

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Ana M. Mijušković

**MEHANIZMI RELAKSANTNOG EFEKTA
NATRIJUM-SULFIDA
NA UTERUS PACOVA *in vitro*:
EFEKTORNE VRSTE I CILJNE
MOLEKULSKE STRUKTURE**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Ana M. Mijušković

**MECHANISMS OF SODIUM SULPHIDE
RELAXATORY EFFECT IN RAT UTERUS
in vitro: REACTIVE SPECIES AND
MOLECULAR TARGETS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

MENTORI:

Prof. dr Ljuba Mandić

redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Mihajlo B. Spasić

naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Milan Nikolić

docent

Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE:

Zahvalnica

Najiskrenije se zahvaljujem **Prof. Mihajlu B. Spasiću**, svom mentoru, koji je predložio temu za ovaj rad i rukovodio njegovom izradom. Povjerenje, podrška i pružena sloboda su bili od neprocjenjive važnosti za moj naučni razvoj.

Prof. Ljubi Mandić se zahvaljujem na podršci tokom doktorskih studija i korisnim sugestijama u toku pisanja teze.

Hvala **Dr Milanu Nikoliću** na kritičkoj analizi teksta doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem kolegama sa odeljenja za fiziologiju na inspirativnim godinama i jedinstvenoj radnoj atmosferi, koji su moje dane u Institutu učinili nezaboravnim. Hvala **Dr Dušku Blagojeviću, Dr Aleksandri Nikolić-Kokić, Dr Zorani Oreščanin-Dušić i Nikoli Tataloviću**.

Želim da se zahvalim **Dr Ivanu Spasojeviću** na razgovorima, motivaciji i podsticaju na kritičko promišljanje kao i pomoći koja nikada nije izostala.

Zahvaljujem se **Dr Karolu Ondrijasu** koji me je primio u svoj istraživački tim kao i kolegi **Dr Marijanu Grmanu** na pomoći pri dizajniranju i realizaciji eksperimenata za vrijeme mog šestomjesečnog boravka u Bratislavi.

Zahvaljujem se **Prof. Suzan Vrej**, koja je podržala moj boravak u svojoj istraživačkoj grupi.

Posebnu zahvalnost dugujem dragoj **Dr Milici Vučetić**, na predanoj i bezrezervnoj podršci.

Hvala Odeljenju za biohemiju, koji su promptno reagovali u kriznim trenucima. Osobito hvala, **Dr Jeleni Nestorov i Dr Ani Đorđević**.

Zahvaljujem se odeljenju za citologiju, bez čije logistike ne bilo moguće započeti radni dan. Hvala **sobi 6: Vladi, djevojkama i Maretu**.

Hvala mojim divnim prijateljima i porodici za ljubav i podršku.

Mojim roditeljima

SKRAĆENICE i AKRONIMI

AA	akrilamid
ANO	anoktamini – CaCC kanali (engl. <i>Anoctamins</i>)
APS	amonijum-persulfat
AUC	površina ispod krive (engl. <i>Area under the Curve</i>)
BEST	bestrofini – CaCC kanali (engl. <i>Bestrophins</i>)
BK _{Ca}	veliki K _{Ca} kanali (engl. <i>Large conductance K_{Ca}</i>)
BSA	albumin goveđeg seruma (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
Ca ²⁺ -CaM	Ca ²⁺ -kalmodulin kompleks (<i>Ca²⁺-Calmodulin complex</i>)
CaCC	kalcijumom-aktivirani hloridni kanali (engl. <i>Calcium Activated Cl⁻ Channels</i>)
cAMP	ciklični adenzin-monofosfat (engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CAT	katalaza (od engl. <i>Catalase</i>)
cGMP	ciklični guanozin-monofosfat (engl. <i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
CO	ugljen-(II)-oksid
COX	ciklooksigenaza (engl. <i>Cyclooxygenase</i>)
CuZnSOD	Cu, Zn superoksid dismutaza (engl. <i>Cu,Zn Superoxide Dismutase</i>)
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetil-sulfoksid
EDTA	etilendiaminotetrasirćetna kiselina
EPR	elektronska paramagnetna rezonanca
GPCR	receptori spregnuti sa G proteinima (engl. <i>G-Protein Coupled Receptors</i>)
GR	glutation-reduktaza (engl. <i>Glutathione Reductase</i>)
GSH	glutation (redukovani)
GSH-Px	glutation-peroksidaza (engl. <i>Glutathione Peroxidase</i>)
GSSG	glutation-disulfid (oksidovani)
H ₂ S	vodonik-sulfid
HS ⁻	vodonik-sulfidni anjon
ICC	intersticijalne ćelije Kalaja (engl. <i>Interstitial Cells of Cajal</i>)
IK _{Ca}	srednji K _{Ca} kanali(engl. <i>Intermediate conductance K_{Ca}</i>)
IP3	inozitol trifosfat (engl. <i>Inositol 1,4,5-triphosphate</i>)

K _{ATP}	ATP-zavisni kalijumovi kanali (engl. <i>ATP-sensitive K⁺ Channel</i>)
K _{Ca}	kalcijumom-aktivirani kalijumovi kanali (engl. <i>Calcium Activated K⁺ Channels</i>)
K _v	voltažno-zavisni kalijumovi kanali (engl. <i>Voltage-gated K⁺ Channels</i>)
LTCC	L-tip Ca ²⁺ kanal (engl. <i>L-type Ca²⁺ channel</i>)
MLC	miozin lakog lanca (engl. <i>Myosin Light chain</i>)
MLCK	kinaza lakog lanca miozina (<i>Myosin Light Chain Kinase</i>)
MLCP	fosfataza lakog lanca miozina (<i>Myosin Light Chain Phosphatase</i>)
NO	azot-(II)-oksid
O ₂ ^{•-}	superoksid-anjon-radikal
HO [•]	hidroksil-radikal
PBS	fosfatom puferisan fiziološki rastvor (engl. <i>Phosphate Buffered Salin</i>)
PCR	reakcija lančanog umnožavanja (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PKC	protein kinaza C (od engl. <i>Protein kinase C</i>)
PLC	fosfolipaza C (engl. <i>Phospholipase C</i>)
PM	potencijal mirovanja ćelijske membrane
PVDF	polivinil-difluorid
RhoA	GTP vezujući protein
ROCK	RhoA–asoirana protein kinaza
ROS/RNS	reaktivne vrste kiseonika/azota/sumpora
/RSS	(od engl. <i>Reactive Oxygen/Nitrogen/Sulphur Species</i>)
SDS-PAGE	natrijum-dodecilsulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
sGC	solubilna guanilat ciklaza
SKCa	mali Kca kanali (engl. <i>Small conductance Kca</i>)
TAE	tris-acetatni-EDTA pufer
TBE	tris-boratni EDTA pufer
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlen diamin
TMEM	tmem – CaCC kanali (engl. <i>Transmembrane Member</i>)
VOCC	voltažno-zavisni kalcijumski kanali (engl. <i>Voltage Operated Ca²⁺ Channels</i>)

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Uvod u problematiku teze	1
2	Pregled literature	4
2.1	Uterus	4
2.1.1	Anatomija humanog uterusa i uterusa pacova	4
2.1.1.1	Mioci miometrijuma	5
2.1.1.2	Kontrakcija miometrijuma - važnost ćelijske komunikacije	7
2.1.2	Ekscitabilnost ćelija miometrijuma	8
2.1.2.1	Potencijal mirovanja i aktivacija jonskih kanala	9
2.1.3	Medijatori kontraktilne aktivnosti - jonski kanali	10
2.1.3.1	Kalijumovi kanali	11
2.1.3.1.1	Kalcijumom aktivirani K ⁺ kanali	11
2.1.3.1.2	Voltažno-zavisni K ⁺ kanali	12
2.1.3.1.3	K _{ATP} kanali	13
2.1.3.2	Voltažno-zavisni kalcijumski kanali	13
2.1.3.2.1	L-tip kalcijumskih kanala	14
2.1.3.3	Hloridni kanali	14
2.1.3.3.1	Hloridni kanali u miometrijumu	15
2.1.3.3.2	Kalcijumom-aktivirani hloridni kanali	16
2.1.3.3.3	Bestrofini	17
2.1.4	Ekscitujuće-kontrahujuće sprezanje	18
2.1.5	Kontrakcija miometrijuma - regulacija unutarćelijskog kalcijuma [Ca ²⁺]	19
2.1.5.1	Elektromehaničko sprezanje	20
2.1.5.1.1	Akcionni potencijal	21
2.1.5.2	Farmakološko-mehaničko sprezanje	22
2.1.5.2.1	Agonist indukovane kontrakcije	22
2.1.5.3	Kontrakcije indukovane kalijum-hloridom	23
2.1.5.4	Modulacija senzitivnosti kontraktilnog aparata	24
2.2	Reaktivne vrste - redoks-regulacija versus (oksidativni) stres	25
2.2.1	Antioksidativni sistem zaštite	31
2.2.2	Reaktivne vrste i uterus	33
2.3	Vodonik-sulfid	34
2.3.1	Vodonik-sulfid i evolucija	34
2.3.2	Fizičko-hemijska svojstva vodonik-sulfida	35
2.3.3	Biosinteza vodonik-sulfida	36
2.3.4	Metabolizam vodonik-sulfida	37

2.3.5 Biološke mete sulfida.....	38
2.3.5.1 S-persulfidacija.....	39
2.3.5.2 Interakcije H ₂ S sa proteinima koji sadrže hem.....	40
2.3.5.3 Interakcije H ₂ S sa redoks-vrstama.....	40
2.3.5.3.1 Reakcije sa kiseonikom.....	41
2.3.5.3.2 Reakcije vodonik-sulfida sa superoksidom, peroksidom i peroksinitritom.....	41
2.3.5.3.3 Reakcija vodonik-sulfida sa •NO.....	42
2.3.5.4 Tiolni ostaci na proteinima - zajednički imenitelj modifikacija posredovanim signalnim vrstama?.....	42
3 Ciljevi.....	44
4 Materijal i metode.....	46
4.1 Reagensi i rastvori.....	46
4.2 Laboratorijske životinje.....	50
4.2.1 Utvrđivanje faze ciklusa.....	50
4.2.2 Uzorkovanje uterusa pacova.....	50
4.2.3 Uzorkovanje humanog uterusa.....	51
4.2.3.1 Disekcija humanih biopsija.....	51
4.3 Priprema tkiva za analize.....	51
4.3.1 Preparacija uterusa pacova za mjerenje kontraktilne aktivnosti.....	51
4.3.2 Preparacija humanog miometrijuma za mjerenje kontraktilne aktivnosti.....	52
4.3.3 Priprema tkiva za mjerenje aktivnosti antioksidativnih enzima.....	52
4.3.4 Priprema tkiva za <i>Western blot</i> analizu.....	52
4.3.5 Priprema tkiva za RT-PCR analizu - izolovanje RNK.....	53
4.3.6 Kalupljenje tkiva u parafinu.....	53
4.4 Efekti sulfida na kontrakcije uterusa.....	54
4.4.1 Efekat sulfida na kontrakcije uterusa – karakterizacija efekta ispitivanje mehanizama relaksacije.....	54
4.4.2 Efekti sulfida na kontrakcije humanog miometrijuma.....	55
4.4.3 Analiza rezultata kontraktilnosti.....	56
4.4.3.1 Amplituda.....	56
4.4.3.2 Frekvencija.....	56
4.4.3.3 AUC.....	56
4.5 Određivanje količine proteina.....	57
4.6 Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima.....	58
4.6.1 Određivanje aktivnosti CuZnSOD.....	58
4.6.2 Mjerenje aktivnosti CAT.....	59
4.6.3 Određivanje aktivnosti GSH-Px.....	60

4.6.4	Određivanje aktivnosti GR.....	60
4.7	<i>Western blot</i>	61
4.7.1	SDS PAGE.....	61
4.7.2	Imunoblot.....	61
4.8	RT-PCR.....	62
4.8.1	Sinteza prvog lanca kDNK.....	62
4.8.2	Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (qRT-PCR).....	63
4.8.3	<i>End point</i> PCR - identifikacija BEST-1 u humanom miometriju ..	64
4.8.3.1	<i>Gel elektroforeza - razdvajanje produkata</i>	64
4.9	Imunohistohemijsko bojenje	65
4.9.1	Imunohistohemijska PAP metoda.....	65
4.9.2	Imunofluorescentna metoda.....	65
4.10	EPR.....	66
4.11	Bioinformatička pomagala	67
4.11.1	Molekulsko modelovanje	67
4.11.2	Metode i softver	67
4.11.3	Priprema receptora.....	68
4.11.3.1	<i>Humana katalaza</i>	68
4.11.3.2	<i>Goveđa katalaza</i>	68
4.11.3.3	<i>Humana CuZnSOD</i>	68
4.11.3.4	<i>Goveđa CuZnSOD</i>	69
4.11.4	Priprema liganda.....	69
4.11.4.1	<i>H₂S struktura</i>	69
4.11.4.2	<i>HS⁻ struktura</i>	70
4.11.4.3	<i>CH₃SH struktura</i>	70
4.12	Statistička analiza podataka	70
5	Rezultati	72
5.1	Efekti natrijum-sulfida na kontraktilnost uterusa	72
5.1.1	Efekti Na₂S na kontraktilnu aktivnost spontano-aktivnog i Ca²⁺-stimulisanog uterusa	72
5.1.2	Efekti Na₂S na kontrakcije uterusa stimulisane oksitocinom	74
5.1.3	Efekti Na₂S na kontrakcije uterusa stimulisane kalijum-hloridom.	75
5.1.4	Poređenje efekata natrijum-sulfida sa efektima cisteina i homocisteina	76
5.1.4.1	<i>Efekat cisteina na kontraktilnost uterusa</i>	76
5.1.4.2	<i>Efekat homocisteina na kontraktilnost uterusa</i>	77
5.1.4.3	<i>Da li hiperhomocisteinemija (in vitro) utiče na relaksantni potencijal H₂S?</i>	77

5.2 Poređenje efekata natrijum-sulfida sa efektima metantiola - uloga tiolatnog anjona	79
5.2.1 Efekat CH_3SH na kontraktilnost uterusa - poređenje sa Na_2S	79
5.3 Medijatori relaksantnog efekta Na_2S	83
5.3.1 Efekti konsekutivnih dodavanja Na_2S na kontraktilnost utersa.....	83
5.3.2 Poređenje efekata Na_2S sa efektima Na_2S /polisulfida.....	83
5.3.3 Interakcija $\text{H}_2\text{S} \cdot \text{NO}$	84
5.4 Mehanizmi relaksantnog efekta natrijum-sulfida	85
5.4.1 Uloga K^+ kanala	85
5.4.1.1 Učešće K^+ kanala u relaksantnom efektu sulfida.....	85
5.4.1.2 Uloga K_{ATP} kanala u relaksantnom efektu sulfida	86
5.4.1.3 Uloga Kir kanala u relaksantnom efektu sulfida.....	87
5.4.2 Uloga Cl^- kanala u relaksantnom efektu sulfida	88
5.4.2.1 Uloga <i>BEST-1</i> kanala.....	88
5.4.2.2 Efekat <i>De Jalon</i> rastvora bez HCO_3^-	89
5.4.2.3 Uloga <i>CaCC</i> kanala u relaksantnom efektu natrijum-sulfida.....	89
5.4.2.4 Uloga <i>ANO-1</i> kanala.....	91
5.4.2.5 Uloga <i>CLC-1</i> kanala.....	92
5.4.3 Uloga kalcijumovih kanala	93
5.4.3.1 Uloga <i>L-tipa</i> kanala.....	94
5.4.4 Uloga cAMP i cGMP puteva u relaksantnom efektu natrijum-sulfida	94
5.4.4.1 Uloga β -adrenoreceptora.....	95
5.4.4.2 Uloga solubilne guanilat ciklaze (<i>sGC</i>).....	95
5.5 Efekti sulfida na kontraktilnost humanog miometrijuma	97
5.5.1 Efekti ATB-346, HTB i naproksena na kontraktilnost humanog miometrijuma	97
5.6 Proteinska ekspresija bestrofinskih kanala	100
5.7 Genska ekspresija bestrofina	101
5.8 Imunohistohemijska analiza	103
5.9 Ispitivanje redoks-osjetljivosti relaksantnog efekta vodonik-sulfida	104
5.9.1 Aktivnosti antioksidativnih enzima	104
5.9.1.1 Efekat sulfida na aktivnost antioksidativnih enzima u uterusu	104
5.9.1.2 Efekat CH_3SH na aktivnost antioksidativnih enzima u uterusu - poređenje sa efektima sulfida	106
5.9.1.3 Efekat pretretmana modulator/ Na_2S na aktivnost antioksidativnih enzima u uterusu - poređenje sa efektima sulfida.....	107

5.9.1.4	<i>EPR karakterizacija efekata sulfida na antioksidativne enzime (SOD)</i>	109
5.9.1.5	<i>Efekat sulfida na SOD</i>	109
5.9.2	Molekulsko modelovanje interakcija sulfida sa targetnim proteinima	110
6	Diskusija	124
7	Zaključci	143
8	Literatura	145
	Biografija	161
	Prilozi	162

Mehanizmi relaksantnog efekta natrijum-sulfida na uterus pacova *in vitro*: efektorne vrste i ciljne molekulske strukture

REZIME

Kontrakcije uterusa su važne za regulaciju brojnih reproduktivnih funkcija. Neregularna i neadekvatna aktivnost uterusa povezana je sa brojnim patološkim stanjima: neplodnost, neadekvatna implantacija, dismenoreja, kasne trudnoće i prevremeni porođaji. Kontraktilnost uterusa regulisana je kompleksnom elektrofiziološkom mrežom koja može biti modulirana različitim farmakološkim i signalnim molekulima.

Uterus se karakteriše izuzetnom osobinom, brzom adaptacijom iz stanja mirovanja u oscilatorne cikluse jakih kontrakcija. Ovo je omogućeno zahvaljujući aktivnosti ćelija koje su sposobne da remodeliraju svoje signalne puteve.

Endogeno-sintetisani vodonik-sulfid (H_2S), koji je zajedno sa azot-monoksidom i ugljen-monoksidom prepoznat kao gasoviti transmitter, ima signalnu ulogu i u uterusu. Vodonik-sulfid redukuje kontrakcije uterusa i prepoznat je kao agens velikog potencijala u tretmanu oboljenja uterusa. Do sada nisu urađene detaljnije studije, koje su dale uvid u mehanizme njegovog relaksantnog dejstva na uterusu, te je to od značajnog interesa. Nije poznato da li su biološki efekti sulfida posredovani njegovim molekulskim oblikom (H_2S) ili tiolatnim anjonom (HS^-).

Rezultati ove disertacije implicirali su da molekulska i anjonska forma ne mogu imati identične farmakološke efekte, uključujući i regulaciju kontraktilnosti. Efekti H_2S/HS^- na relaksaciju uterusa upoređeni su sa efektom metantiole (CH_3SH , koji „imitira“ H_2S). Uočene razlike mogu biti posljedica specifične aktivnosti HS^- jona. Ujedno, ovo upoređivanje može biti jedan od načina za razlikovanje efekata H_2S i HS^- . Metabolizam CH_3SH je povezan sa sulfidom, budući da se H_2S metiluje do CH_3SH i ova metilacija može biti novi način modulacije H_2S efekata *in vivo*. Ispitivano je učešće jonskih kanala (K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), kao posrednika u relaksaciji uterusa indukovanoj sa H_2S/HS^- . Nađeno je da sulfid izaziva reverzibilnu koncentracijski-zavisnu relaksaciju koja je posredovana DIDS-osjetljivim Cl^- kanalom. Dodatno, pokazano je da je DIDS-osjetljivi Ca^{2+} -

activated chloride channel), bestrofin (engl. *bestrophin*; BEST-1), prisutan u uterusu na nivou iRNK i na proteinskom nivou, što upućuje na njegovu ulogu u regulaciji kontraktilnosti uterusa. Dobro poznati relaksanti uterusa cAMP i cGMP, nisu važni za relaksaciju uterusa izazvanu sulfidom. Premda je poznato da su signalizacija sulfida i reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species*; ROS) međusobno integrisani, važnost ove komunikacije u regulaciji mehanizama koji kontrolišu kontraktilnost miometrijuma (poput jonskih kanala) nije do sada izučena. Osim toga, HS⁻ ima veći afinitet za metalo-proteine (poput nekih antioksidativnih enzima) u poređenju sa H₂S. Stoga je određivanjem aktivnosti antioksidativnih enzima ispitivano da li su različite komponente relaksacije uterusa, indukovane sulfidom, redoks-osjetljive i da li relaksacija nastaje kao rezultat izmijenjene redoks-ravnoteže. Sulfid je povećao aktivnost CuZnSOD (engl. *CuZn superoxide dismutase*). Ispitivanje interakcije sulfida sa CuZnSOD urađeno je EPR tehnikom. Utvrđena je redukcija Cu²⁺ do Cu⁺, što jasno ističe da je aktivni centar CuZnSOD „otvoren“ za efekte HS⁻/H₂S. Rezultati molekulskog modelovanja dali su uvid u mehanizme kojima sulfid može modulirati glavne mete, koje su identifikovane kao posrednici u relaksaciji u farmakološkim esejima. Da bi se povećao translacioni potencijal, efekti sulfida su takođe testirani i na humanom miometrijumu. Pokazano je da je sulfid snažan relaksant trudnog miometrijuma.

Generalno gledano, rezultati ove disertacije osnažili su nalaze o fiziološkom značaju vodonik-sulfida u uterusu i ukazali na njegove ciljne mete – hloridne kanale. Takođe, ovo istraživanje doprinosi generalnom razumijevanju molekulskih mehanizama kojima H₂S ostvaruje svoje efekte, a može biti od značaja za dizajniranje budućih *in vivo* studija, kao i za razvoj adekvatnog terapeutika koji bi tretirao poremećaje uterusa vezane za nepravilnu kontraktilnost.

Ključne riječi: Uterus, kontraktilnost, H₂S/HS⁻, CaCC, bestrofin, ROS

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Biohemijska farmakologija

UDK broj: 577

Mechanisms of sodium sulphide relaxatory effect in rat uterus in vitro: reactive species and molecular targets

ABSTRACT

Uterine contractions are important in many reproductive functions. Improper or irregular uterine activity may underlie the common pathological disorders such as infertility, improper implantation, dysmenorrhea, weak uterine contraction during labor and preterm labor. The contractile activity of the uterus is regulated by the complex electrophysiologic network which is highly sensitive to various pharmacological and signaling molecules. Remarkably, uterus is able to switch from quiescence to oscillatory cycles of strong contractions. This is dependent on the activity of the cells being able to remodel their signalling systems.

Endogenously produced hydrogen sulphide (H_2S), which, together with NO and CO, is a recognized gasotransmitter, also appears to be a signalling molecule in rat uterus. Hydrogen sulphide reduces uterine contractility, and it is recognized as a promising treatment for uterine disorders. There were no studies about mechanistic insights of its relaxatory effect, done so far, and thus is of potential interest. It is not currently known whether the biological effects of H_2S are mediated directly by H_2S or by its derivatives, the most important being the thiolate anion HS^- . The results presented in this thesis imply that it appears unlikely that molecular and anionic forms have pharmacologically identical actions, including the regulation of contractility. Pharmacological effects of H_2S/HS^- were compared to effects of methanethiol (CH_3SH , mimicks H_2S), and observed differences might be a consequence of the specific actions of HS^- . This comparison may represent a useful tool for discrimination between different actions of H_2S and HS^- . The metabolism of CH_3SH is intertwined with hydrogen sulfide (H_2S), since the later is methylated to CH_3SH and this methylation may be a new way of modulation of H_2S effects *in vivo*.

