane sivim histogramom, i predstavljaju negativnu kontrolu.

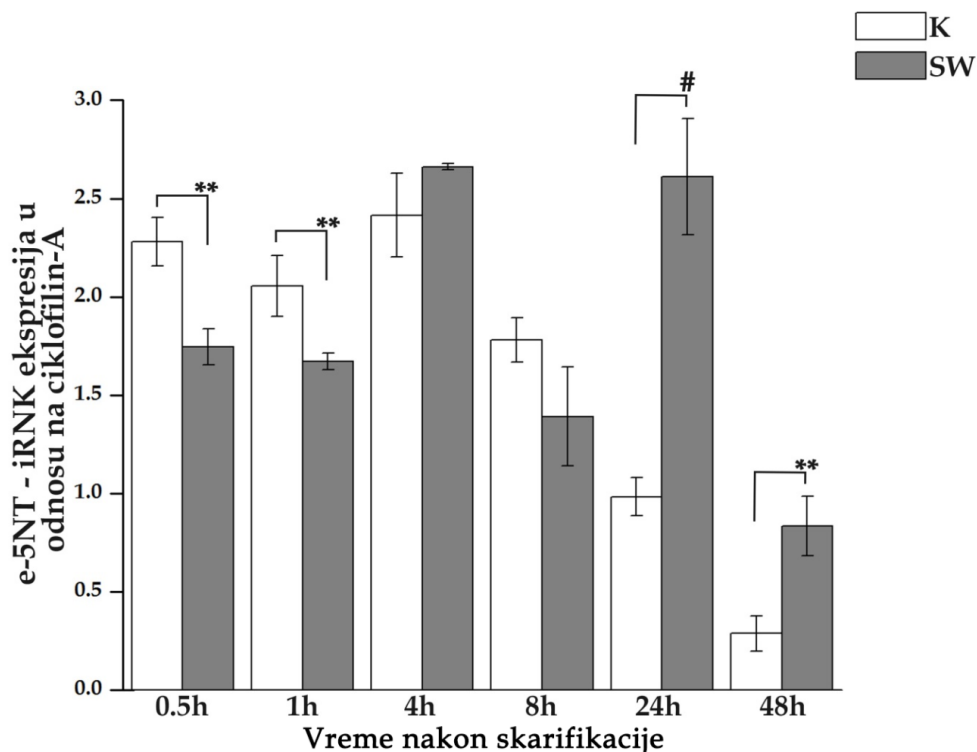
Nivo statističke značajnosti između grupa: $**P < 0.01$.

4.2.5. Analiza ekspresije e-5NT u različitim vremenima nakon povrede skarifikacije ili tretmana

Prikazani su rezultati genske ekspresije za e-5NT u različitim vremenima nakon skarifikacije i tretmana sa Ado, ATP, DPM i DPCPX. Dvadeset i četiri sata pre skarifikacije odnosno početka tretmana, ćelijama je ukidan FCS.

Ekspresija iRNK za e-5NT nakon skarifikacije utvrđena je qRT-PCR analizom, 0.5, 1, 4, 8, 24 i 48 sati nakon povrede (Slika 37). Kao kontrola svake grupe uzete su intaktne ćelije iste vremenske tačke.

Već 0.5 h nakon skarifikacije primećen je pad u ekspresiji e-5NT za 25% (1.75 ± 0.09 , $P < 0.01$) u odnosu na kontrolu (2.28 ± 0.12). Pad u nivou e-5NT transkripta se održao i 1h posle povrede za 20% (1.67 ± 0.04 , $P < 0.01$) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (2.05 ± 0.15). U kasnijim vremenima ovaj trend se menja, i ekspresija e-5NT se povećava za 160% 24 h (2.61 ± 0.30 , $P < 0.001$) i za 200% 48 h (0.83 ± 0.15 , $P < 0.01$) nakon povrede, u odnosu na odgovarajuće kontrole (0.98 ± 0.1 i 0.28 ± 0.09).



Slika 37. Analiza genske ekspresije za e-5NT u različitim vremenima nakon skarifikacije.

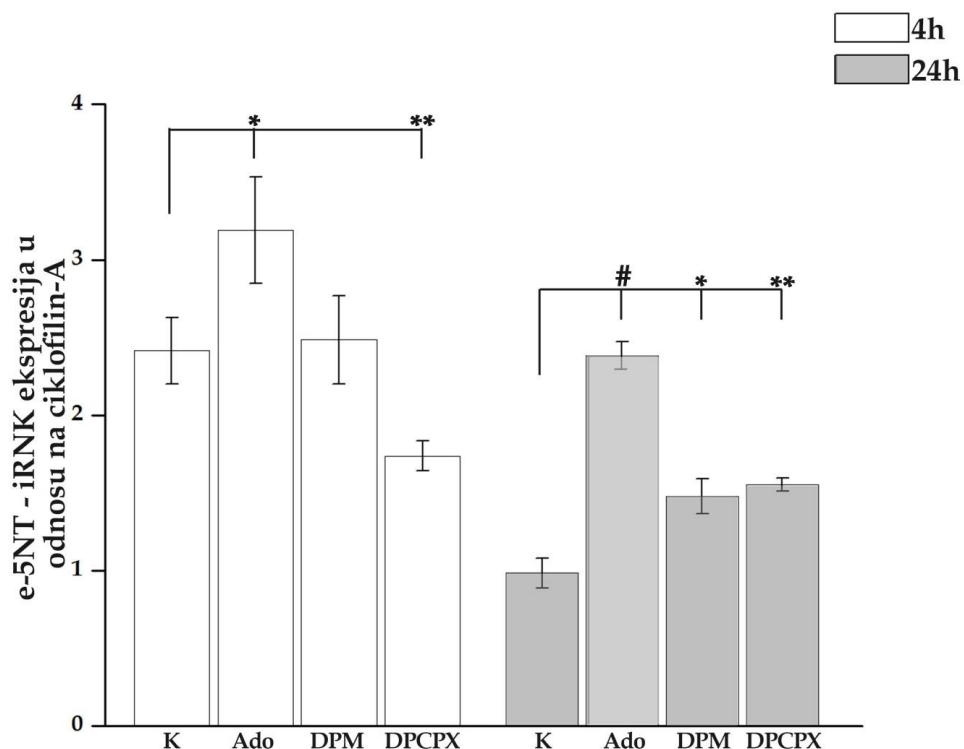
Ekspresija iRNK za e-5NT je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkripata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za ciklofilin-A, a potom normalizovane u odnosu na odgovarajuću vrednost kontrole. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi. Nivo statističke značajnosti između grupa: ** $P < 0.01$; # $P < 0.001$.

U daljem toku rađena je analiza genske ekspresije za e-5NT 4 i 24 h nakon tretmana Ado (50 μ M), DPM (5 μ M) i DPCPX (1 μ M), (Slika 38). Kao kontrola svake grupe uzete su netretirane ćelije iste vremenske tačke.

Rezultati su pokazali da, 4 h nakon aplikacije, tretman Ado povećava ekspresiju e-5NT za 30% (3.19 ± 0.64 , $P < 0.05$), DPCPX smanjuje za 30% (1.73 ± 0.11 , $P < 0.01$) u odnosu na kontrolu (2.42 ± 0.21), dok DPM tretman ne utiče na ekspresiju e-5NT.

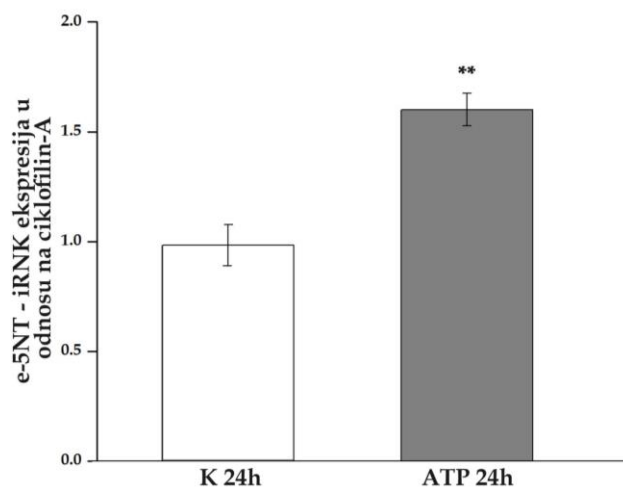
Svi tretmani su povećali ekspresiju e-5NT nakon 24 h. Ado tretman je povećao nivo transkripta za 130% (2.39 ± 0.09 , $P < 0.001$), DPM za 30% (1.48 ± 0.11 , $P < 0.05$), kao i

DPCPX (1.55 ± 0.04 , $P < 0.01$) u odnosu na kontrolu (1.09 ± 0.12).



Slika 38. Analiza genske ekspresije za e-5NT 4 i 24 h nakon Ado, DPM ili DPCPX tretmana. Ekspresija iRNA za e-5NT je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkriptata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za ciklofilin-A,. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi. značajnosti između grupa: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; # $P < 0.001$.

Analiza genske ekspresije za e-5NT rađena je 24 h nakon ATP tretmana ($100 \mu\text{M}$), (Slika 39). Kao kontrola svake grupe uzete su netretirane ćelije iste vremenske tačke. Rezultati su pokazali da tretman ATP-om povećava ekspresiju e-5NT za 60% (1.6 ± 0.07 , $P < 0.01$) u poređenju sa kontrolom (0.98 ± 0.1).



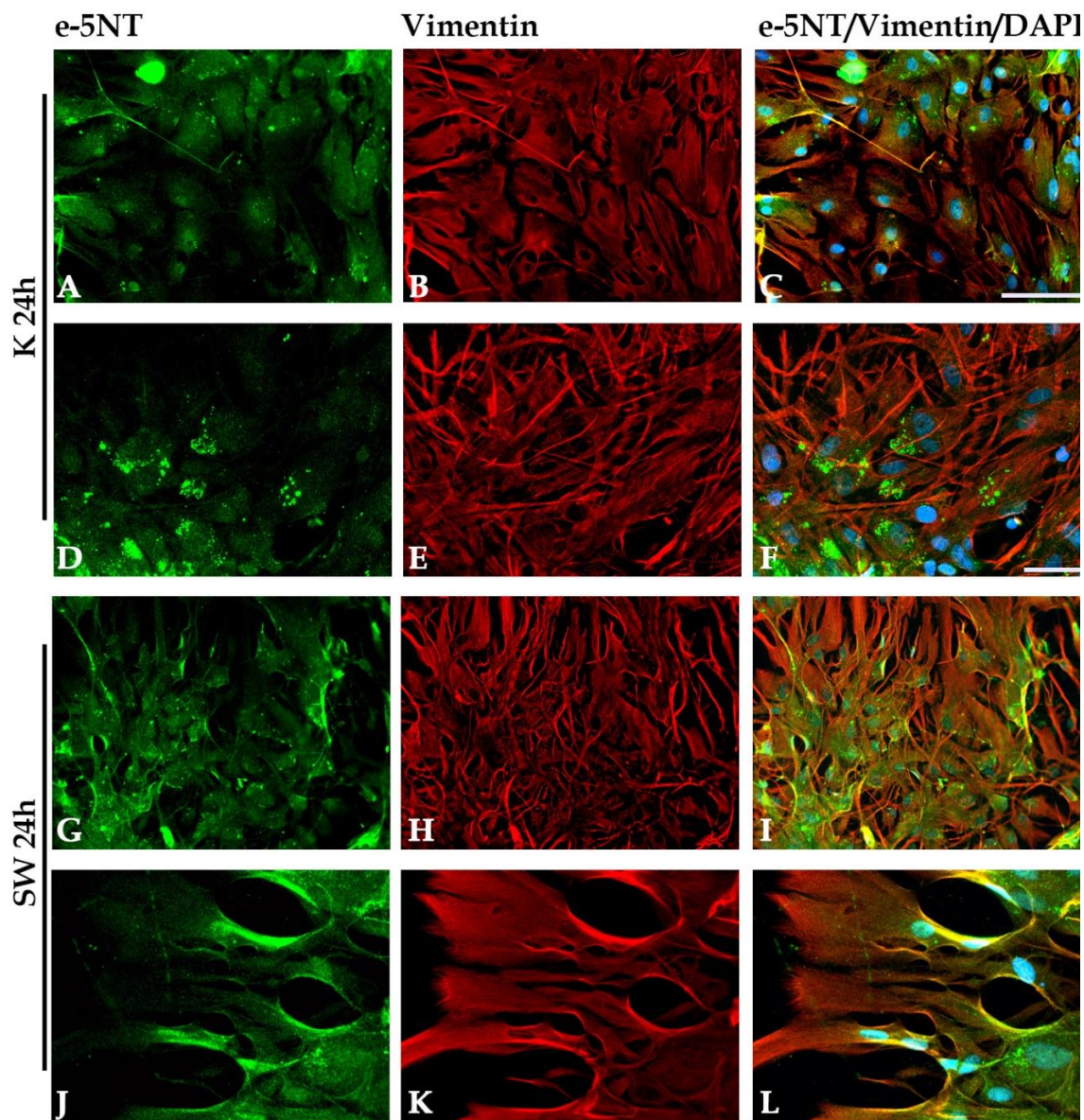
Slika 39. Analiza genske ekspresije za e-5NT 24 h nakon ATP tretmana.

Ekspresija iRNK za e-5NT je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkripata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za ciklofilin-A. Rezultati prikazani stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi. Nivo statističke značajnosti između grupa: $**P < 0.01$.

Na Slici 40 prikazano je dvojno imunofluorescentno bojenje na e-5NT (zeleno) i vimentin (crveno) i kontrastno bojenje jedara primenom fluorescentne DAPI boje (plavo) kod kontrolnih i ćelija izloženih skarifikaciji.

Imunocitohemijska analiza je pokazala da astrociti u kulturi eksprimiraju e-5NT (Slika 40A-C). Na većem uveličanju (Slika 40D-F), vidi se da je e-5NT prisutan uglavnom na ćelijskim telima astrocita.

Nakon skarifikacije primećuje se znatno intenzivnije obeležavanja tela astrocita i nastavaka reaktivnih astrocita, kao i mnogo intenzivnija ekspresija vimentina na astrocitima u blizini mesta skarifikacije. astrocitnih nastavaka u odnosu na telo, neposredno oko mesta povrede, što se posebno vidi na većem uveličanju (Slika 40G-L).



Slika 40. Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje e-5NT (zeleno) i vimentina (crveno) 24 h nakon skarifikacije. Jedra su obeležena DAPI bojom (plavo).

A-C: U kontrolnim kulturama e-5NT je snažno eksprimirana na ćelijskim telima vimentin-pozitivnih astrocita, dok se lokalizacija na nastavcima uočava tek sporadično.

D-F: Veće uveličanje ukazuje na membransku distribuciju e-5NT na telima astrocita.

G-I: Nakon skarifikacije, uočava se snažna indukcija imunoreaktivnosti e-5Nt.

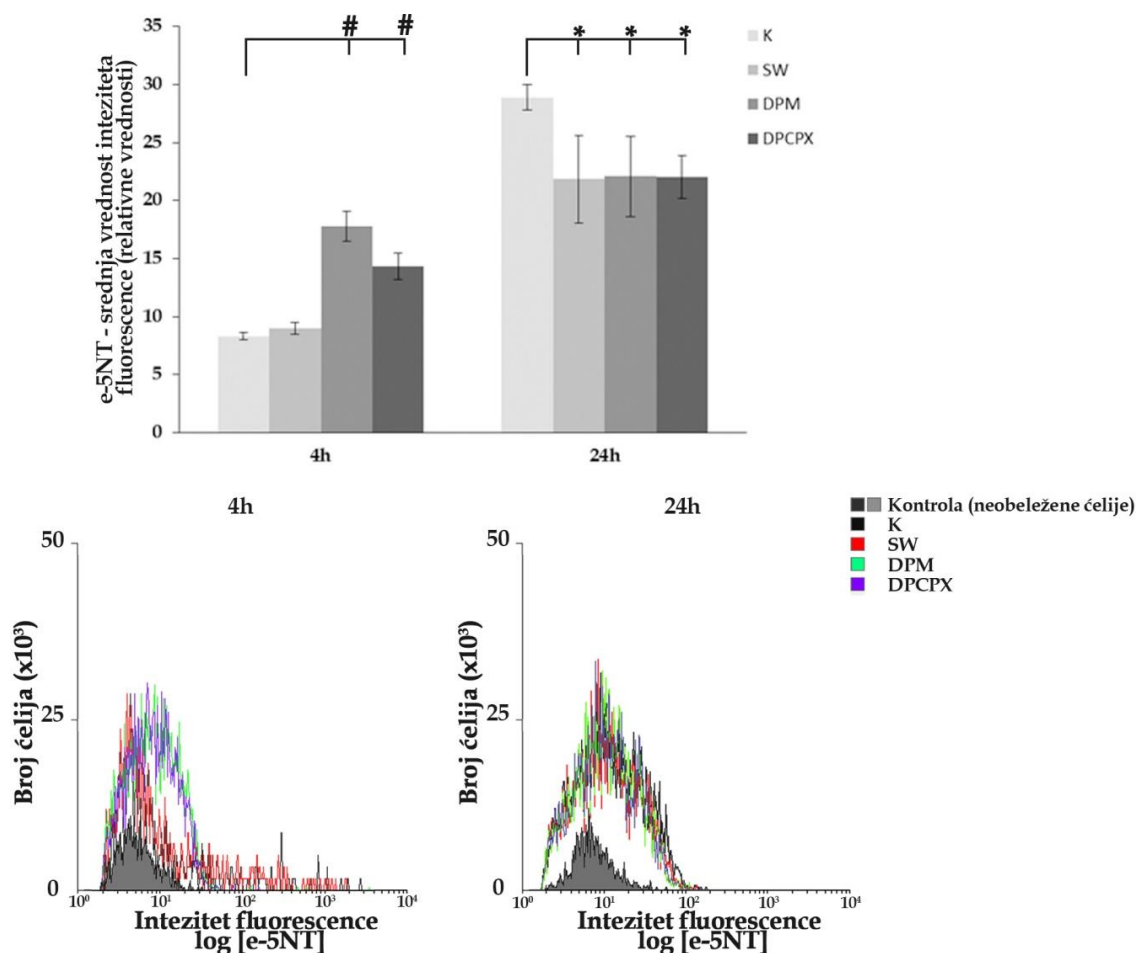
J-L: e-5Nt obeležava kako tela astrocita tako i brojne nastavke koji se pružaju preko mesta povrede.

Dužine skala: A-C, G-I, 60 μ m; D-F, J-L 30 μ m.

Na Slici 41 je prikazana kvantitativna analiza ekspresija e-5NT na proteinskom nivou.

Membranska ekspresija e-5NTu kontroli 4 h nakon početka eksperimenta je bila izrazito niska u svim eksperimentima. Pored toga, u istoj vremenskoj tački nakon skarifikacije ekspresija e-5NT je ostala nepromenjena u poređenju sa kontrolama. Povreda je dovela do smanjenja membranske ekspresije e-5NT 24 h kasnije (21.84 ± 0.76 , $P < 0.05$) u odnosu na kontrolu (28.9 ± 1.07).

DPM i DPCPX tretmani su doveli do značajnog povećanja u ekspresiji e-5NT (za 100 i 70%, redom) nakon 4 h (17.79 ± 1.30 , 14.34 ± 1.13 , $P < 0.001$) u odnosu na kontrolu (8.3 ± 1.10). Posle 24 h nakon oba tretmana, vrednost ekspresije e-5NT se smanjila za 20% (22.09 ± 3.47 u tretmanu DPM, odnosno 22.06 ± 1.85 u tretmanu DPCPX, $P < 0.05$) u poređenju sa kontrolom (28.9 ± 1.07).



Slika 41. Efekat povrede astrocita skarifikacijom ili tretmanima DPM i DPCPX na membransku ekspresiju e-5NT.

A: Relativne srednje vrednosti inteziteta fluoescence poreklom od e-5NT izražene su u odnosu na kontrolu, 4 i 24 h nakon povrede ili tretmana.

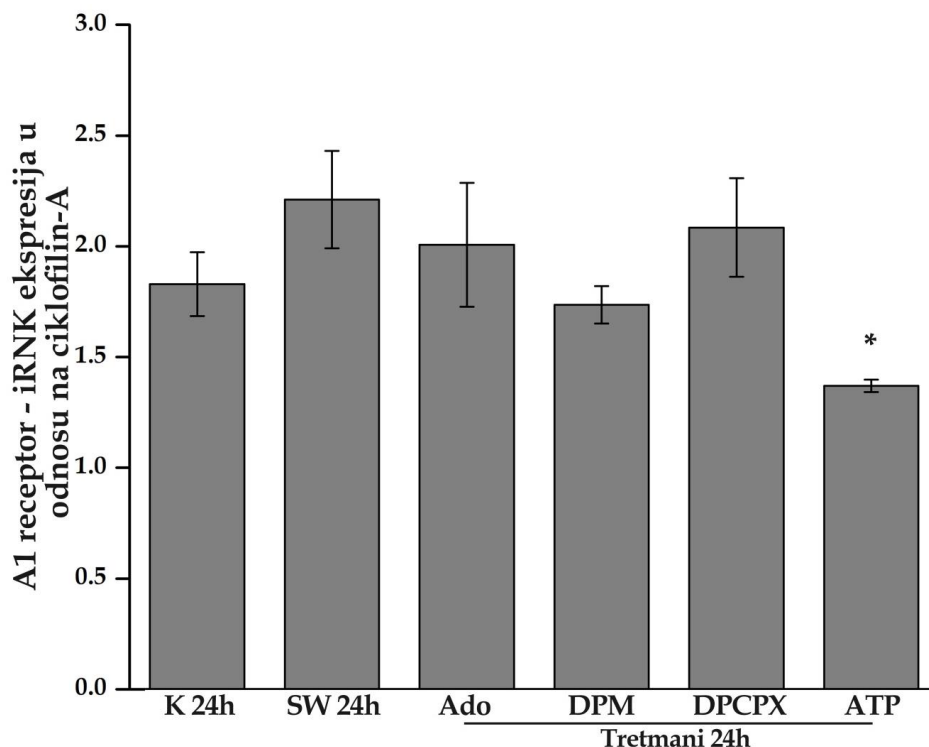
B, C: Preklapljeni reprezentativni histogrami inteziteta fluoescence u funkciji broja e-5NT-obeležanih ćelija. Neobeležene ćelije su prikazane sivim histogramom, i predstavljaju negativnu kontrolu.

Nivo statističke značajnosti između grupa: * $P < 0.05$; # $P < 0.001$.

4.2.6. Analiza genske ekspresije za A1 receptor 24 sata nakon skarifikacije i Ado, DPM ili DPCPX tretmana

Prikazani su rezultati genske ekspresije za A1 receptor 24 h nakon skarifikacije i tretmana Ado (50 μ M), DPM (5 μ M), DPCPX (1 μ M) i ATP (100 μ M), (Slika 42). Rezultati su pokazali da se ekspresija A1 receptora ne menja značajno 24 sata posle povrede. Samo je tretman ATP-om uticao na promenu ekspresije A1

receptora, smanjivši je za oko 25% (1.36 ± 0.002 , $P < 0.05$) u odnosu na kontrolnu kulturu (1.83 ± 0.14).

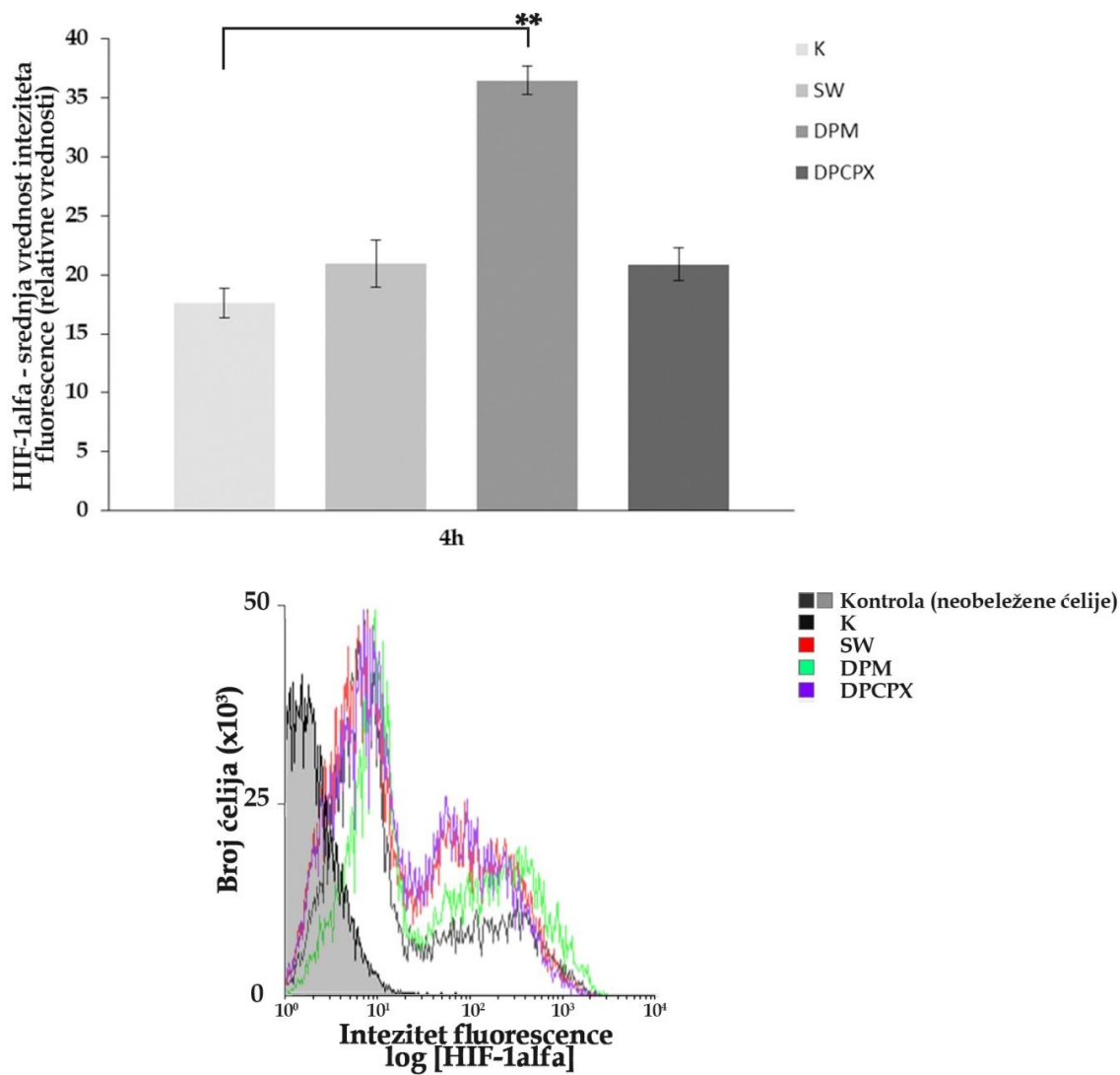


Slika 42. Analiza genske ekspresije za A1 receptor 24 h nakon SW i Ado, DPM, DPCPX ili ATP tretmana.

