

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Vanda B. Balint

UTICAJ GENA SOX2 I SOX9 I MIR-21 NA
FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE ASTROCITA
POREKLOM OD PLURIPOTENTNIH NT2/D1
ĆELIJA

doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Vanda B. Balint

THE ROLE OF SOX2 AND SOX9 GENES AND
MIR-21 ON PHENOTYPICAL
CHARACTERISTICS OF ASTROCYTES
DERIVED FROM PLURIPOTENT NT2/D1
CELLS

Doctoral Disertation

Belgrade, 2025

Mentori:

dr Andrijana Lazić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

akademik Milena Stevanović

Članovi komisije:

dr Goran Brajušković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu- Biološki fakultet

dr Marija Adžić Bukvić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu- Biološki fakultet

dr Mina Perić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu- Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je realizovana u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, pod rukovodstvom akademika Milene Stevanović.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, **dr Andrijani Lazić**, koja je sa posvećenošću pratila i usmeravala moj rad na svakom koraku tokom realizacije ove doktorske disertacije. Njen entuzijazam, upornost, stručnost i nesebična podrška učinili su da ovaj proces, uprkos brojnim izazovima, bude istinsko zadovoljstvo. Posebno sam joj zahvalna na beskrajnom strpljenju, razumevanju i prijateljstvu koje mi je pružila od prvog dana mog rada u laboratoriji. Njena predanost mentorskoj ulozi ne samo da me je naučila svemu što znam, već me je oblikovala u istraživača spremnog za nove naučne izazove. Kika, uspele smo!

Zahvaljujem **akademiku Mileni Stevanović** što mi je pružila priliku da realizujem doktorsku disertaciju u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku. Zahvaljujem joj na savetima, podršci i znanju koje mi je pružila.

Zahvaljujem i svim ostalim članovima laboratorije koji su učinili moj boravak u laboratoriji prijatnim za rad. Hvala im što su uvek bili spremni da mi pomognu i daju savet kad god je to bilo potrebno.

Dr Goranu Brajuškoviću i **dr Mariji Adžić Bukvić** se zahvaljujem na uloženom vremenu da pročitaju ovu doktorsku disertaciju, kao i korisnim sugestijama koje su učinile ovu disertaciju još kvalitetnijom.

Hvala mojoj porodici na neizmernoj podršci i strpljenju – bez njih ništa od ovoga ne bi bilo moguće. Svojom ljubavlju i vrednostima koje su mi preneli, utrli su put mom uspehu i omogućili mi da danas budem tu gde jesam.

Na kraju, posebnu zahvalnost dugujem svojoj zvezdi vodilji, **dr Mini Perić**, čija se podrška pojavila u pravom trenutku tokom izrade ove doktorske disertacije. Njen bistar um, entuzijazam i izuzetna požrtvovanost su značajno doprineli realizaciji i kvalitetu ove teze. Bila mi je čast i zadovoljstvo sarađivati s njom, a kroz taj proces stekla sam i dragog prijatelja.

Uticaj gena *SOX2* i *SOX9* i miR-21 na fenotipske karakteristike astrocita poreklom od pluripotentnih NT2/D1 ćelija

Sažetak

Astrociti su glavne homeostatske ćelije centralnog nervnog sistema (CNS), sa jedinstvenom sposobnošću da se aktiviraju u odgovoru na različita patološka stanja CNS-a. Poznato je da tokom procesa aktivacije ponovo stiču određene osobine astrocitnih prekursora, uključujući ponovnu ekspresiju regulatornih proteina *SOX2* i *SOX9*. Iako su uloge *SOX2* i *SOX9* u gliogenezi poznate, njihove funkcije u zrelim astrocitima nisu u potpunosti razjašnjene. MikroRNK (miRNK) predstavljaju bitne regulatore različitih funkcija astrocita, pri čemu miR-21 ima značajnu ulogu u reaktivnoj astrogliozii. Međutim, njena uloga u drugoj značajnoj fenotipskoj promeni astrocita, senescenciji, nije poznata. Primenom lentiviralne transdukcije, imunofluorescence i Western blot-a na astrocitima poreklom od NT2/D1 ćelija (NT2/A) ispitane su uloge *SOX2*, *SOX9* i miR-21 u fenotipskim osobinama astrocita, sa fokusom na procese aktivacije i senescencije. Rezultati su pokazali da *SOX2* povećava proliferativni kapacitet NT2/A, dok *SOX9* povećava migratorni kapacitet. Takođe, pokazano je da *SOX9* povećava ekspresiju *NFIA* i glutamatnog transportera GLAST kao i da dovodi do povećanja kapaciteta za preuzimanje vanćelijskog glutamata u zrelim astrocitima. Sa druge strane, utišavanje miR-21 smanjuje proliferaciju astrocita i potencijalno pomaže njihov ulazak u senescenciju. Naši rezultati pokazuju da *SOX2*, *SOX9* i miR-21 ostvaruju bitne uloge u procesima aktivacije i senescencije astrocita. Razumevanje njihovog uticaja na fenotipske karakteristike astrocita vezanih za aktivaciju i senescenciju otvara mogućnost za njihovu modulaciju koja bi potencijalno mogla doprineti razvoju novih terapijskih strategija za regeneraciju tkiva i oporavak CNS-a.

Ključne reči: astrociti, *SOX2*, *SOX9*, NT2/D1, miR-21, senescencija, reaktivna astrogliozia, proliferacija, migracija, glutamat

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

The role of *SOX2* and *SOX9* genes and miR-21 in phenotypical characteristics of astrocytes derived from pluripotent NT2/D1 cells

Abstract

Astrocytes are the primary homeostatic cells of the central nervous system (CNS), with a unique ability to reactivate in response to various pathological disorders of the CNS. During the reactivation process, they reacquire certain characteristics of astrocytic precursors, including re-expression of the transcription factors *SOX2* and *SOX9*. While the roles of *SOX2* and *SOX9* in gliogenesis are well known, their functions in mature astrocytes remain incompletely understood. MicroRNAs (miRNAs) are key regulators of various astrocytic functions, with miR-21 playing a significant role in reactive astrogliosis. However, its role in another major phenotypic change in astrocytes, senescence, is unknown. Lentiviral transduction, immunofluorescence, and Western blot analysis were employed to investigate the roles of *SOX2*, *SOX9*, and miR-21 in the phenotypic properties of astrocytes derived from NT2/D1 cells (NT2/A), with the focus on the processes of reactivation and senescence. Our results showed that *SOX2* increases the proliferative capacity of NT2/A, while *SOX9* increases their migratory capacity. *SOX9* also increases the expression of *NFIA* and the glutamate transporter GLAST, as well as the capacity for extracellular glutamate uptake in mature astrocytes. Silencing miR-21 reduces astrocyte proliferation and potentially promotes their senescence. Our findings indicate that *SOX2*, *SOX9*, and miR-21 play critical roles in the processes of astrocyte reactivation and senescence. Understanding the influence of these factors on astrocyte phenotypic characteristics related to reactivation and senescence opens the possibility for their modulation, which could potentially contribute to the development of novel therapeutic strategies for tissue regeneration and CNS recovery.

Key words: *SOX2*, *SOX9*, astrocytes, NT2/D1, miR-21, senescence, reactive astrogliosis, proliferation, migration, glutamate.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

Lista skraćenica

AB - Alchajmerova bolest
ALS - Amiotrofična lateralna skleroza
APCDD1 - engl. *APC-downregulated 1*
ATP - adenozin trifosfat
AQP4 - akvaporin 4
BDNF - engl. *brain-derived neurotrophic factor*
bp - bazni parovi
BSA - albumin iz seruma govečeta, engl. *Bovine Serum Albumin*
C1q - komponenta komplementa 1q
cDNK - komplementarni lanac molekula DNK, engl. *complementary DNA*
CNS - centralni nervni sistem
CTNF - cilijarni neurotrofni factor, engl. *ciliary neurotrophic factor*
DMEM - dulbeko modifikovani medijum, engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNK - dezoksiribonukleinska kiselina
EAAT1 - engl. *Excitatory aminoacid transporter 1*
EAAT2 - engl. *Excitatory aminoacid transporter 2*
ECL - pojačana hemiluminescencija, engl. *enhanced ChemiLuminescence*
HB - Hantingtonova bolest
HMG boks - engl. *high mobility group box*
HRP - peroksidaza rena, engl. *HorseRadish Peroxidase*
FBS - serum fetusa govečeta, engl. *Fetal Bovine Serum*
GAPDH - engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GLAST - engl. *Glutamate/aspartate transporter*
GLT-1 - engl. *Glutamate transporter 1*
GFAP - glijski fibrilarni kiseli protein, engl. *Glial fibrillary acidic protein*
HBSS - Henkov balansirani rastvor soli
HB - Hantingtonova bolest
IL-1 α - interleukin 1 α
IL-1 β - interleukin 1 β
IL-6 - interleukin 6
iRNK - informaciona RNK
Kir4.1 - ulazni ispravljački K⁺ kanal 4.1
kDa - kilo dalton
miRNK - mikro RNK
MAP2 - engl. *Microtubule-associated protein-2*
MS - multipla skleroza
OCT4 - engl. *octamer-binding transcription factor 4*
NF- κ B - nuklearni faktor κ B
NFIA - engl. *Nuclear factor I A*
NEUROD1 - engl. *Neurogenic differentiation factor 1*
NGS - engl. *Normal goat serum*
NGF - engl. *Nerve growth factor*
NT2/D1 - NTERA2 klon D1
NT2/A - NT2-astrociti dobijeni diferencijacijom NT2/D1 ćelija
NT2/N - NT2-neuroni dobijeni diferencijacijom NT2/D1 ćelija
PB - Parkinsonova bolest
PBS - fosfatni pufer, engl. *Phosphate-Buffered Saline*
PCR - lančana reakcija polimeraze, engl. *Polymerase Chain Reaction*
PFA - paraformaldehid
PVDF - polivinil difluorid

RK - retinoična kiselina

RNK - ribonukleinska kiselina

RT-PCR - PCR kome prethodi reverzna transkripcija

SASP - sekretorni fenotip povezan sa senescencijom, engl. *senescence associated secretory phenotype*

SDS - sodijum dodecil sulfat

SDS-PAGE - elektroforeza u gelu od poliakrilamidnom sa natrijum dodecil sulfatom, engl.

Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SEM - srednja vrednost standradne greške, engl. *Standard Error Mean*

TAE - Tris-acetat-EDTA

TBST - Tris pufer soli sa 0.1% Tween-20

TNF- α - faktor nekroze tumora α

ZCCHC24 - engl. *Zinc finger CCHC domain-containing protein 24*

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Geni <i>SOX/Sox</i> familije	1
1.1.1 Funkcije gena <i>SOX/Sox</i> familije	1
1.1.2. Uloge SOX regulatornih proteina transkripcije u neuralnoj diferencijaciji	3
1.1.3. Gen <i>SOX2/Sox2</i> u gliogenezi	3
1.1.4. Gen <i>SOX9/Sox9</i> u gliogenezi	5
1.2 Mikro RNK	5
1.2.1. mikroRNK u CNS-u	6
1.2.2. miR21	6
1.3. TERA2 pluripotentna embrionalna karcinomska ćelijska linija	7
1.3.1. NTERA2 ćelijska linija	7
1.4. Astrociti	8
1.4.1. Gliogeneza	8
1.4.2. Tipovi astrocita	9
1.4.2.1. Protoplazmatični astrociti	10
1.4.2.2. Fibrozni astrociti	10
1.4.3. Uloge astrocita	11
1.4.3.1. Formiranje i modulacija sinapsi	11
1.4.3.2. Održavanje homeostaze jona i glutamata	11
1.4.3.3. Regulacija krvno-moždane barijere	12
1.4.4.4. Imunološke funkcije astrocita	12
1.4.4. Reaktivna astroglioza	13
1.4.4.1. Tipovi reaktivne astroglioze	13
1.4.4.2. Morfološke, transkripcione i funkcionalne promene reaktivnih astrocita	15
1.4.5. Reaktivni astrociti i patologije CNS-a	17
1.4.5.1. Traumatska povreda mozga	18
1.4.5.2. Ishemija	18
1.4.5.3. Neurodegenerativne bolesti	18
1.4.6. Senescencija astrocita	19
1.4.6.1. Senescencija i neurodegenerativne bolesti povezane sa starenjem	21
1.4.7. Razlike i sličnosti između senescentnih i reaktivnih astrocita	22
1.4.8. Terapeutske strategije usmerene na modulaciju astrocita	23
2. Ciljevi istraživanja	26
3. Materijal i metode	27
3.1. Tabelarni prikaz hemikalija, rastvora, pufera i medijuma	27
3.2. Eksperimentalne životinje	27
3.2.1. Ablacija senzomotorne kore (ASK) prednjeg mozga pacova	28
3.3. NT2/D1 ćelijska linija	28
3.3.1. Protokol za diferencijaciju NT2/D1 ćelija	28

3.4. Modulacija ekspresije SOX2, SOX9 i miR21	29
3.4.1. Transformacija bakterija.....	29
3.4.2. Izolacija plazmidne DNK na srednjoj skali.....	29
3.4.3. Produkcija lentivirusa i transdukcija NT2/A.....	30
3.5. Test vijabilnosti	32
3.6. Test zarastanja povrede (engl. <i>Scratch Wound</i>)	32
3.7. Tretman forskolinom	32
3.8. Glutamatni esej	32
3.9. Test senescencije	33
3.10. Izolacija totalne RNK	33
3.11. Oslobađanje totalne RNK od ostataka genomske DNK	34
3.12. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)	34
3.13. Semi-kvantitativni RT-PCR	34
3.14. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)	35
3.15. Sinteza cDNK korišćenjem Taqman™ MicroRNA Assay-a	36
3.16. RT-qPCR korišćenjem Taqman proba	36
3.17. Izolacija ukupnih proteina	36
3.18. Imunološka detekcija proteina (Western blot)	37
3.19. Imunofluorescencija	38
3.19.1. Priprema životinjskog tkiva i imunohistohemijska analiza	38
3.19.2. Imunocitohemija	39
3.20. <i>In silico</i> analiza miR-21 ciljnih gena	39
3.21. Statistička analiza	40
4. Rezultati	41
4.1. Karakterizacija <i>in vitro</i> neuralne diferencijacije humanih pluripotentnih embrionalnih karcinomskih NT2/D1 ćelija	41
4.2. Karakterizacija NT2/A tokom sazrevanja	42
4.3. Promena ekspresije regulatornih proteina SOX2 i SOX9 tokom sazrevanja NT2/A	43
4.4. Povećanje ekspresije SOX2 i SOX9 u reaktivnim astrocitima cerebralnog korteksa pacova nakon ablacije senzomotorne kore.....	45
4.5. Promena ekspresije SOX2 i SOX9 u zrelih NT2/A nakon mehanički i hemijski izazvane povrede..	45
4.6. Promene proliferativnog i migratornog kapaciteta zrelih NT2/A usled povećane ekspresije SOX2 i SOX9 lentiviralnom transdukcijom Tabelarni prikaz hemikalija, rastvora, pufera i medijuma	49
4.7. Povećana ekspresija SOX9 u zrelih NT2/A dovodi do povećane ekspresije gena aktivnih tokom gliogeneze i povećanja kapaciteta za preuzimanje glutamata	52
4.8. Smanjenje vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta NT2/A u uslovima utišane ekspresije miR-21	53
4.9. Povećanje ekspresije inhibitora ćelijskog ciklusa i ulazak u senescenciju nakon utišavanja ekspresije miR-21 u NT2/A	55
4.10. <i>In silico</i> analiza miR-21 ciljnih gena čija je ekspresija povećana u senescentnim astrocitima	56
5. Diskusija	58
6. Zaključci	66
7. Literatura	67

8. Biografija.....81

1. Uvod

1.1. Geni *SOX/Sox* familije

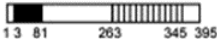
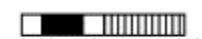
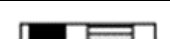
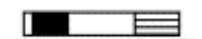
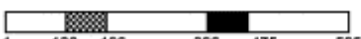
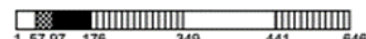
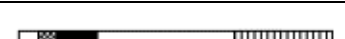
1.1.1. Funkcije gena *SOX/Sox* familije

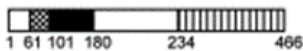
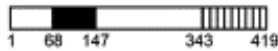
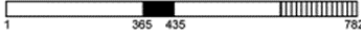
Razviće kod viših organizama uključuje kompleksnu genetičku regulaciju na molekularnom nivou. U regulaciju razvića uključeno je nekoliko familija ključnih regulatornih gena. Geni familije *SOX/Sox* (engl. *Sry-related HMG box genes*) predstavljaju evolutivno mladu familiju gena bitnih za regulaciju razvića. Prvootkriveni član familije *SOX/Sox* gena bio je gen *Sry* (engl. *Sex-determining Region Y*), otkriven 1990. godine kao gen sa funkcijom u određivanju muškog pola (Prior & Walter, 1996). Tokom kloniranja ovog gena, otkriveni su i drugi geni koji sa genom *Sry* dele homologiju u okviru DNK vezujućeg domena koji se naziva HMG boks (engl. *high mobility group box*) (Denny et al., 1992; Wright et al., 1993). Geni *SOX/Sox* familije predstavljaju evolutivno konzerviranu familiju gena koji regulišu mnoge procese tokom razvića, a uključeni su i u održavanje homeostaze adultnih tkiva (Bowles et al., 2000; Stevanovic et al., 2021). Geni *SOX/Sox* kodiraju istoimene regulatorne proteine transkripcije koji svoju ulogu u aktivaciji ili represiji gena ostvaruju preko HMG boksa preko koga se vezuju za regulatorne elemente ciljnih gena i vrše njihovu regulaciju. HMG boks se sastoji od 79 aminokiselina koje omogućavaju specifično vezivanje za sekvencu na molekulu DNK (A/T A/T CAA A/T) (Harley et al., 1994; Stevanovic et al., 2021). *SOX* regulatorni proteini regulišu mnoge procese tokom razvića, kao što je održavanje pluripotentnosti matičnih ćelija, ćelijska proliferacija, specijalizacija ćelija, kao i terminalna diferencijacija ćelija u tkiva i organe (Stevanovic et al., 2021). Do danas je opisano 20 članova *SOX/Sox* familije gena kod čoveka i miša koji se dele u 8 grupa označenih slovima od A do H (Schepers et al., 2002) (Tabela 1). Pored HMG boks domena, *SOX* proteini sadrže i druge funkcionalne domene kao što su: transaktivacioni, transrepresorski domen i domen za dimerizaciju (Lefebvre et al., 2007). *SOX* proteini svoju ulogu u regulaciji transkripcije ostvaruju direktnim vezivanjem HMG domena za mali žljeb molekula DNK. Dok se kod članova u okviru iste grupe *SOX* gena uočava visok stepen homologije u sekvenci unutar i izvan HMG boks domena (70-95%), članovi različitih grupa pokazuju homologiju samo u okviru HMG boks domena ($\geq 46\%$) (Bowles et al., 2000). Ekspresija članova u okviru iste grupe gena *SOX* često se preklapa u tkivima i deluju sinergistički, a mogu i da jedni drugima nadomeste funkciju (Bernard & Harley, 2010).

Brojni *SOX* proteini sadrže transaktivacione domene C-terminalno u odnosu na HMG box, čija aktivnost često zavisi od regulatornih elemenata i proteina partnera sa kojim stupaju u interakciju. Takav je slučaj sa članovima porodica *SOXB1*, C, E i F koji su poznati kao transkripcioni aktivatori svojih ciljnih gena (Bernard & Harley, 2010). Nasuprot tome, *SOXB2* proteini, *SOX14* i *SOX21*, poseduju represorski domen C-terminalno u odnosu na HMG boks. Kako bi ostvarili svoju funkciju *SOX* proteini preko aktivatorskih ili represorskih domena regrutuju kofaktore potrebne za pokretanje ekspresije ili represije gena. Zanimljivo je da *SOXD* proteini nemaju tipičan aktivatorski ili represorski domen i njihova funkcija zavisi od tipa tkiva ili razvojnog stadijuma (Bernard & Harley, 2010). Kako bi ostvarili svoju regulatornu funkciju *SOX* stupaju u interakcije sa drugim regulatornim proteinima. Osim gena *SRY* i *SOX3* koji se nalaze na polnim hromozomima, svi ostali geni *SOX* su locirani na autozomima i rasuti su po genomu (Prior & Walter, 1996). Geni *SOX* iz B i C grupe ne sadrže introne. Većina *SOX* gena imaju jedan egzon, dok *SOX5*, *SOX9*, *SOX10*, *SOX15*, *SOX17* i *SOX18* koji poseduju više egzona (Argentaro et al., 2000; Cohen-Barak et al., 2001; Han et al., 2010; Ikeda et al., 2002) (Tabela 1).

Tabela 1. Klasifikacija gena *Sox* miša, sa oznakom grupe kojoj gen pripada, funkcijom i strukturnom organizacijom proteina kodiranih *Sox* genima. Na šematskom prikazu proteina blokovi označavaju funkcionalne domene, a brojevi označavaju aminokiselinsku poziciju domena. Crni blok označava HMG domen, blok označen vertikalnim linijama označava transaktivacioni domen, blok označen horizontalnim

linijama označava transrepresorski domen, dok blok sa dijagonalnim linijama predstavlja dimerizacioni domen. Preuzeto i izmenjeno iz: Lefebvre et al., 2007.

Grupa	Gen	Funkcija	Šematski prikaz proteina
A	<i>Sry</i>	- Determinacija pola - Regulacija dopaminegičnih neurona nigrostriatalnog sistema	
B1	<i>Sox1</i>	- Razviće oka - Neurogeneza	
	<i>Sox2</i>	- Održavanje pluripotenosti embrionalnih matičnih ćelija - Neurogeneza - Razviće oka - Razviće hipofize	
	<i>Sox3</i>	- Neurogeneza - Razviće oka - Razviće hipofize - Razviće gonada	
B2	<i>Sox14</i>	Neurogeneza	
	<i>Sox21</i>	Neurogeneza	
C	<i>Sox4</i>	- Kardiogeneza - Limfopoeza - Razviće pankreasa - Neurogeneza	
	<i>Sox11</i>	- Kardiogeneza - Razviće oka, pluća, pankreasa, skeleta i slezine - Neurogeneza	
	<i>Sox12</i>	Nepoznata	
D	<i>Sox5</i>	- Razviće skeleta - Razviće nervne kreste - Gliogeneza	
	<i>Sox6</i>	- Provodljivost srčanog mišića - Razviće skeleta - Gliogeneza	
	<i>Sox13</i>	Limfopoeza	
E	<i>Sox8</i>	- Gliogeneza - Razviće testisa - Osteogeneza - Formiranje nervne kreste	
	<i>Sox9</i>	- Determinacija pola - Hondrogeneza - Razviće nervne kreste - Gliogeneza - Održavanje ćelija notohorda	

		• Kardiogeneza • Formiranje unutrašnjeg uha • Formiranje folikula dlake • Razviće pankreasa • Razviće epitela creva	
	<i>Sox10</i>	• Razviće nervne kreste • Formiranje unutrašnjeg uha	
F	<i>Sox7</i>	• Kardiogeneza	
	<i>Sox17</i>	• Formiranje endoderma • Angiogeneza	
	<i>Sox18</i>	• Kardiogeneza • Angiogeneza • Razviće folikula dlake	
G	<i>Sox15</i>	• Regeneracija skeletne muskulature	
H	<i>Sox30</i>	• Spermatogeneza	

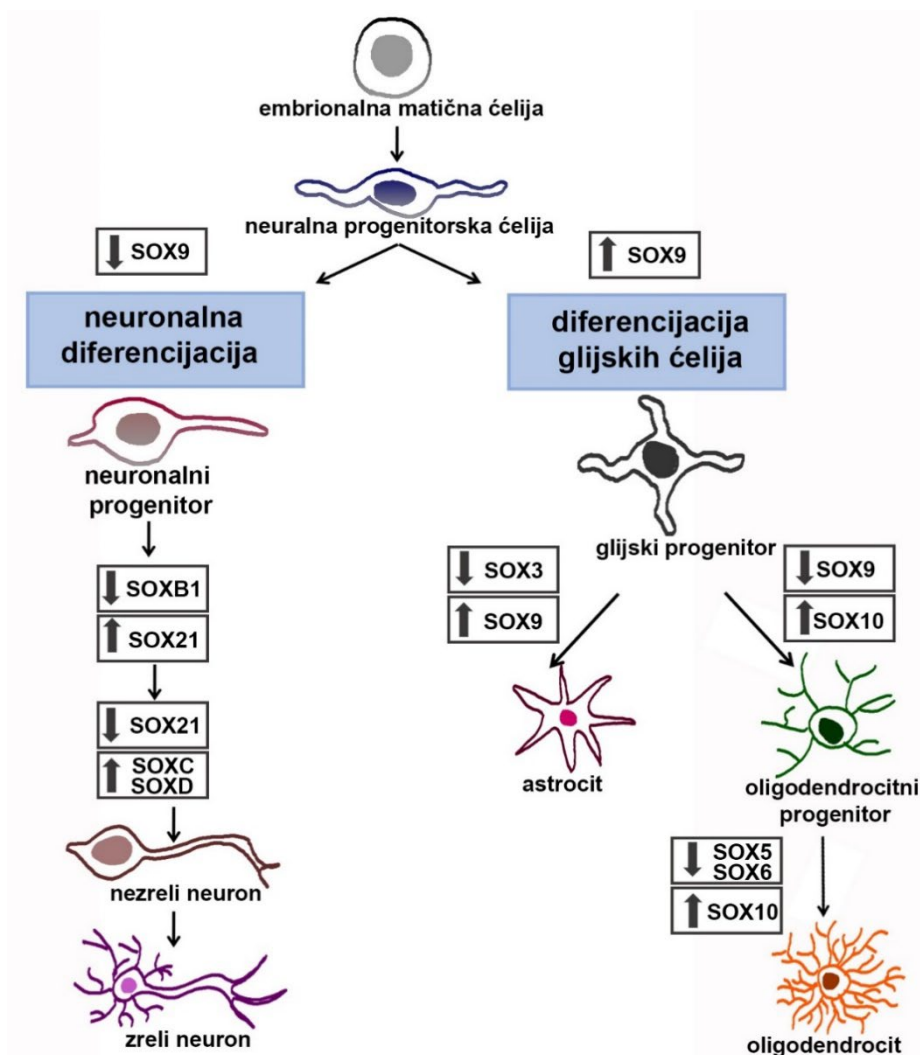
1.1.2. Uloge SOX proteina u neuralnoj diferencijaciji

Tokom embrionalnog razvića centralnog nervnog sistema (CNS), multipotentne neuralne prekursorske ćelije prolaze kroz specifičan obrazac diferencijacije gde prvo dolazi do diferencijacije neurona, a tek nakon toga dolazi do diferencijacije glijskih ćelija (Kang et al., 2012; Kessaris et al., 2001). Neurogeneza je proces u kome učestvuju mnogi SOX proteini od početka diferencijacije do generisanja zrelih neurona. Članovi SOXB i SOXC grupe ostvaruju svoju ulogu sukcesivno tokom ovog procesa (Bergsland et al., 2006) (Slika 1). Članovi SOXB1 grupe (SOX1, SOX2 i SOX3) su eksprimirani u neuralnim prekursorским ćelijama, dok su članovi SOXB2 grupe (SOX21) i SOXC grupe (SOX14 i SOX11) eksprimirani u neuronalnim progenitorima koji će se diferencirati u neurone (de la Rocha et al., 2014) (Slika 1). Članovi SOXB1 grupe sprečavaju diferencijaciju neuronalnih progenitora u neurone (Kiefer, 2007). Pokazano je da povećana ekspresija ovih transkripcionih regulatora dovodi do inhibicije neuronalne diferencijacije, dok utišavanje njihove ekspresije dovodi do ekspresije post- mitotičkih neuronalnih markera (Bylund 2003). Sa druge strane SOX21, SOX4 i SOX11, podstiču neuronalnu diferencijaciju (Kiefer, 2007). Povećana ekspresija SOX4 i SOX11 u neuronalnim progenitorima dovodi do preuranjene ekspresije pro-neuronalnih markera (Bergsland et al., 2006). Član SOXE grupe, SOX9, ima ključnu ulogu u inicijaciji gliogeneze (Kang et al., 2012) (Slika 1). Ovaj SOX protein je bitan za održavanje populacije neuralnih matičnih ćelija u embrionalnom i adultnom mozgu (Kang et al., 2012). Studije su pokazale da odsustvo SOX9 u neuralnim progenitorima dovodi do neuspešne diferencijacije astrocita i oligodendrocita, dva glavna tipa glijskih ćelija (Stolt et al., 2003). Pokazano je da se SOX9 eksprimira i tokom sazrevanja astrocita, dok SOX10 i SOX8 preuzimaju njegovu ulogu u diferencijaciji i sazrevanju oligodendrocita (Stolt et al., 2004; Weider et al., 2013) (Slika 1). Istraživanja su pokazala da je SOX10 ključan za mijelinizaciju neurona u CNS-u i perifernom nervnom sistemu, preko kontrole ekspresije glavnih proteina mijelina (Stolt & Wegner, 2010).

1.1.3. Gen *SOX2/Sox2* u gliogenezi

Humani gen *SOX2/Sox2* (engl. *SRY-related HMG-box gene 2*) pripada podgrupi gena SOXB1 zajedno sa *SOX3/Sox3* i *SOX1/Sox1* genima (Lefebvre et al., 2007). SOX2 svoju ulogu u razviću ostvaruje kroz održavanje pluripotentnosti i proliferativnog potencijala matičnih ćelija (Novak et al.,

2020). Jedan je od najranije eksprimiranih regulatornih proteina tokom razvića CNS-a. Tokom razvića ovaj regulatorni protein je eksprimiran u unutrašnjoj ćelijskoj masi i primitivnom ektodermu (Keramari et al., 2010).



Slika 1. Uloge SOX proteina u diferencijaciji neurona i različitih tipova glijskih ćelija. Šematski prikaz procesa diferencijacije neurona (levo) i glijskih ćelija (desno). Nivoi ekspresije SOX proteina tokom neuronalne i diferencijacije glijskih ćelija predstavljeni su strelicama nadole (smanjena ekspresija) i strelicama nagore (povećana ekspresija). Preuzeto i izmenjeno iz Stevanovic et al., 2021.

Ovaj regulatorni protein je tokom razvića CNS-a eksprimiran u neuroektodermu, kao i u neuralnim progenitorima, čijom diferencijacijom nastaju neuroni i glijske ćelije (Avilion et al., 2003). SOX2 je takođe eksprimiran u adultnom mozgu u neurogenim zonama, u subventrikularnoj zoni lateralne ventrikule i subgranularnoj zoni dentatnog girusa (Shimozaki, 2014). Kako bi ostvario svoju funkciju u održavanju pluripotentnosti neuralnih matičnih i embrionalnih matičnih ćelija SOX2 ostvaruje kontakt sa ko-faktorima, kao što je OCT4 (engl. *octamer-binding transcription factor 4*). Neki od ciljnih gena SOX2 i OCT4 su geni *Nanog* (engl. *Homeobox protein NANOG*), *Utf1* (engl. *Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1*) i *Fgf4* (engl. *Fibroblast growth factor 4*) (Keramari et al., 2010). Takođe, ekspresija nestina, markera neuralnih matičnih ćelija, se nalazi pod regulacijom ova dva regulatorna proteina (Josephson et al., 1998). Studije su pokazale da povećana ekspresija SOX2 u neuralnim progenitorima održava ove ćelije u pluripotentnom stanju i inhibira njihovu diferencijaciju u neurone, dok utišavanje ekspresije SOX2 dovodi do njihove diferencijacije u neurone (Drakulic et al., 2012; Klajn et al., 2014; Stevanovic et al., 2021). Ekspresija SOX2 ograničena je na proliferišuće ćelijske populacije uključujući neuralne matične i progenitorske ćelije, glijske prekursore kao i proliferišuće astrocite prisutne tokom ranog postnatalnog razvića (Bani-

Yaghoub et al., 2006). Studija Bani-Yaghoub i saradnika pokazala je da se u *in vitro* kulturama astrocita ekspresija ovih regulatornih proteina održava na visokom nivou u astrocitima koji su proliferativni. Dugoročnim gajenjem u kulturi, smanjuje se proliferativni kapacitet astrocita i ulaze u utišano stanje, i u ovoj fazi sazrevanja ekspresija SOX2 se značajno smanjuje (Bani-Yaghoub et al., 2006). Za razliku od zrelih neurona u kojima dolazi do trajnog gašenja ekspresije ovog proteina i njegove degradacije proteolitičkim enzimima, u terminalno diferenciranim astrocitima ekspresija ovog gena se može ponovo aktivirati tokom procesa reaktivne astroglioze (Bani-Yaghoub et al., 2006). Uloge SOX2 u procesu reaktivne astroglioze su nedovoljno ispitane, međutim određene studije pokazuju da je ponovna ekspresija SOX2 u reaktivnim astrocitima povezana sa njihovim povećanim proliferativnim kapacitetom (Chen et al., 2019).

1.1.4. Gen *SOX9/Sox9* u gliogenezi

Gen *SOX9/Sox9* pripada podgrupi *SOXE* gena zajedno sa genima *SOX8/Sox8* i *SOX10/Sox10* (Lefebvre et al., 2007). Protein SOX9 predstavlja ključni faktor inicijacije gliogeneze (Kang et al., 2012). Eksperimenti na embrionalnoj kičmenoj moždini miša i pileta pokazali su da ovaj regulatorni protein transkripcije regrutuje regulatorni protein NFIA sa kojim formira kompleks koji ko-reguliše ekspresiju set gena uključujući *APCDD1* (engl. *Adenomatosis Polyposis Coli downregulated 1*), *MMD2* (engl. *Monocyte To Macrophage Differentiation Associated 2*) i *ZCCHC24* (engl. *Zinc finger CCHC domain-containing protein 24*) sa ključnim ulogama u regulaciji fiziologije astroglijalnih prekursora (Kang et al., 2012). NFIA (engl. *Nuclear Factor I A*) pripada familiji NFI (engl. *Nuclear factor I*) transkripcionih regulatora uključenih u inicijaciju gliogeneze (Li et al., 2018). Eksperimenti na embrionalnoj kičmenoj moždini pileta pokazali su da APCDD1 ima ulogu u migraciji astrocitnih prekursora tokom gliogeneze (Kang et al., 2012). MMD2 ima ulogu u metabolizmu astrocitnih prekursora (Kang et al., 2012), dok ZCCHC24 pored uloge u migraciji astrocitnih prekursora (Kang et al., 2012) ima ulogu u sprečavanju apoptoze ćelija tokom razvika CNS-a (Vitorino et al., 2014). Povećan nivo ekspresije APCDD1 u HeLa ćelijama dovodi do povećane sinteze i polimerizacije F-aktina, koja se povezuje sa povećanim migratornim kapacitetom ćelija (Kang et al., 2012). Ista studija pokazala je da APCDD1 svoju ulogu ostvaruje preko interakcije sa Rho-GTPazom (engl. *Ras homologous (Rho) protein family GTPases*) za koju je poznato da učestvuje u polimerizaciji F-aktina (Machesky & Hall, 1997; Nobes & Hall, 1995). Studija Kang i saradnici pokazala je da SOX9 u kompleksu sa NFIA indukuje ekspresiju glutamatnog transportera GLAST (engl. *glutamate aspartate transporter*), markera astroglijalnih prekursora (Kang et al., 2012). Takođe, studije na humanim embrionalnim matičnim ćelijama i humanim indukovanim pluripotentnim ćelijama (iPSc) pokazale su da je povećan nivo ekspresije SOX9 i NFIA u ovim ćelijama dovoljna za generisanje funkcionalnih astrocita (Li et al., 2018). Ovako dobijeni astrociti imaju karakterističnu morfologiju astrocita, eksprimiraju specifične astrocitne markere i zadržavaju svoje karakteristike nakon transplantacije u mozak miša. Funkcionalno, one podsećaju na primarne astrocite, prenose kalcijumske talase, preuzimaju glutamat i podržavaju rast neurita (Li et al., 2018). Studije su pokazale da se ekspresija SOX9 povećava u reaktivnim astrocitima tokom reaktivne astroglioze, međutim njeno uloga u ovom procesu nije dovoljno razjašnjena (Sun et al., 2017).

1.2. MikroRNK

Mikro RNK (miRNK) su klasa malih, nekodirajućih RNK dužine 22-24 nukleotida, koje su uključene u post-translacionu regulaciju ekspresije gena (Saliminejad et al., 2019). Vezuju se za 3'-netranslatirajući region (3' UTR) ciljnih iRNK uzrokujući njihovu degradaciju, represiju translacije ili deadenilaciju (Rajman & Schratt, 2017). MiRNK su u genomu lokalizovane u regionima bez kodirajućeg potencijala ili u okviru introna gena za proteine (Rajman & Schratt, 2017). Identifikovani su u genomima životinja, biljkama i određenim virusima i najčešće ostvaruju represiju ekspresije gena na nivou iRNK (Bartel, 2004). Bitni su regulatori brojnih ćelijskih procesa kao što je razviće, diferencijacija, proliferacija ćelija i apoptoza. Većina gena za miRNK su transkribovani pomoću RNK polimeraze II (Pol II) u prekursore zrelih miRNK koji se nazivaju primarne miRNK (engl.

primary miRNA, pri-miRNK). Ovi prekursori poseduju nekoliko “stablo-petlja” (engl. *stem loop*) struktura. Pri-miRNK se u nukleusu pomoću enzima Droša seku u prekursorske miRNK (pre-miRNK), a nakon transporta iz nukleusa seku se u male dvolančane RNK enzimom koji se naziva Dajser (Saliminejad et al., 2019; Vishnoi & Rani, 2017). Jedan od lanaca dvolančane RNK postaje zrela miRNK, a drugi se obično razgrađuje. Zrela miRNK se potom ugrađuje u ribonukleo-proteinski kompleks za utišavanje RNK (engl. *RNA-induced silencing complex*, RISK) zajedno sa Argonaut proteinima. Ovaj kompleks omogućava miRNK da prepozna i veže ciljnu iRNK na osnovu komplementarnosti nukleotida. Nakon vezivanja za ciljnu iRNK, RISK kompleks može inhibirati translaciju iRNK ili izazvati njenu razgradnju, čime se suprimira ekspresija gena (Saliminejad et al., 2019). Pretpostavlja se da su miRNK uključene u regulaciju ekspresije ~60% protein kodirajućih gena (Macfarlane & Murphy, 2010). Poremećaji u nivoima ekspresije molekula mikro RNK uključeni su u patogenezu mnogih bolesti, kao što su neurodegenerativne, maligne i kardiovaskularne bolesti (Vishnoi & Rani, 2017). Danas je istraživački fokus usmeren na konstruisanje terapijskih pristupa baziranih na primeni sintetički sintetisanih miRNK oligonukleotida, koji mogu zameniti funkcije miRNK čija je ekspresija smanjena u različitim patologijama, ili dovesti do utišavanja njihove ekspresije u slučajevima kad je njihova ekspresija povećana (Samad & Kamaroddin, 2023).

1.2.1. MikroRNK u CNS-u

Poznato je da miRNK učestvuju u razviću nervnog sistema, a narušavanje njihove regulacije se povezuje sa različitim neurorazvojnim i neurodegenerativnim bolestima (Rajman & Schratt, 2017). Često se nazivaju master regulatorima neuralnog razvića jer kontrolišu brojne procese kao što su migracija, diferencijacija, neuronalna polarizacija i formiranje sinapsi (Rajman & Schratt, 2017). Molekuli miRNK tokom razvića CNS-a regulišu ekspresiju gena u različitim tipovima neuronalnih ćelija, u različitim fazama razvića, čak i u određenim delovima ćelija, što ukazuje na njihovu bitnu ulogu u prostornoj i vremenskoj organizaciji genske ekspresije tokom razvića CNS-a (Rajman & Schratt, 2017). Uključene su u diferencijaciju i neurona i različitih tipova glijskih ćelija. Rezultati dosadašnjih eksperimentalnih istraživanja pokazuju da molekuli miR21 tokom razvića CNS-a podstiču proliferaciju neuralnih matičnih ćelija i neuralnu diferencijaciju (Zhang et al., 2018). Istovremeno, molekuli miR-134 i miR-184 uključeni su u procese proliferacije i migracije neuralnih progenitora, dok molekuli miR-9, miR-124, miR-137 i članovi familije let-7 (let-7a, let-7b) imaju ulogu u neuronalnoj diferencijaciji (Bian et al., 2013). Od njih, molekuli miR-9 i miR-124 najzastupljeniji su i najviše proučavane miRNK u mozgu. Pretpostavlja se da ove dve miRNK deluju putem inhibicije transkripcionog represora REST (engl. *RE1-Silencing Transcription Factor*) uključenog u inhibiciju neurogeneze, čime podstiču ovaj proces (Rajman & Schratt, 2017). Molekul MiR-9, zajedno sa miR-132, takođe učestvuje u regulaciji rasta i grananja dendrita, kao i u funkcionalnosti sinapsi (Giusti et al., 2014; Magill et al., 2010). Pored toga što učestvuju u neurogenezi tokom razvića, miRNK su uključene i u adultnu neurogenezu u neurogenim zonama mozga (Rajman & Schratt, 2017). MiR-153 je jedna od miRNK uključenih u regulaciju inicijacije gliogeneze. Svoju ulogu ostvaruje kroz represiju translacije NFIA i NFIB, čime odlaže preranu inicijaciju gliogeneze (Zhao et al., 2010). Molekul miR-92a učestvuje u astrocitnoj diferencijaciji nizvodno od NANOG (Dugas et al., 2010) dok bitnu ulogu u diferencijaciji oligodendrocita ostvaruju miR-219 i miR-338 (Zhao et al., 2010).

1.2.2. MiR-21

Molekul miR-21 je jedna od prvootkrivenih i najizučavanijih mikroRNK, čija je ekspresija značajno povećana u mnogim malignim bolestima uključujući glioblastom (Chan et al., 2005; Krichevsky & Gabriely, 2009). Ekspimirana je u velikom broju tipova ćelija i ima vitalne regulatorne uloge i u fiziološkim i patološkim uslovima (Jenike & Halushka, 2021). Molekul miR-21 deluje kao onkogen u različitim tipovima malignih tumora tako što inhibira apoptozu, a povećava proliferativni i migratorni kapacitet ćelija (Asangani et al., 2008; Bai & Bian, 2022; Chan et al., 2005). Rezultati studije Zhang i saradnici pokazali su da povećana ekspresija miR-21 dovodi do povećanog

proliferativnog kapaciteta neuralnih matičnih ćelija, najverovatnije preko Wnt/ β -katenin signalnog puta (Zhang et al., 2018). Povećan nivo ekspresije miR-21 u neuronalnim prekursorima dovodi do povećane ekspresije ciklina D1- CDK1 i smanjene ekspresije p21 inhibitora ćelijskog ciklusa (Zhang et al., 2018) koji su deo ovog signalnog puta. Takođe, povećan nivo ekspresije miR-21 dovodi do indukcije neuronalne diferencijacije (Zhang et al., 2018). Ekspresija ove miRNK se povećava u reaktivnim astrocitima nakon povrede (Liu et al., 2018), a njena regulacija je narušena u mnogim patologijama CNS-a, stoga se ona potencijalno može koristiti kao meta za lečenje različitih bolesti CNS-a (Bai & Bian, 2022). Narušena regulacija ove miRNK se može uočiti u neurodegenerativnim bolestima kao što je Alchajmerova bolest (AB), Parkinsonova bolest (PB) i amiotrofična lateralna skleroza (ALS) (Bai & Bian, 2022). Molekul miR-21 takođe deluje kao regulator imunološkog sistema, aktivirajući ili inhibirajući signalni put nuklearnog faktora kapa B (engl. *Nuclear factor- κ B*, NF- κ B) i NOD-sličnog receptorskog proteina 3 (engl. *NOD-like receptor protein 3*, NLRP3) koji su osnova hronično niskog nivoa sistemske inflamacije koja je prisutna tokom starenja (Olivieri et al., 2021). Eksperimenti na miševima pokazali su da utišavanje miR-21 pomoću *anti-sense-miR21* oligonukleotida dovodi do smanjenja inflamatornog odgovora u hroničnim inflamatornim bolestima kako što su sistemski lupus i psorijaza (Garchow et al., 2011; Guinea-Viniegra et al., 2014). Interesantno je takođe da se nivo ekspresije miR-21 značajno menja u tkivima i u krvotoku tokom starenja što je korelisano sa različitim upalnim stanjima i bolestima koje su vezane za proces starenja (Olivieri et al., 2021).

1.3. TERA2 pluripotentna embrionalna karcinomska ćelijska linija

Teratokarcinomi su maligni tumori koji spadaju u grupu tumora germinativnih ćelija. Sastoje od teratoma i embrionalnog karcinoma. Teratomi sadrže diferencirane somatske ćelije sva tri klicina lista (endoderm, mezoderm i ektoderm), dok embrionalni karcinomi čine nediferencirane embrionalne karcinomske ćelije koje po karakteristikama odgovaraju ćelijama unutrašnje ćelijske mase blastocista i primitivnog ektoderma (Andrews et al., 2005). Embrionalne karcinomske ćelije (EK ćelije) poreklom iz teratokarcinoma su pluripotentne, imaju sposobnost samo-obnavljanja i mogu se diferencirati u bilo koji ćelijski tip, a sposobne su i da generišu čitav tumor nakon transplantacije u organizam domaćina. Diferencijacija ovih ćelija po mnogim svojstvima podseća na embriogenezu (Andrews et al., 2005). Humane embrionalne karcinomske ćelije po morfološkim svojstvima, ekspresiji površinskih antigena, biohemijskim svojstvima i potencijalu za diferencijaciju pokazuju sličnost sa humanim embrionalnim matičnim ćelijama (Andrews, 1998; Sperger et al., 2003). Zbog navedenih osobina, humane EK ćelije smatraju se malignim pandanima humanih embrionalnih ćelija i predstavljaju pogodan model sistem za izučavanje *in vitro* diferencijacije ćelija. TERA2 je jedna od prvih uspostavljenih humanih ćelijskih linija. Ova ćelijska linija vodi poreklo od metastaze karcinoma pluća pacijenta koji je imao primarni embrionalni karcinom testisa (Trempe, 1975).

1.3.1. NTERA2 ćelijska linija

Od TERA2 ćelijske linije proizvedena je NTERA2 ćelijska linija. NTERA2 ćelijsku liniju je izolovao Piter Endrujs (engl. *Peter Andrews*) nakon transplantacije TERA2 ćelija u imunodeficientne „*nude*“ miševima. U miševima se formirao ksenograftni tumor sa karakteristikama teratoma (Andrews et al., 1984). Izolovani su pojedinačni klonovi NTERA2 ćelija, a među njima NTERA2 klon D1 (NT2/D1) predstavlja ćelijsku liniju koja se široko koristi u istraživanjima. Pored toga što su sposobne da formiraju teratome, NT2/D1 ćelije su podložne indukciji retinoičnom kiselinom (RK) i drugim agensima. Pod uticajem retinoične kiseline, NT2/D1 ćelije gube fenotip EK ćelija i počinju da se diferenciraju u pravcu neuralnog fenotipa do finalno diferenciranih neurona i astrocita (Andrews et al., 1984; Lee & Andrews, 1986; Pleasure & Lee, 1993; Pleasure et al., 1992). Stoga je ova ćelijska linija pogodna za izučavanje ranog razvića CNS (Marchal-Victorion et al., 2003). NT2/D1 mogu biti indukovane i drugim agensima kao što su koštani morfogenetski proteini (engl. *bone morphogenetic proteins*, BMP) i heksametilen bisacetamid (engl. *hexamethylene bisacetamide*, HMB). Tretman NTERA2 ćelija BMP proteinima uzrokuje diferencijaciju u ćelije koje predominantno ispoljavaju

epitelni fenotip, dok HMBA dovodi do diferencijacije u ćelije epiderma (Caricasole et al., 2000; Simoes & Ramos, 2007). Diferencijacija NT2/D1 ćelija pod dejstvom RK u mnogome podseća na embrionalno razviće nervnog sistema. Na primer, ekspresija nestina i vimentina, intermedijarnih filamenata karakterističnih za neuralne progenitore, kao i tenascina C i koneksina 43, povećava se ubrzo nakon izlaganja NT2/D1 ćelija RK (Marchal-Victorion et al., 2003). Pored toga, naglo se povećava i ekspresija gena uključenih u neuralnu diferencijaciju: Neurogenin 1 (Ngn1), PAX6 i drugih (Haile et al., 2014). NT2-neuroni (NT2/N) dobijeni diferencijacijom NT2/D1 pokazuju mnoge karakteristike primarnih neurona kao što je ekspresija markera neurona, citoskeletnog proteina MAP2 (engl. *Microtubule-associated protein-2*) (Klajn et al., 2014), oslobađaju neurotransmitere i učestvuju u sinaptičkoj transmisiji (Haile et al., 2014; Hill et al., 2012). Pored NT2/N diferencijacijom NT2/D1 ćelijske linije pod dejstvom RK dobijaju se i NT2-astrociti (NT2/A) (Haile et al., 2014; Sandhu et al., 2002). NT2/A pokazuju mnoge morfološke i funkcionalne karakteristike primarnih humanih astrocita i zbog toga predstavljaju dobar model sistem za njihovo proučavanje. Kao i primarni astrociti, NT2/A eksprimiraju specifične markere astrocita: glijski fibrilarni kiseli protein (GFAP) i Ca^{2+} -vezujući protein iz grupe S100 (S100B), a takođe eksprimiraju i glutamatne transportere EAAT1 (engl. *excitatory amino acid transporter 1*) i EAAT2 (engl. *excitatory amino acid transporter 2*), humane homologe pacovskih GLAST i GLT-1 (engl. *glutamate transporter 1*), za koje su *in vitro* studije pokazale da su funkcionalni u preuzimanju glutamata (Sandhu et al., 2002). Kao i primarni astrociti tokom postnatalnog sazrevanja, NT2-A pokazuju smanjenje proliferativnog kapaciteta tokom sazrevanja *in vitro*, a pokazuju i reaktivni odgovor na povredu što se ogleda u promeni iz morfologije nalik protoplazmatičnoj u fibroznu morfologiju, povećanju proliferativnog kapaciteta i povećanoj ekspresiji GFAP-a (Sandhu et al., 2002).