We investigated the involvement of ion channels (K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) in the relaxation of rat uteri induced by H_2S/HS^- . We found that sulphide induces reversible concentration-dependent relaxation of uteri via a DIDS-sensitive Cl^-

channel. Additionally, we showed that DIDS sensitive, CaCC channel (Ca²⁺-activated chloride channel), bestrophin (BEST-1) is present in uterus at both levels – mRNA and protein, suggesting a role for BEST-1 in the control of uterine contractility. Well known regulators of uterine contractility cAMP and cGMP seem to be not important in sulphide relaxation of uteri. Although, it has been known that hydrogen sulphide and reactive oxygen species (ROS) signalling systems are integrated, importance of such integration in the regulation of the mechanism that underlies myometrial contractility (such as ion channels) is not studied so far. Moreover, HS⁻ has a higher affinity towards metalloproteins (such as antioxidant enzymes) compared with H₂S. Therefore, we measured the activity of antioxidant enzymes with the aim of elucidating whether different components of the relaxation are redox-sensitive and whether the relaxation occurs as a consequence of disturbances in the redox homeostasis. Sulphide increased activity of CuZn superoxide dismutase (CuZnSOD). We applied EPR spectroscopy to further examine interactions of sulphide with CuZnSOD. This clearly implies that the active center of CuZnSOD is open to the effects of HS⁻/H₂S. Docking studies provided some data which could be useful in understanding of mechanisms by which sulphide modulate main targets which we identified through pharmacological study. In order to increase the translational potential of performed research, effects of sulphide was tested on human myometrium. It has been shown that sulphide is a potent relaxant of human myometrium.

Taken together, work undertaken in this thesis strengthens the evidence of a physiologically important role for H₂S in the uterus and suggests it targets -chloride channels. This research add to our understanding of molecular mechanisms of H₂S effects and will be beneficial in designing future *in vivo* studies, and ultimately identifying new therapeutic targets to treat uterine disorders that are associated with disturbed contractility.

Key words: Uterus, Contractility, H₂S/ HS⁻, CaCC, Bestrophin, ROS

Scientific field: Biochemistry

Special topic: Biochemical pharmacology

UDC number: 577

POGLAVLJE PRVO

Uvod

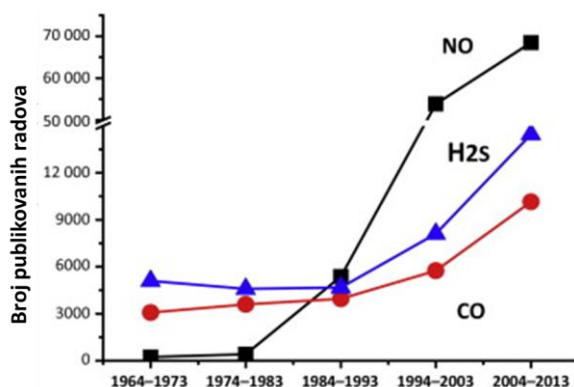
UVOD

1.1 Uvod u problematiku teze

Ćelijsko funkcionisanje je orkestrirano brojnim signalnim molekulima koji pripadaju različitim klasama jedinjenja uključujući lipide, male i velike peptide, male organske i neorganske jone (poput kalcijuma, cinka), kao i brojne intermedijere metabolizma. Neki od ovih molekula prenose informaciju na velike distance, dok drugi pak djeluju lokalno. Takođe, oni se mogu razlikovati po načinu aktivnosti - da li svoje efekte ispoljavaju vezujući se za ekstracelularne receptore, odnosno da li su sposobni da prođu plazminu membranu i djeluju na nivou nukleusa vezujući se za intracelularne receptore.

Gasoviti transmiteri su proširili konvencionalne koncepte unutarćelijske komunikacije. Uz epohalno otkriće da je radikalski azot-monoksid (NO) signalni molekul došla su još dva otrovna gasa ugljenmonoksid (CO) i vodonik-sulfid (H₂S), a njihove brojne uloge u fiziološkim i patofiziološkim procesima su potvrđene (Li i sar, 2011). Zahvaljujući svojim fizičko-hemijskim svojstvima (lipofilnosti) gasoviti transmiteri difunduju u ćeliju da bi interagovali sa njenim ciljnim molekulima. Klasični prenosnici prenose signal kroz amplifikaciju u signalnoj kaskadi (dobro poznati primjer signalizacije posredovane receptorima kuplovanim sa G proteinima). Suprotno ovom konceptu, gasoviti transmiteri hemijski modifikuju intraćelijske proteine, što utiče na ćelijski metabolizam na neposredan način. Upravo lipofilnost i njihova visoka difuziona konstanta onemogućava njihovo skladištenje (što je osobina konvencionalnih vezikularnih transmitera), već oni odmah po sintezi djeluju autokrino ili parakrino. Ovo implicira da biosintetički enzimi moraju biti subjekt ekstraordinarnih nijansiranih regulatornih mehanizama. Pionirski rad Abe i Kimura (Abe i Kimura, 1996) ustanovio je vodonik-sulfid kao fiziološki medijator. Otkriće da izlaganje miša vodonik-sulfidu (80 ppm) može indukovati stanje nalik hibernaciji kod životinja koje normalno ne hiberniraju, važno je otkriće zbog potencijalnih primjena na humanom organizmu (Blackstone i sar, 2005). Tokom posljednje dekade, interes za gasne transmitere je višestruko porastao o čemu svjedoči broj publikovanih radova (Slika 1.1).

UVOD



Slika 1.1. Interes za gasovite transmitere

Neregularna kontraktilnost uterusa može biti uzrok brojnih oboljenja poput dismenoreje ili endometrioze. Razumijevanje fiziologije uterusa – čime i kako je kontrolisana, identifikacija molekulskih osnova koje regulišu ekscitujuće-kontrahujuće sprezanje, je od ključnog značaja za utvrđivanje tačne sekvence događaja kod fizioloških i patofizioloških promjena elektromehaničkog profila uterusa. Disfunkcionalnost kontraktilnosti je vezana za brojne faktore među kojima su neregulisani jonski kanali, kao i reaktivne vrste porijeklom od molekulskog kiseonika. Takođe, nije poznato da li funkcionalne promjene jonskih kanala koji su glavni regulatori kontraktilnosti uterusa, mogu biti posredovane reaktivnim vrstama.

Cilj je identifikovati agens koji bi ciljano modulirao kontrakcije uterusa. Ovo je osobito važno za sprečavanje prevremenog porođaja, koji mogu nastati kao posljedica neregulisano-pojačanih kontrakcija. Uzimajući u obzir navedeno, endogeni molekul koji može redukovati kontrakcije je od interesa. Vodonik-sulfid je prepoznat kao signalni molekul u uterusu koji ima konstruktivnu ulogu u regulaciji kontraktilnosti. On predstavlja agens velikog potencijala, budući da se u uterusu endogeno (enzimatski) sintetiše. Njegova produkcija je gestacijski-regulisana (Robinson i Wray, 2012). Studije su pokazale da on redukuje kontrakcije miometrijuma (glatkog mišića uterusa), kako pacovskog, tako i humanog (Robinson i Wray, 2012). Stoga regulisanje nivoa H₂S predstavlja atraktivnu metu za terapijsku manipulaciju disfunkcionalnog uterusa. Poznato je da relaksira uterus, ali bez preciznih mehanističkih objašnjenja sa aspekta realnih

UVOD

hemijskih vrsta koje nastaju (molekulski i/ili jonski oblik) i sa aspekta ciljnih molekulskih struktura koje posreduju u ostvarenju krajnjeg relaksantnog efekta. (Bio)hemija vodonik-sulfida vezana je za H_2S i HS^- vrste koje su prisutne pri fiziološkim uslovima. Vodonik-sulfid u molekulskom obliku je reduktant, dok je tiolatni anjon jak nukleofil. Reduktivna i nukleofilna svojstva H_2S/HS^- su najvažnija u aspektu biohemije ovih vrsti, koje mogu doprinosti fiziologiji na različit i nezavisan način.

U ovoj doktorskoj disertaciji i objavljenim radovima na kojima se ona zasniva identifikovane su razlike u relaksantom efektu vrsta koji nastaju iz sulfida u fiziološkim uslovima. Po prvi put je pokazano da se relaksantni efekat vodonik-sulfida na netrudnom uterusu ostvaruje posredstvom hloridnih kanala, što je takođe doprinosi i razumijevanju uloge anjonskih kanala (bestrofina) u regulaciji kontraktilnosti uterusa. Utvrđeno je i da su komponente relaksacije redoks-osjetljive i da vodonik-sulfid modulira aktivost glavnih antioksidativnih enzima. Ovo može biti od velikog značaja, posebno u uslovima kada je miometrijum izložen oksidativnom disbalansu. Ovi rezultati bi trebalo da doprinesu definisanju efektornih vrsta i ciljnih molekulskih struktura relevantnih za objašnjenje mehanizma ostvarenog efekta *in vitro* koji su vjerovatno prisutni i *in vivo* u fiziološkim uslovima. Takođe, efekti vodonik-sulfida na humanom miometrijumu zajedno sa predloženim mehanizmima relaksacije izučenim na uterusu pacova čine se obećavajućim u cilju razvoja adekvatnog tokolitika.

POGLAVLJE DRUGO

Pregled literature

2.1 Uterus

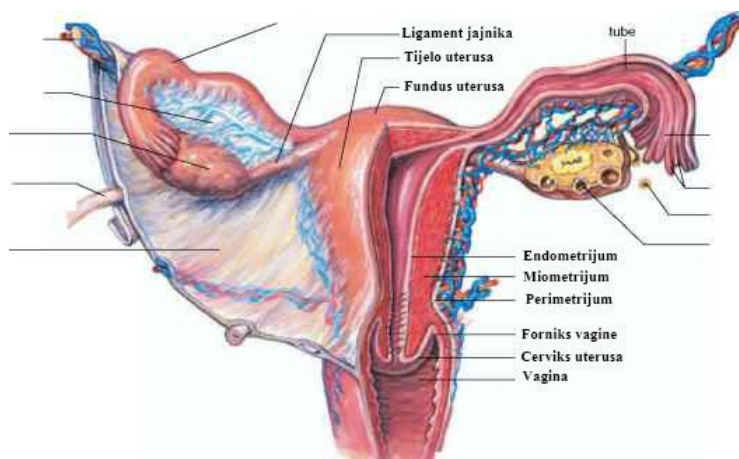
Uterus, odnosno glatki mišićni sloj uterusa – miometrijum, predstavlja organ izuzetne plastičnosti. On je ekscitabilan i sposoban da generiše spontane ritmične kontrakcije koje variraju u frekvenciji i amplitudi tokom menstrualnog ciklusa (Lammers i sar, 1994). Uterus se kontrahuje tačno određenom snagom i u određeno vrijeme, ostaje relaksiran tokom trudnoće, a zadržava tonus u netrudnim, nemenstrualnim periodima. Iako hormonalni i biohemijski događaji imaju ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti uterusa, kontrakcije su kao i kod ostalih glatkih mišića primarno elektromehanički događaj. U fiziološkim uslovima fazne kontrakcije su karakteristika uterusa, mokraćovoda i bešike. Ovi glatki mišići se razlikuju po funkciji, ali i inervaciji koja reguliše istu, tako uterus ima aferentnu inervaciju, ali ne i značajniju eferentnu, dok npr. bešika ima izražene obje inervacije. Krvni sudovi se, primjera radi, karakterišu toničnim kontrakcijama, koje imaju funkciju u održavanju dijametra sudova. Fazne kontrakcije, u ovom slučaju, su posljedica određenog patološkog stanja i uočavaju se kao spazam. Nakon porođaja, uterusne kontrakcije postaju tonične, dok ova funkcija nije uočena kod bešike. Stoga je uterus, jedinstven po funkciji, ima fazne i tonične kontrakcije, bez značajne nervne kontrole. Identifikacija molekulskih osnova koje leže u osnovi izmijenjene aktivnosti jonskih kanala, a posledično i ekscitujuće-kontrahujućeg sprežanja je od ključnog značaja za utvrđivanje tačne sekvence događaja kod fizioloških i patofizioloških promjena elektromehaničkog profila uterusa, dajući na taj način mogućnost identifikacije novih ciljnih struktura važnih za terapijske intervencije.

2.1.1 Anatomija humanog uterusa i uterusa pacova

Uterusi se među vrstama razlikuju, imaju drugačije morfološke karakteristike koje su povezane sa funkcijom. Humani uterus je kruškastog oblika, koji je u negravidnom stanju oko 6-8 cm, sastoji se iz tri sloja: seroznog, endometrijuma i glatkog mišićnog sloja miometrijuma (**Slika 2.1**). Premda postoje jasne razlike u anatomiji humanog i pacovskog uterusa, na nivou glatkog mišića oni pokazuju zavidan stepen sličnosti.

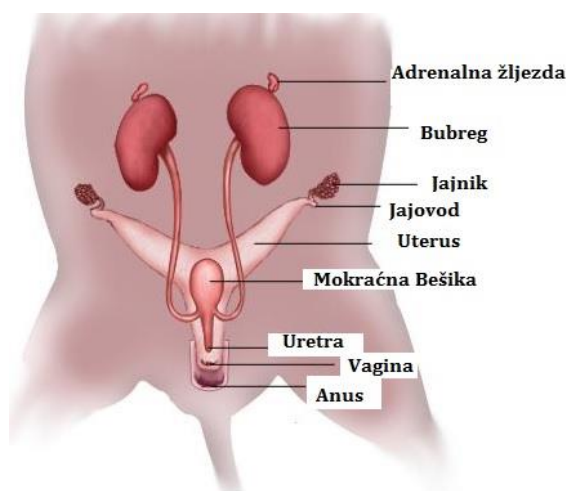
PREGLED LITERATURE

Kod pacova, uterus se sastoji iz dva roga (**Slika 2.2**). Ovakav oblik uterusa predstavlja morfološku adaptaciju koja omogućava simultani razvoj nekoliko embriona i višestruke, uzastopne porođaje. Uterus se sastoji iz tri različita sloja: endometrijuma, miometrijuma i perimetrijuma. Miometrijum čine longitudinalni i cirkularni mišići.



Slika 2.1 Anatomija humanog uterusa

(adaptirano sa: http://www.78stepshealth.us/human-physiology/images/3204_835_1095-infundibulum-uterine-tube.jpg).



Slika 2.2 Anatomija uterusa pacova

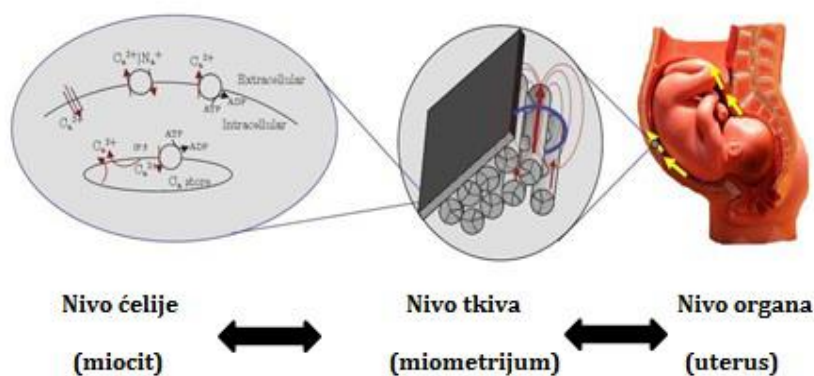
(adaptirano sa: <http://images.tutorvista.com/content/animal-morphology/female-rat-reproductive-system.jpeg>).

2.1.1.1 Miociti miometrijuma

Kontraksije uterusa zavise od kontraktilne aktivnosti ćelijskih elemenata, miocita uterusa – glatke mišićne ćelije miometrijuma (**Slika 2.3**) (Young, 2007). To

PREGLED LITERATURE

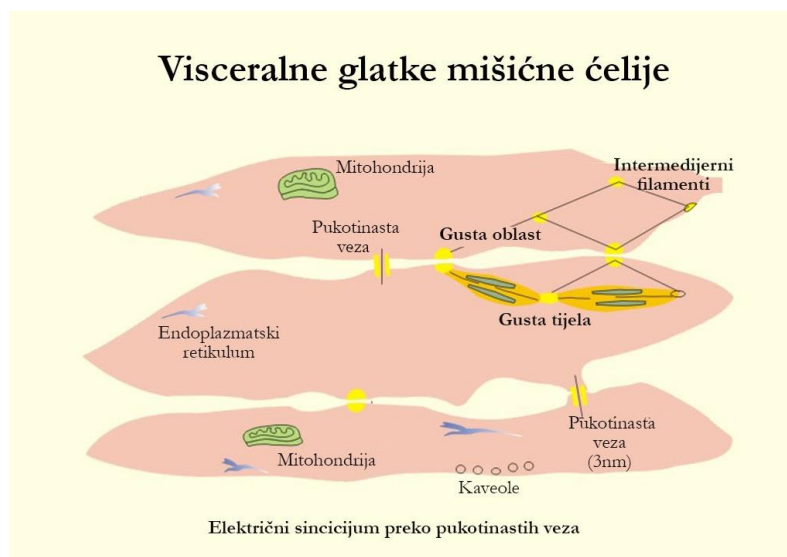
su ćelije vretenastog oblika sa jednim jedrom, centralno postavljenim. U netrudnom uterusu one su od 5-10 μm u dijametri i dugačke 30-40 μm . Tokom trudnoće, dužina ćelija se višestruko uvećava (300 μm – 600 μm) (Broderick and Broderick, 1990).



Slika 2.3 Miociti - ćelijski elementi kontraktilne aktivnosti uterusa

(adaptirano sa: http://www.ese.wustl.edu/~nehorai/research/ra/uterus_model_files/Figure1.jpg).

Nastanak kontrakcija vezan je za interakciju aktina i miozina u miocitu. U relaksiranom stanju, miozinski mostovi su odvojeni od aktinskih filamenata. Tokom kontrahovanja, oni se vezuju što omogućava nastanak kontrahujuće sile. Kontraktilna mašinerija (miofilamenti, intermedijarni filamenti i tamna tijela) čine ukupno 80-90% ukupnog volumena miometrijalne ćelije. Miociti uterusa funkcionišu kao sincicijum: miociti su ekscitabilne ćelije koje proizvode koordinisane kontrakcije, a ovo je postignuto ćelijskom komunikacijom preko pukotinastih veza (Wray, 1993) (Slika 2.4). Akcioni potencijali nastali u jednoj ćeliji aktiviraju susjedne ćelije što rezultira koordinisanom kontrakcijom cijelog tkiva, stoga se tkivo ponaša kao „*single unit*“, odnosno sincicijum.



Slika 2.4 Električni sincicijum glatkog mišića – aktivnost se prenosi od ćelije do ćelije zahvaljujući pukotinastim vezama

(adaptirano sa: <http://www.zuniv.net/physiology/book/images/n2-11.jpg>).

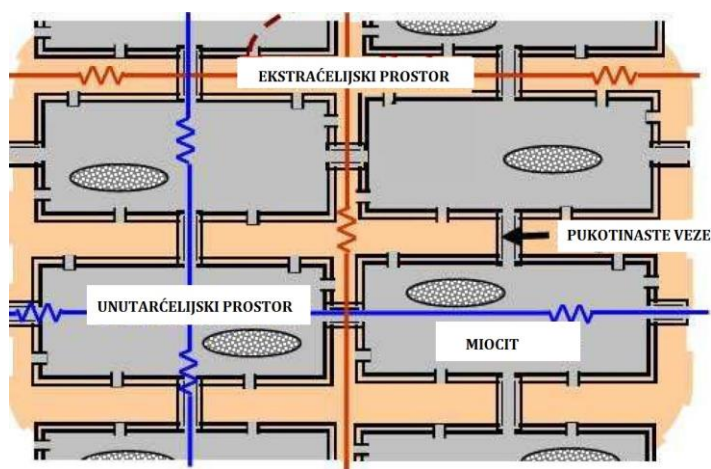
Plazma membrana miocita uterusa sadrži specijalizovane regione – kaveole. Kaveole predstavljaju omega invaginacije membrane. U slučaju ćelija glatkog mišića miometrijuma kaveole su prisutne u velikom broju, povećavajući tako površinu membrane (Wray i Noble, 2008). Kaveole uterusa su važne u regulaciji brojnih signalnih puteva, a u slučaju uterusa važne su za regulaciju signalizacije Ca^{2+} i kontraktilnosti (Lee i sar, 2001).

2.1.1.2 Kontrakcija miometrijuma – važnost ćelijske komunikacije

Kontrakcija i relaksacija miometrijuma nastaju kao posledica periodičnih depolarizacija i repolarizacija glatke mišićne ćelije u formi akcionih potencijala (Marshall, 1962; Kao, 1989). Depolarizacija membrane je spora i povezana sa aktivnošću pejsmejker ćelija; međutim prisustvo ovih ćelija u uterusu nije utvrđeno (Shmygol i sar, 2007). Mehanizam spontane aktivnosti nije razjašnjen, ali je pretpostavljeno postojanje pejsmejker ćelija kao inicijatora aktivnosti (Lammers i sar, 1994; Lammers i Hamid, 1998). Ćelije poznate kao ICC – intersticijalne ćelije Kajala (engl. ICC – *interstitial cells of Cajal*), identifikovane su i u drugim glatkim mišićima, kao što su mokraćna bežika, gastrointestinalne glatke mišićne ćelije, za koje je pokazano da imaju pejsmejker ulogu (Sergeant i sar, 2000). Ćelije nalik ICC ćelijama su pronađene u miometrijumu (Duquette i sar, 2005), ali njihova uloga u

PREGLED LITERATURE

predvođenju kontrakcija nije jasno utvrđena. Ekscitacija nastala u pejsmejker ćelijama mora biti prenijeta do drugih ćelija na brz i efikasan način. Ovo zahtijeva visoko razvijen sistem ćelijskog sprežanja tzv. „kuplovanja“ (Challis i Lye, 1994; Wray i sar, 2003). Unutarćelijske, pukotinaste veze se formiraju zahvaljujući proteinima koneksinima koji se organizuju u heksaedarski kanal povezujući na taj način citoplazmu jedne sa citoplazmom druge ćelije. Ovi kanali predstavljaju mjesta niskog otpora za električno ili jonsko sprežanje između ćelija i obezbjeđuju put za transport metabolita (manjih od 1-1,7 kDa) direktno između ćelija. Akcioni potencijali se tako brzo propagiraju od ćelije do ćelije (Cole i sar, 1985; Monga i Sanborn, 1992; Wray, 1993; Riemer i Heyman, 1998). U slučaju uterusa, koneksin 43 je najzastupljeniji, premda su i koneksini 45 i 26 identifikovani (Wray i sar, 2003). Funkcionisanje ovih veza je regulisano na više nivoa, preko strukturnog sprežanja, njihove propustljivosti (funkcionalno sprežanje), do njihove degradacije (Cole i Garfield, 1986).