Ekspresija iRNK za A1 receptor je određena qRT-PCR analizom. Nivoi transkripata svake grupe su prikazani relativno u odnosu na nivo transkripta za ciklofilin-A, a potom normalizovane u odnosu na odgovarajuću vrednost kontrole. Rezultati prikazani stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi. Nivo statističke značajnosti između grupa: $*P < 0.05$.

4.2.7. FACS analiza ekspresije HIF-1 α u astrocitima

Kako bi se ispitala promena ekspresije transkripcionog faktora HIF-1 α 4h nakon skarifikacije ili korišćenih tretmana, rađena je FACS analiza GFAP pozitivnih astrocita. Kvantitativna analiza ekspresije HIF-1 α prikazana je na Slici 43. Ni skarifikacija ni tretman DPCPX nisu nije uticala na ekspresiju HIF-1 α . Međutim DPM tretman je povećao ekspresiju HIF-1 α (36.52 ± 1.22 , $P < 0.01$) u poređenju sa kontrolom (17.62 ± 2.23).



Slika 43. Efekat povrede astrocita skarifikacijom ili tretmanima DPM i DPCPX na ekspresiju HIF-1alfa.

A: Relativne srednje vrednosti inteziteta fluorescence poreklom od HIF-1alfa izražene su u odnosu na kontrolu, 4 h nakon povrede ili tretmana.

B, C: Preklapljeni reprezentativni histogrami inteziteta fluorescence u funkciji broja HIF-1alfa - obeleženih ćelija. Neobeležene ćelije su prikazane sivim histogramom, i predstavljaju negativnu kontrolu.

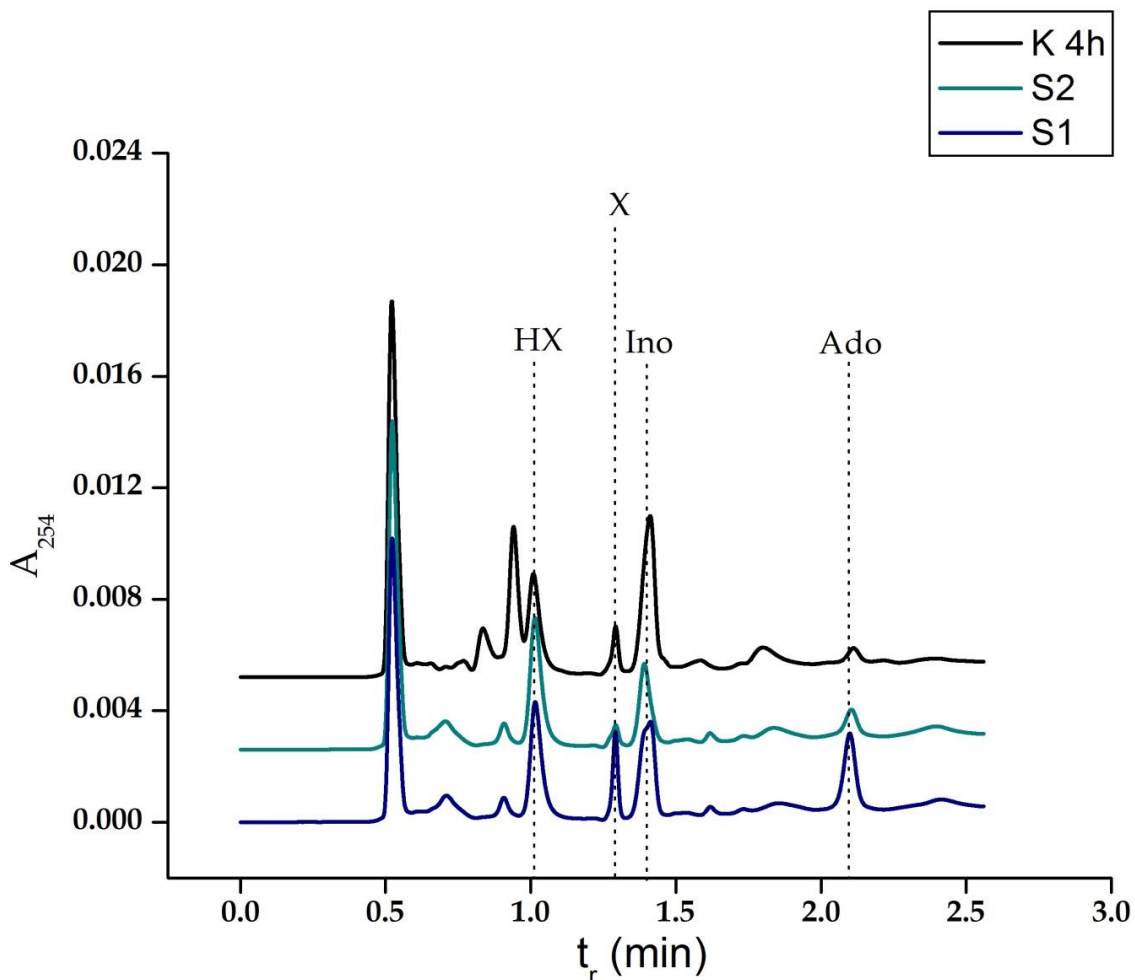
Nivo statističke značajnosti između grupa: $**P < 0.01$.

4.2.8. UPLC analiza promena koncentracija adenzina i njegovih metabolita u ćelijskom medijumu nakon skarifikacije

Vanćelijski metabolizam adenzina nakon SW povrede u kulturi astrocita, ispitali smo metodom tečne hromatografije ultravisokih performansi (UPLC). Koncentracije Ado, Ino, HX i X detektovane su u ćelijskom medijumu 4, 8 ili 24 sata nakon skarifikacije ili 4 i 24 sata nakon tretmana DPM (5 μ M) i DPCPX (1 μ M). Rezultati su izraženi grafički, kao srednje vrednosti koncentracija dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Na Slici 44, prikazani su reprezentativni hromatogrami dva standarda različitih koncentracija (S1 i S2) i kontrolnog uzorka (K 4h).

U našim eksperimentalnim uslovima najkraće retenciono vreme imao je hipoksantin (1 min), zatim ksantin (1.3 min), inozin (1.4 min), i adenzin (2.1 min).



Slika 44. Reprezentativni hromatogrami, dobijeni UPLC metodom uz upotrebu TUV detektora na talasnoj dužini 254 nm.

Skraćenice: adenzin (Ado), inozin (Ino), ksantin (X), hipoksantin (HX), retenciono vreme (t_r), apsorbancna na 254 nm (A_{254}). Koncentracije standarda u medijumu: S1 - 2 μM , S2 - 0.5 μM .

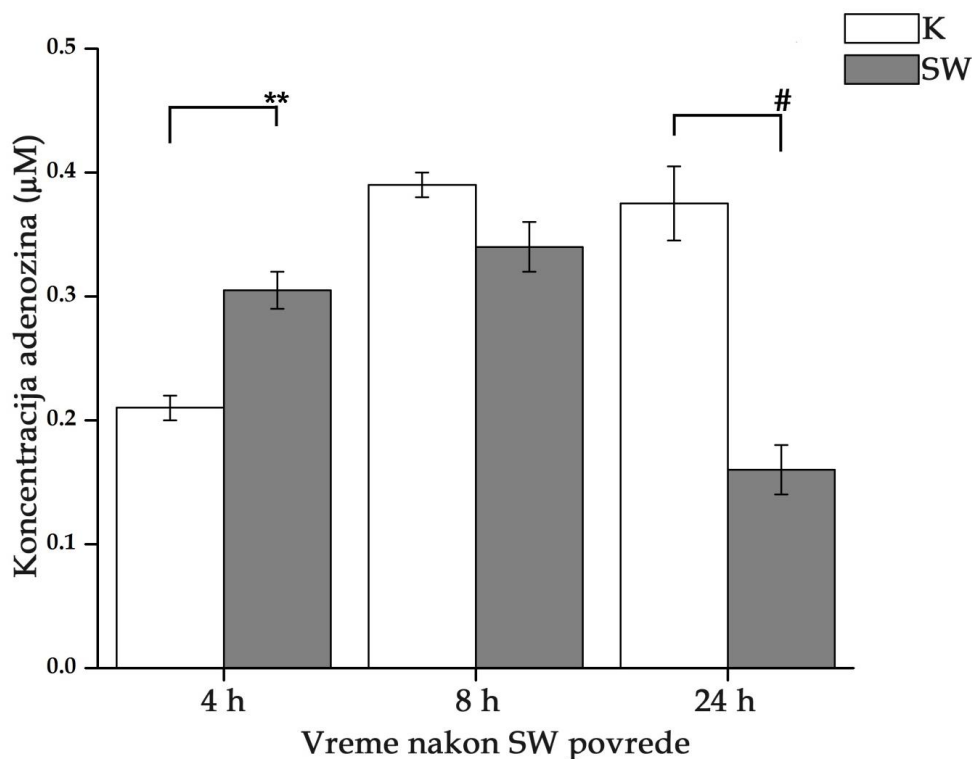
U Tabeli 10 prikazane su koncentracije adenzina i njegovih metabolita u ćelijskom medijumu kontrolnih uzoraka, 4 h nakon početka eksperimenta (zamene medijuma).

Adeninski nukleozidi/metaboliti	Koncentracija (μM)
Adenozin	0.21 ± 0.01
Inozin	0.16 ± 0.03
Hipoksantin	2.23 ± 0.03
Ksantin	0.32 ± 0.03

Tabela 10. Koncentracije adeninskih nukleozida i njihovih metabolita u ćelijskom medijumu kontrolnih grupa, dobijene UPLC metodom. Hromatogrami su dobijeni merenjem apsorbancije na 254 nm tokom hromatografskog razdvajanja 4 μl deproteinizovanog uzorka. Koncentracije su određene iz jednačina standardnih krivih koje su konstruisane na osnovu vrednosti površina signala sa hromatograma komercijalnih standarda ispitivanih molekula. Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti koncentracija (μM) iz 3 nezavisna eksperimenta, sa po 3 ili 4 kontrolna uzorka određenih u duplikatu.

4.2.8.1. Promene koncentracija adenzina u ćelijskom medijumu nakon skarifikacije ili tretmana

Slika 45 predstavlja prikaz promene koncentracije adenzina u ćelijskom medijumu 4, 8 i 24 sata nakon skarifikacije. Koncentracija adenzina se blago ali statistički značajno povećava 4 h nakon povrede (0.305 ± 0.015 , $P < 0.01$) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (0.21 ± 0.01), dok 8 h kasnije nisu uočene statistički značajne promene u koncentraciji. Dvostruko smanjenje koncentracije adenzina u ćelijskom medijumu posle SW povrede je primećeno 24 h kasnije (0.16 ± 0.02 , $P < 0.001$) u odnosu na kontrolu (0.38 ± 0.03).

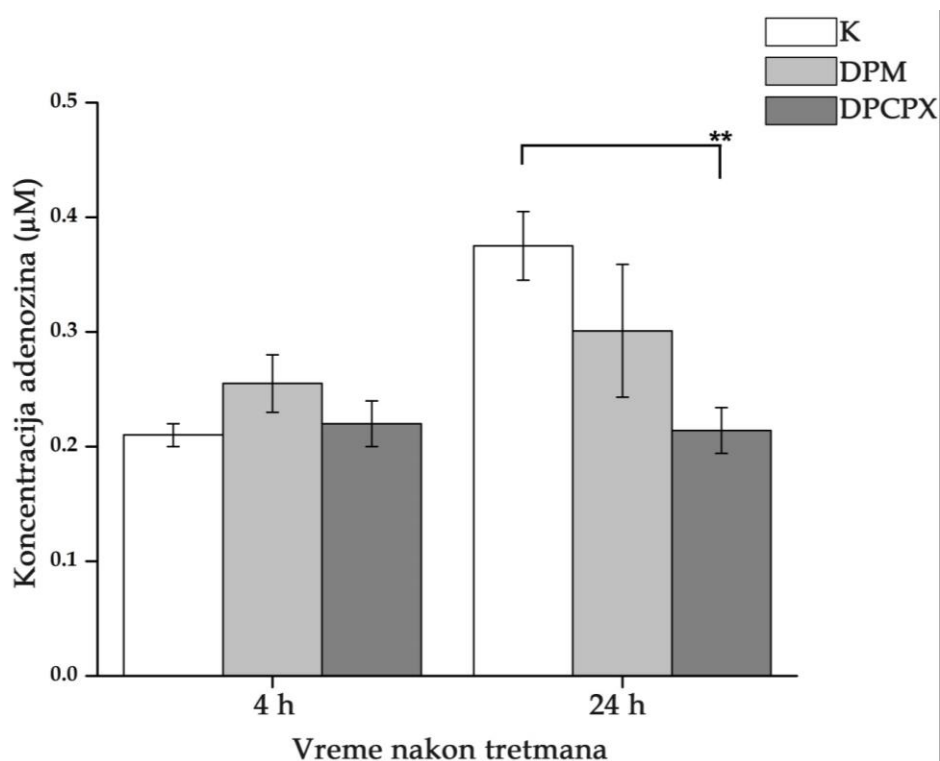


Slika 45. Promene koncentracije Ado u ćelijskom medijumu u različitim vremenskim intervalima nakon skarifikacije astrocita.

Beli stubići predstavljaju srednje vrednosti koncentracije Ado u kontrolnim grupama, a sivi stubići predstavljaju srednje vrednosti Ado grupa koje su izložene skarifikaciji. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti koncentracija \pm SEM (μM) iz 3 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: $**P < 0.01$; $\#P < 0.001$.

Promene u koncentraciji adenozina u ćelijskom medijumu praćene su i 4 i 24 sata nakon DPM ili DPCPX tretmana (Slika 46). Značajna promena koncentracije adenozina u vidu dvostrukog smanjenja (0.21 ± 0.05 , $P < 0.01$) je zabeležena samo 24 h nakon DPCPX tretmana u poređenju sa odgovarajućom kontrolom (0.38 ± 0.03).



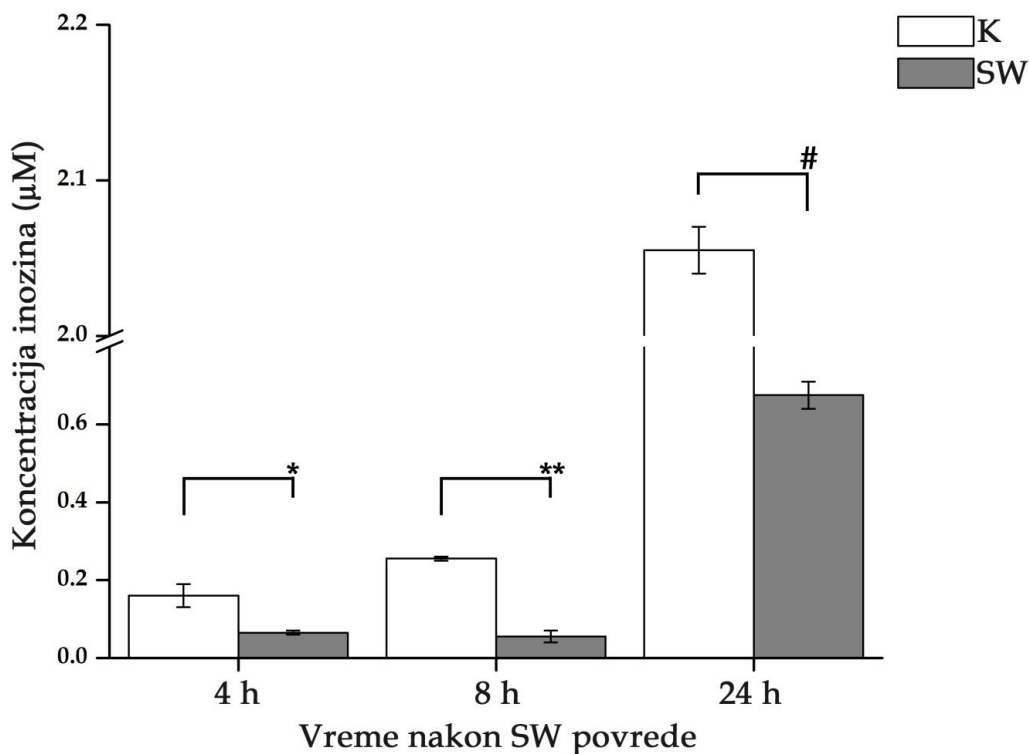
Slika 46. Promene koncentracije Ado u ćelijskom medijumu 4 i 24 h nakon DPX ili DPCPX tretmana astrocita.

Srednje vrednosti koncentracije Ado su prikazane belim stubićima u kontrolnim grupama, svetlosivim u DPM tretiranim grupama, a tamnosivi stubići prikazuju srednje vrednosti grupa nakon DPCPX tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM (μ M) iz 3 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: $**P < 0.01$.

4.2.8.2. Promene koncentracija inozina u ćelijskom medijumu nakon skarifikacije ili tretmana

Slika 47 predstavlja prikaz promene koncentracije inozina u ćelijskom medijumu 4, 8 i 24 sata nakon skarifikacije. Koncentracija inozina u svim ispitivanim vremenskim tačkama značajno pada 4 h nakon povrede (0.065 ± 0.005 , $P < 0.05$) u odnosu na kontrolu (0.16 ± 0.03), i taj trend je nastavljen 8 sati (0.055 ± 0.015 , $P < 0.01$) i 24 sata kasnije (0.065 ± 0.035 , $P < 0.001$) u odnosu na odgovarajuće kontrolu (0.255 ± 0.005 , 2.055 ± 0.015).

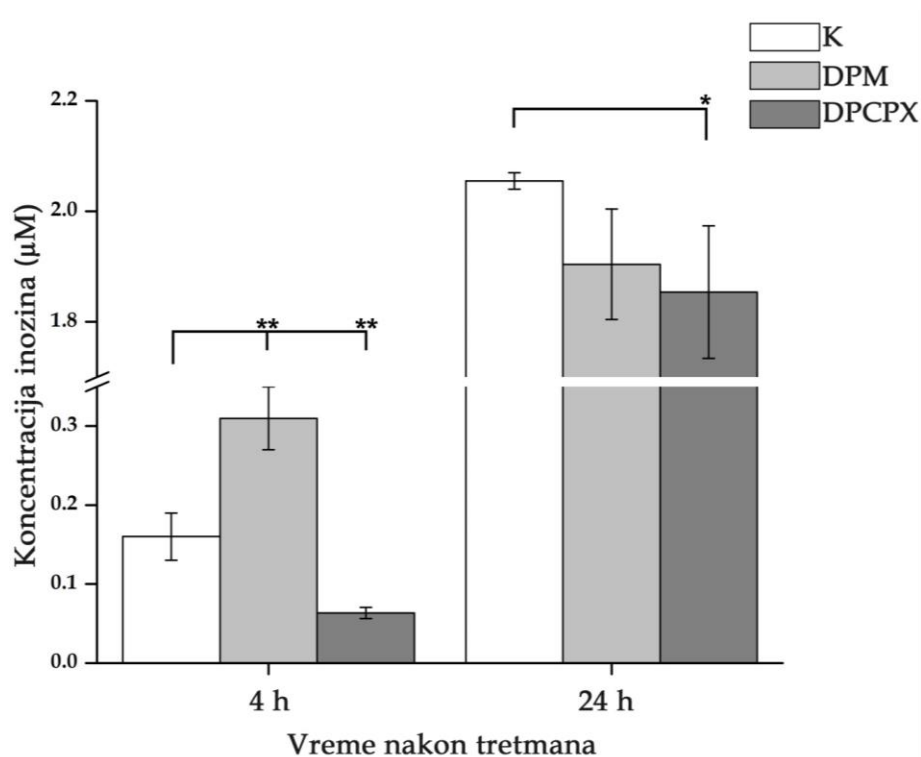


Slika 47. Promene koncentracije Ino u ćelijskom medijumu u različitim vremenskim intervalima nakon skarifikacije astrocita.

Beli stubići predstavljaju srednje vrednosti koncentracije Ino u kontrolnim grupama, a sivi stubići prikazuju srednje vrednosti Ino grupa koje su izložene skarifikaciji. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM (μM) iz 3 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; # $P < 0.001$.

Promene u koncentraciji inozina u ćelijskom medijumu praćene su i 4 i 24 sata nakon DPM ili DPCPX tretmana (Slika 48). Značajna promena koncentracije inozina u vidu dvostrukog povećanja (0.31 ± 0.04 , $P < 0.01$) je zabeležena 4 sata nakon DPM tretmana u poređenju sa odgovarajućom kontrolom (0.16 ± 0.03). Tretman DPCPX je doveo do smanjenja koncentracije inozina nakon 4 sata (0.063 ± 0.007 , $P < 0.01$), što se nastavilo i 24 sata kasnije (1.85 ± 0.12 , $P < 0.05$) u odnosu na kontrolu (2.055 ± 0.015).



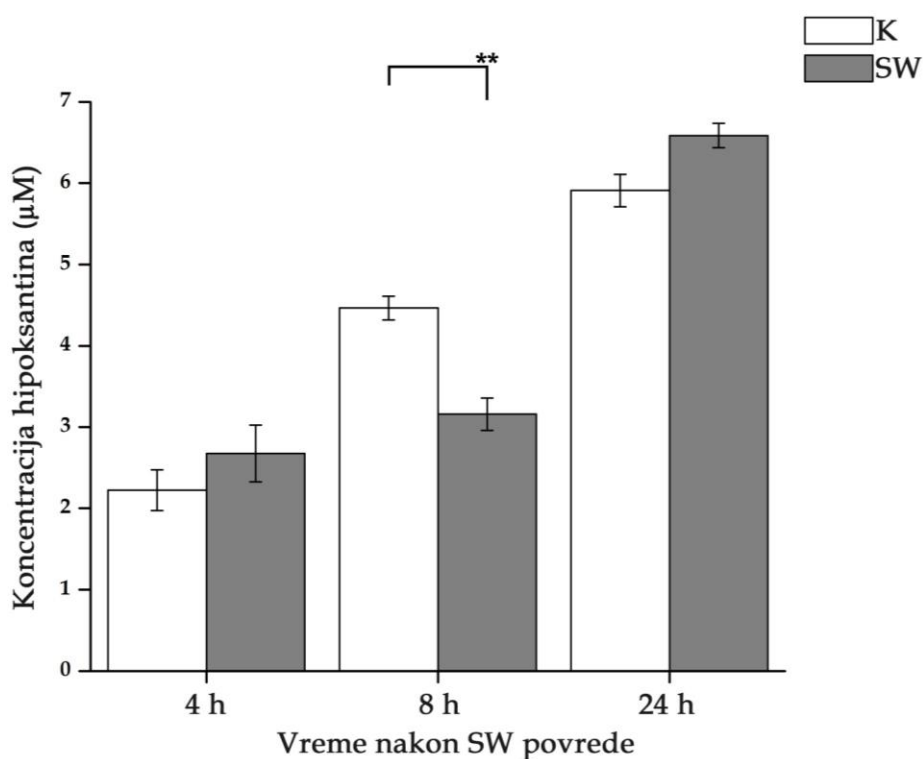
Slika 48. Promene koncentracije Ino u ćelijskom medijumu 4 i 24 h nakon DPX ili DPCPX tretmana astrocita.

Srednje vrednosti koncentracije Ino su prikazane belim stubićima u kontrolnim grupama, svetlosivim u DPM tretiranim grupama, a tamnosivi stubići prikazuju srednje vrednosti grupa nakon DPCPX tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM (μ M) iz 3 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

4.2.8.3. Promene koncentracija hipoksantina u ćelijskom medijumu nakon skarifikacije ili tretmana

Jedina značajna promena u koncentraciji hipoksantina nakon skarifikacije je zabeleženo značajno smanjenje 8 h nakon povrede ćelijskog jednosloja (3.16 ± 0.02 , $P < 0.01$) u poređenju sa kontrolom (4.47 ± 0.15), (Slika 49).