1.4. Astrociti

Astrociti predstavljaju najbrojniji tip glijskih ćelija sa glavnom homeostatskom ulogom u CNS-u. Ove ćelije čine čine ~20-40% glijskih ćelija mozga (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Pored toga što obezbeđuju mehaničku, metaboličku i trofičku potporu neuronima, ove ćelije učestvuju u formiranju i modulaciji sinapsi, neurotransmisiji, održavanju jonske i vodene homeostaze i bitan su deo krvno-moždane barijere (Slika 3) (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Uzrok brojnih patologija CNS-a je gubitak fizioloških funkcija astrocita i/ili sticanje novih, štetnih funkcija (Sofroniew & Vinters, 2010). Jedinstvena karakteristika astrocita je njihova sposobnost da se, u odgovoru na različita patološka stanja mozga (ishemija, mehanička povreda, infekcije, starenje i neurodegenerativne bolesti), transformišu iz utišanog u aktivirano stanje u procesu poznatom kao reaktivna astroglioza (Sofroniew & Vinters, 2010).

1.4.1. Gliogeneza

Astrociti su neuralne ćelije ektodermalnog porekla, koji, kao i neuroni i oligodendrociti, vode poreklo od radijalne glije (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Neuroni tokom razvića nastaju od progenitorskih ćelija koje nastaju asimetričnom deobom radijalne glije u procesu poznatom kao neurogeneza. Prvi deo razvića nervnog sistema usmeren je na nastajanje neurona. Kada se neurogeneza završi, proces poznat kao „gliogeni aktivator” (engl. *gliogenic switch*) označava početak diferencijacije neuralnih progenitora u astrocite (Kang et al., 2012). Ovaj proces se naziva gliogeneza, strogo je transkripciono regulisan, a ključnu ulogu u regulaciji ovog procesa ostvaruju regulatori transkripcije SOX9 i NFIA (Freeman, 2010; Kang et al., 2012). Astrociti mogu nastati transformacijom radijalne glije, od NG2 (engl. *nerve/glial antigen 2*) glijskih ćelija, kao i proliferacijom već diferenciranih astrocita (Molofsky & Deneen, 2015; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Embrionalna gliogeneza je odgovorna za nastanak samo dela astrocitne populacije. Većina astrocita se generiše tokom druge i četvrte nedelje postnatalnog razvića kada broj ćelija glije raste od ~4 miliona do ~140 miliona (Bandeira et al., 2009). Za razliku od neurona koji su terminalno diferencirani po završetku embrionalne neurogeneze, sazrevanje astrocita se nastavlja i tokom ranog postnatalnog perioda (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Astrociti u postnatalnom mozgu jedno

vreme zadržavaju visok proliferativni potencijal (Zhou, 2016). Smatra se da je u održavanje visokog proliferativnog kapaciteta astrocitnih prekursora i ranih postnatalnih astrocita uključen protein SOX2 (Bani-Yaghoub et al., 2006). Tokom ranog postnatalnog razvića, astrociti migriraju duž nastavaka radijalne glijе (Lagos-Cabre et al., 2019) i kada stignu do svojih finalnih pozicija u korteksu sive mase i u beloj masi (Jacobsen & Miller, 2003; Tabata, 2015), prelaze iz visoko proliferativnog u „utišano“ (zrelo/neproliferišuće) stanje (Placone et al., 2015; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Utišani astrociti se odlikuju reverzibilnim zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G0 fazi (Huang et al., 2022). Utišanost astrocita (engl. *astrocyte quiescence*) je aktivno održavano stanje, posredstvom transkripcionih i post-transkripcionih mehanizama, u kome ćelije opstaju u svom ne-proliferativnom stanju, bez gubljenja svog proliferativnog potencijala u potpunosti. Ovo je takozvano "stanje pripravnosti" koje im omogućava brzu aktivaciju nakon povrede (Kang & Hebert, 2011; Marescal & Cheeseman, 2020).

1.4.2. Tipovi astrocita

Astrociti predstavljaju veoma heterogenu grupu glijskih ćelija koje se na osnovu morfologije, ekspresije karakterističnih markera, kao i funkcionalnih karakteristika razlikuju u zavisnosti od regiona mozga u kome se nalaze (Gradisnik & Velnar, 2023; Verkhratsky et al., 2023; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Astrociti se najčešće opisuju kao ćelije zvezdastog oblika sa razgranatim nastavcima koji se pružaju od ćelijskog tela. Na osnovu razlika u morfologiji i lokalizaciji u CNS-u, mogu se izdvojiti dva glavna tipa astrocita: protoplazmatični astrociti, dominantno lokalizovani u sivoj masi i fibrozni astrociti lokalizovani u beloj masi CNS-a (Slika 2) (Oberheim et al., 2012; Sofroniew & Vinters, 2010). Pored ova dva najzastupljenija tipa, u mozgu postoje i drugi tipovi astrocita uključujući: Bergmanovu gliju u cerebelumu, Milerove ćelije u retini, pituците u neurohipofizi, tanićite u hipotalamusu i određenim delovima kičmene moždine, perivaskularne astrocite i druge (Oberheim et al., 2012; Verkhratsky et al., 2023). Iako do sada nije pronađen jedinstveni marker astrocita, GFAP, protein iz grupe intermedijarnih filamenata tipa III (Potokar et al., 2020), se najčešće koristi za identifikaciju ovih ćelija u CNS-u (Oberheim et al., 2012; Potokar et al., 2020). Protein GFAP poseduje različite izoforme uključujući α , β , γ , δ i κ koje su heterogeno eksprimirane u različitim tipovima astrocita u CNS-u (Moeton et al., 2016; Sofroniew, 2014). Iako se najčešće koristi za identifikaciju astrocita, ovaj citoskeletni protein nije eksprimiran u svim tipovima astrocita i nisu sve ćelije koje ga eksprimiraju u CNS-u astrociti (Oberheim et al., 2012). GFAP se pre svega smatra markerom fibroznih astrocita u CNS-u (Tabata, 2015), dok je njegova ekspresija manje uočljiva u protoplazmatičnim astrocitima (Molofsky & Deneen, 2015). Pored astrocita, u CNS-u GFAP eksprimiraju neuralne matične ćelije u subventrikularnoj zoni (Oberheim et al., 2012; Potokar et al., 2020). Ekspresija ovog citoskeletnog elementa je jedno od glavnih morfoloških obeležja reaktivnih astrocita (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Na nivou pojedinačne ćelije, ekspresija GFAP-a najbolje se uočava u primarnim nastavcima astrocita, dok nije vidljiva u njihovim finim, razgranatim nastavcima. Shodno tome, GFAP imunofluorescentno obeležavanje može značajno da potceni stepen grananja i teritoriju koju pojedinačan astrocit zauzima u poređenju sa drugim metodama detekcije, kao što su Goldži bojenje, ekspresija reporterskih proteina poput zelenog fluorescentnog proteina (GFP) i β -galaktozidaze, ili ispunjavanje astrocita fluorescentnim bojama (Bushong et al., 2002; Sofroniew & Vinters, 2010). Drugi marker koji se često koristi za identifikaciju astrocita je S100B (Donato et al., 2013). Protein S100B u CNS-u je uključen u regulaciju ćelijske proliferacije i diferencijacije i poznat je kao inhibitor apoptoze (Donato et al., 2013; Verkhratsky & Nedergaard, 2018), a njegova ekspresija se povećava u reaktivnim astrocitima (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Ovaj protein se sekretuje iz astrocita tokom aktivacije i može ostvariti kako neuroprotektivne, tako i neurotoksične efekte na okolno tkivo (Donato et al., 2013; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Vimentin je još jedan od markera koji se koristi za identifikaciju astrocita. Pripada istoj grupi intermedijarnih filamenata kao GFAP (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Tokom razvića njegova ekspresija je ograničena na neuralne progenitore i nezrele postnatalne astrocite, dok se tokom daljeg sazrevanja CNS-a njegova ekspresija u astrocitima smanjuje (Potokar et al., 2020; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). U adultnom mozgu njegova ekspresija je ograničena na određene astrocite u

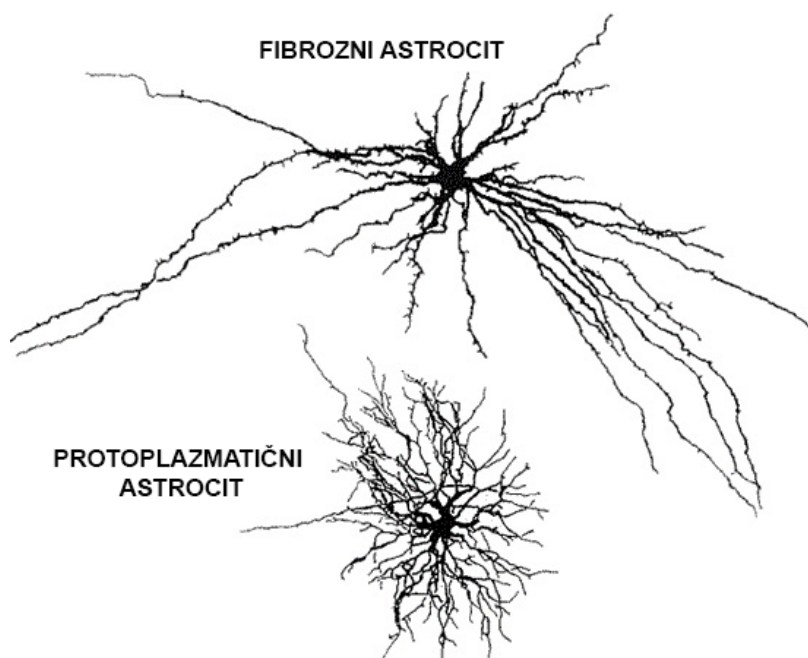
korteksu, hipokampusu i žuljevitom telu, Bergmanovu gliju, Milerovu gliju i tanicite (Potokar et al., 2020; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Prisutan je i u adultnim neuralnim matičnim ćelijama u neurogenim zonama, a ekspresija mu se povećava tokom aktivacije astrocita (Doetsch et al., 1999; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Za karakterizaciju astrocita se koriste i drugi marker kao što su glutamin sintetaza (engl. *glutamine synthetase*) i član porodice aldehid dehidrogenaze 1 L1 (engl. *aldehyde dehydrogenase 1 family member L1, Aldh1L1*) (Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

1.4.2.1. Protoplazmatični astrociti

Protoplazmatični astrociti predstavljaju najbrojniji tip astrocita u sivoj masi mozga i kičmene moždine (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Ovaj tip astrocita uključen je u usmeravanje razvića, održavanje homeostaze jona i neurotransmitera, kao i sinaptičku transmisiju (Bushong et al., 2002; Wei & Morrison, 2025). Karakteriše ih okruglo ćelijsko telo, sa nekoliko primarnih nastavaka koji se granaju u veliki broj sitnih nastavaka koji čine mrežu (Slika 2) (Oberheim et al., 2012; Sofroniew & Vinters, 2010). Ove ćelije u sivoj masi zauzimaju nezavisne teritorije koje se ne preklapaju (Wei & Morrison, 2025). Pojedinačan humani protoplazmatični astrocit u korteksu stupa u kontakt sa 270.000 do 2 miliona sinapsi (Vasile et al., 2017). Protoplazmatični astrociti istovremeno ostvaruju kontakt sa krvnim sudovima preko svojih astrocitnih stopala (engl. *endfeet*). Na taj način, ove ćelije učestvuju u modulaciji i sinhronizovanju protoka krvi sa sinaptičkom aktivnošću neurona kako bi se poboljšala efikasnost neuronalne komunikacije (Wei & Morrison, 2025). Iako se GFAP koristi za identifikaciju protoplazmatičnih astrocita, studije su pokazale da ovaj marker ne oslikava u potpunosti njihovu kompleksnu morfologiju i boji samo 15% ukupnog volumena ćelije. Najuočljiviji je u njihovim primarnim nastavcima, kao i u astrocitnim stopalima, dok nije detektovan u njihovim tankim razgranatim nastavcima (Bushong et al., 2002; Sofroniew & Vinters, 2010).

1.4.2.2. Fibrozni astrociti

Fibrozni astrociti su raspoređeni duž moždanih vlakana bele mase i pružaju im mehaničku podršku (Oberheim et al., 2012; Oberheim et al., 2009; Wei & Morrison, 2025). Preko svojih nastavaka ove ćelije stupaju u kontakt sa Ranvijerovim suženjima, mestima obnavljanja i propagacije akcionih potencijala (Li et al., 2016; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Fibrozni astrociti, za razliku od protoplazmatičnih astrocita imaju manji broj izduženih nastavaka (Slika 2). Imajuću u vidu da u beloj masi ne postoji veliki broj sinapsi, smatra se da fibrozni astrociti ne učestvuju u regulaciji sinaptičke aktivnosti već su uključeni u održavanje metaboličke i jonske homeostaze (Vasile et al., 2017). Pokazano je da formiranje mijelina u velikoj meri zavisi od komunikacije između fibroznih astrocita



Slika 2. Morfologija protoplazmatičnog i fibroznog astrocita. Na slici se uočava da protoplazmatični astrociti (siva masa) poseduju veliki broj razgranatih nastavaka, dok fibrozni astrociti (bela masa), poseduju manji broj izduženih nastavaka. Preuzeto i izmenjeno iz Gottipati et al., 2020.

i oligodendrocita, a stabilnost akcionih potencijala u Ranvijerovim čvorovima zavisi od komponenti vanćelijskog matriksa u čijem formiranju fibrozni astrociti imaju bitnu funkciju (Miguel-Hidalgo, 2023). Značajna uloga fibroznih astrocita pokazana je i u oslobađanju glutaciona i pružanju metaboličke potpore oligodendrocitima (Li et al., 2016; Oberheim et al., 2009).

Pored predominantno zastupljenih fibroznih i protoplazmatičnih astrocita, u ljudskom mozgu postoje još dve grupe astrocita koje se ne sreću kod drugih vrsta: interlaminarni astrociti u prvom sloju korteksa i astrociti sa varikoznim nastavcima (engl. *varicose projection*) u petom i šestom sloju korteksa (Oberheim et al., 2012; Oberheim et al., 2009). Humani protoplazmatični i fibrozni astrociti su znatno veći i kompleksniji u odnosu na glodarske astrocite. Astrocitna stopala humanih protoplazmatičnih astrocita se, u odnosu na glodarske, intenzivnije boje GFAP-om (Oberheim et al., 2009). Takođe, humani astrociti brže propagiraju Ca^{2+} talase u odgovoru na neurotransmitere (Oberheim et al., 2009). Za razliku od humanih protoplazmatičnih astrocita, astrociti glodara stupaju u kontakt 20.000–120.000 sinapsi unutar svog domena (Vasile et al., 2017).

1.4.3. Uloge astrocita

1.4.3.1. Formiranje i modulacija sinapsi

Astrociti aktivno učestvuju u formiranju i eliminisanju sinapsi i regulaciji njihove funkcije i plastičnosti u fiziološkim i patološkim uslovima (Eroglu & Barres, 2010). Oslobađanjem različitih solubilnih supstanci među kojima su trombospondin, holesterol i proteini vanćelijskog matriksa, astrociti su uključeni u formiranje sinapsi tokom razvića (Christopherson et al., 2005; Ehlers, 2005; Mauch et al., 2001). Takođe, studija na pacovima pokazala je da u ćelijskim ko-kulturama neurona i astrocita dolazi do formiranja većeg broja sinapsi pod uticajem različitih faktora koje luče astrociti, u odnosu na kulture koje čine isključivo neuroni (Nagler et al., 2001). Astrociti kroz lučenje različitih solubilnih faktora igraju važnu ulogu u proliferaciji, migraciji i diferencijaciji oligodendrocita tokom razvića i utiču na brzinu mijelinizacije aksona (Slika 3) (Kiray et al., 2016). Astrociti stupaju u blizak kontakt sa pre- i post- sinaptičkim završecima neurona i formiraju strukturu poznatu kao tripartitna sinapsa (engl. *Tripartite synapse*) (Slika 3) (Perea et al., 2009). Pored toga što sekretuju proteine koji učestvuju u sinaptogenezi, astrociti eksprimiraju različite receptore za neurotransmitere na svojoj membrani (Farhy-Tselnicker & Allen, 2018). Neurotransmitere koje neuroni oslobađaju u sinaptički prostor prepoznaju receptori smešteni na membrani astrocita. Ovi neurotransmiteri izazivaju porast unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} , što pokreće oslobađanje gliotransmitera iz astrocita. Oslobodeni gliotransmiteri – među kojima su ATP, adenozin, gama-aminobuterna kiselina (engl. *gamma aminobutyric acid*, GABA) i D-serin i u određenim regionima mozga, glutamat (de Ceglia et al., 2023). Ovi gliotransmiteri mogu delovati inhibitorno ili ekscitatorno na sinaptičku aktivnost. Na taj način, astrociti značajno doprinose modulaciji sinaptičke aktivnosti (Farhy-Tselnicker & Allen, 2018; Lazic et al., 2022; Perea et al., 2009). Astrociti preuzimaju višak neurotransmitera kao što su glutamat, GABA, adenozin i norepinefrin i na taj način održavaju homeostazu neurotransmitera u sinaptičkom prostoru (Lazic et al., 2022; Sofroniew & Vinters, 2010). Preuzeti transmiteri se u astrocitima konvertuju u prekursore kao što je glutamin, koji se potom oslobađa u sinaptički prostor i koristi od strane neurona za ponovnu sintezu neurotransmitera (Sofroniew & Vinters, 2010). Astrociti takođe učestvuju u energetsom metabolizmu tako što preuzimaju glutamat iz krvotoka i pretvaraju ga u laktat, koji neuronima služi kao energetski supstrat (Deitmer et al., 2019; Simard & Nedergaard, 2004). Takođe, ove ćelije su glavno skladište glikogena u periodima visoke nervne aktivnosti i hipoglikemije, a mogu da ga pretvore u laktat kad je to potrebno (Brown & Ransom, 2007; Lazic et al., 2022).

1.4.3.2. Održavanje homeostaze jona i glutamata

Astrociti preko svojih nastavaka ostvaruju kontakt sa sinapsama u mozgu i učestvuju u održavanju homeostaze vode, jona, pH i neurotransmitera (Sofroniew & Vinters, 2010). Astrociti učestvuju u održavanju homeostaze različitih jona uključujući jone kalijuma (K^+), natrijuma (Na^+), kalcijuma (Ca^{2+}) i hlora (Cl^-) (Cheng et al., 2019). U periodu pojačane sinaptičke aktivnosti vanćelijska koncentracija K^+ raste. Jedan od najzastupljenijih kanala na membrani astrocita je ulazno-ispravljački K^+ kanal 4.1 (engl. *inwardly rectifying potassium channel Kir4.1*, Kir4.1) koji uklanja višak K^+ iz vanćelijske sredine i na taj način održava homeostazu K^+ u CNS-u (Kofuji & Newman, 2004). Kanali Kir4.1 funkcionalno su spregnuti sa glutamatnim transporterima te posredno uključeni i u regulaciju vanćelijskog nivoa glutamata (Nwaobi et al., 2016). Glutamat predstavlja primarni ekscitatorni neurotransmiter u CNS (Andersen et al., 2021; Sattler & Rothstein, 2006). Nakon oslobađanja iz neurona u oblast sinapse, vezuje se za receptore na pre- i post-sinaptičkoj membrani neurona, kao i za receptore na membrani astrocita i pokreće kompleksnu unutarćelijsku signalnu kaskadu (Sattler & Rothstein, 2006). Blagovremeno uklanjanje glutamata iz oblasti sinapse je od ključne važnosti za održavanje homeostaze imajući u vidu da povećana koncentracija ovog neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini može dovesti do hiperekscitabilnosti neurona i njihovog oštećenja ili smrti (Andersen et al., 2021). Ovaj fenomen poznat je kao ekscitotoksičnost i nalazi se u osnovi mnogih poremećaja CNS-a uključujući i neurodegenerativne bolesti (Sattler & Rothstein, 2006). GLAST/EAAT1 i GLT-1/EAAT2 su dva glavna glutamatna transportera na membrani astrocita (Andersen et al., 2021; Lazic et al., 2022). GLAST/EAAT1 je primarni transporter glutamata u cerebelumu i retini (Sattler & Rothstein, 2006; Todd & Hardingham, 2020; Torp et al., 1994), dok je GLT-1/EAAT2 primarni transporter u svim drugim regionima mozga, posebno u hipokampusu i korteksu (Pajarillo et al., 2019). Ovi transporteri vrše aktivan transport glutamata korišćenjem koncentracionog gradijenta jona natrijuma (Na^+) i kalijuma (K^+) (Todd & Hardingham, 2020). Smanjena ekspresija glutamatnih transportera je najčešći uzrok ekscitotoksičnosti i oštećenja ili smrti neurona u različitim patologijama CNS-a (Sattler & Rothstein, 2006). Iz tog razloga, mnogi terapijski pristupi su fokusirani na strategije za povećanje ekspresije ovih transportera u patološkim stanjima (Fontana, 2015).

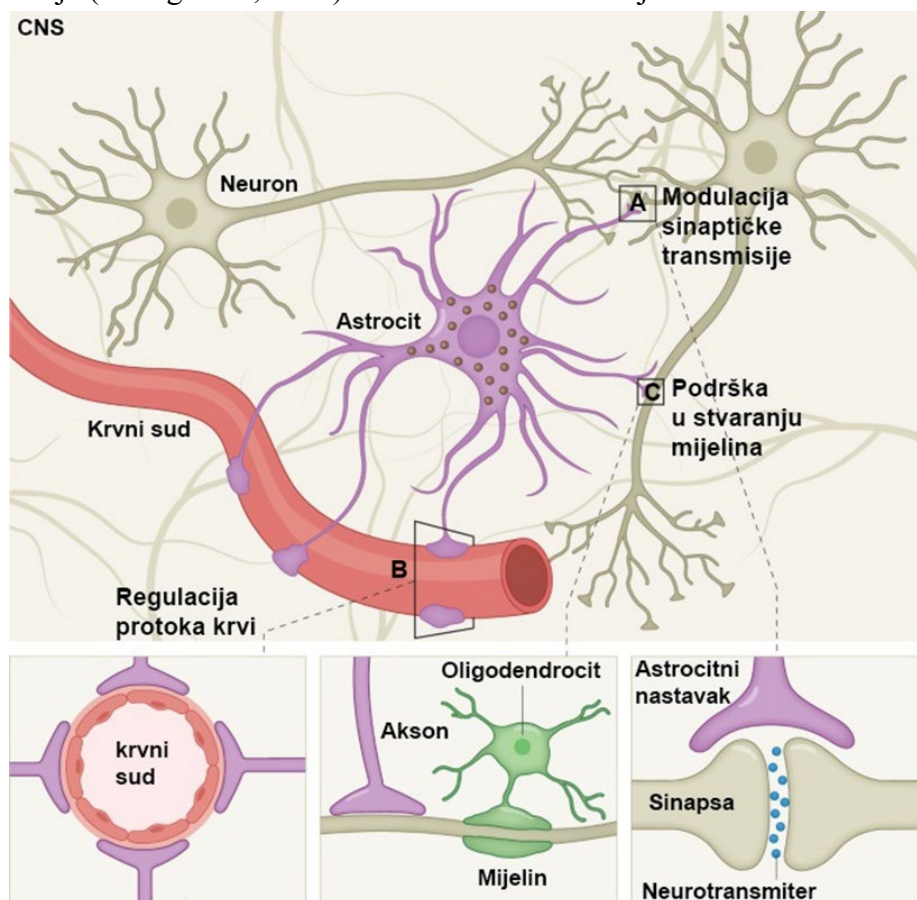
1.4.3.3. Regulacija krvno-moždane barijere

Astrociti su ključni elementi krvno-moždane barijere (KMB). Strukturno, KMB čine endotelne ćelije kapilara koje međusobno formiraju čvrste veze (engl. *tight junctions*) koje su okružene bazalnom laminom i astrocitnim stopalima (Sofroniew & Vinters, 2010) (Slika 3). Istraživanja pokazuju da astrociti luče molekule kao što su prostaglandini, azot oksid i arahnoidna kiselina, koji povećavaju ili smanjuju promer krvnih sudova i na taj način regulišu protok krvi u mozgu (Iadecola & Nedergaard, 2007; Sofroniew & Vinters, 2010). Preko svojih nastavaka istovremeno komuniciraju i sa neuronima i sa endotelnim ćelijama krvnih sudova i na taj način mogu da usklade protok krvi sa sinaptičkom aktivnošću neurona (Iadecola & Nedergaard, 2007). Astrociti su uključeni i u regulaciju homeostaze vode u CNS-u preko akvaporin 4 kanala (engl. *aquaporin 4*, AQP4) koji su gusto raspoređeni na membrani njihovih astrocitnih stopala koja ostvaruju blizak kontakt sa krvnim sudovima i učestvuju u razmeni vode preko krvno-moždane barijere (Salman et al., 2022). Ovi kanali su uključeni u regulaciju ćelijske zapremine, astrocitne migracije, a imaju bitnu ulogu u glimfatičkom sistemu (Salman et al., 2022).

1.4.4.4. Imunske funkcije astrocita

Astrociti i mikroglia i imaju glavnu odbrambenu ulogu u CNS-u (Matejuk & Ransohoff, 2020). Mikroglia predstavlja glavne imunske ćelije CNS-a koje u fiziološkim uslovima nadgledaju okolinu i vrše fagocitozu patogena, apoptotskih ćelija i ćelijskih ostataka (Matejuk & Ransohoff, 2020). Astrociti u fiziološkim uslovima proizvode antioksidativne molekule kao što su glutation, enzim super-oksida dismutaza i askorbat i štite nervno tkivo od slobodnih radikala (Chen et al., 2020). Pored toga, učestvuju i u fagocitozi patogena koje prepoznaju pomoću različitih receptora na svojoj

membrani, uključujući TLR receptore (engl. *Toll like receptors*) koje na svojoj membrani poseduje i mikroglia. Usled različitih patoloških stanja u CNS-u (infekcije, moždani udar, neurodegenerativne bolesti i druga) mikroglia i astrociti bivaju aktivirani i prolaze kroz značajne morfološke i funkcionalne promene (Garland et al., 2022). Aktivirani astrociti i mikroglia reaguju na različite medijatore koje oslobađaju mrtve i oštećene ćelije kao što su ATP, IL6 i hemokini, i zatim vrše fagocitozu tih ćelija (Cheng et al., 2019). Oni takođe i oslobađaju različite faktore uključujući



Slika 3. Shematski prikaz određenih funkcija astrocita. Astroцити u adultnom mozgu ostvaruju mnoge funkcije važne za održavanje homeostaze. (A) Astroцитnim stopalima astroцити stupaju u kontakt sa sinapsama i učestvuju u modulaciji sinaptičke transmisije. (B) Astroцити su bitna komponenta krvno-moždane barijere i učestvuju u regulaciji protoka krvi u mozgu i transportu nutrijenata od krvnih sudova do neurona. (C) Tokom razvika, ove ćelije kroz lučenje faktora rasta ostvaruju pozitivan efekat na mijelinizaciju neurona. Preuzeto i izmenjeno iz Abdelhak et al., 2022.

citokine, hemokine, neurotrofne faktore, glutamat i ATP koji privlače, usmeravaju i organizuju ćelije imunskog sistema i time modulišu inflamatorni odgovor (Farina et al., 2007; Garland et al., 2022; Matejuk & Ransohoff, 2020). Koordinisane interakcije između astrocita, mikroglie i ćelija imunskog sistema su stoga od ključnog značaja za regulaciju i sprečavanje daljeg širenja inflamacije u različitim patologijama CNS-a (Liddelow & Barres 2017). Reaktivni astrociti i mikroglia mogu osloboditi i pro- i anti-inflamatorne molekule u zavisnosti od tipa i faze povrede, koji mogu ostvariti pozitivno ili negativno dejstvo na oporavak nervnog tkiva (Liddelow & Barres, 2017).

Iako je aktivacija astrocita usko povezana sa aktivacijom mikroglie i drugim imunskim ćelijama, istraživanja u okviru ove teze su se primarno fokusirala na izučavanje različitih aspekata aktivacije astrocita u procesu poznatom kao reaktivna astroglioza.

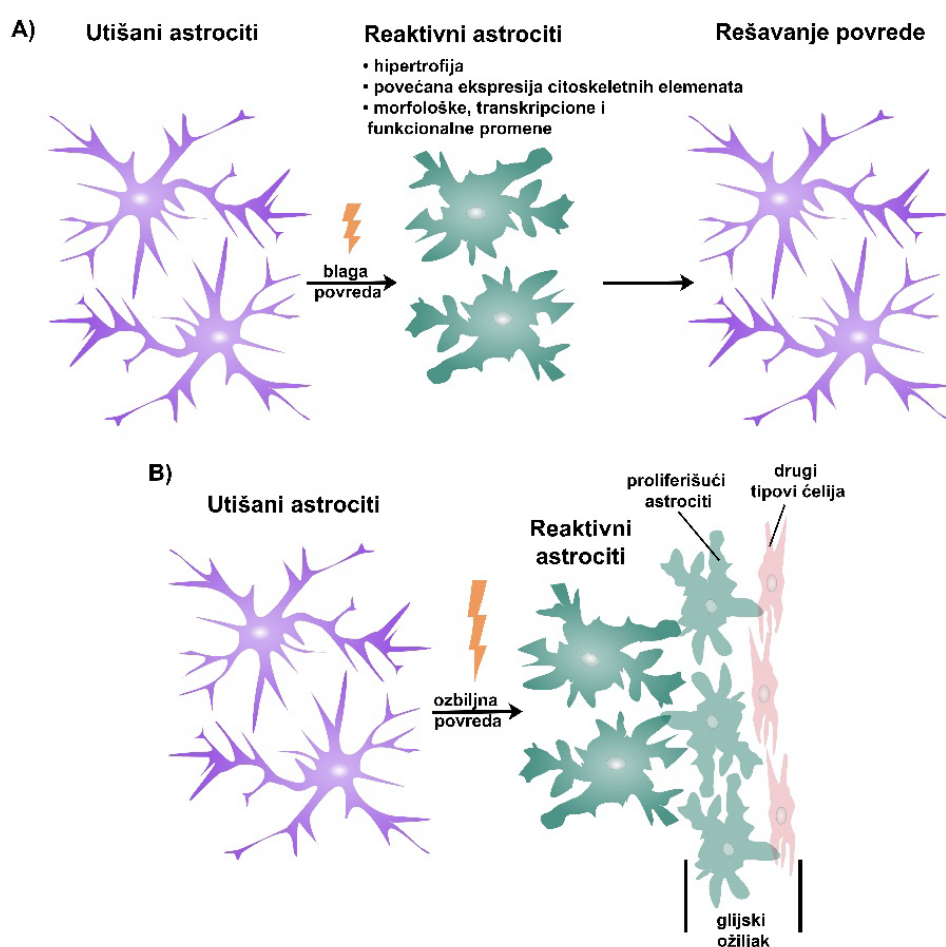
1.4.4. Reaktivna astroglioza

Reaktivna astroglioza predstavlja odbrambenu reakciju astrocita koja može biti uzrokovana različitim patološkim stanjima u mozgu i kičmenoj moždini, uključujući akutne povrede (mehaničke lezije moždanog tkiva), ishemiju, bakterijske ili virusne infekcije, neurodegenerativne bolesti i starenje (Ben Haim et al., 2015; Sofroniew, 2009). Reaktivni astrociti prolaze kroz brojne morfološke,

transkripcione i funkcionalne promene koje utiču na konačan ishod svih bolesti CNS-a. Reaktivna astroglioza je dugo bila posmatrana kao proces koji uglavnom ima štetne efekte na oporavak nervnog tkiva nakon povrede, pre svega usled formiranja glijskog ožiljka koji lokalizuje inflamaciju i sprečava njeno širenje, ali istovremeno predstavlja mehaničku barijeru za ponovno uspostavljanje sinapsi. Danas je poznato da je ovo kompleksan proces koji, u zavisnosti od ozbiljnosti i lokalizacije povrede, uključuje promene u ekspresiji gena, različite stepene proliferacije i hipertrofije ćelijskog tela astrocita, a u ozbiljnijim slučajevima dovodi do formiranja glijskog ožiljka (Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010).

1.4.4.1. Tipovi reaktivne astroglioze

Na osnovu težine povrede, reaktivni astrociti se mogu klasifikovati u dva glavna podtipa: hipertrofične astrocite i reaktivne astrocite koji formiraju ožiljak (Sofroniew, 2014, 2020). Kao rezultat blagih povreda CNS-a (blaga trauma, virusne ili bakterijske infekcije) astrociti postaju hipertrofični i prolaze kroz različite nivoe molekularnih, funkcionalnih i fizioloških promena. Nakon ovakvih povreda, astrociti zadržavaju svoje osnovne ćelijske karakteristike i morfologiju i ne povećava im se proliferativni kapacitet. Oni takođe “ostaju” na svojim inicijalnim pozicijama i nastavljaju da interaguju sa istim tipom ćelija kao i u zdravom CNS-u (Slika 4) (Sofroniew, 2009, 2014, 2020). Kod ovog tipa reaktivne astroglioze, moguć je oporavak i ne dolazi do trajne reorganizacije tkiva, posebno ako se ukloni dejstvo faktora koji je izazvao povredu (Slika 3) (Sofroniew, 2009, 2014, 2020). Kao odgovor na povrede CNS-a poput penetrirajuće traume, teške



Slika 4. Tipovi reaktivnih astrocita. Na osnovu težine povrede CNS, reaktivni astrociti mogu se klasifikovati u dve grupe: hipertrofični astrociti i reaktivni astrociti koji formiraju glijski ožiljak. **(A)** U odgovoru na blage povrede CNS-a (blaga trauma, virusne ili bakterijske infekcije, ne dolazi do proliferacije astrocita, oni ostaju na svojim originalnim pozicijama i nastavljaju da interaguju sa istim tipom ćelija kao u zdravom CNS-u. Ovaj tip povrede ne dovodi do formiranja glijskog ožiljka. **(B)** Kao rezultat ozbiljnijih povreda, astrociti proliferiraju i migriraju na mesto povrede gde

formiraju glijski ožiljak. Glijski ožiljci sadrže novoformirane astrocite i druge tipove ćelija. Teže povrede dovode do značajnog i trajnog rearanžmana tkiva i inhibiraju regeneraciju aksona na mestu povrede. Preuzeto i izmenjeno iz Lazic et al., 2022.

kontuzivne traume, ishemije, infekcije, autoimunske inflamacije, nakupljanja toksina, neurodegenerativnih bolesti ili poremećaja krvno-moždane barijere, reaktivni astrociti migriraju na mesto povrede gde proliferišu i formiraju glijski ožiljak koji služi kao granica koja razdvaja oštećeno tkivo od okolnog zdravog nervnog tkiva (Sofroniew, 2009, 2014) (Slika 4). Proliferišući astrociti nastaju ili transformacijom zrelih astrocita koji su već prisutni u blizini lezije, ili diferencijacijom od neuralnih progenitora (Sofroniew, 2009, 2014). Fiziološka uloga glijskog ožiljka je da spreči dalja oštećenja i inflamaciju okolnog zdravog nervnog tkiva (Slika 4). S druge strane, dovodi do trajne reorganizacije tkiva i može dovesti do nekih štetnih efekata na oporavak CNS-a kao što je sprečavanje regeneracije aksona na mestu povrede (Hara et al., 2017; Shigetomi et al., 2019; Sofroniew, 2009, 2014, 2020).

1.4.4.2. Morfološke, transkripcione i funkcionalne promene reaktivnih astrocita

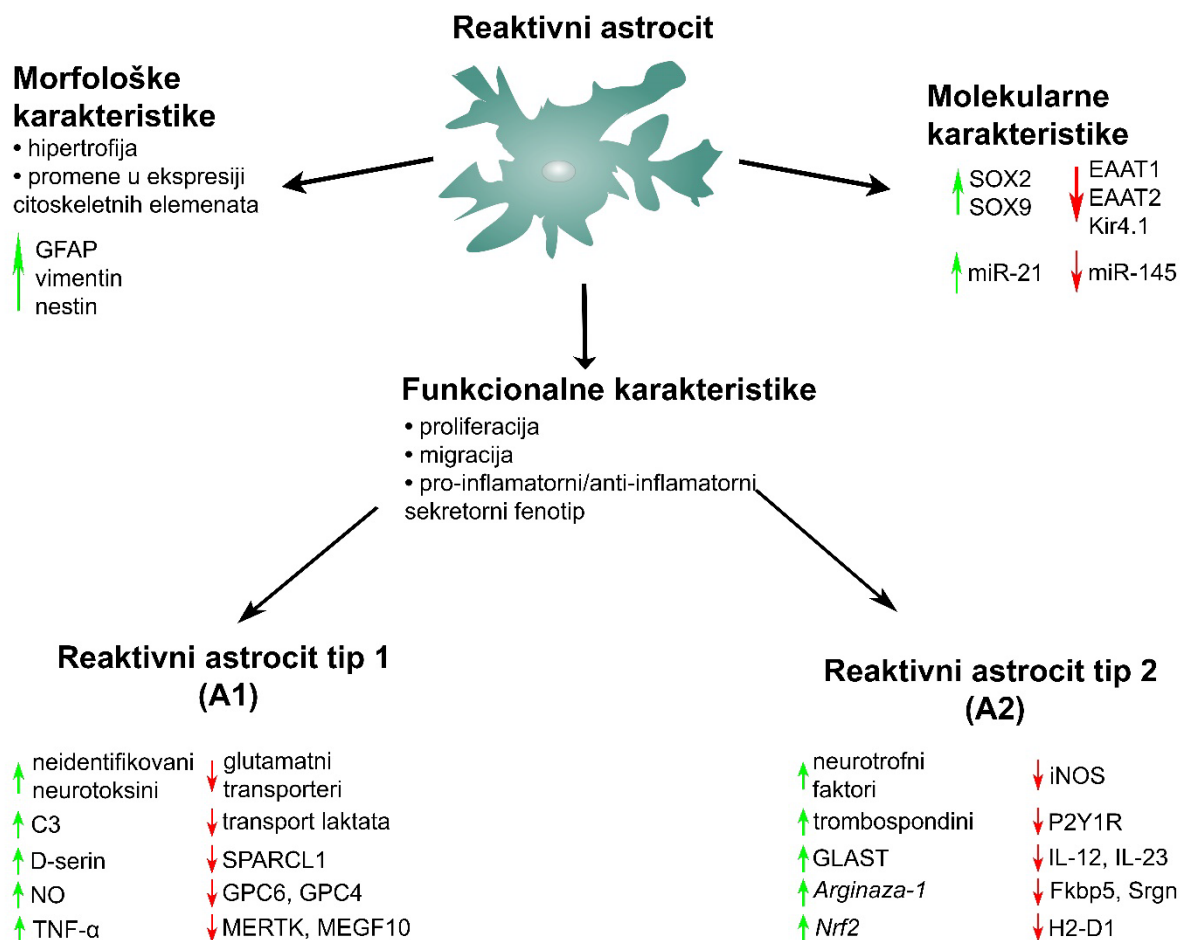
Reaktivni fenotip astrocita varira u zavisnosti od tipa povrede, regiona CNS-a pogođenog povredom kao i lokalizacije astrocita u odnosu na povredu (Sofroniew, 2014; Zamanian et al., 2012). Najistaknutije morfološke promene reaktivnih astrocita su hipertrofija ćelijskog tela i nastavaka i povećana ekspresija GFAP-a (Slika 5) (Ben Haim et al., 2015; Yu et al., 2012).

Morfološke i funkcionalne promene u reaktivnim astrocitima su posledica složenih i precizno regulisanih promena u profilu ekspresije njihovih gena. Reaktivni astrociti ponovo stiču neke od prekursorskih karakteristika kao što su povećan proliferativni i migratorni kapacitet i ponovna ekspresija citoskeletnih elemenata karakterističnih za ranije faze sazrevanja (vimentin i nestin) (Bernal & Arranz, 2018; Lagos-Cabre et al., 2019; Liu et al., 2014; Luo et al., 2017; Shimada et al., 2012; Sofroniew, 2009) (Slika 5). Mnoge studije pokazuju da reaktivni astrociti ponovo aktiviraju genetički program karakterističan za astrocitne prekursore i rane postnatalne astrocite (Chaboub et al., 2016; Zhou, 2016). Na primer, ekspresija proteina SOX2, ključnog za održavanje visokog proliferativnog potencijala astrocita tokom razvića, značajno raste u reaktivnim astrocitima (Slika 5) (Bani-Yaghoub et al., 2006). Studija Bani-Yaghoub i saradnika povezuje ponovnu ekspresiju SOX2 sa povećanim proliferativnim kapacitetom ovih ćelija nakon povrede. Pored toga, ekspresija proteina SOX9, ključnog za inicijaciju gliogeneze, takođe je povećana u reaktivnim astrocitima (Slika 5) (Sun et al., 2017). Ipak, molekularni mehanizmi delovanja i uloga ovih regulatornih proteina transkripcije u reaktivnim astrocitima još uvek nisu detaljno razjašnjeni. Pored SOX gena, mikroRNK imaju važne regulatorne uloge u aktivaciji astrocita (Bhalala et al., 2012; Mor et al., 2011; Ziu et al., 2011). Pokazano je da miR-21, čija se ekspresija povećava u reaktivnim astrocitima, ostvaruje pozitivne efekte na oporavak nervnog tkiva nakon povrede (Slika 5) (Bhalala et al., 2012). Povećana ekspresija miR-21 se uočava i u reaktivnim astrocitima nakon povrede kičmene moždine (Liu et al., 2018). Studija Liu i saradnici je pokazala da miR-21 ostvaruje pozitivan efekat na oporavak nervnog tkiva preko sekrecije neurotrofnih faktora BDNF (engl. *brain-derived growth factor*) i NGF (engl. *nerve growth factor*), dovodi do povećanja proliferativnog kapaciteta ovih ćelija i u isto vreme inhibira njihovu apoptozu (Liu et al., 2018). Takođe, nivo miR-21 raste u astrocitima nakon traumatske povrede mozga, gde ova miRNK ostvaruje pozitivan efekat na oporavak krvno-moždane barijere i sprečava apoptozu neurona (Bai & Bian, 2022; Han et al., 2014). S druge strane, ekspresija miR-145, koji se eksprimira u astrocitima u fiziološkim uslovima, smanjuje se tokom reaktivne astroglioze (Slika 5) (Wang et al., 2015). Različite studije pokazuju da, osim miR-21 i miR-145, mnoge druge miRNK imaju promenjen nivo ekspresije u različitim patološkim stanjima CNS-a i imaju važnu ulogu u regulaciji reaktivne astroglioze (Bhalala et al., 2012; Mor et al., 2011; Ziu et al., 2011).

Promene u ekspresiji gena u reaktivnim astrocitima zavise od tipa povrede koji je izazvao njihovu aktivaciju. Rezultati studije Zamanian i saradnika su pokazali da neuroinflamacija izazvana injekcijom lipopolisaharida (LPS) u mozak miša, dovodi do nastanka neurotoksičnog A1 fenotipa

reaktivnih astrocita. Sa druge strane, ishemija izazvana okluzijom srednje cerebralne arterije miša, dovodi do nastanka neuroprotektivnog A2 fenotipa reaktivnih astrocita (Slika 5) (Zamanian et al., 2012). Uočene su razlike u ekspresiji najmanje 50% gena između ova dva reaktivna fenotipa. Na primer, ekspresija GFAP-a i vimentina se povećava i u A1 i u A2 astrocitima, ali su nestin-pozitivni astrociti prisutni samo kod A1 reaktivnog fenotipa (Zamanian et al., 2012). U oba modela povrede se povećava ekspresija citoskeletnih proteina, proteina vanćelijskog matriksa, proteina uključenih u imunski odgovor kao i adhezionih molekula (Matusova et al., 2023). Međutim, u A1 astrocitima postoji značajnije povećanje u ekspresiji gena uključenih u imunski odgovor, dok A2 astrociti značajnije povećavaju ekspresiju gena uključenih u proliferaciju i metaboličku aktivnost (Matusova et al., 2023). A1 astrociti ostvaruju negativan efekat na oporavak CNS-a (Lawrence et al., 2023). Oni oslobađaju pro-inflamatorne faktore kao što su neidentifikovani neurotoksin(i), komplement C3 (C3), D-serin, azot monoksid (NO) i faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) i na taj način inhibiraju aktivnost ili dovode do smrti određene grupe neurona i oligodendrocita (Slika 5) (Fan & Huo, 2021; Liddel & Barres, 2017). A1 astrociti takođe sekretuju i hemoatraktante i hemokine uključujući hemokinski ligand sa motivom C-X-C 10 (CXCL10). Ovaj hemokin privlači T limfocite i druge imunske ćelije i time dovodi do širenja inflamacije (Lawrence et al., 2023). Takođe je utvrđeno da se u A1 astrocitima smanjuje ekspresija glutamatnih transportera, GABA neurotransmitera, trofičkih faktora, gena uključenih u transport laktata, faktora uključenih u formiranje sinapsi SPARC-sličan protein 1 (engl. *SPARC-like protein 1*, SPARCL1) i glipikana (GPC6 i GPC4) (Slika 5) (Ding et al., 2021; Liddel & Barres, 2017). Smanjena ekspresija glutamatnih transportera u astrocitima je glavni uzrok ekscitotoksičnosti koja dovodi do smrti neurona, a uočava se u različitim patološkim stanjima uključujući traumatsku povredu mozga (engl. *traumatic brain injury*, TBI), epilepsiju, moždani udar i neurodegenerativne bolesti (Nwaobi et al., 2016; Reeb KL, 2024). A2 tip reaktivnih astrocita se javlja u odgovoru na povredu nervnog tkiva i ishemiju. Ovaj tip astrocita pomaže regeneraciju CNS-a lučenjem neurotrofnih faktora i trombospondina koji podržavaju preživljavanje neurona i oporavak sinapsi (Slika 5) (Liddel & Barres, 2017; Liddel et al., 2017). A2 astrociti proliferišu i učestvuju u formiranju glijskog ožiljka, uklanjaju ćelijske ostatke i učestvuju u reparaciji KMB (Lawrence et al., 2023; Liddel & Barres, 2017; Liddel et al., 2017). Međutim, određene studije govore da su u formiranje glijskog ožiljka uključeni i A1 astrociti (Czyzewski et al., 2024; Fan & Huo, 2021). Istovremeno prisustvo ova dva tipa astrocita u određenim patologijama CNS-a može da objasni zašto se smatra da astrociti imaju dvojni ulogu (inhibitornu i protektivnu) u oporavku nervnog tkiva nakon povrede (Czyzewski et al., 2024). Neal i saradnici su otkrili da se u A2 mišjim primarnim reaktivnim astrocitima povećava ekspresija glutamatnog transportera Glast i time smanjuje nivo vanćelijskog glutamata i sprečava ekscitotoksičnost (Slika 5) (Neal et al., 2018). Pokazano je da A2 astrociti takođe smanjuju ekspresiju nekih faktora uključenih u odgovor na stres i inflamaciju, uključujući: P2Y purinoceptor 1 (engl. *P2Y purinoceptor 1*, P2Y1R), IL-12, IL-23, FKBP prolil izomeraza 5 (engl. *FKBP Prolyl Isomerase 5*, FKBP5), serglicin (eng. *serglycin*, SRGN), histokompatibilni 2 D region lokusa 1 (engl. *histocompatibility 2 D region locus 1*, H2-D1) i guanilat-vezujući protein 2 (engl. *Guanylate-Binding Protein 2*, GBP2) (Slika 5) (Ding et al., 2021). Nekoliko studija ukazuje da su u različitim patologijama CNS-a (akutne povrede, infekcije, neurodegenerativnih bolesti), prisutni različiti reaktivni fenotipovi astrocita. Korišćenjem transkriptomike na nivou pojedinačnih ćelija, Leng i saradnici (Leng et al., 2022) istraživali su heterogenost astrocita dobijenih iz iPSC tretiranih citokinima koji izazivaju neuroinflamaciju, korišćenim u studiji Liddel i saradnika (Liddel et al., 2017). Definisali su dva podtipa A1 reaktivnih astrocita izazvanih neuroinflamacijom. Dok jedna grupa A1 astrocita povećano eksprimira gene uključene u imunski odgovor, u drugoj grupi povećava se ekspresija gena uključenih u signalizaciju interferona, što ukazuje na njihove specijalizovane funkcije (Leng et al., 2022; Matusova et al., 2023). Studija Li i saradnici kod miševa sa povredom kičmene moždine identifikovala je dva tipa reaktivnih astrocita. Obe populacije povećano eksprimiraju GFAP, vimentin i nestin, međutim samo u jednoj populaciji se povećava ekspresija markera proliferacije Ki67, što je ukazuje na povećan proliferativni kapacitet ovih ćelija (Li et al., 2022). Sve navedene studije naglašavaju složenost reaktivnih astrocitnih fenotipova, što jednostavna klasifikacija na A1 i A2 fenotipe ne može adekvatno obuhvatiti. Iako je klasifikacija na A1 i A2

astrocite usvojena u više studija (Fan & Huo, 2021; Liddel et al., 2017; Zamanian et al., 2012), ova jednostavna podela reaktivnih astrocita na dobro/loše ili neurotoksično/neuroprotektivno stanje ima svoje nedostatke, jer ne uspeva da obuhvati njihovu raznolikost kroz različite bolesti CNS-a. Escartin i saradnici su objasnili da u bilo kom trenutku tokom progresije patologije istovremeno postoji veći broj reaktivnih astrocitnih fenotipova u mozgu (Escartin et al., 2021). Takođe, astrociti u različitim patologijama istovremeno mogu steći štetne funkcije i izgubiti korisne funkcije. Ravnoteža između izgubljenih/stečenih funkcija, kao i prisutnost različitih subpopulacija astrocita određuju konačan ishod bolesti (Escartin et al., 2021).