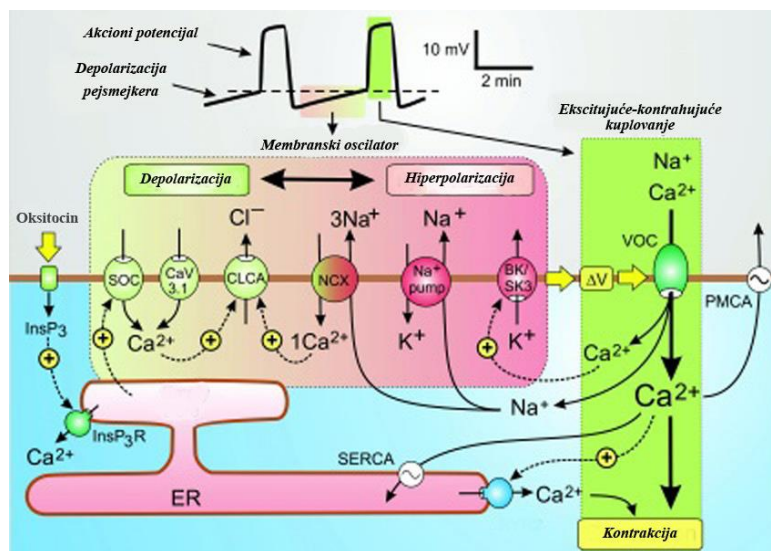


Slika 2.5 Model komunikacije ćelija u uterusu - pukotinaste veze (adaptirano sa: http://www.esel.wustl.edu/~nehorai/research/ra/uterus_model_files/Figure3.jpg).

2.1.2 Ekscitabilnost ćelija miometrijuma

Miometrijum uterusa predstavlja fazni glatki mišić koga karakterišu spontane i agonistom indukovane kontrakcije. Ekscitabilnost tkiva je vođena, jednim dijelom, potencijalom mirovanja. Ovaj potencijal je određen i regulisan aktivnošću nekoliko jona: Na^+ , K^+ , Cl^- , što za posljedicu ima uspješno generisanje aktivnog potencijala i Ca^{2+} , koji predstavlja vučnu silu za kontrakcije. Ulazak

kalcijuma je vođen spontanim promjenama membranskog potencijala (Wray, 1993). Premda su mnogi faktori uključeni u nastanak kontrakcije miometrijuma, primarni mehanizam koji je odgovoran za faznu aktivnost podrazumijeva onaj koji obezbeđuje spontanu depolarizaciju ćelija miometrijuma (Slika 2.6).



Slika 2.6 Model mehanizama aktivacije kontrakcija uterusa (adaptirano iz Berridge, 2008).

2.1.2.1 Potencijal mirovanja i aktivacija jonskih kanala

Potencijal membrane je kontrolisan distribucijom jona kroz membranu. Kontrakcija miocita je zavisna od ove raspodjele. Jonski gradijent u glatkoj mišićnoj ćeliji uterusa je takav da se unutrašnja koncentracija kalijuma održava visokom, a kalcijuma niskom (Kao, 1989). Ovo obezbeđuje brz odgovor na male promjene u permeabilnosti, koje nastaju kao rezultat značajne promjene kretanja jona. Potencijal mirovanja (PM) u miometrijumu je između -80 i -35 mV (Kumar i Barnes, 1961; Pressman i sar, 1988; Inoue i sar, 1990), ali u mnogome zavisi od vrste i gestacijskog statusa uterusa (Parkington i sar, 1999). Sa druge strane, kontraktilnost uterusa zavisi od membranskog potencijala (E_m) i propustljivosti kanala za određeni jon. Pri PM, koncentracije Na^+ , Ca^{2+} , kao i Cl^- su veće izvan ćelije, dok je koncentracija K^+ veća unutar ćelije (Monga i Sanborn, 1992; Sanborn, 2000). Ravnotežni potencijal (E_i) može biti izražen preko Nerstnove jednačine (Sanborn, 2000):

PREGLED LITERATURE

$$E_i = - RT/zF(\ln C_i/C_o)$$

C_i - intracelularna koncentracija jona,
 C_o - ekstracelularna koncentracija jona,
 R - gasna konstanta (8,3 J/mol x K),
 T - temperatura izražena u kelvinima ($K = - 272,15$ °C),
 F - Faradejeva konstanta (96500 C/eq)
 z - valenca.

Međutim, bolje razumijevanje E_i izraženo je Goldman-Hodgkin jednačinom, gdje su u razmatranje uzete koncentracije najvažnijih jona, kao i propostljivosti kanala za određeni jon:

$$E_i = - RT/F[\ln((P_k[K^+]_i + P_{Na}[P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_i) / (P_k[K^+]_o + P_{Na}[Na^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_o)))]$$

P_k , P_{Na} i P_{Cl^-} membranske propustljivosti za K^+ , Na^+ i Cl^-

Budući da se Cl^- pasivno distribuiraju, on se ne može uzeti u razmatranje regulacije potencijala mirovanja. Kao rezultat, gore navedena jednačina se svodi na:

$$E_i = - 2,303RT / F[\log(([K^+]_i + P_{Na}[P_k[Na^+]_i / ([K^+]_o + P_{Na}/P_k[Na^+]_o)))]$$

PM je blizak ravnotežnom potencijalu K^+ (Sanborn, 2000). Generalno, PM miometrijuma je između -40 do -50 mV (Parkington i Coleman, 1990).

2.1.3 Medijatori kontraktilne aktivnosti – jonski kanali

Ritmične kontrakcije miometrijuma podrazumijevaju promjene E_m . Različiti jonski kanali doprinose električnoj aktivnosti miometrijuma. Otvaranje i zatvaranje kanala obezbjeđuje stvaranje i održavanje razlike u koncentraciji jona. Selektivnost jonskih kanala obezbjeđena je različitim naelektrisanjem i veličinom jona, te su ovi kanali obično selektivni samo za jedan određen jon i/ili tip jona. Njihovo otvaranje zavisno je od specifičnih promjena u okruženju, kao i od promjena membranskog potencijala, odnosno voltaže, i vezivanja specifičnih agonista (Kim i sar, 2002). Glavna determinanta za promjenu transmembranske

PREGLED LITERATURE

distribucije kanala je svakako njihova ekspresija. Međutim, elektrohemijski gradijent takođe utiče na ukupnu struju datog kanala.

2.1.3.1 Kalijumovi kanali

Efluks K^+ je mehanizam kojim se uspostavlja repolarizacija, održava i/ili pojačava (hiperpolarizacija) potencijal mirovanja ćelije. Glavna funkcija kalijumovih kanala, koja se ogleda u kontrolisanju ćelijske ekscitabilnosti, postiže se održavanjem membranskog potencijala ćelije bliskom reverznom potencijalu K^+ jona (oko -84 mV). Pri ovako negativnom potencijalu, depolarizaciji se suprotstavlja izlazna K^+ struja, koja uzrokuje hiperpolarizaciju ili repolarizaciju. To dovodi do prekida ili onemogućenja nastanka akcionog potencijala i čini nastanak kontrakcije manje vjerovatnom (Khan i sar, 2001). Ovi kanali su klasifikovani na osnovu njihovih farmakoloških osobina koje su intezivno proučavane (Kuriyama i sar, 1998; Wickenden, 2002).

2.1.3.1.1 Kalcijumom aktivirani K^+ kanali

Postoje tri subklase ovih kanala: veliki BK_{Ca} (engl. *large conductance channel*), srednji IK_{Ca} (engl. *intermediate conductance channel*) i mali SK_{Ca} (engl. *small conductance channel*), kao i sprovodni kalcijumom aktivirani kalijumovi kanali (engl. *conductance calcium-activated K^+ channels*).

BK_{Ca} kanali su eksprimirani u netrudnom pacovskom uterusu (Song i sar, 1999), netrudnom (Tritthart i sar, 1991), kao i trudnom humanom miometriju (Khan i sar, 1993). Aktivacija malog broja BK_{Ca} kanala je povezana sa relaksacijom uterusa (Korovkina i sar, 2001). Inhibicija BK_{Ca} kanala sa tetraetilamonijumom, jonima barijuma ili 4-aminopiridinom, dovodi do povećanja frekvencije kontrakcija, što je vjerovatna posljedica smanjenja izlazne kalijumove struje. Međutim, inhibicija BK_{Ca} kanala nije pokazala efekat na kontraktilnost trudnog i netrudnog miometrijuma pacova (Aaronson i sar, 2006). Alternativno splajsovanje, kao i posttranslacine modifikacije, razmatraju se kao uzroci funkcionalno različitih varijanti receptora koji dalje, na drugačiji način, moduliraju kalcijumsku i voltažnu senzitivnost (Korovkina i sar, 2001), hormonalnu senzitivnost (Holdiman i sar,

PREGLED LITERATURE

2002), kao i fosforilaciju receptora, odnosno njegov unutarćelijski transport (Perez i Toro, 1994; Brainard i sar, 2007).

IK_{Ca} kanali imaju sličnu strukturu koja se sastoji iz centralne pore, regiona osjetljivog na kalcijum, kao i šest transmembranskih regiona (Tharp i Bowles, 2009). Za razliku od BK_{Ca} kanala, oni ne posjeduju voltažno-senzitivni region, što ih čini neosjetljivim na promjene voltaže membrane. Ovi kanali su važni u održavanju negativnog potencijala mirovanja u cilju akumulacije električnog gradijenta za jonski transport (Jensen i sar, 2001; Begenisich i sar, 2004).

SK_{Ca} kanali su kodirani od strane četiri gena – SK1, SK2, SK3 i IK1/SK4. Struktura SK kanala je slična voltažno-zavisnim (Kv) kalijumovim kanalima. Sastoje se iz šest transmembranskih segmenata (S1-S6) i selektivnog regiona – pore (Stocker, 2004). Oni nemaju kalcijum-vezujući motiv, koji omogućava direktnu interakciju sa kalcijumom, međutim njihov proksimalni C-terminus interaguje sa kalmodulinom (Maylie i sar, 2004). Pokazano je da ekspresija SK2 može da utiče na koordinaciju kontrakcija uterusa ograničavanjem ulaska kalcijuma kroz L-tip kalcijumskih kanala (Brown i sar, 2007). Funkcionalne studije na miometriju pacova pokazale su da je inhibicija ovih kanala veća nego inhibicija BK_{Ca} kanala, sugerišući da SK_{Ca} kanali mogu imati značajniju ulogu u održavanju mirovanja uterusa u odnosu na BK_{Ca} kanale.

2.1.3.1.2 *Voltažno-zavisni K⁺ kanali*

Ovi kanali su u velikom broju eksprimirani u uterusu i aktiviraju se depolarizacijom (Brainard i sar, 2007). Voltažno-zavisni kalijumovi kanali (Kv; engl. *voltage-gated potassium channels*) su označeni kao važni u održavanju mirovanja uterusa, kao i inicijaciji kontrakcija (Knock i sar, 1999). Pokazana je i njihova uloga u održanju PM (Brainard i sar, 2007). Postoje četiri glavne subklase Kv kanala – Kv1 (engl. *Shaker*), Kv2 (engl. *Shab*), Kv3 (engl. *Shaw*), Kv4 (engl. *Shal*) (Xu i Yu, 1995). Aktivnost kanala iz subfamilija Kv4 se smatra najvažnijom za funkcionisanje miometrijuma tokom trudnoće (Knock i sar, 1999). Hormoni utiču na aktivnost ovih kanala. Estrogen redukuje ekspresiju Kv4.3 omogućavajući povećanje kontraktilnosti miometrijuma (Song i sar, 2001).

PREGLED LITERATURE

2.1.3.1.3 K_{ATP} kanali

Najrasprostranjenija grupa kanala među kalijumovim kanalima su ATP-zavisni kalijumovi kanali (K_{ATP} ; engl. ATP-sensitive potassium channel), koji ujedno najviše doprinose PM glatkih mišićnih ćelija (Teramoto, 2006). Ovaj kanal je heteromultimer i sačinjen je od: ulazno-ispravljačkog K^+ kanala – Kir (engl. *inwardly rectifying K^+ channel*), kao i modulatorne sulfonilurea receptorske subjedinice - SUR (engl. *sulphonylurea receptor subunit*), koja je odgovorna za osjetljivost na ATP, kao i farmakoloških karakteristika kanala (Inagaki i sar, 1995; Isomoto i sar, 1997; Aguilar-Bryan i sar, 1998). Funkcionalna uloga K_{ATP} kanala je utvrđena korišćenjem različitih agonista i antagonista. Otvarači ovih kanala – levkromakalim, diazooksid i pinacidil inhibiraju spontane i oksitocin-stimulisane kontrakcije humanog izolovanog miometrijuma (Morrison i sar, 1993). S druge strane, blokator K_{ATP} kanala glibenklamid indukuje spontane kontrakcije uterusa (Bailie i sar, 2002). Rezultati funkcionalnih studija pokazale su razlike između trudnog i netrudnog miometrijuma sugerišući povećanu ekspresiju ovih kanala kod netrudnog uterusa (Bailie i sar, 2002; Longo i sar, 2003). Kalijumovi kanali se aktiviraju endogenim supstancama. Nekoliko endogenih „otvarača“ je do sada pronađeno: agonisti β -adrenergičkih receptora, relaksin, kao i drugi relaksanti uterusa koji dovode do povećanja unutarćelijskog cAMP. cGMP, kao i cGMP-generišući agensi poput azot monoksida (\bullet NO) dovode do relaksacije. Kritični sulfhidrilni ostaci su glavna regulatorna mjesta koja posreduju u modulaciji reaktivnim vrstama kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS), kao i \bullet NO (Gaston, 1999; Fernhoff i sar, 2009).

2.1.3.2 *Voltažno-zavisni kalcijumski kanali*

VOCC (engl. *voltage-operated calcium channels*) su podijeljeni u tri grupe: Cav1 (L-tip), Cav2 (P-tip, N-tip i R-tip) i Cav3 (T-tip) (Lipscombe i sar, 2004). Dva subtipa ovih kanala su eksprimirana u miometrijumu - L-tip, i T-tip Ca^{2+} kanala (Young i sar, 1993; Sanborn, 2000; Wray, 2007; Lee i sar, 2009). T-tip kalcijumskih kanala obuhvata tri tipa α subjedinica - Cav3.1, Cav3.2 i Cav3.3 (Blanks i sar, 2007). T-tip kalcijumske struje su detektovane u humanom miometrijumu (Young i sar,

PREGLED LITERATURE

1993; Young i Zhang, 2005; Young, 2007). Ove struje su niske voltaže i pokazano je da učestvuju u inicijaciji akcionih potencijala glatkih mišićnih ćelija uterusa (Young i Zhang, 2005), kao i u generisanju i moduliranju frekvencije spontanih Ca^{2+} oscilacija (Lee i sar, 2009).

2.1.3.2.1 *L-tip kalcijumskih kanala*

Glavni VOCC u uterusu su L-tip kalcijumski kanali koji su krucijalni za ekscitaciono-kontrahujuće sprezanje (Lipscombe i sar, 2004). L-tip kalcijumskih kanala produkuje dugotrajnu struju, koja primarno teče kroz Cav1.2 kalcijumske kanale i predstavlja većinu struja mjerenih u miometriju (Blanks i sar, 2007; Shmygol i sar, 2007). Ulazak kalcijuma kroz L-tip VOCC oslanja se na membransku depolarizaciju, koja predstavlja ključni korak za kontrakciju glatkog mišića. Ovi kanali imaju kompleksnu strukturu koja se sastoji od četiri subjedinice. Jedna α_1 subjedinica obrazuje poru kanala, ostale tri β , γ i $\alpha_2\delta$ su regulatorne (Collins i sar, 2000). Subjedinica α_1 je od ključnog značaja za aktivnost ovog kanala, budući da obrazuje poru kanala koja nosi karakteristične farmakološke i funkcionalne osobine ovog kanala vezane za voltažnu-osjetljivost, propustljivost jona i vezivanje drugih jedinjenja, dok su druge subjedinice označene kao pomoćne. Adekvatno funkcionisanje ovog receptora zahtijeva prisustvo svih subjedinica kao i koekspresiju različitih β izoformi koje sa istom α subjedinicom mogu „pomijerati“ kanal u različite membrane ćelijskih kompartmana. Ekstracelularni α_2 domen obezbjeđuje strukturnu potporu neophodnu za stimulaciju kanala i vezan je za membranu preko δ subjedinice koja premošćuje membranu. Subjedinica δ utiče na voltažno-zavisnu aktivaciju i *steady-state* inaktivaciju, a takođe modulira i samu kinetiku inaktivacije.

2.1.3.3 *Hloridni kanali*

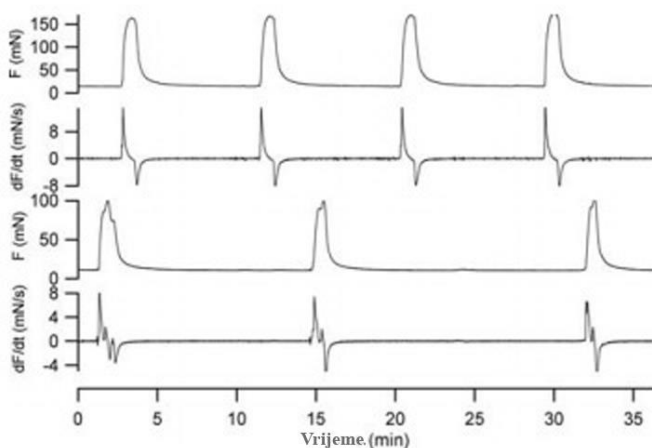
Hloridni kanali su od fundamentalnog značaja za brojne fiziološke procese: neurotransmisiju (GABA i receptri za glicin), kontrakciju skeletnih mišića (CLC), kao i sekreciju elektrolita (CFTR).

2.1.3.3.1 Hloridni kanali u miometriju

Detaljne studije trudnog humanog miometrija na kraju trudnoće pokazala su dva tipa akcionog potencijala: nalik platou i šiljak. Akcioni potencijal nalik platou karakteriše se brzom uzlaznom strujom (-30 i -20 mV) koja traje obično oko 1 minut. U slučaju šiljka, obično se individualni šiljci grupišu tako da se konačno zbrajaju. Oba tipa akcionog potencijala dovode do povećanja unutarćelijskog kalcijuma i pokreću kontrakciju koja traje koliko traje i akcioni potencijal, a relaksacija nastaje nakon repolarizacije. Međutim postoje razlike u obliku Ca^{2+} struja i kontrakcija koje su inicirane ovim potencijalima. Akcioni potencijal nalik platou inicira kontrakciju koja doseže pik brzo nakon što akcioni potencijal dostigne svoj maksimum, a potom sporo pada. Nakon repolarizacije pad se ubrzava, mišić se relaksira do nivoa bazne linije. Suprotno ovome, akcioni potencijali nalik šiljku iniciraju „iskrzane“ kontrakcije koje nastavljaju da rastu tokom trajanja potencijala, a relaksiraju se nakon prestanka šiljaka (**Slika 2.7**). Interesantno, preparati miometrija koji pokazuju akcione potencijale nalik šiljku mogu se transformisati u plato-tip pod dejstvom uterotonika, implicirajući da su mehanizmi uključeni u generisanje plato-tipa prisutni kod oba tipa potencijala, s tim što kod šiljka zahtijevaju aktivaciju agonistom. Pokazano je da dva preparata iste biopsije humanog miometrija produkuju dva tipa kontrakcija – glatku monofaznu (iniciranu plato-akcionim potencijalom) i „iskrzanu“ (iniciranu šiljak-akcionim potencijalom). Navedene razlike ne mogu biti posljedica mehaničkog oštećenja, budući da su obje kontrakcije ostale stabilne tokom nekoliko sati ([Shmygol i sar, 2007](#)). Ovi podaci pokazuju da su dva tipa kontrakcija posljedica nehomogenosti u ekscitujuće-sprezajućem sistemu miometrija. Ovo takođe upućuje na različitu dinamiku molekulskih mehanizama kojiposreduju u iniciranju kontrakcija (npr. *cross-bridge* ciklusi). Egzaktan mehanizam koji određuje električnu aktivnost ovih kontrakcija još uvijek nije poznat ([Shmygol i sar, 2007](#)). Voltažni nivo plato faze je sličan reverznom potencijalu za Cl^- što upućuje na učešće hloridnih kanala. Zaista su struje kalcijum aktiviranih hloridnih kanala snimljene u miometriju pacova kao odgovor na oksitocin ([Arnaudeau i sar, 1994](#); [Jones i sar, 2004](#)). Interesantno je i to da iako su ovi kanali zastupljeni

PREGLED LITERATURE

svega sa 30% u odnosu na ostale jonske kanale u ćelijama miometrijuma, njihova inhibicija dovodi do značajnog smanjenja frekvence spontanijh kontrakcija, ukazujući na njihovu funkcionalnu važnost (Jones i sar, 2004). *Patch clamp* studije pokazale su prisustvo subpopulacije ovih kanala u humanim ćelijama miometrijuma (Shmygol i sar, 2007).



Slika 2.7 Dva tipa kontrakcija diseciranih iz istog humanog miometrijuma.

Glatke monofazne kontrakcije inicirane akcionim potencijalima nalik platou (gornja dva zapisa). „Iskrzane“ višekomponentne kontrakcije inicirane akcionim potencijalima nalik šiljku (Preuzeto iz Shmygol i sar, 2007).

2.1.3.3.2 Kalcijumom-aktivirani hloridni kanali

Nedavno je pokazano da hloridni kanali mogu biti regulisani sa Ca^{2+} i ćelijskim volumenom (Kunzelmann, 2015). Hloridni kanali osjetljivi na kalcijum – CaCC (engl. *calcium activated chloride channels*) u vaskularnim i nevaskularnim glatkim mišićima predstavljaju važnu komponentu ritmičke električne aktivnosti (Janssen i Sims 1992; 1995; Hartzell i sar, 2005) i ekscitujuće-kontrahujućeg sprežanja (Criddle i sar, 1996; Large i Wang, 1996). Oni su važni za produkciju spontane fazne aktivnosti uterusa, budući da njihova inhibicija vodi smanjenju frekvencije i kontraktilnosti (Jones i sar, 2004; Young i Bemis, 2009). Njihova uloga je važna i kod efekata agonista, budući da oksitocin povećava struje Cl^- kroz ove kanala i dovodi do povećanja kontraktilnosti (Arnaudeau i sar, 1994; Jones i sar, 2004). U miometrijumu glavna anjonska provodljivost se ostvaruje aktivnošću ovih kanala (Song i sar, 2009; Bernstein i sar, 2014). Smatra se da mogu biti odgovorni za primarnu struju koja obezbjeđuje prolongiranu depolarizaciju miometrijuma i favorizuje transmembranski transport kalcijuma kroz L-tip kalcijumskim kanala. Međutim, molekularni identitet ovih kanala nije potpuno istražen. Nekoliko

PREGLED LITERATURE

kandidata je predloženo uključujući bestrofine (BEST, engl. *bestrophin*, Leblanc i sar, 2005; Greenwood, 2008), anoktamin (ANO, engl. *anoctamin*), ili TMEM (engl. *transmembrane member*, Caputo i sar, 2008; Scudieri i sar, 2012; Pedemonte i Galiotta, 2014). TMEM16A je široko eksprimiran CaCC, dok je ekspresija bestrofina ograničena. Uloga ovih kanala povezana je sa regulacijom fototransdukcije, olfaktorne transdukcije, ekstimbalnošću neuronalnih i srčanih ćelija, kontrakcijom glatkih mišića i epitelijalnom sekrecijom Cl⁻ jona. Oni takođe kontrolišu volumen ćelije, proliferaciju kao i nivo intraćelijskog kalcijuma (Kunzelmann, 2015).