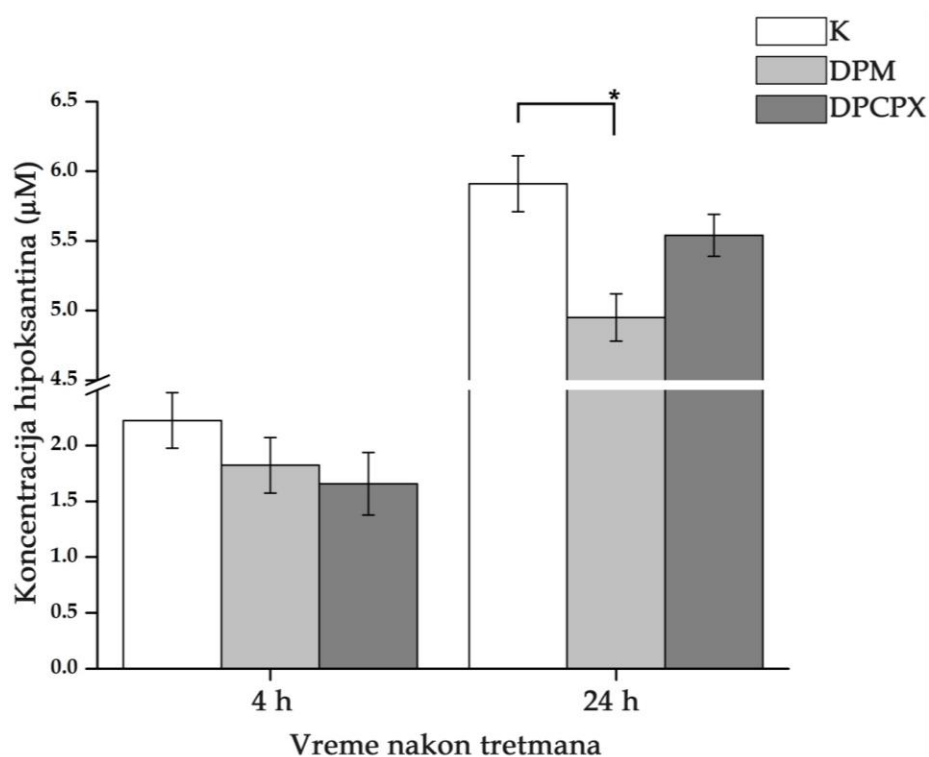


Slika 49. Promene koncentracije HX u ćelijskom medijumu u različitim vremenskim intervalima nakon skarifikacije astrocita.

Beli stubići predstavljaju srednje vrednosti koncentracije HX u kontrolnim grupama, a sivi stubići predstavljaju srednje vrednosti HX grupa koje su izložene skarifikaciji. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM (μM) iz 3 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: $**P < 0.01$.

Na Slici 50 je prikazan uticaj tretmana DPM i DPCPX na promenu koncentracija HX nakon 4 i 24 h. Značajno smanjenje HX je zabeleženo 24 h nakon DPM tretmana (4.95 ± 0.17 , $P < 0.05$) u poređenju sa kontrolom (5.91 ± 0.20).



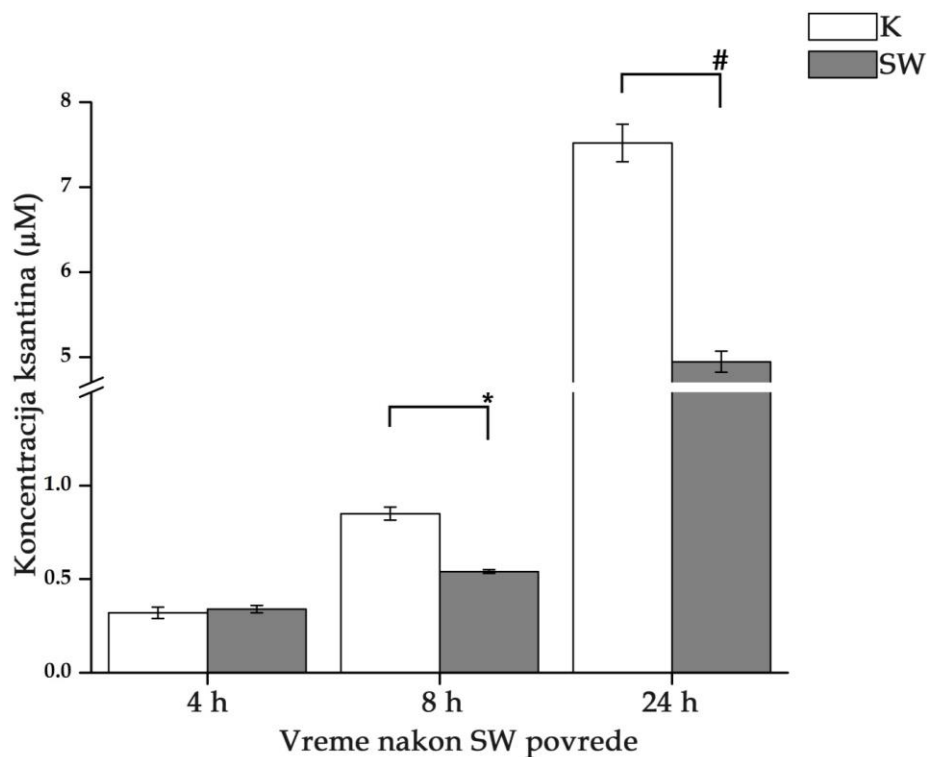
Slika 50. Promene koncentracije HX u ćelijskom medijumu 4 i 24 h nakon DPX ili DPCPX tretmana astrocita.

Srednje vrednosti koncentracije HX su prikazane belim stubićima u kontrolnim grupama, svetlosivim u DPM tretiranim grupama, a tamnosivi stubići prikazuju srednje vrednosti grupa nakon DPCPX tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM (μ M) iz 3 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: * $P < 0.05$.

4.2.8.4. Promene koncentracija ksantina u ćelijskom medijumu nakon skarifikacije ili tretmana astrocita

Na Slici 51 su prikazane promene koncentracije ksantina u različitim vremenima nakon skarifikacije. Značajno smanjenje koncentracije ksantina za oko 30% je primećeno 8 sati nakon povrede (0.54 ± 0.01 , $P < 0.05$) u poređenju sa kontrolom (0.85 ± 0.035). Ovaj trend se održao i 24 h nakon povrede (4.95 ± 0.125 , $P < 0.001$) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (7.52 ± 0.22).

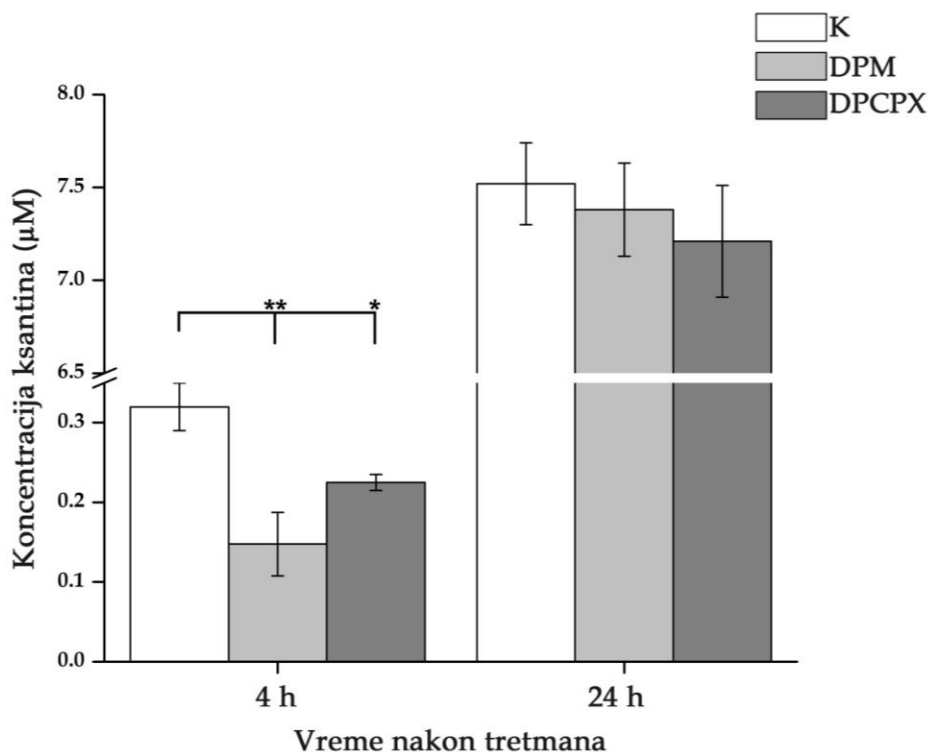


Slika 51. Promene koncentracije X u ćelijskom medijumu u različitim vremenskim intervalima nakon skarifikacije astrocita.

Beli stubići predstavljaju srednje vrednosti koncentracije X u kontrolnim grupama, a sivi stubići predstavljaju srednje vrednosti X grupa koje su izložene skarifikaciji. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM (μM) iz 3 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: * $P < 0.05$; # $P < 0.001$.

Dalje su praćene i promene u koncentraciji ksantina u ćelijskom medijumu nakon izlaganja DPM ili DPCPX (Slika 52). I DPM i DPCPX su izazvali značajno smanjenje (50% i 25%) u koncentraciji ksantina 4 sata nakon tretmana (0.14 ± 0.01 , $P < 0.01$; 0.23 ± 0.01 , $P < 0.05$) u poređenju sa kontrolom (0.32 ± 0.03). Značajne promene nisu uočene nakon 24 h ni pod jednim tretmanom.



Slika 52. Promene koncentracije X u ćelijskom medijumu 4 i 24 h nakon DPX ili DPCPX tretmana astrocita.

Srednje vrednosti koncentracije X su prikazane belim stubićima u kontrolnim grupama, svetlosivim u DPM tretiranim grupama, a tamnosivi stubići prikazuju srednje vrednosti grupa nakon DPCPX tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM (μM) iz 3 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

4.2.8.5. Uticaj DPM na nivo vanćelijskog Ado i njegovih metabolita, 4 i 24h nakon SW

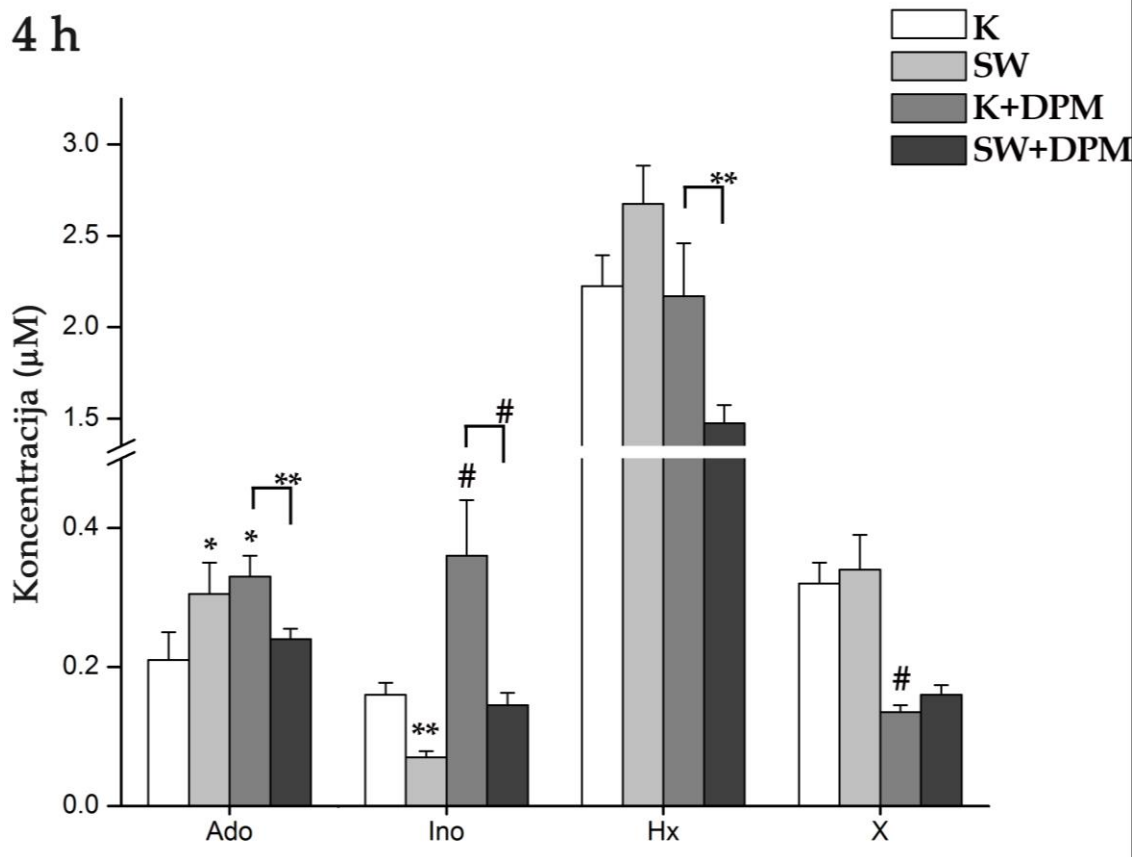
Blokiranjem ENT-ova dipiridamolom ispitali smo u kojoj meri ovi nukleozidni transporter doprinose regulaciji vanćelijskog Ado, Ino, HX i X, 4 (Slika 49) i 24 (Slika 53) sata nakon skarifikacije astrocitnog jednosloja.

Četiri sata nakon skarifikacije nivo vanćelijskog Ado (0.31 ± 0.05 , $P < 0.05$) u odnosu na kontrolu (0.21 ± 0.04). Nakon tretmana DPM, ovaj efekat se poništava, to jest nivoi Ado su niži za oko 30% (0.24 ± 0.02 , $P < 0.01$) u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu DPM (0.33 ± 0.03).

Četiri časa nakon skarifikacije koncentracije Ino se smanjuju (0.07 ± 0.009 , $P < 0.01$), dok nakon DPM tretmana rastu (0.36 ± 0.08 , $P < 0.001$) u odnosu na kontrolu (0.16 ± 0.02). Vanćelijske koncentracije Ino se značajno snižavaju 4 h nakon skarifikacije i tretmana DPM (0.15 ± 0.02 , $P < 0.001$) za oko 60% u odnosu na DPM tretiranu kontrolu (0.36 ± 0.08).

U odnosu na DPM tretman (2.17 ± 0.29), koncentracije HX su bile smanjene za oko 30% nakon skarifikacije u kombinaciji sa DPM tretmanom (1.48 ± 0.10 , $P < 0.01$).

Tretman DPM smanjuje koncentraciju vanćelijskog ksantina za oko 50% u odnosu na kontrolu, ali se ne menja nakon skarifikacije i DPM tretmana.

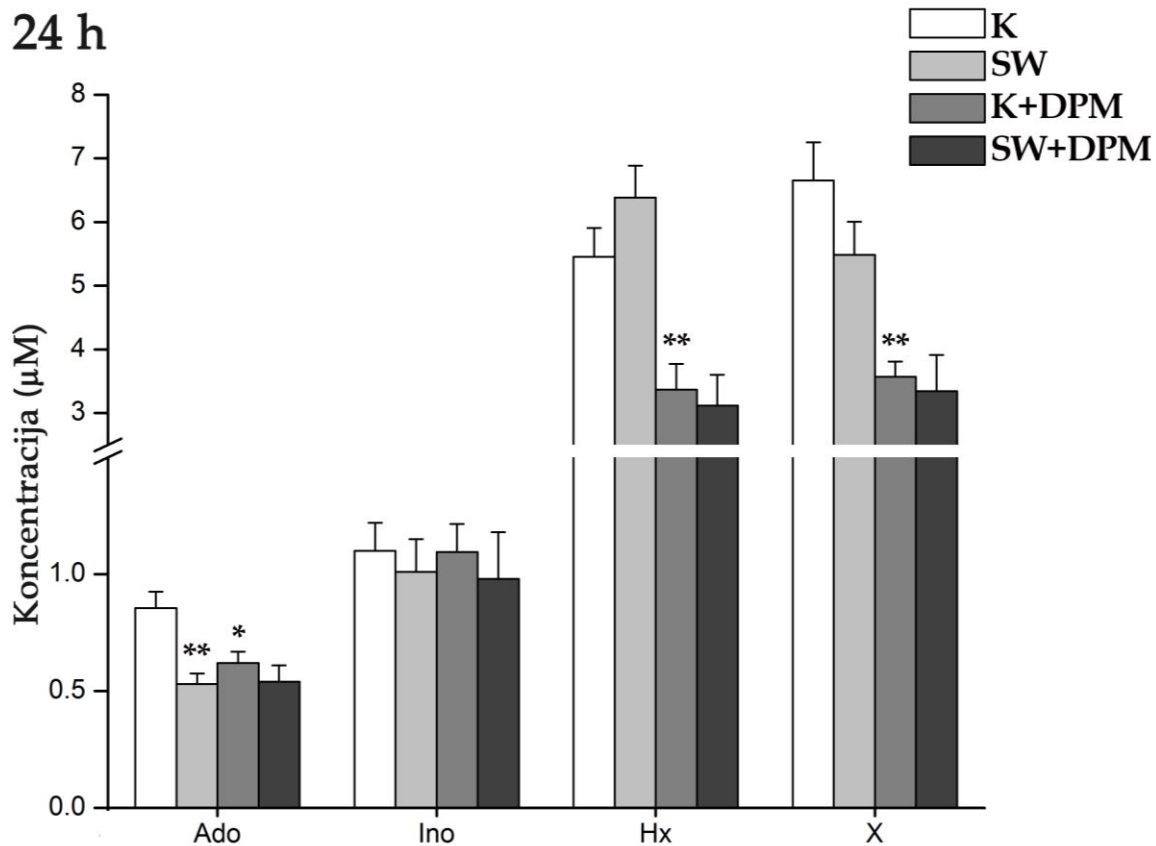


Slika 53. Uticaj DPM na vanćelijske koncentracije Ado i njegovih metabolita, 4h nakon skarifikacije.

Srednje vrednosti koncentracija Ado, Ino, Hx i X, su prikazane belim stubićima u kontrolnim grupama (K), svetlosivim u grupama podvrgnutim skarifikaciji (SW), tamnosivim u DPM tretiranim grupama (K+DPM), a crni stubići prikazuju srednje vrednosti grupa nakon skarifikacije i DPM tretmana (SW+DPM). Poređenje grupa je vršeno u odnosu na kontrolu, dok je linijama označena statistička značajnost dobijena poređenjem K+DPM i SW+DPM grupa. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM (μM) iz 2 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; # $P < 0.001$.

Dvadeset četiri časa nakon tretmana DPM koncentracije Ado, HX i X se smanjuju za oko 30% u odnosu na kontrolu. Kombinacija tretmana DPM i skarifikacije, ne utiče na vanćelijske koncentracije Ado, Ino, HX i X u odnosu na tretman DPM (Slika 54).



Slika 54. Uticaj DPM na vanćelijske koncentracije Ado i njegovih metabolita, 24h nakon skarifikacije.

Srednje vrednosti koncentracija Ado, Ino, Hx i X, su prikazane belim stubićima u kontrolnim grupama (K), svetlosivim u grupama podvrgnutim skarifikaciji (SW), tamnosivim u DPM tretiranim grupama (K+DPM), a crni stubići prikazuju srednje vrednosti grupa nakon skarifikacije i DPM tretmana (SW+DPM). Poređenje grupa je vršeno u odnosu na kontrolu. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM (μ M) iz 2 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

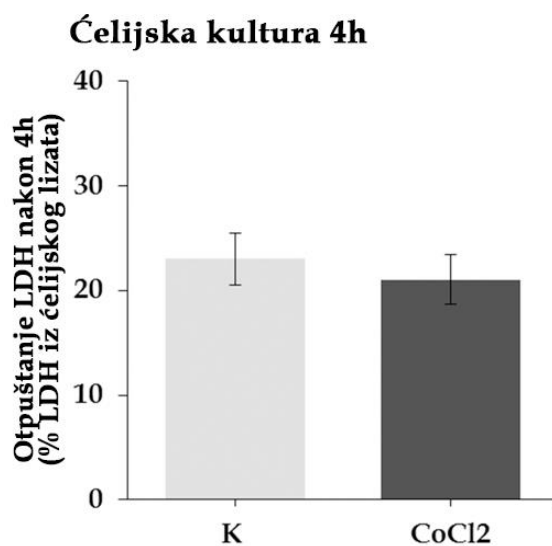
4.2.9. Uticaj hemijski izazvane hipoksije kobalt-hloridom (CoCl_2) na aktivnosti komponenti adenozienskog signalnog sistema

Kako bi se uporedili efekti mehaničke i hipoksične povrede astrocita *in vitro* u smislu aktivnosti komponenti adenozienskog signalnog sistema, osmišljena je

serija dodatnih eksperimenata pod tretmanom CoCl_2 . Primenjen je CoCl_2 tretman ($30 \mu\text{M}$) u trajanju od 4h, nakon čega je procenjena vijabilnost ćelija. Potom su urađene FACS i UPLC analize, a rezultati iz dva nezavisna eksperimenata sa po tri uzorka po grupi su prikazani u daljem tekstu.

4.2.8.1. Određivanje citotoksičnog efekta CoCl_2 tretmana

Citotoksični potencijal $30 \mu\text{M}$ CoCl_2 u kulturi ćelija ispitivan je primenom LDH testa 4 sata nakon tretmana glijskog jednosloja, (Slika 55). LDH test je pokazao da primenjeni tretman CoCl_2 nije uticao na preživljavanje ćelija.



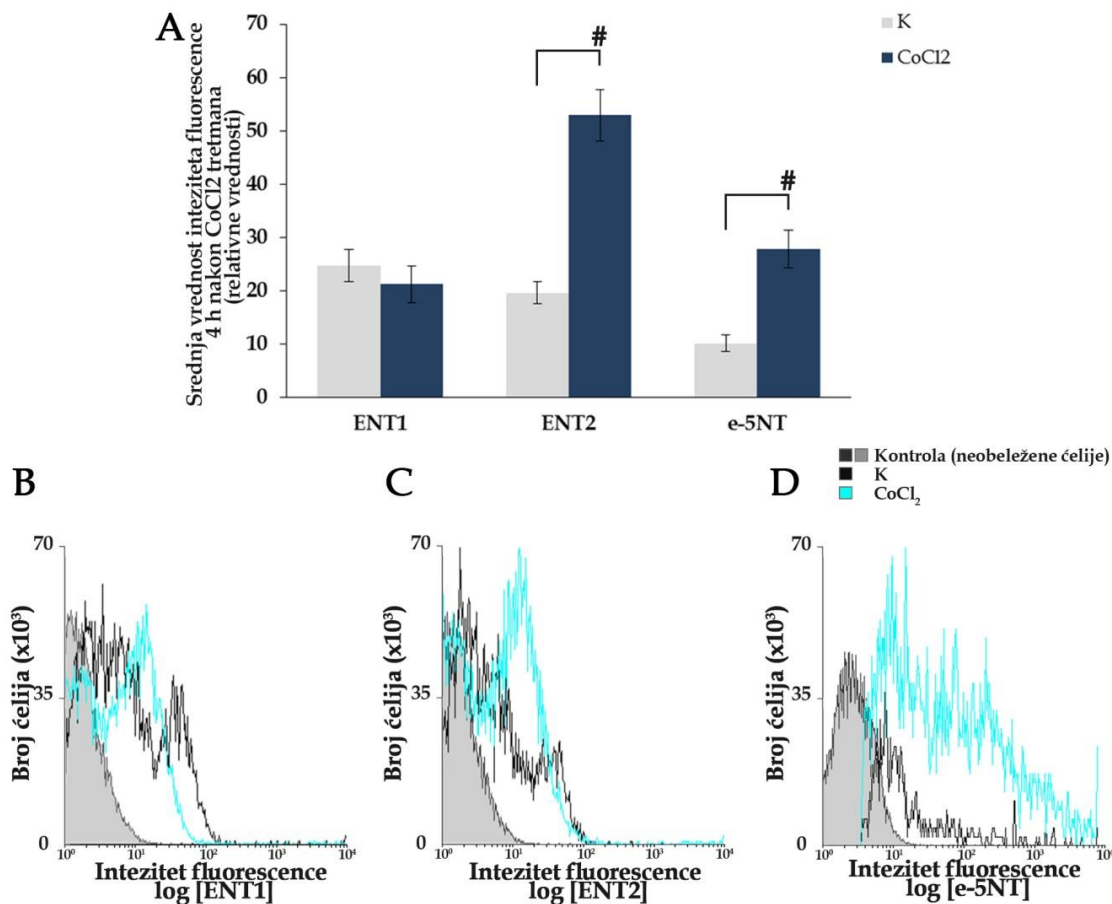
Slika 55. Uticaj CoCl_2 na ćelijsku vijabilnost.

Uticaj $30 \mu\text{M}$ CoCl_2 tretmana nakon 4 h na vijabilnost ćelija u kulturi određen je LDH testom. Svi efekti predstavljeni su kao procenat otpuštanja LDH u odnosu na apsolutnu kontrolu (100%) maksimalnog otpuštanja LDH iz liziranih ćelija. Rezultati prikazani stubićima su srednje vrednosti \pm SEM iz 3 uzorka po grupi.

4.2.8.2. Analiza membranske ekspresije ENT1, ENT2 i e-5NT na astrocitima protočnom citofluorimetrijom (FACS) nakon CoCl_2 tretmana

Kako bi se kvantitativno odredile promene u ekspresiji odabranih komponenti adenozienskog sistema, urađena je FACS analiza 4 h nakon tretmana

CoCl₂ (30 μM). Rezultati FACS analize prikazani su na Slici 56. Nakon 4 sata pod CoCl₂ tretmanom, nije primećena promena u ekspresiji ENT1, dok se ENT2 ekspresija povećala tri puta (52.48 ± 2.05, $P < 0.001$) u odnosu na kontrolu (19.57 ± 0.77). Pored toga, CoCl₂ tretman je doveo do gotovo trostrukog povećanja ekspresije e-5NT (27.45 ± 1.32, $P < 0.001$) u poređenju sa kontrolom (9.05 ± 0.23).