Slika 5. Morfološke, funkcionalne i molekularne karakteristike reaktivnih astrocita. Kao odgovor na povredu reaktivni astrociti prolaze kroz morfološke promene, uključujući hipertrofiju ćelijskog tela i nastavaka, kao i povećanu ekspresiju intermedijarnih filamenata: GFAP-a, vimentina i nestina. Reaktivni astrociti stiču sekretorni fenotip koji može imati korisne ili štetne efekte na oporavak nervnog tkiva. Reaktivni astrociti prolaze kroz značajne promene u ekspresiji gena. Dolazi do povećane ekspresije regulatornih proteina aktivnih u astoglijalnim prekursorima tokom gliogeneze, SOX2 i SOX9. Smanjuje se ekspresija glutamatnih transportera EAAT1 i EAAT2, kao i kalijumskog kanala Kir4.1. Takođe, ekspresija miR-21 se povećava u reaktivnim astrocitima, dok se ekspresija miR-145 smanjuje. Na osnovu patološkog stanja koje je izazvalo njihovu aktivaciju, astrociti se mogu klasifikovati kao A1 ili A2 astrociti. A1 astrociti oslobađaju pro-inflamatorne citokine kao što su neidentifikovani neurotoksini, komplement C3, D-serin, NO i TNF-α, koji su štetni za preživljavanje neurona i njihov oporavak. A1 astrociti smanjuju transport laktata, ekspresiju glutamatnih transportera; ekspresiju SPARCL1, glipikana (GPC4 i GPC6) i MER tirozin kinaze (engl. *Mer Tyrosine Kinase*, MERTK) i MEGF10 (engl. *Multiple EGF-like Domain 10*). A2 tip reaktivnih astrocita podržava regeneraciju CNS-a lučeći podskup neurotrofnih faktora i trombospodina, koji podržavaju preživljavanje neurona i oporavak sinapsi. Oni takođe povećavaju ekspresiju glutamatnog transportera GLAST i na taj način održava homeostazu vanćelijskog glutamata, sprečavajući glutatomom izazvanu ekscitotoksičnost. A2 astrociti pojačavaju ekspresiju gena uključenih u anti-inflamatorni odgovor: *arginaza-1*, *Nrf2* (engl. *Nuclear factor E2-related factor 2*), dok smanjuju ekspresiju faktora povezanih sa odgovorom na stres i inflamacijom: inducibilna sintaza azot-monoksida (iNOS); P2Y purinoceptor 1 (P2Y1R); interleukini IL-12 i IL-23; FKBP proil izomeraza 5 (FKBP5); SRGN; histokompatibilni 2 D-lokus 1 (H2-D1); i guanilat-vezujući protein 2 (GBP2). Preuzeto i izmenjeno iz Lazic et al., 2022.

1.4.5. Reaktivni astrociti i patologije CNS-a

Izučavanje funkcija reaktivnih astrocita i formiranja glijskog ožiljka u različitim patologijama CNS-a su fokus mnogih istraživanja. Usled gubitka fizioloških, homeostatskih funkcija i sticanja patogenih odlika reaktivni astrociti predstavljaju bitne učesnike mnogih poremećaja i bolesti CNS-a (Sofroniew & Vinters, 2010). Ove promene igraju značajnu ulogu u različitim patološkim stanjima kao što su traumatske povrede, epilepsija, moždani udar, infekcije, ishemija, neurodegenerativne bolesti i starenje (De Keyser et al., 2008; Sofroniew & Vinters, 2010).

1.4.5.1. Traumatska povreda mozga

Traumatska povreda mozga (engl. *Traumatic brain injury, TBI*) nastaje kao posledica mehaničkih povreda mozga koje uzrokuju oštećenje tkiva i narušavaju homeostazu CNS-a. Kao posledica TBI dolazi do aktivacije različitih regulatornih mehanizama tokom vremena koji mogu dovesti ili do ublažavanja posledica povrede ili do sekundarnih povreda nervnog tkiva (Burda et al., 2016). Glavne odlike TBI su reaktivna astroglioza i formiranje glijskog ožiljka (Sofroniew & Vinters, 2010). Vremenski sled TBI podrazumeva primarne i sekundarne povrede. Primarna povreda se dešava kao posledica direktne mehaničke povrede mozga i za rezultat ima ireverzibilan gubitak neurona i glijskih ćelija na mestu povrede (Jeremic et al., 2023; Michinaga & Koyama, 2021). Primarna povreda dovodi do pokretanja serije neuro-elektro-hemijskih događaja koji kao krajnji rezultat uzrokuju umiranje neurona. Sekundarna povreda nastaje kao fiziološki odgovor na primarnu povredu. Naime, u sekundarnoj povredi astrociti, mikroglija i imunske ćelije iz perifernih tkiva dovode do inflamacije (Michinaga & Koyama, 2021). Pored neuroinflamacije sekundarne povrede uključuju poremećaje u funkciji KMB i otok (Michinaga & Koyama, 2021). U većini slučajeva, imunološki odgovor je koristan i povlači se nakon što se oštećeno tkivo obnovi (Zhang et al., 2023). Međutim, ukoliko se oštećeno tkivo ne oporavi u potpunosti, inflamacija može postati hronična što dalje oštećuje okolno tkivo i vremenom može dovesti do razvoja neurodegenerativnih bolesti (Zhang et al., 2023). Nakon povrede nervnog tkiva iz oštećenih ćelija oslobađa se ATP, koji se smatra univerzalnim „*signalom opasnosti*“ (Franke et al., 2012). ATP se vezuje za purinoreceptore P2X i P2Y na membrani astrocita i pokreće unutarćelijsku molekularnu kaskadu koja finalno dovodi do povećane ekspresije GFAP-a i vimentina, hipertrofije ćelijskog tela i proliferacije astrocita u cilju ograničavanja nastale povrede i formiranja glijskog ožiljka (Czyzewski et al., 2024; Franke et al., 2012; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Iako primarna povreda usled TBI ne može biti sprečena, sekundarne povrede otvaraju mogućnost za primenu različitih terapijskih pristupa u cilju ograničavanja nastalih oštećenja (Wang et al., 2015). Mnoge studije su pokazale da su određeni lekovi ostvarili pozitivan efekat na oporavak neurona kroz promovisanje povoljnih i eliminaciju nepovoljnih funkcija astrocita (Kitchen et al., 2020; Rothstein et al., 2005). Stoga, farmakološka ili genetička modulacija astrocita predstavlja dobar potencijalni pristup za razvoj novih terapijskih strategija u lečenju TBI (Michinaga & Koyama, 2021).

1.4.5.2. Ishemija

Ishemija može dovesti do teškog oštećenja mozga, invaliditeta ili čak smrti. Ranije se istraživanje ishemije fokusiralo na neurone, jer su oni osetljiviji na ishemiju nego astrociti. Danas se zna da astrociti imaju važne i raznolike uloge u ovom procesu, što ih čini obećavajućim terapijskim metama za lečenje moždane ishemije (Hernandez et al., 2021; Rossi et al., 2007). Glavni negativni efekat moždane ishemije je gubitak kiseonika u mozgu (Pivonkova & Anderova, 2017). Moždani udar je najčešći tip fokalne ishemije, uzrokuje ga zapušanje moždane arterije, što dovodi do gubitka neurona u ishemičnoj zoni i formiranja glijskog ožiljka (deSai C, 2023). Tokom ishemije, astrociti prolaze kroz promene fenotipa prema reaktivnom, uključujući hipertrofiju ćelijskog tela, povećan proliferativni kapacitet i formiranje glijskog ožiljka, promene u ekspresiji gena i povećanu ekspresiju intermedijarnih filamenata GFAP-a, vimentina i nestina (Potokar et al., 2020). Kao i u drugim patologijama, astrociti ostvaruju dvojake funkcije tokom moždane ishemije (Li et al., 2008; Liu & Chopp, 2016). Studija koju su sprovedi Li i saradnici pokazala je da, tokom ishemije, reaktivni

astrociti luče interleukin 15 (IL15), koji specifično aktivira citotoksične mehanizme prirodnih ćelija ubica (NK) i CD8⁺ T limfocita, što dovodi do upale tkiva i oštećenja nakon ishemijske povrede (Li et al., 2008; Li et al., 2017). S druge strane, astrociti takođe ostvaruju korisne funkcije, kao što je proizvodnja angiogenih i neurotrofnih faktora koji su važni za preživljavanje neurona i regeneraciju nakon moždanog udara (Liu & Chopp, 2016).

1.4.5.3. Neurodegenerativne bolesti

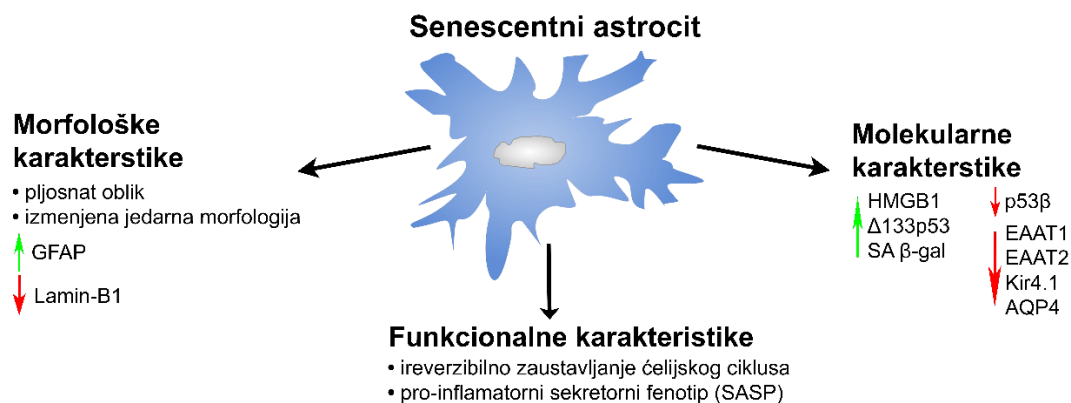
AB, ALS, PB i Hantingtonova bolest (HB) su neurodegenerativne bolesti koje se obično javljaju u kasnoj životnoj dobi. Jedna od patoloških karakteristika ovih bolesti je neuroinflamacija (Chitnis & Weiner, 2017; Heneka et al., 2015; Komine & Yamanaka, 2015; Troncoso-Escudero et al., 2018). Inflamacija u CNS može imati korisne efekte, poput brze i lokalizovane reakcije na povredu (Yong et al., 2019). Međutim, kod ovih neurodegenerativnih bolesti, neuroinflamacija je hronična i postaje štetna po okolno tkivo (Chitnis & Weiner, 2017). Reaktivni astrociti u neurodegenerativnim bolestima mogu pogoršati inflamatorne reakcije i oštetiti tkivo, ili dovesti do imunosupresije i reparacije tkiva (Colombo & Farina, 2016). Efekat koji ostvaruju reaktivni astrociti zavisi od trenutka u progresiji bolesti, specifičnosti bolesti kao i od uticaja mikrosredine koja uključuje mikrogliju (Kwon & Koh, 2020) i druge tipove ćelija (Lee et al., 2021). Reaktivni astrociti i mikroglija proizvode inflamatorne molekule i učestvuju u oblikovanju inflamatornog odgovora u različitim bolestima. Mikroglija luči različite pro-inflamatorne molekule uključujući IL-1, TNF- α i komponentu komplementa 1q (engl. *complement component 1q*, *C1q*) koje deluju na aktivirane astrocite i dovode do ispoljavanja A1 pro-inflamatornog fenotipa. Ovaj fenotip je prisutan u različitim delovima mozga kod pacijenata sa AB, PB, ALS, multiplom sklerozom (MS) i HB, kao i u životinjskim modelima ovih bolesti (Liddelow et al., 2017). Takođe, u ALS i PB dolazi do poremećaja u homeostazi glutamata usled smanjene ekspresije glutamatnih transportera, što dovodi do ekscitotoksičnosti (Gu et al., 2010; Howland et al., 2002; Iovino et al., 2022; Rothstein et al., 1995; Tong et al., 2014). Kod reaktivnih astrocita u HB dolazi do smanjene ekspresije Kir4.1, poremećaja u homeostazi K⁺ i homeostazi glutamata za koje se smatra da doprinose neuronskoj hiperekzitabilnosti u HB modelima (Tong et al., 2014). Broj pro-inflamatornih A1 reaktivnih astrocita povećava se u fiziološkim uslovima tokom starenja i dovodi do hronične inflamacije nervnog tkiva, koja predstavlja rizik za nastanak različitih neurodegenerativnih bolesti (Lawrence et al., 2023).

1.4.6. Senescencija astrocita

Ćelijska senescencija je fenomen povezan sa starenjem koji su prvi opisali Leonard Hayflick (engl. *Leonard Hayflick*) i Pol Murhed (engl. *Paul Moorhead*) kada su uočili da humani fibroblasti nakon dugoročnog kultivisanja *in vitro* gube mogućnost replikacije (Hayflick, 1965). Ovaj fenomen je nazvan replikativna senescencija i najčešće se povezuje sa skraćivanjem telomera usled uzastopnih replikacija molekula DNK (Cohen & Torres, 2019). Kasnije je otkriveno da senescentne ćelije mogu da se akumuliraju u različitim tkivima i organima, gde ostvaruju različite fiziološke i patološke funkcije. Drugi tip senescencije naziva se preuranjena senescencija izazvana stresom. Ovaj tip senescencije nastaje kada ćelije usled različitih stresora (aktivirani onkogeni, citokini, reaktivne kiseionične vrste, oštećenja u molekulu DNK) prerano uđu u senescentno stanje. Senescencija je proces koji se odlikuje ireverzibilnim zaustavljanjem ćelijskog ciklusa, brojnim fenotipskim promenama, kao i sticanjem karakterističnog pro-inflamatornog sekretornog fenotipa povezanog sa senescencijom (engl. *senescence associated secretory phenotype*, SASP) (Slika 6) (Mijit et al., 2020). Za razliku od ćelija u stanju mirovanja gde do zaustavljanja ćelijskog ciklusa dolazi u G0 fazi, senescencija pokreće trajno zaustavljanje ćelijskog ciklusa u fazama ćelijskog ciklusa G1 i G2. Senescentni astrociti ostaju metabolički aktivni, vijabilni i aktivno suprimiraju apoptozu (Roger et al., 2021). Ove ćelije pokazuju jedinstvene karakteristike i funkcije (Slika 6), koje ih razlikuju od drugih neproliferišućih ćelija, kao što su utišane ili terminalno diferencirane ćelije (Roger et al., 2021). Senescentne ćelije najčešće se identifikuju preko aktivnosti enzima β galaktozidaze povezane sa senescencijom (engl. *senescence-associated beta galactosidase*, SA- β -gal) (Slika 6) (Lee et al.,

2006). Povećana aktivnost ovog enzima pored *in vitro* modela, uočena je i u *in vivo* u humanim tkivima i stoga se često koristi kao marker senescencije i starenja (Cho & Hwang, 2012). Zanimljivo je istaći studije koje su pokazale da i utišani i senescentni astrociti pokazuju aktivnost SA- β -gal, s tim što je intenzitet aktivnosti ovog enzima znatno izraženiji u senescentnim astrocitima (Cho & Hwang, 2012; Terzi et al., 2016). Put prenosa signala mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) je glavni signalni put koji učestvuje u finoj regulaciji između ova dva stanja- senescencije i utišanosti (Terzi et al., 2016). Senescencija doprinosi razvoju neurodegenerativnih oboljenja povezanih sa starenjem, a može dovesti i do pojave malignih bolesti (Roger et al., 2021). Cohen i saradnici su senescenciju astrocita nazvali "astrosenescencija" (Cohen & Torres, 2019). Brojne studije su pokazale da različiti faktori uključujući višestruko ponovljenu replikaciju, oksidativni stres, poremećeni metabolizam, inhibiciju proteazoma, visok nivo glukoze, HIV infekcije, X zračenja, izlaganje vodonik-peroksidu i skraćivanja telomera tokom starenja dovode do oštećenja u molekulu DNK i ulaska astrocita u senescenciju (Roger et al., 2021; Terzi et al., 2016). Za razliku od reaktivne astroglioze, ćelijska senescencija astrocita je ireverzibilno i trajno stanje. Senescentni astrociti se odlikuju uvećanim i pljosnatim ćelijskim telom, izmenjenom morfologijom jedra usled smanjene ekspresije proteina jedarne lamine lamina B1 i reorganizacijom intermedijarnih filamenata (Slika 6) (Bitto et al., 2010). Nakon izlaganja oksidativnom stresu, primarne kulture i mišjih i humanih astrocita dobijaju uvećanu, spljoštenu i vakuolizovanu morfologiju tipičnu za senescentne ćelije. Matias i saradnici pokazali su na senescentnim astrocitima *in vitro* da se defektna jedarna morfologija ogleda u pojavi invaginacija u jedrima (Matias et al., 2022). Slično reaktivnim astrocitima, senescentni astrociti karakterišu se povećanom ekspresijom GFAP-a koji je važan za održavanje mehaničke čvrstine i oblika astrocita (Slika 6) (Gomes et al., 1999; Middeldorp & Hol, 2011). Pored morfoloških promena, senescentni astrociti pokazuju složene funkcionalne promene u čijoj su osnovi promene u ekspresiji gena (Kumari & Jat, 2021). Najviše izučavani signalni putevi u senescenciji su P53/p21^{cip1} i p16^{INK4A}/Rb tumor supresor signalni put (Chen et al., 2006). P53/ p21^{cip1} signalni put je uključen u regulaciju replikativne senescencije, dok je glavni regulator stresom-izazvane senescencije p16^{INK4A}/Rb tumor supresor signalni put (Chen et al., 2006). Protein p53 poznat je kao "čuvar genoma" sa brojnim funkcijama i ima ključnu ulogu u procesu replikativne senescencije (Lane, 1992). Postoje dve izoforme p53 proteina u astrocitima, $\Delta 133p53$ i p53 β , a u senescentnim astrocitima se smanjeno eksprimira $\Delta 133p53$ i povećano eksprimira p53 β izoforma (Slika 6) (Turnquist et al., 2016). Ove dve izoforme p53 smatraju se endogenim regulatornim mehanizmima za replikativnu senescenciju posredovanu proteinom p53 (Fujita et al., 2009). Senescentni astrociti povećavaju ekspresiju jednog od nizvodnih targeta p53, regulatora ćelijskog ciklusa p21^{waf1}, koji dalje inhibira aktivnost ciklin-D zavisne kinaze 2 (CDK2), što rezultira zaustavljanjem ćelijskog ciklusa (Han et al., 2020). Oba signalna puta P53/ p21^{cip1} i p16^{INK4A}/Rb tumor supresor signalni put su složena i uključuju promene u različitim setovima gena (Kumari & Jat, 2021). Proteini p53 i p21^{waf1} su ključni "igrači" u senescenciji, a sugerisano je da je put p53/p21^{waf1} važan za inicijaciju senescencije, dok je put koji uključuje p16 i pRb porodicu proteina važan za dalje održavanje senescentnog stanja (Mijit et al., 2020). SASP karakteriše povećana sekrecija pro-inflamatornih hemokina, faktora rasta, proteaza i inflamatornih citokina, što dovodi do indukcije inflamacije (Cohen & Torres, 2019). Sekrecija određenih faktora SASP-a se menja u odnosu na stimulus koji ih je izazvao (Han et al., 2020). Iako je sastav SASP-a varijabilan, jedna od najčešćih komponenti SASP-a je citokin IL-6 (Han et al., 2020). Pored IL-6, interleukini IL-8 i IL-1 β i TNF- α su često povećani kod senescentnih astrocita, dok IL-2, IL-3 i IL-4 nisu toliko zastupljeni (Gao et al., 2021; Limbad et al., 2020; Shang et al., 2020; Turnquist et al., 2019). Pored interleukina, druge komponente SASP-a povećane kod senescentnih astrocita su metaloproteinaze MMP-1 i MMP-3, i hemokin CXCL-1 (Gao et al., 2021; Limbad et al., 2020; Shang et al., 2020). Senescentne astrocite karakteriše smanjena ekspresija gena koji kodiraju ključne proteine za transport glutamata (EAAT1/EAAT2), kalijuma (Kir4.1), i vode (AQP4). Ove promene narušavaju homeostatske funkcije astrocita, uključujući njihovu sposobnost da pruže zaštitu neuronima, čime se povećava rizik od neurotoksičnih efekata i narušavanja fizioloških procesa u mozgu (Slika 6) (Limbadi et al., 2020). Osim negativnih efekata na neurone, senescentni astrociti izazivaju promene u mozgu, poput slabljenja sinaptičke plastičnosti, gubitka neuralnih matičnih ćelija i disfunkcije KMB (Han et

al., 2020). Sve ove promene u mozgu koje indukuju senescentni astrociti mogu doprineti razvoju neurodegenerativnih bolesti povezanih sa starenjem. Imajući u vidu da je ekspresija miRNK često promenjena tokom starenja, smatra se da one mogu biti korišćene kao potencijalni biomarkeri starenja i ćelijske senescencije (Williams et al., 2017). Na primer, ekspresija miR-34a smatra se biomarkerom starenja mozga kod miševa (Li et al., 2011). Pored toga, u hepatocitima miševa koji stare uočena je povećana ekspresija i drugih miRNK kao što su miR-93, miR-214, miR-669c i miR-709 (Maes et al., 2008). Eksperimenti na različitim tipovima humanih ćelijskih linija pokazali su da miRNK utiču na ćelijsku senescenciju kroz modulaciju ekspresije regulatornih proteina senescencije, posebno preko komponenti p53/p21waf1 i p16ink4A/pRB signalnih puteva i SASP-a (Suh, 2018). Na primer, identifikovano je nekoliko miRNK uključujući: miR-504, miR-125b, miR-25i miR-30d koje se direktno vezuju za P53 transkript i suprimiraju njegovu ekspresiju (Hu et al., 2010; Kumar et al., 2011; Le et al., 2009). S druge strane, miR-192, miR-194, miR-215 i miR-605 indirektno povećavaju ekspresiju P53 tako što inhibiraju ekspresiju E3 ubikvitin ligazu MDM2. miR-34a podstiče ćelijsku senescenciju inhibicijom ekspresije SIRT1 (engl. *silent-mating type information regulation 2 homologue 1*), deacetilaze koja negativno reguliše p53 i puteve odgovora na stres. U ovom procesu pored miR-34a učestvuju i miR-22, miR-138, miR-181a/b, miR-217 i miR-449 (Suh, 2018). Molekul miR-106b, članovi familije miR-130b, miR-302a/b/c/d, miR-512-3p i miR-515-3p inhibiraju ekspresiju P21, time inhibirajući i senescencu (Borgdorff et al., 2010). Studija Lal i saradnika pokazala je da je smanjena ekspresija miR-24 povezana sa povećanim nivoom p16, što ukazuje da ova miRNK negativno reguliše P16 regulator ćelijskog ciklusa i time inhibira replikativnu senescenciju (Lal et al., 2008). Sa druge strane, za miR-9, miR-125 i miR-181 pokazano je da indukuju senescenciju preko P16 (O'Loughlen et al., 2015). Iako postoje brojna istraživanja o ulozi miRNK u ćelijskoj senescenciji, u kontekstu astrocita, ovo istraživačko polje je slabo proučeno. Ovo ostavlja značajan prostor za dalja istraživanja u cilju dubljeg razumevanja njihove uloge u "astrosenescenciji" i mehanizama delovanja što bi pored značaja za fundamentalnu nauku omogućilo i njihovu potencijalnu primenu u terapijske svrhe.



Slika 6. Glavne morfološke, molekularne i funkcionalne karakteristike senescentnih astrocita. Senescentni astrociti imaju uvećan, spljošten oblik sa izmenjenom morfologijom jedra, praćen promenama u ekspresiji citoskeletnih i jedarnih proteina. Odlikuje ih povećana ekspresija GFAP-a i smanjena ekspresija jedarnog proteina Lamina-B1. Kod senescentnih astrocita povećana je ekspresija Δ133p53 i HMGB1, a smanjeno se eksprimira protein p53β. Ove ćelije se odlikuju povećanom aktivnošću enzima SA-β-gal. Ekspresija glutamatnih transportera (EAAT1/EAAT2), kalijumovog kanala Kir4.1, kao i AQP4 transportera je smanjena kod senescentnih astrocita. Sa funkcionalnog aspekta, senescentni astrociti se odlikuju ireverzibilnim zaustavljanjem ćelijskog ciklusa i pro-inflamatornim sekretornim fenotipom povezanim sa senescencijom (SASP). Preuzeto i izmenjeno iz Lazic et al., 2022.

1.4.6.1. Senescencija i neurodegenerativne bolesti povezane sa starenjem

Starenje je prirodan fiziološki proces koji se dešava pod uticajem različitih genetičkih faktora kao i faktora životne sredine (Nigam et al., 2012). Odlika starenja je akumulacija senescentnih ćelija koje nisu u stanju da zamene oštećene ćelije koje se prirodno akumuliraju tokom vremena (Di Micco et al., 2021). Pored toga, senescencija se smatra primarnim faktorom bolesti povezanih sa starenjem,

kao što su neurodegenerativna oboljenja. Iako uloga ćelijske senescencije u bolestima povezanim sa starenjem još nije dovoljno izučena, širok spektar morfoloških, molekularnih i funkcionalnih promena senescentnih astrocita dovodi do gubitka fizioloških i sticanja štetnih funkcija ovih ćelija i čini ih važnim učesnicima u neurodegenerativnim bolestima (Slika 6) (Cohen & Torres, 2019). Senescentni astrociti su identifikovani u *post mortem* moždanom tkivu pacijenata sa AB, PB i ALS (Bhat et al., 2012; Chinta et al., 2018; Ungerleider et al., 2021). Studije ukazuju da je inflamacija glavni mehanizam putem kojeg senescentni astrociti doprinose bolestima povezanim sa starenjem, usled lučenja pro-inflamatornih citokina u okviru SASP-a (Benzing et al., 1999; Bhat et al., 2012; Blasko et al., 2004; Si et al., 2021). Pored inflamacije, poremećaj u metabolizmu glutamata je još jedna karakteristika koja doprinosi uključenosti senescentnih astrocita u neurodegenerativne bolesti (Limbad et al., 2020). Poremećaj u metabolizmu glutamata u senescentnim astrocitima je zajednička karakteristika različitih NB (Slika 6) (Ungerleider et al., 2021). Takođe, eksperimenti na astrocitima u ko-kulturama sa neuronima su pokazali da senescentni astrociti negativno utiču na mitohondrijalni membranski potencijal neurona i menjaju njihovu funkcionalnost (Morales-Rosales et al., 2021). Ovaj fenomen je verovatno posledica gubitka sposobnosti senescentnih astrocita da luče faktore potrebne za funkcionisanje neurona ili sticanje neurotoksičnog efekta kroz lučenje faktora SASP-a (Morales-Rosales et al., 2021).

Pokazano je da komponente SASP-a doprinose glavnim patološkim mehanizmima AB kao što su akumulacija A β , hiperfosforilacija tau proteina i taloženje neurofibrilarnih petlji (engl. *neurofibrillary tangles*, NFT) (Han et al., 2020). U jednoj studiji, senescentni astrociti su primećeni u regionu mozga oko A β plaka, i sugerisano je da su usko povezani sa patologijom AB preko inflamatornog odgovora (Bhat et al., 2012). Senescentni astrociti takođe imaju patološki uticaj na dopaminergičke neurone, koji su pretežno pogođeni u PB. Pokazano je da senescentni astrociti mogu suzbiti proliferaciju i migraciju neuralnih progenitora i smanjiti vijabilnost dopaminergičkih neurona (Chinta et al., 2018). U životinjskim modelima ALS-a, kao i kod pacijenata sa ALS-om, senescentni astrociti postaju toksični za motorne neurone (Das & Svendsen, 2015; Martin et al., 2000; Turnquist et al., 2016). U transgenom glodarskom modelu ALS, primećena je preuranjena pojava senescentnih astrocita, koji nisu u stanju da obezbede podršku motornim neuronima (Das & Svendsen, 2015). Sugerise se da povećani nivo SASP faktora, mogu doprineti hroničnoj inflamaciji koja se razvija u ALS (Pole A, 2016).

Navedene studije pokazuju da senescentni astrociti učestvuju u razvoju NB, kao što su AB, PB i ALS, ali molekularni mehanizmi i dalje nisu dovoljno izučeni. Potrebne su dodatne studije da bi se razjasnila precizna uloga senescentnih astrocita u bolestima mozga povezanih sa starenjem.

1.4.7. Razlike i sličnosti između senescentnih i reaktivnih astrocita

Tokom starenja CNS-a, astrociti usled aktivacije ili senescencije postaju neurotoksični i doprinose hroničnoj inflamaciji koja može uticati na razvoj neurodegenerativnih bolesti (Cohen & Torres, 2019; Lopez-Teros et al., 2022). Usled različitih stresogenih stimulusa astrociti postaju reaktivni ili senescentni i lučenjem pro-inflamatornih citokina doprinose inflamaciji i slabljenju kognitivnih funkcija tokom starenja (Lopez-Teros et al., 2022). Postoje mnoge sličnosti i razlike između reaktivnih i senescentnih astrocita. Ono što je slično kod oba fenotipa je uvećanje ćelijskog tela, povećana ekspresija GFAP-a, smanjena ekspresija EAAT1, EAAT2 i Kir4.1 kanala i pro-inflamatorni fenotip (Tabela 2) (Lazic et al., 2022; Lopez-Teros et al., 2022). Ove zajedničke karakteristike su neretko dovodile do zabune i pogrešno izvođenje zaključaka u okviru različitih studija, jer se smatralo da je istraživački fokus bio na reaktivnim astrocitima, a zapravo se radilo o senescentnim astrocitima (Cohen & Torres, 2019). Međutim, između ova dva fenotipa postoje jasne razlike koje olakšavaju njihovu identifikaciju od kojih su glavne sumirane u Tabeli 2. Rezultati komparativnih analiza pokazali su da između ova dva fenotipa postoje razlike na transkripcionom nivou i na nivou sekretoma (Lopez-Teros et al., 2022; Simmnacher et al., 2020). Interesantno je pomenuti da se pro-inflamatorni sekretorni profil reaktivnih i senescentnih astrocita umnogome

poklapaju. Pro-inflamatorni sekretom senescentnih i reaktivnih astrocita najčešće sadrži citokine IL-6, IL-1 α , IL-1 β i TNF- α (Lopez-Teros et al., 2024; Lopez-Teros et al., 2022) kao i određene hemokine (Alarcon-Aguilar et al., 2014). Sa druge strane, reaktivni astrociti, za razliku od senescentnih astrocita mogu ostvariti i pozitivne efekte na oporavak nervnog tkiva putem lučenja različitih anti-oksidativnih, neurotrofnih molekula i faktora rasta (Lopez-Teros et al., 2022). Iako je senescencija proces koji se prevasodno povezuje sa razvojem neurodegenerativnih bolesti (Cohen&Torres, 2019), tokom embrionalnog razvika se javlja kao normalan fiziološki proces (Munoz-Espin & Serrano, 2014), a učestvuje i u održavanju homeostaze adultnih tkiva (pomaže oporavak tkiva nakon oštećenja jetre, fibroze ili zarastanja povreda) (Demaria et al., 2014; Jun & Lau, 2010; Krizhanovsky et al., 2008).

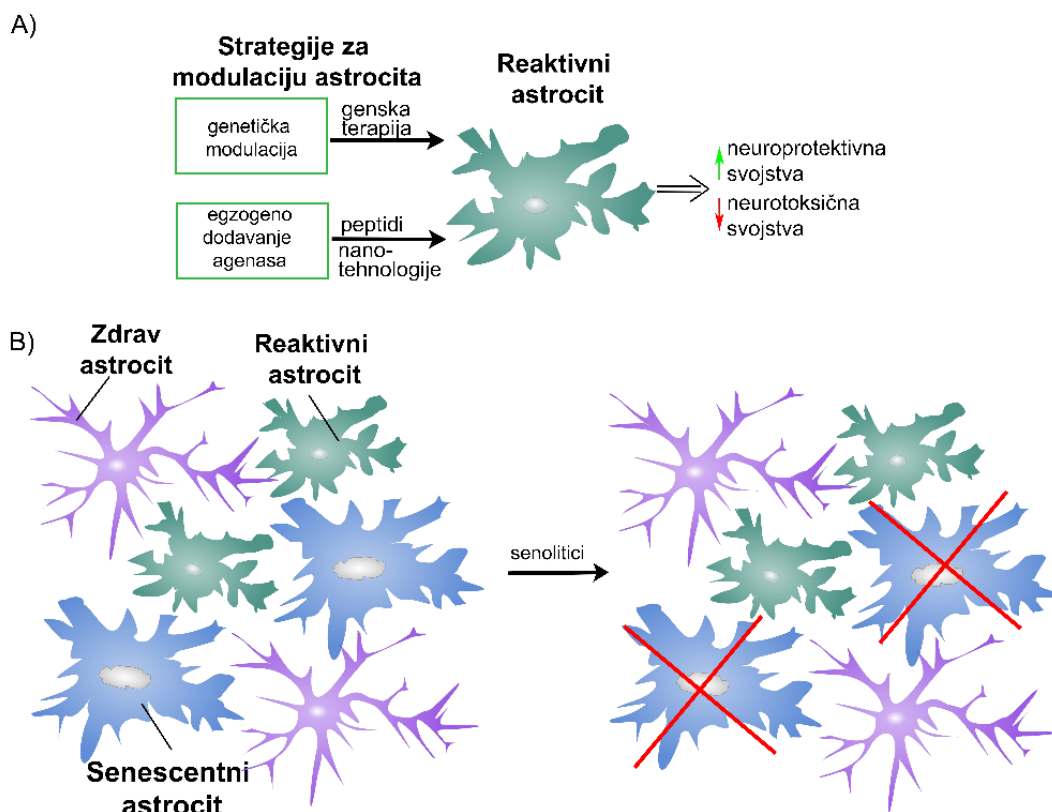
Tabela 2. Pregled sličnosti i razlika između reaktivnih i senescentnih astrocita. Preuzeto i izmenjeno iz Lazic et al., 2022.

Promene u odnosu na utišan/zdrav astrocitni fenotip	Reaktivni astrociti	Reference	Senescentni astrociti	Reference
Morfološke promene	- Čelijska hipertrofija; - Promene u ekspresiji citoskeletnih intermedijarnih filamenata: - Povećana ekspresija GFAP-a, nestina i vimentina.	Mestre et al., 2018 Abbott et al., 2006 Brown & Ransom, 2007; Deitmer et al., 2019; Salman et al., 2022	- Uvećano, pljosnato, čelijsko telo sa vakuolama; - Povećana ekspresija GFAP-a; - Smanjena ekspresija Lamina-B1 i gubitak tipične jedarne morfologije.	Bitto et al., 2010 Kwon & Koh, 2020 Bitto et al., 2010
Funkcionalne promene	- Povećan proliferativni i migracioni kapacitet; - Sekretorni fenotip (sekrecija pro-inflamatornih faktora kao i neurotrofnih i neuropoetičnih faktora rasta).	Sofroniew, 2009 Bak & Walls, 2018; Pole A, 2016	- Ireverzibilno zaustavljanje čelijskog ciklusa; - Sekretorni fenotip povezan sa senescencijom (engl. <i>senescence-associated secretory phenotype, SASP</i>) (najčešće pro-inflamatorni).	Bush et al., 1999 O'Brien & Wong, 2011

Trnaskripcione promene	- Povećana ekspresija SOX2 i SOX9 regulatornih proteina;	Bani-Yaghoub et al., 2006; Herrmann et al., 2008; Sun et al., 2017	- Povećana aktivnost enzima β -galaktozidaze (SA- β -gal);	Bhat et al., 2012; Bitto et al., 2010; Cohen & Torres, 2019; Evans et al., 2003
	- Povećana ekspresija miR-21 i smanjena ekspresija miR-145;	Bhalala et al., 2012; Wang et al., 2015	- Povećana ekspresija HMGB1	Limbad et al., 2020
	-Smanjena ekspresija glutamatnih transportera EAAT1 and EAAT2 i Kir4.1 kanala;	Nwaobi et al., 2016	- Smanjena ekspresija EAAT1/EAAT2; Kir4.1 i AQP4.	Limbad et al., 2020
	- Povećana ekspresija AQP4.	Auguste et al., 2007; Saadoun et al., 2005	- Povećana ekspresija inhibitora ćelijskog ciklusa p53, p21 i p16 - Smanjena ekspresija $\Delta 133p53$ i povećana ekspresija p53 β ;	Herbig et al., 2004 Turnquist et al., 2016

1.4.8. Terapeutske strategije usmerene na modulaciju astrocita

Imajući u vidu da astrociti imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze kako u fiziološkim, tako i u patološkim uslovima u CNS-u, njihovo proučavanje postalo je vrlo interesantno sa terapeutskog aspekta. Sposobnost astrocita da reaguju na bilo koji vid povrede u mozgu čini ove ćelije moćnim endogenim odbrambenim mehanizmom kojim se može manipulirati u cilju preživljavanja i oporavka nervnog tkiva nakon povrede (Escartin & Bonvento, 2008; Liberto et al., 2004; Pivonkova & Anderova, 2017; Sofroniew & Vinters, 2010). Terapeutske strategije zasnovane na funkcionalnoj modulaciji reaktivnih astrocita usmerene su na unapređivanje njihovih neuroprotektivnih uloga, poput sekrecije neurotrofnih faktora, neuropoetičkih citokina i faktora rasta, dok se istovremeno minimalizuju ili potpuno eliminišu nepovoljni efekti koje ove ćelije ostvaruju (Slika 7) (Escartin & Bonvento, 2008; Linnerbauer & Rothhammer, 2020). Različiti terapeutske pristupi, primenjeni do sada, baziraju se na genskoj terapiji posredovanoj virusima ili egzogenom dodavanju supstanci koji indukuju neuroprotektivne funkcije astrocita (Valori et al., 2019). Danas su u upotrebi nanočestice i peptidi sa visokim afinitetom i specifičnošću za astrocite koji služe za isporuku biološki aktivnih hidrofilnih jedinjenja kao što su proteini, nukleinske kiseline i mali molekuli u ove ćelije (Valori et al., 2019). Određeni lekovi, koji se koriste u kliničkoj praksi, takođe mogu poboljšati funkcije astrocita. Dobar primer za ovo je prenamena antibiotika ceftriaksona, za koji je otkriveno da efikasno povećava ekspresiju specifičnog glutamatnog transportera EAAT2 kod astrocita (Rothstein et al., 2005) čija je redukovana ekspresija karakteristika mnogih neurodegenerativnih oboljenja i uzrokuje glutamatnu ekscitotoksičnost. Astrociti u zdravom CNS-u proizvode različite antioksidante uključujući glutation, superoksid dismutazu i askorbat (Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Stimulacijom produkcije ovih jedinjenja u astrocitima može da se smanji nivo štetnih slobodnih



Slika 7. Astroцити kao targeti za nove terapijske strategije. (A) Terapijske strategije zasnovane na funkcionalnoj modulaciji reaktivnih astrocita imaju za cilj poboljšanje njihovih neuroprotektivnih ili minimalizaciju neurotoksičnih efekata. U tu svrhu primenjenjuju se različiti pristupi, uključujući virusima posredovanu gensku terapiju i egzogenu primenu jedinjenja. Različiti alati, uključujući peptide visoko specifične za astrocite i nanočestice, koriste se za selektivnu i specifičnu dostavu terapeutika astrocitima. **(B)** Moguće opcije lečenja degenerativnih promena uzrokovanih starenjem i bolesti povezanih sa starenjem oslanjaju se na novu klasu lekova poznatu kao senolitici, koji funkcionišu selektivnim indukovanjem apoptoze u senescentnim ćelijama. Preuzeto i izmenjeno iz Lazic et al., 2022.

radikala u povređenom nervnom tkivu i tako pozitivno deluje na preživljavanje neurona i njihov oporavak (Barreto et al., 2011). Značajno povećanje oslobađanja glutationa postignuto je aktivacijom astrocita posredstvom citokina IL-1 β i TNF α (Gavillet et al., 2008), a oslobođeni glutation postaje dostupan neuronima kao bitan antioksidativni molekul (Dringen, 2000). Razvoj terapijskih strategija za eliminaciju senescentnih ćelija je u fokusu istraživanja kao jedna od mogućih strategija za lečenje bolesti povezanih sa starenjem. Eliminacija senescentnih ćelija i pratećeg SASP-a, ili sprečavanje senescencije genetičkom ili farmakološkim modulacijom, može ostvariti pozitivan efekat na neurodegenerativne bolesti (Bussian et al., 2018; Si et al., 2021; Yabluchanskiy et al., 2020). Konkretno, pokazano je da povećana ekspresija $\Delta 133p53$ u astrocitima čija je senescencija izazvana zračenjem dovodi do represije SASP-a (Turnquist et al., 2019). Takođe, pokazano je da *in vitro* tretman ginsenzoidom F1 u astrocitima koji su senescentni dovodi do represije SASP-a kroz inhibiciju p38 MAPK-zavisne NF- κ B aktivnosti (Hou et al., 2018). Nova klasa lekova poznata kao senolitici funkcionišu tako što selektivno indukuju apoptozu u senescentnim ćelijama (Slika 7B), dok se senomorfici koriste kao anti-SASP terapija (Ungerleider et al., 2021). Neki senolitički lekovi, kao što su propranolol i sildenafil, pokazuju obećavajuće rezultate kao potencijalni terapijski agensi koji bi mogli biti korisni za lečenje AB (Dobarro et al., 2013; Orejana et al., 2012).

2. Ciljevi istraživanja

Astrociti poseduju jedinstvenu sposobnost da se aktiviraju u odgovoru na različite patološke promene CNS-a i u tom procesu ponovo stiču neke od karakteristika astrocitnih prekursora (Lagos-Cabre et al., 2019). Proteini SOX2 i SOX9 imaju bitne uloge u gliogenezi (Bani-Yaghoub et al., 2006; Kang et al., 2012) i njihova ekspresija se povećava u reaktivnim astrocitima u procesu reaktivne astroglioze (Chen et al., 2019; Sun et al., 2017). Međutim, uloga ovih regulatornih proteina transkripcije u zrelim astrocitima i dalje nije dovoljno izučena. U reaktivnim astrocitima povećano se eksprimira i miR-21 i ostvaruje pozitivne efekte na oporavak nervnog tkiva nakon povrede (Liu et al., 2018). Iako ova miRNK ima bitnu ulogu u održavanju homeostaze CNS, njen mehanizam delovanja i fenotipske karakteristike zrelih astrocita koje se nalaze pod njenom kontrolom umnogome su nepoznati. U cilju ispitivanja uticaja gena *SOX2* i *SOX9* i miR-21 na fenotipske karakteristike astrocita, formulisani su specifični ciljevi ove doktorske teze:

1. Optimizovati uslove gajenja i okarakterisati model sistem NT2/A dobijenih diferencijacijom humanih embrionalnih pluripotentnih karcinomskih NT2/D1 ćelija
2. Ispitati ekspresiju SOX2, SOX9 i miR-21 tokom sazrevanja NT2/A *in vitro*
3. Ispitati ekspresiju SOX2 i SOX9 u reaktivnim astrocitima *in vitro* i *in vivo*
4. Ispitati ulogu SOX2 i SOX9 u ćelijskim procesima karakterističnim za reaktivne astrocite
5. Ispitati uticaj miR-21 na vijabilnost, proliferaciju i senescenciju NT2/A.

3. Materijal i metode

3.1. Tabelarni prikaz hemikalija, rastvora, pufera i medijuma

Tabela 3. Nazivi i proizvođači hemikalija

NaCl - natrijum hlorid KCl - kalijum hlorid CaCl ₂ - kalcijum hlorid NaH ₂ PO ₄ - natrijum dihidrogen fosfat Na ₂ HPO ₄ - natrijum dihidrogen fosfat KH ₂ PO ₄ - kalijum dihidrogen fosfat NaHCO ₃ - natrijum hidrogen karbonat MgSO ₄ - magnezijum sulfat d-glukoza	Sigma-Aldrich, SAD
EDTA - etilen diamin tetra sirćetna kiselina PFA - paraformaldehid Mowiol Glicerol Glicin Metanol SDS - natrijum dodecil sulfat Tween 20 Triton X-100 Akrilamid TEMED-N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin APS - amonijum persulfat Etidijum bromid Saharoza Ponceau- S Sirćetna kiselina Bromfenol plavo Citozin arabinozid uridin 5-fluoro-5-deoksiuridin tri-Natrijum citrat dihidrat Metanol Tris Trypton Ekstrakt Kvasca	Sigma-Aldrich, SAD
DMEM - Dulbekov modifikovani Eagle medijum BSA - albumin iz seruma govečeta Trypsin	Gibco, ThermoFisher Scientific
Antibiotik-antimikotik FBS - fetalni goveđi serum NGS- Normalni kozji serum Geltrex™ Matrigel®	Gibco, ThermoFisher Scientific

3.2. Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su rađeni na pacovima Wistar soja starim 10 nedelja, muškog pola. Životinje su gajene u konstantnim ambijentalnim uslovima: temperatura od $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, relativna vlažnost 50-60%, 12:12h svetlost-mrak i sa *ad libitum* pristupom hrani i vodi. Eksperimentalna procedura je odobrena od stane Etičkog komiteta Univerziteta u Beogradu (broj prijave 61206-2915/2-20) i izvršena u saglasnosti sa direktivom EU o zaštiti životinja korišćenih u naučne svrhe 2010/63/EU.

3.2.1. Ablacija senzomotorne kore (ASK) prednjeg mozga pacova

Kao eksperimentlna grupa životinja na kojima je izvršena ablacija senzomotorne kore prednjeg mozga (ASK grupa) korišćeni su pacovi stari 10 nedelja, muškog pola. Životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom Zoletila®50 (50 mg/kg telesne težine; Virbac, Karos, Francuska) i postavljene u stereotaktički ram. Koža glave je obrijana i zasečena duž srednje linije skalpelom kako bi se izložio predeo bregme. Koordinate kraniotomije bile su 2 mm ispred bregme, 4 mm iza bregme i 4 mm bočno od srednje linije. Koštani poklopac odvojen je pincetom u stranu. Dura (tvrda moždana ovojnica) je pažljivo zasečena i pomerena u stranu. Odstranjivanje senzomotorne kore prednjeg mozga pacova izvedeno je pažljivom aspiracijom (metoda sukcione ablacije) sive moždane mase pomoću tanke polipropilenske cevi povezane na vakum, sve do pojave bele mase. Nakon što su dura i pomerena kost vraćene na mesto, koža je zašivena, a životinje su održavane na toplom dok se nisu probudile. Kao kontrolna grupa životinje korišćene su intaktne životinje identičnog uzrasta. Životinje iz obe grupe (ASK i kontrolne grupe), žrtvovane su 10 dana nakon povrede.

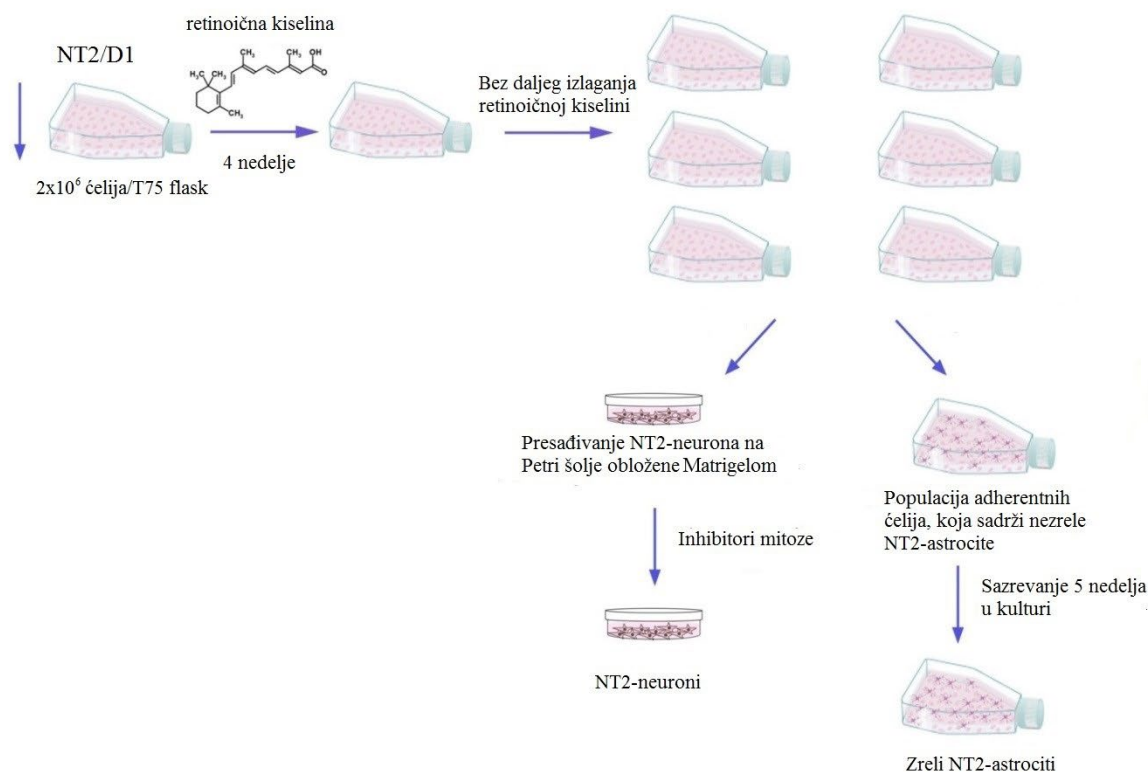
3.3. NT2/D1 ćelijska linija

U ovom radu korišćena je permanentna ćelijska linija poreklom od humanog embrionalnog teratokarcinoma NT2/D1 (ATCC® eng. *American Type Culture Collection*, Sjedinjene Američke Države, SAD).