2.1.3.3.3 Bestrofini

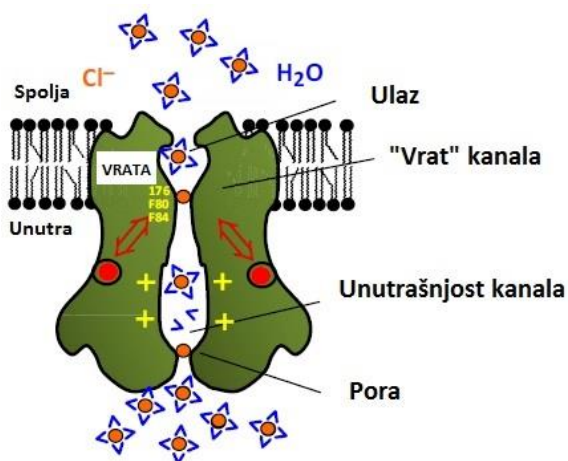
Familiju bestrofina čini grupa integralnih proteina koji potiču od četiri gena paraloga. Bestrofini su u savremenoj literaturi identifikovani kao anjonski kanali (Adorante, 1995) koji mogu regulisati voltažno-zavisne Ca²⁺ kanale. Bestrofin-1 (BEST-1) je visoko eksprimiran u epitelu humanog retinalnog pigmenta gdje je lokalizovan na bazolateralnoj membrani (Marmorstein i sar, 2006). Mutacije BEST-1 dovode do karakterističnih retinopatija poznatih kao BEST-bolest (engl. *Best disease*). Bestrofini su identifikovani kao CaCC, a ova njihova osobina pomaže u objašnjenju karakteristika spomenute bolesti.

Prvi jasan dokaz da su bestrofini hloridni kanali obezbijeđen je zahvaljujući radu Sun i saradnika (2002), koji su pokazali da ekspresija hBEST-1 u HEK ćelijama indukuje Cl⁻ struje. Mutacije pojedinačnih amino-kiselina dovele su do promjena u propustljivosti i provodljivosti, a sulfhidrilni reagensi su izmijenili svojstva cistein-substituisanog kanala na karakterističan način, sugerišući da su bestrofini dio provodnog puta za određeni jon (Hartzell i sar, 2008 i tamo citirane reference). Regulatorni efekti hBEST-1 na L-tip Ca²⁺ kanala podrazumijevaju modulaciju kinetike aktivacije i voltažno-zavisne aktivacije (Rosenthal i sar, 2006).

BEST-1 i TMEM16A se aktiviraju sa intraćelijskim Ca²⁺, međutim njihove farmakološke osobine se razlikuju (Milenkovic i sar, 2015). Nedavno je predložena uloga bestrofina u neurotransmisiji (Kunzelmann, 2015), a posebno je istaknut za sada nerazjašnjen mehanizam prolaska neurotransmitera, budući da isti moraju proći kroz uski hidrofobni vrat BEST-1 (ovaj osvrt je dat na osnovu sada dostupne

PREGLED LITERATURE

X-ray strukture). Za sada su dostupne dvije strukture bestrofina: kokošiji kao i bakterijski homolog KpBEST-1. Kokošiji BEST-1 identifikovan je kao Cl⁻ kanal a KpBEST-1 kao katjonski kanal (Kunzelman, 2015). Kokošiji BEST-1 je pentamerni kanal sa neobično dugačkom porom od 95 Å (Dickson i sar, 2014) (Slika 2.8). Aktivnost kanala je regulisana vezivanjem jona kalcijuma, a anjonska selektivnost je kontrolisana ostacima I76, F80 i F84, premda ovo još uvijek nije jednoznačno utvrđeno. Dosadašnji podaci ukazuju da vrat kanala učestvuje u aktivnosti kanala kao i kontroli jonske selektivnosti. Unutrašnjost kanala (pozitino naelektrisana) može služiti kao selektivni filter (Kunzelmann, 2015).



Slika 2.8 Struktura bestrofina – poru kanala čine dvije identične subjedinice (adaptirano iz Kunzelmann, 2015).

Za bestrofine je pokazano i da mogu biti regulatori Ca²⁺ kanala ili drugih transportera koji su uključeni u signalizaciju Ca²⁺. Oni su detektovani u endoplazminom retikulumu gdje pomažu aktivaciji TMEM16A i SK4 kanala. Takođe BEST-1 može imati ulogu u unutarćelijskoj kompartmentalizaciji ili pomjeranju organela (Kunzelmann, 2015).

2.1.4 Ekscitujuće–kontrahujuće sprezanje

Uterus je miogeni organ čije kontrakcije mogu biti incirane samo aktivnošću miocita, bez spoljašnjih stimulusa, poput nervne ili hormonske aktivacije. Ekscitujuće-kontrahujuće kuplovanje može nastati na dva načina:

PREGLED LITERATURE

elektromehaničkim i farmakološkim sprežanjem. Kontrakcije nastaju kao rezultat povećanja nivoa unutarćelijskog kalcijuma, koje se ostvaruje otvaranjem voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala L-tipa. Agonisti mogu da izazovu kontrakciju nezavisno od promjena membranskog potencijala, različitim mehanizmima kod kojih se ulazak kalcijuma ostvaruje preko: aktivacije unutrašnjih skladišta (engl. *store operated Ca^{2+} entry*), odnosno receptor-posredovanom aktivacijom određenih kanala (engl. *receptor operated Ca^{2+} entry*) (Arnaudeau i sar, 1994; Miyoshi i sar, 2004). Na osnovu ovih razlika, aktivacija uterusu membranskom depolarizacijom i aktivacijom receptora se i terminološki razlikuje i označava kao elektromehaničko, odnosno farmakomehničko sprežanje (kuplovanje) (Wray, 1993).

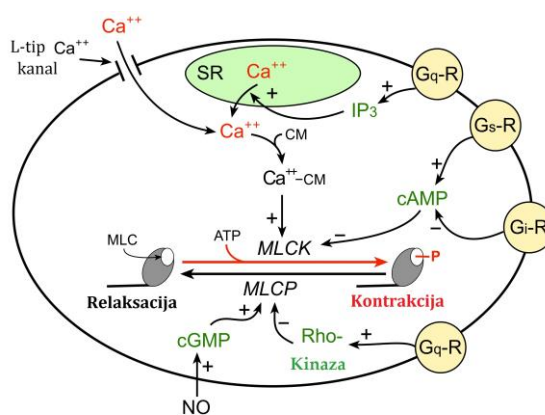
2.1.5 Kontrakcija miometrijuma - regulacija unutarćelijskog kalcijuma $[Ca^{2+}]_i$

Jon kalcijuma je fundamentalni sekundrani glasnik u svim eukariotskim ćelijama. Slobodni joni kalcijuma u ćeliji doprinose kontrahovanju glatkog mišića na nekoliko nivoa i putem više mehanizama. Kofaktor je aktin-miozinske interakcije, a direktno modulira i ekscitabilne osobine plazmine membrane. Ove dvije važne funkcije su klasično razmatrane kao visoko spregnute, budući da ih unutarćelijski kalcijum modulira veoma brzo. Pokazano je pak da je njihova funkcionalnost nezavisna, na osnovu dokaza o fiziološkom gradijentu kalcijuma između duboko citoplazmatskog Ca^{2+}_c i subplazmalealnog prostora Ca^{2+}_{spp} . Subplazmalealni prostor predstavlja prostor između unutrašnje površine plazmine membrane i spoljašnje površine sarkoplazminog retikuluma. Na osnovu ovih definicija, Ca^{2+}_c modulira aktin-miozin interakcije, a Ca^{2+}_{spp} ekscitabilna svojstva plazma mebrane (Young i Zhang, 2004).

Kalcijum se vezuje za kalmodulin, koji nakon vezivanja četiri jona kalcijuma disocira od unutrašnje strane plazmine membrane u vidu kalmodulin-kalcijumskog kompleksa. Ovo vodi aktivaciji kinaze lakog lanca miozina (MLCK, engl. *myosin light chain kinase*), koja fosforiluje serin 19 na miozinu lakog lanca. Laki lanac miozina su regulatorne subjediniice (20 kDa) koje se nalaze na miozinskim glavama. U ovom obliku, miozin lakog lanca je sposoban za vezivanje

PREGLED LITERATURE

sa aktinom i izazivanje kontrakcije (Webb, 2003; Wray, 2007; Aguilar i Mitchell 2010). Posledično, pad u koncentraciji Ca^{2+} , kroz njegovo preuzimanje u unutarćelijska skladišta (kalcijum se sekvstrira unutar sarkoplazminog retikuluma) ili izbacivanje pomoću mehanizama u plazminoj membrani, rezultira defosforilacijom miozina aktivnošću fosfataze miozina lakog lanca (MLCP, engl. *myosin light chain phosphatase*, deaktivaciji kinaze i disocijaciji kalcijum-kalmodulin kompleksa, što sve konačno vodi ka relaksaciji miometrijuma (Allen i Walsh, 1994; Webb, 2003) (Slika 2.9).



Slika 2.9 Mehanizmi regulacije kontraktibilnosti uterusa

– direktna aktivacija MLCK preko Ca^{2+} -kalmodulin kompleksa, inhibicija MLCK povećanom koncentracijom cAMP, aktivacija MLCP povećanom koncentracijom cGMP (adattirano iz: <http://www.cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP026%20VSM%20contraction.png>).

Nivo kalcijuma se dovodi na nivo mirovanja zahvaljujući aktivnosti membranske Ca^{2+} ATPaze, Na^{+} - Ca^{2+} -jonoizmjenjivača i SR Ca^{2+} ATPaze (Matthew i sar, 2004). Veza između kalcijuma i generisane sile kontrakcije je u osnovi sigmoidalnog karaktera, koji se može mijenjati procesom poznatim kao Ca^{2+} -senzitivizacija. Jedan od targeta Ca^{2+} -senzitivizacije je i MLCP, koji je kao fosforilisan manje aktivan, što za posljedicu ima više fosforilisanog MLC, a time i intenziviranje kontrakcija.

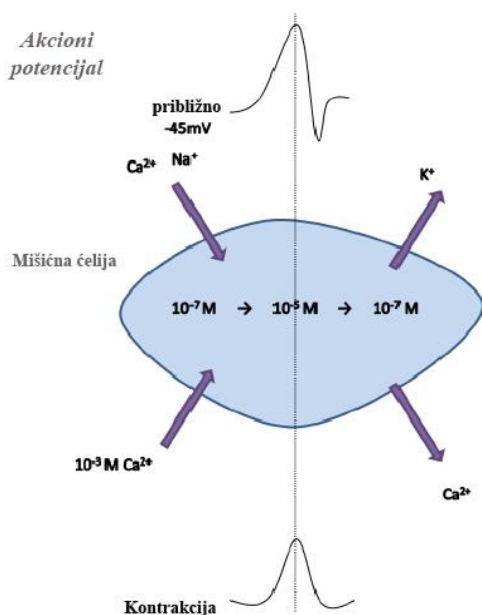
2.1.5.1 Elektromehaničko sprežanje

Veza između akcionog potencijala, odnosno posljedične depolarizacije, je od ključnog značaja za kontrakciju uterusa. Elektromehaničko sprežanje predstavlja

vezu između membranskog potencijala i indukcije mehaničke sile, odnosno akcionog potencijala i produkovane sile (Somlyo i Somlyo, 1994).

2.1.5.1.1 Akcioni potencijal

U glatkim mišićima postoje dvije vrste akcionih potencijala nalik šiljku i nalik platou. Miometrijum pacova, za razliku od ostalih glatkih mišića, karakteriše se samo akcionim potencijalima nalik šiljku (Mironneau, 1973; Kuriyama i Suzuki, 1976; Parkington i Coleman, 1988). Porast membranskog potencijala do nivoa praga dovodi do brze depolarizacije, koju prati ulazak Ca^{2+} , kao i Na^+ . Voltažno-zavisni kalcijumski kanali se otvaraju pri pragu aktivacije od -60 do -30 mV, dok se maksimalna provodna struja pojavljuje u opsegu od -30 do +10 mV (Jmari i sar, 1986; Amedee i sar, 1987; Perez-Reyes, 2003). Otvaranje ovih kanala, prati ulazak kalcijuma, kao i povećanje propustljivosti za Na^+ . Ovi događaji predstavljaju glavnu komponentu uzlaznog dijela akcionog potencijala, koji dalje potencira depolarizaciju membrane i povećava „otvoreno“ stanje ovih kanala (Wray, 1993; Shmygol i sar, 1998; Wray i sar, 2003). L-tip Ca^{2+} kanali su voltažno-zavisni i depolarizacijom bivaju inaktivirani (Honore, 1989; Sperelakis, 1992) za razliku od



voltažno i Ca^{2+} -zavisnih K^+ kanala koji su aktivirani pri datim uslovima, što uzrokuje pad akcionog potencijala i repolarizaciju ćelijske membrane (Wray, 1993; Wray i sar, 2003) (Slika 2.10).

Slika 2.10 Membranski potencijal, akcioni potencijal i kontrakcija uterusa.

Povećanje koncentracije unutarćelijskog kalcijuma (sa 10^{-7} do 10^{-5} M) inicira pomjeranje jona niz gradijent koncentracije. Kontraktiji uterusa prethodi globalno povećanje unutarćelijskog Ca^{2+} (adaptirano iz Robinson, 2012).

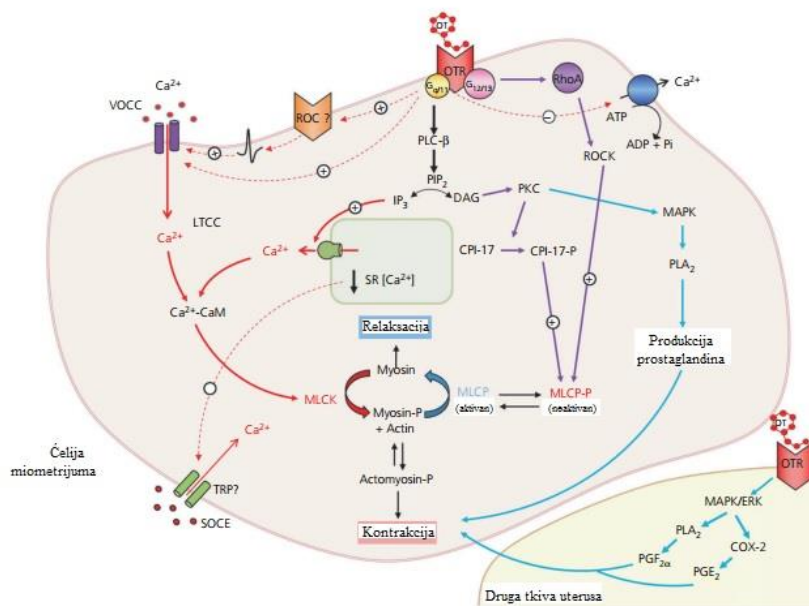
2.1.5.2 **Farmakološko-mehaničko sprezanje**

Farmakološko-mehaničko sprezanje predstavlja način proizvodnje sile, koje je nezavisno od promjena membranskog potencijala, a indukovano je endogenim, odnosno egzogenim agonistima. Kontrakcije nastaju kao rezultat oslobađanja kalcijuma iz unutrašnjih depoa, kroz ulazak kalcijuma kroz receptor regulisane kanale, ili pak mjenjanjem osetljivosti kontraktilnih proteina za kalcijum. U ovom slučaju, generisana sila ne zavisi od promjena membranskog potencijala, premda promjene mogu biti prisutne, budući da ovi mehanizmi mogu imati nishodne efekte koji utiču na membranski potencijal i zavisne procese.

2.1.5.2.1 *Agonist indukovane kontrakcije*

U slučaju miometrija, receptori spregnuti sa G proteinima (GPCR, engl. *G-protein coupled receptors*) se aktiviraju ligandom (okситocin, prostaglandin) tako što vezivanje liganda izaziva konformacionu promjenu receptora, koja dovodi do aktivacije G proteina, koji dalje aktiviraju sistem sekundarnih glasnika ili direktno jonske kanale. Aktivacija α -adrenenrgičkih receptora promovise kontrakcije uterusa dok stimualcija β_2 -adrenergičkih receptora dovodi do relaksacije. Stimulacija kontrakcija je u ovom slučaju izazvana aktivacijom G_{α_q} , a relaksacija aktivacijom G_{α_s} . Promjene u membranskom potencijalu izazvane agonistom mogu da utiču na frekvenciju potencijala, a posledično i na karakteristike proizvodjene sile. Ovo je omogućeno time što agonisti (poput oksitocina) moduliraju kanale koji su važni za regulaciju kontraktilnosti (BK_{Ca} i CaCCs). Efekti agonista su često posredovani višestrukim mehanizmima. Oksitocin, vezivanjem za svoj receptor, dovodi do povećanja unutarćelijskog kalcijuma (**Slika 2.11**). Njegova funkcija ostvaruje se na više načina i uključuje više mehanizama: inhibiciju izbacivanja kalcijuma van ćelije, supresiju Ca^{2+} -ATPaze, otvaranje L-tipa kalcijumskih kanala, Ca^{2+} -senzitivaciju (Shmygol i sar, 2006), aktivaciju fosfolipaze C, čija aktivacija dovodi do oslobađanja inozitol-1,4,5-trifosfata (IP_3 ; engl. *inositol 1,4,5 triphosphate*), koji vezivanjem za receptor na sarkoplazminom retikulumu (SR) dovodi do oslobađanja kalcijuma iz unutarćelijskih skladišta (Reimer i Roberts, 1986; Kao, 1989). Inhibicija ulaska kalcijuma ukazuje na limitiranu ulogu SR,

budući da ne izaziva promjene u odgovoru oksitocina na kontrakcije miometrijuma (Kupittayanant i sar, 2002). Ovo upućuje na ulogu ROCC (engl. *receptor operated calcium channels*) preko efekata na L-tip kalcijumskih kanala.



Slika 2.11 Oksitocinom indukovana kontrakcija uterusa - signalizacijski put oksitocina u miometrijumu uterusa

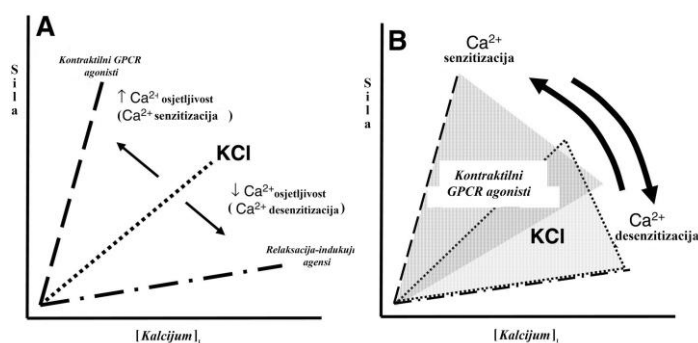
Vezivanje oksitocina aktivira Gq/11, što vodi aktivaciji fosfolipaze C- β i posleđnoj produkciji inozitol trifosfata (IP₃) i diacilglicerola (DAG). IP₃ dovodi do oslobađanja Ca²⁺ iz sarkoplazminog retikuluma, a DAG aktivira protein kinazu C (PKC). Smanjenje lumenskog sarkoplazminog kalcijuma vodi ka aktivaciji SOCE (engl. *store-operated Ca²⁺ entry*). Povećanje Ca²⁺ konačno vodi ka formiranju Ca²⁺-kalmodulin kompleksa i aktivaciji MLCK. Dodatno DAG posredovana aktivacija PKC vodi aktivaciji mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK) što rezultuje u povećanoj aktivnosti fosfolipaze A (PLA₂) i produkciji prostaglandina E₂ (PGE₂) koji takođe favorizuju kontrakcije. DAG takođe reguliše preko PKC nivo fosforilacije protein-fosfataznog inhibitora 17 (CPI-17) a samo vezivanje oksitocina aktivira RhoA-aciciranu protein kinazu (ROCK). CPI-17 kao i ROCK inhibiraju fosfatazu lakog lanca miozina (MLCP), što povećava nivo fosforilacije MLC (Ca²⁺ - senzitivizacija u miometrijumu). Oksitocin može da aktivira i druge puteve u okolnim ćelijama što posledično kroz parakrini signalni put može uticati na samu ćeliju miocita. COX-2 - ciklooksigenaza-2; ROC - receptor aktivirani kanal; VOCC - voltažno zavisni Ca²⁺ kanal; LTCC - L-tip Ca²⁺ kanal; TRP (engl. *transient receptor potential channel*); Ca²⁺-CaM, Ca²⁺-kalmodulin kompleks; ERK, ekstraćelijski signal regulisana protein kinaza; SOCE - skladištem indukovani Ca²⁺ ulazak. Crvenim su označeni putevi koji direktno utiču na nivo unutarćelijskog Ca²⁺ (adaptirano iz Arrowsmith i Wray, 2014).

2.1.5.3 Kontrakcije indukovane kalijum-hloridom

Aktivacija mišića se postiže remećenjem K⁺ ravnoteže i dovođenjem membranskog potencijala do nižih vrijednosti od nivoa mirovanja. Inicijacija kontrakcija se postiže nezavisno od GPCR stimulacije. Povećanje unutarćelijskog kalcijuma, koje aktivira Ca²⁺-kalmodulin-zavisnu protein kinazu II, može dovesti do fosforilacije MLC kinaze, smanjenja afinitet MLC kinaze za Ca²⁺-kalmodulin

PREGLED LITERATURE

kompleks, ili potpuno spriječiti porast MLC fosforilacije kod određenih glatkih mičića. Stoga dio KCl efekata mogu biti vezani za Ca^{2+} desenzitizaciju, kao i Ca^{2+} senzitivizaciju kroz moduliranje MLC kinazne aktivnosti, što dokazuje da KCl aktivacija nije posredovana samo jednostavnom aktivacijom voltažno-zavisnih kanala (Ratz i sar, 2005). Rana faza kontrakcija indukovanih sa KCl nastaje zahvaljujući oslobođenom kalcijumu iz unutarćelijskih skladišta osjetljivih na rianodin i kofein (Kobayashi i sar, 1986). Stoga, stepen kalcijumske senzitivnosti nastao bilo GPCR-aktivacijom ili KCl-stimulacijom, nije fiksna, već zavisi od koncentracije stimulusa, kao i od istorije prethodne receptorske aktivacije (Slika 2.12).



Slika 2.12 CGRP i KCl aktivacija – stepen Ca^{2+} senzitivizacije i desenzitivizacije (adaptirano iz Ratz i sar, 2005).