Slika 56. Efekat CoCl₂ tretmana na membransku ekspresiju ENT1, ENT2 i e-5NT.

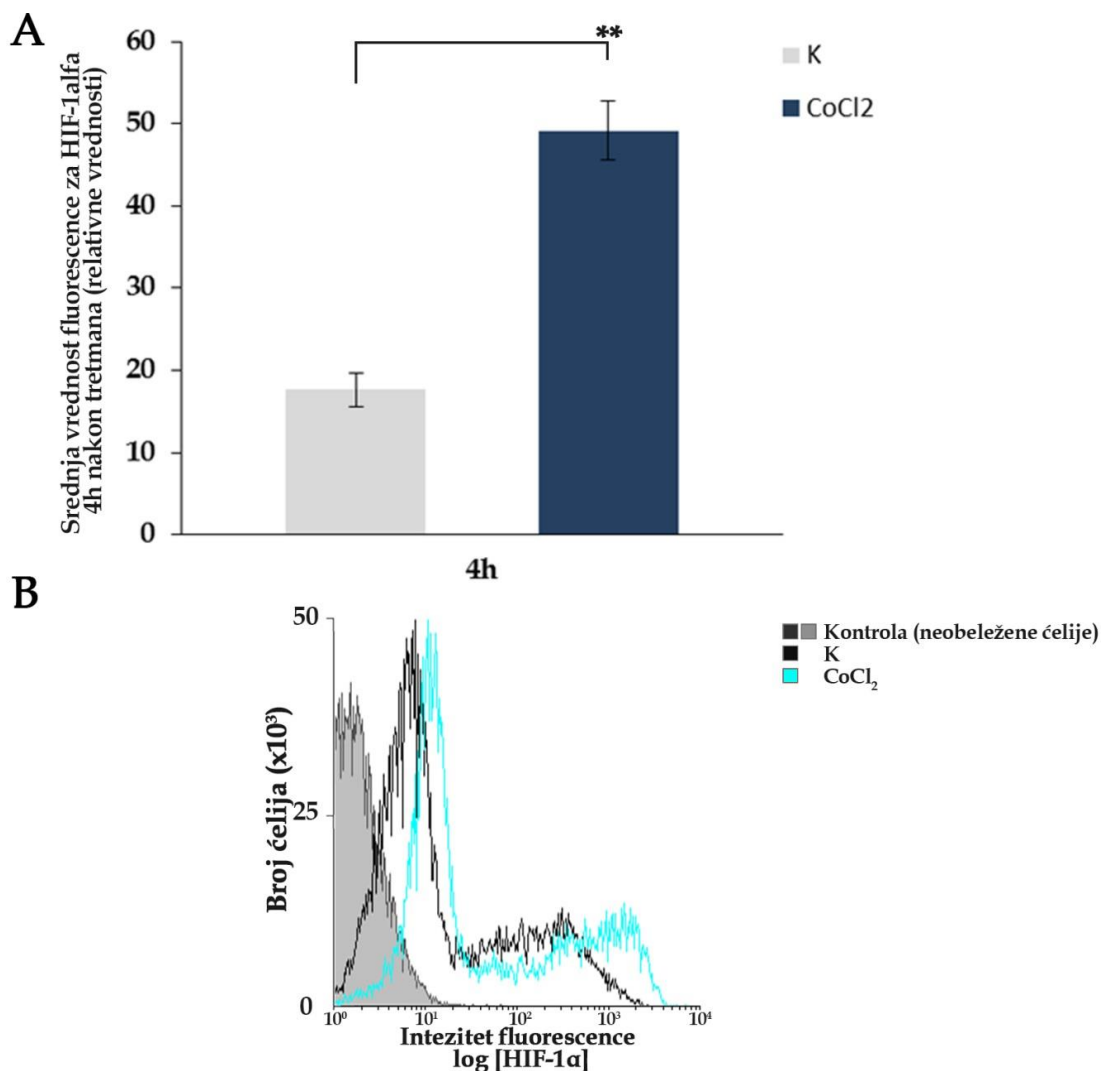
A: Relativne srednje vrednosti inteziteta fluorescence poreklom od ENT1, ENT2 i e-5NT izražene su u odnosu na kontrolu, 4 h nakon tretmana.

B, C, D: Preklapljeni reprezentativni histogrami inteziteta fluorescence u funkciji broja ENT1, ENT2 odnosno e-5NT pozitivnih ćelija. Neobeležene ćelije su prikazane sivim histogramom, i predstavljaju negativnu kontrolu.

Nivo statističke značajnosti između grupa: # $P < 0.001$.

Kako bi se ispitala promena ekspresije transkripcionog faktora HIF-1α 4h nakon CoCl₂ tretmana, rađena je FACS analiza GFAP pozitivnih astrocita.

Kvantitativna analiza ekspresije HIF-1 α je prikazana na Slici 57. CoCl₂ tretman je povećao ekspresiju HIF-1 α gotovo tri puta (49.2 ± 1.92 , $P < 0.01$) u odnosu na kontrolu (17.62 ± 2.23).



Slika 57. Efekat CoCl₂ tretmana na ekspresiju HIF-1alfa.

A: Relativne srednje vrednosti inteziteta fluorescence poreklom od HIF-1alfa izražene su u odnosu na kontrolu, 4 h nakon povrede ili tretmana.

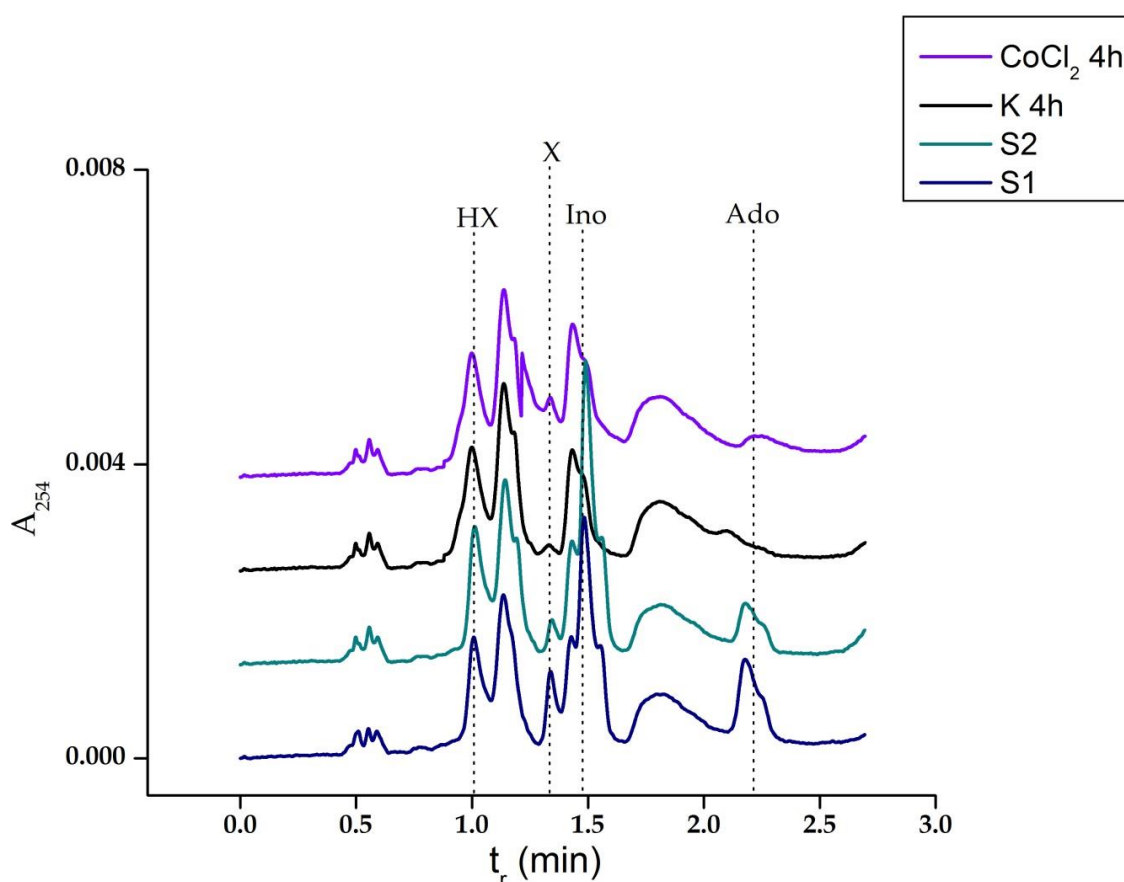
B: Preklapljeni reprezentativni histogrami inteziteta fluorescence u funkciji broja HIF-1alfa pozitivnih ćelija. Neobeležene ćelije su prikazane sivim histogramom, i predstavljaju negativnu kontrolu.

Nivo statističke značajnosti između grupa: $**P < 0.01$.

4.2.8.3. Određivanje koncentracija adenzina i njegovih metabolita UPLC analizom ćelijskog medijuma nakon CoCl_2 tretmana

Koncentracije adenzina, inozina, hipoksantina i ksantina u ćelijskom medijumu, 4 h nakon tretmana CoCl_2 ($30 \mu\text{M}$) određene su metodom UPLC.

Na Slici 58, prikazani su reprezentativni hromatogrami dva standarda različitih koncentracija (S1 i S2), kontrolnog uzorka (K 4h) i uzorka tretiranog sa CoCl_2 (CoCl_2 4h).



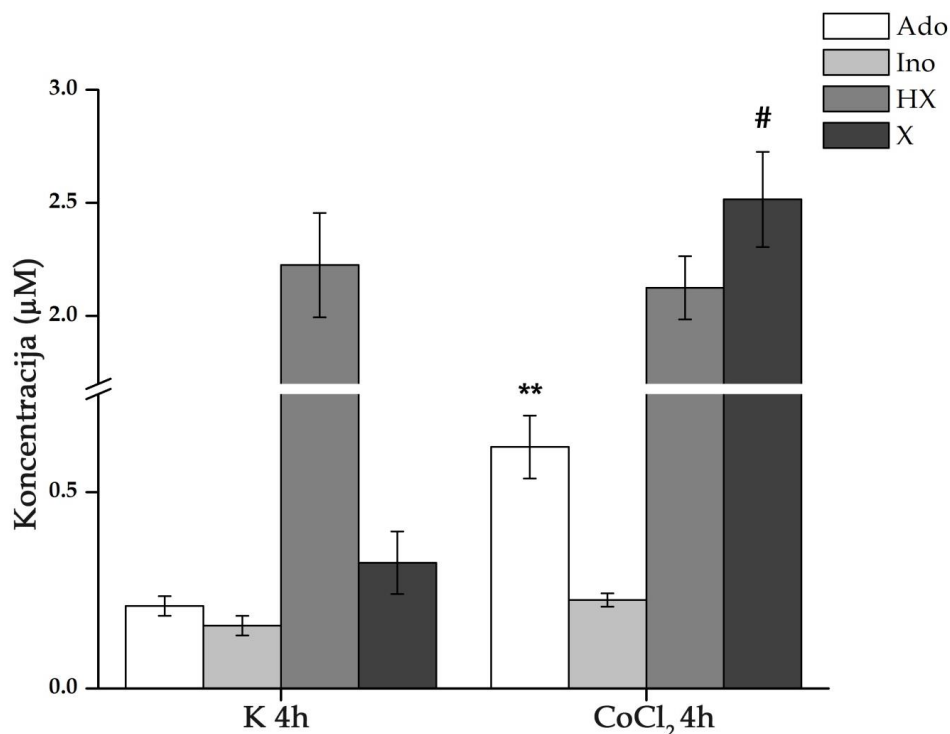
Slika 58. Reprezentativni hromatogrami, dobijeni UPLC metodom uz upotrebu TUV detektora na talasnoj dužini 254 nm.

Skraćenice: adenzin (Ado), inozin (Ino), ksantin (X), hipoksantin (HX), retenciono vreme (t_r), apsorbancija na 254 nm (A_{254}).

Koncentracije standarda u medijumu: S1 – $2 \mu\text{M}$, S2 – $0.5 \mu\text{M}$.

Slika 59 predstavlja prikaz promena koncentracija Ado, Ino, HX i X, u ćelijskom medijumu 4 sata nakon CoCl_2 tretmana. Koncentracija adenzina se

trostruko povećava 4 h nakon CoCl_2 tretmana (0.62 ± 0.08 , $P < 0.01$) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (0.21 ± 0.03). Povećanje od skoro 8 puta je zabeleženo pri merenju koncentracija ksantina 4 h nakon CoCl_2 tretmana (2.52 ± 0.21 , $P < 0.001$) u odnosu na kontrolu (0.32 ± 0.08). Koncentracije inozina i hipoksantina se nisu menjale pod tretmanom CoCl_2 .



Slika 59. Promene koncentracije Ado, Ino, HX i X, u ćelijskom medijumu 4h nakon CoCl_2 tretmana.

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM koncentracija (μM) iz 2 nezavisna UPLC eksperimenta sa 3 uzorka po grupi.

Nivo statističke značajnosti između grupa: ** $P < 0.01$; # $P < 0.001$.

V Diskusija

Traumatska povreda mozga uzrokuje strukturne i funkcionalne promene u nervnom sistemu, koje, između ostalih, uključuju narušavanje krvno-moždane barijere, pad energetskeg metabolizma, hipoksiju i oksidativni stres [208]. Pokretanje velikog broja različitih procesa, čija međusobna interakcija zavisi i od tipa i obima povrede, čini TPM kompleksnom bolešću koja je još uvek bez adekvatne terapije [174].

Mehanička povreda dovodi do oslobađanja velike količine nukleotida i nukleozida, a pre svega ATP i Ado, i uslovljava promene u signalizaciji purinima koje se mogu održavati danima i nedeljama nakon TPM [209]. Usled ishemije ili hipoksije, vanćelijski Ado se akumulira i uzrokuje brzu depresiju evociranih sinaptičkih potencijala, delujući neuroprotektivno [17, 210, 211]. Uprkos značajnom broju podataka na ovu temu, malo se zna o izvorima Ado tokom povreda mozga.

Sudbina Ado poreklom od astrocita ispitana je u *in vivo* i *in vitro* modelu povrede, genskom i proteinskom analizom ekspresije odabranih komponenti adenozienskog sistema. Pored toga, korišćenjem UPLC metode analiziran je sadržaj astrocitnog medijuma i analizirane su koncentracije purina nakon skarifikacije, ali i pod delovanjem specifičnih inhibitora, kao što je DPM, potentan i nespecifičan blokator ENT [212, 213]. DPCPX je upotrebljen kako bi se ispitaio uticaj signalizacije A1 receptora na ekspresiju i funkciju ENT1/2 i e-5NT. Potrebno je naglasiti da je funkcija razmatrana posredno, s obzirom na to da tehnički nismo bili u mogućnosti da upotrebimo odgovarajući esej aktivnosti ENT1/2.

Veliki broj podataka o nukleozidnim transporterima iz literature je „nedorečen“ usled nedostatka adekvatnih, i pre svega specifičnih, blokatora. S obzirom na to da je prepoznata važnost NT u kruženju Ado, ali i njihova

potencijalna uloga u transportu nukleozidnih analoga (lekova), intenzivno se traga za novim i potentnim inhibitorima NT [214].

1. Skarifikacija astrocitnog jednosloja kao model povrede - studija ekspresije hondroitin-sulfatnih proteoglikana

Iako se *in vitro* modeli ne mogu posmatrati kao zamena za *in vivo* modele, oni ipak imaju prednost jer omogućavaju ispitivanje izolovanih fenomena. Uz to, *in vitro* modeli se uglavnom lako uspostavljaju, ekonomični su, sa daleko manje etičkih izazova, ponovljivi i bolje kontrolisani, pa predstavljaju dobru platformu za ispitivanje lekova [187, 215, 216]. Stoga su *in vitro* modeli TPM vredan alat u izučavanju patobiologije povrede mozga i uvek postoji potreba da se bolje definišu.

Reaktivna astrogliozna je događaj koji karakteriše sve tipove moždane povrede. Tipično biohemijsko obeležje reaktivne astroglioze je povećana ekspresija intermedijarnog filameta GFAP-a [188, 217]. Međutim podaci iz literature govore da se *in vitro* povrede astrocita unekoliko razlikuju u ovom smislu i zabeleženi su oprečni rezultati u poređenju sa rezultatima *in vivo*. Na primer, rezultati iz eksperimenata sa hemijskim tretmanima astrocita (di-butiril ciklični AMP, interleukin-1 β ili makrofagni kondicioni medijum) ne govore o značajnim promenama ekspresije GFAP-a [188]. Sa druge strane, porast ekspresije GFAP na nivou proteina za oko 70% je primećen u modelu povrede astrocita skarifikacijom koja je oštetila oko 37% ćelijskog jednosloja [218]. Takođe je objavljen podatak da 24 h nakon SW, pojedini astrociti u blizini mesta povrede iskazuju povećanu GFAP imunoreaktivnost [191]. Nasuprot ovome, Yang i saradnici su radili sukcesivne imunoblot analize nakon SW povrede astrocitnog jednosloja, i nisu registrovali promene u sadržaju GFAP proteina do petog dana [193]. Naši rezultati ukazuju na to da su iRNK nivoi za GFAP nepromenjeni 4h nakon SW. Ipak, imunocitohemijska analiza je pokazala pojačan signal poreklom od GFAP na

astrocitima oko mesta skarifikacije. Takođe, astrociti u blizini mesta povrede su morfološki odgovarali reaktivnim astrocitima - hipertrofirano ćelijsko telo i dugački nastavci. Slični rezultati su ranije objavljeni u modelu mehaničkog "istezanja" diferenciranih astrocita u kulturi sa fibroblastima moždanica, kada se povećanja u sadržaju GFAP na nivou imunofluorescence nisu podudarala sa rezultatima PCR analize (*de novo* GFAP ekspresija) [219]. Wanner i saradnici su u ovom radu razmatrali mogućnost da akumulacija GFAP u nastavcima astrocita može biti zapravo rezultat kontrakcije ćelije i rearanžmana citoskeletnih elemenata. Uzevši u obzir navedeno, ovi rezultati bi mogli značiti da analiza GFAP jednom metodom i u jednoj vremenskoj tački nije pouzdan marker aktivacije astrocita *in vitro*.

Iz *in vivo* studija je takođe poznato da TPM dovodi do akumulacije CSPG, koji doprinose formiranju barijere i sprečavaju regeneraciju aksona i inervaciju mesta povrede [182, 220, 221]. Upravo se reaktivni astrociti smatraju primarnim izvorom ovih inhibitornih proteina [185]. Prethodne studije su pokazale da se svi članovi CSPG familije pojačano sintetišu nakon povrede CNS-a [222, 223], iako se ove promene razlikuju u zavisnosti od ispitivane strukture i vremenske tačke nakon povrede [224]. S obzirom na to da su fosfakan, brevikan i neurokan prepoznati kao markeri formiranja ožiljka nakon povrede, cilj ove studije je bio da se odredi dinamika njihove ekspresije u *in vitro* modelu povrede astrocita. Skarifikacija astrocitnog jednosloja povećava ekspresiju neurokana i fosfakana, dok se nivoi transkripta za brevikan smanjuju nakon skarifikacije. Dalje, sva tri CSPG su eksprimirana u astrocitima, dok mikroglia nije bila obeležena ni na jedan od tri ispitivana proteoglikana. Najzastupljeniji je bio transkript za neurokan, zatim fosfakan, a najmanje zastupljen je bio transkript za brevikan. Naši rezultati ukazuju na to da kortikalni astrociti u kulturi produkuju neurokan i da povreda skarifikacijom uzrokuje značajno povećanje iRNK za neurokan, što je u skladu sa rezultatima dobijenih iz prethodnih *in vitro* [225] i *in vivo* studijama [181, 224, 226].

Druga važna komponenta CSPG familije, fosfakan, je snažno ushodno regulisan nakon različitih povreda CNS-a *in vivo* [176, 227, 228]. Iako su neke studije ukazale na nishodnu regulaciju fosfakana neposredno nakon povrede [224], mi smo pokazali da je fosfakan pojačano eksprimiran 4h nakon skarifikacije. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima povrede astrocita *in vitro* [219]. Rezultati ICC analize su dali više informacija o lokalizaciji fosfakana i neurokana, pa je tako zabeležena imunoreaktivnost ova dva proteoglikana u citosolu astrocita u kontroli. Nakon skarifikacije jače bojenje je bilo vidljivo u nastavcima astrocita u neposrednoj blizini mesta povrede, što je u skladu sa prethodnim rezultatima [219].

Iako je i *in vitro* i *in vivo* potvrđeno da su astrociti glavni izvor brevikana [229–231], rezultati qRT-PCR analize naših kultura ukazuju na to da je transkript za brevikan daleko manje zastupljen u poređenju sa iRNK za fosfakan ili neurokan. Važno je, međutim, naglasiti da je skarifikacija dovela do smanjenja iRNK za brevikan na polovinu vrednosti u odnosu na kontrolu. Sličan pad u sadržaju iRNK i proteina za brevikan je primećen u različitim *in vivo* modelima nakon povrede mozga [230, 232] ili kičmene moždine [233].

2. Uticaj skarifikacije astrocitnog sloja i različitih tretmana na vanćelijsku koncentraciju Ado i njegovih metabolita

Najmanje dva aspekta generisanja vanćelijskog Ado u patološkim stanjima zahtevaju pažnju 1) relativan doprinos različitih ćelijskih tipova, i 2) da li Ado nastaje vanćelijskom hidrolizom adeninskih nukleotida ili biva oslobođen iz ćelije. Kada se jednom nađe u vanćelijskom prostoru, Ado se preuzima u ćelije istim nukleozidnim transporterima koji posreduju u njegovom otpuštanju, transportujući Ado u zavisnosti od njegovog koncentracionog gradijenta.

U više navrata je pokazano da se ATP i Ado otpuštaju iz ćelija u fiziološkim i posebno u patološkim stanjima [234]. Efluks Ado je posredovan ENT i tradicionalno posmatran kao autokrini protektivni mehanizam koji smanjuje neuronsku aktivnost u stanjima narušene homeostaze [235]. Isprva se mislilo da je tokom hipoksije većina akumuliranog vanćelijskog Ado rezultat povećane akumulacije u ćelijama usled utroška ATP i oslobađanja u vanćelijski prostor putem ENT [236, 237]. Ovaj koncept je počeo da se preispituje nakon analiza grupe Bruna Frenguelli-ja [238] koja je pokazala da se vanćelijski nivo Ado povećava, a ne smanjuje nakon inhibicije ENT.

Koristeći *in vitro* model povrede, pokušali smo da damo odgovor na napred postavljena pitanja, analizirajući astrocitni medijum korišćenjem UPLC metode u kontrolnim uslovima, posle skarifikacije ili tretmana.

Četiri sata nakon povrede detektovano je neznatno povećanje koncentracije Ado, praćeno značajnim smanjenjem koncentracije 24 h nakon skarifikacije astrocitnog jednosloja.

Zanimljivo je da sami tretmani DPM i DPCPX nisu imali uticaja na promene koncentracija Ado 4h nakon povrede, a samo je DPCPX smanjio koncentraciju značajno 24 h kasnije. Opsežne studije Parkinson i saradnika su pokazale da neuroni u kulturi, a ne astrociti, otpuštaju Ado putem ENT [239]. Ipak, skorijom studijom je predloženo da su astrociti u kulturi takođe osetljivi na hipoksiju i da otpuštaju Ado [240], i tako ostvaruju neuroprotektivnu ulogu u stresnim situacijama. Imajući u vidu da su astrociti veoma otporni na hipoksiju i da mogu da prežive danima u značajno osiromašenim uslovima [241], ovakvi rezultati su bili iznenađujući. Fujita i saradnici [242] su objavili rad u kome navode da su takvi rezultati ipak posledica metodološke greške prilikom korišćenja hemiluminiscentnog eseja za detektovanje Ado [240, 243]. Takođe, oni su pokazali da astrociti u kulturi ne otpuštaju Ado nakon izlaganja dvočasovnoj hipoksiji [242], što je u skladu sa ranijim podacima [239]. S obzirom na to da su neuroni

daleko osetljiviji od astrocita na uslove hipoksije i hipoglikemije [244] i da u energetski lošim uslovima brže „troše“ ATP, verovatnije je da upravo ove ćelije dovode do povećanja vanćelijskih koncentracija Ado [99]. Naši rezultati se donekle slažu sa ovim konceptom, iako treba voditi računa da su mehanička povreda i ishemija/hipoksija različiti tipovi povrede CNS-a.

Iako astrociti doprinose vanćelijskim koncentracijama ado aktivnošću e-5NT koja se pojačano eksprimira i na reaktivnim astrocitima [99, 245], u prva 24 sata nakon povrede mozga pacova uočeno je smanjenje aktivnosti ovog enzima u perilediranom tkivu [246]. Naši rezultati ukazuju i na smanjenu gensku ekspresiju e-5NT 4h nakon skarifikacije. Stoga se može pretpostaviti da e-5NT nema značajnog udela u uočenom povećanju koncentracija Ado, 4h nakon skarifikacije. Činjenica da se taj efekat ne uočava kada se u skarifikovanim kulturama blokira transportna aktivnost ENT, ukazuje na to da ovi transporteri u prvih nekoliko sati nakon povrede mogu imati ulogu u povećanju vanćelijskih koncentracija Ado.