3.3.1. Protokol za diferencijaciju NT2/D1 ćelija

NT2/D1 ćelije (ATCC®™ Virdžinija, SAD) posađene su u broju od 2×10^6 ćelija po T75 flasku i gajene su u kompletnom medijumu koji sadrži: Dulbekov modifikovani Eagle medijum sa visokim sadržajem glukoze (4,5 g/l) (eng. *High glucose Dulbecco's modified Eagle medium*, HG/DMEM) (Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD), sa dodatkom 10% govedeg fetalnog seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS) (Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD) i mešavinom antibiotika i antimikotika (Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD). Ćelije su gajene u inkubatoru sa 10% CO₂, na temperaturi od 37°C. Tretirane su 10 μM *all-trans* retinoičnom kiselinom (RK, Sigma-Aldrich, SAD) rastvorenom u kompletnom medijumu. Kompletan medijum, sa dodatkom sveže RK, menjan je tri puta nedeljno u periodu od četiri nedelje. Nakon četiri nedelje tretmana ćelije su presađene u šest novih T75 flaskova i gajene u medijumu bez RK još dva dana (Slika 8). Diferencirani NT2-neuroni (NT2/N) su zatim mehaničkim putem odvojeni od populacije adherentnih ćelija. Naime, bočne ivice T75 flaskova snažno su udarene po 10 puta i zatim je supernatant koji sadrži neurone centrifugiran (1200 rpm, 10 min), talog je resuspendovanu kompletnom medijumu sa dodatkom inhibitora mitoze: 1 mmol/L citozin arabinozid, 10 mmol/L uridin i 10 mmol/L 5-fluoro-5-deoksiuridin (Slika 8) i tako izolovani NT2/N su zasađeni na Petri šolje obložene podlogom od Matrigela. NT2/N su okarakterisani imunofluorescentnim obeležavanjem citoskeletnog markera MAP2 i nisu korišćeni za dalje eksperimente u okviru ove teze, dok su od ostatka adherentne populacije ćelija dobijeni NT2-astrociti (NT2/A) (Slika 8). Za generisanje NT2/A primenjen je protokol objavljen od strane Sandhu i saradnika (Sandhu et al., 2002). Ukratko, populacija adherentnih ćelija je tripsinizovana, presađena u nove T75 flaskove i gajena kompletnom medijumu. Ćelijama je menjan medijum svaki drugi dan, a presađivane su po postizanju konfluentnosti. Ćelije su gajene pet nedelja u kulturi u inkubatoru sa 10% CO₂, na temperaturi od 37°C. NT2/A su tokom prvih faza sazrevanja (prve dve nedelje gajenja

u kulturi) imali visok stepen proliferacije i bilo je potrebno češće ih presađivati, a u kasnijim fazama (od treće do pete nedelje gajenja u kulturi) njihov proliferativni kapacitet se smanjio i presađivani su ređe.



Slika 8. Šematski prikaz protokola za diferencijaciju NT2/D1 ćelija do neurona (NT2/N) i astrocita (NT2/A).

3.4. Modulacija ekspresije SOX2 i SOX9 i miR-21 u NT2/A

3.4.1. Transformacija bakterija

Kao domaćini za umnožavanje molekula rekombinantne DNK najčešće se koriste bakterije. Proces unosa rekombinantne DNK u bakterije naziva se transformacija. Kako bi proces transformacije uspeo, bakterije moraju biti kompetentne, tj. njihove membrane se moraju učiniti propustljivim za molekule strane DNK. Generisanje kompetentnih bakterija se postiže na različite načine, primenom hemijskih ili fizičkih agenasa. U eksperimentima prikazanim u ovoj tezi primenjen je protokol transformacije bakterija toplotnim šokom. Za transformaciju su korišćene bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*), soja Dh5-Alpha, sa karakteristikama genotipa: *F-80dlacZM15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 -thi-1 gyrA96 relA1*, (MCLAB Molecular Cloning Laboratories®, SAD). U prvom koraku transformacije, u 200 µl Dh5-Alpha soja *E. coli* bakterija kompetentnih za transformaciju toplotnim šokom dodato je ~10 ng plazmidne DNK. Smeša je inkubirana 30 min na ledu uz povremeno mešanje, nakon čega je sledila inkubacija 2 min na temperaturi od 42°C. Potom je smeša inkubirana na ledu još 5 min i prebačena u 1 ml toplog tečnog LB medijuma (engl. *Lysogeny Broth*; Trypton, Ekstrakt kvasca, NaCl i dH₂O) radi oživljavanja. Bakterije su se od toplotnog šoka oporavljale 1 h na 37°C, nakon čega je 100-300 µl kulture zasejano na čvrstu LB podlogu sa ampicilinom i inkubirano preko noći na 37°C. Narednog dana su selektovane pojedinačne bakterijske kolonije i zasađene u 10 ml tečnog LB medijuma sa ampicilinom i inkubirane preko noći na 37°C. Deo volumena iz prekonoćnih bakterijskih kolonija (100-150 µl) zasađen je u veći volumen LB medijuma odakle je potom izolovana plazmidna DNK.

3.4.2. Izolacija plazmidne DNK na srednjoj skali

Izolacija plazmidnih konstrukata korišćenih za transfekciju izvršena je na srednjoj skali korišćenjem kita DNK PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen, SAD). Princip rada ovog kit-a zasniva se na modifikovanoj proceduri alkalne lize, nakon čega se plazmidna DNK selektivno vezuje za specijalizovani anjonski-jonoizmenjivački matriks, pod odgovarajućim uslovima niskih jonskih jačina i vrednosti pH. Molekuli RNK, proteini i ostale nečistoće uklonjeni su pranjem rastvorima srednje jonske jačine. Plazmidna DNK je eluirana u puferu sa visokim sadržajem soli, a zatim odsoljena i koncentrisana precipitacijom korišćenjem izopropanola i prikupljena centrifugiranjem. Kako su plazmidi korišćeni za potrebe produkcije lentivirusa i transdukciju NT2/A, bilo je neophodno da iz izolata budu uklonjeni bakterijski endotoksini, imajući u vidu da prisustvo endotoksina znatno umanjuje efikasnost transdukcije eukariotskih ćelija. Korišćenjem ER (engl. *endotoxin removal*) pufera, dobijenog u PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit-u, sprečeno je vezivanje endotoksina iz bakterija za DNK vezujući matriks. Izolovana plazmidna DNK je kvantifikovana i čuvana na -20°C do upotrebe.

3.4.3. Produkcija lentivirusa i transdukcija NT2/A

Transdukcija je proces prenošenja genetičkog materijala posredstvom virusa. Lentivirusni vektori potiču iz virusa humane imunodeficijencije (HIV) i postali su bitan alat koji omogućava ekspresiju transgena u sisarskim ćelijama. Uobičajeno se lentiviralni vektori produkuju u HEK293 ćelijama. Kako bi nastali zreli virusi potrebno je da HEK293 ćelije budu transfekovane plazmidima koji sadrže gene potrebne za formiranje virusne partikule, kao i plazmidom koji sadrži transgen. Za generisanje virusa u ovom doktoratu korišćena je permanentna ćelijska linija poreklom od humanog embrionalnog bubrega HEK293 (ATCC® eng. *American Type 49 Culture Collection*, SAD). U prvom koraku lentivirusne transfekcije generisani su zreli virusi u HEK293 ćelijama. U tu svrhu 1.2×10^6 ovih ćelija je zasejano u Petri šolje prečnika 10 cm a zatim je, naredni dan, urađena tranzijentna transfekcija korišćenjem polietileneimin MAX (PEI-Max) (pH 7.2) reagensa (Polysciences Inc, SAD). Kako bi se generisali virusi koji nose *SOX9* ekspresioni konstrukt, korišćeni su sledeći vektori: 2.5 µg pMDLg/RRE, 1.7 µg pCMV-VSV-G, 1 µg pRSV-Rev, 10 µg pWPXL ili 10 µg pWPXL-Sox9 (Tabela 4). Za generisanje virusa koji nose *SOX2* ekspresioni konstrukt ili odgovarajući prazan vektor, korišćeno je 8.6 µg pCMV-VSV-G, 13 µg pCMV delta R8.2 ili 10µg pSin-EF2-Sox2-Pur ili 10 µg pSin4-EF2-IRES-Pur (Tabela 4). Za generisanje virusa koji nose lentiviralni anti-sense miR-21 konstrukt (anti-miR-21) ili odgovarajući prazan vektor, korišćeno je: 1,7 µg pCMV-VSVG, 1 µg pRSV-REV, 2,5 µg pMDLg/RRE, 10 µg lentiviralnog antisense-miR21 (anti-miR21) (Radulovic et al., 2017) ili pGreenPuro praznog vektora (pGP; SI505A-1, System Biosciences, SAD, Tabela 4). Lentiviralni transdukcioni vektor pGreenPuro (pGP) korišćen je kao nosač u koji je uklonirana

Tabela 4. Vektori i plazmidi korišćeni u radu.

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
pWPXL	10510 bp	Lentivirusni, sisarski ekspresioni vektor, u koji je ukloniran gen za pojačani zeleni fluorescentni protein (eng. ' <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> ', EGFP). Nosi gen odgovoran za razvoj rezistencije na ampicilin.	Addgene®
pSin4-EF2-IRES-Pur	7500 bp	Lentivirusni, sisarski ekspresioni vektor koji nosi gene odgovorne za razvoj rezistencije na ampicilin i puromicin.	Addgene®
pWPXL-Sox9	10510 bp	Lentivirusni, sisarski ekspresioni plazmid, koji je na mestu gena <i>EGFP</i> sadrži kodirajući region humanog gena <i>Sox9</i> .	Addgene®

		Nosi gen odgovoran za razvoj rezistencije na puromicin.	
pSin-EF2-Sox2-Pur	8500 bp	Lentivirusni, sisarski ekspresioni plazmid. Sadrži kodirajući region humanog gena <i>SOX2</i> . Nosi gen odgovoran za razvoj rezistencije na ampicilin i puromicin.	Addgene®
pMDLg/pRRE	8895 bp	Lentivirusni vektor treće generacije za pakovanje virusa - sadrži HIV-1 gene <i>Pol</i> (kodira revereznu transkriptazu, RNKazu H i integrazu) i <i>Gag</i> (kodira glavni strukturni poliprotein <i>Gag</i>) neophodne za pakovanje virusa, gen odgovoran za razvoj rezistencije na ampicilin.	Addgene®
pCMV-VSV-G	6363 bp	Ekspresioni lentivirusni vektor za pakovanje virusa - kodira G glikoprotein virusa vezikularnog stomatitisa (VSV-G) - neophodan za produkciju virusnih partikula - sadrži gen odgovoran za razvoj rezistencije na ampicilin.	Addgene®
pRSV-Rev	4180bp	Ekspresioni lentivirusni vektor treće generacije za pakovanje virusa - sadrži gen <i>Rev</i> (kodira transaktivacioni protein koji je neophodan za regulaciju translacije strukturnih proteina kapsida) i gen odgovoran za razvoj rezistencije na ampicilin.	Addgene
pCMV delta R8.2	8128bp	Ekspresioni lentivirusni vektor koji nosi gene <i>Pol</i> i <i>Gag</i> neophodne za pakovanje virusa, kao i gen odgovoran za razvoj rezistencije na ampicilin.	Addgene
pmiRZIP-21	nepoznata	pmiRZIP lentivirusni ekspresioni vektor koji poseduje odgovarajući region koji sadrži antisense sekvencu miR-21 (anti-miR-21). Dobijen je kloniranjem mir-21 oligonukleotida (miRZIP-21; Biocat, Nemačka) u pGreen Puro (pGP) lentivirusni ekspresioni vektor.	(Radulovic et al., 2017)
pGreen Puro (pgP)	7861bp	pGreen puro (pGP) shRNA (engl. <i>Small hairpin RNAs</i>) lentivirusni eukariotski, klonirajući ekspresioni vektor koji nosi gene odgovorne za razvoj rezistencije na puromicin i ampicilin. Poseduje CMV (engl. <i>cytomegalovirus</i>) promotor sa kojeg se transkribuje gen za GFP.	System Biosciences

sekvenca za inhibiciju miR-21 (anti-miR-21) koristeći miRNK oligonukleotid (Biocat, Nemačka). Za rastvaranje PEI reagensa i plazmida su korišćen je Opti-MEM™ medijum (Gibco, Thermofisher scientific, SAD). Odnos PEI:DNK koji je korišćen u svim navedenim transfekcijama bio je 3:1. Nakon inkubiranja u transfekcionoj smeši 6h, ćelijama je uklonjen medijum i dodat im je svež kompletan medijum. Virusi su u transfektovanim HEK293 ćelijama generisani i oslobođeni u

medijum u narednih 48 h. Nakon isteka ovog vremenskog perioda ćelijski supernatant je filtriran kroz filter prečnika pore 0.2 μm radi oslobađanja od ćelijskih ostataka. U filtrirani supernatant dodat je agens koji poboljšava efikasnost penetracije virusa u eukariotsku ćeliju, Polybrene (Sigma-Aldrich, SAD) u finalnoj koncentraciji 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Na ovaj način pripremljena infektivna smeša nakapavana je na NT2/A u četvrtoj nedelji sazrevanja. Nakon 6 h ćelije su isprane u 1x fosfatnom puferu za ćelije (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 i ddH_2O) i dodat im je svež kompletan medijum sa dodatkom antibiotika puromicina (0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) u cilju selekcije transdukovanih ćelija. Ćelije su rasle u medijumu koji je sadržavao puromicin narednih 48 h. Eksperimenti na ćelijama su rađeni 5 dana nakon transdukcije.

3.5. Test vijabilnosti

Vijabilnost NT2/A nakon transdukcije sa *SOX2* i *SOX9* ispitana je koristeći CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation esej (MTS esej, Promega, SAD). Pet dana nakon transdukcije sa *SOX2* i *SOX9* lentiviralnim konstruktima i njihovim odgovarajućim kontrolnim vektorima, ćelije su zasejane u sudove sa 96 bunarića (1x10⁴ ćelija po bunariću). Esej je urađen po uputstvu proizvođača. Kolorimetrijsko merenje izvršeno je uz pomoć Infinite 200 PRO čitača za mikroploče (Tecan, Menerdorf, Švajcarska), na talasnoj dužini od 490 nm. Pet dana nakon transdukcije sa anti-miR21 ili praznim vektorom, ćelije su zasejane u ploče sa 96 bunarića (1,5 × 10⁴ ćelija po bunariću) za NT2/A stare jednu nedelju i 2 × 10⁴ ćelija po bunariću za NT2/A stare četiri nedelje. Vijabilnost NT2/A sa utišanom ekspresijom miR-21, ispitana je MTT esejem (M2128, Merck, SAD) za NT2/A prve nedelje sazrevanja i MTS esejem za NT2/A četvrte nedelje sazrevanja. Eseji su urađeni u šest tehničkih replikata i ponovljeni u tri nezavisna eksperimenta.

3.6. Test zarastanja povrede (engl. *Scratch Wound*)

Test zarastanja povrede korišćen je za određivanje migratornog kapaciteta ćelija *in vitro*. NT2/A 2. nedelje sazrevanja zasejani su u Petri šolje prečnika 10cm (4x10⁵ ćelija po šolji) i gajeni su do četvrte nedelje sazrevanja, kad su dostigli konfluentnost (5x10⁵ ćelija po šolji). Konfluentni sloj ćelija zagreban je nastavkom pipete od 200 μL . Pri svakom ručnom nanošenju povrede vodilo se računa da pritisak, ugao i brzina povlačenja nastavka budu što ravnomerniji u cilju dobijanja ogrebotina ujednačenih širina. Kako bi se uklonile odlepljene ćelije, ćelije su isprane sa 1 x PBS-om, i nakon toga im je dodat svež medijum. Naneta je po jedna povreda na konfluentan sloj astrocita u petri šolji od 10 cm. Uslikana su po 4 kadra duž povrede, čija je lokalizacija naznačena markerom. Migratorni kapacitet ćelija sa povećanom ekspresijom *SOX9* analiziran je 24 h nakon ogrebotine, dok je migratorni kapacitet NT2/A sa povećanom ekspresijom *SOX2* analiziran 36 sata nakon ogrebotine, usled sporije migracije ćelijskog fronta. Mesto povrede je fotografisano u momentu nanošenja povrede (0 h) i 24 h (*SOX9*), odnosno 36 h (*SOX2*) nakon povrede upotrebom invertnog mikroskopa DM IL LED (Leica Microsystems, Nemačka). Svaki uzorak je uslikan na 4 lokacije duž inicijalne povrede. Iste lokacije su ponovo fotografisane 24 h (*SOX9*) odnosno 36 h (*SOX2*) nakon nanošenja povrede. Za analizu procenta popunjenosti praznog prostora korišćen je Leica Application Suite V4.8 softver. Za svaki od uzoraka (NT2/A_1N, NT2/A_SOX9, NT2_SOX2 i NT2/A_4N) analizirana su dva seta mikrografija (0h i 24h ili 36h), koja uključuju četiri odvojena kadra, odnosno 4 različite lokacije duž povrede. Povlačenjem linija od jednog do drugog ćelijskog fronta, premerena je širina povrede. Da bi se obuhvatila cela površina kadra, povučen je veći broj paralelnih linija. Premerene dužine izražene su u μm i izvučena je srednja vrednost širine povrede za svaki kadar u svakoj vremenskoj tački. Procenat preostalog slobodnog prostora nakon migracije ćelijskog fronta određen je pomoću formula: srednja vrednost širine povrede nakon 24h × 100 / srednja vrednost širine povrede u 0h, odnosno: srednja vrednost širine povrede nakon 36h × 100 / srednja vrednost širine povrede u 0h. Nakon toga, procenat popunjenosti praznog prostora izračunat je oduzimanjem dobijene vrednosti od 100%, pri čemu je inicijalna širina povrede (0h) uzeta kao referentna vrednost. Analiza procenta popunjenosti praznog prostora izvršena je u tri nezavisna eksperimenta.

Kako bi se analizirala ekspresija *SOX2* i *SOX9* u NT2/A aktiviranim ogrebotinom, dve nedelje stare NT2/A ćelije zasejane su na Petri šolje prečnika 10cm (4×10^5 ćelija po šolji) i gajene su do četvrte nedelje sazrevanja, kada su ćelije dostigle konfluentnost (5×10^5 ćelija po šolji). Konfluentni ćelijski sloj je zagreban nastavkom pipete od 200 μ L. U različitim vremenskim tačkama (0, 8, 24 i 36 h) nakon povrede ćelije su sakupljene i napravljeni su talozi iz kojih su izolovani ukupni ćelijski proteini, koji su dalje korišćeni za Western blot analizu.

3.7. Tretman forskolinom

NT2/A druge nedelje sazrevanja su zasejani na pokrovna stakla obložene Geltrex® reagensom (rastvorenim 1:100 u DMEM medijumu; i inkubirana 30 min na 37°C) i gajene do četvrte nedelje sazrevanja kad su dostigle konfluentnost. Nakon toga ćelije su tretirane 10 μ M forskolinom (F3917, Sigma-Aldrich) u medijumu tokom 24 h. Zatim su fiksirane uz pomoć 4% PFA i imunocitohemijskim bojenjem je ispitana ekspresija *SOX2* i *SOX9*.

3.8. Glutamatni esej

Za procenu preuzimanja glutamata od strane astrocita, korišćen je Glutamate Assay kit (Abcam, SAD). Kapacitet za preuzimanje glutamata izmeren je u NT2/A_4N+*SOX9*, kao i NT2/A_4N+prazan vektor. Ukupan broj ćelija po uzorku iznosio je 3×10^6 (4 konfluentne petri šolje od 10cm). Ćelije su tretirane sa 2 mM glutamatom (Sigma-Aldrich, SAD) koji je dodat u Henkov balansirani rastvor soli sa dodatkom Ca^{2+} (engl. *Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS) u trajanju od 1 h. Sastav HBSS rastvora bio je sledeći: 1.26 mM CaCl_2 , 5.36 mM KCl, 0.44 mM KH_2PO_4 , 0.811 mM MgSO_4 , 137 mM NaCl, 0.336 mM Na_2HPO_4 , 4.166 mM NaHCO_3 i 5.55 mM d-glukoza, pH 7.25 ± 0.15 (Tabela 3). Nakon toga, ćelije su mehaničkim putem skinute sa šolja strugačem (engl. *scraper*) i lizirane u reagensu iz glutamatnog kita. Unos glutamata meren je prema uputstvu proizvođača koristeći Infinite 200 PRO čitač za mikroploče (Tecan, Švajcarska). Unos glutamata je normalizovan na ukupnu količinu proteina u odgovarajućem uzorku (Mahmoud et al., 2019), merenu Bradford esejem.

3.9. Test senescencije

Za analizu senescencije NT2/A prve i četvrte nedelje sazrevanja sa utišanom ekspresijom miR-21 korišćen je Senescence β -galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, SAD) prema uputstvima proizvođača. Test senescencije zasniva se na sposobnosti enzima β -galaktozidaze povezane sa senescencijom (SA- β -gal) da katalizuje hidrolizu hromogenog supstrata X-gal-a (5-bromo-4-hloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid) na pH=6, što je praćeno pojavom zelenog produkta u senescentnim ćelijama. NT2/A ćelije su zasejane u ploče sa 24 bunarića ($1,7 \times 10^4$ ćelija po bunariću). Transdukcija je sprovedena na NT2/A ćelijama u prvoj i četvrtoj nedelji sazrevanja. Pet dana nakon transdukcije anti-miR21 konstruktom ili praznim vektorom, ćelije su obojene prema uputstvu proizvođača koristeći odgovarajući kit. Nakon toga, ćelije su isprane 1 x PBS-om, fiksirane sa 4% PFA i bojene 12 h na 37°C radi detekcije SA- β -gal koristeći X-gal. Sve ćelije su slikane pod istim uslovima pomoću DM IL LED invertovanog mikroskopa. Intenzitet SA- β -gal bojenja kvantifikovan je pomoću opcije Analyze (measure area) softvera ImageJ. Rezultati su dobijeni iz tri nezavisna biološka eksperimenta.

3.10. Izolacija totalne RNK

Totalna RNK izolovana je iz uzoraka pomoću TRIzol reagensa (engl. *TRI reagent® Solution*) (Invitrogen, SAD) prema uputstvu proizvođača. Ćelije su isprane 1xPBS-om, odvojene od površine suda 1x ili 2x tripsinom (Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD) i resuspendovane u kompletnom medijumu. Ćelije su potom centrifugirane 5 min na 1200 rpm na sobnoj temperaturi (engl. *room temperature*, RT), a nakon uklanjanja supernatanta talog je resuspendovan u 1ml 1xPBS-a. Ćelije su

još jednom centrifugirane 5min na 1200 rpm na RT, a nakon uklanjanja supernatanta talog je resuspendovan u TRIzol reagensu (u talog ćelija je dodata količina reagensa koja odgovara površini suda u kome su ćelije gajene; 1ml za konfluentni sloj ćelija iz petri šolje prečnika 10cm, 500μl za konfluentni sloj ćelija iz petri šolje prečnika 6 cm). Uzorci su zatim inkubirani 5 min na RT. U homogenate je potom dodat hloroform (1/5 volumena korišćenog TRIzol reagensa), komponente smeše su promešane na vorteksu i zatim inkubirane 5 min na RT. Smeša je centrifugirana 15 min na 12000 x g na +4 °C. Nakon centrifugiranja u tubi su se izdvojile tri faze: donja, organska faza, srednja beličasta faza, i gornja, vodena faza sa RNK. Gornja, vodena faza, u kojoj se nalazila RNK, prebačena je u nove tube i RNK je precipitirana dodavanjem izopropanola (polovina dodatog volumena TRIzol reagensa). Smeša je inkubirana 10 min na RT, a zatim centrifugirana 10 min na 12000x g na +4°C. Nakon centrifugiranja na dnu tube je bio vidljiv beličast talog RNK. Uklonjen je supernatant, a talog opran u 75% hladnom etanolu (iste zapremine kao korišćenog Trizol reagensa) i centrifugiran 5 min na 7500 x g na +4°C. Posle odlivanja supernatanta, talog je osušen na RT i rastvoren u odgovarajućoj količini ddH₂O (10-40μl u zavisnosti od veličine taloga). Da bi se RNK potpuno rastvorila u vodi, uzorci su inkubirani 10 min u vodenom kupatilu na +60°C. Za određivanje koncentracije izolovane RNK korišćen je Biospec-Nano spektrofotometar (Shimadzu, Japan). Kvalitet izolovane RNK proveren je elektroforezom (80V, 45 min) u 1% agaroznom gelu (Serva, Nemačka), pripremljenim korišćenjem agaroze rastvorene u 1x TAE (Tris-acetat EDTA) (40mM Tris baza, 20mM Acetate, 2mM EDTA i ddH₂O) puferu koji sadrži 0,2 mg/ml etidijum bromida. Signal je vizuelizovan korišćenjem BioDoc Analyzer aparata (Biometra, Nemačka).

3.11. Oslobođanje totalne RNK od ostataka genomske DNK

Kako bi se izolovana RNK oslobodila tragova DNK korišćen je DNA-free™ DNA Removal Kit (Invitrogen, SAD) po uputstvima proizvođača. Uzorak koji je sadržao 2.5 μg izolovane totalne RNK tretiran je sa 2 U DNKaza I enzima i 0.1 volumenom 10x koncentrovanog DNKaza I pufera u ukupnoj zapremini od 25 μl. Smeša je inkubirana u vodenom kupatilu na 37°C 30 min što su optimalni uslovi za aktivnost DNKaze I. Da bi dalja aktivnost DNKaze bila zaustavljena u reakcionu smešu dotato je 2.5 μl DNKaza I inaktivacionog reagensa i smeša je inkubirana 2 min na RT uz povremeno mešanje. Zatim su uzorci centrifugirani na 10000 x g u trajanju od 90 sek. Nakon centrifugiranja, supernatant sa RNK oslobođenom od nukleaza, prebačen je u nove tube i čuvan na -80°C i korišćen za sintezu cDNK.

3.12. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Za reverznu transkripciju totalne RNK u reakciji lančane polimerizacije (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) korišćen je High-Capacity cDNA Reverse Transcription®kit (, Applied Biosystems, SAD) prema uputstvu proizvođača. Za sintezu komplementarne DNK kao matrica korišćen je 1μg totalne RNK u ukupnoj zapremini od 20μl. Reakciona smeša je pored RNK sadržavala i 2μl nasumičnih oligonukleotida, 1 μl MultiScribe™ reverzne transkriptaze (50 U/μl), 2 μl 10x RT pufera, 0,8 μl 100 mM dNTP miksa i vodu prečišćenu od nukleaza do 20 μl. cDNK je sintetisana u aparatu 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: (1) vezivanje oligonukleotida za RNK: 10 min na 25°C; (2) sinteza cDNK: 120 min na 37°C; (3) inaktivacija reverzne transkriptaze: 5 min na 85°C. Uzorci cDNK su čuvani na -20 °C do korišćenja.

3.13. Semi-kvantitativni RT-PCR

Kao matrica za semi-kvantitativni RT-PCR korišćena je prethodno sintetisana cDNK. Za umnožavanje DNK fragmenata korišćen je KAPA 2G Fast HotStart Ready Mix (Kapa Biosystems, SAD). Reakciona smeša ukupne zapremine od 10 μl sastojala se od 50 ng cDNK, 5 μl 2x KAPA 2G Fast HotStart Ready Mix-a, 0,5 pmol/μl odgovarajućeg F (engl. *forward* - F) oligonukleotida, 0,5 pmol/μl odgovarajućeg R (engl. *reverse* - R) oligonukleotida i ddH₂O do 10 μl. U reakcijama

semikvantitativnog RT-PCR-a korišćeni su oligonukleotidi specifični za gene *OCT4* (*OCT4 F* i *OCT4 R*), *NEUROD1* (*NeuroD1 F* i *NeuroD1 R*), *GAPDH* (*GAPDH F*, *GAPDH R*) (sekvence oligonukleotida su prikazane u Tabeli 5). Ekspresija gena *GAPDH* korišćena je za normalizaciju količine matrice korišćene u reakcijama semi-kvantitativnog RT-PCR-a. Uslovi koji su korišćeni za odvijanje PCR reakcije: (1) inicijalna denaturacija: 3 min na 95°C; (2) 30 ciklusa umnožavanja: a) denaturacija 15 sec na 95°C, b) aniling 15 sec na 60°C, c) elongacija 15 sec na 72°C; (3) finalna elongacija: 1 min na 72°C.

PCR reakcija rađena je u 2720 Thermal Cycler aparatu. Dobijeni PCR produkti provereni su elektroforezom u 2% agaroznom gelu pripremljenom korišćenjem 1x TAE pufera sa 0,2mg/ml etidijum bormida, na 80V, 45 min, a signal je vizuelizovan korišćenjem BioDoc Analyzer aparata (Biometra, Nemačka).

3.14. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)

qRT-PCR je metoda koja omogućava umnožavanje molekula DNK od interesa uz istovremenu relativnu kvantifikaciju njegove količine. Za qRT-PCR reakcije korišćen je Power SYBRTM Green PCR master mix (Applied Biosystems, SAD) prema upustvima proizvođača. Za qRT-PCR reakcije korišćeni su PCR aparati: 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, MA, SAD) i CFX Opus Real-Time PCR Systems (Biorad, SAD). Pored SYBRTM Green PCR master mix-a, u reakcionu smešu ubačeno je 0,5 pmol/μl odgovarajućeg F (engl. *forward* - *F*) oligonukleotida, 0,5 pmol/μl odgovarajućeg R (engl. *reverse* - *R*) oligonukleotida (Tabela 5), 1 μl odgovarajuće cDNK matrice (50 ng) i ddH₂O do 10 μl. Ekspresija gena *GAPDH* korišćena je za normalizaciju količine matrice korišćene u RT-qPCR reakcijama prema sledećem protokolu: (1) inicijalna denaturacija: 10 min na 95°C; (2) 40 ciklusa umnožavanja: a) denaturacija-15 sec na 95°C, b) aniling i elongacija-1 min na 60°C.

Svaka reakcija rađena je u triplicatu i za svaki uzorak izračunata je srednja vrednost. Pomoću komparativnog algoritma za kvantifikaciju određen je relativni nivo ekspresije analiziranih gena. Ova metoda se zasniva na primeni formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$, koja omogućava izračunavanje stepena promene ekspresije ciljnog gena između ispitivanih uzoraka. Vrednost $\Delta\Delta Ct$ predstavlja razliku između ΔCt vrednosti ispitivanog uzorka i ΔCt vrednosti kontrolnog uzorka. ΔCt se određuje kao razlika između Ct vrednosti gena od interesa i Ct vrednosti unutrašnje kontrole (*GAPDH*), čiji bi nivo trebalo da ostane isti u svim ispitivanim uzorcima. Relativna ekspresija ispitivanih gena prikazana je u poređenju sa ekspresijom u kontrolnim ćelijama ili ćelijama transdukovanim praznim vektorom, kojima je dodeljena vrednost 1.

Tabela 5. Sekvence oligonukleotida korišćenih u eksperimentima semi-kvantitativnog PCR-a i PCR-a u realnom vremenu (RT-qPCR).

Naziv	Sekvenca
OCT4 F	5'-GCTTTGAGGCTCTGCAGCTT-3'
OCT4 R	5'-TCTCCAGGTTGCCTCTCACT-3'
NEUROD1 F	5'-GGAAACGAACCCACTGTGCT-3'
NEUROD1 R	5'-GCCACACCAAATTCGTGGTG-3'
SOX2 F	5'-CCCCTGGCATGGCTCTTGGC-3'
SOX2 R	5'-TCGGCGCCGGGAGATACAT-3'
SOX9 F	5'-CTTCTGAACGAGAGCGAGA-3'
SOX9 R	5'-CTGCCCGTTCTTCACCGACTTC-3'
APCDD1 F	5'-AAGGAGTCACAGTGCCATCA-3'
APCDD1 R	5'-GCCTGACCTTACTTCACAGCC-3'
NFIA F	5'-TAATCCAGGGCTCTGTGTCC-3'
NFIA R	5'-CCTGCAGCTATTGGTGTCTG-3'

ZCCHC24 F	5'-CTCCTCCGAACCTACCTGTGC-3'
ZCCHC24 R	5'-GTTGATGTGGCACTTGATGC-3'
SLC1A3 F	5'-GGTTGCTGCAAGCACTCATCAC-3'
SLC1A3 R	5'-CACGCCATTGTTCTCTTCCAGG-3'
SLC1A2 F	5'-GACAGTCATCTTGGCTCAGA-3'
SLC1A2 R	5'-AATCCACCATCAGCTTGGCC-3'
p21Waf1/Cip1 F	5'-GCCTCAAGATCATCAGCAATGC-3'
p21Waf1/Cip1 R	5'-CCACGATACCAAAGTTGTCATGG-3'
TP53 F	5'-GACACCACTGGAGGGTGACT-3'
TP53 R	5'-CAGGTCCACATGGTCTTCCT-3'
GAPDH F	5'-GCCTCAAGATCATCAGCAATGC-3'
GAPDH R	5'-CCACGATACCAAAGTTGTCATGG-3'

3.15. Sinteza cDNK korišćenjem Taqman™ MicroRNA Assay

Za sintezu cDNK korišćene za analizu ekspresije miR-21 korišćen je TaqMan® MicroRNA esej (ID testa 000397, Applied Biosystems, SAD), a za sintezu RNU44 (engl. *small nucleolar RNA C/D box 44*) korišćen je TaqMan® MicroRNA esej (ID testa 001094, Applied Biosystems, SAD), prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša sadržala je 1,5 µl 10x RT pufera za reverznu transkriptazu, 0,7 µl enzima reverzne transkriptaze (MultiScribe™, Applied Biosystems, SAD) 50 U/µl, 0,19 µl RNKaznog inhibitora, 0,15 µl 100nm dNTP miksa, 5 x specifičnog oligonukleotida po tipu ukosnice (engl. *stem-loop*) za ciljano umnožavanje i ddH₂O do 15 µl. Kao matrica korišćeno je 3 µl molekula RNK koncentracije 20 ng/µl. Reakcija sinteze izvedena je u PCR aparatu prema programu: (1) vezivanje oligonukleotida za RNK: 30 min na 16°C; (2) sinteza cDNK: 30 min na 42°C; (3) inaktivacija reverzne transkriptaze: 5 min na 85°C.

3.16. RT-qPCR korišćenjem Taqman proba

Za analizu ekspresije miR-21 rađena je reakcija qPCR-a korišćenjem TaqMan® Universal PCR Master Mix-a (*Applied biosystems*, SAD) u ukupnoj zapremini od 10 µl, u aparatu 7500 Real-Time PCR Systems. Reakciona smeša sadržala je i 0,5 µl specifičnih fluorescentno obeleženih oligonukleotida (20 x) (TaqMan® microRNA esej, ID testa 000397), 2,5 µl ddH₂O, a kao matrica je korišćeno 2 µl cDNK prethodno sintetisane korišćenjem Taqman microRNA esej. Svaka reakcija rađena je u triplicatu i za svaki uzorak je izračunata srednja vrednost. Ekspresija RNU44 (ID testa 001094, Applied Biosystems, SAD) korišćena je za normalizaciju količine matrice korišćene u RT-qPCR reakcijama. Reakcija je izvedena prema sledećem protokolu: (1) aktivacija Taqman polimeraze: 10 min na 95°C; (2) 40 ciklusa umnožavanja: a) denaturacija-15 sec na 95°C, b) aniling i elongacija -1 min na 60°C.

Relativna ekspresija miR-21 procenjena je metodom $\Delta\Delta C_t$ i normalizovana u odnosu na RNU44. Relativna ekspresija miR-21 prikazana je kao procenat u odnosu na ekspresiju u kontrolnim ćelijama ili u ćelijama transdukovanim praznim vektorom, kojima je dodeljena vrednost 1.

3.17. Izolacija ukupnih proteina

U cilju analize ekspresije proteina izolovani su ukupni proteini iz NT2/D1 ćelija, kao i NT2/A različitih faza sazrevanja. Proteini su izolovani prema prethodno objavljenom protokolu (Xu et al., 2003.). U prvom koraku, ćelije se odvojene od podloge koristeći 1x Tripsin, zatim je dodat kompletan medijum radi inaktivacije Tripsina. Ćelije su centrifugirane 5 min na 1200 rpm, a talog ćelija je zatim ispiran 2 puta u 1x PBS-u i čuvan na -80°C do korišćenja. Talog ćelija je resuspendovan u puferu za

lizu sledećeg sastava: 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8 i ddH₂O (Tabela 3) i koktel inhibitora proteaza (1 µg/µl aprotinin, 1 µg/µl leupeptin i 1 µg/µl pepstatin A) (Roche diagnostics, Švajcarska). Čelije su lizirane inkubiranjem 15 min na +4°C uz rotiranje, a zatim su uzorci centrifugirani u na 14000 rpm, 15 min na +4°C. Supernatant, u kome se nalaze ukupni proteini ćelija, prebačen je u nove tube i čuvan na - 80°C do upotrebe.

3.18. Imunološka detekcija proteina (Western blot)

Koncentracija ukupnih proteina određena je Bradfordovom metodom korišćenjem BioRad Protein Assay Dye (Serva, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Standardi za merenje koncentracije dobijeni su rastvaranjem BSA u koncentracijama od 1 do 20 µg/ml. Uzorci su pripremljeni rastvaranjem 1 µl ukupnog ćelijskog lizata u 799 µl ddH₂O u koji je zatim dodato 200 µl "BioRad Protein Assay Dye" reagensa. Apsorbancija je merena na spektrofotometru (Ultrospec 3300 Pro, Amersham Biosciences, UK) na talasnoj dužini od 595 nm i na osnovu standardne krive određena je koncentracija proteina u analiziranim uzorcima. Uzorci proteina su denaturisani rastvaranjem u puferu za nanošenje (engl. *loading buffer*) sastavljenog od sledećih komponenti: 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β-merkaptioetanol, 0,01% bromfenol plavo (Tabela 3) i inkubacijom 5 min na 95°C. Nakon denaturacije, uzorci (30 µg ukupnih proteina i proteinski standard (MWP06, Nippon GENETICS EUROPE, Nemačka) nanošeni su na prethodno pripremljeni 5% gel za koncentrovanje u čiji sastav ulaze: 5% akrilamid, 0,125M Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 0,01% APS, 0,001% TEMED i ddH₂O. Uzorci su potom razdvajani na 12% gelu za razdvajanje koji su činile sledeće komponente: 12% akrilamida, 0,375M Tris-HCl pH 8,8, 1% SDS-a, 0,01% APS-a, 0,001% TEMED-a i ddH₂O. Uzorci su elektroforetski razdvajani na BioRad Protein Mini sistemu (BioRad, SAD) u TANK puferu koji sadrži: 28,75 mM Tris, 0,19 M glicin, 0,1% SDS. Uslovi pod kojima se odvijala elektroforeza su: 80 V dok uzorci putuju kroz gel za koncentrovanje i 150 V dok uzorci putuju kroz gel za razdvajanje. Nakon razdvajanja proteina po veličini na gelu, usledilo je prenošenje proteina sa gela na noseće membrane od polivinilfluorida sa porama prečnika 0,2 µm (Immobilion™ PDVF membrane, Millipore, SAD). Membrana je aktivirana inkubacijom u metanolu u trajanju od 5 min. Korišćen je polusubi sistem elektrotransfera na aparatu Whatman Biometra® Fastblot (Biometra, Nemačka) u uslovima konstantne jačine struje od 2 mA/cm² membrane u trajanju od 45 min. Za elektrotransfer proteina na membranu korišćeni su sledeći puferi sistemi, prema uputstvu proizvođača (Biometra, Nemačka): anodni pufer I (300 mM Tris-HCl pH 10,4, 20% metanol i ddH₂O), anodni pufer II (25 mM Tris-HCl pH 10,4, 20% metanol i ddH₂O) i katodni pufer (25 mM Tris-HCl pH 9,5, 20% metanol, 0,3% glicin i ddH₂O) (Tabela 3). Nakon završenog transfera za vizuelizaciju proteina korišćen je rastvor Ponceau S boje (0,1% Ponceau S, 5% sirćetna kiselina). Membrana je odbojena inkubacijom u metanolu 3 min uz mešanje. Po završenom transferu, membrane su blokirane u 5% rastvoru obranog mleka (Santa Cruz, TX, SAD) rastvorenog u TBST-u (engl. *Tris Buffered Saline with Tween 20*), u čiji sastav ulaze: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl i 0,05% Tween20 (Tabela 3) na RT u trajanju od 60 min. Nakon blokiranja, membrana je inkubirana sa primarnim antitelom rastvorenim u 5%BSA/TBST preko noći na +4°C. Primarna antitela i korišćena razblaženja prikazani su u Tabeli 6. Nakon inkubacije sa primarnim antitelom, višak nevezanog antitela uklonjen je sa membrane kroz 3 ispiranja od po 10 min i 2 ispiranja od 5 min u 1×TBST puferu, a zatim su membrane inkubirane u sekundarnim antitelima rastvorenim u 5% rastvoru obranog mleka rastvorenog u TBST-u, 1h na RT. Sekundarna antitela i njihova razblaženja prikazana su u Tabeli 7. Membrane su potom ispirane na i 3 x 10 min i 2 x 5 min u 1×TBST puferu da bi se uklonio višak nevezanog antitela i signal je vizualizovan inkubacijom membrane u peroksidaznom supstratu ECL (Immobilion supstrat, Millipore, SAD) po uputstvu proizvođača. Hemiluminescentni signal je detektovan u mračnoj sobi na radiografskom filmu (engl. *Kodak Medical X Ray film*) ili na Biorad ChemiDoc Imaging sistemu (Biorad, SAD). Eksperimenti su urađeni u triplikatu, a analiza blotova je urađena korišćenjem Gel Analyzer opcije u ImageJ softveru.

Tabela 6. Primarna antitela korišćena u Western blot (WB), imunohistohemijiskim (IHH) i imunocitochemijskim (ICH) eksperimentima

Primarno antitelo	Proizvođač	Kataloški broj	Razblaženje
zečje anti-SOX2	Active Motif, SAD	39823	1:3000 WB 1:100 ICH 1:100 IHH
zečje anti-SOX9	Merck, SAD	ab5535	1:500 WB 1:100 ICH 1:100 IHH
zečje anti-GFAP	Dako, Nemačka	Z0334	1:1000 WB 1:200 ICH
mišje anti-GFAP	UC Davis/NIH NeuroMab Facility, SAD	73-240	1:200 IHH
mišje anti-vimentin	Santa Cruz Biotechnology, Nemačka	sc-6260	1:300 ICH 1:1000 WB
mišje anti-vimentin	Dako, Nemačka	M0725	1:300 IHH
zečje anti-Ki67	Abcam, SAD	ab15580	1:300 ICH
mišje anti-GAPDH	Novus Biologicals, SAD	NBP2- 27103SS	1:15.000 WB
mišje anti-MAP2	Abcam, SAD	ab11267	1 : 500 ICH
zečje anti-S100B	Sigma-Aldrich, SAD	S2644	1:100 ICH
mišje anti-tubulin	Abcam, SAD	ab56676	1:100.000 WB

Tabela 7. Sekundarna antitela korišćena u Western blot (WB), imunohistohemijiskim (IHH) i imunocitochemijskim (ICH) eksperimentima.

Sekundarno antitelo	Proizvođač	Kataloški broj	Razblaženje
magareće anti-zečje antitelo konjugovano sa peroksidazom rena	ThermoFisher Scientific, SAD	A16023	1:10.000 WB
magareće anti-mišje antitelo konjugovano sa peroksidazom rena	Active Motif, SAD	15014	1:10.000 WB
magareće anti-mišje IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Invitrogen, SAD	A-21202	1:250 ICC
magareće anti-zečje IgG (H+L) Alexa Fluor 555	Invitrogen, SAD	A-21428	1:250 IHC
kozje anti-zečje IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Invitrogen, SAD	A-11034	1:500 ICC
kozje anti-mišje IgG (H+L) Alexa Fluor 546	Invitrogen, SAD	A-11030	1:500 ICC
Biotinilizovano kozje anti- zečje IgG (H+L)	Vector Laboratories, SAD	BA-1000	1:500 ICC
streptavidin DyLight® 488	Vector Laboratories, SAD	SA-5488	1:500 ICC

3.19. Imunofluorescencija

3.19.1. Priprema životinjskog tkiva i imunohistohemijska analiza

Desetog dana nakon povrede, životinje iz obe grupe (ASK i kontrolna grupa) su žrtvovane. Mozgovi su izolovani i fiksirani u 4% PFA na 4 °C tokom noći, zatim su kriozaštićeni inkubacijom u rastvorima saharoze različitih koncentracija: 10%, 20% i 30% u 0,2 M fosfatnom puferu (0,16 M Na₂HPO₄, 0,04 M NaH₂PO₄ i ddH₂O; pH 7,4; Tabela 3) i zamrznuti u izopentanu prethodno ohlađenom na -80 °C. Koronarni preseći mozga, debljine 25 µm, isečeni su na kriostatu, (Leica Instruments, Nemačka) postavljeni na staklene mikroskopske pločice, osušeni na RT i čuvani na -20 °C. Ovaj krioprezervirani histološki materijal iz prethodnog rada (Jeremic et al., 2023), korišćen je za *ex vivo* analizu ekspresije SOX2 i SOX9 prikazane u ovom radu. Pre imunohistohemijskog bojenja, pločice su držane na RT 30 min. Za oslobađanje antigena preseći su zagrevani u citratnom puferu u čiji sastav ulaze: 10 mM tri-Natrijum citrat dihidrat, 0,05% Tween 20 i ddH₂O (Tabela 3), pH 6, 4 min na 75 °C. Nakon dva ispiranja od po 5 min u 0,01 M PBS-u, usledilo je blokiranje nespecifičnog vezivanja u 5% normalnom kozjem serumu (NGS), rastvorenom u PBT (0.1% Triton X-100 u PBS-u), 60 min na RT. Preseći su zatim inkubirani sa primarnim antitelima rastvorenim u 1%BSA/0,1% Triton X-100/PBS, u vlažnoj komori na +4 °C tokom noći (Tabela 6). Preseći su potom isprani tri puta u PBS-u i inkubirani 2h na RT u odgovarajućim sekundarnih antitelima rastvorenim u PBS-u (Tabela 7). Da bi se obeležila jedra ćelija, uzorci su inkubirani sa 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:2000, Sigma-Aldrich, SAD) 20 min na RT. Nakon poslednjeg ispiranja u PBS-u, pločice su fiksirane sa Mowiol (Sigma-Aldrich, SAD) medijumom. Za testiranje specifičnosti bojenja, korišćeni su preseći mozga inkubirani bez primarnih antitela. Mikrografije su snimane korišćenjem Carl Zeiss AxioVision mikroskopa (Zeiss, Nemačka) na uvećanjima od 10x i 40x.

3.19.2. Imunocitohemija

NT2/N i NT2/A prve i četvrte nedelje sazrevanja zasađeni su na okugla pokrovna stakla prečnika 12mm i/ili 18mm (Citotest scientific Co., Kina) obložena Geltrexom (Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD). Ćelije su fiksirane 4% PFA u PBS-u, 20 min na RT i nakon toga isprane 1x PBS-om 3 x 10 min. Ćelije su permeabilizovane 0,2% triton X-100 u PBS-u, 20 min na RT. Zatim je usledilo blokiranje nespecifičnih mesta vezivanja sa 1% BSA/5% NGS u PBS-u, 60 min na RT. Nakon blokiranja, ćelije su inkubirane sa primarnim antitelom rastvorenim u 1% BSA rastvorenim u 0.1% PBT, preko noći na +4°C. Nakon toga usledila su 3 ispiranja po 5 min u 0,1% PBT-u. Ćelije su zatim inkubirane sa sekundarnim antitelom rastvorenim u 1% BSA/ 0.1% PBT, 60 min na RT u mraku. Usledila su 3 ispiranja od po 5 min u 0.1% PBT-u i jedno ispiranje od 5 min u PBS-u. U cilju obeležavanja jedara, ćelije su potom inkubirane sa fluorescentnom bojom DAPI, razblaženom 1:2000 u PBS-u, 10 min na RT u mraku. Pokrovno stakalce je fiksirano na mikroskopske pločice korišćenjem smeše za montiranje (Mowiol). U slučaju imunofluorescentnog bojenja sa zečjim anti-GFAP antitelom i mišjim anti-SOX2 antitelom, nakon ispiranja sa PBS-om, radi bolje detekcije antigena, ćelije su podvrgnute oslobađanju antigena u citratnom puferu pH 6,0, na 75 °C tokom 4 min. Nakon hlađenja, ćelije su isprane PBS-om, blokiranje sa 5% BSA/5% NGS/PBT 60 min na RT, i inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima razblaženim u 1%BSA/PBT preko noći na 4 °C (Tabela 6). U slučaju imunofluorescentnog bojenja SOX2 i SOX9 nakon inkubacije sa primarnim antitelom urađena su tri dodatna koraka u cilju amplifikacije signala: 1) Inkubacija sa sekundarnim anti-zečjim antitelom obeleženim biotinom rastvorenim u 1%BSA/PBS-u, 60 min na RT; 2) 2 ispiranja po 5 min u 0,1% PBT-u i jedno ispiranje od 5 min u PBS-u; 3) Inkubacija sa streptavidinom koji je fluorescentno obeležen, rastvorenim u 1% BSA/PBT, 60 min na RT. Aktinski filament obeleženi su inkubiranjem ćelija 60 min u Phalloidin-iFluor 594 reagensu (Abcam, SAD), razblaženom 1:3000 u 1% BSA/PBT. Preparati ćelija analizirani su pomoću fluorescentnog mikroskopa Olympus BX51 i odgovarajućeg softvera Cytovision 3.1 (Applied Imaging Corporation, SAD).