2.1.5.4 Modulacija senzitivnosti kontraktilnog aparata

Koncentracija unutarćelijskog kalcijuma ne odgovara nivou fosforilisane MLC i/ili stepenom kontraktilne aktivnosti. U nekim slučajevima, poput stimulacije egzogenim agonistom oksitocinom, porast unutarćelijskog kalcijuma dovodi do neočekivano veće kontrakcije. Ovaj fenomen je poznat kao Ca^{2+} -senzitivizacija (Wray, 1993; Somlyo i Somlyo, 1998). Takođe, ovi agonisti su se pokazali efikasnijim u izazivanju većih kontrakcija u pogledu amplitude, u poređenju sa depolarišućim stimulusima poput K^+ rastvora visoke koncentracije (Bradley i Morgan, 1987; Somlyo i Somlyo, 1994). Sa biohemijškog stanovišta, nivo fosforilovane MLC odražava enzimatsku ravnotežu između aktivnosti kinaze i fosfataze. Stoga, bilo aktivacija kinaze ili inhibicija fosfataze može proizvoditi odgovarajuću silu. Inhibicija fosfataze ne predstavlja glavni mehanizam za

PREGLED LITERATURE

kontrolisanje Ca^{2+} -senzitivizacije (Kitazawa i sar, 1989; Noda i sar, 1995). GPCR agonisti produkuju veću silu nego KCl. Kontrakcije indukovane KCl nastaju kao posljedica depolarizacije membrane, koja uzrokuje otvaranje voltažno zavisnih kanala i ulazak kalcijuma, aktivaciju Ca^{2+} -zavisne MLC kinaze i povećanje MLC fosforilacije (Driska i sar, 1981). S druge strane, GPCR indukovane kontrakcije su uzrokovane aktivacijom trimernih G proteina, čija aktivacija uzrokuje nastajanje brojnih ćelijskih glasnika, uključujući IP_3 , diacilglicerol, GTPaze, RhoA, aktivaciju brojnih Ca^{2+} -kanala, kao i kinaza RhoA kinaze i protein kinaze C (Somlyo i Somlyo, 2000; 2003). Dok je većina proteina odgovorna za generisanje sile smještena u ćelijsku unutrašnjost, većina signala koji se generišu nakon GPCR stimulacije, poput spomenutih kinaza, regulisane su na nivou plazminea membrane. Nekoliko studija potvrdilo je da GPCR stimulacija povećava translokaciju neaktivne citosolne RhoA (vezane za RhoA-GDI) ka perifernoj plazminoj membrani – na mjestu gdje su kaveole, gdje RhoA-GTP aktivira RhoA kinazu (Fujihara i sar, 1997; Taggart, 2001), što potvrđuje hipotezu o ulozi kaveola u regulaciji kalcijumske senzitivizacije. Takođe, eksperimentalni podaci kojim se potvrđuje važnost kaveola u regulaciji gore-pomenutog fenomena, pokazali su da remećenje kaveolarne strukture agensima koji dovode do uklanjanja holesterola, poput metil- β -ciklodekstrina, smanjuju sposobnost GPCR stimulusa, ali ne i KCl da produkuju kontrakciju (Driska i sar, 1981; Drab i sar, 2001; Dreja i sar, 2002).

2.2 Reaktivne vrste – redoks-regulacija *versus* (oksidativni) stres

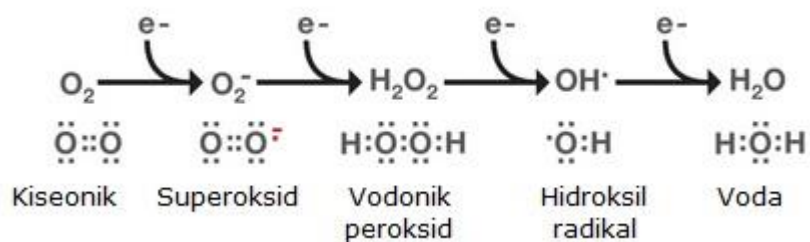
Redoks biologija je nerazdvojiva od aerobnog života (Halliwell, 2006). Visoka reaktivnost kiseonika, koja bi mogla biti prepreka za život, je zapravo iskorišćena u živom za generisanje energije iz skladišta hemijske energije. Mitohondrije su organele u kojima se odvojeno i kontrolisano odvija oksidacija metaboličkih goriva do ugljendioksida i vode, kuplovana sa sintezom ATP, ćelijskom respiracijom - esencijalnom oksido-redukcijom reakcijom u živom. Generalno, redoks-reakcije su strogo regulisane i događaju se u više koraka, u kojima se elektroni (otpušteni oksidacijom različitih molekula goriva – glukoze,

PREGLED LITERATURE

masnih kiselina itd.) čuvaju u nosačima, tzv. redukujućim ekvivalentima koji postoje zajedno sa svojom oksidovanom formom u obliku redoks-parova - NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, $\text{FAD}^+/\text{FADH}_2$ i GSH/GSSG . Kiseonik je molekul bez koga život viših eukariota ne bi bio moguć, ali je isto vrijeme i toksičan. Ovo je poznato kao paradoks aerobnog života tj. „kiseonični paradoks“ (Halliwell i Gutteridge, 1990). Svi aerobni organizmi trpe različita oštećenja kada su izloženi višoj koncentraciji O_2 od normalne (Halliwell and Gutteridge, 2007). Tetravalentna redukcija kiseonika mitohondrijalnim elektronskim transportnim lancem je relativno siguran proces, nepotpune jednovalentne redukcije (**Slika 2.13**) vode do stvaranja hemijski reaktivnih vrsti poznatijih kao ROS (engl. *reactive oxygen species*). Pretpostavljeno je da toksičnost O_2 potiče od povišene koncentracije nastalog superoksida ($\text{O}_2^{\bullet-}$) – superoksidna teorija toksičnosti kiseonika (Fridovich, 1995). Opstanak aerobnih organizama omogućen je evolucijom odgovarajućeg antioksidativnog sistema.

Premda molekulski kiseonik sadrži paran broj elektrona, on ima dva nesparena elektrona u svojoj orbitali koja su istog spinskog broja. Spontane reakcije oksidacije podrazumijevale bi primanje elektrona istog spina drugog molekula, što se ne dešava, budući da su parovi elektrona u orbitalama molekula u anti-spin orijentaciji. Stoga molekulski kiseonik učestvuje u jednoelektronskim reakcijama i reaguje vrlo brzo sa drugim radikalima gdje učestvuje u jednoelektronskim transferima. Više reaktivna forma kiseonika, singlet kiseonik, može nastati pobuđivanjem elektrona što rezultira u njihovom rearanžmanu (tako nestaje spin restrikcija), a oksidaciona moć raste (singlet kiseonik može direktno da oksiduje proteine, DNK i lipide). Ukoliko se kiseonik redukuje samo jednim elektronom, superoksid-anjon-radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) nastaje kao produkt. Dalja jednoelektronska redukcija superoksida vodi formiranju peroksida, koji nije radikal. Peroksid se konačno redukuje u vodu.

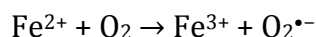
PREGLED LITERATURE



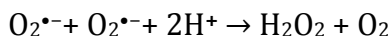
Slika 2.13 Nastajanje ROS iz kiseonika

(adaptirano sa: <https://www.caymanchem.com/images/articles/page/2165-1.jpg>).

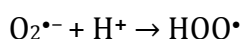
Kiseonik može da interaguje sa drugim paramagnetnim centrom (Fe^{2+} ili Cu^{2+}) (način da prevaziđe spin restrikciju) (Tripathy i Oelmuller, 2012).



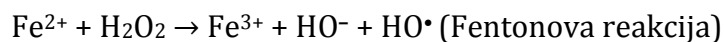
U vodenom rastvoru superoksid-anjon-radikal se disproporcioniše do H_2O_2 :



Protonovanje $\text{O}_2^{\bullet -}$ može dovesti do nastanka hidroperoksil-radikala, visoko reaktivnog radikala.

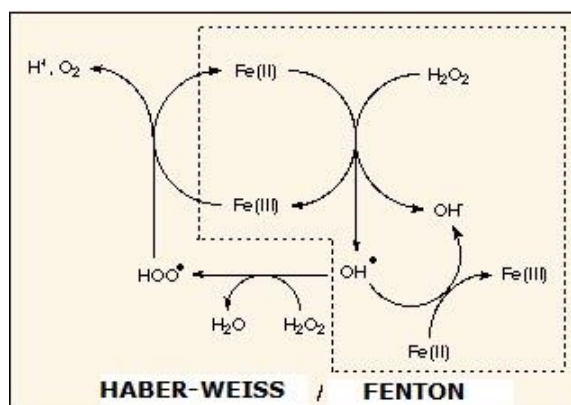


S druge strane, H_2O_2 u reakciji sa Fe^{2+} dovodi do nastanka HO^{\bullet} hidroksil-radikala, reaktivne čestice koji izaziva brojna oštećenja u ćeliji.



Fentonova reakcija se dešava i u *in vivo* uslovima, ali su organizmi razvili način da je kontrolišu, limitirajući nivo dostupnosti slobodnog Fe^{2+} i H_2O_2 (Halliwell i Gutteridge, 1990, 2007). Za nastanak visoko reaktivnih HO^{\bullet} i HOO^{\bullet} odgovorne su Fentonova i Haber-Weiss reakcija (Slika 2.14).

PREGLED LITERATURE



Slika 2.14 Haber-Weiss i Fentonova reakcija

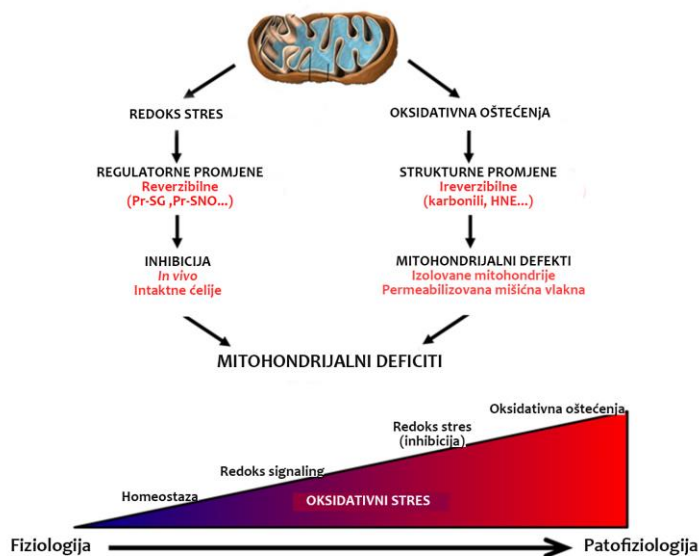
(adaptirano sa: <http://www.madsci.org/posts/archives/1999-09/936854566.Ch.r.html>).

Koncentracije reaktivnih vrsti su određene balansom između njihove produkcije i uklanjanja. Disbalans između metabolizma ovih reaktivnih intermedijera rezultuje fenomenom poznatim kao oksidativni stres. Bez mehanizama kontrole reaktivne vrste mogu oštetiti bilo koju klasu biomolekula i eventualno dovesti do ćelijske smrti. Povišen nivo reaktivnih vrsta vezan je kako za etiologiju (ateroskleroza, hipertenzija, dijabetes), tako i za progresiju (kancer, neurodegenerativne bolesti) velikog broja bolesti (Thanan i sar, 2015).

Zbog svoje visoke hemijske reaktivnosti ROS se razmatraju najčešće u kontekstu oksidativnog stresa, pod kojim se podrazumijeva oštećenje biomolekula: lipida, proteina i DNK usled oksidativnih modifikacija. Uočeno je da je oksidativni stres zapravo krajnji rezultat oksidativnih modifikacija izazvanih sa ROS. Reaktivne vrste zajedno sa različitim metal-redoks-sistemima su efikasni kao unutarćelijski oksidanti. Regulacija produkcije slobodnih radikala ima brojne uloge u ćelijskim funkcijama. Regulacija vaskularnog tonusa, odbrana domaćina ubijanjem mikroba u fagocitnim ćelijama, kao što su neutrofil i makrofagi, posredovana je njihovom sposobnošću da produkuju ROS i RNS (Babior, 1999). Zapravo efekti ROS u ćeliji prate graduisane promjene: od regulacije signalnih puteva u homeostazi do oksidativnih oštećenja. Redoks-signalizacija podrazumijeva efekte koji se ostvaruju zahvaljujući niskim koncentracijama ROS koji vode regulaciji signalnih puteva i aktivaciji bioloških procesa, dok oksidativni stres nastaje u uslovima visokih koncentracija ROS koje ne mogu biti uklonjene

PREGLED LITERATURE

kompenzatornim antioksidativnim mehanizmima, usled njihovog nedostatka. Stoga ćelijski odgovor na ROS prati principe hormezisa – suprotni efekti se uočavaju pri niskim koncentracijama u poređenju sa visokim (**Slika 2.15 i 2.16**).

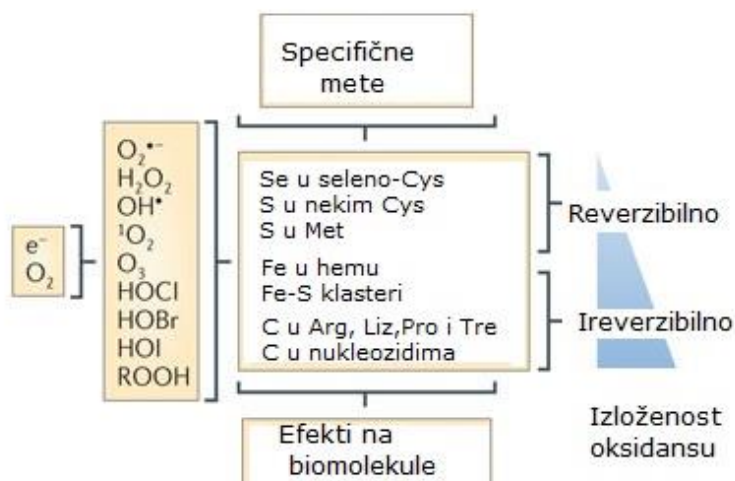


Slika 2.15 Efekti ROS u ćeliji – princip hormezisa

(adaptirano sa: <http://www.impactaging.com/papers/v5/n8/full/100590/Figure1.jpg>).

Za razliku od „klasičnog“ načina regulacije ćelijskih puteva u kojima ostaci tirozina treonina i serina bivaju (de)fosforilovani,

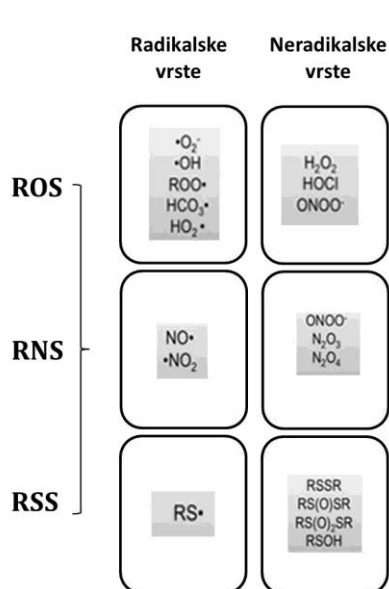
kod koga su identifikovani ključni specifični targeti i enzimi koji posreduju u ovoj modifikaciji, mehanizmi redoks- signalizacije još uvijek nisu dobro izučeni.



Slika 2.16 Efekti ROS u ćeliji – mehanizmi i efekti (adaptirano iz: Nathan i Bussel, 2013).

PREGLED LITERATURE

Redoks-signalizacija obuhvata jednim dijelom, postranslacione modifikacije proteina koje se ostvaruju preko mehanizama redoks-hemije – redoks-reakcija koje podrazumijevaju transfer elektrona: redoks-centri postaju redukovani (primaju elektrone) odnosno oksidovani (otpuštaju elektrone).

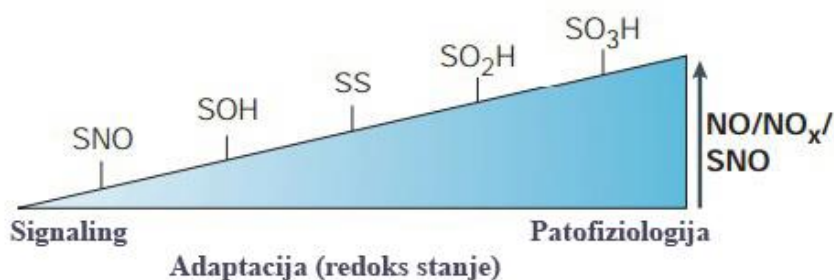


Termodinamika ovih reakcija određena je redokspotencijalom. Reaktivne vrste kiseonika, ali i azota i sumpora (RNS i RSS; engl. *reactive oxygen/nitrogen/sulphur species*) produkti su normalnog ćelijskog metabolizma, ali nastaju i pod određenim stimulusima nezavisno od navedenog izvora (Slika 2.17).

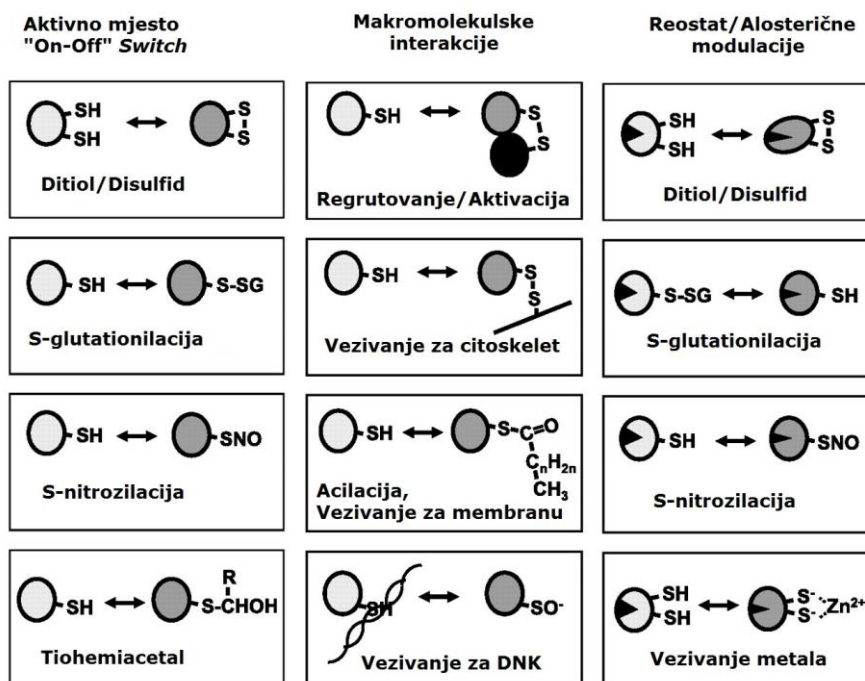
Slika 2.17
Reaktivne vrste kiseonika, azota i sumpora.

Redoks-reakcije, kao što su oksidacija, hidroksilacija, tiolacija, nitrovanje, nitrozilovanje, nitrozovanje, ispunjavaju termodinamičke i kinetičke zahtjeve koji im omogućavaju da se dešavaju *in vivo*, pri čemu ispoljavaju značajan efekat na ćeliju. Mjesto specifične, kovalentne modifikacije proteina predstavljaju dominantan molekularni mehanizam transformacije oksidantnog signala u biološki odgovor. Reaktivne vrste mogu modifikovati ostatke različitih aminokiselina (histidina, metionina, triptofana i tirozina), ali se cistein čini kao najvjerojatniji redoks-senzor (vidjeti 1.3.5.4; Slika 2.18 i 2.19). Oksidativne modifikacije tiolnih ostataka kontrolišu biološke funkcije generalno na tri načina: hemijskom izmjenom aktivnog mjesta cisteina, uticajem na makromolekulske interakcije kao i regulacijom aktivnosti kroz alosterne efekte (Slika 2.19). Umrežavanje proteina kroz formiranje disulfida posreduje u agregiranju proteina. Oksidacija cisteina koji nije u aktivnom mjestu može kroz alosterni uticaj da reguliše aktivnost proteina. Proteini obično sadrže brojne cisteinske ostatke koji mogu pretrpjeti reverzibilne i ireverzibilne modifikacije (Jones, 2008).

PREGLED LITERATURE



Slika 2.18 Oksidacija cisteina povezana je sa graduisanom promjenom od signalne uloge do toksičnosti - tioli cisteina (Cys-SH) mogu pretrpjeti različite •NO-zavisne elektrofilne ili oksidativne modifikacije, kao i •NO-nezavisne oksidacije reaktivnim kiseoničnim vrstama (ROS). Ove modifikacije možemo posmatrati kao kontinuum koji dovodi u vezu nivoe (količinu, porijeklo, vremensko-prostornu distribuciju) reaktivnog NO/viših NO oksida (NO_x)/SNO u formu i posledicu modifikacija. Sa ove tačke gledišta, progresija od S-nitrozotiola do sulfenske kiseline (SOH)/disulfida (SS), odnosno sulfinske (SO₂⁻) do ireverzibilne sulfonske kiseline (SO₃⁻) predstavlja graduisanu promjenu od signalne funkcije, kroz adaptaciju, do nitrozativnog i oksidativnog stresa i, na kraju, toksičnosti (disulfidi mogu biti intra- ili miješani između peptida; ireverzibilne modifikacije poput tirozinskog nitrovanja) (adaptirano iz Hess i sar, 2005).



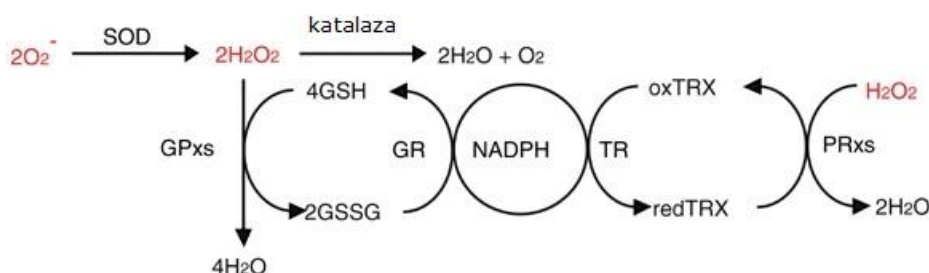
Slika 2.19 Modifikacije na tiolima proteina - sumporni „switch“ (adaptirano iz Jones , 2008)

2.2.1 Antioksidativni sistem zaštite

Unutarćelijski redoks-događaji ne prate uvijek linearne reakcije puteve. Istraživanja vezana za oksidativni stres, pokazala su da brojne redoks-

PREGLED LITERATURE

transformacije unutar ćelije i između ćelija prate visoko kompleksne transformišuće obrasce koje je teško svesti na nivo individualnih redoks-molekula, proteina i enzima. Redoks-balans se postiže različitim enzimskim i neenzimskim sistemima koji neutrališu toksične oksidanse, kao što su ROS. Jedno-elektronska redukcija superoksid-anjon-radikala ($O_2^{\bullet-}$) do H_2O_2 je ključni ćelijski događaj, budući da služi kao inicijalni korak u enzimskoj ROS detoksifikacionoj kaskadi katalizovanoj superoksid-dismutazom (SOD), koja se završava daljom konverzijom H_2O_2 u H_2O i O_2 (u slučaju daljeg disproporcionisanja katalizovanog katalazom (CAT; engl. *catalase*) i glutation-peroksidazom (GSH-Px; engl. *glutathione peroxidase*), odnosno u H_2O i oksidovani glutation (GSSG) (u slučaju redukcije peroksida glutation-peroksidazom, uz regeneraciju glutationa glutation-reduktazom (GR)). U detoksifikaciji peroksida, mogu učestvovati i tireodoksini koji se redukuju pomoću tireodoksin-reduktaze, uz učešće NADPH kao esencijalnog kofaktora.

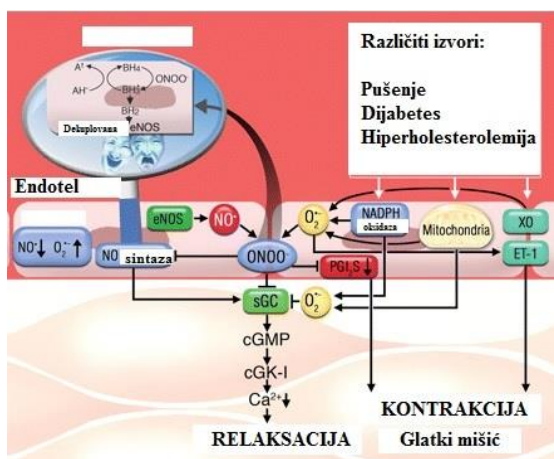


Slika 2.20 Antioksidativni sistem zaštite (adaptirano iz Nakano i sar, 2006).