Nije isključeno da mehanička povreda, koja za razliku od indukcije hipoksije dovodi do direktnog oštećenja ćelija i otpuštanja njihovog sadržaja u vanćelijski prostor, dovodi do povećanja koncentracije Ado. Ovo nažalost nismo mogli da potvrdimo iz tehničkih razloga, jer adeninski nukleotidi nisu mogli biti detektovani u ćelijskom medijumu korišćenjem UPLC metode izložene u ovom radu. Da astrocitni ENT igraju veću ulogu u kasnijim vremenima nakon povrede pokazuje rezultat dobijen 24 h nakon skarifikacije i DPM tretmana: za razliku od pada Ado uočenog nakon same skarifikacije, ovde nije bilo promena u vanćelijskim koncentracijama Ado.

Četiri sata nakon skarifikacije registrovano je smanjenje koncentracije Ino u ćelijskom medijumu, dok se koncentracije HX i X nisu promenile. Pad Ino se nastavio i 8h nakon skarifikacije, a u ovoj vremenskoj tački je registrovan i pad HX

i X. Dvadesetčetiri sata nakon skarifikacije HX se nije promenio, dok je koncentracija X i dalje bila ispod kontrolne vrednosti.

Rezultati iz literature, pak, ukazuju da nakon ishemične ili traumatske povrede CNS *in vivo* [18, 247–249] ili u različitim modelima ishemije astrocita *in vitro* [239] dovode do povećanja koncentracije adenozijskih metabolita. Jedan od razloga za ovo drastično neslaganje je određivanje koncentracije metabolita neposredno ili u daleko kraćem vremenskom razmaku (10 – 120 minuta) nakon povrede u poređenju sa našim modelom. Imajući u vidu da u ishemičnim događajima ekto-ADA katalizuje konverziju Ado do Ino [250], i brzo dovodi do povećanja Ino [99], nije isključeno da u kasnijim vremenskim tačkama profil koncentracija Ino pada usled aktivnosti ENT [106]. Takođe, verovatno je i da je pad koncentracija Ino uzrok pada koncentracija HX i X.

Četiri sata nakon tretmana DPM, koncentracija Ino u ćelijskom medijumu bila je povećana u odnosu na kontrolu. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodnima, gde je pokazano da DPM značajno povećava vanćelijske koncentracije Ino u kulturi astrocita [251]. Takođe, *in vivo* HPLC studija vanćelijskog nivoa Ino nakon akutne hipoksije kičmene moždine je pokazala da akutna hipoksija dovodi to temperaturno-zavisnog povećanja i Ado i Ino [247]. Inhibitori ADA i ENT su poništili ove efekte u slučaju Ino, što je još jedna potvrda da se transport Ino obavlja preko ENT. Takođe, tretman DPM je smanjio koncentracije HX 24h nakon skarifikacije.

Inozin je opisan kao neuroprotektivni metabolit Ado, dok hipoksantin i ksantin nisu imali slične efekte na povredu astrocita [111]; stoga bi bilo važno detaljnije ispitati njegovo kruženja između unutar i vanćelijskog prostora nakon povrede, kao i signalizacije koju posreduje.

3. Ekspresija i ćelijska distribucija ENT1 i ENT2

Adenozin moduliše i ekscitatornu i inhibitornu neurotransmisiju posredstvom P1 receptora, i njegov uticaj u CNS-u je u velikoj meri zavisan od vanćelijskih koncentracija. Ovo je posebno važno u patološkim uslovima, gde Ado iskazuje neuroprotektivno dejstvo [17, 82, 252, 253]. S obzirom na to da Ado reguliše neuronsku aktivnost u fiziološkim i patološkim stanjima, mehanizam kontrole mora da omogući brze promene vanćelijskih koncentracija Ado [31, 254]. Ovo se postiže na dva načina: 1) Ado se proizvodi hidrolizom AMP od strane e-5NT i/ili 2) koncentracije Ado su regulisane od strane ENT.

Uzimajući u obzir da je Ado veoma važan signalni molekul, izučavan je prilično detaljno. Ipak, daleko manji broj studija se odnosi na ćelijsko poreklo Ado u mozgu; tu postoje različita mišljenja o poreklu Ado u vanćelijskom prostoru, koje se pripisuje ili enzimima ili transporterima [82].

ENT su tek nedavno privukli pažnju onih koji ispituju funkcije Ado u različitim patologijama CNS-a. Većina podataka vezanih za funkciju ENT dolazi iz studija koje se tiču toksičnosti alkohola [255–258], tako da je uloga ovih transportera u stanjima kao što je TPM nejasna.

Lokalizacija ENT1 i ENT2 proučavana je u mozgu čoveka i nekoliko vrsta glodara, korišćenjem različitih pristupa [259]. Rezultati IHC analize u našem radu ukazuju da se u intaktnom mozgu ENT1 i ENT2 snažno ekspimiraju u kortikalnim neuronima pacova, što je u skladu sa nalazima Alanka i sar. [71]. U našim uslovima, analiza genske ekspresije ukazala je da je ENT2 zastupljeniji od ENT1, na nivou zastupljenosti njihovih iRNK, što je potvrđeno i IHC analizom, a saglasno je i sa rezultatima iz literature [260, 261] [105].

Kada je reč o prisustvu i ekspresiji ENT na kortikalnim astrocitima u fiziološkim uslovima, naša IHC analiza preseka intaktnog mozga ukazuju na sporadično prisustvo i oskudnu ekspresiju kako ENT1, tako i ENT2 na astrocitima kore prednjeg mozga. Slični literaturni podaci o ekspresiji ENT na astrocitima

ukazuju da se oba transkripta, ENT1 i ENT2, eksprimiraju u kortikalnim astrocitima pacova, kako u *in vivo* [260], tako i u *in vitro* sistemima [66, 81, 245, 262].

Ova studija je, prema našem saznanju, prva koja je pokazala razlike u ekspresiji ENT1 i ENT2 nakon TPM. Naime, ekspresija oba ispitivana transportna proteina smanjuje se u datim vremenskim tačkama nakon ubodne lezije. Rezultati genske ekspresije delimično se poklapaju sa rezultatima proteinske ekspresije. Naime, dva dana nakon povrede zabeležen je značajan pad u zastupljenosti transkripta za ENT1 i ENT2, dok se sedam dana nakon povrede nivo transkripta za ENT1 značajno povećava, dok nivo ENT2 transkripta odgovara kontroli. Za ovo postoji nekoliko mogućih objašnjenja, kao što su post-transkripciona regulacioni procesi koji obuhvataju stabilnost proteina, zatim iRNK stabilnost ili početak translacije [263].

Osim kvantitativnih promena ekspresije ENT, još jedan zanimljiv aspekt naših rezultata odnosi se na promenu ćelijske distribucije ENT, posebno ENT2 nakon povrede. Imunohistohemijska analiza je pokazala da ubodna lezija vodi ka značajnom gubitku imunoreaktivnosti oba transportera u neuronima periledirane kore, u obe vremenske tačke. Ovo je u skladu sa rezultatima dobijenim imunoblot analizom proteinske ekspresije. Ipak, ushodna regulacija oba transportera je zabeležena kod reaktivnih astrocita koji okružuju mesto povrede. Ovo je daleko izraženije u slučaju ENT2, gde se ekspresija na astrocitima dodatno pojačava sedmog dana nakon povrede. Zanimljivo je da je sličan obrazac ekspresije pokazan i za e-5NT [171], što dodatno upućuje na zaključak da su astrociti suštinski uključeni u regulaciju metabolizma Ado nakon povrede mozga.

Treba konačno, napomenuti da je ovom studijom praćen i mogući efekat anestetika primenjenog tokom hirurške intervencije, koji međutim, bar kada je reč o promeni ekspresije ENT, nije ostvarivao efekat.

Kada je reč o ekspresiji ENT na izolovanim astrocitima u kulturi, naši rezultati odgovaraju rezultatima *in vivo* studije. Iako je FACS analiza potvrdila

prisustvo oba transportera na astrocitima, ENT2 je zastupljeniji od dva testirana transportera, bar kada je reč o nivou iRNK. Nakon skarifikacije astrocitnog sloja, ekspresija transportera, kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina nije se bitno menjala tokom prva 24 sata. Opet saglasno našim rezultatima dobijenim *in vivo*, u kulturi astrocita dolazi do ushodne regulacije oba transportera u kasnijim vremenima nakon povrede, 24 i 48h nakon skarifikacije. Budući da ICC analiza nije pokazala jasne promene u ekspresiji ovih transportera, urađena je FACS analiza koja je pokazala da se ekspresija ENT1 i ENT2 nije menjala na proteinskom nivou. S obzirom na to da analiza ekspresije ENT nije praćena u kasnijoj vremenskoj tački (48h), ostaje mogućnost da i na nivou proteina dolazi do kasnije ushodne regulacije ENT.

Bez obzira na poreklo adenzina, neminovno je da sa narušavanjem homeostaze, njegova vanćelijska koncentracija višestruko raste. Zbog toga smoteli da ispitamo kakav uticaj ostvaruje sam Ado na ekspresiju ENT u kulturi astrocita. U kulturi astrocita tretiranih Ado do smanjenja ekspresije ENT1 i povećanja ekspresije ENT2 je došlo već 4 sata nakon tretmana, dok su nakon 24 sata oba transportera bila ushodno regulisana na nivou iRNK. Imajući u vidu rezultate *in vivo* studije, može se zaključiti da dolazi do povećanja ekspresije ENT na astrocitima nakon povrede. Tretiranje astrocita sa ATP takođe utiče na ekspresiju ENT i to tako što dovodi do povećanja ekspresije oba transportera na nivou njihovih iRNK. Ovakav nalaz saglasan je rezultatima kinetičke analize vezivanja [³H]NBTI za membranu hromafinskih ćelija nakon ATP tretmana. Pokazano je da je tretman ATP značajno povećao broj NBTI vezujućih mesta, ne menjajući konstantu disocijacije K_d [264]. S obzirom na to da su slični rezultati dobijeni i sa ATP analogom, diadenozin tetrafosfatom, koji ne podleže hidrolizi ektonukleotidazama, autori su zaključili da ATP preko svojih receptora, deluje modulatorno na ENT. Ipak ostaje otvoreno pitanje da li ATP deluje preko svojih

receptora ili je povećanje transkripcije ENT vezano za Ado receptore, jer su oba tretmana uticala na povećanje transkripata za ENT1 i ENT2.

Iako ne možemo da donesemo zaključke o funkciji na osnovu studije ekspresije *in vivo* i *in vitro*, prodiskutovaćemo moguće uloge astrocita u kruženju adenozina nakon TPM uzimajući u obzir naše i rezultate drugih grupa.

Znajući da patološki stimuli mogu da dovedu do povećanja koncentracije vanćelijskog Ado do 100 puta, važno je otkriti tip ćelija koje su zaslužne za ovo. Odgovor na ovo pitanje je razmatran kroz različite eksperimentalne pristupe tokom protekle decenije, i smatra se da su za povećanje Ado najzaslužniji astrociti produkcijom Ado od ATP posredstvom e-5NT [53, 81, 105, 240, 245]. Jedno vreme vladalo je mišljenje da se Ado akumuliran tokom hipoksije otpušta u vanćelijsku sredinu posredstvom ENT, međutim, ovaj koncept je doveden u pitanje nakon rezultata Frenguelli-eve grupe [238] koja je pokazala da se nivo vanćelijskog Ado povećava tokom hipoksije nakon blokiranja transportne aktivnosti ENT.

Ipak, putevi kojima se Ado uklanja iz vanćelijskog prostora nisu dovoljno proučeni. Rezultati skorašnjih studija aktivnosti adenzin kinaze (AK) u epilepsiji sugerišu da se astrociti ponašaju kao "odvod" adenozina u procesu astroglioze. AK hipoteza epiletogeneze predlaže da se vanćelijski nivo Ado povećava nakon ma kog tipa povrede mozga, što dovodi do astroglioze, što za uzvrat ima prekomernu ekspresiju astrocitne AK i pojačane aktivnosti ovog enzima, čime se smanjuje unutarćelijska koncentracija Ado. Ovo za posledicu ima unos Ado iz vanćelijske sredine, najverovatnije putem ENT, i srazmerno smanjenje nivoa Ado u vanćelijskom prostoru [195, 205, 265, 266]. Stoga bi u budućnosti bilo interesantno istražiti ekspresiju AK u modelima povrede mozga i skarifikacije astrocita, i ispitati u kojoj meri aktivnost ENT utiče na funkciju ovog enzima.

Takođe, naši UPLC rezultati su u skladu sa adenzin kinaznom hipotezom s obzirom na pad Ado 24h nakon povrede koji se podudara sa povećanom ekspresijom ENT1/2 na nivou iRNK. Pored toga, izraženo povećanje ekspresije

ENT1/2 na reaktivnim astrocitima nakon povrede *in vivo* takođe idu u prilog ovoj hipotezi. Ipak, bilo bi neophodno ispitati aktivnost transportera direktnim testom, kako bi se potvrdila hipotetička uloga astrocitnih ENT nakon povrede.

Kako bi smo utvrdili da li transport Ado preko ENT1/2 ima uticaja na njihovu ekspresiju, ispitati smo ekspresiju na nivou iRNK i proteina 4 i 24 h nakon tretmana DPM. Sličan obrazac ekspresije onom nakon tretmana Ado za ENT1 i ENT2 je dobijen 4h nakon primene DPM – ENT1 se smanjio a ENT2 povećao, što je potvrđeno i na nivou proteina FACS analizom. S obzirom na to da je UPLC analiza pokazala da u istoj vremenskoj tački nakon tretmana DPM nema promena u vanćelijskim koncentracijama Ado, ova promena se ne može pripisati Ado. Međutim, mogle bi se pripisati Ino koji nakon tretmana DPM raste a ranije je pokazano da Ino može delovati na adenozijske receptore [94, 108, 109]. Dvadesetčetiri sata kasnije DPM nije imao nikakvog uticaja na ekspresiju ENT1/2 niti na iRNK niti na proteinskom nivou.

Budući da su prethodno navedeni rezultati ukazali na mogućnost regulacije ekspresije ENT preko adenozijskih receptora, ispitana je ekspresija ENT nakon tretmana DPCPX, koji blokira najzastupljeniji adenozijski receptor - A₁ receptor. Ovaj tretman doveo je do značajnog smanjenja ekspresija iRNK za ENT1 i povećanja ekspresija ENT2 na nivou proteina.

Tretmani Ado, DPM i DPCPX najverovatnije utiču na signalizaciju posredovanu adenozijskim receptorima, na šta ukazuje činjenica da izazivaju slične promene u ekspresiji ENT1 i ENT2. Takođe, rezultati ukazuju i na moguće odvojene puteve koji regulišu ekspresiju ENT1 i ENT2.

Naše razumevanje mehanizama koji regulišu ekspresiju ENT relativno je oskudno u poređenju sa znanjem koje posedujemo o njihovoj strukturi i kinetici transporta [267]. Dosadašnji podaci ukazuju na to da je ekspresija nukleozidnih transportera tkivno i ćelijski specifična, te da zavisi i od fiziološkog stanja organizma. Nishodna regulacija i recikliranje su najbolje opisani fenomeni kada je

reč o regulaciji aktivnosti ENT. Studija na hromafinskim ćelijama pokazala je da vezivanje NBTI uzrokuje brzu internalizaciju čak 60% transporternih molekula [268]. Druge studije na retikulocitima sisara pokazale su postojanje citosolnog depoa nukleozidnih transportera [269, 270].

Sem toga, pokazano je da inflamatorni citokini utiču na smanjenje ekspresije nekoliko transportera među kojima je i ENT1 [271, 272], ali nisu ispitivani konkretni signalni putevi.

S obzirom na to da je aktivnost transkripcionog faktora HIF-1 α usko vezana za hipoksične uslove, u nekoliko studija je ispitivano njegovo dejstvo na transkripciju ENT. Revijski članak autora Vangeison i Rempe [273] sažima mali broj broj objavljenih istraživanja o uticaju HIF-1 α na ekspresiju komponenti adenozienskog sistema. HIF-1 α učestvuje u regulaciji različitih proteina, uključujući i negativnu regulaciju ekspresije ENT1 u ćelijama endotela [274]. Sem toga, HIF-1 α -zavisna represija ENT2 je potvrđena u mukozi creva, što bi moglo da vodi povećanju vanćelijskog Ado i smanjenju hipoksijom izazvane inflamacije [275]. Rezultati FACS analize za HIF-1 α prikazani u ovoj studiji su pokazali da se ekspresija ovog transkripcionog faktora ne menja 4 sata nakon skarifikacije ili DPCPX tretmana. Međutim, DPM tretman značajno povećava ekspresiju HIF-1 α . Uzevši u obzir prethodno pomenuto povećanje Ino detektovano UPLC analizom u ćelijskom medijumu nakon istog tretmana, moglo bi se zaključiti da upravo Ino učestvuje u regulaciji HIF-1 α . Ovaj nalaz je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima na PC12 ćelijama, gde je pokazano da tretman Ino nakon hipoksije značajno povećava sadržaj HIF-1 α na nivou proteina [276].

4. Ektonukleotidaze u povredi mozga

4.1. Ekspresija e-5NT nakon povrede mozga *in vivo* i skarifikacije astrocита *in vitro*

e-5NT, lociran na ćelijskoj membrani, poslednji je u nizu ekto-enzima koji razgrađuju ATP, katalizujući konverziju AMP do Ado. Brzina reakcije e-5NT manja je od brzine reakcije ostalih ektonukleotidaza, pa ovaj enzim određuje ukupnu brzinu prevođenja ATP u adenzin. S obzirom na to da aktivnošću e-5NT nastaje Ado koji ispoljava snažne anti-inflamatorne efekte [103, 277], enzim se smatra veoma važnim faktorom kako u održanju homeostaze mozga, tako i u etiologiji brojnih poremećaja CNS [278].

Raniji rad naše grupe detaljno je ispitao funkciju i ekspresiju e-5NT nakon ubodne povrede mozga pacova, i uočio dvofazne promene ekspresije i aktivnosti e-5NT. Ove promene su se ogledale u akutnom smanjenju ekspresije i aktivnosti, praćene ushodnom regulacijom e-5NT koja se održala 2 nedelje nakon TPM [171, 172]. Rezultati naših i studija drugih grupa, ukazuju na to da u patološkim stanjima e-5NT može služiti kao generator Ado [81, 245, 279]. Međutim, postoje i sasvim suprotni rezultati, koji su pokazali da e-5NT nije ključni faktor u regulaciji vanćelijskih nivoa adenzina u fiziološkim ili hipoksičnim uslovima na tkivnim presecima hipokampusu u kulturi [84]. Kontradiktorni rezultati slični ovima usloveli su potrebu da se dodatno razjasne alternativni izvori vanćelijskog Ado i uloga e-5NT.

Ovde izloženi rezultati pokazuju da se profil ekspresije iRNK za e-5NT slaže sa ranije opisanom proteinskom ekspresijom *in vivo* – dva dana posle povrede nivoi iRNK su bliski onima u kontrolnim uzorcima, dok je povećanje ekspresije zabeleženo sedam dana nakon povrede. Ako uzmemo u obzir prethodne imunohistohemijske rezultate kojima smo pokazali porast e-5NT na astrocitima

posle povrede [171], ushodnu regulaciju u genskoj ekspresiji 7 dana nakon povrede možemo pripisati reaktivnim astrocitima.

S obzirom na rezultate prethodnih istraživanja naše grupe, takođe smo želeli da ispitamo eventualnu ko-ekspresiju e-5NT i ENT1, kao i e-5NT i ENT2. Oba transportera u kontrolnim uslovima se zajedno sa e-5NT eksprimiraju na neuronima. Ovo je posebno važno naglasiti, jer je izraženo mišljenje da je distribucija ovog enzima u centralnom nervnom sistemu pretežno vezana za gliju [165, 166, 168] te da je ekspresija e-5NT na kortikalnim neuronima niska [105, 159]. Rezultati Bjelobabe i sar. [171] nedvosmisleno opovrgavaju ove tvrdnje, a ovdašnji rezultati dodatno potvrđuju snažnu ekspresiju e-5NT na neuronima.

Nakon ubodne lezije e-5NT i ENT1/2 se eksprimiraju na brojnim, reaktivnim astrocitima u neposrednoj oblasti ozlede. Ovi rezultati idu u prilog hipotezi da su astrociti glavni regulatori vanćelijskih koncentracija Ado nakon povrede. Takođe ostavljaju mogućnost da se astrociti ponašaju kao generatori ali istovremeno i kao „odvod“ za Ado.

Iako je ushodna regulacija e-5NT višestruko pokazana u nekoliko *in vivo* modela povrede mozga, regulacije ekspresije e-5NT je ostala nepoznata. Rad Briševac i saradnika ispitao je efekte nekoliko pro-inflamatornih faktora, bakterijskog lipopolisahardinog endotoksina (LPS), faktora tumorske nekroze (TNF- α), interferona- γ (IFN- γ), glutamata (Glu) i vodonik prekoksida (H₂O₂), na e-5NT aktivnost, iRNA ekspresiju i zastupljenost membranske forme proteina na astrocitima u kulturi. Rezultati su pokazali da IFN- γ , LPS, Glu i H₂O₂ smanjuju dok TNF- α povećava e-5NT aktivnost [280]. Takođe, analiza genske ekspresije e-5NT i ekspresije na membrani su pokazali da različiti pro-inflamatorni faktori različito utiču na regulaciju e-5NT nivoa verovatno različitim mehanizmima [280]. Ovi rezultati su pokazali da različita ekspresija i funkcija e-5NT na astrocitima zavisi od različitih faza neuroinflamacije i oslikava suštinsku ulogu ovog enzima u regulaciji odgovora na inflamaciju u CNS.

Rezultati naših istraživanja *in vitro* su pokazali da neposredno nakon skarifikacije, 0.5 i 1h, e-5NT je nishodno regulisana na nivou iRNK. Ovaj trend se menja 24 i 48 sata nakon povrede, kada je primećeno značajno povećanje iRNK e-5NT. Ovi rezultati su takođe u skladu sa rezultatima *in vivo* eksperimenata ovog rada, ali i ranijih nalaza naše grupe [171].

Zanimljivi rezultati su dobijeni i pod različitim tretmanima. Naime, nakon tretmana kulture astrocita adenozinom, ekspresija iRNK e-5NT se povećava u oba ispitivana vremena (4 i 24h). Tretman DPM i DPCPX utiče na ushodnu regulaciju iRNK za e-5NT, 24 sata nakon tretmana.

Nekoliko ranijih studija se bavilo pitanjem genske regulacije e-5NT. Promotor e-5NT gena sadrži element aktiviran cAMP (CRE) [281], odnosno DNK motive koji regulišu transkripciju preko cAMP-zavisnog CRE-vezanog proteina (CREB) [282]. Aktivacija Ado preko A2A ili A2B receptora povećava unutarćelijske nivoe cAMP i sledstveno aktivira CREB [283]. Ovo sugerise na mogućnost da je e-5NT regulisan od strane Ado, što je kasnije i potvrđeno u ćelijama endotela [284]. Pored toga, Stefanović i saradnici pokazali su da izlaganje mezangijskih ćelija analogima adenozina stimuliše aktivnost e-5NT preko A2 receptora [285]. Naši rezultati vezani za ekspresiju e-5NT nakon tretmana astrocita, iako se ne bave signalnim putevima direktno, idu u prilog opisanim nalazima.

4.2. Ekspresija odabranih ektonukleotidaza nakon ubodne lezije kore mozga pacova

Studije genske ekspresije ostalih enzima ektonukleotidazne kaskade nakon ubodne povrede kore mozga pacova predstavljaju dopunu prethodno dobijenih rezultata naše grupe. Ranije smo pokazali da hidroliza ATP i ADP ima dvofazan profil, sa padom u prva 24 časa koji prati značajan rast aktivnosti do petnaestog dana nakon povrede [172]. Ovde prikazani rezultati ukazuju da e-NTPD-aza2 možda takođe doprinosi primećenim promenama u hidrolizi nukleotida, bar kada

je u pitanju ATP hidroliza. Shodno ovde prezentovanim rezultatima, transkripti za e-NTPD-azu1 i e-NTPD-azu2 su najzastupljeniji od svih ispitivanih ektonukleotidaza u kori prednjeg mozga pacova. Pored toga, iRNK za e-NTPD-azu2 iskazuje dvofaznu promenu ekspresije, sa prvobitnom značajnom nishodnom regulacijom dva dana posle povrede i zatim izraženom ushodnom regulacijom sedam dana nakon povrede. Treba pomenuti da su vremenske tačke odabrane za ovu studiju odgovaraju početku (dva dana nakon lezije) i vrhuncu astroglioze (sedam dana nakon lezije). Dok je e-NTPD-aza1 povezana sa mikroglijom [145], e-NTPDaza2 je uglavnom pripisivana astrocitima [251], što su rezultati naše studije i potvrdili. Potrebno je primetiti da uvođenje ćelija C6 glioma koje prekomerno ekspimiraju e-NTPD-azu2 drastično povećava veličinu i malignost tumora. Stoga, bilo bi zanimljivo ispitati ulogu e-NTPD-aze2 u astrogliozi različitih patologija CNS-a.

Sa druge strane, ekspresija e-NTPD-aze3 se ne menja sa povredom. Naši prethodni rezultati su takođe pokazali nisku ekspresiju ovog enzima na nivou proteina, koja je ostala nepromenjena nakon povrede [286]. Ovde izloženi rezultati takođe ukazuju na to da e-NTPD-aza3 ne doprinosi promenama u hidrolizi ATP i ADP nakon ubodne povrede mozga kod pacova [172].