3.20. *In silico* analiza miR-21 ciljnih gena

Za predviđanje ciljnih gena miR-21 korišćeni su softveri dostupni na internetu: TargetScan Human Release 7.2 (http://www.targetscan.org/vert_72/) (Agarwal et al., 2015); DIANA TarBase 8 (https://carolina.imis.athenainnovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex) (Karagkouni et al., 2018) i MirDB (<http://mirdb.org/>) (Liu & Wang, 2019), koji poseduju baze sa potencijalnim ciljnim genima različitih miRNK. Predviđeni ili verifikovani ciljni geni miR-21, dobijeni pomoću ovih softvera, preklopljeni su sa genima čija je ekspresija povećana u astrocitima tokom senescencije izazvane zračenjem, objavljenim u radu Limbada i saradnika (Limbada et al., 2020).

3.21. Statistička analiza

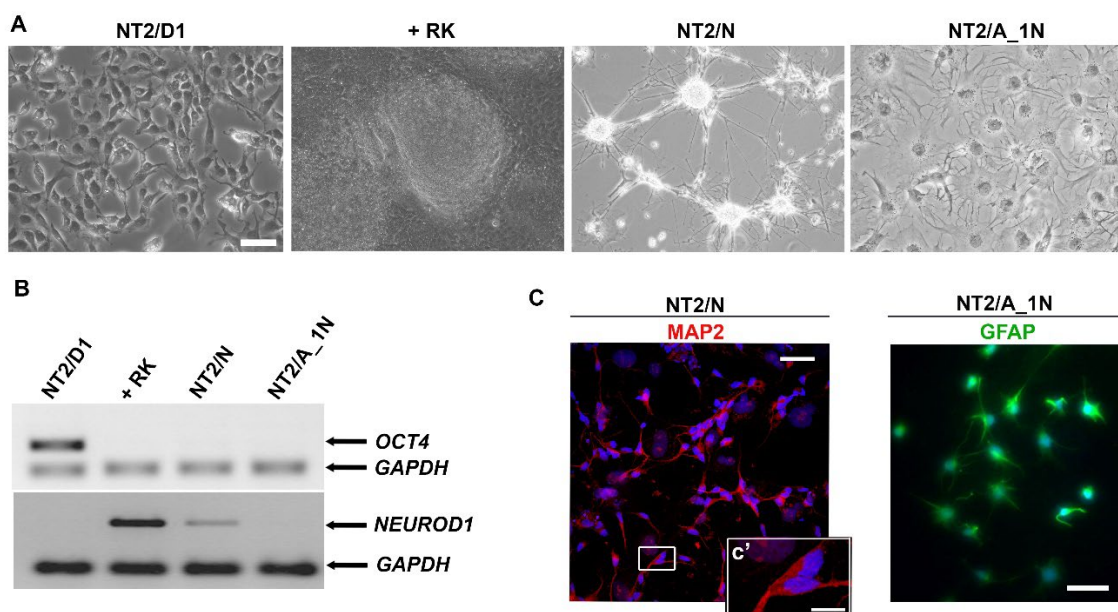
Kako bi se procenio proliferativni kapacitet NT2/A u različitim uzorcima, analiziran je broj Ki67+ i Ki67- ćelije pomoću fluorescentnog mikroskopa Olympus BX51 i odgovarajućeg softvera Cytovision 3.1. Brojanje je vršeno ručno u definisanim vidnim poljima pri uveličanju 60x, kako bi se jasno uočila Ki67+ jedra. Za svaki uzorak u analizu je uključeno najmanje 100 jedara. Na kraju je izračunat procenat Ki67+ jedara u odnosu na ukupan broj jedara.

S obzirom na to da su podaci zadovoljavali kriterijume normalne raspodele i homogenosti varijanse, za analizu je korišćen Studentov t-test u SPSS statističkom softveru v20. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM (engl. *standard error mean*) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta, dok su p-vrednosti izračunate primenom Studentovog t-testa. Statistička značajnost je označena kao * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ i *** $p \leq 0,001$.

4. Rezultati

4.1. Karakterizacija ćelija dobijenih *in vitro* neuralnom diferencijacijom humanih pluripotentnih embrionalnih karcinomskih NT2/D1 ćelija

NT2/D1 ćelije su diferencirane korišćenjem RK po prethodno opisanom protokolu (Pleasure et al., 1992; Sandhu et al., 2002). Tokom diferencijacije praćene su morfološke karakteristike ćelija (Slika 9A) i ispitivana je ekspresija specifičnih markera (Slika 9B, C). Nediferencirane NT2/D1 ćelije karakteriše sitno ćelijsko telo i odsustvo nastavaka (Slika 9A) kao i ekspresija markera pluripotentnosti *OCT4* (Slika 9B). Nakon četiri nedelje tretmana RK, ćelije formiraju gustu višeslojnu kulturu sa okruglim grupacijama ćelija koje rastu na površini gustog sloja adhezivnih ćelija (Slika 9A, +RK). Ovu višeslojnu kulturu ćelija čine mešane populacije neuronalnih i glijskih progenitora (Pleasure et al., 1992; Sandhu et al., 2002) što pokazuje i visok nivo ekspresije markera neuronalnih progenitora- *NEUROD1* (Slika 9B). Daljom diferencijacijom od neuronalnih progenitora formiraju se NT2/N, a od glijskih progenitora nastaju NT2/A (Slika 9A i C) koji se iz ovih višeslojnih kultura ćelija izoluju mehaničkim razdvajanjem prema prethodno uspostavljenim protokolima (Pleasure et al., 1992; Sandhu et al., 2002).

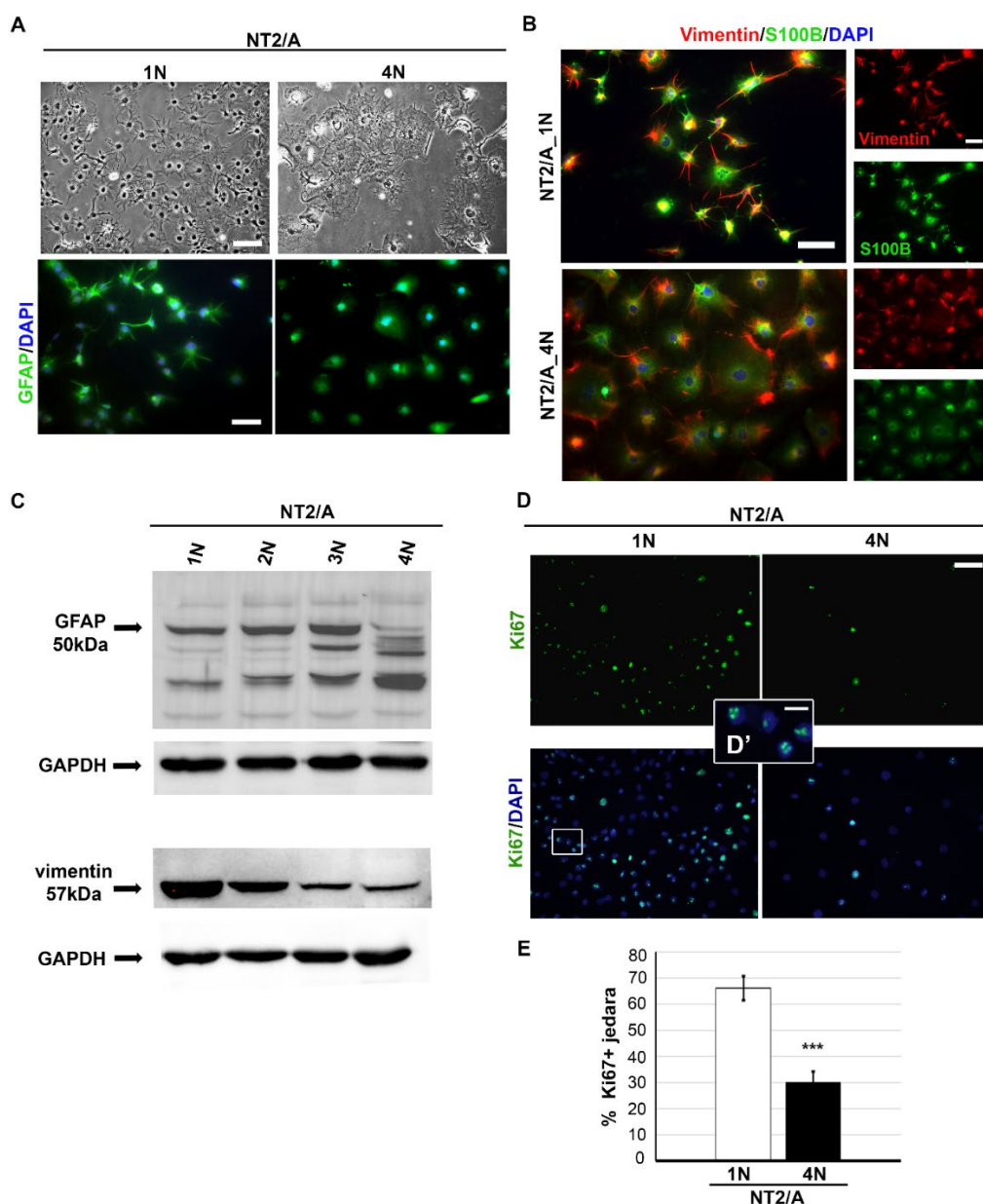


Slika 9. Karakterizacija humanih pluripotentnih embrionalnih karcinomskih NT2/D1 ćelija tokom neuralne diferencijacije. (A) Fazno-kontrastne mikrofografije prikazuju morfološke promene koje se dešavaju tokom RK-indukovane neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. Uveličanje 10x. Skala-100 μ m. (B) Semikvantitativna RT-PCR analiza ekspresije gena *OCT4* i *NEUROD1*. *GAPDH* je korišćen kao kontrola ujednačenosti nanošenja uzoraka. (C) Imunofluorescentno obeležavanje NT2/N anti-MAP2 antitelom (crveni signal) i NT2/A anti-GFAP antitelom (zeleni signal). Jedra ćelija su obeležena DAPI-jem (plavi signal). Region uokviren na slici (C) je uvećan u (C'). Skala: (C) -100 μ m; (C')- 25 μ m. NT2/D1 - nediferencirane ćelije; +RK - NT2/D1 ćelije nakon četiri nedelje RK tretmana; NT2/N - zreli neuroni; NT2/A_1N - astrociti 1. nedelje sazrevanja.

Fenotip neurona odnosno astrocita fenotip potvrđen je analizom morfoloških karakteristika i imunofluorescentnim obeležavanjem specifičnih citoskeletnih markera. NT2/N odlikuje malo ćelijsko telo sa dugačkim nastavcima koji formiraju mrežu (Slika 9A, NT2/N). Ove ćelije pokazuju visok nivo ekspresije citoskeletnog proteina MAP2 eksprimiranog u ćelijskom telu i neuronskim nastavcima (Slika 9C, NT2/N). Astrociti ranih faza sazrevanja (NT2/A 1. nedelja, NT2/A_1N) se odlikuju zvezdastom morfologijom sa velikim brojem razgranatih nastavaka (Slika 9A) i ekspresijom intermedijarnog filameta GFAP (Slika 9C).

4.2. Karakterizacija NT2/A tokom sazrevanja

Nakon izolovanja iz višeslojnih ćelijskih kultura, prema prethodno objavljenom protokolu (Sandhu et al., 2002) NT2/A gajeni su *in vitro* još 5 nedelja u medijumu bez RK. Sazrevanje NT2/A praćeno je na osnovu promena u morfologiji, ekspresije specifičnih astrocitnih markera i promene proliferativnog kapaciteta (Slika 10). Studija Sandhu i saradnika astrocite kasnih faza sazrevanja (4. nedelja- NT2/A_4N i kasnije nedelje) karakteriše kao „utišane“ ili zrele (engl. *quiescent*), dok proliferativne astrocite ranih faza sazrevanja (1. nedelja- NT2/A_1N) definiše kao nezrele (engl. *immature*) astrocite (Sandhu et al., 2002). Ista nomenklatura je primenjena i u ovoj tezi.



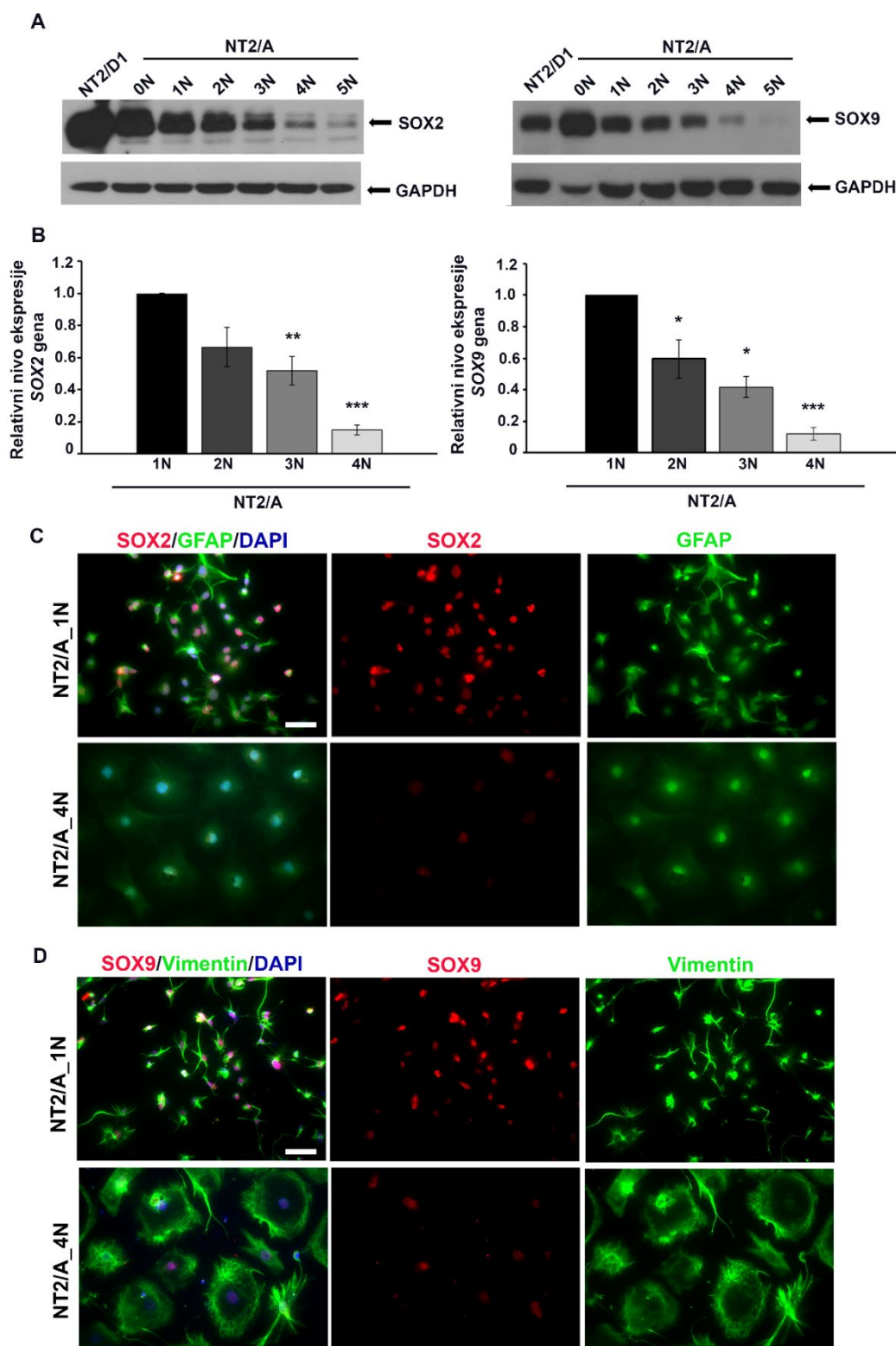
Slika 10. Karakterizacija NT2/A tokom sazrevanja *in vitro*. (A) Gornji panel prikazuje reprezentativne fazno-kontrastne mikrofografije NT2/A rane i kasne faze sazrevanja (NT2/A_1N i NT2/A_4N). Mikrofografije su snimljene pod uvećanjem od 10x. Skala 100 μm. Donji panel prikazuje reprezentativne mikrofografije imunofluorescentno obeleženih NT2/A_1N i NT2/A_4N anti-GFAP antitelom (zeleni signal). Čelijska jedra su obeležena DAPI-jem (plavi signal). Mikrofografije su snimljene pod uvećanjem od 20x. Skala-50μm. (B) Reprezentativne mikrofografije NT2/A imunofluorescentno obeleženih antitelima na vimentin (crveni signal) i S100B (zeleni signal). Čelijska jedra su obeležena DAPI-jem (plavi signal). Mikrofografije su snimljene pod uvećanjem od 20x. Skala-50μm. (C) Reprezentativni primeri Western blot membrana prikazuju ekspresiju GFAP-a od 1. do 4. nedelje sazrevanja astrocita *in vitro* (NT2/A_1N, _2N, _3N, _4N). Očekivana traka na 50kDa je dominantna tokom prve tri nedelje sazrevanja, a u četvrtoj nedelji dominiraju

izoforme manjih molekularskih težina. GAPDH je korišćen kao kontrola ujednačenosti nanošenja uzoraka. **(D)** Imunofluorescentno obeležavanje NT2/A_1N i NT2/A_4N markerom proliferacije Ki67 (zeleni signal). Uokviren region na slici **(D)** je uvećan i naznačen kao **D'**. Mikrografije su snimljene pod –uvećanjem 20x. Skala (D)- 50µm; (D')- 25 µm. **(E)** Statistička analiza Ki-67+ jedara u kulturama NT2/A_1N i NT2/A_4N. Procenat Ki-67+ jedara je izračunat u odnosu na ukupan broj jedara obeleženih DAPI-jem (najmanje 100). Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± SEM (n = 3), p-vrednosti su izračunate korišćenjem Studentovog t-testa, *** p ≤ 0,001. 1N- 1. nedelja sazrevanja NT2/A; 2N- 2. nedelja sazrevanja NT2/A; 3N- 3. Nedelja sazrevanja NT2/A; 4N- 4. nedelja sazrevanja NT2/A.

Tokom prve dve nedelje sazrevanja, u kulturi NT2/A dominiraju astrociti fibrozne morfologije, a značajno manje su zastupljeni astrociti protoplazmatične morfologije (Slika 10A). Dok astrocite fibrozne morfologije odlikuje izduženo telo i dugi razgranati nastavci (Slika 10A, NT2/A_1N), za astrocite protoplazmatične morfologije karakteristično je pljosnato telo sa malim brojem kratkih nastavaka (Slika 10A, NT2/A_4N). Nakon druge nedelje, astrociti fibrozne morfologije postepeno iščezavaju iz kulture i u 4. nedelji sazrevanja se mogu uočiti samo astrociti protoplazmatične morfologije (Slika 10A). Astrocitni fenotip potvrđen je imunofluorescentnim obeležavanjem specifičnih markera astrocita: GFAP-a, vimentina i S100B (Slika 10A,B). Analiza ekspresije GFAP-a metodom Western blot pokazala je da je izoforma molekulske težine od 50kD dominantno eksprimirana tokom prve tri nedelje sazrevanja NT2/A, dok izoforme manjih molekularskih masa dominiraju u četvrtoj nedelji sazrevanja NT2/A (Slika 10C). Slično, imunofluorescentno obeležavanje GFAP-a u NT2/A pokazalo je da se intenzitet signala i obrazac ekspresije ovog citoskeletnog proteina značajno razlikuje između prve i četvrte nedelje sazrevanja (Slika 10A). Imunofluorescentno obeležavanje antitelom specifičnim za GFAP je, jasno i intenzivno, obeležilo ćelijske nastavke NT2/A_1N, dok je u NT2/A_4N signal bio slabiji i difuzniji i mogao se uočiti i u ćelijskim nastavcima i u jedru (Slika 10A). Imunofluorescentnim obeležavanjem astrocitnih markera vimentina i S100B pokazana je njihova ekspresija u nastavcima NT2/A obe faze sazrevanja (Slika 10B) pri čemu je intenzivniji signal bio prisutan u NT2/A_1N. Postepeno smanjenje proteinske ekspresije vimentina tokom četiri nedelje sazrevanja NT2/A *in vitro* pokazano je i Western blot metodom (Slika 10C). Proliferativni kapacitet NT2/A tokom sazrevanja ispraćen je analizom ekspresije Ki67, jedarnog proteina koji obeležava jedra ćelija u proliferaciji (Slika 10D). Rezultati ove analize pokazali su da se procenat Ki67-pozitivnih jedara (Ki67+) u odnosu na ukupan broj jedara značajno smanjio tokom sazrevanja astrocita (Slika 10D). U NT2/A_1N bilo je prisutno 66% Ki67+ jedara, dok se u NT2/A_4N taj procenat smanjio na 29% (Slika 10E).

4.3. Promena ekspresije SOX2 i SOX9 tokom sazrevanja NT2/A

Imajući u vidu da proteini SOX2 i SOX9 ostvaruju važne uloge u astrocitnim prekursorima tokom gliogeneze, bilo je bitno ispitati njihovu ekspresiju tokom sazrevanja NT2/A *in vitro*. Nivo ekspresije SOX2 i SOX9 analiziran je u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama i u astrocitima različitih faza sazrevanja, od momenta njihovog odvajanja od NT2/N (NT2/A neposredno nakon izolacije, NT2/A_0) do 5. nedelje sazrevanja kada se njihov proliferativni kapacitet značajno smanjuje i ulaze u zrelo, utišano stanje (Sandhu et al., 2002) (Slika 11A). Postepeno smanjenje proteinske ekspresije SOX2 i SOX9 u NT2/A u fazama od NT2/A_0 do NT2/A_5N detektovano je Western blot metodom (Slika 11A). Najviši nivo ekspresije SOX2 uočen je u NT2/D1 ćelijama, kao i u astrocitima ranih faza sazrevanja (Slika 11A), koje, kao što je pokazano u prethodnom rezultatu (Slika 10D) odlikuje visok proliferativni kapacitet. Sa druge strane, nivo ekspresije SOX9 bio je viši u astrocitima naposredno nakon izolacije (NT2/A_0), u odnosu na nediferencirane NT2/D1 ćelije (Slika 11A). Obrazac postepenog smanjenja ekspresije SOX2 i SOX9 potvrđen je i na nivou iRNK (Slika 11B). Kako bi se ispitala korelacija između promena nivoa ekspresije SOX2 i SOX9 i prethodno uočenih promena u morfologiji NT2/A tokom sazrevanja, primenjeno je dvostruko imunofluorescentno obeležavanje antitelima koja se specifično vezuju za intermedijerne proteine astrocita GFAP i vimentin i SOX2 i



Slika 11. Analiza ekspresije SOX2 i SOX9 tokom sazrevanja NT2/A u kulturi. (A) Reprezentativni primeri Western blot membrana prikazuju nivo ekspresije SOX2 i SOX9 proteina u NT2/D1 i različitim fazama sazrevanja NT2/A, od momenta kad su odvojeni od NT2-neurona (NT2/A_0) do 5. nedelje sazrevanja (NT2/A_5N) *in vitro*. GAPDH je korišćen kao kontrola ujednačenosti nanošenja uzoraka. (B) qPCR rezultati pokazuju relativnu ekspresiju gena *SOX2* i *SOX9* tokom četiri nedelje sazrevanja NT2/A. Nivo ekspresije ovih gena u NT2/A_2N, _3N i _4N je prikazan u odnosu na nivo ekspresije u NT2/A_1N. Podaci su normalizovani u odnosu na nivo ekspresije GAPDH-a, korišćenog u svojstvu kontrole ujednačenosti nanošenja uzoraka. Podaci predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM ($n = 3$), p -vrednosti su izračunate korišćenjem Studentovog t -testa, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. (C) Reprezentativne mikrografije NT2/A_1N i NT2/A_4N imunofluorescentno obeleženih sa anti-GFAP (zeleni signal) i anti-SOX2 (crveni signal) antitelima. Čelijska jedra su obeležena DAPI-jem (plavi signal). (D) Reprezentativne mikrografije NT2/A_1N i NT2/A_4N obeleženih sa

anti-vimentin (zeleni signal) i anti-SOX9 (crveni signal) antitelima. Čelijska jedra su obeležena DAPI-jem (plavi signal). Mikrografije su snimljene pod objektivom 20x. Skala- 50 µm.

SOX9 (Slika 11C, D). Rezultati su pokazali da u kulturama NT2/A_1N dominiraju GFAP- i vimentin-pozitivni fibrozni astrociti sa visokim nivoom ekspresije jedarno lokalizovanih SOX2 i SOX9 proteina (Slika 11C, D). Nasuprot tome, kulture NT2/A_4N čine pretežno krupni, protoplazmatični astrociti sa slabom ekspresijom SOX2 i SOX9 (Slika 11C, D).

Dobijeni rezultati pokazali su da se ekspresija SOX2 i SOX9 proteina postepeno smanjuje tokom sazrevanja astrocita. Na osnovu ove analize, 4. nedelja sazrevanja NT2/A odabrana je za dalje eksperimente u kojima je lentiviralnom transdukcijom postignuta stabilno povećana ekspresija SOX2 i SOX9, sa ciljem rasvetljavanja uloge ovih regulatornih proteina u zrelih NT2/A.

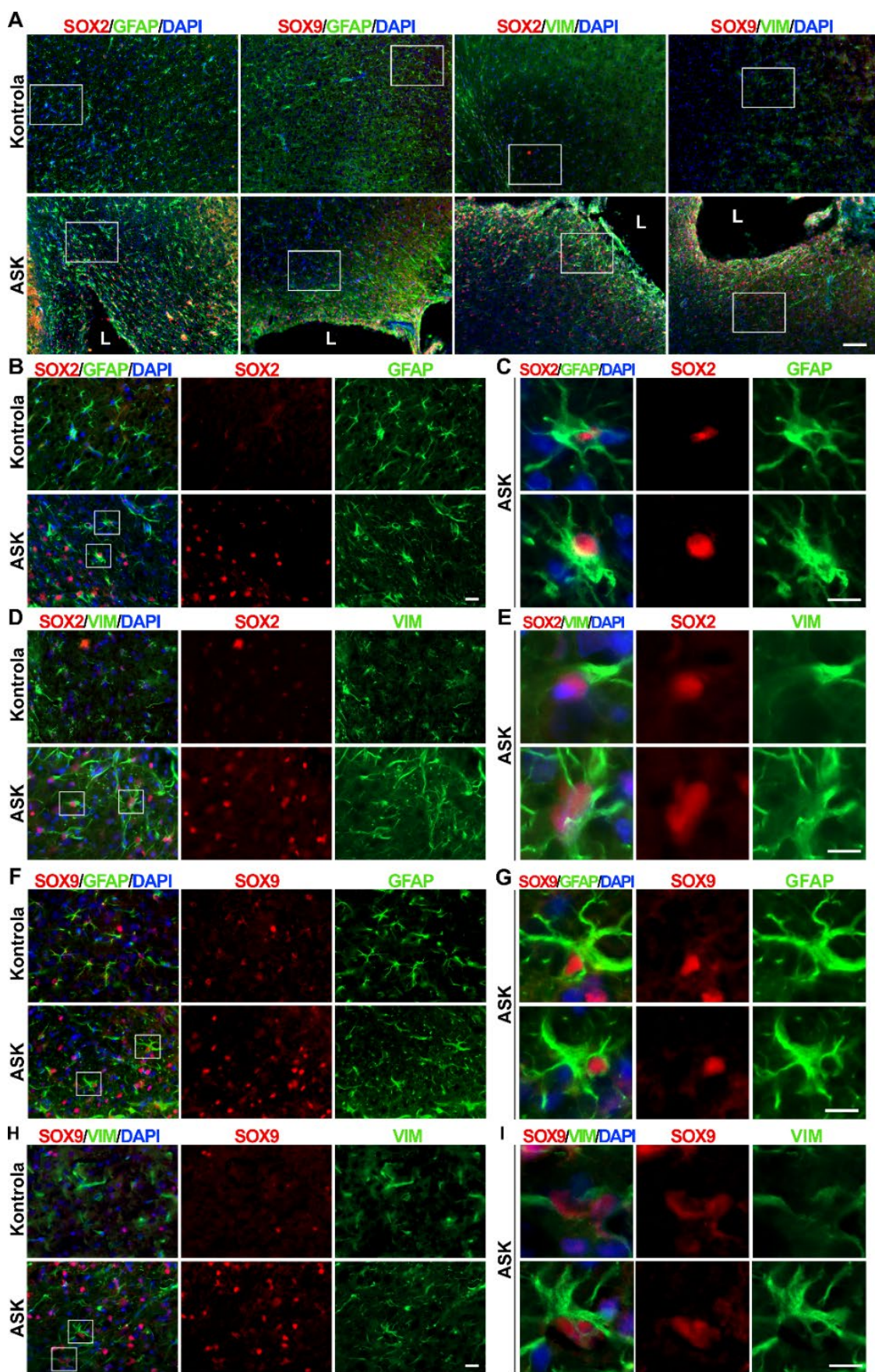
4.4 Povećanje ekspresije SOX2 i SOX9 u reaktivnim astrocitima cerebralnog korteksa pacova nakon ablacije senzomotorne kore

Kako bi se utvrdila povezanost između ekspresije SOX2 i SOX9 i aktivacije astrocita nakon povrede ispitana je ekspresija ovih regulatornih proteina u cerebralnom korteksu pacova kojima je urađena ablacija senzomotorne kore (ASK) (Slika 12). Prethodne studije pokazale su da ablacija senzomotornog korteksa velikog mozga pacova predstavlja dobar model sistem za izučavanje različitih aspekata povrede CNS-a (Goldstein, 2003; Jeremic et al., 2023). Povreda je napravljena aspiracionom ablacijom u desnoj hemisferi velikog mozga pacova. Koronalni preseki korteksa kontrolnih i ASK pacova imunofluorescentno su obeleženi antitelima specifičnim za markere astrocita, GFAP i vimentin, i SOX2 i SOX9. Na presecima korteksa kontrolnih pacova uočeni su retki GFAP i vimentin pozitivni astrociti protoplazmatične morfologije koje odlikuje niska ekspresija SOX2 i SOX9 (Slika 12A). Primećeno je da je prisustvo SOX2- i SOX9-pozitivnih jedara u kontrolnoj grupi ograničeno na mali broj ćelija, koje su uglavnom GFAP-pozitivne (Slika 12B, F), dok je njihovo prisustvo u vimentin-pozitivnim ćelijama ređe uočljivo (Slika 12D, H). Nakon povrede desne senzomotorne kore pacova uočava se pojava reaktivnih astrocita u oblasti lezije koje odlikuje povećana ekspresija GFAP-a i vimentina i koji su SOX2 (Slika 12A, B, D) i SOX9 pozitivni (Slika 12A, F, H). Reaktivne GFAP- i vimentin-pozitivne astrocite pored povećane ekspresije SOX2 i SOX9 na ASK presecima odlikuje i fibrozna morfologija, karakteristična za reaktivni fenotip (Slika 12C, E, G i I).

4.5. Promena ekspresije SOX2 i SOX9 u zrelih NT2/A nakon mehanički i hemijski izazvane povrede

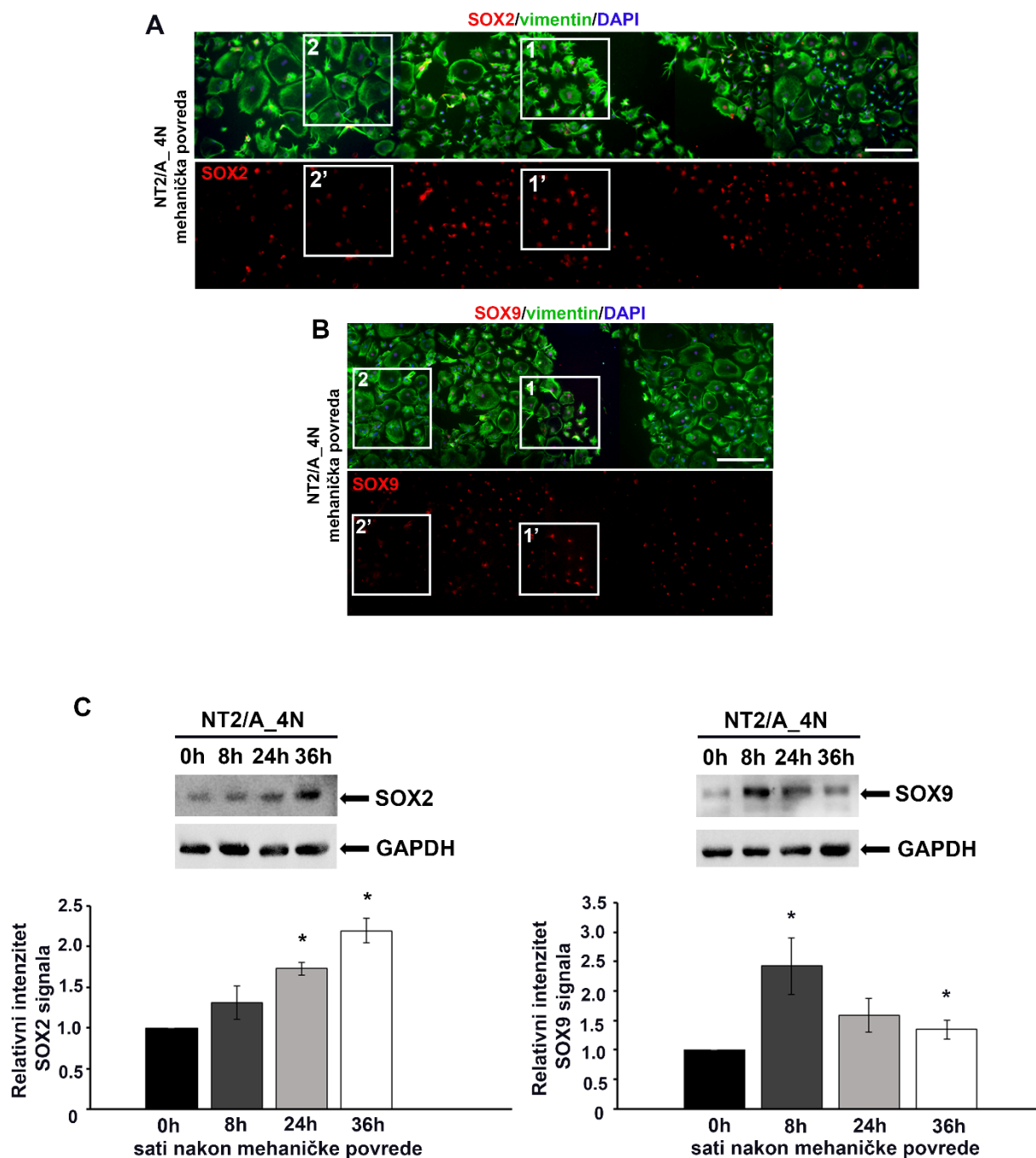
Prethodna istraživanja pokazala su da mehanička povreda i tretman aktivatorom adenilatne ciklaze, forskolinom, dovode do aktivacije zrelih (utišanih) NT2/A *in vitro* (Sandhu et al., 2002). Kako bi se ispitalo da li u procesu aktivacije zrelih NT2/A dolazi do povećanja ekspresije SOX2 i SOX9, NT2/A_4N naneta je mehanička povreda i zatim je imunofluorescencijom i Western blot-om ispitana ekspresija ovih regulatornih proteina.

Konfluentni sloj NT2/A_4N zagreben je nastavkom, a potom je imunofluorescentnim obeležavanjem SOX2 i SOX9 analiziran nivo ekspresije ovih proteina nakon indukovane povrede (Slika 13A, B). Povećan nivo ekspresije SOX2 i SOX9 uočen je u astrocitima lokalizovanim blizu povrede (Slika 13A, B; uokvireni regioni 1 i 1'), dok je ekspresija ovih proteina ostala niska u astrocitima udaljenim od mesta povrede (Slika 13A, B; uokvireni regioni 2 i 2').



Slika 12. Ekspresija SOX2 i SOX9 na kriopresjecima senzomotorne kore pacova 10 dana nakon ASK. (A) Reprezentativne mikrografije desnog cerebralnog korteksa imunofluorescentno obeleženog sa SOX2 i SOX9 (crveni signal), markerima astrocita GFAP-om i vimentinom (VIM, zeleni signal) i jedarnim markerom DAPI (plavi signal). Kontrolna grupa se odlikuje retkim astrocitima pozitivnim na SOX2, SOX9, GFAP i vimentin. ASK je dovela do pojave reaktivnih astrocita koji se odlikuju povećanom ekspresijom GFAP-a i vimentina i povećanom ekspresijom SOX2 i SOX9

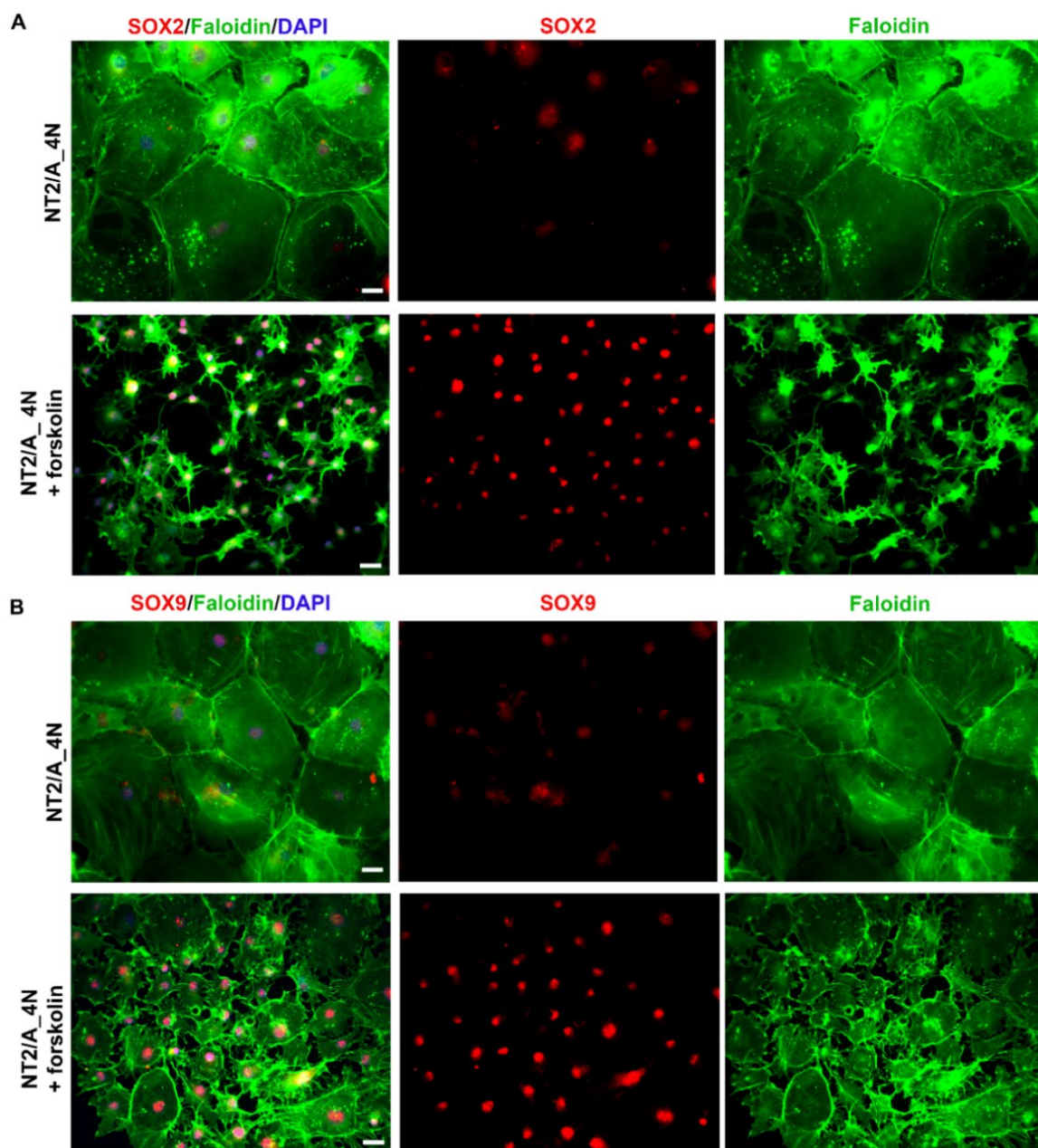
u jedrima ćelija u okolini lezije. Mikrografije su snimljene pod objektivom 10x. Skala-100 μm . (**B**, **D**, **F**, **H**) Uvećani regioni uokvireni u panelu (**A**) snimljeni na uveličanju 40x. Skala - 20 μm . (**C**, **E**, **G**, **I**) Uvećani regioni uokvireni u (**B**, **D**, **F**, **H**, redom) prikazuju pojedinačne reaktivne astrocite u kojima se može uočiti ekspresija SOX2 i SOX9 koji su pozitivni na GFAP ili vimentin. Mikrografije su snimljene pod objektivom 40x i uvećane. Skale - 10 μm . L- lezija.



Slika 13. Analiza ekspresije SOX2 i SOX9 u NT2/A u 4. nedelji sazrevanja nakon *in vitro* aktivacije izazvane mehaničkom povredom. (**A**, **B**) Konfluentni sloj NT2/A_4N zagreban je nastavkom u cilju nanošenja mehaničke povrede, ćelije su zatim fiksirane i imunofluorescentno obeležene anti-vimentin antitelom (zeleni signal) i anti-SOX2 i anti-SOX9 antitelima (crveni signal). Jedra ćelija su obeležena DAPI-jem (plavi signal). Pet pojedinačnih mikrografija za SOX2 (**A**) i četiri pojedinačne mikrografije za SOX9 (**B**) su snimljene uzastopno pod istim uslovima i spojene u objedinjenu sliku koja prikazuje široku oblast oko povrede. Kvadrati označeni kao **1** i **1'** prikazuju ćelije lokalizovane blizu povredene oblasti, sa visokom intenzitetom SOX2 (**A**) i SOX9 (**B**) signala i fibroznom morfologijom. Kvadrati označeni kao **2** i **2'** prikazuju ćelije lokalizovane dalje od povrede, sa niskom ekspresijom SOX2 (**A**) i SOX9 (**B**) signala i pljosnatom protoplazmatičnom morfologijom. Mikrografije su snimljene pod objektivom od 10x. Skala - 200 μm . (**C**) Reprezentativni primeri Western blot membrana prikazuju ekspresiju SOX2 i SOX9 u NT2/A_4N nakon mehaničke povrede izazvane ogrebotinom, u trenutku kada je povreda inicirana (0h) i 8h, 24h i 36h nakon povrede. GAPDH je korišćen kao kontrola ujednačenosti nanošenja uzoraka. Grafikoni prikazuju kvantifikaciju traka dobijenih Western

blotom iz tri nezavisna eksperimenta $\pm$ SEM. Vrednosti intenziteta signala u tri različita vremenska intervala nakon povrede (8h, 24h i 36h nakon povrede) prikazane su u odnosu na vrednost inteziteta signala u 0h, a p-vrednosti su izračunate korišćenjem Studentovog t-testa: * $p \leq 0,05$.

Takođe, imunofluorescentno obeležavanje antitelom za vimentin pokazalo je da su astrociti u blizini povrede zadobili fibroznu morfologiju karakterističnu za reaktivne astrocite (Slika 13A, B; uokvireni region 1), dok su astrociti udaljeni od mesta povrede zadržali svoju karakterističnu protoplazmatičnu morfologiju (Slika 13A, B; uokvireni region 2). Western blot metodom analizirana je ekspresija SOX2 i SOX9 u tri različita vremenska intervala: 8h, 24h i 36h od trenutka indukovanja povrede (Slika 13C). Rezultati Western blot analize pokazali su da se nivo ekspresije SOX2 i SOX9 povećava u svim ispitivanim vremenskim tačkama nakon povrede u poređenju sa trenutkom u kojem je inicirana povreda (0h).



Slika 14. Ekspresija SOX2 i SOX9 u NT2/A 4. nedelje sazrevanja nakon aktivacije indukovane forskolinom. (A, B) Reprezentativne mikrografije imunofluorescentno obeleženih SOX2 (A), SOX9 (B) (crveni signal), F-aktina (zeleni signal) u NT2/A_4N pre i nakon tretmana forskolinom. Jedra su obeležena DAPI-jem (plavi signal). Tretman forskolinom doveo je do transformacije NT2/A_4N iz protoplazmatične u fibroznu morfologiju (obeleženo faloidinom) i povećane ekspresije SOX2 i SOX9 u morfološki izmenjenim NT2/A. Mikrografije su snimljene koristeći objektiv od 20x. Skala - 50 μ m.

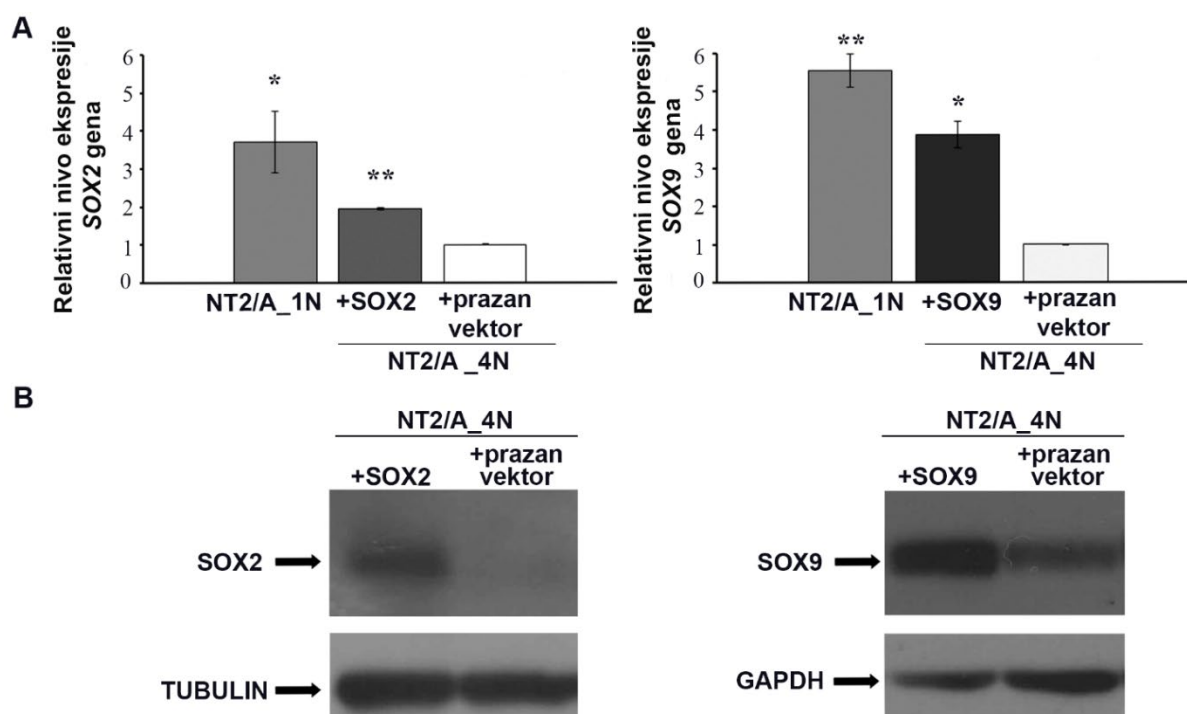
Najuočljive povećanje ekspresije SOX2, od približno 2 puta ($2,2 \pm 0,15$), detektovano je 36h nakon mehanički indukovane povrede. Sa druge strane, najznačajnije povećanje nivoa ekspresije SOX9, od približno 2,5 puta ($2,5 \pm 0,75$), uočeno je 8h nakon nanošenja povrede.

Tretman forskolinom doveo je do sličnih promena u zrelih NT2/A, kao nanošenje mehaničke povrede ovih ćelija. Imunofluorescentnim obeležavanjem faloidina, koji se specifično vezuje za citoskeletni protein F-aktin, uočeno je da tretman forskolinom dovodi do transformacije zrelih astrocita, krupnog tela i protoplazmatične morfologije u astrocite malog tela i fibrozne morfologije, karakteristične za reaktivni fenotip (Slika 14A, B). Pored jasne promene u morfologiji, ovaj tretman je doveo i do povećane ekspresije SOX2 i SOX9 proteina u reaktivnim astrocitima (Slika 14A, B).