Takođe, uklanjanje peroksida nije zavisno samo od enzimске katalize. U uslovima visoke koncentracije peroksida, npr. tokom oksidativnog stresa, postoji čitav spektar „žrtvujućih” antioksidanasa, koji mogu takođe da reaguju sa peroksidom, uz posledično formiranje vode (Jacob i Winyard, 2009). To su niskomolekulski endogeni antioksidansi: pomenuti glutation (GSH), askorbat, odnosno piruvat – komponente neenzimskog sistema.

2.2.2 Reaktivne vrste i uterus

Reaktivne vrste kiseonika, kao i odgovarajući enzimski sistemi koji ih uklanjaju, nađeni su u uterusu. Porijeklo i produkcija ROS varira u odnosu na gestacijsko stanje uterusa i uslovljeno je patofiziološkim stanjem samog organa. Generisanje ROS se tokom trudnoće povećava i uterus u toku trudnoće je u stanju povišenog oksidativnog pritiska (Zyrianov i sar, 2003). Glavni izvor ROS su svakako mitohondrije i pokazano je da ROS nastale na ovaj način utiču na nekoliko ćelijskih signalnih puteva (Murphy, 2009). Snažno kontrahovanje uterusa može dovesti do kompresije krvnih sudova, a posledično i do ishemija-reperfuzija efekta, što rezultuje povećanom produkcijom ROS. Postoje dokazi da su mnogi ćelijski efekti indukovani ROS, posledica modulacije određenih jonskih kanala. Direktna efekat H_2O_2 , koji je difuzibilan molekul, te može izvan ćelije uticati na kontrakcije, pokazan je na negravidnom uterusu pacova (Appiah i sar, 2009). Ista grupa autora pokazala je da H_2O_2 reverzibilno modifikuje voltažno-zavisne K^+ kanale (Appiah i sar, 2012). Kompleksnost fizioloških i patoloških stanja otežava identifikaciju pojedinačnih molekularnih vrsta koje su posrednici istih. NO može da djeluje preko direktne aktivacije solubilne guanilat-ciklaze (sGC, engl. *soluble guanylate cyclase*), modulacije određenih jonskih kanala i/ili indirektno kroz interakciju sa drugim ROS i formiranjem sekundarnih RNS. Ovaj *crosstalk*, tj. komunikacija između direktnih i indirektnih puteva, ultimativno vodi formiranju različitih klasa signalnih molekula koji mogu imati različite funkcije (Slika 2.21). Egzaktna veza između reaktivnih, oksidujućih molekula i njihovih efekata je često kompleksna, ponekad kontradiktorna i u uterusu još uvijek slabo proučena.



Slika 2.21 Ilustrativni primjer komunikacije reaktivnih vrsta i efekti na kontraktinost vaskularnog glatkog mišića (adaptirano iz Munzel i sar, 2010).

2.3 Vodonič-sulfid

Otrovni gasovi, koji su endogeno produkovani, kako u bakterijskom, tako i u organizmu čovjeka, imaju važne van- i unutar-ćelijske uloge. Uz epohalno otkriće da je radikalski NO gasoviti signalni molekul, otkrivena su još dva – ugljen-monoksid (CO) i vodonik-sulfid (H₂S), a njihove brojne uloge u fiziološkim tako i patofiziološkim procesima su potvrđene (Li i sar, 2011). Gasoviti transmiteri su proširili konvencionalne koncepte unutarćelijske komunikacije, budući da njihovo djelovanje nije posredovano klasičnom ligand-receptor interakcijom koja za posljedicu ima aktivaciju i/ili inhibiciju različitih nishodnih puteva. Zahvaljujući svojim hemijskim svojstvima (lipofilnosti), gasoviti transmiteri difunduju u ćeliju da bi interagovali sa njenim ciljnim molekulima. Klasični prenosnici prenose signal kroz amplifikaciju u signalnoj kaskadi (dobro poznati primjer signalizacije posredovane receptorima kuplovanim sa G proteinima). Suprotno ovom konceptu, gasoviti transmiteri hemijski modifikuju unutarćelijske proteine, što utiče na ćelijski metabolizam na neposredan način. Upravo lipofilnost i visoka difuziona konstanta onemogućava njihovo skladištenje (što je svojstvo konvencionalnih vezikularnih transmitera), već oni odmah po sintezi djeluju autokrino i/ili parakrino. Ovo ukazuje da biosintetski enzimi moraju biti subjekat izvanredno iznijansiranih regulatornih mehanizama. Abe i Kimura (1996) su etabrirali vodonik-sulfid kao fiziološki medijator i prvi su predstavili njegove neuromodulatorne efekte. Do danas je objavljeno na desetine radova vezanih za njegove fiziološke, ali i patofiziološke efekte.

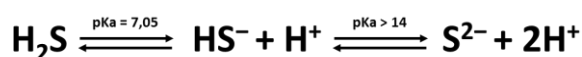
2.3.1 Vodonič-sulfid i evolucija

Važno je sagledati istorijsku biologiju sulfida, odnosno put kojim je ovaj molekul iz prebiotske Zemlje dospio u modernu eukariotsku ćeliju. Vodonič-sulfidni anjon (HS⁻) i njegova nedisocirana forma, H₂S, smatraju se važnim u nastanku i porijeklu života na Zemlji. Redukovani sumpor, prisutan u prebiotičkim uslovima, koji je obezbjeđivan iz međuzvezdanih izvora, predstavlja integralnu komponentu ranog života budući da kroz oksidaciju, čak i u slabo oksidovanom okruženju, može obezbjeđiti dovoljno energije. Njegove spontane reakcije sa

gvoždem dovele su do formiranja FeS klastera, koji će postati najraniji biološki katalizatori i strukturne komponente ćelije. Sposobnost sumpora da se nalazi između različito redukovanih i oksidovanih stanja, može predstavljati ključ u endosimbiotskom događaju kada se sulfid-oksidujuća protobakterija inkorporirala u sulfid-redukujuću *Archea*, što je na kraju rezultovalo eukariotskom ćelijom.

2.3.2 Fizičko-hemijska svojstva vodonik-sulfida

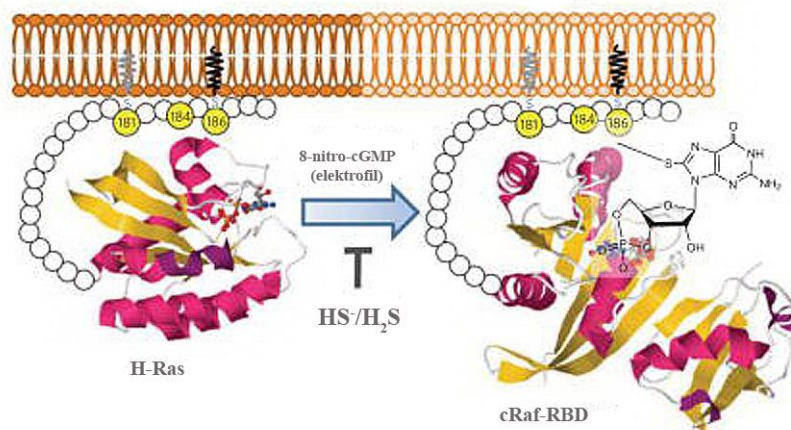
Pri standardnim uslovima, H₂S je bezbojan, u vodi rastvorljiv gas, karakterističnog, jakog mirisa nalik mirisu pokvarenih jaja. Akutno izlaganje do 500 ppm može biti letalno (Doujaaji i Al-Tawfiq, 2010). Kontraverza H₂S vezana je za metalo-centar citohrom *c* oksidaze. Naime, toksičnost koja je dugo vremena bila njegov pratilac, upravo je posljedica inhibicije ovog važnog kompleksa respiratornog lanca. Sumpor se pojavljuje u različitim oksidacionim stanjima, od -2 do 0. Sumpor u najnižem oksidacionom stanju (-2) može biti samo oksidovan. Stoga, vodonik-sulfid u molekulskom obliku je redukciono sredstvo. Energija disocijacije H₂S je 90 kcal/mol (Li i Lancaster, 2013), što odgovara energiji disocijacije S-H veze tiola (92±1 kcal/mol). Standardni redukcionni potencijali (E^{o'}) u skladu sa biohemijskom konvencijom pri pH=7 su E^{o'}(H⁺/H₂)=-0,421 V, E^{o'}(S⁰/H₂S)=-0,23 V, a E^{o'}(S⁰/HS⁻)=-0,270 V, što odgovara redukcionim potencijalima pod istim uslovima ćelijski važnog redoks-aktivnog para, glutation disulfida/glutaciona E^{o'}(GSSG/GSH)=-0.24 V, kao i E^{o'}(cistina/cisteina)= -0.340 V. S druge strane, HS⁻ je nukleofil, poput RS⁻ nukleofila, sa širokim spektrom reakcija (Li i Lancaster, 2013). Sa hemijske tačke gledišta, H₂S je najjednostavniji tiol. Značajno se razlikuje od •NO i CO, budući da je jonizovan na fiziološkom pH (H₂S je slaba kiselina):



U uslovima fiziološkog pH (7,4) najveći dio H₂S je u formi HS⁻, dok je sadržaj S²⁻ zanemarljivo mali (na osnovu Henderson–Hasselbach (HH) jednačine – H₂S:HS⁻:S²⁻ = 30:70:0.000002 (Li i Lancaster, 2013)). pK_a je zavisna od temperature, te na 25 °C ima vrijednost od 7,05 (odnosno 6,98 zavisno od literaturnog podatka),

dok je na 37 °C ova vrijednost niža. Budući da su sve tri vrste prisutne u vodenom rastvoru, nemoguće je odrediti i pripisati biološku aktivnost bilo kojoj pojedinačno. Stoga, „H₂S“ upućuje na prisustvo sve tri vrste. Premda H₂S može lako da difunduje kroz membranu, predloženo je postojanje jonskog kanala za HS⁻ koji ne prolazi membranu (Czyzewski i Wang, 2012). Njihova distribucija sa obje strane membrane je proporcionalna razlici pH, kako je opisano H-H jednačinom. Nishida i saradnici (Nishida i sar, 2012) su nedavno postulirali učešće nukleofilnog napada HS⁻ kao važnog mehanizma u ostvarivanju njegovih uloga (Slika 2.22).

Reduktivna i nukleofilna svojstva H₂S/HS⁻ su najvažnija u aspektu biohemije ovih vrsta, koje mogu doprinosti fiziologiji na različit i nezavisan način.



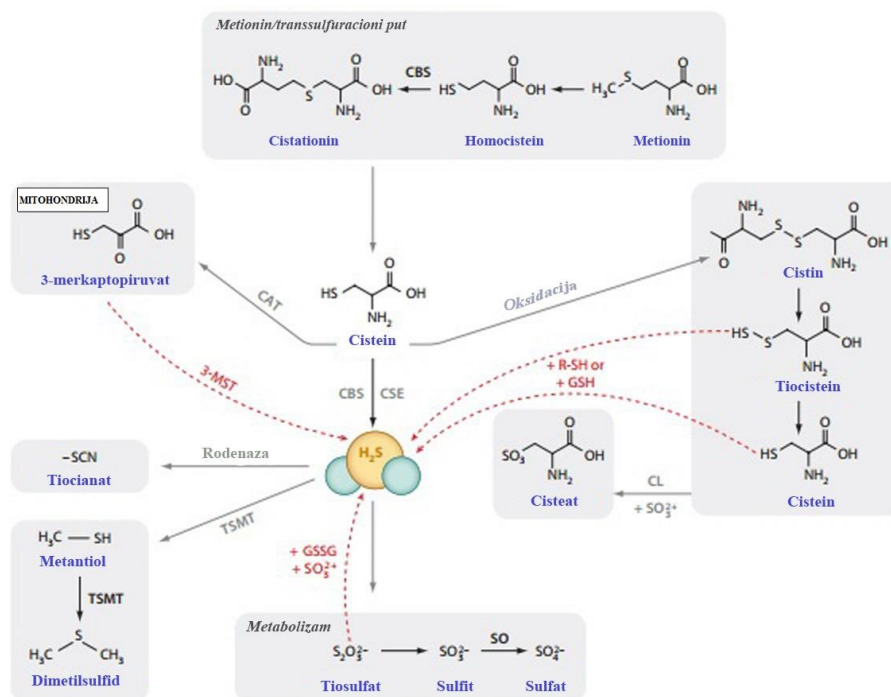
Slika 2.22 Vodonik-sulfidni anjon reaguje sa ćelijskim elektrofilima, poput 8–nitro–cGMP, što za proizvod daje inhibitor S-guanilaciono zavisne H-Ras aktivacije na modelu inflamatornog oštećenja miokarda (adaptirano iz Nishida i sar, 2012).

2.3.3 Biosinteza vodonik-sulfida

Glavni izvor H₂S kod sisara je cistein (Slika 2.23). Dvije grane sumpornog metaboličkog puta doprinose produkciji H₂S: *reversni trans-sumporni put*, u kome dva citosolna piridoksal-5'-fosfat zavisna (PLP) enzima, cistation-β sintaza (CBS) i cistein-γ-liaza (CSE) prevode homocistein do cistationa i cisteina; i grana *cisteinskog kataboličkog puta* gdje se cistein prevodi do merkaptopiruvata PLP-zavisnom cistein-aminotransferazom (CAT), a merkaptopiruvat onda PLP-nezavisnom mitohondrijalnom i citosolnom merkaptopiruvat-sumpor transferanom (MST) (Slika 2.23). Nekoliko enzima kod sisara može da katalizuje desulfurizaciju cisteina i produkciju H₂S, uključujući rodenazu i cistein liazu

PREGLED LITERATURE

(Stipanuk, 2004). Ekspresija CSE je veća u odnosu na CBS u brojnim tkivima (Hosoki i sar, 1997; Zhao i sar, 2001). Oba enzima su eksprimirana kako u pacovskom tako i u humanom miometriju (Patel i sar, 2009; You i sar, 2011).



Slika 2.23 Shematski prikaz metabolizma H₂S. Produkcija i razgradnja različitim reakcijama katalizovanim enzimima-(adaptirano iz Li i sar, 2011).

Produkcija H₂S neenzimatskim putem iz elementarnog sumpora, korišćenjem redukovanih ekvivalenata dobijenih oksidacijom glukoze, je pokazana, a prooksidativno okruženje i hiperglikemija stimulišu njegovo nastajanje na ovaj način (Searcy i Lee, 1998). Takođe, neenzimatska produkcija pokazana je iz polisulfida nađenih u bijelom luku (Benavides i sar, 2007).

2.3.4 Metabolizam vodonik-sulfida

H₂S se brzo oksiduje do tiosulfata (S₂O₃²⁻), koji se dalje prevodi do sulfita (SO₃²⁻) i sulfata (SO₄²⁻). Prvi korak u oksidaciji sulfida u mitohondrijama je katalizovan sulfid-hinon oksidoreduktazom (SQR, engl. *sulphide quinone reductase*), mitohondrijalnim membranskim flavoproteinom koji oksiduje H₂S do proteinski

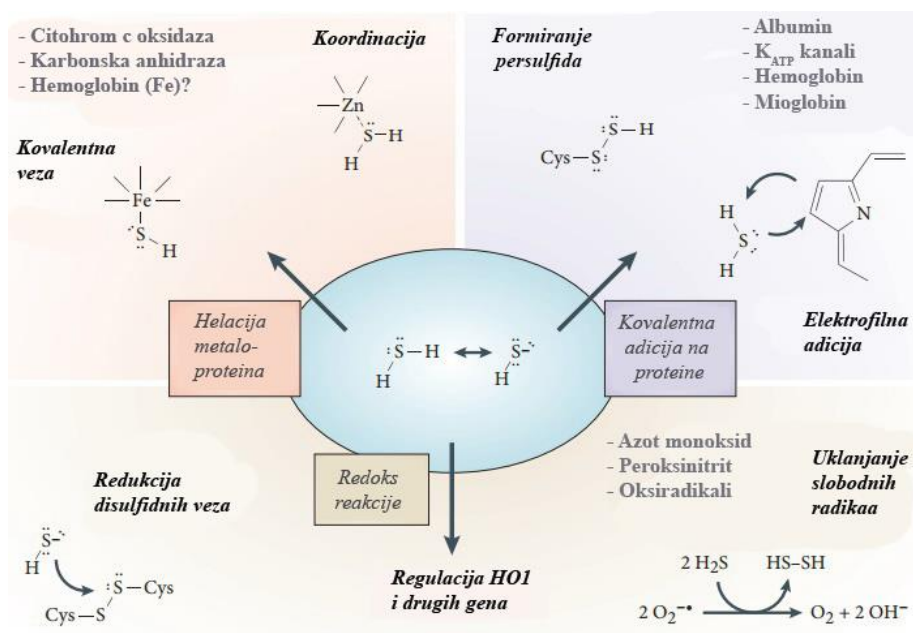
PREGLED LITERATURE

vezanog persulfida. Akceptor elektrona u ovoj reakciji je ubihinon, koji prenosi elektrone do kompleksa III, što povezuje katabolizam H₂S sa respiratornim lancem. Predloženo je da sekvencijske reakcije sumpor-dioksidaze i sumpor-transferaze (rodenaze) prevode SQR-vezani persulfid do sulfita i tiosulfita (Tiranti i sar, 2009). Tiosulfat se prevodi do sulfata, tiosulfat-cijanid sumportransferazom. Sulfit nastao ovom reakcijom se vrlo brzo oksiduje do sulfata, sulfit-oksidadom, te je sulfat glavni proizvod metabolizma H₂S u većini fizioloških stanja, premda je tiosulfat marker produkcije vodonik-sulfida (Kage i sar, 1992). Drugi katabolički put H₂S uključuje metilaciju pomoću tiol-S-metiltransferaze to metantiola (CH₃SH) i dimetilsulfida (CH₃SCH₃). Pokazano je da se oksidacija odvija 10000 puta brže od metilovanja (Levitt i sar, 1999). Treći put podrazumijeva uklanjanje H₂S pomoću methemoglobina i hemoglobina (Beauchamp i sar, 1984), odnosno metaloproteinima (Lowicka i Beltowski, 2007). Interakcije H₂S sa hemoglobinom i methemoglobinom su naročito interesantne budući da hemoglobin vezuje i •NO i CO, tako da vezivanje jednog gasa može da utiče na vezivanje drugog, što posledično može da modulira nivo dostupnosti datog gasa i njegove efekte na ciljnim ćelijama.

2.3.5 Biološke mete sulfida

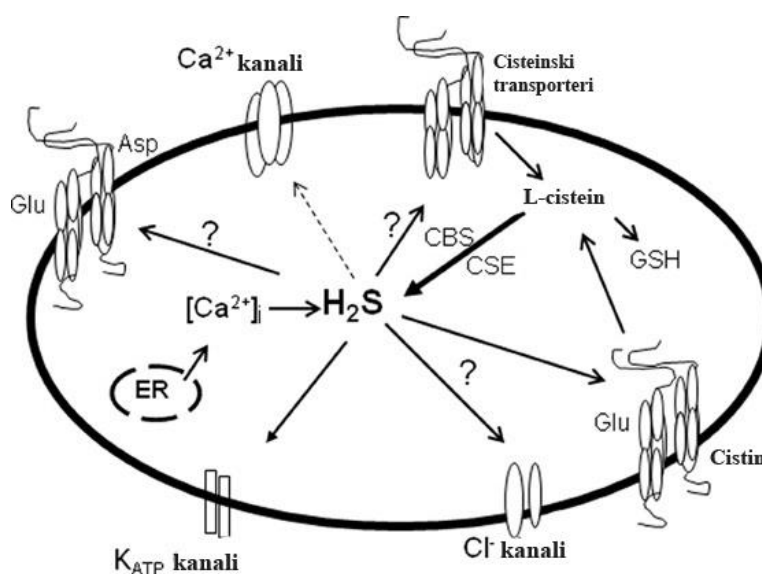
Reduktivna i nukleofilna svojstva H₂S/HS⁻ su glavne determinante u određivanju njihovih bioloških meta. Tako, H₂S direktno uklanja oksidante - peroksinitrit, peroksid ili superoksid (Li i Moore, 2008), dok HS⁻ ima veliki afinitet ka metaloproteinima (Pavlik i sar, 2010) (Fe-S klasteri, citohrom *c* oksidaza) ili proteinima koji sadrže hem (Slika 2.24). Modulacija jonskih kanala H₂S/HS⁻ predstavlja jedan od mogućih mehanizama kojim ostavruje svoje efekte (Slika 2.25).

PREGLED LITERATURE

Slika 2.24 Glavne ćelijske mete H₂S (adaptirano iz Szabo, 2007).

2.3.5.1 S-persulfidacija

Cavallini i saradnici (1970) pokazali su sedamdesetih godina prošlog vijeka da se persulfidacija insulina i RNaze (proteini koji sadrže disulfidne mostove) odigrava nakon njihovog izlaganja Na₂S. Masenom spektrometrijom je identifikovana persulfidacija cisteinskog ostatka na SOD za koju je pokazano da stabilizuje enzim naspram agregacije indukovane oksidacijom bez uticaja na katalitičku aktivnost (De Beus i sar, 2004). Pored brojnih dokaza o postojanju, značaj H₂S kao medijatora persulfidacije i njene uloge u kontekstu signalizacije još uvijek nije ispitana. Takođe, H₂S kao slab reduktant ne može hemijski modifikovati proteinske ostatke (tiole) na ovaj način, a mala brzina njegove autooksidacije dovodi u pitanje biološku relevantnost u ovim procesima (Mishanina i sar, 2015).



Slika 2.25 H₂S posredovana regulacija jonskih kanala
(adaptirano iz Njie-Mbye i sar, 2012).

2.3.5.2 Interakcije H₂S sa proteinima koji sadrže hem

Hoppe-Seyler (Pavlik i sar, 2010) je u pionirskom radu prvi pokazao da nakon tretmana methemoglobina sa H₂S u prisustvu kiseonika nastaje karakteristični, zeleno obojeni derivat hemoglobina, nazvan „sulfo-hemoglobin”, koji nastaje nakon kovalentne modifikacije porfirinskog jezgra hema (Pavlik i sar, 2010 i tamo citirane reference). H₂S reaguje sa mitohondrijalnom citohrom c oksidazom, a efekti su koncentraciono zavisni. Afinitet H₂S/HS⁻ za metalo-centre enzima, potvrđen je i na modelu CuZnSOD, koja katalizuje konverziju superoksida u peroksid, a oksidaciju vodonik-sulfida u sumpor (Searcy i sar, 1995). Ovaj proces može biti od fundamentalne važnosti za modulaciju ćelijske signalizacije posredovanog reaktivnim vrstama. Pored modulacije aktivnosti, pokazano je da H₂S pozitivno utiče na ekspresiju antioksidativnih enzima (Szabo i sar, 2011; Benetti i sar, 2013).

2.3.5.3 Interakcije H₂S sa redoks-vrstama

Nedavno je pokazano da, pri fiziološkim koncentracijama, H₂S štiti tkiva/ćelije od oksidativnog stresa: neurone, kardiomiocyte i vaskularne glatke mišićne ćelije (Kimura i sar, 2006). Inhibicija citotoksičnosti vezana je kako za

PREGLED LITERATURE

reakcije sa peroksinitritom (ONOOH/ONOO⁻), tako i sa hipohloritom (HOCl/-OCl) (Whiteman i sar, 2005; Lowicka i Beltowski, 2007), a zaštitni efekat je uporediv sa onim koji pokazuje redukovani glutation (GSH). Vodonik-sulfid se prevodi u sulfid pod dejstvom aktiviranih neutrofila. Ova konverzija zavisi od aktivnosti NADPH-oksidade, a askorbat istu inhibira.