U poređenju sa drugim ektonukleotidazama, e-NPP-aze su daleko manje ispitivane u patološkim stanjima i u CNS-u uopšte. Mi smo ispitivali imunohistohemijski distribuciju e-NPP-aze1 u kori mozga pacova, i pokazali da se ovaj enzim mahom ekspimirira na neuronima [287]. Takođe smo pokazali da se na genskom nivou ekspresija e-NPP-aze1 smanjuje sedam dana posle povrede, što bi mogla da bude posledica degeneracije neurona.

Zanimljivo je da se u našem modelu TPM, iRNK za e-NPP-azu2 ne menja posle povrede. Studije rađene nakon povrede hipokampusa kod pacova, u sličnim vremenskim tačkama (2 i 5 dana) su pokazale značajnu ushodnu regulaciju e-NPP-aze2 na nivou proteina u fibroznim astrocitima [153]. Moguće je da su posve

različiti rezultati posledica manjeg sadržaja bele mase u našim uzorcima. Od svih ispitivanih NPP-aza, transkript za e-NPP-azu2 je najzastupljeniji, iako je ranije pokazano da je e-NPPaza2 na proteinskom nivou vrlo slabo eksprimirana i ograničena na IV sloj korteksa [153].

Ranije je pokazano da je transcript e-NPP3 prisutan u tkivu kore prednjeg mozga i na astrocitima tokom razvića [288], ali s obzirom na niske nivoe iRNK koje smo dobili qRT-PCR analizom, možemo zaključiti da E-NPP-aza3 ne doprinosi značajno kontroli vanćeliskih nivoa nukleotida.

Uloga NPP enzima bi mogla biti region-specifična; na primer, e-NPP-aza1 ima najveću aktivnost u malom mozgu, hipotalamusu i hipokampusu [289] dok je distribucija E-NPP-aze2 ograničena na belu masu [153].

5. Ekspresija A₁ receptora nakon *in vivo* i *in vitro* povrede i tretmana

Stimulacija adenozijskih receptora, od kojih su svi prisutni u astrocitima, modulira funkcije astrocita. Posebno je važno naglasiti da aktivacija A₁ receptora vodi smanjenju proliferacije astrocita, pa se smatra da je proliferacija astrocita u fiziološkim uslovima pod toničnom inhibicijom [266].

Rezultati dobijeni *in vivo* su pokazali da je A₁ receptor transkript visoko eksprimiran u kori mozga pacova, što je u skladu sa prethodnim nalazima [290]. A₁ receptor takođe ima i najveći afinitet za adenzin u poređenju sa ostalim podtipovima [236]. A₁ receptor ima protektivne uloge u kontekstu moždane povrede. Na primer, antagonisti A₁ receptora značajno povećavaju ćelijsku smrt u CA1 regionu mišjeg modela ishemije [291].

Naši rezultati ekspresije A₁ receptora na nivou iRNK *in vivo* pokazali su da se ekspresija smanjuje dva dana i da ostaje smanjena sedam dana nakon ubodne lezije. Nishodna regulacija A₁ receptora nakon povrede bi mogla da rezultira smanjenim inhibitornim i protektivnim potencijalom Ado. Kao odgovor na astrogliozu a posebno na hronične epileptične napade, adenozijski sistem trpi

izvesne promene koje potenciraju dalje napade. Nishodna regulacija A_1 receptora je opisana kao posledica hroničnih napada [292, 293]. Takođe kombinacija smanjenja A_1 receptora ekspresije i metaboličkih promena koje vode smanjenim koncentracija Ado su opisani u hipokampusu epileptičnih pacova [294]. Interesantno je da je sličan efekat, odnosno smanjenje ekspresije viđeno i nakon ATP tretmana, iako sama skarifikacija nije imala uticaja na ekspresiju. S obzirom na to da tretman Ado takođe nije imao uticaja na ekspresiju, moglo bi se zaključiti da je ekspresije A_1 receptora regulisana ATP.

Naši rezultati su pokazali da blokiranje A_1 receptora dovodi do smanjenja ekspresije ENT1 na nivou iRNK i povećanja ENT2 i e-5NT na nivou proteina 4 sata nakon tretmana. Ovakav efekat bi se mogao objasniti delovanjem Ado na druge receptore, na primer A_{2A} receptore.

A_{2A} receptor je takođe široko rasprostranjen u mozgu i vezuje adenzin sa visokim afinitetom. U uslovima koji dovode do poremećaja homeostaze izazvanim hipoksijom ili traumom, za razliku od A_1 receptora, A_{2A} receptori su ushodno regulisani [290]. Ushodna regulacija A_{2A} receptora je u vezi sa povećanim nivoima Ado i ovo može biti ključni faktor u indukciji astroglioze nakon ishemije, traumatske povrede mozga i slično. Iako se efekti posredovani A_{2A} receptorom načelno smatraju suprotnim u poređenju sa efektima A_1 , njegova uloga je diskutabilna. Naime, iako postoje podaci da agonist A_{2A} , CGS 21680, smanjuje ishemičnu povredu [295, 296], nekoliko relativno specifičnih antagonista smanjuje ishemičnu povredu u animalnom modelu globalne ili stalne ishemije (Von Lubity 1995). Posebno je važan podatak dobijen iz eksperimenta sa A_{2A} nokaut miševima koji su pokazali smanjenje efekata nakon moždanog udara u modelu fokalne cerebralne ishemije [297].

Nedavno su dobijeni podaci da u mozgu [298] i u plućima [299], postoji jasna sprega između A_{2A} receptora i ENT aktivnosti. Ovi radovi ukazuju na to da A_{2A} receptor podstiče aktivnost ENT što vodi smanjenju vanćelijskog Ado. Dalje,

ukazano je i na vezu između aktivacije A_{2A} i e-5NT; primećeno je paralelno povećanje aktivnosti e-5NT i gustine A_{2A} receptora i u fiziološkim [19] i u patološkim stanjima [294, 300]. U različitim modelima je pokazano da patološki stimulusi kao što je hipoksija takođe uzrokuju paralelnu ushodnu regulaciju e-5NT i A_{2A} [301–303], ističući povezanost ova dva proteina.

Uzevši u obzir iznad izloženo i rezultate ekspresije ENT1, ENT2 i e-5NT nakon tretmana DPCPX, trebalo bi ispitati ulogu A_{2A} u regulaciji ekspresije ovih komponenti adenzinskog sistema.

6. Uticaj hemijski izazvane hipoksije kobalt-hloridom na aktivnosti komponenti adenzinskog signalnog sistema

Iako patologije CNS-a kao što su TPM i ishemija imaju dosta sličnosti, treba uzeti u obzir da se povrede međusobno mogu prilično razlikovati, posebno u zavisnosti od njihove težine i mehanizama koji ih odlikuju. Slično se može kazati i za *in vitro* povrede astrocita.

Kako bismo uporedili rezultate dobijene skarifikacijom astrocita sa modelom hipoksije *in vitro*, hemijski smo indukovanu hipoksiju kobalt-hloridom ($CoCl_2$). $CoCl_2$ aktivira hipoksiju, i time specifične signalne puteve i transkripcione faktore [304–306]. Ranije je opisano da se $CoCl_2$ aktivira signalizaciju posredovanu HRE (engl. *hypoxia response element*) promotorom i aktivira HIF-1 α [121]. Pored toga, pokazano je ne samo da $CoCl_2$ indukuje ekspresiju HIF-1 α već i njegovu stabilizaciju [307–310]. Ovo je potvrđeno i kod astrocita u kulturi, gde $CoCl_2$ indukuje ushodnu regulaciju HIF-1 α [271]. Zbog svega navedenog tretman $CoCl_2$ se smatra adekvatnim modelom hipoksije, jer ima dosta sličnosti sa pravom hipoksijom [311].

$CoCl_2$ nije izazvao smrt ćelija četiri sata nakon tretmana, pa su svi dobijeni rezultati posmatrani kao efekat hipoksije, a ne kao posledica citotoksičnosti $CoCl_2$.

U skladu sa prethodnim nalazima, FACS analizom je potvrđeno značajno povećanje HIF--1 α nakon tretmana CoCl₂.

FACS analiza je pokazala da CoCl₂ nije doveo do promene ekspresije ENT1, ali zato je značajno povećao ekspresiju ENT2 i e-5NT. Sa druge strane, posledice skarifikacije u istoj vremenskoj tački nisu uticale na promene iRNK ili proteinske ekspresije ENT1/2, ili e-5NT.

Iako je ranije objavljivano da HIF--1 α utiče na nishodnu regulaciju ENT1 i ENT2 [274, 275], naši rezultati nisu to pokazali. U oba modela povrede astrocita, SW i CoCl₂, mi nismo utvrdili vezu između ekspresije HIF--1 α i ENT1/ENT2 koja bi ukazivala na represiju ekspresije ovih transportera. Pored toga, u oba modela povrede kao i pod različitim tretmanima, rezultati idu u prilog hipotezi da su ENT1 i ENT2 regulisani različitim signalnim putevima. Sa druge strane, istovremeno povećanje e-5NT bi moglo zavisiti od povećanja HIF--1 α , za koji je ranije pokazano da utiče na ushodnu regulaciju enzima [284].

Budući da skarifikacija dovodi do malog povećanja vanćelijskih koncentracija Ado, hteli smo da proverimo isti parametar nakon tretmana CoCl₂. Četiri sata nakon izlaganja astrocita CoCl₂, u medijumu je detektovan značajan porast koncentracije Ado. Raniji nalazi su ukazali da hipoksija u trajanju od dva sata ne dovodi do promene vanćelijskih koncentracija Ado u kulturi astrocita [242]. Međutim jedna ranija studija je uspela da detektuje Ado oslablađanje od astrocita u hipoksičnim uslovima, koji su okarakterisani kao vid teže ili intenzivnije hipoksije [312]. Astrociti sadrže velike količine glikogena i mogu preživeti duže vreme, i stoga manje zavise od nedostatka glukoze ili ATP [313, 314]. Fujita u svom radu ističe da se dva sata hipoksije smatraju „srednje teškom“ hipoksijom.

Iznenadjući je rezultat UPLC analize medijuma koji pokazuje da se pored Ado povećala koncentracija X, ali ne i Ino i HX. S obzirom na to da su Ino i HX intermedijarne forme koje prethode X, ovaj nalaz ukazuje na povećanu aktivnost enzima PNP i XO, koji konvertuju Ino do HX, odnosno, HX do X, mahom od strane

astrociti [83, 315]. Hipoksantin se koristi u spasonosnom putu katalitičkom aktivnošću HGPRT u ili se razgrađuje aktivnošću XO, kojom nastaje X. *In vitro* studije su pokazale da neuroprotektivni efekat Ino zavisi od njegove dostupnosti tj. od aktivnosti PNP [244, 316]. Takođe, ranije je pokazano da se aktivnost XO povećava nakon TPM [317], i povećava nivo X na račun HX. Ipak, da bi se doneo bilo kakav zaključak bilo bi neophodno ispitati aktivnosti PNP i XO u kulturi astrociti izloženoj hemijskoj hipoksiji.

U poređenju sa rezultatima dobijenim 4 sata nakon skarifikacije, hipoksija izazvana CoCl_2 je sasvim drugačije uticala na ekspresiju ENT2 i e-5NT, kao i HIF-1 α ; sem toga povećanje vanćelijske koncentracije Ado je bilo daleko veće nego nakon skarifikacije u istoj vremenskoj tački. Ovi rezultati nedvosmisleno pokazuju da, iako po mnogo čemu slične, mehanička i hipoksična povreda mogu biti prilično različite i samim tim iziskivati drugačije terapijske pristupe kada je u pitanju adenozijski sistem.

VI Zaključci

U skladu sa zadatim ciljevima ove doktorske teze i dobijenim rezultatima izvedeni su sledeći zaključci:

1. Traumatska povreda mozga u primenjenom modelu jednostrane ubodne lezije moždane kore dovodi do:
 - a. Smanjenja ekspresije ENT1, ENT2 i e-5NT na nervnim ćelijama, kao i do povećanja ekspresije istih transportera i enzima na reaktivnim astrocitima u blizini mesta lezije.
 - b. Povećanja ekspresije e-NTPD-aze1, prolaznog smanjenja i naknadnog povećanja ekspresije e-NTPDaze2, kao i do smanjenja ekspresije e-NPPaze1.
 - c. Smanjenja ekspresije najzastupljenijeg adenozienskog receptora A₁.

2. U modelu skarifikacije astrocitnog jednosloja uočeno je da mehanička povreda dovodi do:
 - a. Povećanja ekspresije ENT1 i ENT2, 24 sata nakon skarifikacije.
 - b. Bifazne promene ekspresije e-5NT, u vidu smanjenja ekspresije neposredno nakon povrede i znatne ushodne regulacije 24 časa nakon skarifikacije.
 - c. Nepromenjene ekspresije A₁ receptora.

3. Tretmani Ado, ATP, DPM ili DPCPX astrocitnog jednosloja uticali su na ekspresiju ispitivanih komponenti adenozienskog sistema na sledeći način:
 - a. Ado, DPM i DPCPX, nakon četiri sata smanjuju ekspresiju iRNK za ENT1, dok je samo je tretman DPM imao isti efekat i na nivou ENT1 proteina. Tretman Ado i ATP nakon 24 sata značajno povećavaju ekspresiju ENT1.

- b. Četiri sata nakon tretmana Ado i DPM, ekspresija iRNK za ENT2 se značajno povećala, dok su četvoročasovni tretmani DPM i DPCPX uticali na povećanje ekspresije ENT2 na nivou proteina. Ado i ATP ushodno regulišu ENT2 transkript 24 sata nakon tretmana.
 - c. Tretmani Ado i DPCPX su povećali količinu transkripta za e-5NT u obe ispitivane vremenske tačke, dok je tretman DPM imao isti efekat samo 4 sata nakon povrede. Suprotni efekti se uočavaju na nivou proteina: povećanje ekspresije pod četvoročasovnim tretmanom DPM i DPCPX, i smanjenje 24 sata kasnije.
 - d. Četiri sata nakon blokiranja ENT1/2, povećava se ekspresija transkripcionog faktora HIF-1 α .
 - e. iRNK za A₁ receptor se smanjuje pod dejstvom ATP tretmana.
4. Skarifikacija ili tretmani su na sledeći način uticali na koncentracije Ado, Ino, HX i X u ćelijskom medijumu:
- a. Skarifikacija astrocitnog jednosloja povećava koncentracije Ado u ćelijskom medijumu 4 sata nakon povrede, dok se smanjenje detektuje se 24 sata kasnije. Samo je blokiranje A₁ receptora uticalo na smanjenje Ado nakon 24 sata. Takođe, blokiranje ENT1/2 u kombinaciji sa skarifikacijom je uticalo na smanjenje koncentracije Ado nakon 4 h.
 - b. U svim ispitivanim vremenima, skarifikacija uz blokiranje A₁ receptora dovodi do smanjenja koncentracija Ino. Blokiranje transporta putem ENT1/2 povećava, a u kombinaciji sa skarifikacijom smanjuje vanćelijske koncentracije Ino nakon 4 sata.
 - c. Zabeležen je pad u koncentraciji HX 8 sati nakon skarifikacije. DPM je takođe smanjio koncentracije HX nakon 24h, kao i nakon 4 sata u kombinaciji sa skarifikacijom.
 - d. Koncentracije X su se smanjila 8 i 24 sata nakon skarifikacije. Blokiranje ENT1/2 i A₁ receptora je imalo sličan učinak nakon 4 sata, dok ostali tretmani nisu uticali na koncentracije X.

5. Hemijski izazvana hipoksija nakon četvoročasovnog CoCl_2 tretmana astrocita dovodi do:
- a. Povećanja nivoa proteina za ENT2, e-5NT i HIF-1 α .
 - b. Povećanja koncentracija Ado i X u ćelijskom medijumu, dok su koncentracije Ino i HX ostale nepromenjene.

Na osnovu izloženih rezultata i izvedenih zaključaka može se izvesti generalni zaključak:

Traumatska povreda mozga uzrokuje promene u ekspresiji i ćelijskoj distribuciji ENT, promene u ekspresiji ispitivanih ektonukleotidaza i A_1 receptora. Veliki broj ovih događaja se dešava u astrocitima, čineći ih važnim u orkestraciji komponenti adenozienskog sistema nakon povrede i samim tim ćelijama koje u velikoj meri određuju dostupnost adenzina. Astrociti regulišu koncentracije adenzina dvojako, što verovatno zavisi od toka reaktivne astroglioze i samim tim promena u ekspresiji komponenti adenozienskog sistema, kao što su ENT i ektonukleotidaze. Neposredno nakon povrede koncentracije adenzina se povećavaju, verovatno kao posledica neposredne mehaničke ozlede ćelija i aktivnosti ektonukleotidaza. U kasnijim vremenima reaktivni astrociti pre služe kao odvod adenzina, najverovatnije putem ENT, smanjujući njegovu dostupnost u vanćelijskom miljeu i negativno utičući na oporavak.

Imajući u vidu neuroprotektivne uloge adenzina u patološkim uslovima, kao i činjenicu da od aktivnosti svih ovih komponenti zavisi njegova dostupnost u vanćelijskom prostoru, jasno je da ovi rezultati mogu pružiti korisne informacije o potencijalnim farmaceutskim metama budućih tretmana traumatske povrede mozga.

VII Literatura

1. Burnstock G: **Purinergetic nerves.** *Pharmacological reviews* 1972, **24**:509–81.
2. Burnstock G: **Do some nerve cells release more than one transmitter?** *Neuroscience* 1976, **1**:239–48.
3. Burnstock G: **Discovery of purinergetic signalling, the initial resistance and current explosion of interest.** *British journal of pharmacology* 2012, **167**:238–55.
4. Burnstock G: **Purinergetic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future.** *BioEssays news and reviews in molecular cellular and developmental biology* 2012, **34**:218–25.
5. Burnstock G, Verkhratsky a: **Evolutionary origins of the purinergetic signalling system.** *Acta physiologica (Oxford, England)* 2009, **195**:415–47.
6. Burnstock G, Krugel U, Abbracchio MP, Illes P, Krügel U: **Purinergetic signalling: From normal behaviour to pathological brain function.** *Progress in neurobiology* 2011, **95**:229–274.
7. Baines CP, Cohen M V, Downey JM: **Signal transduction in ischemic preconditioning: the role of kinases and mitochondrial K(ATP) channels.** *Journal of cardiovascular electrophysiology* 1999, **10**:741–54.
8. Fredholm BB: **Purinoceptors in the nervous system.** *Pharmacology & toxicology* 1995, **76**:228–39.
9. Fredholm BB: **Adenosine and neuroprotection.** *International review of neurobiology* 1997, **40**:259–80.
10. Sebastião AM, Ribeiro JA: **Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system.** *Progress in neurobiology* 1996, **48**:167–89.
11. Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB: **Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors.** *Progress in neurobiology* 1999, **59**:355–96.

12. Haas HL, Selbach O: **Functions of neuronal adenosine receptors.** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2000, **362**:375–81.
13. Sawynok J: **Adenosine receptor activation and nociception.** *European journal of pharmacology* 1998, **347**:1–11.
14. Roman RM, Fitz JG: **Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function.** *Gastroenterology* 1999, **116**:964–79.
15. Cronstein BN: **Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent.** *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 1994, **76**:5–13.
16. Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A: **Participation of adenosine receptors in neuroprotection.** *Drug news & perspectives* 2003, **16**:80–6.
17. Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB: **Adenosine and brain ischemia.** *Cerebrovascular And Brain Metabolism Reviews* 1992, **4**:346–369.
18. Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S, Sandberg M: **Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia.** *Journal of Neurochemistry* 1987, **49**:227–231.
19. Cunha RA: **Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors.** *Neurochemistry international* 2001, **38**:107–25.
20. Sebastião AM, Ribeiro JA: **Adenosine receptors and the central nervous system.** *Handbook of experimental pharmacology* 2009:471–534.
21. Burnstock G: **Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission.** *Physiological reviews* 2007, **87**:659–797.
22. Bucheimer RE, Linden J: **Purinergic regulation of epithelial transport.** *The Journal of Physiology* 2004, **555**:311–321.
23. Londos C, Cooper DM, Wolff J: **Subclasses of external adenosine receptors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980, **77**:2551–4.

24. Van Calker D, Müller M, Hamprecht B: **Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells.** *Journal of neurochemistry* 1979, **33**:999–1005.
25. Biber K, Lubrich B, Fiebich BL, Boddeke HW, van Calker D: **Interleukin-6 enhances expression of adenosine A(1) receptor mRNA and signaling in cultured rat cortical astrocytes and brain slices.** *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2001, **24**:86–96.
26. Gebicke-Haerter PJ, Christoffel F, Timmer J, Northoff H, Berger M, Van Calker D: **Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation.** *Neurochemistry international* 1996, **29**:37–42.
27. Othman T, Yan H, Rivkees SA: **Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration.** *Glia* 2003, **44**:166–72.
28. Linden J: **Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection.** *Annual review of pharmacology and toxicology* 2001, **41**:775–87.
29. Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB: **Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia.** *Trends in pharmacological sciences* 1992, **13**:439–45.
30. Bischofberger N, Jacobson KA, von Lubitz DK: **Adenosine A1 receptor agonists as clinically viable agents for treatment of ischemic brain disorders.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1997, **825**:23–9.
31. Fredholm BB, Chen J, Cunha RA, Svenningsson P: **ADENOSINE AND BRAIN FUNCTION.** 2005, **63**.
32. Dixon AK, Gubitz AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC: **Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat.** *British journal of pharmacology* 1996, **118**:1461–8.
33. Peterfreund RA, MacCollin M, Gusella J, Fink JS: **Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene.** *Journal of neurochemistry* 1996, **66**:362–8.
34. Jarvis MF, Schulz R, Hutchison AJ, Do UH, Sills MA, Williams M: **[3H]CGS 21680, a selective A2 adenosine receptor agonist directly labels A2 receptors in rat brain.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1989, **251**:888–93.

35. Stella SL, Bryson EJ, Thoreson WB: **A2 adenosine receptors inhibit calcium influx through L-type calcium channels in rod photoreceptors of the salamander retina.** *Journal of neurophysiology* 2002, **87**:351–60.
36. Nash JE, Brotchie JM: **A common signaling pathway for striatal NMDA and adenosine A2a receptors: implications for the treatment of Parkinson's disease.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000, **20**:7782–9.
37. Nörenberg W, Wirkner K, Assmann H, Richter M, Illes P: **Adenosine A2A receptors inhibit the conductance of NMDA receptor channels in rat neostriatal neurons.** *Amino acids* 1998, **14**:33–9.
38. Gao Y, Phillis JW: **CGS 15943, an adenosine A2 receptor antagonist, reduces cerebral ischemic injury in the Mongolian gerbil.** *Life sciences* 1994, **55**:PL61–5.
39. Feoktistov I, Murray JJ, Biaggioni I: **Positive modulation of intracellular Ca²⁺ levels by adenosine A2b receptors, prostacyclin, and prostaglandin E1 via a cholera toxin-sensitive mechanism in human erythroleukemia cells.** *Molecular pharmacology* 1994, **45**:1160–7.
40. Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, Moyses E, Chédotal A, Mehlen P: **Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor.** *Nature* 2000, **407**:747–50.
41. Linden J, Taylor HE, Robeva AS, Tucker AL, Stehle JH, Rivkees SA, Fink JS, Reppert SM: **Molecular cloning and functional expression of a sheep A3 adenosine receptor with widespread tissue distribution.** *Molecular pharmacology* 1993, **44**:524–32.
42. Salvatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, Linden J, Johnson RG: **Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**:10365–9.
43. Jacobson KA: **Adenosine A3 receptors: novel ligands and paradoxical effects.** *Trends in pharmacological sciences* 1998, **19**:184–91.
44. Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Schulte G: **Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells.** *Biochemical pharmacology* 2001, **61**:443–8.

45. Fabian M, Palmer G: **The interaction of cytochrome oxidase with hydrogen peroxide: the relationship of compounds P and F.** *Biochemistry* 1995, **34**:13802–10.
46. Dunwiddie T V, Diao L, Kim HO, Jiang JL, Jacobson KA: **Activation of hippocampal adenosine A3 receptors produces a desensitization of A1 receptor-mediated responses in rat hippocampus.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1997, **17**:607–14.
47. Von Lubitz DK: **Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept?** *European Journal of Pharmacology* 1999, **365**:9–25.
48. Chen G-J, Harvey BK, Shen H, Chou J, Victor A, Wang Y: **Activation of adenosine A3 receptors reduces ischemic brain injury in rodents.** *Journal of neuroscience research* 2006, **84**:1848–55.
49. Appel E, Kazimirsky G, Ashkenazi E, Kim SG, Jacobson KA, Brodie C: **Roles of BCL-2 and caspase 3 in the adenosine A3 receptor-induced apoptosis.** *Journal of molecular neuroscience : MN* 2001, **17**:285–92.
50. Von Lubitz DK, Lin RC, Popik P, Carter MF, Jacobson KA: **Adenosine A3 receptor stimulation and cerebral ischemia.** *European journal of pharmacology* 1994, **263**:59–67.
51. Latini S, Corsi C, Pedata F, Pepeu G: **The source of brain adenosine outflow during ischemia and electrical stimulation.** *Neurochemistry international* 1996, **28**:113–8.
52. King AE, Ackley M a, Cass CE, Young JD, Baldwin S a: **Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets.** *Trends in pharmacological sciences* 2006, **27**:416–25.
53. Zhang D, Xiong W, Albeni BC, Parkinson FE: **Expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mouse neurons regulates adenosine levels in physiological and hypoxic-ischemic conditions.** *Journal of neurochemistry* 2011, **118**:4–11.
54. Zimmermann H: **Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2000, **362**:299–309.
55. Griffiths M, Beaumont N, Yao SY, Sundaram M, Boumah CE, Davies A, Kwong FY, Coe I, Cass CE, Young JD, Baldwin SA: **Cloning of a human nucleoside**

transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nature medicine* 1997, **3**:89–93.