Naši rezultati pokazuju da primena mehaničkog i hemijskog stimulusa, u cilju simulacije određenih aspekata aktivacije u *in vitro* uslovima, dovodi do povećane ekspresije SOX2 i SOX9 proteina u zrelih NT2/A, vrlo slično rezultatima dobijenim *in vivo*, na ASK modelu povrede.

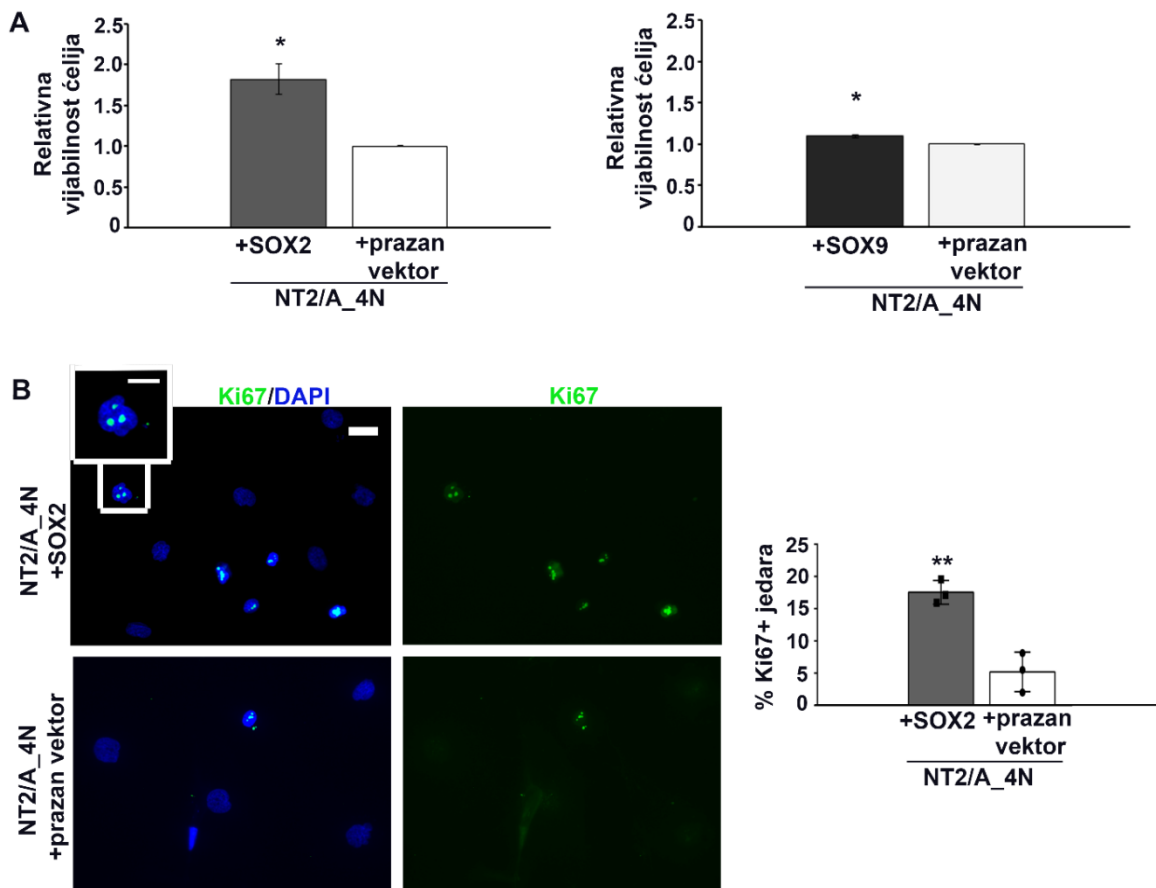
4.6. Promene proliferativnog i migratornog kapaciteta zrelih NT2/A usled povećane ekspresije SOX2 i SOX9 lentiviralnom transdukcijom

Visok proliferativni i migratorni kapacitet odlika su reaktivnih astrocita i astrocita ranih faza sazrevanja, kao i astrocitnih prekursora (Lagos-Cabre et al., 2019; Shimada et al., 2012).



Slika 15. Analiza uspešnosti lentiviralne transdukcije NT2/A 4. nedelje sazrevanja sa SOX2 i SOX9 ekspresionim konstruktima na nivou iRNK i proteina. (A) Rezultati qPCR-a prikazuju relativan nivo ekspresije SOX2 i SOX9 u NT2/A_1N, kao i ekspresiju ovih proteina u NT2/A_4N+SOX2 i NT2/A_4N+SOX9 (pet dana nakon lentiviralne transdukcije) u odnosu na kontrolu, NT2/A_4N+prazan vektor. Podaci su normalizovani na GAPDH, koji je korišćen kao kontrola ujednačenosti nanošenja uzoraka. Podaci predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM ($n = 3$), p-vrednosti su izračunate koristeći Studentov t-test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. **(B)** Reprezentativni primeri Western blot membrana prikazuju nivo SOX2 i SOX9 u NT2/A_4N+SOX2 i NT2/A_4N+SOX9, u poređenju sa odgovarajućom kontrolom. Alfa Tubulin ili GAPDH su korišćeni kao kontrola ujednačenosti nanošenja uzoraka.

Da bi se ispitalo da li SOX2 i SOX9 učestvuju u regulaciji proliferacije i migracije, ovi regulatorni proteini su lentiviralnom transdukcijom konstitutivno povećano eksprimirani u zrelim NT2/A_4N (NT2/A_4N+SOX2 i NT2/A_4N+SOX9), nakon čega je ispitan njihov efekat na vijabilnost, proliferaciju i migraciju ovih ćelija. Pet dana nakon lentiviralne transdukcije, povećana ekspresija SOX2 i SOX9 u zrelim NT2/A potvrđena je na nivou iRNK (Slika 15A) i proteina (Slika 15B).



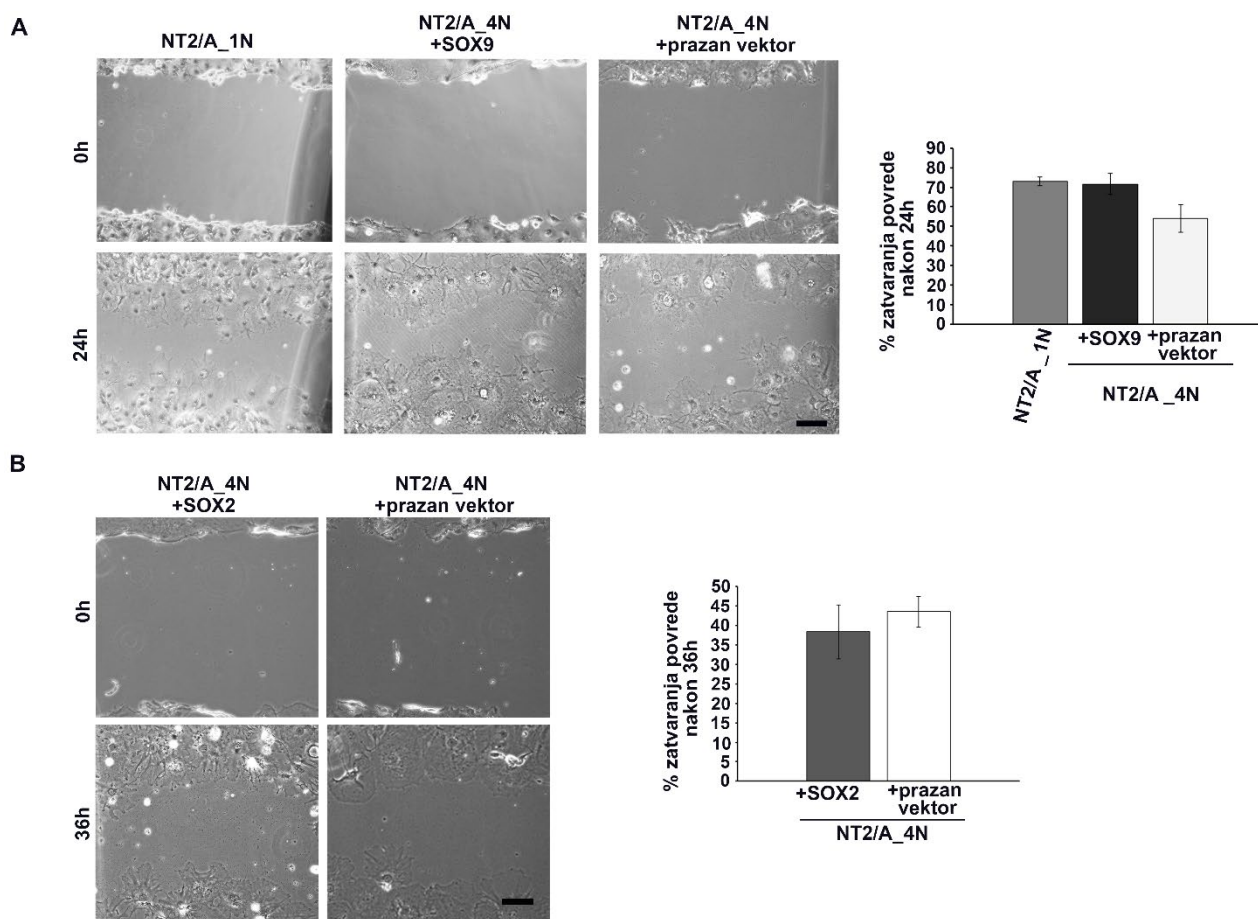
Slika 16. Analiza proliferacije i vijabilnosti NT2/A 4. nedelje sazrevanja transdukovanih sa SOX2 i SOX9 ekspresionim konstruktima. (A) Relativna vijabilnost NT2/A_4N+SOX2 i NT2/A_4N+SOX9 merena je MTS testom i upoređena sa vijabilnošću kontrolnih NT2/A_4N+prazan vektor ćelija. Podaci predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM ($n = 3$); p -vrednosti su izračunate koristeći Studentov t -test: $* p \leq 0,05$. **(B)** Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentno obeleženog Ki67 (zeleni signal) u NT2/A_4N+SOX2 i kontrolnim ćelijama. Čelijska jedra su obeležena DAPI-jem (plavi signal). Mikrofografije su snimljene koristeći objektiv od 60x. Skala-20 μ m. Uokvireni region je uvećan kako bi se prikazala jedarna lokalizacija Ki67. Skala-10 μ m. Procenat Ki67+ ćelija prikazan na grafikonu izračunat je u odnosu na ukupan broj DAPI-obeležanih jedara u tri nezavisna eksperimenta. Podaci predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM, a p -vrednosti su izračunate koristeći Studentov t -test: $** p \leq 0,01$.

Ekspresija oba regulatorna proteina transkripcije bila je značajno povećana nakon transdukcije. Preciznije, ekspresija *SOX2* gena se povećala približno 2 puta ($1,95 \pm 0,036$), dok se ekspresija *SOX9* gena povećala približno 4 puta ($3,87 \pm 0,35$) u poređenju sa kontrolnim ćelijama transdukovanim odgovarajućim praznim vektorom (Slika 15A). Iako se nivo ekspresije *SOX2* i *SOX9* gena značajno povećao u transdukovanim ćelijama, u odnosu na kontrolu (Slika 15A), nije postignut endogeni nivo ekspresije ovih proteina karakterističan za NT2/A_1N. Samo kulture astrocita u kojima je potvrđena uspešna transdukcija, odnosno povećana ekspresija SOX2 i SOX9 i na nivou iRNK i proteina su bile korišćene za dalja istraživanja.

Nakon utvrđivanja uspešnosti transdukcije ispitani su vijabilnost, kao i proliferativni i migratorni kapacitet transdukovanih ćelija. Vijabilnost je analizirana MTS esejem i rezultati su pokazali da transdukcijom povećana ekspresija SOX2 dovodi do značajnog povećanja vijabilnosti zrelih NT2/A_4N+SOX2 ($1,82 \pm 0,19$) u poređenju sa kontrolom. Za razliku od ovog rezultata,

povećana ekspresija SOX9 nije dovela do značajnog porasta vijabilnosti NT2/A_4N+SOX9 ($1,09 \pm 0,02$) u odnosu na kontrolu (Slika 16A). Kako bi se utvrdilo da li je povećana vijabilnost NT2/A_4N+SOX2 povezana sa povećanim proliferativnim kapacitetom ovih ćelija, imunofluorescentnim obeležavanjem ispitana je ekspresija Ki67 (Slika 16B). Naši rezultati su pokazali da SOX2 dovodi do povećanja u broju Ki67+ jedara. Procenat Ki67+ jedara u NT2/A_4N+SOX2 je iznosio 17%, u odnosu na kontrolu, gde je taj procenat iznosio 5% u odnosu na ukupan broj jedara obeleženih DAPI-jem (Slika 16B).

Migratorni kapacitet NT2/A_4N u uslovima povećane ekspresije SOX2 i SOX9 analiziran je primenom testa zarastanja povrede (Slika 17). Analiza je pokazala da je 24h nakon nanošenja povrede, u slučaju NT2/A_4N+SOX9, 72% zagrebane površine bilo popunjeno, dok je u kontroli procenat popunjenosti praznog prostora iznosio 54% (Slika 17A). U slučaju NT2/A_1N, koji se odlikuju visokim endogenim nivoom ekspresije SOX9, zabeležen sličan procenat popunjenosti praznog prostora (73%) kao kod i kod NT2/A_4N+SOX9 (Slika 17A). Dobijeni rezultati pokazuju da povećana ekspresija SOX9 dovodi do povećanja procenta popunjenosti praznog prostora od skoro 20% u odnosu na kontrolu (Slika 17A). Sa druge strane, povećana ekspresija SOX2 u zrelih NT2/A nije značajno uticala na migratorni kapacitet ovih ćelija (Slika 17B).



Slika 17. Analiza migratornog potencijala zrelih NT2/A_4N u uslovima povećane ekspresije SOX2 i SOX9. (A) Reprezentativne fazno-kontrastne mikrografije iz testa zatvaranja povrede. Migratorni kapacitet NT2/A_1N, NT2/A_4N+SOX9 i NT2/A_4N+prazan vektor ćelija meren je 24h nakon nanošenja mehaničke povrede. Mikrografije su snimljene pod objektivom 10x. Skala -100 μ m. Statistička analiza procenta zatvaranja povrede dobijena je iz tri nezavisna eksperimenta. Podaci predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM **B)** Reprezentativne fazno-kontrastne mikrografije iz testa zatvaranja povrede. Migraciona sposobnost NT2/A_4N+SOX2 i NT2/A_4N+prazan vektor, merena je 36h nakon mehaničke povrede. Mikrografije su snimljene pod objektivom 10x. Skala - 100 μ m. Statistička analiza procenta zatvaranja povrede izvedena je iz tri nezavisna eksperimenta. Podaci predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM.

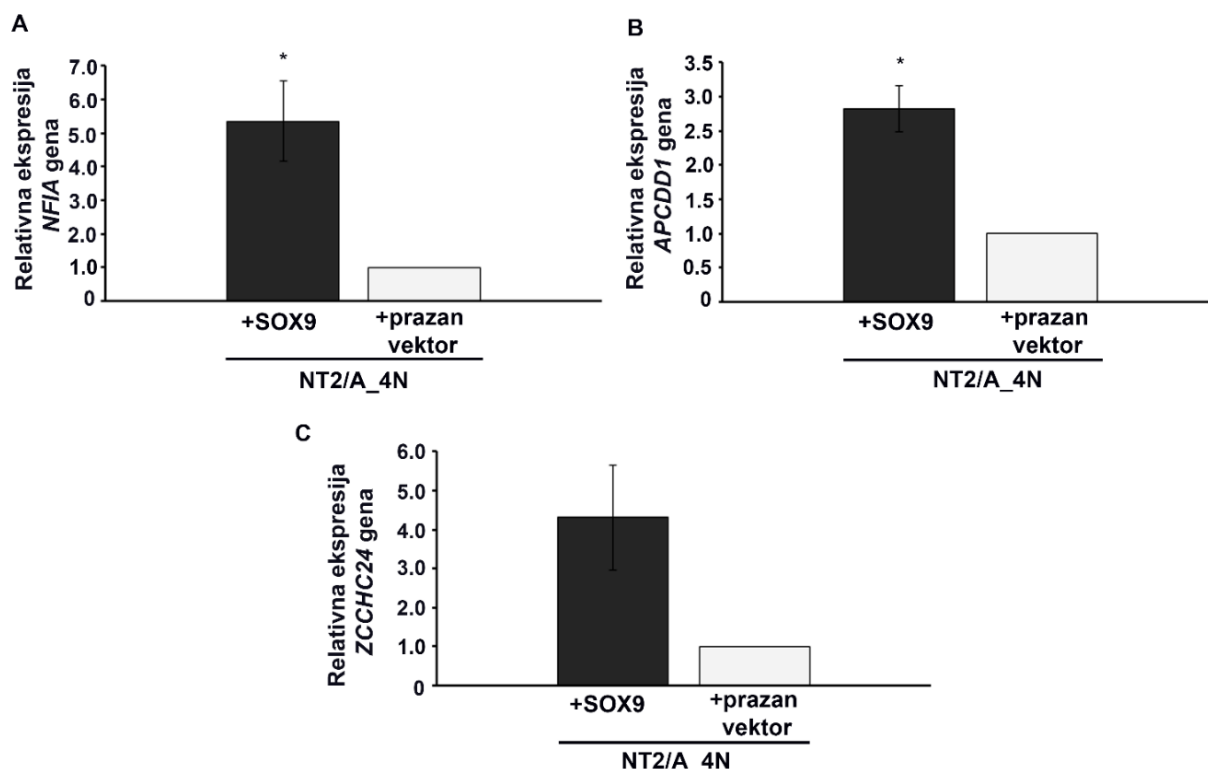
Sumirano, naši rezultati su pokazali da SOX2 utiče na vijabilnost i proliferativni kapacitet zrelih NT2/A, dok SOX9 utiče na njihov migratorni kapacitet.

4.7. Povećana ekspresija SOX9 u zrelih NT2/A reaktivira ekspresiju gena aktivnih tokom gliogeneze i povećava njihov kapacitet za preuzimanje glutamata

SOX9 je ključni faktor za inicijaciju gliogeneze (Kang et al., 2012). Svoju funkciju ostvaruje kroz formiranje kompleksa sa NFIA sa kojim reguliše grupu gena uključujući *APCDD1* koji ima ključnu ulogu u regulaciji migratornog kapaciteta glijalnih progenitora (Kang et al., 2012) i *ZCCHC24* sa ulogom u metabolizmu astrocitnih prekursora tokom gliogeneze (Kang et al., 2012).

Kako bi se ispitalo da li povećana ekspresija SOX9 u zrelih astrocitima aktivira transkripcionu kaskadu prisutnu tokom gliogeneze analizirana je ekspresija gena *NFIA*, *APCDD1* i *ZCCHC24* u NT2/A_4N+SOX9. Rezultati qPCR-a pokazali su da nivo ekspresije gena *NFIA* povećao 5 puta ($5,355 \pm 1,2$) (Slika 18A) u NT2/A_4N+SOX9, u odnosu na kontrolu. Ekspresija *APCDD1* gena se povećala 2,5 puta ($2,55 \pm 0,34$) (Slika 18B), a ekspresija *ZCCHC24* se povećala 4 puta ($4,3 \pm 1,35$) u zrelih NT2/A sa povećanom ekspresijom SOX9 u odnosu na kontrolu (Slika 18C).

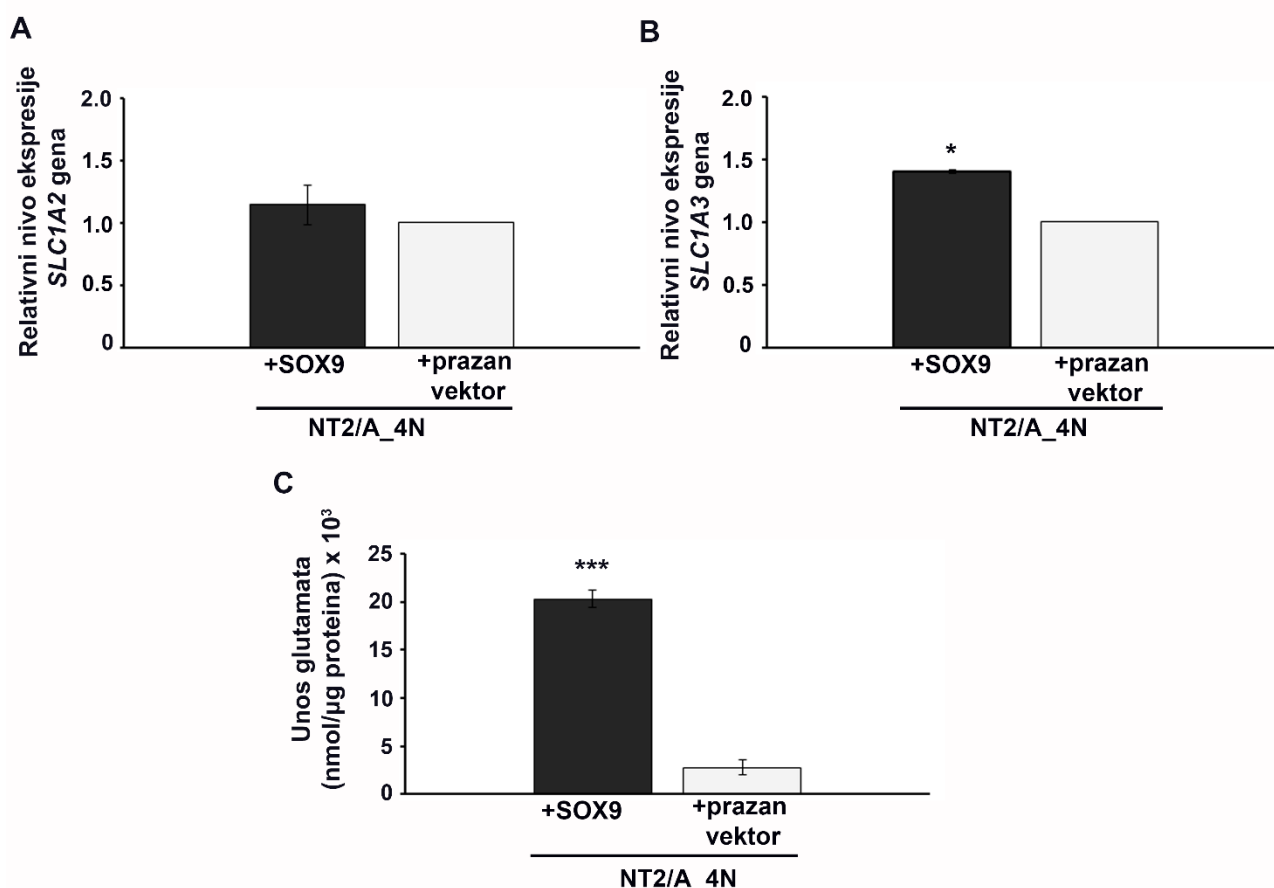
Imajući u vidu da su transporter GLAST/EAAT1 i GLT1/EAAT2 bitni za održavanje glutamatne homeostaze, bilo je interesantno ispitati da li povećana ekspresija SOX9 u zrelih NT2/A dovodi do povećane ekspresije gena *SLC1A2* koji kodira GLT1/EAAT2 i gena *SLC1A3* koji kodira GLAST/EAAT1.



Slika 18. Analiza ekspresije *NFIA*, *APCDD1* i *ZCCHC24* u uslovima povećane ekspresije SOX9 u zrelih NT2/A. (A, B, C) Rezultati qPCR-a pokazuju relativnu ekspresiju gena *NFIA* (A), *APCDD1* (B) i *ZCCHC24* (C) u zrelih NT2/A transdukovanim SOX9 ekspresionim konstruktom (NT2/A_4N+SOX9) u poređenju sa nivoom ekspresije ovog regulatornog proteina u kontrolnim NT2/A transdukovanih praznim vektorom (NT2/A_4N+prazan vektor). Podaci su normalizovani na GAPDH kao endogenu kontrolu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM (n = 3), a p-vrednosti su izračunate korišćenjem Studentovog t-testa: * $p \leq 0,05$ i ** $p \leq 0,01$.

Rezultati qPCR-a pokazali su da povećana ekspresija SOX9 u zrelih NT2/A dovodi do blagog povećanja nivoa ekspresije gena *SLC1A3* ($1,41 \pm 0,01$) u odnosu na NT2/A_4N+prazan vektor (Slika 19B), dok u slučaju *SLC1A2* nije detektovan značajan efekat SOX9 na povećanje ekspresije ovog gena (Slika 19A). Dalje, primenom glutamatnog eseja ispitan je i kapacitet zrelih NT2/A za preuzimanje glutamata iz medijuma. Rezultati primenjenog eseja su pokazali da je sposobnost ovih ćelija za preuzimanje glutamata značajno porasla u uslovima povećane ekspresije SOX9 u odnosu na kontrolu (Slika 19B, C).

Naši rezultati su pokazali da povećana ekspresija SOX9 u zrelih NT2/A dovodi do aktivacije transkripcione regulacione kaskade prisutne tokom gliogeneze i do povećanja kapaciteta ovih ćelija za preuzimanje glutamata.

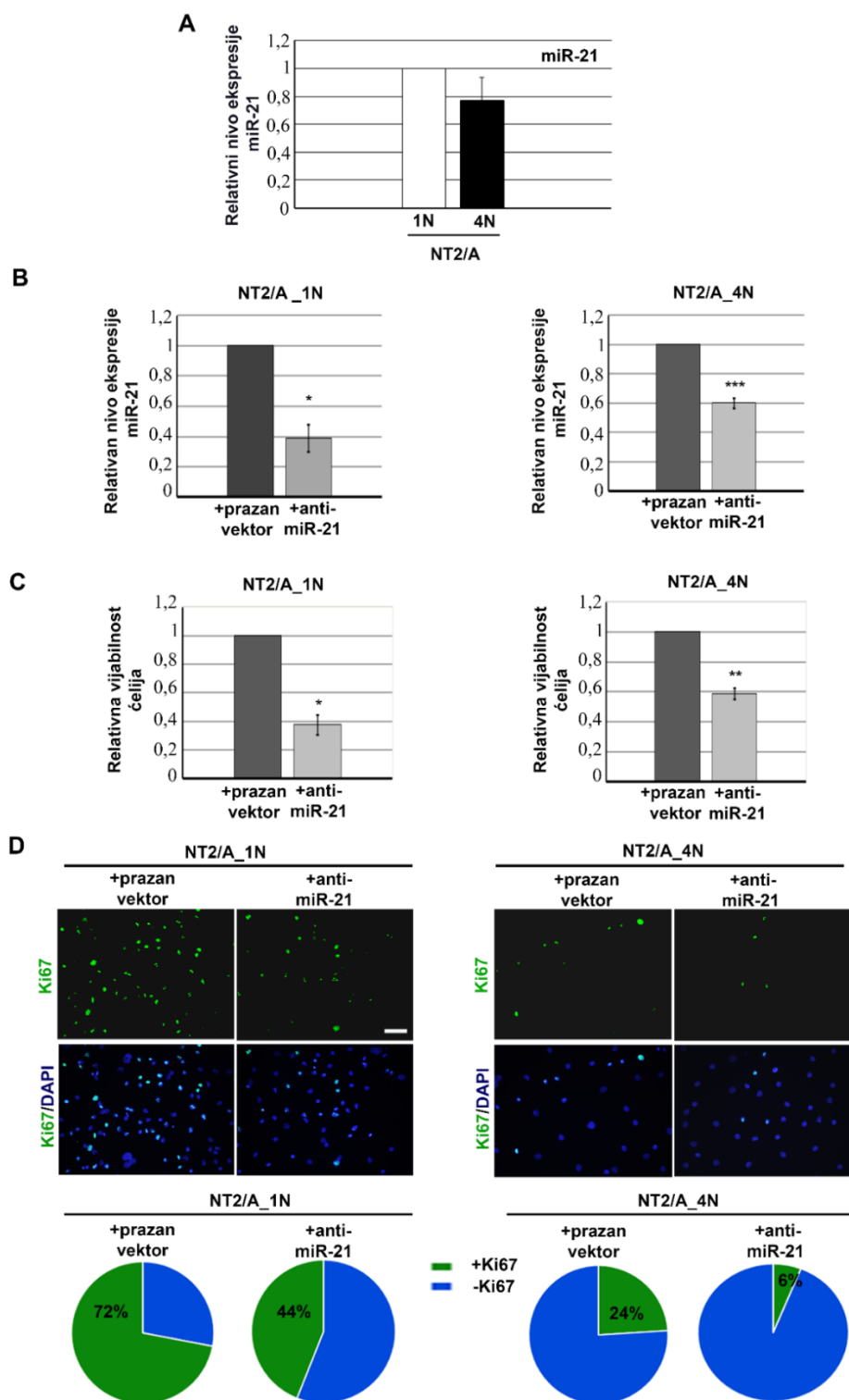


Slika 19. Analiza nivoa ekspresije glutamatnih transportera i kapaciteta astrocita za preuzimanje glutamata u uslovima povećane ekspresije SOX9. Relativni nivo ekspresije gena *SLC1A2* (kodira GLT1/EAAT2) (A) i *SLC1A3* (kodira GLAST/EAAT1) (B) u NT2/A_4N+SOX9 u odnosu na kontrolne NT2/A_4N + prazan vektor. Podaci su normalizovani na GAPDH kao endogenu kontrolu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM ($n = 3$), a p-vrednosti su izračunate korišćenjem Studentovog t-testa: * $p \leq 0,05$. (C) Kapacitet za preuzimanje glutamata NT2/A_4N+SOX9 i kontrolnih NT2/A_4N+prazan vektor ćelija analiziran je pomoću testa za preuzimanje glutamata. Preuzimanje glutamata iz medijuma je normalizovano na ukupnu količinu proteina u odgovarajućem uzorku i izraženo kao nmol/μg proteina (Mahmoud et al., 2019). Podaci predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta; p-vrednosti su izračunate korišćenjem Studentovog t-testa: *** $p \leq 0,001$.

4.8. Smanjenje vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta NT2/A u uslovima utišane ekspresije miR-21

Jedan od ciljeva ove teze bio da se ispita uticaj miR-21 na različite fenotipske osobine NT2/A. Nakon što je uočeno da se ekspresija miR-21 održava na visokom nivou nezavisno od faze sazrevanja astrocita (Slika 20A), njena ekspresija je utišana u ranim (NT2/A_1N) i kasnim (NT2/A_4N) fazama

sazrevanja NT2/A lentiviralnom transdukcijom, koristeći anti-miR-21 konstrukt (Slika 20B, +anti-miR-21), i zatim je analizirana ekspresija miR-21 pet dana nakon transdukcije (Slika 20A).



Slika 20. Analiza vijabilnosti i proliferacije u NT2/A 1. i 4. nedjelje sazrevanja u uslovima utišane ekspresije miR-21. (A) qPCR rezultati prikazuju relativni nivo ekspresije miR-21 u NT2/A_4N predstavljen u odnosu na nivo ekspresije u NT2/A_1N. (B) Relativna ekspresija miR-21 u NT2/A_1N+anti-miR-21 i NT2/A_4N+anti-miR-21 izračunata je u poređenju sa nivoom ekspresije miR-21 u NT2/A transdukovanim praznim vektorom (+prazan vektor). (C) Relativna vijabilnost NT2/A_1N+anti-miR-21 i NT2/A_4N+anti-miR-21 izračunata u poređenju sa vijabilnošću odgovarajućim kontrolnih ćelija transdukovanim praznim vektorom. Podaci prikazani u (B) i (C) predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM ($n = 3$), p -vrednosti su izračunate korišćenjem Studentovog t -testa, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$. (D) Reprezentativne mikrografije imunofluorescentno obeleženog Ki67 (zeleni signal) u NT2/A_1N (levi panel) i NT2/A_4N (desni panel) transdukovanih sa anti-miR-21 (+anti-miR-21) ili praznim vektorom (+prazan vektor). Jedra ćelija su obeležena DAPI-jem (plavi signal). Mikrografije su snimljene pod objektivom 20x. Skala -50 μ m. (D) Statistička

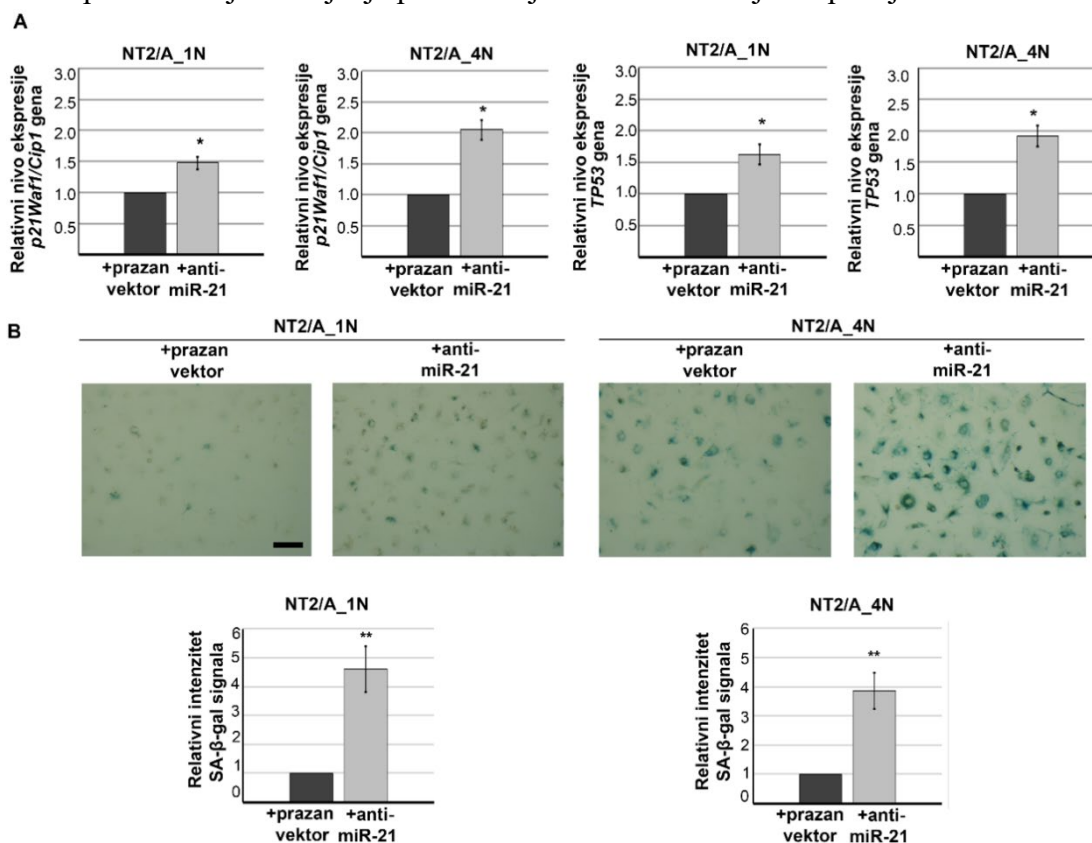
analiza Ki67+ NT2/A_1N i NT2/A_4N transdukovanih sa anti-miR-21 ili praznim vektorom. Procenat Ki67+ ćelija je izračunat u odnosu na ukupan broj jedara obeleženih DAPI-jem (najmanje 180). Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta.

Ekspresija miR-21 smanjila se na $0,39 \pm 0,09$ u NT2/A_1N+anti-miR-21 i na $0,60 \pm 0,03$ u NT2/A_4N+anti-miR-21 u u poređenju sa odgovarajućom kontrolom, astrocitima transdukovanim praznim vektorom (Slika 20B, +prazan vektor). Pošto je ovom analizom potvrđena uspešna transdukcija ranih i zrelih NT2/A anti-miR-21 konstruktom, ispitan je efekat utišavanja miR-21 na vijabilnost i proliferaciju ovih ćelija (Slika 20C i D). Utišavanje miR-21 dovelo je do smanjenja vijabilnosti astrocita rane, NT2/A_1N i kasne, NT2/A_4N faze sazrevanja (Slika 20C). Vijabilnost NT2/A_1N+anti-miR-21 ćelija smanjena je približno 2,5 puta u odnosu na kontrolu, dok je u NT2/A_4N+anti-miR-21 zabeleženo smanjenje vijabilnosti od približno 1,6 puta u odnosu na kontrolu (Slika 20C). Imunofluorescentno obeležavanje Ki67 pokazalo je da se proliferacija u NT2/A sa utišanom miR-21 značajno smanjuje i u njihovoj ranoj i u kasnoj fazi sazrevanja (Slika 20D). Proliferativni kapacitet NT2/A_1N+anti-miR-21 smanjio se za približno 30% (Slika 20D), a u NT2/A_4N+anti-miR-21 za oko 20% u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Slika 20D).

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je smanjena vijabilnost ranih i zrelih NT2/A detektovana u uslovima smanjene ekspresije miR-21, uzrokovana, barem delimično, smanjenjem proliferativnog kapaciteta ovih ćelija.

4.9. Povećanje ekspresije inhibitora ćelijskog ciklusa i ulazak u senescenciju nakon utišavanja ekspresije miR-21 u NT2/A

Kako bi se ispitalo da li je smanjenje proliferacije nakon utišavanja ekspresije miR-21 u NT2/A



Slika 21. Analiza ekspresije mitotskih inhibitora i SA-β-gal aktivnosti NT2/A u uslovima utišane ekspresije miR-21. (A) qPCR analiza relativnog nivoa ekspresije *p21Waf1/Cip1* (kodira P21) i *TP53* (kodira P53) u NT2/A_1N+anti-miR-21 i NT2/A_4N+anti-miR-21 prikazanih u odnosu na nivo ekspresije ovih gena u NT2/A transdukovanim praznim vektorom (kontrola). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti $\pm$ SEM tri nezavisna eksperimenta, p-vrednosti su izračunate koristeći Studentov t-test, * $p \leq 0,05$. **(B)** Reprezentativne mikrografije SA-β-gal bojenja (zeleno) NT2/A_1N i NT2/A_4N transdukovanih sa anti-miR-21 konstruktom (anti-miR-21) ili praznim vektorom (kontrola). Skala 100μm.

Relativno povećanje intenziteta SA- β -gal signala u NT2/A_1N i NT2/A_4N transdukovanih sa anti-miR-21 izraženo je u odnosu na intenzitet SA- β -gal signala u kontroli. Podaci predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM (n=3), p-vrednosti su izračunate koristeći Studentov t-test, ** $p \leq 0,01$.

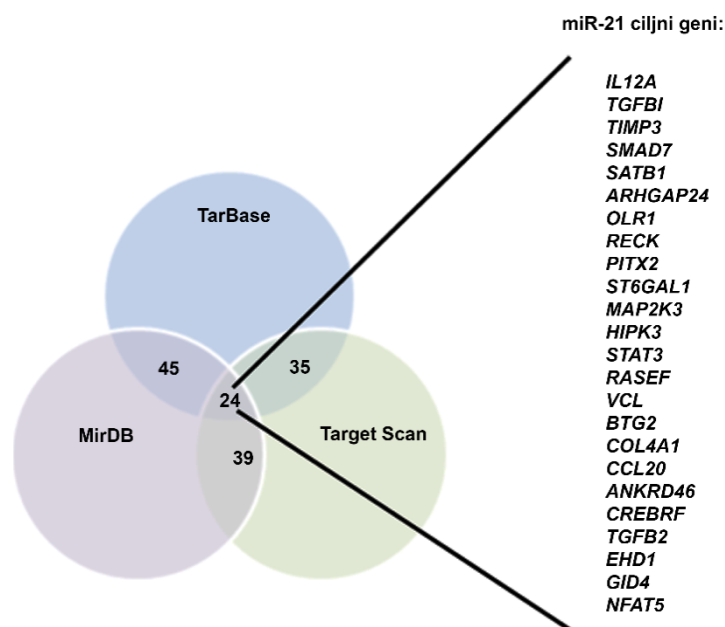
rane i kasnije faze sazrevanja u korelaciji sa promenom ekspresije inhibitora ćelijskog ciklusa analizirana je ekspresija gena *p21Waf1/Cip1* (kodira P21 protein) i gena *TP53* (kodira P53 protein) (Slika 21A).

Rezultati qPCR-a pokazali su da je ekspresija ovih mitotskih inhibitora povećava u NT2/A_1N i NT2/A_4N transdukovanim anti-miR-21 konstruktom u odnosu na kontrolu (Slika 21A). Kako bi se ispitalo da li utišana ekspresija miR-21 dovodi do ulaska NT2/A_1N i NT2/A_4N ćelija u senescenciju analizirana je aktivnost enzima SA- β -gal koja se koristi kao marker senescentnog fenotipa (Cohen & Torres, 2019). Pokazano je da se tokom sazrevanja NT2/A *in vitro* intenzitet SA- β -gal signala povećava (Slika 21B, uporediti: kontrola/NT2/A_1N i kontrola/NT2/A_4N). Utišavanje miR-21 dovelo je do povećanja u intenzitetu SA- β -gal signala u NT2/A_1N+anti-miR-21 i NT2/A_4N+anti-miR-21) u odnosu na njihove kontrole (Slika 21B). Utišavanje miR-21 u NT2/A_1N dovelo je do povećanja intenziteta SA- β -gal signala od približno 4,6 puta u odnosu na kontrolu, dok se u NT2/A_4N intenzitet signala povećao 3,8 puta u odnosu na kontrolu (Slika 21B).

Na osnovu dobijenih rezultata, povećanog nivoa ekspresije gena koji kodiraju za P21 i P53 mitotske inhibitore, kao i povećane β -galaktozidazne aktivnosti zaključeno je da utišavanje miR-21 dovodi do ulaska NT2/A u senescenciju.

4.10. *In silico* analiza miR-21 ciljnih gena čija je ekspresija povećana u senescentnim astrocitima

Kako bi se ustanovilo da li miR-21 potencijalno reguliše neke od gena čija je ekspresija povećana u senescentnim astrocitima (Limbad et al., 2020), upotreбили smo tri različita softvera za predviđanje miRNK ciljnih gena dostupna na internetu: MirDB, TarBase i Target Scan.



Slika 22. Venov dijagram dobijen preklapanjem rezultata *in silico* analize proisteklih korišćenjem tri različita softvera (TargetScan, MirDB i TarBase) za predikciju miR-21 ciljnih gena. Među genima čija je ekspresija povećana u senescentnim astrocitima (Limbad et al., 2020), naznačena su 24 gena, čija je ekspresija najverovatnije regulisana posredstvom miR-21.

In silico analiza dobijena korišćenjem ovih softvera pokazala je da su mnogi od gena, čija je ekspresija povećana u senescentnim astrocitima, potencijalni ciljni geni miR-21. Među njima su se izdvojila 24

gena čija je ekspresija najverovatnije regulisana posredstvom miR-21, što je zaključeno na osnovu preklapanja dobijenog iz Venovog dijagrama, kada su upoređeni rezultati *in silico* analize, proistekli primenom svakog od tri softvera (Slika 22). Ovaj rezultat dodatno je sugerisao da bi miR-21 mogla biti potencijalni regulator ćelijske senescencije.

5. Diskusija

Regulatorni proteini SOX uključeni su u složene transkripcione regulatorne mreže preko kojih upravljaju raznovrsnim ćelijskim procesima uključujući održavanje pluripotentnosti matičnih ćelija, ćelijsku proliferaciju, specijalizaciju ćelija, formiranje germinalnih slojeva i terminalnu diferencijaciju ćelija u tkiva i organe (Wegner, 2005; Weider et al., 2013). Proteini SOX2 i SOX9 tokom razvika ostvaruju bitne uloge u gliogenezi (Bani-Yaghoub et al., 2006; Kang et al., 2012; Stolt et al., 2003). Njihova ekspresija u adultnom mozgu uglavnom je ograničena na neurogene zone, gde imaju važne uloge u regulaciji neurogeneze (Wegner, 2011; Weider et al., 2013). Međutim, sve više je dokaza da SOX geni igraju i bitne uloge u održavanju homeostaze i regeneraciji adultnih tkiva (Chen et al., 2019; Parrinello et al., 2010; Sarkar & Hochedlinger, 2013; Stevanovic et al., 2021), iako je ovo područje još uvek nedovoljno proučeno. Regeneracija perifernih nerava predstavlja dobar primer značaja gena *SOX2* u reparaciji tkiva. Nakon povrede, u zrelim Švanovim ćelijama u adultnom mozgu se ponovo aktivira ekspresija *SOX2*, čime ove ćelije stiču karakteristike slične progenitorskim ćelijama (Parrinello et al., 2010). Povećana ekspresija *SOX2* u Švanovim ćelijama ima ključnu ulogu u njihovom grupisanju, što je osnovni korak u regeneraciji nerava. Ovaj proces omogućava Švanovim ćelijama da formiraju višćelijske strukture koje usmeravaju rast aksona preko oštećenog područja (Parrinello et al., 2010). Reaktivna astrogliozna predstavlja ključni endogeni odbrambeni mehanizam koji se aktivira u odgovoru na bilo koji vid patološke promene u CNS-u. Nezamenjiva uloga astrocita u održavanju homeostaze, kako u fiziološkim, tako i u patološkim uslovima, čini ih posebno značajnim i sa terapijskog aspekta. Stoga je od ključnog značaja izučiti molekularne mehanizme koji leže u osnovi kompleksnih fenotipskih osobina astrocita, kako bi se njima moglo manipulirati u cilju regeneracije i reparacije nervnog tkiva. Reaktivna astrogliozna je vrlo interesantan fenomen, jer astrociti, kao i mikroglia, za razliku od drugih terminalno diferenciranih ćelija, imaju specifičnu karakteristiku da se u odgovoru na različita patološka stanja aktiviraju i tim procesom ponovo steknu neke od karakteristika svojih prekursora (Bernal & Arranz, 2018; Lagos-Cabre et al., 2019; Liu et al., 2014; Luo et al., 2017; Shimada et al., 2012; Sofroniew, 2009). Tako je pokazano da je, ekspresija *SOX2* i *SOX9* utišana u zrelim astrocitima (Bani-Yaghoub et al., 2006; Sun et al., 2017) i da se povećava u reaktivnim astrocitima (Bani-Yaghoub et al., 2006; Chen et al., 2019; Sun et al., 2017), međutim njihova uloga u ovom procesu i dalje nije dovoljno izučena. Otuda je deo istraživanja u okviru ove teze bio posvećen razumevanju uloge *SOX2* i *SOX9* u ćelijskim procesima vezanim za aktivaciju astrocita. Senescencija astrocita se nalazi u osnovi mnogih patologija CNS, ali mehanizmi koji je regulišu u mnogome su nepoznati. Posebno neistraženo polje je uloga miRNK u ovom procesu. S obzirom na to da miR-21 ima pozitivan efekat na oporavak nervnog tkiva nakon povrede (Bhalala et al., 2012; Liu et al., 2018), i doprinosi ponovnom uspostavljanju homeostaze, bilo je važno deo istraživanja u ovoj tezi posvetiti boljem razumevanju uloge ove miRNK u astrocitima. Naši rezultati pokazuju da su *SOX2* i *SOX9* uključeni u regulaciju nekih od osobina reaktivnih astrocita, preciznije *SOX2* povećava njihov proliferativni, dok *SOX9* povećava njihov migratorni kapacitet i kapacitet za preuzimanje glutamata. Uticaj *SOX2* i *SOX9* na ove ćelijske procese karakteristične za reaktivne astrocite, čini ove proteine potencijalnim metama za modulaciju, preko kojih se mogu razvijati nove terapijske strategije, bazirane na modifikovanju fenotipskih karakteristika astrocita, u cilju lečenja različitih patologija CNS-a. Takođe, modulacija *SOX9* bi potencijalno mogla da se iskoristi za sprečavanje glutamatne ekscitotoksičnosti u različitim oboljenjima CNS-a, imajući u vidu da naši rezultati ukazuju da ovaj regulatorni protein ima bitnu ulogu u regulaciji kapaciteta astrocita za preuzimanje glutamata. Rezultati drugog dela istraživanja u okviru ove teze ukazuju da miR-21 igra bitnu ulogu u regulaciji proliferativnog kapaciteta astrocita i potencijalno u sprečavanju njihove senescencije. Imajući u vidu da se senescencija nalazi u osnovi mnogih neurodegenerativnih bolesti

povezanih sa starenjem, naši rezultati koji sugerišu da miR-21 učestvuje u regulaciji ovog procesa su vrlo značajni sa naučnog i potencijalno aplikativnog aspekta.

Astrociti diferencirani od NT2/D1 ćelija (NT2/A) okarakterisani su na osnovu morfologije, ekspresije specifičnih astrocitnih markera, kao i proliferativnog kapaciteta. Dok kulture NT2/A ranih faza sazrevanja (NT2/A_1N) čine pretežno astrociti fibrozne morfologije visokog proliferativnog kapaciteta, kulture zrelih NT2/A (NT2/A_4N), sastoje se isključivo od astrocita koji su po morfologiji slični protoplazmatičnim čiji se proliferativni kapacitet značajno smanjuje. Uočene promene u morfologiji i proliferativnom kapacitetu tokom sazrevanja NT2/A u skladu su sa rezultatima prethodno objavljene studije Sandhu i saradnika koja je pokazala da je smanjenje proliferativnog kapaciteta zrelih NT2/A posledica zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G0/G1 fazi (Sandhu et al., 2002). U našoj studiji je pokazano da zreli NT2/A_4N pokazuju jači intenzitet signala glavnog markera senescencije SA- β -gal, u poređenju sa intenzitetom signala u nezrelim NT2/A_1N te bismo mogli zaključiti da je smanjenje proliferativnog kapaciteta zrelih astrocita delom i posledica njihovog ulaska u senescenciju, što je u saglasnosti sa činjenicom da NT2/A imaju ograničen životni vek u kulturi (šest do deset pasaža) (Sandhu et al., 2002). Iako neki literaturni podaci ukazuju da se aktivnost SA- β -gal može uočiti i u utišanim i senescentnim astrocitima (Cho & Hwang, 2012; Terzi et al., 2016), aktivnost ovog enzima znatno je izraženija u senescentnim u odnosu na utišane astrocite (Cho & Hwang, 2012; Terzi et al., 2016). Iako kulture NT2/A_4N ispoljavaju određene karakteristike senescencije, naši rezultati, kao i nalazi Sandhu i saradnika, ukazuju na to da su ove ćelije funkcionalne, jer imaju aktivan sistem za transport glutamata i aktiviraju se u odgovoru na mehaničku ili hemijsku povredu (Sandhu et al., 2002).