2.3.5.3.1 Reakcije sa kiseonikom

Vodonik-sulfid u prisustvu kiseonika podleže autooksidaciji, stvarajući polisulfide, sulfite, tiosulate i sulfate kao intermedijere i proizvode, premda je mehanizam njihovog nastanka još uvijek nerazjašnjen (Chen i Morris, 1972). Reakcija je spora da bi bila biološki relevantna. Međutim, metali (Vazquez i sar, 1989), kao i druge supstance poput fenola i aldehida, mogu ubrzati ovu reakciju. Staško i saradnici (2009) proučavali su reakciju vodonik-sulfida sa dva relativno stabilna radikala: 1,1-difenil-2-pikrihidrazilom i 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikalskim katjonom (u odsustvu helatora metala) i našli su da kiseonik ima dominantnu ulogu u ovim reakcijama. Oni su dalje ispitivali autooksidaciju H₂S koristeći *spin trapping* i elektronsku paramagnetnu rezonancu (EPR) i ukazali na postojanje jednoelektronskog transfera koji za proizvod ima sulfhidril-radikal (HS[•]/S^{•-}). Nedavno, pokazano je da helator metala dietilentriaminopentasilčetna kiselina onemogućava nestanak H₂S u aerobnim uslovima dokazujući učešće metala u autooksidaciji vodonik-sulfida (Hughes i sar, 2009).

2.3.5.3.2 Reakcije vodonik-sulfida sa superoksidom, peroksidom i peroksinitritom

Carballal i saradnici (2011) potvrdili su hemijske reakcije vodonik-sulfida sa različitim oksidantima, kao i intermedijerima izvedenih iz njih. Premda je reaktivnost vodonik-sulfida uporediva sa antioksidantima poput cisteina i GSH, direktno uklanjanje oksidanata je malo vjerovatno *in vivo* zbog njegove niske koncentracije. Demonstracija direktnih reakcija vodonik-sulfida bilo sa H₂O₂ ili O₂^{•-} pokazane su u puferisanim rastvorima i mitohondrijama srca (Geng i sar, 2004).

PREGLED LITERATURE

Polisulfidi su nađeni kao intermedijeri koji mogu nastati kao posljedica nukelofilnog napada HS^- na H_2O_2 .

2.3.5.3.3 Reakcija vodonik-sulfida sa $\bullet\text{NO}$

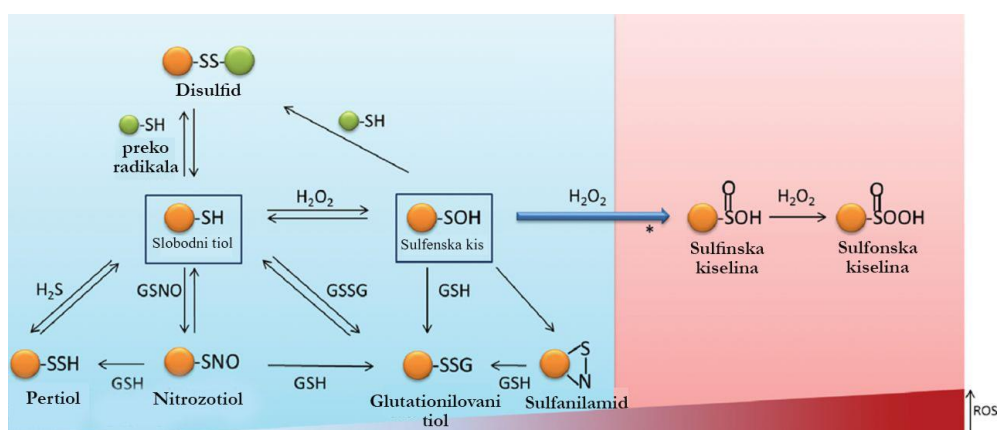
Međusobna veza $\bullet\text{NO}$ - H_2S i posljedične biohemijske interakcije su kompleksne i još uvijek nerazjašnjene. Neke studije su pokazale da $\bullet\text{NO}/\text{H}_2\text{S}$ pozitivno utiču na međusobno nastajanje i funkciju, dok druge, pak, imaju suprotne rezultate, što, definitivnu predstavu o mehanizmima i ishodištu ovih interakcija čini otežanom. Ova zapažanja ukazuju da vodonik-sulfid ispoljava svoje efekte $\bullet\text{NO}$ -zavisnim mehanizmom. O mehanizmima se i dalje spekulira, a formiranje nitrozotiola, kao relevantne signalne vrste, je pokazano (Filipović i sar, 2012; 2013).

2.3.5.4 Tiolni ostaci na proteinima- zajednički imenitelj modifikacija posredovanim signalnim vrstama?

Reverzibilne promjene na proteinima u kojima posreduju signalne vrste generalno podrazumijevaju modifikacije na tiolima cisteina (Eaton, 2006). Cistein je prvi kandidat za ovu vrstu modifikacija, budući da je na fiziološkom pH u obliku tiolatnog jona (RS^-), koji je jak nukleofil što mu omogućava interakciju sa reaktivnim vrstama. Reagovanje sa HS^- rezultira formiranjem persulfidne veze (Finkel, 2012). Reaktivni intermedijeri ROS, RNS i RSS funkcionišu kao sekundarni glasnici koji imaju kapacitet regulisanja aktivnosti brojnih proteina kroz kovalentne modifikacije istih, na prvom mjestu cisteinskih ostataka. Svaka modifikacija dalje može propagirati različite redoks transformacije. Ove hemijske reaktivne forme cisteina takođe pripadaju grupi RSS. Nekoliko „nespecifičnih“ peroksidaza mogu oksidovati tiolne supstrate jedno-elektronskom oksidacijom da bi formirali tiolne radikale, važne medijatore u ovim transformacijama (Mueller, 2006). Cisteinski ostatak je zajednički imenitelj $\bullet\text{NO}/\text{H}_2\text{S}$ signalinga, što otvara mogućnosti različitih redoks-modulacija, imajući u vidu mehanizme njihovih interakcija i ishodište istih. $\bullet\text{NO}$ učestvuje u moduliranju na sličan način, S-nitrozilacijom (Okamoto i sar, 2014) (Slika 2.26). Bočni ostatak cisteina sadrži jonizabilnu tiolnu grupu – sumpor je bogat elektronima a slobodne d orbitale

PREGLED LITERATURE

osiguravaju postojanje različitih oksidacionih stanja. Ova osobina je jako važna upravo za oksidativne modifikacije i otuda različitost istih. Nastanak ovih modifikacija zavisi od više faktora poput: reaktivnosti samog cisteina, njegovog mikrookruženja, kao i sastava lokalne redoks-sredine (Chung i sar, 2013).



Slika 2.26 Oksidativne posttranslacione modifikacije cisteina – plavo su označene reevrziбилne, a crveno irreverzibilne promjene (adaptirano iz Chung i sar, 2013).

POGLAVLJE TREĆE

Ciljevi

CILJEVI

Vodonik-sulfid se pokazao kao potentan inhibitor kontrakcija uterusa, međutim, precizan mehanizam njegovog djelovanja nije poznat, kako sa aspekta realnih hemijskih vrsta koje nastaju i odgovorne su za efekte sulfida, tako i sa aspekta ciljnih molekulskih struktura koje posreduju u ostvarenju krajnjeg relaksantnog efekta.

Stoga, u okviru ovog istraživanja formulisani su sledeći ciljevi:

a. Karakterizacija relaksantnog efekta natrijum-sulfida

Ispitati relaksantni efekat na uterusu pacova, čija aktivnost ima različito porijeklo: spontane aktivne kontrakcije i kontrakcije indukovane jonima kalcijuma, kalijum-hloridom ili agonistom-. Svaki od ovih puteva indukcije kontraktilne aktivnosti uterusa favorizuje posebne ciljne strukture i nishodne puteve realizacije krajnjeg fiziološkog efekta, čime omogućava da se u eksperimentalnim uslovima identifikuju najvjerojatniji posrednici u efektima natrijum-sulfida. Efekat će se porediti i sa efektima cisteina i homocisteina, kao prekursora biosinteze vodonik-sulfida.

b. Identifikacija vrsta koje su dominantni nosioci efekata natrijum-sulfida

Budući da „H₂S“ obuhvata sve tri vrste (od kojih su H₂S i HS⁻ dominantne) koje se ne mogu fizički razdvojiti, razlikovanje njihovih efekata će se ispitati poređenjem efekata H₂S/HS⁻ sa CH₃SH, koji pri eksperimentalnim uslovima koji odgovaraju fiziološkim postoji samo u molekulskom obliku. Ovo poređenje efekata je značajno i iz aspekta utvrđivanja biološke važnosti metilacije H₂S.

c. Identifikacija ciljnih meta (jonskih kanala i drugih glasnika) koji su posrednici u relaksaciji

Ispitati učešće pojedinačnih kanala iz tri grupe kanala (K⁺, Ca²⁺ i Cl⁻ kanali) važnih za regulaciju kontraktilnosti uterusa, kao i klasičnih relaksacionih puteva

CILJEVI

indukovanih promjenom količine drugih glasnika (cAMP i cGMP) u relaksantnom odgovoru sulfida.

d. Ispitivanje modulacije relaksantnog efekta vodonik-sulfida polisulfidima i azot(II)-oksidom

Ispitaće se modulacija efekata sulfida polisulfidima i azot(II)-oksidom budući da su polisulfidi identifikovani kao nosioci aktivnosti H₂S, jer se iz njega generišu, kao i usled kompleksne biohemijske interekacije između NO i H₂S koje su do sada pokazane.

e. Ispitivanje redoks-osjetljivosti relaksantnog efekta

Tiolatni anjon (HS⁻) ima veliki afinitet za metalne centre nekih proteina, poput antioksidativnih enzima. S druge strane pokazano je da vodonik-sulfid uklanja reaktivne vrste kiseonika koje su supstrati antioksidativnih enzima. Kako su brojne komponente relaksacije redoks-osjetljive, ispitaće se efekti tretmana natrijumsulfidom na aktivnost enzima antioksidativne odbrane i okarakterisaće se interakcije H₂S sa datim enzimima.

f. Ispitivanje translacionog potencijala

U cilju identifikacije translacionog potencijala istraživanje će obuhvatiti testiranje efekata sulfida na humanom miometriju što, zajedno sa izučavanjem fundamentalnih mehanizama relaksantnog djelovanja vodonik-sulfida (na uterusu pacova), obezbjeđuje platformu za razvoj terapeutika koji bi adekvatno regulisali kontrakcije uterusa naročito kod prevremenih porođaja.

POGLAVLJE ČETVRTO

Materijal i metode

4.1 Reagensi i rastvori

U eksperimentalnom radu su korišćene hemikalije najveće čistoće i, osim ako nije drugačije naglašeno, dobavljane su od Sigma Aldrich (St Louis, MO, SAD).

Tabela 4.1 Lista korišćenih rastvora i pufera

Rastvori	
<i>Na₂S x 9 H₂O</i>	Kristal natrijum-sulfida se opere u miliQ vodi, potom se rastvori u maloj zapremini iste. Koncentracija sulfida se određuje spektrofotometrijski na 230 nm, a zatim sa DTNB na 412 nm (Nagy i sar, 2014)
<i>Sn²⁻</i>	Polisulfidi su pripremljeni miješanjem Na ₂ S i HOCl (Nagy i Winterbourn, 2010)
<i>„SSNO“</i>	Na ₂ S i GSNO (10:1; 3 minuta) - žuto obojeni produkt prema metodi Cortese Krott i sar. (2014)
<i>De Jalon (DJ)</i>	154 mM NaCl; 5,64 mM KCl; 5,95 mM NaHCO ₃ ; 0,41 mM CaCl ₂ ; 2,77 mM glukoza (pH 7,4)
<i>DJ bez bikarbonata</i>	10 mM HEPES, NaCl dodat u ekvimolarnom odnosu da bi održao osmolaritet
<i>Krebs Henseleit (KH)</i>	118 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 25 mM NaHCO ₃ ; 1,2 mM KH ₂ PO ₄ ; 1,25 mM CaCl ₂ ; 1,2 mM MgSO ₄ ; 11 mM glukoza (pH 7,4)
<i>KH bez bikarbonata</i>	25 mM HEPES, a NaCl dodat u ekvimolarnom odnosu da bi održao osmolaritet
<i>Saharozni pufer</i>	250 mM saharoza; 50 mM Tris; 1 mM EDTA (pH 7,4)
<i>PBS pufer</i>	137 mM NaCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 16,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2,7 mM KCl
<i>PBST pufer</i>	PBS sa 0,1% Tween-20
<i>RIPA pufer</i>	25 mM Tris-HCl; 1 mM Na ₂ EDTA; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% detergent Nonidet P-40; proteazne inhibitore (20 mM Na ₂ MoO ₄ , 0,15 mM spermin, 0,15 mM spermidin, 0,1 mM PMSF, 5 µg/ml antipain, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin) i fosfatazne inhibitore (20 mM β-glicerofosfat, 5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ x 10H ₂ O i 25 mM NaF); pH 7,4

MATERIJAL I METODE

Tabela 4.2 Lista korišćenih supstanci u esejima kontraktilnosti uterusa

Modulatori korišćeni u esejima kontraktilnosti				
<i>Modulator</i>	<i>Aktivnost</i>	<i>Koncentracija (μM)</i>	<i>Rastvarač (max konc.)</i>	<i>Porijeklo</i>
<i>TEA</i>	nespecifičan inhibitor K ⁺ kanala	1000	ddH ₂ O (100 mM)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD
<i>Glibenklamid</i>	inhibitor K _{ATP} kanala	2	polietilen glikol	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD
<i>4-AP</i>	inhibitor Kir kanala	1000	ddH ₂ O (100 mM)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD
<i>DIDS</i>	inhibitor CaCC kanala (BEST)	100	0,1M KHCO ₃ (10 mM)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD
<i>NFA</i>	inhibitor CaCC kanala	10	DMSO (100 mM)	Tocris Bioscience Abingdon, UK
<i>TA</i>	inhibitor CaCC kanala	50	ddH ₂ O	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD
<i>T16A_{inh}-A01</i>	inhibitor TMEM16A kanala	5	DMSO (100 mM)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD
<i>IAA-94</i>	inhibitor CLC-1 kanala	25	DMSO (70 mM)	Tocris Bioscience Abingdon, UK
<i>S-Bay 8644</i>	aktivator L-tip Ca ²⁺ kanala	0,1	DMSO (100 mM)	Alomone Labs Jerusalem, Izrael
<i>Propranolol</i>	inhibitor β-adreno receptora	1	etanol	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD
<i>Metilensko plavo</i>	inhibitor solubilne GC	1	ddH ₂ O (10 mM)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD

MATERIJAL I METODE

Tabela 4.3 Lista korišćenih supstanci i rastvora za elektroforetske i srodne analize

Reagensi za Western blot analizu			
PUZ (pufer za uzorke)	0,125 M Tris-HCl; pH 6,8; 0,4% β -merkaptotanol; 4% SDS; 1% brom-fenol plavo i 20% glicerol		
Transfer pufer za elektroforezu	0,192 M glicin; 20% metanol i 0,025 M Tris; pH 8,3		
Gelovi za elektroforezu			
za koncentrovanje	5% akrilamid/bisakrilamid; 0,1% SDS; 0,125 M Tris HCl; pH 6,8		
za razdvajanje	7,5% akrilamid/bisakrilamid; 0,1% SDS; 0,375 M Tris HCl; pH 8,8		
# Za polimerizaciju korišćeni 30% akrilamid/bisakrilamid (37,5:1); 0,05% amonijum persulfat (APS) i 0,033% N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED)			
1% TAE agarozni pufer	1g agaroze u 100mL TAE pufera (Tris-acetatni-EDTA pufer), pH 8,0		
2% TBE agarozni pufer	2g agaroze u 100mL TBE pufera (Tris-borat-EDTA pufer), pH 8,0		
Antijela			
Naziv	Porijeklo	Proizvođač	Razblaženje
Primarna			
Anti-Bestrofin-1	zec	Alomone, Izrael	1:2000
Anti-Bestrofin-1	zec	Alomone, Izrael	1:1500
Anti- β -actin	miš	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD	1:5000
# Primarna antitijela za bestrofine korišćena su i u imunohistohemijskom bojenju (detalji 3.9)			
Sekundarna			
Anti-zečije, obilježeno peroksidazom rena	magarac	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, SAD	1:5000
Anti-mišije, obilježeno peroksidazom rena	ovca	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, SAD	1:5000

MATERIJAL I METODE

Tabela 4.4 Sekvence prajmera korišćenih u RT-PCR i qRT-PCR

Prajmeri korišćeni za qRT-PCR			
Gen	Vrsta	Prajmer (5'-3')	Pristupni broj u bazi podataka
<i>BEST-1</i>	pacov	F: 5'-GCACCATTGGACGCTTCTTA-3' R: 5'-ACTGCTGAGGAGGAAGACC-3'	NM_001011940.1
<i>BEST-2</i>	pacov	F: 5'-GACGACGACGACTTCGAGAC-3' R: 5'-GGACACGCAGCTGTTCTTTC-3'	NM_001108895.1
<i>GAPDH</i>	pacov	F: 5'-GTGGACCTCATGGCCTACAT-3' R: 5'-GGATGGAATTGTGAGGGAGA-3'	NM_017008.4
<i>ACTIN</i>	pacov	F: 5'-AGATTACTGCCCTGGCTCCT-3' R: 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'	NM_031144.3
<i>CYCA</i>	pacov	F: 5'-CAAAGTTCCAAAGACAGCAGAAAA-3' R: 5'-CCACCCTGGCACATGAAT-3'	NM_017101.1
<i>18S</i>	pacov	F: 5'-TTCAGCACATCCTGCGAGTA-3' R: 5'-TTGGTGAGGTCAATGTCTGC-3'	NM_213557.1
<i>BEST-1</i>	čovjek	F: 5'-ATTGGGCCTTGGAAAACAG-3' R: 5'-GACTGGATCAGTGCCTGCTG-3'	NM_004183.3

Tabela 4.5 Enzimi korišćeni za EPR i enzimske eseje

Enzimi		
Enzim	Porijeklo	Proizvođač
<i>GR</i>	kvasac	Sigma Aldrich, St Louis, MO, SAD
<i>CuZnSOD</i>	pacov	prečišćena (Cleland i sar, 1983)
<i>CAT</i>	jetra govečeta	Sigma Aldrich, St Louis, MO, SAD

4.2 Laboratorijske životinje

U ovom istraživanju korišćene su negravidne ženke pacova soja *Wistar* starosti 10-12 nedelja, tjelesne mase ~220 g, gajene u vivarjumu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Životinje su boravile u plastičnim kavezima sa prostirkom od sterilne strugotine u uslovima konstantne temperature prostorije (22 ± 2 °C) i režimom osvetljenja 12h svetlo/12h mrak, čime je omogućen adekvatan dnevno-noćni ritam. Tokom izvođenja eksperimenata, životinjama voda i hrana su bile dostupne *ad libitum*.

4.2.1 Utvrđivanje faze ciklusa

Vaginalni sekret se uzima svakog jutra (8-10h) pipetom napunjenom sa 0,2 mL destilovane vode. Vaginalna tečnost se stavi na staklenu pločicu, koja se potom suši i boji hematoksilinom. Tri tipa ćelija se mogu uočiti. Okrugle ćelije sa nukleusom su epitelijalne ćelije. Ćelije nepravilnog oblika i bez nukleusa su kornifikovane (skvamozne). Male okrugle ćelije su leukociti. Odnos broja između ovih ćelija se koristi za određivanje faze estrusnog ciklusa. Dominantna formu ćelija čine: u pro-estrusu ovalne epitelijalne ćelije sa jedrima, u estrusu kornifikovane, anuklearne, ljuspastog oblika, u meta-estrusu se uočavaju sva tri tipa ćelija – leukociti, kornifikovane i ovalne epitelijalne ćelije sa jedrom, dok se u di-estrusu ističu leukociti, premda su prisutne i kornifikovane i ovalne ćelije sa jedrom (Marcondes i sar, 2002).

4.2.2 Uzorkovanje uterusa pacova

Sve procedure na životinjama su urađene u skladu sa EEC Direktivom (86/609/EEC) o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe, a odobreni su od strane Etičkog komiteta za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Životinje su žrtvovane dekapitacijom. Uterus pacova je uzorkovan tokom ~1 minuta. Uterus je diseciran, očišćen od masti i vezivnog tkiva stavljen u De Jalon rastvor.

MATERIJAL I METODE

4.2.3 Uzorkovanje humanog uterusa

Eksperimenti na humanim uzorcima su dobijeni uz pismenu saglasnost pacijenata (Local Research Ethics Committee (REC Ref: 10/H1002/49)). Upotreba tkiva miometrijuma odobrena je od strane MRTB (Myometrial Research Tissue Bank; Liverpool Women's NHS Foundation Trust Hospital, Liverpool, UK).

Biopsije tkiva trudnih pacijenata (1x1 cm) uzimane su odmah nakon porođaja carskim rezom i odmah stavljane u ohlađeni rastvor (*Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS): 137 mM NaCl; 5,1 mM KCl; 0,44 mM KH_2PO_4 ; 0,26 Na_2HPO_4 ; 5 mM glukoza; 10 mM HEPES; pH 7,2). Sve biopsije su uzimane i čuvane na način kako bi se spečila degradacija tkiva. Uzorci su tretirani na isti način. Biopsije su korišćene istog ili sledećeg dana nakon skladištenja na 4 °C (najviše 18 časova između uzimanja biopsije do njenog korišćenja; pokazano je se humani miometrijum koji se čuva do 18h na sobnoj temperature ne ponaša drugačije od svježih uzoraka (Hillock i Crankshaw, 1999; Senchyna i Crankshaw, 1999; Popat i Crankshaw, 2001)).

4.2.3.1 Disekcija humanih biopsija

Uzorci su u Krebsovom rastvoru očišćeni od krvi, endometrijuma i perimetrijuma. Otvaranje uterusa je urađeno na tup način, između snopova mišića, da bi se došlo do unutrašnjeg dijela tkiva koje nije bilo izloženo spoljašnjoj traumi. Male longitudinalne trake su disecirane pod mikroskopom, svaka 1x5 mm i stavljane su u Krebsov rastvor. Disekcija je urađena tako da disecirana traka sadrži mišićna vlakna koja se pružaju u istom pravcu.

4.3 Priprema tkiva za analize

4.3.1 Preparacija uterusa pacova za mjerenje kontraktilne aktivnosti

Izolovani i očišćeni uterusi su inkubirani u kupatilu (10 mL) za izolovane organe TSZ-04-E Tissue Bath System (Experimetria, Mađarska) u DJ rastvoru na 37 °C u trajanju od 30 minuta. Rastvor je sve vrijeme aerisan 95% O_2 i 5% CO_2 . Uterusi su stabilizovani tokom 60 minuta, pri opterećenju preparata od 1 g. Mehaničke kontrakcije izolovanog uterusa pacova su registrovane transdjuserom

MATERIJAL I METODE

Experimetria i promjene u izometrijskoj sili kontrakcija bilježene su pomoću odgovarajućeg softvera (Experimetria, Mađarska).