56. Griffiths M, Yao SY, Abidi F, Phillips SE, Cass CE, Young JD, Baldwin SA: **Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta.** *The Biochemical journal* 1997, **328** (Pt 3:739–43.

57. Baldwin SA, Yao SYM, Hyde RJ, Ng AML, Foppolo S, Barnes K, Ritzel MWL, Cass CE, Young JD: **Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**:15880–7.

58. Barnes K, Dobrzynski H, Foppolo S, Beal PR, Ismat F, Scullion ER, Sun L, Tellez J, Ritzel MWL, Claycomb WC, Cass CE, Young JD, Billeter-Clark R, Boyett MR, Baldwin SA: **Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH.** *Circulation research* 2006, **99**:510–9.

59. Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD: **Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development.** *Molecular medicine today* 1999, **5**:216–24.

60. Young JD, Yao SYM, Sun L, Cass CE, Baldwin SA: **Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins.** 2008.

61. Huang M, Wang Y, Cogut SB, Mitchell BS, Graves LM: **Inhibition of nucleoside transport by protein kinase inhibitors.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2003, **304**:753–60.

62. Mani RS, Hammond JR, Marjan JM, Graham KA, Young JD, Baldwin SA, Cass CE: **Demonstration of equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and hENT2) in nuclear envelopes of cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells by functional reconstitution in proteoliposomes.** *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**:30818–25.

63. Ward JL, Serali A, Mo ZP, Tse CM: **Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for i.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**:8375–81.

64. Endres CJ, Moss AM, Ke B, Govindarajan R, Choi D-S, Messing RO, Unadkat JD: **The role of the equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in transport and metabolism of ribavirin by human and wild-type or Ent1-/- mouse erythrocytes.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2009, **329**:387–98.
65. Lee E-W, Lai Y, Zhang H, Unadkat JD: **Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine.** *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**:16700–6.
66. Jennings LL, Hao C, Cabrita M a, Vickers MF, Baldwin S a, Young JD, Cass CE: **Distinct regional distribution of human equilibrative nucleoside transporter proteins 1 and 2 (hENT1 and hENT2) in the central nervous system.** *Neuropharmacology* 2001, **40**:722–31.
67. Yao SYM, Ng AML, Vickers MF, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA, Young JD: **Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**:24938–48.
68. Yao SY, Ng AM, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA, Young JD: **Transport of antiviral 3'-deoxy-nucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive (ENT2) nucleoside transporter proteins produced in Xenopus oocytes.** *Molecular membrane biology* 2001, **18**:161–7.
69. Nagai K, Nagasawa K, Fujimoto S: **Transport mechanisms for adenosine and uridine in primary-cultured rat cortical neurons and astrocytes.** *Biochemical and biophysical research communications* 2005, **334**:1343–50.
70. Crawford CR, Patel DH, Naeve C, Belt JA: **Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line.** *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**:5288–93.
71. Alanko L, Porkka-Heiskanen T, Soynila S: **Localization of equilibrative nucleoside transporters in the rat brain.** *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2006, **31**:162–168.

72. Pisoni RL, Thoene JG: **Detection and characterization of a nucleoside transport system in human fibroblast lysosomes.** *The Journal of biological chemistry* 1989, **264**:4850–6.
73. Cattano D, Williamson P, Fukui K, Avidan M, Evers AS, Olney JW, Young C: **Potential of xenon to induce or to protect against neuroapoptosis in the developing mouse brain.** *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie* 2008, **55**:429–36.
74. Govindarajan R, Endres CJ, Whittington D, LeCluyse E, Pastor-Anglada M, Tse C-M, Unadkat JD: **Expression and hepatobiliary transport characteristics of the concentrative and equilibrative nucleoside transporters in sandwich-cultured human hepatocytes.** *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2008, **295**:G570–80.
75. Sandoval I V, Martinez-Arca S, Valdueza J, Palacios S, Holman GD: **Distinct reading of different structural determinants modulates the dileucine-mediated transport steps of the lysosomal membrane protein LIMP2 and the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**:39874–85.
76. Lu H, Chen C, Klaassen C, Al LUET: **TISSUE DISTRIBUTION OF CONCENTRATIVE AND EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTERS IN MALE AND FEMALE RATS AND MICE.** 2004, **32**:1455–1461.
77. Zhou M, Xia L, Engel K, Wang J: **Molecular determinants of substrate selectivity of a novel organic cation transporter (PMAT) in the SLC29 family.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**:3188–95.
78. Dahlin A, Xia L, Kong W, Hevner R, Wang J: **Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain.** *Neuroscience* 2007, **146**:1193–211.
79. Baldwin S a, Beal PR, Yao SYM, King AE, Cass CE, Young JD: **The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29.** *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 2004, **447**:735–43.
80. Peng L, Huang R, Yu ACH, Fung KY, Rathbone MP, Hertz L: **Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes.** *Glia* 2005, **52**:25–35.

81. Parkinson FE, Xiong W, Zamzow CR: **Astrocytes and neurons: different roles in regulating adenosine levels.** *Neurological Research* 2005, **27**:153–160.
82. Chu S, Xiong W, Zhang D, Soylu H, Sun C, Albeni BC, Parkinson FE: **Regulation of adenosine levels during cerebral ischemia.** *Acta pharmacologica Sinica* 2013, **34**:60–6.
83. Zamzow CR, Xiong W, Parkinson FE: **Adenosine produced by neurons is metabolized to hypoxanthine by astrocytes.** *Journal of neuroscience research* 2008, **86**:3447–55.
84. Zhang D, Xiong W, Chu S, Sun C, Albeni BC, Parkinson FE: **Inhibition of hippocampal synaptic activity by ATP, hypoxia or oxygen-glucose deprivation does not require CD73.** *PLoS one* 2012, **7**:e39772.
85. Ritzel MW, Yao SY, Ng AM, Mackey JR, Cass CE, Young JD: **Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine.** *Molecular membrane biology* 1998, **15**:203–11.
86. Smith KM, Ng AML, Yao SYM, Labeledz KA, Knaus EE, Wiebe LI, Cass CE, Baldwin SA, Chen X-Z, Karpinski E, Young JD: **Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes.** *The Journal of physiology* 2004, **558**:807–23.
87. Smith KM, Slugoski MD, Loewen SK, Ng AML, Yao SYM, Chen X-Z, Karpinski E, Cass CE, Baldwin SA, Young JD: **The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**:25436–49.
88. Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Ritzel RG, Mowles DA, Carpenter P, Chen XZ, Karpinski E, Hyde RJ, Baldwin SA, Cass CE, Young JD: **Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib).** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**:2914–27.
89. Larráyoz IM, Casado FJ, Pastor-Anglada M, Lostao MP: **Electrophysiological characterization of the human Na⁽⁺⁾/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**:8999–9007.

90. Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Hyde RJ, Karpinski E, Cass CE, Baldwin SA, Young JD: **Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides** (s. *Molecular membrane biology* 2001, **18**:65–72.
91. Wang J, Schaner ME, Thomassen S, Su SF, Piquette-Miller M, Giacomini KM: **Functional and molecular characteristics of Na(+)-dependent nucleoside transporters.** *Pharmaceutical Research* 1997, **14**:1524–1532.
92. Mackey JR, Galmarini CM, Graham KA, Joy AA, Delmer A, Dabbagh L, Glubrecht D, Jewell LD, Lai R, Lang T, Hanson J, Young JD, Merle-Béral H, Binet JL, Cass CE, Dumontet C: **Quantitative analysis of nucleoside transporter and metabolism gene expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): identification of fludarabine-sensitive and -insensitive populations.** *Blood* 2005, **105**:767–74.
93. Anderson CM, Xiong W, Young JD, Cass CE, Parkinson FE: **Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain.** *Brain research. Molecular brain research* 1996, **42**:358–61.
94. Guillén-Gómez E, Calbet M, Casado J, De Lecea L, Soriano E, Pastor-Anglada M, Burgaya F: **Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats.** *Journal of Neurochemistry* 2004, **90**:883–893.
95. Palella TD, Andres CM, Fox IH: **Human placental adenosine kinase. Kinetic mechanism and inhibition.** *The Journal of biological chemistry* 1980, **255**:5264–9.
96. Lindberg B, Klenow H, Hansen K: **Some properties of partially purified mammalian adenosine kinase.** *The Journal of biological chemistry* 1967, **242**:350–6.
97. Yamada H, Fredette B, Hagihara K, Miura R, Ranscht B, Stallcup WB, Yamaguchi Y: **with Astrocytes Ensheathing Cerebellar Glomeruli and Inhibits Neurite Outgrowth from Granule Neurons.** 1997, **17**:7784–7795.
98. Geiger JD, Nagy JI: **Distribution of adenosine deaminase activity in rat brain and spinal cord.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1986, **6**:2707–14.

99. Parkinson FE, Xiong W: **Stimulus- and cell-type-specific release of purines in cultured rat forebrain astrocytes and neurons.** *Journal of neurochemistry* 2004, **88**:1305-12.
100. Ceballos G, Tuttle JB, Rubio R: **Differential distribution of purine metabolizing enzymes between glia and neurons.** *Journal of neurochemistry* 1994, **62**:1144-53.
101. Hirschhorn R, Ratech H: **Isozymes of adenosine deaminase.** *Isozymes* 1980, **4**:131-57.
102. Ratech H, Thorbecke GJ, Meredith G, Hirschhorn R: **Comparison and possible homology of isozymes of adenosine deaminase in Aves and humans.** *Enzyme* 1981, **26**:74-84.
103. Haskó G, Sitkovsky M V, Szabó C: **Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine.** *Trends in pharmacological sciences* 2004, **25**:152-7.
104. Deussen A: **Quantitative integration of different sites of adenosine metabolism in the heart.** *Annals of biomedical engineering* 2000, **28**:877-83.
105. Parkinson FE, Ferguson J, Zamzow CR, Xiong W: **Gene Expression for Enzymes and Transporters Involved in Regulating Adenosine and Inosine Levels in Rat Forebrain Neurons , Astrocytes and C6 Glioma Cells.** 2006, **808**:801-808.
106. Pastor-Anglada M, Casado FJ, Valdés R, Mata J, García-Manteiga J, Molina M: **Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells.** *Molecular membrane biology* 2001, **18**:81-5.
107. Ralevic V, Burnstock G: **Receptors for purines and pyrimidines.** *Pharmacological reviews* 1998, **50**:413-92.
108. Fenster MS, Shepherd RK, Linden J, Duling BR: **Activation of adenosine A2 alpha receptors inhibits mast cell degranulation and mast cell-dependent vasoconstriction.** *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 2000, **7**:129-35.
109. Jin X, Shepherd RK, Duling BR, Linden J: **Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation.** *The Journal of clinical investigation* 1997, **100**:2849-57.

110. Gomez G, Sitkovsky M V: **Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo.** *Blood* 2003, **102**:4472-8.
111. Haun SE, Segeleon JE, Trapp VL, Clotz M a, Horrocks L a: **Inosine mediates the protective effect of adenosine in rat astrocyte cultures subjected to combined glucose-oxygen deprivation.** *Journal of neurochemistry* 1996, **67**:2051-9.
112. Benowitz LI, Goldberg DE, Madsen JR, Soni D, Irwin N: **Inosine stimulates extensive axon collateral growth in the rat corticospinal tract after injury.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**:13486-13490.
113. Spitsin S, Hooper DC, Leist T, Streletz LJ, Mikheeva T, Koprowski H: **Inactivation of peroxynitrite in multiple sclerosis patients after oral administration of inosine may suggest possible approaches to therapy of the disease.** *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 2001, **7**:313-9.
114. Cheng Y, Jiang DH: **[Therapeutic effect of inosine in Tourette syndrome and its possible mechanism of action].** *Zhonghua shen jing jing shen ke za zhi = Chinese journal of neurology and psychiatry* 1990, **23**:90-3, 126-7.
115. Hällgren R, Niklasson F, Terent A, Akerblom A, Widerlöv E: **Oxypurines in cerebrospinal fluid as indices of disturbed brain metabolism. A clinical study of ischemic brain diseases.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* , **14**:382-8.
116. Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D: **ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system.** *Nature* 1992, **359**:144-7.
117. Holton FA, HOLTON P: **The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings.** *The Journal of physiology* 1954, **126**:124-40.
118. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A: **Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut.** *British journal of pharmacology* 1970, **40**:668-88.
119. Kogure K, Alonso OF: **A pictorial representation of endogenous brain ATP by a bioluminescent method.** *Brain research* 1978, **154**:273-84.

120. Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C: **Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture.** *J Biol Chem* 2003, **278**:1354–1362.
121. Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu X, Duan S: **Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis.** *Nature Cell Biology* 2007, **9**:945–953.
122. Richardson PJ, Brown SJ: **ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals.** *Journal of neurochemistry* 1987, **48**:622–30.
123. White T, Potter P, Wonnacott S: **Depolarisation-induced release of ATP from cortical synaptosomes is not associated with acetylcholine release.** *Journal of neurochemistry* 1980, **34**:1109–12.
124. Perez MT, Bruun A: **Colocalization of (3H)-adenosine accumulation and GABA immunoreactivity in the chicken and rabbit retinas.** *Histochemistry* 1987, **87**:413–7.
125. Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA: **Vesicular release of ATP at central synapses.** *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 2006, **452**:589–97.
126. Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC: **Connexin and pannexin mediated cell-cell communication.** *Neuron glia biology* 2007, **3**:199–208.
127. Drury AN, Szent-Györgyi A: **The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart.** *The Journal of physiology* 1929, **68**:213–37.
128. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H: **Purinergic signalling in the nervous system: an overview.** *Trends in neurosciences* 2009, **32**:19–29.
129. North RA, Verkhratsky A: **Purinergic transmission in the central nervous system.** *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 2006, **452**:479–85.
130. Zimmermann H: **Ectonucleotidases in the nervous system.** *Novartis Foundation symposium* 2006, **276**:113–28; discussion 128–30, 233–7, 275–81.
131. Nicke A, Bäumer HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G: **P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels.** *The EMBO journal* 1998, **17**:3016–28.

132. North RA: **Molecular physiology of P2X receptors.** *Physiological reviews* 2002, **82**:1013–67.
133. Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O, Verkhratsky A: **P2X receptor-mediated excitatory synaptic currents in somatosensory cortex.** *Molecular and cellular neurosciences* 2003, **24**:842–9.
134. Pankratov Y, Lalo U, Krishtal OA, Verkhratsky A: **P2X receptors and synaptic plasticity.** *Neuroscience* 2009, **158**:137–48.
135. Sperlágh B, Heinrich A, Csölle C: **P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update.** *Purinergic signalling* 2007, **3**:269–84.
136. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J-M, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA: **International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy.** *Pharmacological reviews* 2006, **58**:281–341.
137. Verkhratsky A, Verkhratsky A, Krishtal OA, Burnstock G: **Purinoceptors on neuroglia.** *Molecular neurobiology* 2009, **39**:190–208.
138. Ciana P, Fumagalli M, Trincavelli ML, Verderio C, Rosa P, Lecca D, Ferrario S, Parravicini C, Capra V, Gelosa P, Guerrini U, Belcredito S, Cimino M, Sironi L, Tremoli E, Rovati GE, Martini C, Abbracchio MP: **The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor.** *The EMBO journal* 2006, **25**:4615–27.
139. Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, Schäfer R, Kassack M, Stricker R, Reiser G: **Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor.** *The Biochemical journal* 2008, **409**:107–16.
140. Fischer W, Krügel U: **P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain.** *Current medicinal chemistry* 2007, **14**:2429–55.
141. Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA: **P2 receptors: intracellular signaling.** *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 2006, **452**:552–62.
142. Arthur DB, Akassoglou K, Insel PA: **P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**:19138–43.

143. Zimmermann H: **Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system.** *Progress in neurobiology* 1996, **49**:589–618.
144. Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H: **Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells.** *European journal of biochemistry / FEBS* 1999, **262**:102–7.
145. Braun N, Sévigny J, Robson SC, Enyoji K, Guckelberger O, Hammer K, Di Virgilio F, Zimmermann H: **Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain.** *The European journal of neuroscience* 2000, **12**:4357–66.
146. Bjelobaba I, Stojiljkovic M, Pekovic S, Dacic S, Lavrnja I, Stojkov D, Rakic L, Nedeljkovic N: **Immunohistological determination of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (NTPDase1) and 5'-nucleotidase in rat hippocampus reveals overlapping distribution.** *Cellular and molecular neurobiology* 2007, **27**:731–43.
147. Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H: **Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited.** *Cell and tissue research* 2008, **334**:199–217.
148. Braun N, Sévigny J, Robson SC, Hammer K, Hanani M, Zimmermann H: **Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system.** *Glia* 2004, **45**:124–32.
149. Wang TF, Guidotti G: **Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system.** *Brain research* 1998, **790**:318–22.
150. Biederbick A, Rose S, Elsässer HP: **A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles.** *Journal of cell science* 1999, **112** (Pt 1):2473–84.
151. Harahap AR, Goding JW: **Distribution of the murine plasma cell antigen PC-1 in non-lymphoid tissues.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1988, **141**:2317–20.
152. Narita M, Goji J, Nakamura H, Sano K: **Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I alpha) from rat brain.** *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**:28235–42.

153. Savaskan NE, Rocha L, Kotter MR, Baer A, Lubec G, van Meeteren LA, Kishi Y, Aoki J, Moolenaar WH, Nitsch R, Bräuer AU: **Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma.** *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 2007, **64**:230–43.
154. Rebbe NF, Hickman S: **Modulation of nucleotide pyrophosphatase in plasmacytoma cells.** *Biochemical and biophysical research communications* 1991, **175**:637–44.
155. Zimmermann H, Braun N: **Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system.** *Journal of Autonomic Pharmacology* 1996, **16**:397–400.
156. Friede RL: **A quantitative mapping of alkaline phosphatase in the brain of the rhesus monkey.** *Journal of neurochemistry* 1966, **13**:197–203.
157. Fonta C, Négyessy L, Renaud L, Barone P: **Areal and subcellular localization of the ubiquitous alkaline phosphatase in the primate cerebral cortex: evidence for a role in neurotransmission.** *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 2004, **14**:595–609.
158. Doengi M, Deitmer JW, Lohr C: **New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008, **22**:2368–78.
159. Schoen SW, Graeber MB, Reddington M, Kreutzberg GW: **Light and electron microscopical immunocytochemistry of 5'-nucleotidase in rat cerebellum.** *Histochemistry* 1987, **87**:107–13.
160. Grondal EJ, Janetzko A, Zimmermann H: **Monospecific antiserum against 5'-nucleotidase from Torpedo electric organ: immunocytochemical distribution of the enzyme and its association with Schwann cell membranes.** *Neuroscience* 1988, **24**:351–63.
161. Latini S, Pedata F: **Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations.** *Journal of neurochemistry* 2001, **79**:463–84.
162. Vogel M, Kowalewski H, Zimmermann H, Hooper NM, Turner AJ: **Soluble low-Km 5'-nucleotidase from electric-ray (Torpedo marmorata) electric organ and bovine cerebral cortex is derived from the glycosyl-phosphatidylinositol-**

anchored ectoenzyme by phospholipase C cleavage. *The Biochemical journal* 1992, **284** (Pt 3:621-4.

163. Zimmermann H: **5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects.** *The Biochemical journal* 1992, **285** (Pt 2:345-65.

164. Cammer W, Tansey FA, Sacchi R: **Antibody against mouse liver 5'-nucleotidase immunostains white matter in the adult mouse central nervous system.** *Journal of the neurological sciences* 1986, **73**:155-67.

165. Kreutzberg GW, Barron KD, Schubert P: **Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in glial plasma membranes.** *Brain research* 1978, **158**:247-57.

166. Kreutzberg GW, Barron KD: **5'-Nucleotidase of microglial cells in the facial nucleus during axonal reaction.** *Journal of neurocytology* 1978, **7**:601-10.

167. Gehrman J, Kreutzberg GW: **Characterisation of two new monoclonal antibodies directed against rat microglia.** *The Journal of comparative neurology* 1991, **313**:409-30.

168. Schoen SW, Kreutzberg GW: **Evidence that 5'-nucleotidase is associated with malleable synapses--an enzyme cytochemical investigation of the olfactory bulb of adult rats.** *Neuroscience* 1995, **65**:37-50.

169. Braun N, Lenz C, Gillardon F, Zimmermann M, Zimmermann H: **Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase.** *Brain research* 1997, **766**:213-26.

170. Nedeljkovic N, Bjelobaba I, Lavrnja I, Stojkov D, Pekovic S, Rakic L, Stojiljkovic M: **Early temporal changes in ecto-nucleotidase activity after cortical stab injury in rat.** *Neurochemical research* 2008, **33**:873-9.

171. Bjelobaba I, Parabucki A, Lavrnja I, Stojkov D, Dacic S, Pekovic S, Rakic L, Stojiljkovic M, Nedeljkovic N: **Dynamic changes in the expression pattern of ecto-5'-nucleotidase in the rat model of cortical stab injury.** *Journal of Neuroscience Research* 2011, **89**:862-73.

172. Nedeljkovic N, Bjelobaba I, Subasic S, Lavrnja I, Pekovic S, Stojkov D, Vjestica A, Rakic L, Stojiljkovic M: **Up-regulation of ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rats.** *Cell biology international* 2006, **30**:541-6.

173. Loane DJ, Faden AI: **Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies.** *Trends in pharmacological sciences* 2010, **31**:596–604.
174. Masel BE, DeWitt DS: **Traumatic brain injury: a disease process, not an event.** *Journal of neurotrauma* 2010, **27**:1529–40.
175. Hampton DW, Rhodes KE, Zhao C, Franklin RJM, Fawcett JW: **The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain.** *Neuroscience* 2004, **127**:813–820.
176. Silver J, Miller JH: **Regeneration beyond the glial scar.** *Nature Reviews Neuroscience* 2004, **5**:146–156.
177. Sofroniew M V: **Reactive astrocytes in neural repair and protection.** *The Neuroscientist a review journal bringing neurobiology neurology and psychiatry* 2005, **11**:400–407.
178. Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK: **The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury.** *Molecular neurobiology* 2001, **24**:169–81.
179. Correa-Cerro LS, Mandell JW: **Molecular mechanisms of astrogliosis: new approaches with mouse genetics.** *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2007, **66**:169–176.
180. Haylock-Jacobs S, Keough MB, Lau L, Yong VW: **Chondroitin sulphate proteoglycans: extracellular matrix proteins that regulate immunity of the central nervous system.** *Autoimmunity reviews* 2011, **10**:766–72.
181. McKeon RJ, Jurynech MJ, Buck CR: **The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1999, **19**:10778–88.
182. McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J: **Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1991, **11**:3398–411.

183. Bartus K, James ND, Bosch KD, Bradbury EJ: **Chondroitin sulphate proteoglycans: Key modulators of spinal cord and brain plasticity.** *Experimental Neurology* 2011, **235**:5–17.
184. Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, Strata P, Fawcett JW: **Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components.** *Journal of Comparative Neurology* 2006, **494**:559–577.
185. Smith GM, Strunz C: **Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate proteoglycans by astrocytes.** *Glia* 2005, **52**:209–218.
186. Finnie J: **Animal models of traumatic brain injury: a review.** *Australian veterinary journal* 2001, **79**:628–33.
187. Morrison B, Elkin BS, Dollé J-P, Yarmush ML: **In vitro models of traumatic brain injury.** *Annual review of biomedical engineering* 2011, **13**:91–126.
188. Wu VW, Schwartz JP: **Mini-Review Cell Culture Models for Reactive Gliosis : New Perspectives.** 1998, **681**:675–681.
189. Liang C-C, Park AY, Guan J-L: **In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.** *Nature Protocols* 2007, **2**:329–333.
190. Robel S, Bardehle S, Lepier A, Brakebusch C, Götz M: **Genetic deletion of cdc42 reveals a crucial role for astrocyte recruitment to the injury site in vitro and in vivo.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2011, **31**:12471–82.
191. Környei Z, Czirók a, Vicsek T, Madarász E: **Proliferative and migratory responses of astrocytes to in vitro injury.** *Journal of neuroscience research* 2000, **61**:421–9.
192. Yang H, Qian X-H, Cong R, Li J, Yao Q, Jiao X-Y, Ju G, You S-W: **Evidence for heterogeneity of astrocyte de-differentiation in vitro: astrocytes transform into intermediate precursor cells following induction of ACM from scratch-insulted astrocytes.** *Cellular and molecular neurobiology* 2010, **30**:483–91.
193. Yang H, Cheng X-P, Li J-W, Yao Q, Ju G: **De-differentiation response of cultured astrocytes to injury induced by scratch or conditioned culture medium of scratch-insulted astrocytes.** *Cellular and molecular neurobiology* 2009, **29**:455–73.