Promene u morfologiji NT2/A ispitane su i na nivou promena u ekspresiji specifičnih astrocitnih markera. Naši rezultati imunocitohemije pokazali su da NT2/A eksprimiraju astrocitni marker GFAP. Međutim, uočene su razlike u ekspresiji ovog markera u zavisnosti od zrelosti NT2/A. Intenzivan signal GFAP-a registrovan je u citoplazmi astrocita fibrozne morfologije u kulturama NT2/A_1N. Nasuprot tome, signal za GFAP u kulturama NT2/A_4N, koje čine isključivo astrociti protoplazmatične morfologije, je slabiji, difuzan i lokalizovan ne samo u citoplazmi već i u jedru ovih ćelija. Poznato je da je GFAP marker fibroznih astrocita bele mase (Tabata, 2015), dok protoplazmatični astrociti, koji su dominantne ćelije u sivoj masi, imaju relativno nisku ekspresiju ovog markera (Eng et al., 1971; Jurga et al., 2021; Macikova, 2009). Slično tome, Sandhu i saradnici su pokazali da GFAP intenzivno boji samo astrocite fibrozne morfologije prisutne tokom ranih faza sazrevanja (prve tri nedelje sazrevanja), dok se njegova ekspresija ne može uočiti u astrocitima kasnijih faza sazrevanja (≥ 4 . nedelja sazrevanja), kada u ćelijskim kulturama dominiraju astrociti protoplazmatične morfologije. Promena obrasca ekspresije GFAP proteina tokom sazrevanja NT2/A može se objasniti prisustvom različitih izoformi GFAP-a u različitim tipovima NT2/A, što se može pretpostaviti na osnovu rezultata Western blota. Tokom prve tri nedelje sazrevanja NT2/A, kada su astrociti fibrozne morfologije prisutni u kulturi, dominantno eksprimirana očekivana izoforma GFAP proteina, molekulske mase od 50 kDa. Međutim, u NT2/A_4N dolazi do promena u obrascu ekspresije GFAP-a, pri čemu dominantne postaju izoforme niže molekulske mase. Iako je za tačnost ove pretpostavke neophodna potvrda korišćenjem antitela specifičnih za svaku, pojedinačnu izoformu, bitno je napomenuti da je do sad otkriveno 10 izoformi GFAP-a (Yang et al., 2015), čija ekspresija varira u zavisnosti od faze diferencijacije astrocita (de Reus et al., 2024; Messing & Brenner, 2020) i u zavisnosti od regiona mozga u kojem se nalaze (Kamphuis et al., 2012). Detaljna studija Kamphuis i saradnika na mišjim astrocitima pokazala je da se različite izoforme GFAP-a eksprimiraju u specifičnim regionima mozga (Kamphuis et al., 2012). Tako su u korteksu, malom mozgu i strijatumu detektovane izoforme Gfap- α , Gfap- β , Gfap- γ , Gfap- δ i Gfap- κ . GFAP- α izoforma je najzastupljenija izoforma u CNS-u, dok je GFAP- δ izoforma pre svega eksprimirana u proliferišućim astrocitima subventrikularne zone, subgranularnoj zoni, rostralnom migratornom putu i subpijalnim astrocitima (Kamphuis et al., 2012), a njena ekspresija se povećava i u reaktivnim astrocitima u različitim patologijama CNS-a (de Reus et al., 2024). Dalja potvrda astrocitnog fenotipa

diferenciranih ćelija dobijena je analizom citoskeletnog proteina vimentina, koji se eksprimira i u NT2/A fibrozne i protoplazmatične morfologije, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima na ovom model sistemu (Burkert et al., 2012; Lim et al., 2007; Sandhu et al., 2002). Ovaj protein je lokalizovan u citoplazmi i intenzivno obeležava nastavke oba tipa astrocita (Sandhu et al., 2002). Interesatno je da je Western blot analizom pokazano da tokom sazrevanja NT2/A dolazi do postepenog pada nivoa ekspresije ovog proteina, što je u saglasnosti sa podacima u literaturi gde je vimentin opisan kao citoskeletni protein specifičan za neuralne progenitore i nezrele astrocite (Potokar et al., 2020; Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Uspešnost diferencijacije NT2/D1 u zrele astrocite dodatno potvrđuje ekspresija proteina S100B, poznatog kao markera zrelih astrocita u CNS-u (Donato et al., 2013). Imunofluorescentni signal za S100B, detektovan u astrocitima ranih i kasnih faza sazrevanja najintenzivniji je u oblasti oko jedra, difuzan u citoplazmi i ne uočava se u jedru, što je u saglasnosti sa zapažanjima Sandhu i saradnika (Sandhu et al., 2002).

Analiza ekspresije SOX2 i SOX9 u kulturama NT2/A različitih faza sazrevanja, pokazala je da su ova dva proteina eksprimirana na visokom nivou u proliferišućim progenitorskim NT2/D1 ćelijama i NT2/A ranih faza sazrevanja, a da sa daljim sazrevanjem NT2/A *in vitro* nivo ovih proteina opada. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima iz različitih studija na mišjim modelima, koja navode da su SOX2 i SOX9 eksprimirani u astrocitnim prekursorima tokom gliogeneze i u nezrelim astrocitima tokom ranog postnatalnog perioda (Bani-Yaghoub et al., 2006; Stolt et al., 2003; Sun et al., 2017), dok se u utišanim astrocitima adultnog mozga, ekspresija ovih regulatornih proteina značajno smanjuje (Bani-Yaghoub et al., 2006; Sun et al., 2017). SOX2 u astrocitnim prekursorima omogućava održavanje visokog proliferativnog kapaciteta ovih ćelija (Bani-Yaghoub et al., 2006), dok SOX9 u kompleksu sa NFIA omogućava inicijaciju gliogeneze i uključen je u regulaciju gena koji imaju ključne uloge u migraciji i metabolizmu astrocitnih prekursora (Kang et al., 2012). Rezultati naše studije pokazuju da astrociti ranih faza sazrevanja sa visokom ekspresijom SOX2 i SOX9, poseduju visok proliferativni i migratorni kapacitet. Nasuprot tome, u zrelim NT2/A, koje odlikuje niska ekspresija SOX2 i SOX9, proliferativni i migratorni kapacitet je značajno smanjen. Interesantno je da se u literaturi SOX2 i SOX9 opisuju i kao markeri zrelih astrocita (Cahoy et al., 2008; Chen et al., 2019; Sun et al., 2017; Zhang & Cui, 2014). Naši imunohistohemijski rezultati dobijeni na presecima korteksa pacova to ne potvrđuju, jer je na kontrolnim životinjama ekspresija SOX2 i SOX9 ograničena samo na mali broj GFAP-pozitivnih ćelija. Nije isključeno da je ekspresija ovih regulatornih proteina transkripcije u zrelim astrocitima specifična za vrstu, jer se navedeni literaturni podaci odnose na cerebralne preseke adultnih miševa (Sun et al., 2017; Xia & Zhu, 2015) i ljudi (Sun et al., 2017), dok su naši rezultati dobijeni na cerebralnom korteksu adultnih pacova. Naši *in vivo* i *in vitro* rezultati sugerišu da se ekspresija SOX2 i SOX9 povezuje pre svega sa reaktivnim astrocitima. Zaista, imunofluorescentno obeležavanje preseka velikog mozga pacova s lezijom desnog cerebralnog korteksa (ASK) pokazuje da se ekspresija SOX2 i SOX9 povećava u reaktivnim astrocitima u okolini povrede. Reaktivni fenotip ovih astrocita potvrđen je na osnovu povećane ekspresije GFAP-a i vimentina. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa nekoliko studija koje su pokazale da se SOX2 i SOX9 ponovo eksprimiraju u reaktivnim astrocitima nakon povrede (Bani-Yaghoub et al., 2006; Chen et al., 2019; Sun et al., 2017). Naš rezultat potvrđen je i *in vitro*. Nakon izlaganja mehaničkom stimulusu konfluentne kulture zrelih NT2/A, u reaktivnim astrocitima u okolini povrede uočena je povećana ekspresija SOX2 i SOX9. Kao i u *in vivo* modelu, NT2/A u okolini povrede dobijaju fibrozu morfologiju karakterističnu za reaktivne astrocite, što je potvrđeno imunofluorescentnim obeležavanjem vimentina. Vrlo slični rezultati objavljeni su u studiji Bani-Yaghoub i saradnika gde su autori pokazali da mehanička povreda naneta kulturama utišanih mišijih astrocita *in vitro* dovodi do povećanja ekspresije SOX2 u reaktivnim astrocitima u blizini povrede (Bani-Yaghoub et al., 2006). Sličan rezultat dobijen je u studiji Lim i saradnika, gde je pokazano da nakon mehaničke povrede *in vitro*, vimentin i GFAP-pozitivni NT2/A fibrozne morfologije migriraju u povređeno područje (Lim et al., 2007). Zanimljivo je da, slično rezultatima dobijenim na *in vivo* modelu pacova, naša *in vitro* studija pokazuje da je aktivacija NT2/A ograničena na oblast u neposrednoj blizini povrede. Nasuprot tome, astrociti udaljeni od povrede ne menjaju svoju

morfologiju i zadržavaju nisku ekspresiju SOX2 i SOX9, slično zapažanjima iz drugih studija koja ukazuju na to da je stepen reaktivne astroglioze, koji uključuje morfološke, funkcionalne i transkripcione promene astrocita, najizraženiji u neposrednoj blizini povrede, dok se progresivno smanjuje sa povećanjem udaljenosti astrocita od mesta povrede (Moulson et al., 2021; Sofroniew & Vinters, 2010). Sličan efekat mehaničkom povređivanju NT2/A, izazvao je forskolin, koji je korišćen kao hemijski stimulus za aktivaciju astrocita. Tretman zrelih NT2/A forskolinom doveo je do transformacije morfologije astrocita iz protoplazmatične u fibroznu i do povećane ekspresije SOX2 i SOX9 u ovim ćelijama (Slika 14). Iako su brojne studije pokazale povećanje ekspresije SOX2 (Bani-Yaghoub et al., 2006) i SOX9 (Sun et al., 2017) u reaktivnim astrocitima *in vivo* i/ili *in vitro*, njihova uloga u ovim ćelijama nije dovoljno razjašnjena. Iz tog razloga bilo je interesantno ispitati ulogu ovih proteina u ćelijskim procesima karakterističnim za aktivirane astrocite.

Reaktivna astrogliozna je složen proces u kome ove ćelije stiču neke od karakteristika astrocitnih prekursora, kao što je povećan proliferativni i migratorni kapacitet (Bernal & Arranz, 2018; Lagos-Cabre et al., 2019; Liu et al., 2014; Luo et al., 2017; Shimada et al., 2012; Sofroniew, 2009), kao i ponovna ekspresija SOX2 i SOX9 (Bani-Yaghoub et al., 2006; Sun et al., 2017). Naši rezultati pokazali su da povećana ekspresija SOX2 dovodi do povećanja vijabilnosti i proliferativnog potencijala NT2/A. Prve indikacije o uticaju SOX2 na proliferativni kapacitet zrelih astrocita objavljene su u studiji Bani-Yaghoub i saradnika, koji su pokazali da se nakon *in vitro* mehaničke povrede SOX2 ponovo eksprimira u ćelijskim kulturama utišanih mišjih astrocita, koji povećavaju svoj proliferativni kapacitet (Bani-Yaghoub et al., 2006). Rezultati naših eksperimenata potvrđuju ove indikacije i daju dokaz o direktnom uticaju SOX2 na ponovno sticanje proliferativnog kapaciteta zrelih astrocita. S druge strane, povećana ekspresija SOX9 u utišanim NT2/A nije uticala na vijabilnost i proliferaciju ovih ćelija, ali je dovela do povećanja migratornog kapaciteta NT2/A. Interesantno je da su rezultati studije koja je rađena na kulturama mišjih astrocita kičmene moždine aktiviranih ATP-om pokazali da SOX2 ne utiče na proliferaciju ovih ćelija već da je SOX2 uključen u povećanu proliferaciju i vijabilnost astrocita (Xia & Zhu, 2015). Razlike u sprezi SOX2 i SOX9 i funkcionalnih karakteristika astrocita mogle bi biti povezane sa poreklom astrocita, odnosno okolnog tkiva u kome su lokalizovani, kao i tipom povrede. Naime, u zavisnosti od tipa i konteksta povrede, različiti stimulusi, oslobođeni usled oštećenja tkiva, mogu aktivirati brojne unutarćelijske kaskade u reaktivnim astrocitima, što, utiče na fenotipski status astrocita, a to finalno dovodi do različitih ishoda u procesu oporavka nervnog tkiva (Zamanian et al., 2012).

Više studija govori o tome da profil ekspresije gena reaktivnih astrocita odgovara profilu ekspresije gena specifičnom za prekursore astrocita tokom razvića mozga i rane (nezrele) postnatalne astrocite (Chaboub et al., 2016; Zhou, 2016). Vođeni ovim literaturnim podacima, u ovoj doktorskoj tezi ispitano je da li povećana ekspresija SOX9 u zrelih astrocitima reaktivira istu transkripcionu regulatornu kaskadu koja je aktivna tokom inicijacije gliogeneze. Podaci iz studije rađene na kičmenoj moždini embriona pileta i miša pokazali su da SOX9 direktno reguliše ekspresiju proteina NFIA (Kang et al., 2012). SOX9 i NFIA formiraju kompleks i ko-regulišu ekspresiju seta gena, uključujući gen *Apcdd1*, koji igra ključnu ulogu u migraciji astrocitnih prekursora tokom gliogeneze i gen *Zcchc24* koji se povezuje sa njihovom metabolizmom (Kang et al., 2012). Naša studija pokazala je da povećana ekspresija SOX9 u zrelih NT2/A dovodi do povećane ekspresije gena *NFIA*, *APCDD1* i *ZCCHC24*. *APCDD1* igra ključnu ulogu u migraciji astrocitnih prekursora, verovatno kroz interakciju sa Rho GTP-azom (Kang et al., 2012). U skladu s tim, možemo pretpostaviti da se povećani migratorni potencijal zrelih NT2/A, detektovan nakon povećane ekspresije SOX9 u zrelih astrocitima, može pripisati povećanoj ekspresiji gena *APCDD1*. Interesantno je da je migratorni kapacitet zrelih NT2/A sa egzogeno povećanom ekspresijom SOX9 dostigao migratorni kapacitet NT2/A ranih faza sazrevanja koji endogeno visoko ekspimiraju SOX9. Naši rezultati pokazuju da SOX2 i SOX9 učestvuju u regulaciji proliferacije i migracije, važnih funkcionalnih osobina astrocita povezanih sa aktivacijom. Proliferacija i migracija astrocita imaju ključni značaj u formiranju glijskog ožiljka (Lagos-Cabre et al., 2019; Wanner et al., 2013). Ovi precizno regulisani procesi omogućavaju

reaktivnim astrocitima da formiraju barijeru koja sprečava širenje inflamacije na okolno tkivo (Lagos-Cabre et al., 2019; Sofroniew, 2014; Wanner et al., 2013), stoga je od izuzetnog značaja rasvetljavanje molekularnih mehanizama koji stoje u njihovoj osnovi. Naši rezultati su u saglasnosti sa studijama koje pokazuju da su setovi gena, čija je aktivnost vezana za formiranje glijskog ožiljka, prepoznati kao ciljni geni SOX2 i SOX9 regulatornih proteina transkripcije (Chen et al., 2019; Gris et al., 2007). Iako su potrebna dodatna istraživanja kako bi se razlučilo koje komponente signalnih puteva se nalaze pod kontrolom SOX2 i SOX9 tokom reaktivne astroglioze, naši rezultati i podaci iz literature (Chen et al., 2019; Lim et al., 2007) sugerišu da bi SOX2 i SOX9 ili njihovi ciljni geni mogli biti specifično modulirani radi usmeravanja reaktivnih astrocita u smeru regeneracije i oporavka nervnog tkiva.

Astroцити ostvaruju ključnu ulogu u održavanju homeostaze glutamata u CNS-u, preko glutamatnih transportera GLT1/EAAT2 i GLAST/EAAT1 na svojoj membrani (Andersen et al., 2021). Smanjena ekspresija ovih transportera (kodiranih genima *SLC1A2* i *SLC1A3*) u astrocitima usled različitih patoloških stanja CNS-a, dovodi do glutatomom posredovane ekscitotoksičnosti koja za posledicu ima oštećenje ili smrt neurona. Smanjena ekspresija glutamatnih transportera uočava se u mozgu tokom starenja, u različitim patologijama, poput traumatskih povreda mozga i u brojnim neurodegenerativnim oboljenjima (Kutzing et al., 2012; Yi & Hazell, 2006). Rezultati qPCR-a analize pokazali su da povećana ekspresija SOX9 dovodi do povećane ekspresije gena *SLC1A3*, koji kodira glutamatni transporter GLAST/EAAT1, što je u skladu sa studijom Kang i saradnika koja pokazuje da SOX9 posredno, preko regulacije NFIA, podstiče ekspresiju glutamatnog transportera Glast u astrocitnim prekursorima pileta (Kang et al., 2012). Zanimljivo, literaturni podaci ukazuju da se GLAST/EAAT1 često smatra markerom nezrelih postnatalnih astrocita, a poznato je da je u njima SOX9 i dalje visoko eksprimiran (Sun et al., 2017). Ovi podaci zajedno ukazuju na ulogu SOX9 u regulaciji GLAST tokom ranih faza diferencijacije i sazrevanja astrocita. Sa druge strane, ekspresija gena *SLC1A2* koji kodira GLT1/EAAT2 se nije promenila u uslovima povećane ekspresije SOX9 u zrelih NT2/A. Iako je povećana ekspresija SOX9 izazvala samo blago povećanje ekspresije gena *SLC1A3* i nije uticala na ekspresiju gena *SLC1A2*, značajno je doprinela povećanju kapaciteta astrocita za preuzimanje glutamata iz medijuma. Može se pretpostaviti da je povećana ekspresija SOX9 preko regulacije gena *SLC1A3* doprinela povećanom kapacitetu astrocita za preuzimanje glutamata, dok su u regulaciju ekspresije GLT-1 uključeni drugi molekularni mehanizmi nezavisni od SOX9. Na primer, različite studije su pokazale da je u regulaciju GLT-1 uključen cAMP/PKA/CREB (engl. *cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A/cAMP Response Element-Binding Protein*) i NFκB signalni put (Gegelashvili et al., 2000; Liu et al., 2016; Martinez-Lozada et al., 2016; Takahashi et al., 2015). Bitno je istaći da ekspresija glutamatnih transportera na astrocitima može zavisiti od miljea u kome se astroцити nalaze. Studije na astrocitima pacova pokazale su da je ekspresija Glt-1 u astrocitima povećava kada se gaje u ko-kulturi sa neuronima, u odnosu na ekspresiju ovog transportera u čistim kulturama astrocita (Schlag et al., 1998; Swanson et al., 1997). Pretpostavlja se da neuroni svoj efekat na povećavanje ekspresije GLT-1 ostvaruju preko efektorskih molekula kao što je aktivator adenilatne ciklaze- PACAP (engl. *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) (Figiel & Engele, 2000; Resch et al., 2014). Sandhu i saradnici su uočili da je nivo ekspresije *SLC1A3* (kodira EAAT1) veći u odnosu na nivo *SLC1A2* (kodira GLT-1/EAAT2) u NT2/A. Ovaj rezultat su objasnili time što su za eksperimente korišćene čiste kulture astrocita, bez prisustva neurona (Sandhu et al., 2002). Bez obzira na nižu ekspresiju GLT-1/EAAT2 u odnosu na GLAST/EAAT1 u astrocitima, pokazano je da su NT2/A funkcionalni u preuzimanju glutamata iz medijuma (Sandhu et al., 2002). Štaviše, blokiranje GLT-1 transportera kainatom je dovelo do blokiranja preuzimanja glutamata iz medijuma. Ovi podaci ukazuju na ključnu ulogu GLT-1 transportera u regulaciji preuzimanja glutamata, nezavisno od nivoa njegove ekspresije u NT2/A. Zaključno, blago povećanje ekspresije *SLC1A3* (kodira GLAST/EAAT1) usled povećane ekspresije SOX9 bilo je dovoljno da značajno poveća kapacitet NT2/A za preuzimanje glutamata. Međutim, dodatni molekularni mehanizmi koji učestvuju u regulaciji glutamatnih transportera, nezavisni od SOX9, kao i uticaj regulatornih proteina koje luče neuroni ostaju otvoreno polje za buduća istraživanja. miR-21 je bitan regulator funkcije astrocita koji može pospešiti oporavak nakon povrede

kičmene moždine, *in vitro* i *in vivo* (Bhalala et al., 2012; Liu et al., 2018). Pokazano je da miR-21 nakon povrede kičmene moždine povećava proliferaciju i inhibira apoptozu astrocita (Liu et al., 2018). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da smanjenje ekspresije miR-21 dovodi do smanjenja proliferacije NT2/A. Zanimljivo je da je ovaj efekat primetan ne samo u kulturi ranih/nezrelih astrocita, koja se uglavnom sastoji od mitotički aktivnih ćelija, već i u kulturi zrelih NT2/A, gde je proliferativni kapacitet značajno smanjen. Ova pro-proliferativna funkcija miR-21 opisana je i u drugim ćelijskim kontekstima, uglavnom u različitim vrstama maligniteta, uključujući glioblastom (Gaur et al., 2011; Lou et al., 2010). Interesantno, naši rezultati pokazuju da se ekspresija miR-21 ne smanjuje u zrelih NT2/A, uprkos značajnom smanjenju proliferativnog kapaciteta ovih ćelija. Činjenica da astrociti održavaju određeni nivo ekspresije miR-21 tokom sazrevanja ukazuje na to da je ova miRNK važna za fiziološku aktivnost astrocita, najverovatnije kroz sprečavanje preranog ulaska u senescenciju. Zaista, smanjenje proliferativnog kapaciteta NT2/A izazvano utišavanjem miR-21 praćeno je povećanom ekspresijom inhibitora ćelijskog ciklusa, gena *p21Waf1/Cip1* i *TP53* i povećanom aktivnošću SA- β -galaktozidaze koji predstavljaju glavne odlike senescentnog fenotipa, što ukazuje na potencijalnu ulogu miR-21 u senescenciji. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja ukazuje na povezanost između miR-21 i senescencije astrocita. Postoje studije na drugim ćelijskim modelima koje povezuju različite miRNK sa senescencijom. Slično kao u našoj studiji, studija na humanim U87 ćelijama glioma tumora je pokazala da utišavanje ekspresije miR-21 u ovim ćelijama dovodi do smanjenja proliferativnog kapaciteta i indukcije njihove senescencije (Chai et al., 2018). Sa druge strane, pokazano je da miR-21 u humanim endotelnim ćelijama preko regulacije ekspresije gena *DNMT1* i *SIRT1* enzima dovodi do smanjene proliferacije ovih ćelija i indukuje njihovu senescenciju (Mensa et al., 2020). Naša *in silico* analiza otkrila je dvadeset četiri gena povezana sa senescencijom koje potencijalno reguliše miR-21. Za nekoliko od ovih gena (*TIMP3*, *TGFB1*, *IL12A*, *RECK*, *VCL*, *COL4A1* i *EHD1*), eksperimentalno je pokazano da se povećano ekspimiraju u humanim senescentnim astrocitima kod kojih je senescencija izazvana oksidativnim stresom (Crowe et al., 2016). Različite studije su potvrdile da miR-21 u različitim tipovima ćelija direktno reguliše neke od ovih gena, uključujući *TIMP3*, *RECK*, *SMAD7*, *SATB1*, *PITX2*, *MAP2K3*, *BTG2*, *CCL20* i *ANKRD46* (Gabriely et al., 2008; Liu et al., 2009; Marts et al., 2017; Yan et al., 2011). Sve navedeno ukazuje da je miR-21 potencijalni regulator senescencije astrocita, iako su neophodna dodatna istraživanja za bolje razumevanje preciznih mehanizama njenog delovanja u kontroli ovog procesa. Senescencija, kao važan faktor u razvoju neurodegenerativnih bolesti, je u središtu naučnog fokusa poslednjih decenija. Ipak, ovaj fenomen i dalje nije dovoljno istražen, što naglašava značaj daljeg proučavanja molekularnih mehanizama koji leže u njegovoj osnovi.

Proces reaktivne astroglioze predstavlja kompleksan niz događaja koji obuhvata promene u ekspresiji brojnih gena, pri čemu upravo te promene određuju fenotipske promene koje utiču na finalni ishod patološkog procesa. Astrociti se aktiviraju u odgovoru na različite tipove patoloških stanja CNS-a, i u tom procesu mogu ostvariti i pozitivne i negativne efekte na oporavak nervnog tkiva. Ciljanim modifikovanjem ekspresije specifičnih gena u astrocitima moguće je modulirati određene fenotipske osobine astrocita, sa namerom da se promovišu neuroprotektivne i eliminišu štetne funkcije astrocita i time ostvari pozitivan efekat na oporavak nervnog sistema nakon povrede (Liddelow & Barres 2017). Interesantni su rezultati dobijeni na transgenim miševima sa ciljano uklonjenim genima za GFAP i vimentin (GFAP-/-Vim-/-). Kod ovih životinja, nakon povrede entorinalnog korteksa, ne dolazi do hipertrofije astrocitnih nastavaka, što rezultira većim gubitkom neuronalnih sinapsi u poređenju sa miševima divljeg soja (Wilhelmsson et al., 2004). Ova studija ukazuje na to da reaktivni astrociti pomažu oporavak nervnog tkiva u akutnoj fazi nakon povrede CNS-a i sugeriše da je hipertrofija astrocitnih nastavaka, povezana sa reaktivnom astrogliozom, od ključnog funkcionalnog značaja. Reaktivni astrociti, kao glavne ćelijske komponente glijskog ožiljka, mogu proizvoditi anti-regenerativne molekule, poput hondroitin sulfat proteoglikana (engl. *chondroitin sulfate proteoglycans*, *CSPGs*), ili pro-regenerativne molekule, poput laminina i fibronektina koji zajedno doprinose formiranju matriksa glijskog ožiljka (Gris et al., 2007). Hondroitin sulfat je komponenta vanćelijskog matriksa koja je prepoznata kao primarni inhibitor

oporavka aksona nakon povrede (McKillop et al., 2013). Zanimljivo je da nivo ekspresije SOX9 u ćelijama može biti ključan za balans između produkcije pro- i anti-regenerativnih molekula vanćelijskog matriksa koje proizvode astrociti (Gris et al., 2007). Štaviše, ciljano uklanjanje gena *SOX9* iz astrocita smanjuje nivo CSPG nakon povrede kičmene moždine, povećava neuroplastičnost i oporavak motornih funkcija miševa (McKillop et al., 2013). Suprotno tome, rezultati studije Shin i saradnika pokazuju da povećana ekspresija SOX9 u reaktivnim astrocitima, indukovana primenom PLGA (engl. *poly-lactic-co-glycolic acid*) nanočestica, smanjuje neurološke deficite i veličinu infarkta nakon ishemijskog oštećenja mozga, pružajući potencijalnu terapijsku opciju za oporavak nervnog tkiva (Shin et al., 2024). Naši rezultati sugerišu da je SOX9 uključen u regulaciju migracije astrocita, verovatno kroz aktivaciju iste transkripcione regulatorne kaskade koja je aktivna tokom gliogeneze. Imajući u vidu da reaktivni astrociti ponovo stiču povećan migratorni kapacitet i tokom formiranja glijskog ožiljka nakon teških oštećenja CNS-a (Lagos-Cabre et al., 2019), modulacijom ekspresije SOX9 ili njegovih ciljnih gena moglo bi se uticati na migratorne sposobnosti reaktivnih astrocita, a samim tim i na dalji tok reaktivne astroglione. Otuda su bitna dalja istraživanja u cilju boljeg razumevanja mehanizama koji se nalaze u osnovi migratornih sposobnosti astrocita. Dobijeni rezultati otvorili bi nove mogućnosti za terapijsko delovanje usmereno na modulaciju reaktivne astroglione u cilju sprečavanja daljih oštećenja i sanacije nervnog tkiva nakon povrede. Naša studija pokazuje da povećana ekspresija SOX9 povećava kapacitet zrelih astrocita za preuzimanje glutamata, što bi moglo imati potencijalni terapijski značaj s obzirom na to da je glutatomom posredovana ekscitotoksičnost zabeležena u različitim patologijama CNS-a, uključujući TBI (Sarkar & Hochedlinger, 2013; Todd & Hardingham, 2020; Yi & Hazell, 2006) i neurodegenerativne bolesti (Sattler & Rothstein, 2006). Među genima koje reguliše SOX2, mnogi (poput *Nr2e1*, *Mmd2*, *Wnt7a* i *Akt2*) su povezani sa aktivacijom i proliferacijom astrocita nakon TBI ili drugih bolesti mozga (Chen et al., 2019), što je u skladu sa našim rezultatima koji pokazuju da SOX2 povećava vijabilnost i proliferaciju astrocita. Takođe, pokazano je da ciljano uklanjanje SOX2 iz astrocita adultnih miševa značajno smanjuje glijski odgovor na kontrolisanu povredu korteksa i poboljšava oporavak miševa nakon povrede (Chen et al., 2019). Navedeni podaci sugerišu da SOX2 reguliše funkciju astrocita putem različitih signalnih puteva i da ovaj regulatorni protein transkripcije ili njegovi ciljni geni predstavljaju potencijalne mete za terapijske intervencije.

miRNK su u poslednjih nekoliko decenija postale vrlo interesantne sa terapijskog aspekta, imajući u vidu njihovu bitnu ulogu u regulaciji ekspresije gena. Terapijske strategije bazirane na oligonukleotidima imaju potencijal da leče širok spektar bolesti za koje trenutno ne postoje lekovi (Thakur et al., 2022). U ovu svrhu se koriste sintetički sintetisani oligonukleotidi koji deluju tako što zamenjuju funkcije miRNK čija je ekspresija smanjena u različitim patologijama CNS-a (engl. *miRNA mimics*) ili tako što utišavaju njihovu ekspresiju (engl. *antisense-miR*) ili ih razgrađuju u slučajevima kad su prekomerno eksprimirane (Samad & Kamaroddin, 2023). Mala dužina miRNK (~22 nuklotida) čini ih pogodnim i za dizajn lekova i za transfer u *in vivo* sisteme putem odobrenih sistema za transfer lekova koji su u primeni kod ljudi (Bai & Bian, 2022). Takođe, jedna miRNK reguliše ekspresiju većeg broja gena, stoga se miRNK-bazirane terapijske strategije mogu koristiti za regulaciju čitavih signalnih puteva, a ne samo jednog gena (Bai & Bian, 2022; Baumann & Winkler, 2014). Sa druge strane, to može dovesti do neželjenih efekata, kao što je modulacije ekspresije gena koji nisu primarno ciljani terapijom (engl. "*off targets*"), što posledično dovodi do poremećaja fizioloških ili pojave novih neželjenih funkcija ćelija (Samad & Kamaroddin, 2023). Stoga je detaljno proučavanje molekularnih mehanizama putem kojih miRNK ostvaruju svoje uloge ključno za minimalizovanje ovih neželjenih efekata, što bi omogućilo razvoj efikasnijih i sigurnijih terapijskih strategija. Naša istraživanja ukazuju na potencijalni značaj miR-21 u regulaciji senescencije astrocita. Kao što je ranije pomenuto, senescentni astrociti povezani su s različitim patologijama CNS-a (Cohen & Torres, 2019). Gubitak fizioloških funkcija astrocita uzrokovan senescencijom ima značajan uticaj na proces starenja mozga i razvoj neurodegenerativnih poremećaja (Baker & Petersen, 2018). Razumevanje mehanizama kojima miRNK doprinose senescenciji astrocita moglo bi imati aplikativni značaj. Dodatno, postoje dokazi koji sugerišu da miR-21 utiče na regulaciju ekspresije gena čija je

ekspresija povećana u senescentnim astrocitima (Gabriely et al., 2008; Liu et al., 2009; Marts et al., 2017; Yan et al., 2011). Zanimljivo je da se među ciljnim genima miR-21 nalaze geni koji su deo SASP-a, poput gena za interleukin 12A (IL12A), hemokin CCL20, TGF β i inhibitora metaloproteinaza TIMP3 i RECK. Ovo čini miR-21 posebno interesantnim sa terapijskog aspekta, jer bi modulacija njene ekspresije potencijalno mogla doprineti eliminaciji štetnih karakteristika senescentnih astrocita ili čak potpuno sprečiti njihovu senescenciju. Pored senolitika, koji dovode do uklanjanja senescentnih ćelija, sa terapijskog aspekta sve veći značaj dobijaju senomodulatori. Ova jedinjenja sprečavaju ekspresiju gena uključenih u SASP, čime se smanjuje rizik od inflamacije povezane sa starenjem (Lagoumtzi & Chondrogianni, 2021; Lu et al., 2023). Kao senomodulatori se najčešće koriste prirodna jedinjenja (resveratrol, rapamicin, apigenin, kaempferol, i drugi) za koje je na različitim ćelijskim linijama fibroblasta pokazano da inhibiraju ekspresiju različitih komponenti SASP-a (Laberge et al., 2015; Lim et al., 2015; Menicacci et al., 2017), uglavnom preko inhibicije NF- κ B signalnog puta (Lim et al., 2015; Xu et al., 2018). Za komponente iz semena biljke rambutan pokazano je da direktno inhibiraju sintezu iRNK koja kodira pro-inflamatorne faktore kao što su: IL-6, IL-8, IL-1 α , and IL-1 β . Takođe, ovaj senomodulator inhibira ekspresiju ćelijskih inhibitora P16, P21, P53, smanjuje intenzitet aktivnosti SA- β -gal u humanim fibroblastima kože (Lagoumtzi & Chondrogianni, 2021; Lee et al., 2020). Naša istraživanja su pokazala da miR-21 moduliše ekspresiju inhibitora ćelijskog ciklusa P53 i P21 u NT2/A. Takođe, naša *in silico* analiza je pokazala da ova miRNK potencijalno reguliše neke od gena uključenih u SASP (*IL12A*, *CCL20*, *TGF β* , *TIMP3* i *RECK*). U budućim istraživanjima bilo bi interesantno eksperimentalno potvrditi ulogu miR-21 u regulaciji ekspresije ovih gena. Navedeni rezultati i podaci iz literature navode na zaključak da bi miR-21 uz dodatna istraživanja, potencijalno mogla da se iskoristi kao senomodulator. Modifikacija njene ekspresije u senescentnim astrocitima bi potencijalno mogla da ublaži ili spreči neke od karakteristika senescentnog fenotipa. Ipak, potrebne su dalje funkcionalne analize kako bi se otkrili mehanizmi povezani sa miR-21 i senescencijom astrocita.

6. Zaključci

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Tokom sazrevanja NT2/A *in vitro*, ove ćelije menjaju svoju morfologiju od dominantno fibrozne tokom prve dve nedelje sazrevanja do protoplazmatične u četvrtoj nedelji sazrevanja (utišani/zreli NT2/A). NT2/A odlikuje ekspresija karakterističnih markera astrocita (GFAP, Vimentin i S100B) i pokazuju smanjenje proliferativnog kapaciteta sa sazrevanjem.
2. Ekspresija SOX2 i SOX9 se postepeno smanjuje tokom sazrevanja NT2/A. Ekspresija miR-21 se održava na visokom nivou i u ranim (prva nedelja sazrevanja) i u zrelim NT2/A (četvrta nedelja sazrevanja).
3. Reaktivna astroglioza indukovana povredom na *in vivo* i *in vitro* model sistemu dovodi do povećanja ekspresije SOX2 i SOX9 u reaktivnim astrocitima.
4. Ekspresija SOX2 povećana lentiviralnom transdukcijom u zrelim NT2/A dovodi do povećane vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta ovih ćelija, dok povećana ekspresija SOX9 dovodi do povećanja migratornog kapaciteta ovih ćelija.
5. Povećana ekspresija SOX9 u zrelim NT2/A dovodi do povećanja ekspresije gena *NFIA*, *APCDD1* i *ZCCHC24*, odnosno do reaktivacije transkripcione regulatorne kaskade prisutne tokom gliogeneze. Takođe, povećana ekspresija SOX9 dovodi do povećane ekspresije gena *SLC1A3* koji kodira EAAT1/GLAST glutamatni transporter kao i značajnog povećanja kapaciteta NT2/A za preuzimanje glutamata.
6. Utišavanje ekspresije miR-21 u ranim i zrelim NT2/A dovodi do smanjenja proliferativnog kapaciteta ovih ćelija, povećanja ekspresije gena *p21Waf1/Cip1* i *TP53* i povećanja intenziteta SA- β -gal signala.
7. Povećana ekspresija mitotskih inhibitora i intenziteta SA- β -gal signala u uslovima utišane ekspresije miR-21, sugerise na ulazak NT2/A u senescenciju, što ukazuje na potencijalnu ulogu miR-21 u regulaciji senescencije astrocita.

Rezultati ove doktorske teze doprinose razumevanju uloge SOX2, SOX9 i miR-21 u kompleksnim fenotipskim osobinama astrocita i rasvetljavanju molekularnih mehanizama koji leže u osnovi aktivacije i senescencije astrocita te ukazuju na potencijalnu mogućnost modulacije ovih regulatornih proteina kao osnove za razvoj novih terapijskih strategija za oporavak CNS-a.

Literatura

- Abbott, N. J., Ronnback, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7(1), 41-53.
- Abdelhak, A., Foschi, M., Abu-Rumeileh, S., Yue, J. K., D'Anna, L., Huss, A., Oeckl, P., Ludolph, A. C., Kuhle, J., Petzold, A., Manley, G. T., Green, A. J., Otto, M., & Tumani, H. (2022). Blood GFAP as an emerging biomarker in brain and spinal cord disorders. *Nat Rev Neurol*, 18(3), 158-172.
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*, 4.
- Alarcon-Aguilar, A., Gonzalez-Puertos, V. Y., Luna-Lopez, A., Lopez-Macay, A., Moran, J., Santamaria, A., & Konigsberg, M. (2014). Comparing the effects of two neurotoxins in cortical astrocytes obtained from rats of different ages: involvement of oxidative damage. *J Appl Toxicol*, 34(2), 127-138.
- Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A., & Aldana, B. I. (2021). Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 196, 108719.
- Andrews, P. W. (1998). Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APMIS*, 106(1), 158-167; discussion 167-158.
- Andrews, P. W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G. S., Carlin, C., Dracopoli, N. C., & Fogh, J. (1984). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest*, 50(2), 147-162.
- Andrews, P. W., Matin, M. M., Bahrami, A. R., Damjanov, I., Gokhale, P., & Draper, J. S. (2005). Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 6), 1526-1530.
- Argentaro, A., Olsson, J., Critcher, R., McDowall, S. G., & Harley, V. R. (2000). Genomic characterisation and fine mapping of the human SOX13 gene. *Gene*, 250(1-2), 181-189.
- Asangani, I. A., Rasheed, S. A., Nikolova, D. A., Leupold, J. H., Colburn, N. H., Post, S., & Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27(15), 2128-2136.
- Auguste, K. I., Jin, S., Uchida, K., Yan, D., Manley, G. T., Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2007). Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. *FASEB J*, 21(1), 108-116.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 17(1), 126-140.
- Bai, X., & Bian, Z. (2022). MicroRNA-21 Is a Versatile Regulator and Potential Treatment Target in Central Nervous System Disorders. *Front Mol Neurosci*, 15, 842288.
- Bak, L. K., & Walls, A. B. (2018). CrossTalk opposing view: lack of evidence supporting an astrocyte-to-neuron lactate shuttle coupling neuronal activity to glucose utilisation in the brain. *J Physiol*, 596(3), 351-353.
- Baker, D. J., & Petersen, R. C. (2018). Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J Clin Invest*, 128(4), 1208-1216.
- Bandeira, F., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009). Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33), 14108-14113.
- Bani-Yaghoub, M., Tremblay, R. G., Lei, J. X., Zhang, D., Zurakowski, B., Sandhu, J. K., Smith, B., Ribocco-Lutkiewicz, M., Kennedy, J., Walker, P. R., & Sikorska, M. (2006). Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev Biol*, 295(1), 52-66.
- Barreto, G. E., Gonzalez, J., Torres, Y., & Morales, L. (2011). Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res*, 71(2), 107-113.

- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Baumann, V., & Winkler, J. (2014). miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents. *Future Med Chem*, 6(17), 1967-1984.
- Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ceyzeriat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*, 9, 278.
- Benzing, W. C., Wujek, J. R., Ward, E. K., Shaffer, D., Ashe, K. H., Younkin, S. G., & Brunden, K. R. (1999). Evidence for glial-mediated inflammation in aged APP(SW) transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 20(6), 581-589.
- Bergsland, M., Werme, M., Malewicz, M., Perlmann, T., & Muhr, J. (2006). The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev*, 20(24), 3475-3486.
- Bernal, A., & Arranz, L. (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*, 75(12), 2177-2195.
- Bernard, P., & Harley, V. R. (2010). Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(3), 400-410.
- Bhalala, O. G., Pan, L., Sahni, V., McGuire, T. L., Gruner, K., Tourtellotte, W. G., & Kessler, J. A. (2012). microRNA-21 regulates astrocytic response following spinal cord injury. *J Neurosci*, 32(50), 17935-17947.
- Bhat, R., Crowe, E. P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C. D., Garcia, F. U., Johnson, F. B., Trojanowski, J. Q., Sell, C., & Torres, C. (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 7(9), e45069.
- Bian, S., Xu, T. L., & Sun, T. (2013). Tuning the cell fate of neurons and glia by microRNAs. *Curr Opin Neurobiol*, 23(6), 928-934.
- Bitto, A., Sell, C., Crowe, E., Lorenzini, A., Malaguti, M., Hrelia, S., & Torres, C. (2010). Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Exp Cell Res*, 316(17), 2961-2968.
- Blasko, I., Stampfer-Kountchev, M., Robatscher, P., Veerhuis, R., Eikelenboom, P., & Grubeck-Loebenstien, B. (2004). How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell*, 3(4), 169-176.
- Borgdorff, V., Lleonart, M. E., Bishop, C. L., Fessart, D., Bergin, A. H., Overhoff, M. G., & Beach, D. H. (2010). Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene*, 29(15), 2262-2271.
- Bowles, J., Schepers, G., & Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, 227(2), 239-255.
- Brown, A. M., & Ransom, B. R. (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55(12), 1263-1271.
- Burda, J. E., Bernstein, A. M., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 275 Pt 3(0 3), 305-315.
- Burkert, K., Moodley, K., Angel, C. E., Brooks, A., & Graham, E. S. (2012). Detailed analysis of inflammatory and neuromodulatory cytokine secretion from human NT2 astrocytes using multiplex bead array. *Neurochem Int*, 60(6), 573-580.
- Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostensfeld, T., Svendsen, C. N., Mucke, L., Johnson, M. H., & Sofroniew, M. V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, 23(2), 297-308.
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, 22(1), 183-192.
- Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., & Baker, D. J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*, 562(7728), 578-582.

- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. A., Krupenko, S. A., Thompson, W. J., & Barres, B. A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*, 28(1), 264-278.
- Caricasole, A., Ward-van Oostwaard, D., Zeinstra, L., van den Eijnden-van Raaij, A., & Mummery, C. (2000). Bone morphogenetic proteins (BMPs) induce epithelial differentiation of NT2D1 human embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol*, 44(5), 443-450.
- Chaboub, L. S., Manalo, J. M., Lee, H. K., Glasgow, S. M., Chen, F., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Kuo, C. T., Creighton, C. J., Mohila, C. A., & Deneen, B. (2016). Temporal Profiling of Astrocyte Precursors Reveals Parallel Roles for Asef during Development and after Injury. *J Neurosci*, 36(47), 11904-11917.
- Chai, C., Song, L. J., Han, S. Y., Li, X. Q., & Li, M. (2018). MicroRNA-21 promotes glioma cell proliferation and inhibits senescence and apoptosis by targeting SPRY1 via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *CNS Neurosci Ther*, 24(5), 369-380.
- Chan, J. A., Krichevsky, A. M., & Kosik, K. S. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 65(14), 6029-6033.
- Chen, C., Zhong, X., Smith, D. K., Tai, W., Yang, J., Zou, Y., Wang, L. L., Sun, J., Qin, S., & Zhang, C. L. (2019). Astrocyte-Specific Deletion of Sox2 Promotes Functional Recovery After Traumatic Brain Injury. *Cereb Cortex*, 29(1), 54-69.
- Chen, J., Huang, X., Halicka, D., Brodsky, S., Avram, A., Eskander, J., Bloomgarden, N. A., Darzynkiewicz, Z., & Goligorsky, M. S. (2006). Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(4), H1575-1586.
- Chen, Y., Qin, C., Huang, J., Tang, X., Liu, C., Huang, K., Xu, J., Guo, G., Tong, A., & Zhou, L. (2020). The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif*, 53(3), e12781.
- Cheng, X., Wang, J., Sun, X., Shao, L., Guo, Z., & Li, Y. (2019). Morphological and functional alterations of astrocytes responding to traumatic brain injury. *J Integr Neurosci*, 18(2), 203-215.
- Chinta, S. J., Woods, G., Demaria, M., Rane, A., Zou, Y., McQuade, A., Rajagopalan, S., Limbad, C., Madden, D. T., Campisi, J., & Andersen, J. K. (2018). Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep*, 22(4), 930-940.
- Chitnis, T., & Weiner, H. L. (2017). CNS inflammation and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 127(10), 3577-3587.
- Cho, S., & Hwang, E. S. (2012). Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence. *Mol Cells*, 33(6), 597-604.
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D. F., Bornstein, P., & Barres, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120(3), 421-433.
- Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Arlt, M. F., Horton, J. P., & Brilliant, M. H. (2001). Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SOX6 gene. *Gene*, 265(1-2), 157-164.
- Cohen, J., & Torres, C. (2019). Astrocyte senescence: Evidence and significance. *Aging Cell*, 18(3), e12937.
- Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol*, 37(9), 608-620.
- Crowe, E. P., Tuzer, F., Gregory, B. D., Donahue, G., Gosai, S. J., Cohen, J., Leung, Y. Y., Yetkin, E., Nativio, R., Wang, L. S., Sell, C., Bonini, N. M., Berger, S. L., Johnson, F. B., & Torres, C. (2016). Changes in the Transcriptome of Human Astrocytes Accompanying Oxidative Stress-Induced Senescence. *Front Aging Neurosci*, 8, 208.

- Czyzewski, W., Mazurek, M., Sakwa, L., Szymoniuk, M., Pham, J., Pasierb, B., Litak, J., Czyzewska, E., Turek, M., Piotrowski, B., Torres, K., & Rola, R. (2024). Astroglial Cells: Emerging Therapeutic Targets in the Management of Traumatic Brain Injury. *Cells*, 13(2).
- Das, M. M., & Svendsen, C. N. (2015). Astrocytes show reduced support of motor neurons with aging that is accelerated in a rodent model of ALS. *Neurobiol Aging*, 36(2), 1130-1139.
- de Ceglia, R., Ledonne, A., Litvin, D. G., Lind, B. L., Carriero, G., Latagliata, E. C., Bindocci, E., Di Castro, M. A., Savtchouk, I., Vitali, I., Ranjak, A., Congiu, M., Canonica, T., Wisden, W., Harris, K., Mameli, M., Mercuri, N., Telley, L., & Volterra, A. (2023). Specialized astrocytes mediate glutamatergic gliotransmission in the CNS. *Nature*, 622(7981), 120-129.
- De Keyser, J., Mostert, J. P., & Koch, M. W. (2008). Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci*, 267(1-2), 3-16.
- de la Rocha, A. M., Sampron, N., Alonso, M. M., & Matheu, A. (2014). Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res*, 4(4), 312-324.
- de Reus, A., Basak, O., Dykstra, W., van Asperen, J. V., van Bodegraven, E. J., & Hol, E. M. (2024). GFAP-isoforms in the nervous system: Understanding the need for diversity. *Curr Opin Cell Biol*, 87, 102340.
- Deitmer, J. W., Theparambil, S. M., Ruminot, I., Noor, S. I., & Becker, H. M. (2019). Energy Dynamics in the Brain: Contributions of Astrocytes to Metabolism and pH Homeostasis. *Front Neurosci*, 13, 1301.
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R. M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dolle, M. E., Hoeijmakers, J. H., de Bruin, A., Hara, E., & Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*, 31(6), 722-733.
- Denny, P., Swift, S., Brand, N., Dabhade, N., Barton, P., & Ashworth, A. (1992). A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Res*, 20(11), 2887.
- deSai C, S. A. (2023). StatPearls. In *Cerebral Ischemia*.
- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(2), 75-95.
- Ding, Z. B., Song, L. J., Wang, Q., Kumar, G., Yan, Y. Q., & Ma, C. G. (2021). Astrocytes: a double-edged sword in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*, 16(9), 1702-1710.
- Dobarro, M., Orejana, L., Aguirre, N., & Ramirez, M. J. (2013). Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid beta levels, tau phosphorylation and insulin resistance in response to chronic corticosterone administration. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16(6), 1351-1360.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703-716.
- Donato, R., Cannon, B. R., Sorci, G., RiuZZi, F., Hsu, K., Weber, D. J., & Geczy, C. L. (2013). Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*, 13(1), 24-57.
- Drakulic, D., Krstic, A., & Stevanovic, M. (2012). Establishment and initial characterization of SOX2-overexpressing NT2/D1 cell clones. *Genet Mol Res*, 11(2), 1385-1400.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*, 62(6), 649-671.
- Dugas, J. C., Cuellar, T. L., Scholze, A., Ason, B., Ibrahim, A., Emery, B., Zamanian, J. L., Foo, L. C., McManus, M. T., & Barres, B. A. (2010). Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron*, 65(5), 597-611.
- Ehlers, M. D. (2005). Synapse formation: astrocytes spout off. *Curr Biol*, 15(4), R134-137.
- Eng, L. F., Vanderhaeghen, J. J., Bignami, A., & Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*, 28(2), 351-354.
- Eroglu, C., & Barres, B. A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, 468(7321), 223-231.
- Escartin, C., & Bonvento, G. (2008). Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. *Mol Neurobiol*, 38(3), 231-241.

- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhauser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., Deneen, B., De Strooper, B., Diaz-Castro, B., Farina, C., Freeman, M., Gallo, V., Goldman, J. E., Goldman, S. A., Gotz, M., Gutierrez, A., Haydon, P. G., Heiland, D. H., Hol, E. M., Holt, M. G., Iino, M., Kastanenka, K. V., Kettenmann, H., Khakh, B. S., Koizumi, S., Lee, C. J., Liddel, S. A., MacVicar, B. A., Magistretti, P., Messing, A., Mishra, A., Molofsky, A. V., Murai, K. K., Norris, C. M., Okada, S., Olier, S. H. R., Oliveira, J. F., Panatier, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., Pellerin, L., Perea, G., Perez-Nievas, B. G., Pfrieger, F. W., Poskanzer, K. E., Quintana, F. J., Ransohoff, R. M., Riquelme-Perez, M., Robel, S., Rose, C. R., Rothstein, J. D., Rouach, N., Rowitch, D. H., Semyanov, A., Sirko, S., Sontheimer, H., Swanson, R. A., Vitorica, J., Wanner, I. B., Wood, L. B., Wu, J., Zheng, B., Zimmer, E. R., Zorec, R., Sofroniew, M. V., & Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*, 24(3), 312-325.
- Evans, R. J., Wyllie, F. S., Wynford-Thomas, D., Kipling, D., & Jones, C. J. (2003). A P53-dependent, telomere-independent proliferative life span barrier in human astrocytes consistent with the molecular genetics of glioma development. *Cancer Res*, 63(16), 4854-4861.
- Fan, Y. Y., & Huo, J. (2021). A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochem Int*, 148, 105080.
- Farhy-Tselnicker, I., & Allen, N. J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev*, 13(1), 7.
- Farina, C., Aloisi, F., & Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*, 28(3), 138-145.
- Figiel, M., & Engele, J. (2000). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J Neurosci*, 20(10), 3596-3605.
- Fontana, A. C. (2015). Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *J Neurochem*, 134(6), 982-1007.
- Franke, H., Verkhratsky, A., Burnstock, G., & Illes, P. (2012). Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signal*, 8(3), 629-657.
- Freeman, M. R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science*, 330(6005), 774-778.
- Fujita, K., Mondal, A. M., Horikawa, I., Nguyen, G. H., Kumamoto, K., Sohn, J. J., Bowman, E. D., Mathe, E. A., Schetter, A. J., Pine, S. R., Ji, H., Vojtesek, B., Bourdon, J. C., Lane, D. P., & Harris, C. C. (2009). p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol*, 11(9), 1135-1142.
- Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C. C., Burchard, J., Linsley, P. S., & Krichevsky, A. M. (2008). MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol*, 28(17), 5369-5380.
- Gao, L., Zheng, W. G., Wu, X. K., Du, G. H., & Qin, X. M. (2021). Baicalein Delays H(2)O(2)-Induced Astrocytic Senescence through Inhibition of Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP), Suppression of JAK2/STAT1/NF-kappaB Pathway, and Regulation of Leucine Metabolism. *ACS Chem Neurosci*, 12(13), 2320-2335.
- Garchow, B. G., Bartulos Encinas, O., Leung, Y. T., Tsao, P. Y., Eisenberg, R. A., Caricchio, R., Obad, S., Petri, A., Kauppinen, S., & Kiriakidou, M. (2011). Silencing of microRNA-21 in vivo ameliorates autoimmune splenomegaly in lupus mice. *EMBO Mol Med*, 3(10), 605-615.
- Garland, E. F., Hartnell, I. J., & Boche, D. (2022). Microglia and Astrocyte Function and Communication: What Do We Know in Humans? *Front Neurosci*, 16, 824888.
- Gaur, A. B., Holbeck, S. L., Colburn, N. H., & Israel, M. A. (2011). Downregulation of Pdcd4 by mir-21 facilitates glioblastoma proliferation in vivo. *Neuro Oncol*, 13(6), 580-590.
- Gavillet, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2008). Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia*, 56(9), 975-989.

- Gegelashvili, G., Dehnes, Y., Danbolt, N. C., & Schousboe, A. (2000). The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochem Int*, 37(2-3), 163-170.
- Giusti, S. A., Vogl, A. M., Brockmann, M. M., Vercelli, C. A., Rein, M. L., Trumbach, D., Wurst, W., Cazalla, D., Stein, V., Deussing, J. M., & Refojo, D. (2014). MicroRNA-9 controls dendritic development by targeting REST. *Elife*, 3.
- Goldstein, L. B. (2003). Model of recovery of locomotor ability after sensorimotor cortex injury in rats. *ILAR J*, 44(2), 125-129.
- Gomes, F. C., Paulin, D., & Moura Neto, V. (1999). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res*, 32(5), 619-631.
- Gottipati, M. K., Zuidema, J. M., & Gilbert, R. J. (2020). Biomaterial strategies for creating in vitro astrocyte cultures resembling in vivo astrocyte morphologies and phenotypes. *Curr Opin Biomed Eng*, 14, 67-74.
- Gradisnik, L., & Velnar, T. (2023). Astrocytes in the central nervous system and their functions in health and disease: A review. *World J Clin Cases*, 11(15), 3385-3394.
- Gris, P., Tighe, A., Levin, D., Sharma, R., & Brown, A. (2007). Transcriptional regulation of scar gene expression in primary astrocytes. *Glia*, 55(11), 1145-1155.
- Gu, X. L., Long, C. X., Sun, L., Xie, C., Lin, X., & Cai, H. (2010). Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol Brain*, 3, 12.
- Guinea-Viniegra, J., Jimenez, M., Schonhaler, H. B., Navarro, R., Delgado, Y., Concha-Garzon, M. J., Tschachler, E., Obad, S., Dauden, E., & Wagner, E. F. (2014). Targeting miR-21 to treat psoriasis. *Sci Transl Med*, 6(225), 225re221.
- Haile, Y., Fu, W., Shi, B., Westaway, D., Baker, G., Jhamandas, J., & Giuliani, F. (2014). Characterization of the NT2-derived neuronal and astrocytic cell lines as alternative in vitro models for primary human neurons and astrocytes. *J Neurosci Res*, 92(9), 1187-1198.
- Han, F., Wang, Z., Wu, F., Liu, Z., Huang, B., & Wang, D. (2010). Characterization, phylogeny, alternative splicing and expression of Sox30 gene. *BMC Mol Biol*, 11, 98.
- Han, X., Zhang, T., Liu, H., Mi, Y., & Gou, X. (2020). Astrocyte Senescence and Alzheimer's Disease: A Review. *Front Aging Neurosci*, 12, 148.
- Han, Z., Chen, F., Ge, X., Tan, J., Lei, P., & Zhang, J. (2014). miR-21 alleviated apoptosis of cortical neurons through promoting PTEN-Akt signaling pathway in vitro after experimental traumatic brain injury. *Brain Res*, 1582, 12-20.
- Hara, M., Kobayakawa, K., Ohkawa, Y., Kumamaru, H., Yokota, K., Saito, T., Kijima, K., Yoshizaki, S., Harimaya, K., Nakashima, Y., & Okada, S. (2017). Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nat Med*, 23(7), 818-828.
- Harley, V. R., Lovell-Badge, R., & Goodfellow, P. N. (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res*, 22(8), 1500-1501.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, 37, 614-636.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T., & Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 14(4), 388-405.
- Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*, 14(4), 501-513.

- Hernandez, I. H., Villa-Gonzalez, M., Martin, G., Soto, M., & Perez-Alvarez, M. J. (2021). Glial Cells as Therapeutic Approaches in Brain Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells*, 10(7).
- Herrmann, J. E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T. K., Korsak, R. A., Takeda, K., Akira, S., & Sofroniew, M. V. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci*, 28(28), 7231-7243.
- Hill, E. J., Jimenez-Gonzalez, C., Tarczyluk, M., Nagel, D. A., Coleman, M. D., & Parri, H. R. (2012). NT2 derived neuronal and astrocytic network signalling. *PLoS One*, 7(5), e36098.
- Hou, J., Cui, C., Kim, S., Sung, C., & Choi, C. (2018). Ginsenoside F1 suppresses astrocytic senescence-associated secretory phenotype. *Chem Biol Interact*, 283, 75-83.
- Howland, D. S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N. J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., DeGennaro, L. J., Cleveland, D. W., & Rothstein, J. D. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(3), 1604-1609.
- Hu, W., Chan, C. S., Wu, R., Zhang, C., Sun, Y., Song, J. S., Tang, L. H., Levine, A. J., & Feng, Z. (2010). Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504. *Mol Cell*, 38(5), 689-699.
- Huang, W., Hickson, L. J., Eirin, A., Kirkland, J. L., & Lerman, L. O. (2022). Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat Rev Nephrol*, 18(10), 611-627.
- Iadecola, C., & Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*, 10(11), 1369-1376.
- Ikeda, T., Zhang, J., Chano, T., Mabuchi, A., Fukuda, A., Kawaguchi, H., Nakamura, K., & Ikegawa, S. (2002). Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-SOX5) gene. *Gene*, 298(1), 59-68.
- Iovino, L., Giusti, V., Pischedda, F., Giusto, E., Plotegher, N., Marte, A., Battisti, I., Di Iacovo, A., Marku, A., Piccoli, G., Bandopadhyay, R., Perego, C., Bonifacino, T., Bonanno, G., Roseti, C., Bossi, E., Arrigoni, G., Bubacco, L., Greggio, E., Hilfiker, S., & Civiero, L. (2022). Trafficking of the glutamate transporter is impaired in LRRK2-related Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 144(1), 81-106.
- Jacobsen, C. T., & Miller, R. H. (2003). Control of astrocyte migration in the developing cerebral cortex. *Dev Neurosci*, 25(2-4), 207-216.
- Jenike, A. E., & Halushka, M. K. (2021). miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomark Res*, 9(1), 18.
- Jeremic, R., Pekovic, S., Lavrnja, I., Bjelobaba, I., Djelic, M., Dacic, S., & Brkic, P. (2023). Hyperbaric Oxygenation Prevents Loss of Immature Neurons in the Adult Hippocampal Dentate Gyrus Following Brain Injury. *Int J Mol Sci*, 24(5).
- Josephson, R., Muller, T., Pickel, J., Okabe, S., Reynolds, K., Turner, P. A., Zimmer, A., & McKay, R. D. (1998). POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes. *Development*, 125(16), 3087-3100.
- Jun, J. I., & Lau, L. F. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol*, 12(7), 676-685.
- Jurga, A. M., Paleczna, M., Kadluczka, J., & Kuter, K. Z. (2021). Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules*, 11(9).
- Kamphuis, W., Mamber, C., Moeton, M., Kooijman, L., Sluijs, J. A., Jansen, A. H., Verveer, M., de Groot, L. R., Smith, V. D., Rangarajan, S., Rodriguez, J. J., Orre, M., & Hol, E. M. (2012). GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One*, 7(8), e42823.
- Kang, P., Lee, H. K., Glasgow, S. M., Finley, M., Donti, T., Gaber, Z. B., Graham, B. H., Foster, A. E., Novitsch, B. G., Gronostajski, R. M., & Deneen, B. (2012). Sox9 and NFIA coordinate a transcriptional regulatory cascade during the initiation of gliogenesis. *Neuron*, 74(1), 79-94.
- Kang, W., & Hebert, J. M. (2011). Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Mol Neurobiol*, 43(3), 147-154.

- Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2018). DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res*, 46(D1), D239-D245.
- Keramari, M., Razavi, J., Ingman, K. A., Patsch, C., Edenhofer, F., Ward, C. M., & Kimber, S. J. (2010). Sox2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryo. *PLoS One*, 5(11), e13952.
- Kessarar, N., Pringle, N., & Richardson, W. D. (2001). Ventral neurogenesis and the neuron-glia switch. *Neuron*, 31(5), 677-680.
- Kiefer, J. C. (2007). Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn*, 236(8), 2356-2366.
- Kiray, H., Lindsay, S. L., Hosseinzadeh, S., & Barnett, S. C. (2016). The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Exp Neurol*, 283(Pt B), 541-549.
- Kitchen, P., Salman, M. M., Halsey, A. M., Clarke-Bland, C., MacDonald, J. A., Ishida, H., Vogel, H. J., Almutiri, S., Logan, A., Kreida, S., Al-Jubair, T., Winkel Missel, J., Gourdon, P., Tornroth-Horsefield, S., Conner, M. T., Ahmed, Z., Conner, A. C., & Bill, R. M. (2020). Targeting Aquaporin-4 Subcellular Localization to Treat Central Nervous System Edema. *Cell*, 181(4), 784-799 e719.
- Klajn, A., Drakulic, D., Tosic, M., Pavkovic, Z., Schwirtlich, M., & Stevanovic, M. (2014). SOX2 overexpression affects neural differentiation of human pluripotent NT2/D1 cells. *Biochemistry (Mosc)*, 79(11), 1172-1182.
- Kofuji, P., & Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4), 1045-1056.
- Komine, O., & Yamanaka, K. (2015). Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya J Med Sci*, 77(4), 537-549.
- Krichevsky, A. M., & Gabriely, G. (2009). miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med*, 13(1), 39-53.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., & Lowe, S. W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134(4), 657-667.
- Kumar, M., Lu, Z., Takwi, A. A., Chen, W., Callander, N. S., Ramos, K. S., Young, K. H., & Li, Y. (2011). Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene*, 30(7), 843-853.
- Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol*, 9, 645593.
- Kutzing, M. K., Luo, V., & Firestein, B. L. (2012). Protection from glutamate-induced excitotoxicity by memantine. *Ann Biomed Eng*, 40(5), 1170-1181.
- Kwon, H. S., & Koh, S. H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener*, 9(1), 42.
- Laberge, R. M., Sun, Y., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S. C., Davalos, A. R., Wilson-Edell, K. A., Liu, S., Limbad, C., Demaria, M., Li, P., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Javors, M., Desprez, P. Y., Benz, C. C., Kapahi, P., Nelson, P. S., & Campisi, J. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol*, 17(8), 1049-1061.
- Lagos-Cabre, R., Burgos-Bravo, F., Avalos, A. M., & Leyton, L. (2019). Connexins in Astrocyte Migration. *Front Pharmacol*, 10, 1546.
- Lagoumtzi, S. M., & Chondrogianni, N. (2021). Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. *Free Radic Biol Med*, 171, 169-190.
- Lal, A., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Pullmann, R., Jr., Srikantan, S., Subrahmanyam, R., Martindale, J. L., Yang, X., Ahmed, F., Navarro, F., Dykxhoorn, D., Lieberman, J., & Gorospe, M. (2008). p16(INK4a) translation suppressed by miR-24. *PLoS One*, 3(3), e1864.
- Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15-16.

- Lawrence, J. M., Schardien, K., Wigdahl, B., & Nonnemacher, M. R. (2023). Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. *Acta Neuropathol Commun*, 11(1), 42.
- Lazic, A., Balint, V., Stanisavljevic Ninkovic, D., Peric, M., & Stevanovic, M. (2022). Reactive and Senescent Astroglial Phenotypes as Hallmarks of Brain Pathologies. *Int J Mol Sci*, 23(9).
- Le, M. T., Teh, C., Shyh-Chang, N., Xie, H., Zhou, B., Korzh, V., Lodish, H. F., & Lim, B. (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev*, 23(7), 862-876.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187-195.
- Lee, K. H., Cha, M., & Lee, B. H. (2021). Crosstalk between Neuron and Glial Cells in Oxidative Injury and Neuroprotection. *Int J Mol Sci*, 22(24).
- Lee, V. M., & Andrews, P. W. (1986). Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins. *J Neurosci*, 6(2), 514-521.
- Lee, Y. R., Cho, H. M., Park, E. J., Zhang, M., Doan, T. P., Lee, B. W., Cho, K. A., & Oh, W. K. (2020). Metabolite Profiling of Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Seeds Using UPLC-qTOF-MS/MS and Senomorphic Effects in Aged Human Dermal Fibroblasts. *Nutrients*, 12(5).
- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Mendez, A., Han, Y., & Pallavi, B. (2007). Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(12), 2195-2214.
- Leng, K., Rose, I. V. L., Kim, H., Xia, W., Romero-Fernandez, W., Rooney, B., Koontz, M., Li, E., Ao, Y., Wang, S., Krawczyk, M., Tcw, J., Goate, A., Zhang, Y., Ullian, E. M., Sofroniew, M. V., Fancy, S. P. J., Schrag, M. S., Lippmann, E. S., & Kampmann, M. (2022). CRISPRi screens in human iPSC-derived astrocytes elucidate regulators of distinct inflammatory reactive states. *Nat Neurosci*, 25(11), 1528-1542.
- Li, C., Wu, Z., Zhou, L., Shao, J., Hu, X., Xu, W., Ren, Y., Zhu, X., Ge, W., Zhang, K., Liu, J., Huang, R., Yu, J., Luo, D., Yang, X., Zhu, W., Zhu, R., Zheng, C., Sun, Y. E., & Cheng, L. (2022). Temporal and spatial cellular and molecular pathological alterations with single-cell resolution in the adult spinal cord after injury. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1), 65.
- Li, J., Zhang, L., Chu, Y., Namaka, M., Deng, B., Kong, J., & Bi, X. (2016). Astrocytes in Oligodendrocyte Lineage Development and White Matter Pathology. *Front Cell Neurosci*, 10, 119.
- Li, L., Lundkvist, A., Andersson, D., Wilhelmsson, U., Nagai, N., Pardo, A. C., Nodin, C., Stahlberg, A., Aprico, K., Larsson, K., Yabe, T., Moons, L., Fotheringham, A., Davies, I., Carmeliet, P., Schwartz, J. P., Pekna, M., Kubista, M., Blomstrand, F., Maragakis, N., Nilsson, M., & Pekny, M. (2008). Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(3), 468-481.
- Li, M., Li, Z., Yao, Y., Jin, W. N., Wood, K., Liu, Q., Shi, F. D., & Hao, J. (2017). Astrocyte-derived interleukin-15 exacerbates ischemic brain injury via propagation of cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(3), E396-E405.
- Li, X., Khanna, A., Li, N., & Wang, E. (2011). Circulatory miR34a as an RNA-based, noninvasive biomarker for brain aging. *Aging (Albany NY)*, 3(10), 985-1002.
- Li, X., Tao, Y., Bradley, R., Du, Z., Tao, Y., Kong, L., Dong, Y., Jones, J., Yan, Y., Harder, C. R. K., Friedman, L. M., Bilal, M., Hoffmann, B., & Zhang, S. C. (2018). Fast Generation of Functional Subtype Astrocytes from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 11(4), 998-1008.
- Liberto, C. M., Albrecht, P. J., Herx, L. M., Yong, V. W., & Levison, S. W. (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem*, 89(5), 1092-1100.
- Liddel, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957-967.

- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Munch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., & Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481-487.
- Lim, H., Park, H., & Kim, H. P. (2015). Effects of flavonoids on senescence-associated secretory phenotype formation from bleomycin-induced senescence in BJ fibroblasts. *Biochem Pharmacol*, 96(4), 337-348.
- Lim, J. H., Gibbons, H. M., O'Carroll, S. J., Narayan, P. J., Faull, R. L., & Dragunow, M. (2007). Extracellular signal-regulated kinase involvement in human astrocyte migration. *Brain Res*, 1164, 1-13.
- Limbad, C., Oron, T. R., Alimirah, F., Davalos, A. R., Tracy, T. E., Gan, L., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2020). Astrocyte senescence promotes glutamate toxicity in cortical neurons. *PLoS One*, 15(1), e0227887.
- Linnerbauer, M., & Rothhammer, V. (2020). Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Front Immunol*, 11, 573256.
- Liu, M., Wu, H., Liu, T., Li, Y., Wang, F., Wan, H., Li, X., & Tang, H. (2009). Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma. *Cell Res*, 19(7), 828-837.
- Liu, R., Wang, W., Wang, S., Xie, W., Li, H., & Ning, B. (2018). microRNA-21 regulates astrocytic reaction post-acute phase of spinal cord injury through modulating TGF-beta signaling. *Aging (Albany NY)*, 10(6), 1474-1488.
- Liu, W., & Wang, X. (2019). Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biol*, 20(1), 18.
- Liu, X., Guo, H., Sayed, M. D., Lu, Y., Yang, T., Zhou, D., Chen, Z., Wang, H., Wang, C., & Xu, J. (2016). cAMP/PKA/CREB/GLT1 signaling involved in the antidepressant-like effects of phosphodiesterase 4D inhibitor (GEBR-7b) in rats. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 12, 219-227.
- Liu, Z., & Chopp, M. (2016). Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*, 144, 103-120.
- Liu, Z., Xin, H., & Chopp, M. (2014). Reactive astrocytes promote axonal remodeling and neurological recovery after stroke. *Neural Regen Res*, 9(21), 1874-1875.
- Lopez-Teros, M., Alarcon-Aguilar, A., Castillo-Aragon, A., Konigsberg, M., & Luna-Lopez, A. (2024). Cytokine profiling in senescent and reactive astrocytes: A systematic review. *Neurobiol Aging*, 138, 28-35.
- Lopez-Teros, M., Alarcon-Aguilar, A., Lopez-Diazguerrero, N. E., Luna-Lopez, A., & Konigsberg, M. (2022). Contribution of senescent and reactive astrocytes on central nervous system inflammation. *Biogerontology*, 23(1), 21-33.
- Lou, Y., Yang, X., Wang, F., Cui, Z., & Huang, Y. (2010). MicroRNA-21 promotes the cell proliferation, invasion and migration abilities in ovarian epithelial carcinomas through inhibiting the expression of PTEN protein. *Int J Mol Med*, 26(6), 819-827.
- Lu, Y., Jarrahi, A., Moore, N., Bartoli, M., Brann, D. W., Baban, B., & Dhandapani, K. M. (2023). Inflammation, cellular senescence, and cognitive aging after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*, 180, 106090.
- Luo, H., Wu, X. Q., Zhao, M., Wang, Q., Jiang, G. P., Cai, W. J., & Luo, M. Y. (2017). Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in central nervous system development of rats. *Asian Pac J Trop Med*, 10(12), 1185-1189.
- Macfarlane, L. A., & Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*, 11(7), 537-561.
- Machesky, L. M., & Hall, A. (1997). Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol*, 138(4), 913-926.
- Macikova, I., Perzelova, A., Mraz, P. et al. . (2009). GFAP-positive astrocytes are rare or absent in primary adult human brain tissue cultures. *Biologia*, 64, 833-839.

- Maes, O. C., An, J., Sarojini, H., & Wang, E. (2008). Murine microRNAs implicated in liver functions and aging process. *Mech Ageing Dev*, 129(9), 534-541.
- Magill, S. T., Cambronne, X. A., Luikart, B. W., Liroy, D. T., Leighton, B. H., Westbrook, G. L., Mandel, G., & Goodman, R. H. (2010). microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(47), 20382-20387.
- Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., Amrani, A., & Gris, D. (2019). NLRX1 Enhances Glutamate Uptake and Inhibits Glutamate Release by Astrocytes. *Cells*, 8(5).
- Marchal-Victorion, S., Deleyrolle, L., De Wille, J., Saunier, M., Dromard, C., Sandillon, F., Privat, A., & Hugnot, J. P. (2003). The human NTERA2 neural cell line generates neurons on growth under neural stem cell conditions and exhibits characteristics of radial glial cells. *Mol Cell Neurosci*, 24(1), 198-213.
- Marescal, O., & Cheeseman, I. M. (2020). Cellular Mechanisms and Regulation of Quiescence. *Dev Cell*, 55(3), 259-271.
- Martin, L. J., Price, A. C., Kaiser, A., Shaikh, A. Y., & Liu, Z. (2000). Mechanisms for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and in models of motor neuron death (Review). *Int J Mol Med*, 5(1), 3-13.
- Martinez-Lozada, Z., Guillem, A. M., & Robinson, M. B. (2016). Transcriptional Regulation of Glutamate Transporters: From Extracellular Signals to Transcription Factors. *Adv Pharmacol*, 76, 103-145.
- Marts, L. T., Green, D. E., Mills, S. T., Murphy, T., & Sueblinvong, V. (2017). MiR-21-Mediated Suppression of Smad7 Induces TGFbeta1 and Can Be Inhibited by Activation of Nrf2 in Alcohol-Treated Lung Fibroblasts. *Alcohol Clin Exp Res*, 41(11), 1875-1885.
- Matejuk, A., & Ransohoff, R. M. (2020). Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Front Immunol*, 11, 1416.
- Matias, I., Diniz, L. P., Damico, I. V., Araujo, A. P. B., Neves, L. D. S., Vargas, G., Leite, R. E. P., Suemoto, C. K., Nitrini, R., Jacob-Filho, W., Grinberg, L. T., Hol, E. M., Middeldorp, J., & Gomes, F. C. A. (2022). Loss of lamin-B1 and defective nuclear morphology are hallmarks of astrocyte senescence in vitro and in the aging human hippocampus. *Aging Cell*, 21(1), e13521.
- Matusova, Z., Hol, E. M., Pekny, M., Kubista, M., & Valihrach, L. (2023). Reactive astrogliosis in the era of single-cell transcriptomics. *Front Cell Neurosci*, 17, 1173200.
- Mauch, D. H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E. C., Otto, A., & Pfrieder, F. W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, 294(5545), 1354-1357.
- McKillop, W. M., Dragan, M., Schedl, A., & Brown, A. (2013). Conditional Sox9 ablation reduces chondroitin sulfate proteoglycan levels and improves motor function following spinal cord injury. *Glia*, 61(2), 164-177.
- Menicacci, B., Laurenzana, A., Chilla, A., Margheri, F., Peppicelli, S., Tanganelli, E., Fibbi, G., Giovannelli, L., Del Rosso, M., & Mocali, A. (2017). Chronic Resveratrol Treatment Inhibits MRC5 Fibroblast SASP-Related Protumoral Effects on Melanoma Cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 72(9), 1187-1195.
- Mensa, E., Guescini, M., Giuliani, A., Bacalini, M. G., Ramini, D., Corleone, G., Ferracin, M., Fulgenzi, G., Graciotti, L., Praticchizzo, F., Sorci, L., Battistelli, M., Monsurro, V., Bonfigli, A. R., Cardelli, M., Recchioni, R., Marcheselli, F., Latini, S., Maggio, S., Fanelli, M., Amatori, S., Storci, G., Ceriello, A., Stocchi, V., De Luca, M., Magnani, L., Rippo, M. R., Procopio, A. D., Sala, C., Budimir, I., Bassi, C., Negrini, M., Garagnani, P., Franceschi, C., Sabbatinelli, J., Bonafe, M., & Olivieri, F. (2020). Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells. *J Extracell Vesicles*, 9(1), 1725285.
- Messing, A., & Brenner, M. (2020). GFAP at 50. *ASN Neuro*, 12, 1759091420949680.

- Mestre, H., Hablitz, L. M., Xavier, A. L., Feng, W., Zou, W., Pu, T., Monai, H., Murlidharan, G., Castellanos Rivera, R. M., Simon, M. J., Pike, M. M., Pla, V., Du, T., Kress, B. T., Wang, X., Plog, B. A., Thrane, A. S., Lundgaard, I., Abe, Y., Yasui, M., Thomas, J. H., Xiao, M., Hirase, H., Asokan, A., Iliff, J. J., & Nedergaard, M. (2018). Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain. *Elife*, 7.
- Michinaga, S., & Koyama, Y. (2021). Pathophysiological Responses and Roles of Astrocytes in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci*, 22(12).
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*, 93(3), 421-443.
- Miguel-Hidalgo, J. J. (2023). Astrocytes as Context for the Involvement of Myelin and Nodes of Ranvier in the Pathophysiology of Depression and Stress-Related Disorders. *J Psychiatr Brain Sci*, 8.
- Mijit, M., Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F., & Giordano, A. (2020). Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*, 10(3).
- Moeton, M., Stassen, O. M., Sluijs, J. A., van der Meer, V. W., Kluivers, L. J., van Hoorn, H., Schmidt, T., Reits, E. A., van Strien, M. E., & Hol, E. M. (2016). GFAP isoforms control intermediate filament network dynamics, cell morphology, and focal adhesions. *Cell Mol Life Sci*, 73(21), 4101-4120.
- Molofsky, A. V., & Deneen, B. (2015). Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*, 63(8), 1320-1329.
- Mor, E., Cabilly, Y., Goldshmit, Y., Zalts, H., Modai, S., Edry, L., Elroy-Stein, O., & Shomron, N. (2011). Species-specific microRNA roles elucidated following astrocyte activation. *Nucleic Acids Res*, 39(9), 3710-3723.
- Morales-Rosales, S. L., Santin-Marquez, R., Posadas-Rodriguez, P., Rincon-Heredia, R., Montiel, T., Librado-Osorio, R., Luna-Lopez, A., Rivero-Segura, N. A., Torres, C., Cano-Martinez, A., Silva-Palacios, A., Cortes-Hernandez, P., Moran, J., Massieu, L., & Konigsberg, M. (2021). Senescence in Primary Rat Astrocytes Induces Loss of the Mitochondrial Membrane Potential and Alters Mitochondrial Dynamics in Cortical Neurons. *Front Aging Neurosci*, 13, 766306.
- Moulson, A. J., Squair, J. W., Franklin, R. J. M., Tetzlaff, W., & Assinck, P. (2021). Diversity of Reactive Astrogliosis in CNS Pathology: Heterogeneity or Plasticity? *Front Cell Neurosci*, 15, 703810.
- Munoz-Espin, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(7), 482-496.
- Nagler, K., Mauch, D. H., & Pfrieger, F. W. (2001). Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J Physiol*, 533(Pt 3), 665-679.
- Neal, M., Luo, J., Harischandra, D. S., Gordon, R., Sarkar, S., Jin, H., Anantharam, V., Desaubry, L., Kanthasamy, A., & Kanthasamy, A. (2018). Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes. *Glia*, 66(10), 2137-2157.
- Nigam, Y., Knight, J., Bhattacharya, S., & Bayer, A. (2012). Physiological changes associated with aging and immobility. *J Aging Res*, 2012, 468469.
- Nobes, C. D., & Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1), 53-62.
- Novak, D., Huser, L., Elton, J. J., Umansky, V., Altevogt, P., & Utikal, J. (2020). SOX2 in development and cancer biology. *Semin Cancer Biol*, 67(Pt 1), 74-82.
- Nwaobi, S. E., Cuddapah, V. A., Patterson, K. C., Randolph, A. C., & Olsen, M. L. (2016). The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathol*, 132(1), 1-21.
- O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*, 34, 185-204.
- O'Loghlen, A., Brookes, S., Martin, N., Rapisarda, V., Peters, G., & Gil, J. (2015). CBX7 and miR-9 are part of an autoregulatory loop controlling p16(INK) (4a). *Aging Cell*, 14(6), 1113-1121.

- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol*, 814, 23-45.
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J. D., Pilcher, W., Ojemann, J. G., Ransom, B. R., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*, 29(10), 3276-3287.
- Olivieri, F., Prattichizzo, F., Giuliani, A., Matacchione, G., Rippo, M. R., Sabbatinelli, J., & Bonafe, M. (2021). miR-21 and miR-146a: The microRNAs of inflammaging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*, 70, 101374.
- Orejana, L., Barros-Minones, L., Jordan, J., Puerta, E., & Aguirre, N. (2012). Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. *Neurobiol Aging*, 33(3), 625 e611-620.
- Pajarillo, E., Rizor, A., Lee, J., Aschner, M., & Lee, E. (2019). The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology*, 161, 107559.
- Parrinello, S., Napoli, I., Ribeiro, S., Wingfield Digby, P., Fedorova, M., Parkinson, D. B., Doddrell, R. D., Nakayama, M., Adams, R. H., & Lloyd, A. C. (2010). EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell*, 143(1), 145-155.
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, 32(8), 421-431.
- Pivonkova, H., & Anderova, M. (2017). Altered Homeostatic Functions in Reactive Astrocytes and Their Potential as a Therapeutic Target After Brain Ischemic Injury. *Curr Pharm Des*, 23(33), 5056-5074.
- Placone, A. L., McGuiggan, P. M., Bergles, D. E., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, A., & Searson, P. C. (2015). Human astrocytes develop physiological morphology and remain quiescent in a novel 3D matrix. *Biomaterials*, 42, 134-143.
- Pleasure, S. J., & Lee, V. M. (1993). NTERA 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J Neurosci Res*, 35(6), 585-602.
- Pleasure, S. J., Page, C., & Lee, V. M. (1992). Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTERA 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci*, 12(5), 1802-1815.
- Pole A, D. M., Goberdhan PD. (2016). Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Molecular Science*, 3(3), 300-324.
- Potokar, M., Morita, M., Wiche, G., & Jorgacevski, J. (2020). The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes. *Cells*, 9(7).
- Prior, H. M., & Walter, M. A. (1996). SOX genes: architects of development. *Mol Med*, 2(4), 405-412.
- Radulovic, V., Heider, T., Richter, S., Moertl, S., Atkinson, M. J., & Anastasov, N. (2017). Differential response of normal and transformed mammary epithelial cells to combined treatment of anti-miR-21 and radiation. *Int J Radiat Biol*, 93(4), 361-372.
- Rajman, M., & Schratt, G. (2017). MicroRNAs in neural development: from master regulators to fine-tuners. *Development*, 144(13), 2310-2322.
- Reeb KL, G. S., Temmermand R and Fontana ACK. (2024). Glutamate Transporters in Health and Disease. In *Two Sides of the Same Coin - Glutamate in Health and Disease*.
- Resch, J. M., Albano, R., Liu, X., Hjelmhaug, J., Lobner, D., Baker, D. A., & Choi, S. (2014). Augmented cystine-glutamate exchange by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide signaling via the VPAC1 receptor. *Synapse*, 68(12), 604-612.
- Roger, L., Tomas, F., & Gire, V. (2021). Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *Int J Mol Sci*, 22(23).
- Rossi, D. J., Brady, J. D., & Mohr, C. (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci*, 10(11), 1377-1386.
- Rothstein, J. D., Patel, S., Regan, M. R., Haenggeli, C., Huang, Y. H., Bergles, D. E., Jin, L., Dykes Hoberg, M., Vidensky, S., Chung, D. S., Toan, S. V., Bruijn, L. I., Su, Z. Z., Gupta, P., &

- Fisher, P. B. (2005). Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 433(7021), 73-77.
- Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J., & Kuncl, R. W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 38(1), 73-84.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M. C., Watanabe, H., Yan, D., Manley, G. T., & Verkman, A. S. (2005). Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci*, 118(Pt 24), 5691-5698.
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*, 234(5), 5451-5465.
- Salman, M. M., Kitchen, P., Halsey, A., Wang, M. X., Tornroth-Horsefield, S., Conner, A. C., Badaut, J., Iliff, J. J., & Bill, R. M. (2022). Emerging roles for dynamic aquaporin-4 subcellular relocalization in CNS water homeostasis. *Brain*, 145(1), 64-75.
- Samad, A. F. A., & Kamaroddin, M. F. (2023). Innovative approaches in transforming microRNAs into therapeutic tools. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 14(1), e1768.
- Sandhu, J. K., Sikorska, M., & Walker, P. R. (2002). Characterization of astrocytes derived from human NTera-2/D1 embryonal carcinoma cells. *J Neurosci Res*, 68(5), 604-614.
- Sarkar, A., & Hochedlinger, K. (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*, 12(1), 15-30.
- Sattler, R., & Rothstein, J. D. (2006). Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol*(175), 277-303.
- Schepers, G. E., Teasdale, R. D., & Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell*, 3(2), 167-170.
- Schlag, B. D., Vondrasek, J. R., Munir, M., Kalandadze, A., Zeleniaia, O. A., Rothstein, J. D., & Robinson, M. B. (1998). Regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol Pharmacol*, 53(3), 355-369.
- Shang, D., Hong, Y., Xie, W., Tu, Z., & Xu, J. (2020). Interleukin-1beta Drives Cellular Senescence of Rat Astrocytes Induced by Oligomerized Amyloid beta Peptide and Oxidative Stress. *Front Neurol*, 11, 929.
- Shigetomi, E., Saito, K., Sano, F., & Koizumi, S. (2019). Aberrant Calcium Signals in Reactive Astrocytes: A Key Process in Neurological Disorders. *Int J Mol Sci*, 20(4).
- Shimada, I. S., LeComte, M. D., Granger, J. C., Quinlan, N. J., & Spees, J. L. (2012). Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke. *J Neurosci*, 32(23), 7926-7940.
- Shimozaki, K. (2014). Sox2 transcription network acts as a molecular switch to regulate properties of neural stem cells. *World J Stem Cells*, 6(4), 485-490.
- Shin, H. J., Choi, S. G., Qu, F., Yi, M. H., Lee, C. H., Kim, S. R., Kim, H. G., Beom, J., Yi, Y., Kim, D. K., Joe, E. H., Song, H. J., Kim, Y., & Kim, D. W. (2024). Peptide-mediated targeted delivery of SOX9 nanoparticles into astrocytes ameliorates ischemic brain injury. *Nanoscale*, 16(2), 833-847.
- Si, Z., Sun, L., & Wang, X. (2021). Evidence and perspectives of cell senescence in neurodegenerative diseases. *Biomed Pharmacother*, 137, 111327.
- Simard, M., & Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 129(4), 877-896.
- Simmnacher, K., Krach, F., Schneider, Y., Alecu, J. E., Mautner, L., Klein, P., Roybon, L., Prots, I., Xiang, W., & Winner, B. (2020). Unique signatures of stress-induced senescent human astrocytes. *Exp Neurol*, 334, 113466.
- Simoes, P. D., & Ramos, T. (2007). Human pluripotent embryonal carcinoma NTERA2 cl.D1 cells maintain their typical morphology in an angiomyogenic medium. *J Negat Results Biomed*, 6, 5.

- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32(12), 638-647.
- Sofroniew, M. V. (2014). Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(2), a020420.
- Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends Immunol*, 41(9), 758-770.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1), 7-35.
- Sperger, J. M., Chen, X., Draper, J. S., Antosiewicz, J. E., Chon, C. H., Jones, S. B., Brooks, J. D., Andrews, P. W., Brown, P. O., & Thomson, J. A. (2003). Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23), 13350-13355.
- Stevanovic, M., Drakulic, D., Lazic, A., Ninkovic, D. S., Schwirtlich, M., & Mojsin, M. (2021). SOX Transcription Factors as Important Regulators of Neuronal and Glial Differentiation During Nervous System Development and Adult Neurogenesis. *Front Mol Neurosci*, 14, 654031.
- Stolt, C. C., Lommes, P., Friedrich, R. P., & Wegner, M. (2004). Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Development*, 131(10), 2349-2358.
- Stolt, C. C., Lommes, P., Sock, E., Chaboissier, M. C., Schedl, A., & Wegner, M. (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev*, 17(13), 1677-1689.
- Stolt, C. C., & Wegner, M. (2010). SoxE function in vertebrate nervous system development. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(3), 437-440.
- Suh, N. (2018). MicroRNA controls of cellular senescence. *BMB Rep*, 51(10), 493-499.
- Sun, W., Cornwell, A., Li, J., Peng, S., Osorio, M. J., Aalling, N., Wang, S., Benraiss, A., Lou, N., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2017). SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *J Neurosci*, 37(17), 4493-4507.
- Swanson, R. A., Liu, J., Miller, J. W., Rothstein, J. D., Farrell, K., Stein, B. A., & Longuemare, M. C. (1997). Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci*, 17(3), 932-940.
- Tabata, H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front Neurosci*, 9, 114.
- Takahashi, K., Foster, J. B., & Lin, C. L. (2015). Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cell Mol Life Sci*, 72(18), 3489-3506.
- Terzi, M. Y., Izmirlir, M., & Gogebakan, B. (2016). The cell fate: senescence or quiescence. *Mol Biol Rep*, 43(11), 1213-1220.
- Thakur, S., Sinhari, A., Jain, P., & Jadhav, H. R. (2022). A perspective on oligonucleotide therapy: Approaches to patient customization. *Front Pharmacol*, 13, 1006304.
- Todd, A. C., & Hardingham, G. E. (2020). The Regulation of Astrocytic Glutamate Transporters in Health and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 21(24).
- Tong, X., Ao, Y., Faas, G. C., Nwaobi, S. E., Xu, J., Hausteine, M. D., Anderson, M. A., Mody, I., Olsen, M. L., Sofroniew, M. V., & Khakh, B. S. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci*, 17(5), 694-703.
- Torp, R., Danbolt, N. C., Babaie, E., Bjoras, M., Seeberg, E., Storm-Mathisen, J., & Ottersen, O. P. (1994). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci*, 6(6), 936-942.
- Trempe, J. F. G. (1975). New Human Tumor Cell Lines. In (pp. 115–159).
- Troncoso-Escudero, P., Parra, A., Nassif, M., & Vidal, R. L. (2018). Outside in: Unraveling the Role of Neuroinflammation in the Progression of Parkinson's Disease. *Front Neurol*, 9, 860.
- Turnquist, C., Beck, J. A., Horikawa, I., Obiorah, I. E., Von Muhlinen, N., Vojtesek, B., Lane, D. P., Grunseich, C., Chahine, J. J., Ames, H. M., Smart, D. D., Harris, B. T., & Harris, C. C. (2019).

- Radiation-induced astrocyte senescence is rescued by Delta133p53. *Neuro Oncol*, 21(4), 474-485.
- Turnquist, C., Horikawa, I., Foran, E., Major, E. O., Vojtesek, B., Lane, D. P., Lu, X., Harris, B. T., & Harris, C. C. (2016). p53 isoforms regulate astrocyte-mediated neuroprotection and neurodegeneration. *Cell Death Differ*, 23(9), 1515-1528.
- Ungerleider, K., Beck, J., Lissa, D., Turnquist, C., Horikawa, I., Harris, B. T., & Harris, C. C. (2021). Astrocyte senescence and SASP in neurodegeneration: tau joins the loop. *Cell Cycle*, 20(8), 752-764.
- Valori, C. F., Guidotti, G., Brambilla, L., & Rossi, D. (2019). Astrocytes: Emerging Therapeutic Targets in Neurological Disorders. *Trends Mol Med*, 25(9), 750-759.
- Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct*, 222(5), 2017-2029.
- Verkhatsky, A., Butt, A., Li, B., Illes, P., Zorec, R., Semyanov, A., Tang, Y., & Sofroniew, M. V. (2023). Astrocytes in human central nervous system diseases: a frontier for new therapies. *Signal Transduct Target Ther*, 8(1), 396.
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*, 98(1), 239-389.
- Vishnoi, A., & Rani, S. (2017). MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol*, 1509, 1-10.
- Vitorino, M., Correia, E., Serralheiro, A. R., De-Jesus, A. C., Inacio, J. M., & Belo, J. A. (2014). Expression pattern of zcchc24 during early Xenopus development. *Int J Dev Biol*, 58(1), 45-50.
- Wang, C. Y., Yang, S. H., & Tzeng, S. F. (2015). MicroRNA-145 as one negative regulator of astrogliosis. *Glia*, 63(2), 194-205.
- Wanner, I. B., Anderson, M. A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci*, 33(31), 12870-12886.
- Wegner, M. (2005). Secrets to a healthy Sox life: lessons for melanocytes. *Pigment Cell Res*, 18(2), 74-85.
- Wegner, M. (2011). SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis. *Genes Dev*, 25(23), 2423-2428.
- Wei, D. C., & Morrison, E. H. (2025). Histology, Astrocytes. In *StatPearls*.
- Weider, M., Reiprich, S., & Wegner, M. (2013). Sox appeal - Sox10 attracts epigenetic and transcriptional regulators in myelinating glia. *Biol Chem*, 394(12), 1583-1593.
- Wilhelmsson, U., Li, L., Pekna, M., Berthold, C. H., Blom, S., Eliasson, C., Renner, O., Bushong, E., Ellisman, M., Morgan, T. E., & Pekny, M. (2004). Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci*, 24(21), 5016-5021.
- Williams, J., Smith, F., Kumar, S., Vijayan, M., & Reddy, P. H. (2017). Are microRNAs true sensors of ageing and cellular senescence? *Ageing Res Rev*, 35, 350-363.
- Wright, E. M., Snopek, B., & Koopman, P. (1993). Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res*, 21(3), 744.
- Xia, M., & Zhu, Y. (2015). The regulation of Sox2 and Sox9 stimulated by ATP in spinal cord astrocytes. *J Mol Neurosci*, 55(1), 131-140.
- Xu, L., Botchway, B. O. A., Zhang, S., Zhou, J., & Liu, X. (2018). Inhibition of NF-kappaB Signaling Pathway by Resveratrol Improves Spinal Cord Injury. *Front Neurosci*, 12, 690.
- Yabluchanskiy, A., Tarantini, S., Balasubramanian, P., Kiss, T., Csipo, T., Fulop, G. A., Lipecz, A., Ahire, C., DeFavero, J., Nyul-Toth, A., Sonntag, W. E., Schwartzman, M. L., Campisi, J., Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2020). Pharmacological or genetic depletion of senescent astrocytes prevents whole brain irradiation-induced impairment of neurovascular coupling responses protecting cognitive function in mice. *Geroscience*, 42(2), 409-428.

- Yan, L. X., Wu, Q. N., Zhang, Y., Li, Y. Y., Liao, D. Z., Hou, J. H., Fu, J., Zeng, M. S., Yun, J. P., Wu, Q. L., Zeng, Y. X., & Shao, J. Y. (2011). Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. *Breast Cancer Res*, 13(1), R2.
- Yi, J. H., & Hazell, A. S. (2006). Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int*, 48(5), 394-403.
- Yong, H. Y. F., Rawji, K. S., Ghorbani, S., Xue, M., & Yong, V. W. (2019). The benefits of neuroinflammation for the repair of the injured central nervous system. *Cell Mol Immunol*, 16(6), 540-546.
- Yu, P., Wang, H., Katagiri, Y., & Geller, H. M. (2012). An in vitro model of reactive astrogliosis and its effect on neuronal growth. *Methods Mol Biol*, 814, 327-340.
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*, 32(18), 6391-6410.
- Zhang, S., & Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells*, 6(3), 305-311.
- Zhang, W., Xiao, D., Mao, Q., & Xia, H. (2023). Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. *Signal Transduct Target Ther*, 8(1), 267.
- Zhang, W. M., Zhang, Z. R., Yang, X. T., Zhang, Y. G., & Gao, Y. S. (2018). Overexpression of miR-21 promotes neural stem cell proliferation and neural differentiation via the Wnt/beta-catenin signaling pathway in vitro. *Mol Med Rep*, 17(1), 330-335.
- Zhao, X., He, X., Han, X., Yu, Y., Ye, F., Chen, Y., Hoang, T., Xu, X., Mi, Q. S., Xin, M., Wang, F., Appel, B., & Lu, Q. R. (2010). MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron*, 65(5), 612-626.
- Zhou, M. (2016). Proliferating astrocytes in developing brain and reactive astrocytes in neurological disorders. *SM J. Neurol. Disord. Stroke* 2(1), 1006.
- Ziu, M., Fletcher, L., Rana, S., Jimenez, D. F., & Digicaylioglu, M. (2011). Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury. *PLoS One*, 6(2), e14724.

Biografija

Vanda Balint rođena je 15. 3. 1993. godine u Senti, Srbija. Završila je osnovne studije na Biološkom fakultetu u Beogradu 2017. godine, a 2018. godine i master studije, modul Molekularna biologija, podmodul Neurobiologija. Doktorske studije, program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota upisala je 2018. godine. Eksperimentalni deo teze radila je u Laboratoriji za Humanu molekularnu genetiku na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Bila je angažovana na 3 nacionalna i jednom međunarodnom projektu u okviru kog je išla na naučno usavršavanje u Englesku (Kardif). U okviru doktorske disertacije publikovala je dva naučna rada. Autor i koautor je 3 naučne publikacije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ванда Б. Балинт

Број индекса М3004/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај гена *SOX2* и *SOX9* и *miR-21* на фенотипске карактеристике астроцита пореклом од плурипотентних NT2/D1 ћелија.

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ванда Б. Балинт

Број индекса M3004/2018

Студијски програм Биологија

Наслов рада Утицај гена *SOX2* и *SOX9* и miR-21 на фенотипске карактеристике астроцита пореклом од плурипотентних NT2/D1 ћелија.

Ментори Др Андријана Лазих

академик Милена Стевановић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Утицај гена *SOX2* и *SOX9* и miR-21 на фенотипске карактеристике астроцита пореклом од плурипотентних NT2/D1 ћелија

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

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

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваје 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.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваје 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.** Дозвољаваје 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.