194. Boison D: **Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases.** *Current Opinion in Pharmacology* 2008, **8**:2-7.
195. Boison D: **The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis.** *Progress in Neurobiology* 2008, **84**:249-262.
196. Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, Nedergaard M: **Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP.** *Journal of Neuroscience* 2008, **28**:4702-4711.
197. Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-sanchez R, Sul J, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG: **Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks.** *Science* 2005, **310**:113-116.
198. Newman EA: **New roles for astrocytes : Regulation of synaptic transmission.** *Trends in neurosciences* 2003, **26**:536-542.
199. Newman EA: **Glial cell inhibition of neurons by release of ATP.** *Journal of Neuroscience* 2003, **23**:1659-1666.
200. Fellin T, Pascual O, Haydon PG: **Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition.** *Physiology Bethesda Md* 2006, **21**:208-215.
201. Ballarín M, Fredholm BB, Ambrosio S, Mahy N: **Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism.** *Acta Physiologica Scandinavica* 1991, **142**:97-103.
202. Studer FE, Fedele DE, Marowsky a, Schwerdel C, Wernli K, Vogt K, Fritschy JM, Boison D: **Shift of adenosine kinase expression from neurons to astrocytes during postnatal development suggests dual functionality of the enzyme.** *Neuroscience* 2006, **142**:125-37.
203. Boison D: **Adenosine dysfunction and adenosine kinase in epileptogenesis.** *Open Neurosci J* 2011:93-101.
204. Pignataro G, Simon RP, Boison D: **Transgenic overexpression of adenosine kinase aggravates cell death in ischemia.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2007, **27**:1-5.
205. Li T, Quan Lan J, Fredholm BB, Simon RP, Boison D: **Adenosine dysfunction in astroglisis: cause for seizure generation?** *Neuron Glia Biology* 2007, **3**:353-366.

206. Etherington L-A V, Patterson GE, Meechan L, Boison D, Irving AJ, Dale N, Frenguelli BG: **Astrocytic adenosine kinase regulates basal synaptic adenosine levels and seizure activity but not activity-dependent adenosine release in the hippocampus.** *Neuropharmacology* 2009, **56**:429–437.
207. Paxinos G WCT: **The rat brain in stereotaxic coordinates.** *San Diego, CA: Academic Press*; 1986.
208. Sutton RL, Hovda DA, Adelson PD, Benzel EC, Becker DP: **Metabolic changes following cortical contusion: relationships to edema and morphological changes.** *Acta neurochirurgica. Supplementum* 1994, **60**:446–8.
209. MacDonald RL, Skerritt JH, Werz MA: **Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture.** *The Journal of physiology* 1986, **370**:75–90.
210. Fowler JC: **Adenosine antagonists delay hypoxia-induced depression of neuronal activity in hippocampal brain slice.** *Brain research* 1989, **490**:378–84.
211. Sebastião AM, de Mendonca A, Moreira T, Ribeiro JA: **Activation of synaptic NMDA receptors by action potential-dependent release of transmitter during hypoxia impairs recovery of synaptic transmission on reoxygenation.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001, **21**:8564–71.
212. Lai K-M, Wong PCL: **Metabolism of Extracellular Adenine Nucleotides by Cultured Rat Brain Astrocytes.** *Journal of Neurochemistry* 1991, **57**:1510–1515.
213. Frizzo ME, Lara DR, Dahm KC, Prokopiuk AS, Swanson RA, Souza DO: **Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures.** *Neuroreport* 2001, **12**:879–81.
214. Wang C, Lin W, Playa H, Sun S, Cameron K, Buolamwini J: **Dipyridamole analogues as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4).** *Biochemical pharmacology* 2013.
215. Kumaria A, Tolia CM: **In vitro models of neurotrauma.** *British journal of neurosurgery* 2008, **22**:200–206.

216. Morrison B, Saatman KE, Meaney DF, McIntosh TK: **In vitro central nervous system models of mechanically induced trauma: a review.** *Journal Of Neurotrauma* 1998, **15**:911–928.
217. Sofroniew M V, Vinters H V: **Astrocytes: biology and pathology.** *Acta neuropathologica* 2010, **119**:7–35.
218. Yu ACH, Eng LF: **Astrogliosis in culture I. The model and the effect of antis.pdf.** *Journal of neuroscience research* 1993, **34**:295–303.
219. Wanner IB, Deik A, Torres M, Rosendahl A, Neary JT, Lemmon VP, Bixby JL: **A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth.** *Glia* 2008, **56**:1691–1709.
220. Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A: **Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration.** *Glia* 2004, **46**:225–251.
221. Galtrey C, Fawcett J: **The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system.** *Brain. Res. Rev.* 2007:1–18.
222. Fawcett JW, Rosser AE, Dunnett SB: *Brain Damage, Brain Repair.* Oxford University Press; 2002, **125**:2785–2786.
223. Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW: **Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response.** *Progress in Brain Research* 2002, **137**:313–332.
224. Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH: **The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury.** *Experimental Neurology* 2003, **182**:399–411.
225. Asher R a, Morgenstern D a, Fidler PS, Adcock KH, Oohira a, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW: **Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000, **20**:2427–38.
226. Haas CA, Rauch U, Thon N, Merten T, Deller T: **Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes.** *Journal of Neuroscience* 1999, **19**:9953–9963.

227. Yiu G, He Z: **Glial inhibition of CNS axon regeneration.** *Nature Reviews Neuroscience* 2006, **7**:617–627.
228. Carmichael ST, Archibeque I, Luke L, Nolan T, Momiy J, Li S: **Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex.** *Experimental Neurology* 2005, **193**:291–311.
229. Hamel MG, Mayer J, Gottschall PE: **Altered production and proteolytic processing of brevican by transforming growth factor beta in cultured astrocytes.** *Journal of Neurochemistry* 2005, **93**:1533–1541.
230. Aya-ay J, Mayer J, Eakin AK, Muffly BG, Anello M, Sandy JD, Gottschall PE: **The effect of hypoxic-ischemic brain injury in perinatal rats on the abundance and proteolysis of brevican and NG2.** *Experimental neurology* 2005, **193**:149–62.
231. Ogawa T, Hagihara K, Suzuki M, Yamaguchi Y: **Brevican in the developing hippocampal fimbria: differential expression in myelinating oligodendrocytes and adult astrocytes suggests a dual role for brevican in central nervous system fiber tract development.** *Journal of Comparative Neurology* 2001, **432**:285–295.
232. Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S: **Intracranial injury acutely induces the expression of the secreted isoform of the CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB/brevican.** *Experimental Neurology* 1999, **157**:327–337.
233. Tang X, Davies JE, Davies SJA: **Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue.** *Journal of Neuroscience Research* 2003, **71**:427–444.
234. Neary JT: **Trophic actions of extracellular ATP on astrocytes, synergistic interactions with fibroblast growth factors and underlying signal transduction mechanisms.** *Ciba Foundation symposium* 1996, **198**:130–9; discussion 139–41.
235. Brundege JM, Dunwiddie T V: **Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system.** *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 1997, **39**:353–91.
236. Dunwiddie T V, Masino SA: **The role and regulation of adenosine in the central nervous system.** *Annual review of neuroscience* 2001, **24**:31–55.
237. Sebastião AM: **Neuronal ENT1 takes up synaptic adenosine even under hypoxia/ischemia.** *Journal of neurochemistry* 2011, **118**:1–3.

238. Frenguelli BG, Wigmore G, Llaudet E, Dale N: **Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus.** *Journal of neurochemistry* 2007, **101**:1400–13.
239. Parkinson FE, Sinclair CJD, Othman T, Haughey NJ, Geiger JD: **Differences between rat primary cortical neurons and astrocytes in purine release evoked by ischemic conditions.** *Neuropharmacology* 2002, **43**:836–46.
240. Mart ED, Andez MF, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, Martín ED, Fernández M, Ceña V: **Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission.** *Glia* 2007, **55**:36–45.
241. Chesler M: **Failure and function of intracellular pH regulation in acute hypoxic-ischemic injury of astrocytes.** *Glia* 2005, **50**:398–406.
242. Fujita T, Williams EK, Jensen TK, Smith N a, Takano T, Tieu K, Nedergaard M: **Cultured astrocytes do not release adenosine during hypoxic conditions.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2012, **32**:e1–7.
243. Kather H, Wieland E, Waas W: **Chemiluminescent determination of adenosine, inosine, and hypoxanthine/xanthine.** *Analytical biochemistry* 1987, **163**:45–51.
244. Litsky ML, Hohl CM, Lucas JH, Jurkowitz MS: **Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during chemical hypoxia.** *Brain research* 1999, **821**:426–32.
245. Zamzow CR, Xiong W, Parkinson FE: **Astrocytes affect the profile of purines released from cultured cortical neurons.** *Journal of Neuroscience Research* 2008, **86**:2641–2649.
246. Bjelobaba I, Stojiljkovic M, Lavrnja I, Stojkov D, Pekovic S, Dacic S, Laketa D, Rakic L, Nedeljkovic N: **Regional changes in ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rat.** *General physiology and biophysics* 2009, **28 Spec No**:62–8.
247. Takahashi T, Otsuguro K, Ohta T, Ito S: **Adenosine and inosine release during hypoxia in the isolated spinal cord of neonatal rats.** *British journal of pharmacology* 2010, **161**:1806–16.
248. Bell MJ, Kochanek PM, Carcillo JA, Mi Z, Schiding JK, Wisniewski SR, Clark RS, Dixon CE, Marion DW, Jackson E: **Interstitial adenosine, inosine, and**

hypoxanthine are increased after experimental traumatic brain injury in the rat. *Journal Of Neurotrauma* 1998, **15**:163–170.

249. Chang LH, Shimizu H, Abiko H, Swanson RA, Faden AI, James TL, Weinstein PR: **Adenosine release and changes in pial arteriolar diameter during transient cerebral ischemia and reperfusion.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1991, **11**:1030–1038.

250. Franco R, Casadó V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, Lluís C: **Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme.** *Progress in neurobiology* 1997, **52**:283–94.

251. Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Casali EA, Karl J, Barreto-Chaves ML, Sarkis JFF, Battastini AMO: **Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions.** *Neurochemistry International* 2003, **43**:621–628.

252. Kochanek PM, Vagni V a, Janesko KL, Washington CB, Crumrine PK, Garman RH, Jenkins LW, Clark RSB, Homanics GE, Dixon CE, Schnermann J, Jackson EK: **Adenosine A1 receptor knockout mice develop lethal status epilepticus after experimental traumatic brain injury.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2006, **26**:565–75.

253. Wendler CC, Amatya S, McClaskey C, Ghatpande S, Fredholm BB, Rivkees S a: **A1 adenosine receptors play an essential role in protecting the embryo against hypoxia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**:9697–702.

254. Burnstock G: **Purinergic signalling.** *British journal of pharmacology* 2006, **147 Suppl** :S172–81.

255. Choi D-S, Cascini M-G, Mailliard W, Young H, Paredes P, McMahon T, Diamond I, Bonci A, Messing RO: **The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference.** *Nature Neuroscience* 2004, **7**:855–861.

256. Hinton DJ, Lee MR, Jacobson TL, Mishra PK, Frye M a., Mrazek D a., Macura SI, Choi D-S: **Ethanol withdrawal-induced brain metabolites and the pharmacological effects of acamprosate in mice lacking ENT1.** *Neuropharmacology* 2012, **62**:2480–2488.

257. Kost S, Sun C, Xiong W, Graham K, Cass CE, Young JD, Albeni BC, Parkinson FE: **Behavioral effects of elevated expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mice.** *Behavioural brain research* 2011, **224**:44–9.
258. Ruby CL, Adams CA, Mrazek DA, Choi D: **Adenosine Signaling in Anxiety.** 2011.
259. Parkinson FE, Damaraju VL, Graham K, Yao SYM, Baldwin S a, Cass CE, Young JD: **Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain.** *Current topics in medicinal chemistry* 2011, **11**:948–72.
260. Anderson CM, Baldwin SA, Young JD, Cass CE, Parkinson FE: **Distribution of mRNA encoding a nitrobenzylthioinosine-insensitive nucleoside transporter (ENT2) in rat brain.** *Brain research Molecular brain research* 1999, **70**:293–297.
261. Anderson CM, Xiong W, Geiger JD, Young JD, Cass CE, Baldwin SA, Parkinson FE: **Distribution of Equilibrative , Nitrobenzylthioinosine-Sensitive Nucleoside Transporters (ENT1) in Brain.** *Scientist* 1999:867–873.
262. Tanaka A, Nishida K, Okuda H, Nishiura T, Higashi Y, Fujimoto S, Nagasawa K: **Peroxytrite treatment reduces adenosine uptake via the equilibrative nucleoside transporter in rat astrocytes.** *Neuroscience letters* 2011, **498**:52–6.
263. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M: **Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale.** *Genome biology* 2003, **4**:117.
264. Casillas T, Delicado EG, Miras-Portugal MT: **Adenosine 5'-triphosphate modulation of nitrobenzylthioinosine binding sites in plasma membranes of bovine chromaffin cells.** *Neuroscience Letters* 1993, **164**:51–54.
265. Boison D, Shen H: **Adenosine Kinase is a New Therapeutic Target to Prevent Ischemic Neuronal Death.** 2010:108–118.
266. Boison D: **Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies.** *Trends in pharmacological sciences* 2006, **27**:652–8.
267. Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T: **Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters.** *Acta biochimica Polonica* 2005, **52**:749–58.

268. Torres M, Delicado EG, Fideu MD, Miras-Portugal MT: **Down-regulation and recycling of the nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporter in cultured chromaffin cells.** *Biochimica et biophysica acta* 1992, **1105**:291–9.
269. Blostein R, Grafova E: **Characteristics of membrane transport losses during reticulocyte maturation.** *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 1987, **65**:869–75.
270. Liang L, Johnstone RM: **Evidence for an internal pool of nucleoside transporters in mammalian reticulocytes.** *Biochimica et biophysica acta* 1992, **1106**:189–96.
271. Mojsilovic-Petrovic J, Callaghan D, Cui H, Dean C, Stanimirovic DB, Zhang W: **Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes.** *Journal of neuroinflammation* 2007, **4**:12.
272. Soler C, Felipe A, Casado FJ, Celada A, Pastor-Anglada M: **Nitric oxide regulates nucleoside transport in activated B lymphocytes.** *Journal of leukocyte biology* 2000, **67**:345–9.
273. Vangeison G, Rempe DA: **The Janus-faced effects of hypoxia on astrocyte function.** *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 2009, **15**:579–88.
274. Eltzhig HK, Abdulla P, Hoffman E, Hamilton KE, Daniels D, Schönfeld C, Löffler M, Reyes G, Duszenko M, Karhausen J, Robinson A, Westerman K a, Coe IR, Colgan SP: **HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia.** *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**:1493–505.
275. Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Nivillac NMI, Coe IR, Eltzhig HK: **Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia.** *Gastroenterology* 2009, **136**:607–18.
276. Zur Nedden S, Tomaselli B, Baier-Bitterlich G: **HIF-1 alpha is an essential effector for purine nucleoside-mediated neuroprotection against hypoxia in PC12 cells and primary cerebellar granule neurons.** *Journal of neurochemistry* 2008, **105**:1901–14.

277. Gyoneva S, Orr AG, Traynelis SF: **Differential regulation of microglial motility by ATP/ADP and adenosine.** *Parkinsonism & related disorders* 2009, **15** Suppl 3:S195-9.
278. Di Virgilio F, Ceruti S, Bramanti P, Abbracchio MP: **Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system.** *Trends in neurosciences* 2009, **32**:79-87.
279. Rossi DJ, Brady JD, Mohr C: **Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia.** *Nature Neuroscience* 2007, **10**:1377-1386.
280. Brisevac D, Bjelobaba I, Bajic A, Clarner T, Stojiljkovic M, Beyer C, Andjus P, Kipp M, Nedeljkovic N: **Regulation of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in cultured cortical astrocytes by different inflammatory factors.** *Neurochemistry International* 2012, **61**:681-688.
281. Hansen KR, Resta R, Webb CF, Thompson LF: **Isolation and characterization of the promoter of the human 5'-nucleotidase (CD73)-encoding gene.** *Gene* 1995, **167**:307-12.
282. Montminy M: **Transcriptional regulation by cyclic AMP.** *Annual review of biochemistry* 1997, **66**:807-22.
283. Stiles GL: **Adenosine receptors.** *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**:6451-4.
284. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP: **Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia.** *The Journal of clinical investigation* 2002, **110**:993-1002.
285. Stefanovic V, Vlahovic P, Savic V, Ardaillou N, Ardaillou R: **Adenosine stimulates 5'-nucleotidase activity in rat mesangial cells via A2 receptors.** *FEBS Letters* 1993, **331**:96-100.
286. Bjelobaba I, Lavrnja I, Parabucki A, Stojkov D, Stojiljkovic M, Pekovic S, Nedeljkovic N: **The cortical stab injury induces beading of fibers expressing ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3.** *Neuroscience* 2010, **170**:107-116.
287. Bjelobaba I, Nedeljkovic N, Subasic S, Lavrnja I, Pekovic S, Stojkov D, Rakic L, Stojiljkovic M: **Immunolocalization of ecto-nucleotide**

pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) in the rat forebrain. *Brain research* 2006, **1120**:54–63.

288. Cognato G de P, Czepielewski RS, Sarkis JFF, Bogo MR, Bonan CD: **Expression mapping of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1-3 (E-NPP1-3) in different brain structures during rat development.** *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2008, **26**:593–8.

289. Asensio AC, Rodríguez-Ferrer CR, Castañeyra-Perdomo A, Oaknin S, Rotllán P: **Biochemical analysis of ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase activity in brain membranes indicates involvement of NPP1 isoenzyme in extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates in central nervous system.** *Neurochemistry international* 2007, **50**:581–90.

290. Cunha RA: **Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade.** *Purinergic signalling* 2005, **1**:111–34.

291. Olsson T, Cronberg T, Rytter A, Asztély F, Fredholm BB, Smith M-L, Wieloch T: **Deletion of the adenosine A1 receptor gene does not alter neuronal damage following ischaemia in vivo or in vitro.** *The European journal of neuroscience* 2004, **20**:1197–204.

292. Rebola N, Rodrigues RJ, Oliveira CR, Cunha RA: **Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons.** *Neurochemistry international* 2005, **47**:317–25.

293. Ekonomou A, Sperk G, Kostopoulos G, Angelatou F: **Reduction of A1 adenosine receptors in rat hippocampus after kainic acid-induced limbic seizures.** *Neuroscience letters* 2000, **284**:49–52.

294. Rebola N, Coelho JE, Costenla AR, Lopes L V, Parada A, Oliveira CR, Soares-da-Silva P, de Mendonça A, Cunha RA: **Decrease of adenosine A1 receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats.** *The European journal of neuroscience* 2003, **18**:820–8.

295. Knutsen HK, Reinton N, Taskén KA, Hansson V, Eskild W: **Regulation of protein kinase A subunits by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in a mouse Sertoli cell line (MSC-1): induction of RII beta messenger ribonucleic acid is independent of continuous protein synthesis.** *Biology of reproduction* 1996, **55**:5–10.

296. Jones PA, Smith RA, Stone TW: **Protection against kainate-induced excitotoxicity by adenosine A2A receptor agonists and antagonists.** *Neuroscience* 1998, **85**:229–37.
297. Gui L, Duan W, Tian H, Li C, Zhu J, Chen J-F, Zheng J: **Adenosine A 2A receptor deficiency reduces striatal glutamate outflow and attenuates brain injury induced by transient focal cerebral ischemia in mice.** *Brain research* 2009, **1297**:185–93.
298. Pinto-Duarte A, Coelho JE, Cunha R a, Ribeiro JA, Sebastião AM: **Adenosine A2A receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus.** *Journal of neurochemistry* 2005, **93**:595–604.
299. Eckle T, Hughes K, Ehrentraut H, Brodsky KS, Rosenberger P, Choi D-S, Ravid K, Weng T, Xia Y, Blackburn MR, Eltzschig HK: **Crosstalk between the equilibrative nucleoside transporter ENT2 and alveolar Adora2b adenosine receptors dampens acute lung injury.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013, **27**:3078–89.
300. Agostinho P, Caseiro P, Rego AC, Duarte EP, Cunha RA, Oliveira CR: **Adenosine modulation of D-[3H]aspartate release in cultured retina cells exposed to oxidative stress.** *Neurochemistry international* 2000, **36**:255–65.
301. Kobayashi S, Zimmermann H, Millhorn DE: **Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport.** *Journal of neurochemistry* 2000, **74**:621–32.
302. Kobayashi S, Millhorn DE: **Stimulation of expression for the adenosine A2A receptor gene by hypoxia in PC12 cells. A potential role in cell protection.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**:20358–65.
303. Napieralski R, Kempkes B, Gutensohn W: **Evidence for coordinated induction and repression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) and the A2a adenosine receptor in a human B cell line.** *Biological chemistry* 2003, **384**:483–7.
304. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL: **Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension.** *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**:19253–60.

305. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT: **Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**:11715–20.
306. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny M V, Neckers LM: **Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha.** *Nature* 1998, **392**:405–8.
307. Vengellur A, LaPres JJ: **The role of hypoxia inducible factor 1alpha in cobalt chloride induced cell death in mouse embryonic fibroblasts.** *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2004, **82**:638–46.
308. Sharp FR, Ran R, Lu A, Tang Y, Strauss KI, Glass T, Ardizzone T, Bernaudin M: **Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury.** *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2004, **1**:26–35.
309. Fukuda R, Zhang H, Kim J, Shimoda L, Dang C V, Semenza GL: **HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells.** *Cell* 2007, **129**:111–22.
310. Yang J, Kannan R, Wawrousek EF, Spee C, Sreekumar PG, Hinton DR: **Exacerbation of retinal degeneration in the absence of alpha crystallins in an in vivo model of chemically induced hypoxia.** *Experimental eye research* 2008, **86**:355–65.
311. Karovic O, Tonazzini I, Rebola N, Edström E, Lövdahl C, Fredholm BB, Daré E: **Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1alpha.** *Biochemical pharmacology* 2007, **73**:694–708.
312. Kulik TB, Aronhime SN, Echeverry G, Beylin A, Winn HR: **The relationship between oxygen and adenosine in astrocytic cultures.** *Glia* 2010, **58**:1335–44.
313. Fillenz M, Lowry JP, Boutelle MG, Fray AE: **The role of astrocytes and noradrenaline in neuronal glucose metabolism.** *Acta physiologica Scandinavica* 1999, **167**:275–84.
314. Shulman RG, Hyder F, Rothman DL: **Cerebral energetics and the glycogen shunt: neurochemical basis of functional imaging.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**:6417–22.

315. Van Reempts J, Van Deuren B, Haseldonckx M, Van de Ven M, Thoné F, Borgers M: **Purine nucleoside phosphorylase: a histochemical marker for glial cells.** *Brain research* 1988, **462**:142-7.
316. Shen H, Chen G-J, Harvey BK, Bickford PC, Wang Y: **Inosine reduces ischemic brain injury in rats.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2005, **36**:654-9.
317. Solaroglu I, Okutan O, Kaptanoglu E, Beskonakli E, Kilinc K: **Increased xanthine oxidase activity after traumatic brain injury in rats.** *Journal of Clinical Neuroscience* 2005, **12**:273-275.

BIOGRAFIJA AUTORA

Ana Parabucki je rođena 13.02.1984. godine u Podgorici, Crna Gora, gde je završila osnovnu i tri razreda srednje škole. Maturirala je u Las Vegasu, Amerika. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 2002. godine, a završila 2008. godine na studijskoj grupi Biologija sa opštim uspehom 9,26 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije upisala je 2008. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u okviru modula Biologija, i uže naučne oblasti Neuronauke. Od 2008-2011 godine je bila stipendista Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja, a od 2011-2013 zaposlena na Odeljenju za Neurobiologiju, u Laboratoriji za neurohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Od jula 2013., nalazi se na postdoktorskoj poziciji u laboratoriji dr Romana Shustermana, na Univerzitetu u Haifi, Izrael.

Naučno istraživački rad Ane Parabucki je realizovan kroz projekte finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U periodu od 2008–2010. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Interakcija glijne i neurona u procesu oporavka nakon oštećenja centralnog nervnog sistema“ (projekat 143005, rukovodilac prof dr Mirjana Stojiljković). Od 2011. godine učesnik je projekta „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (projekat III41014, rukovodilac prof dr Mirjana Stojiljković). U okviru ovog projekta je i istraživački zadatak koji se odnosi na izradu njene doktorske teze pod mentorstvom dr Ivane Bjelobabe i prof dr Nadežde Nedeljković. Dobila je studentsku stipendiju od strane DAAD i na osnovu toga učila i usavršavala se na RWTH Aachen u laboratoriji prof Markusa Kippa u Ahenu, Nemačka. Takođe, učestvuje u realizaciji bilateralnog DAAD projekta sa Nemačkom (The role of ectonucleotidases in development of neuronal networks in the auditory brainstem: Immunohistochemical study in gerbils and genetically modified mice lacking P2Y1 or P2Y2 receptor“, 2011 - 2013).

Od 2008. stručni je saradnik je Istraživačke Stanice Petnica. Takođe je aktivna u popularizaciji nauke u Srbiji i Crnoj Gori.

Autor je 3 i koautor 7 radova u međunarodnim vodećim časopisima, kao i brojnih domaćih i međunarodnih saopštenja.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Ана Парабуцки _____

број уписа _____ Б1205/2008 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Активност компоненти аденозинског сигналног система астроцита у моделу

мождане повреде *in vivo* и *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, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Ана Парабуцки _____

Број уписа _____ Б1205/2008 _____

Студијски програм _____ биологија _____

Наслов рада Активност компоненти аденозинског сигналног система астроцита у моделу мождане повреде *in vivo* и *in vitro*

Ментор др Ивана Бјелобаба и проф Надежда Недељковић _____

Потписани _____ Ана Парабуцки _____

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

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

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

Потпис докторанда



У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Активност компоненти аденозинског сигналног система астроцита у моделу мождане повреде *in vivo* и *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, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.