4.3.2 Preparacija humanog miometrijuma za mjerenje kontraktilne aktivnosti

Longitudinalne trake humanog miometrijuma (1x2 mm) su na krajevima fiksirane u aluminijumske držače, a zatim prenesene u mala kupatila za izolovane organe (1000 μ l), postavljene jednim svojim krajem na kraj eksperimentalnog kupatila, a drugim povezane sa transdjuserom (Fort10g isometric force transducer (WPI, Hertfordshire, UK)). Za razliku od pacovskog tkiva, humane kontrakcije su znatno ređe, te period ekvibracije traje minimum 120 minuta (pri opterećenju od 2 mN). Krebsov rastvor, je perfundovan kroz sistem pri protoku 3,5 ml/min i temperiran na 37 °C. Električni signali detektovani transdjuserom su amplifikovani i bilježeni pomoću axon CNS data digi 1440A data digiboard (Scientifica, Sussex, UK) koristeći Axon softver (Axoscope version 10.0, Molecular devices, Berkshire, UK), pri brzini snimanja od 1 kHz i mjerenju u mN.

4.3.3 Priprema tkiva za mjerenje aktivnosti antioksidativnih enzima

Nakon odmrzavanja, tkiva uterusa pacova su izmjerena i homogenizovana na 0-4 °C (Ultra-Turrax homogenizer, T25, Junke & Kunkel, Njemačka) u saharaznom puferu u odnosu 1:4. Tkiva su zatim homogenizovana 3 x 10 sekundi, sa pauzama od po 10 sekundi, a potom i sonifikovana 3 x 15 sekundi, sa pauzama od po 15 sekundi na frekvenciji od 10 KHz. Ovako tretirani uzorci su centrifugirani (Beckman L8-M, Kalifornija, SAD) 90 minuta na 37500 rpm. Nakon centrifugiranja odvajan je supernatant i čuvan na -20 °C, koji je dalje korišćen za određivanje koncentracije proteina i enzimske eseje.

4.3.4 Priprema tkiva za *Western blot* analizu

Tkiva uterusa pacova su macerirana, a zatim homogenizovana (Ultra-Turrax homogenizer, T25, Junke & Kunkel, Njemačka) na 0-4 °C u 4 zapremine RIPA pufera 3 x 30 sekundi, sa po 30 sekundi pauze. Sonifikacija uzoraka je

MATERIJAL I METODE

urađena pri jačini od 10 kHz, 3 x 15 sekundi, sa po 15 sekundi pauze. Potom je sonifikat centrifugiran u Beckman L8-M (Kalifornija, SAD) ultracentrifugi, 20 minuta na 16000 g. Dobijeni supernatanti su korišćeni za određivanje koncentracije proteina i *Western blot* analizu.

4.3.5 Priprema tkiva za RT-PCR analizu - izolovanje RNK

Izolovanje RNK je započeto homogenizovanjem uterusa pacova (50 mg) sa 0,5 mL TRIzol reagensa (rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, koji razara ćelije ne remeteći integritet RNK; Life Technologies, Grand Island, Njujork, SAD). Nakon homogenizacije, tkivo je inkubirano na ledu 5 minuta u cilju što bolje disocijacije nukleoproteinskog kompleksa. Zatim je homogenat inkubiran sa hloroformom (100 μ L) na 4 °C 2-3 min, pa centrifugiran na 12000 g, 20 min, na 4 °C, pri čemu se postiže razdvajanje homogenata u tri faze. Gornjem vodenom sloju supernatanta je dodat izopropil-alkohol (250 μ L) u cilju precipitacije RNK (10 minuta inkubacija na ledu) i dobijeni talog je centrifugiran 12000 g, 20 minuta, 4 °C. Slabo vidljiv talog RNK je zatim ispiran 75% etanolom za odstranjivanje tragova fenola. RNK je resuspendovana, dva puta isprana i centrifugirana na 7500 g na 4 °C, 5 minuta. Uzorci RNK finalno su rastvoreni u dietilpirokarbonatnoj (DEPC) vodi.

4.3.6 Kalupljenje tkiva u parafinu

Odrasle ženke pacova u stadijumu estrusa su žrtvovane dekapitacijom. Nakon žrtvovanja izolovan je uterus, sa kog je pažljivo odstranjeno masno tkivo. Oba roga uterusa su frakcionisana, u tri nivoa: donji dio - bliži cerviksu, središnji dio i gornji dio - bliži ovarijumu. Djelovi uterusa fiksirani su u 4% paraformaldehidu u trajanju od 24 sata. Nakon fiksacije, uterusu su dehidratisani u seriji etanola rastuće koncentracije (30-100%), prosvijetljeni u ksilolu i ukalupljeni u paraplustu (Histowax, HistoLab Product AB, Švedska). Potom su siječeni na presjeke debljine 3 μ m, rotacionim mikrotomom (Leica Microsystems GmbH, Njemačka).

4.4 Efekti sulfida na kontrakcije uterusa

Efekti sulfida ispitivani su najprije na uterusu pacova. Karakterizacija efekata, kao i ispitivanje koji posreduju u njegovom relaksantnom efektu, urađena je takođe na uterusu pacova. U cilju povećanja translacionog potencijala ovog istraživanja efekat sulfida je ispitan na kontrakcije humanog miometrijuma (trudnog) dobijenog nakon carskog reza.

4.4.1 Efekat sulfida na kontrakcije uterusa - karakterizacija efekta; ispitivanje mehanizama relaksacije

U ovoj studiji korišćeni su različiti tipovi aktivacije uterusa pacova: sponatno-aktivni uterusi, kalcijum-indukovani (4,9 mM Ca^{2+}), oksitocinom-aktivirani (OT, 5 nM) i uterusi stimulisani KCl (15 mM) i depolarišućim KCl (75 mM). Spontane i kalcijumske kontrakcije se razlikuju u pogledu frekvencije: kalcijumske kontrakcije imaju znatno veću frekvenciju. U slučaju oksitocinom-indukovanih kontrakcija, karakterističan je porast bazne linije i amplitude. Fazne kontrakcije izazvane sa 15 mM KCl slične su spontanim kontrakcijama. Depolarišuća koncentracija KCl uzrokuje karakterističnu brzu kontrakciju, koja je praćena malom relaksacijom i prolongiranom plato fazom.

Dozno zavisna kriva efekata natrijum-sulfida urađena je na svim tipovima aktivacije (20–200 μM Na_2S i 5-150 μM Na_2S). Nakon što bi se dobila stabilna kontrakcija (ujednačene amplitude i frekvence u vremenu) agens je dodavan direktno u kupatilo za izolovane ograne na kumulativan način. Način djelovanja Na_2S , uslovio je i način njegove aplikacije, tj. vremenski trenutak dodavanja istog (tretman sledećom dozom bi uslijedio nakon potpunog (maksimalnog) oporavka izazvanog prethodnim tretmanom). Svi eksperimenti su urađeni kao jedinstvena dozno-zavisna kriva na jednom preparatu uterusa. Za svaki eksperiment rađene su odgovarajuće kontrole (vremenska kontrola, kontrola efekata rastvarača). Odgovor tkiva u kontrolnim uzorcima korišćen je da bi se normalizovali efekti samog agensa.

Efekat sulfida poređen je sa efektima cisteina (1-1000 μM), homocisteina (10-1000 μM), metantiola (100–600 μM), koji su slično njemu dodavani direktno u

MATERIJAL I METODE

kupatilo za izolovane organe. Sam efekat sulfida testiran je u prisustvu povećane koncentracije homocisteina (500 μM i 1000 μM).

Ispitivanje ciljnih molekula koji mogu posredovati u efektima sulfida testirano je na sledeći način: pretretman uterusa odgovarajućim inhibitorom/aktivatorom/modulatorom bi prethodio aplikaciji sulfida (lista korišćenih modulatora data je u **Tabeli 3.2**). Optimalna koncentracija inhibitora/aktivatora/modulatora (IC_{50}), kao i optimalno vrijeme inkubacije, određeno je u odvojenim eksperimentima. Ovi eksperimenti su ponavljani od 6-10 puta na spontano- i Ca^{2+} -aktiviranim uterusima. Da bi se razdvojili efekti određenih modulatora, u ovom slučaju DIDS, koji je inhibitor hloridnih kanala, ali i hloridno-bikarbonatnog jonoizmjenivača, korišćen je pufer bez bikarbonata koji je zamijenjen odgovarajućom koncentracijom HEPES. Da bi se pratile promjene pH koje mogu nastati tretmanom sa Na_2S , što posledično može smanjivati kontrakcije, korišćeni su puferi različitih puferskih kapaciteta sa i bez bikarbonata (DJ, DJ bez bikarbonata, KH, KH bez bikarbonata).

Svi uterusu su na kraju eksperimenta zamrznuti u tečnom azotu i dalje korišćeni za mjerenje aktivnosti antioksidativnih enzima.

4.4.2 Efekti sulfida na kontrakcije humanog miometrijuma

Efekti sulfida su ispitani na sponatno aktivnom humanom miometrijumu. Spontanom kontrakcijama je prethodio period ekvibracije od 120 minuta. Adekvatne vremenske kontrole i kontrole rastvarača su urađene za svaki eksperiment. Odgovor tkiva u kontrolnim uzorcima korišćen je da bi se normalizovali efekti samog agensa.

Nakon što bi se dobila stabilna kontrakcija (ujednačene amplitude i frekvence u vremenu) agens je perfundovan 30 minuta kroz sistem i na taj način je dobijena dozno-zavisna kriva (Na_2S 0,3–100 μM). ATB-346 (od engl. ((2-(6-methoxynaphtalen- 2-yl)-propionic acid 4-thiocarbamoyl-phenyl ester), HTB (od engl. 4-hydroxythiobenzamide) i naproksen su perfundovani takođe 30 minuta (10 i 30 μM).

4.4.3 Analiza rezultata kontraktilnosti

Kontraktilnost uterusa je analizirana na osnovu tri parametra: amplituda, frekvenca i AUC (engl. *area under curve*). Analize kontrakcija uterusa pacova urađene su pomoću programa Experimetria (Mađarska), a humanog miometrijuma pomoću programa Origin Pro (Version 8.5).

4.4.3.1 Amplituda

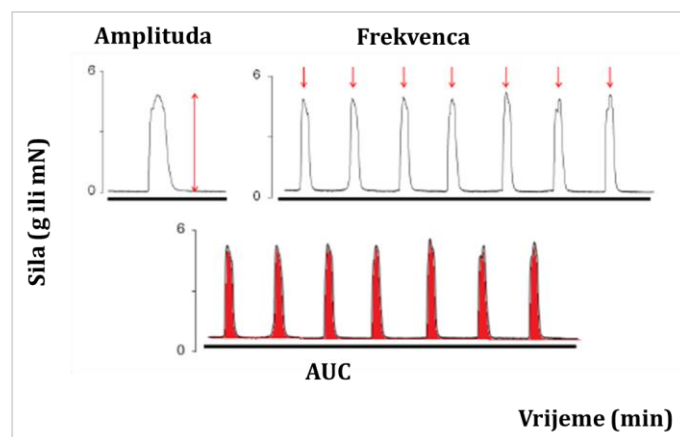
Snaga kontrakcija je mjerena u odnosu na baznu liniju. Efekat tretmana je poređen sa kontrolnim periodom unutar istog eksperimenta, kontrakcije uterusa pacova su analizirane 10 minuta, a humane 30 minuta, budući da su manje frekventne (**Slika 3.1**).

4.4.3.2 Frekvenca

Analiza frekvencija je urađena za isti period u kome je rađena analiza amplituda (vrijeme je računato između pika početne kontrakcije i pika poslednje kontrakcije).

4.4.3.3 AUC

AUC predstavlja integral sile i on je mjera efekata određenog agensa i na amplitudu i frekvenciju, kao i na trajanje kontrakcija.



Slika 4.1 Parametri analize kontraktilnosti

4.5 Određivanje količine proteina

U alkalnim uslovima, kupri joni bakra (Cu^{2+}) se heliraju za peptidne veze proteina što rezultuje u njegovoj redukciji do kupro jona (Cu^+). Kupro joni se mogu detektovati Folin Čikalteovim (engl. *Folin Ciocalteu*) reagensom, tzv. metoda po Loriju (Lowry i sar, 1951). Proizvod je plave boje i asporbuje pri 650-750 nm, a intezitet boje odgovara količini peptidnih veza, odnosno proteina. Koncentracija proteina se izražava u mg/ml.

Uzimano je 20 μl uzoraka razblaženih 10 puta u destilovanoj vodi i miješano (uz snažno vorteksiranje) sa 300 μl rastvora 2% Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH, 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i 2% K-Na-tartarat u H_2O , pomiješanih u razmjeri 98:1:1. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodavano po 60 μl Folin Čikalteu reagensa razblaženog 5 puta u destilovanoj vodi. Narednih 30 minuta, koliko je potrebno za razvijanje plave boje, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi uz povremeno vorteksiranje. Apsorbanca uzoraka mjerena je na 670 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče. Za konstruisanje standardne krive, na osnovu koje su određivane koncentracije proteina u uzorcima, korišćen je rastvor BSA (0,1-1 mg/ml) u destilovanoj vodi.

4.6 Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

Sva određivanja aktivnosti antioksidativnih enzima podrazumijavaju: adekvatno rukovanje uzorcima (uzorci se drže na ledu), uzorci se prije dodavanja u reakcionu smjesu snažno promućkaju na Vortexu, ukoliko je moguće, određivanja aktivnosti svih uzoraka se sprovodi u istom danu ili drugog dana kada su temperaturni uslovi slični (naročito važno za SOD, čije se aktivnost dramatično mijenja sa temperaturom). Sva spektrofotometrijska mjerenja urađena su u triplikatu na uređaju Shimadzu UV-160 spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments, Shimadzu Corporation, Kjoto, Japan).

4.6.1 Određivanje aktivnosti CuZnSOD

Aktivnost SOD određivana je adrenalinskom metodom (Misra i Fridovich, 1972), koja je metoda "negativnog" tipa, pošto se prati smanjenje brzine auto-oksidacije epinefrina u alkalnoj sredini, koja je zavisna od $O_2^{\bullet-}$. Superoksid, koji je supstrat za SOD, generiše se indirektno u alkalnoj sredini kao posledica reakcije kiseonika sa epinefrinom. Nastali superoksid povratno ubrzava auto-oksidaciju adrenalina. Prisutna SOD uklanja $O_2^{\bullet-}$ i pri tome inhibira reakciju auto-oksidacije. Zavisnost procenta inhibicije od SOD koncentracije ima oblik hiperbole, što je u suprotnosti sa prirodom većine enzima, kod kojih je ova zavisnost linearna.

Brzina auto-oksidacije adrenalina jednaka je nagibu linearnog dijela porasta apsorbance (480 nm) koji odgovara brzini nastanka proizvoda (adrenohroma). Proces se prati spektrofotometrijski u odsustvu enzima - referentna (kontrolna) reakcija i u prisustvu uzorka, odnosno SOD. Procenat inhibicije auto-oksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju auto-oksidacije adrenalina, korišćen je za izračunavanje SOD aktivnosti (jedinica aktivnosti (U) definisana je kao količina proteina koja uzrokuje 50% inhibicije brzine auto-oksidacije adrenalina u linearnom dijelu porasta apsorbance).

U 3 ml karbonatnog pufera pH 10,2 dodaje se rastvor adrenalina (10 mM - promjena A/min treba da bude 0,020-0,022). Auto-oksidacija adrenalina je praćena u toku 10-12 minuta na 480 nm svaki minut (stabilan plato na 50%

MATERIJAL I METODE

inhibicije). Reakcija je stabilna u temperaturnom opsegu 26-30 °C. Kontrolna reakcija se radi uporedo sa mjerenjem auto-oksidacije uzorka. Pri mjerenju auto-oksidacije uzorka u reakcionu smešu se dodaje zapremina uzorka koja treba da proizvede 50% inhibicije od vrijednosti dobijene za slijepu probu, ali se može kretati u opsegu 40-60% inhibicije.

$$\text{Aktivnost} = \frac{(\Delta K - \Delta A) \times 2 \times R}{V \times C_{pr} \times \Delta K} * \left(\frac{U}{\text{mg}}\right)$$

ΔK - promjena apsorbance kontrolne reakcije u minuti,
 ΔA - promjena apsorbance reakcije sa uzorkom u minuti ,
 V - zapremina reakcione smješe,
 C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml),
 R - razblaženje.

4.6.2 Mjerenje aktivnosti CAT

Aktivnost katalaze je određivana metodom po Klejbornu (Claiborne, 1985). Vodonik-peroksid ima maksimum apsorpcije na 240 nm. Aktivnost CAT se mjeri praćenjem razlaganja H_2O_2 , odnosno padom absorbance na datoj talasnoj dužini. Za slijepu probu koristi se fosfatni pufer, bez H_2O_2 . Prati se pad absorbance u roku od 3 minuta (5 merenja na po 30 sekundi). Srednja vrednost promjena absorbanci treba da bude u opsegu 0,03-0,06.

$$\text{Aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 1000 \times V_{rs} \times R}{43,6 \times C_{pr} \times V_{uz}} * \left(\frac{U}{\text{mg}}\right)$$

ΔA_{uz} - srednja promjena apsorbance uzorka u minuti,
 ΔA_{bl} - srednja promjena apsorbance blanka u minuti,
 V_{rs} - zapremina reakcione smješe,
 V_{uz} - zapremina uzorka (ml),
 C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml),
 43,6 - molarni ekstinkcioni koeficijent za H_2O_2 ($M^{-1}cm^{-1}$),
 R - razblaženje

4.6.3 Određivanje aktivnosti GSH-Px

Za određivanje aktivnosti GSH-Px koristi se modifikovana metoda Paglia i Valentine (1967). Princip metode se oslanja na prirodu reakcije koju katalizuje GSH-Px - redukciju hidropersida redukovanom glutationom. Enzim sadrži selenocistein u aktivnom mjestu koje učestvuje direktno u dvoelektronskoj redukciji peroksida. Enzim koristi glutation kao donor elektrona da bi regenerisao redukovanu formu selenocisteina. Nastali oksidovani glutation se može reciklirati dejstvom GR i NADPH (donor vodonika). Stoga ova metoda mjeri aktivnost GSH-Px indirektno, preko reakcije kuplovane sa GR. Oksidacija NADPH do NADP⁺ se može pratiti kao smanjenje apsorpcije na 340 nm. Pad A₃₄₀ je direktno proporcionalan GSH-Px aktivnosti u uzorku.

U kvarcnu kivetu se redom doda 1,5 ml destilovane vode; 0,3 ml GSH; 0,6 ml NADPH; 0,1 ml NaN₃; 0,1 ml EDTA; 0,3 ml fosfatnog pufera pH 7,0; 0,2 ml uzorka; 0,1 ml t-butilhidropersida i 0,005 ml glutation-reduktaze (**Tabela 4.5**; GR standardizovana naspram GSH). Dodatkom GR počinje reakcija. Za slijepu probu koriste se isti rastvori bez uzorka i uzima se 1,6 ml destilovane vode. Mjeri se apsorbanca na 340 nm, pri t=37 °C, svakih 30 sekundi u toku 150 sekundi.

$$\text{Aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 3000}{6.22 \times V \times C_{pr}} * \left(\frac{\text{nM NADPH}}{\text{min}} \right) \left(\frac{\text{mg prot}}{\text{mg prot}} \right)$$

ΔA_{uz} - promjena apsorbanca uzorka u minuti,

ΔA_{bl} - promena apsorbanca blanka u minuti,

V - zapremina uzorka (ml),

C_{pr} - koncentracija proteina dobijena (mg/ml),

6.22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH (M⁻¹cm⁻¹)

4.6.4 Određivanje aktivnosti GR

Glutation-reduktaza katališe redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) uz oksidaciju NADPH. Aktivnost glutation-reduktaze je određivana metodom Glatzle i saradnika (1974). Aktivnost GR se prati preko brzine oksidacije NADPH, odnosno mjerenjem smanjenja apsorbanca na 340 nm.

U kvarcnu kivetu se sipa 0,6 ml fosfatnog pufera pH 7,4; 0,1 ml GSSG; 0,1 ml EDTA; 2 ml destilovane vode; 0,1 ml uzorka i 0,1 ml NADPH (reakcija počinje

MATERIJAL I METODE

tek kada se on doda). Za slijepu probu se koriste isti rastvori samo bez uzorka. Apsorbanca se prati spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm prema slijepoj probi, na temperaturi od 37 °C, svakih 30 sekundi tokom 150 sekundi.

$$\text{Aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 3000}{6.22 \times V \times C_{pr}} * \left(\frac{\text{nM NADPH}}{\text{min}} \right) \left(\frac{\text{mg prot}}{\text{mg prot}} \right)$$

ΔA_{uz} - promjena apsorbance uzorka u minuti,

ΔA_{bl} - promena apsorbance blanka u minuti ,

V - zapremina uzorka (ml),

C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml),

6.22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH ($M^{-1}cm^{-1}$)

4.7 Western blot

4.7.1 SDS PAGE

Proteini su razdvojeni na osnovu razlika u molekulskim masama metodom denaturišuće natrijum-dodecilsulfat-poliakrilamid gel elektroforeze (SDS-PAGE; engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), po modifikovanoj metodi Lemlilija (Laemmli, 1970), na aparatu Mini-Protean II Electrophoresis Cell (BioRad, Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD). Uzorci uterusu (30 µg) su pripremani kuvanjem (5 minuta na 100 °C) u jednakoj zapremini pufera za uzorke. Proteini su razdvojeni na 7,5% gelu u trajanju od 90 minuta i pri konstantnom naponu od 120 V. Kao molekulski marker korišćena je smješa referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10-170 kDa, Fermentas, Hanover, MD, SAD).

4.7.2 Imunoblot

Proteini od interesa su detektovani metodom *Western blot*, koja pored elektroforetskog razdvajanja proteina uključuje i prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF (polivinilidien fluorid) membranu i njihovu detekciju pomoću specifičnih primarnih i sekundarnih antitijela.

Nakon završene elektroforeze poliakrilamidni gelovi su inkubirani u puferu za transfer 30 minuta. PVDF membrane (Immobilon-FL, veličine pora 0,45 µm, Millipore Corporation, Italija) su aktivirane 100% metanolom, a potom i

MATERIJAL I METODE

inkubirane u puferu za transfer. Membrane su zajedno sa gelovima pakovane i premještene u rezervoare sa transfer puferom. Prenos proteina sa gelova na membrane odvijao se metodom mokrog (engl. *wet*) transfera preko noći, pri konstantnoj struji od 135 mA po gelu, na temperaturi od 4 °C, u aparaturi Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD). Kvalitet transfera provjeravan je bojenjem membrana 1% rastvorom Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini.

Nespecifična mjesta vezivanja proteina na membranama blokirana su inkubiranjem u puferu za blokiranje (PBS pufer sa 5% nemasnim mlijekom) u trajanju od 60 minuta na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Membrane su inkubirane sa primarnim antitijelima specifičnim za protein od interesa preko noći na 4 °C (**Tabela 4.3**). Nakon inkubacije i ispiranja viška primarnog antitijela, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitijelom (**Tabela 4.3**) 60 minuta na sobnoj temperaturi.

Vezana antitijela detektovana su hemiluminescencijom (ECL, GE Healthcare, Bakinghemšir, UK). Količina proteina mjerena je denzitometrijski, upotrebom programa ImageJ (Nacionalni institut za zdravlje, SAD) i preračunata u odnosu na količinu β -aktina, što je izraženo grafički na slikama.

4.8 RT-PCR

4.8.1 Sinteza prvog lanca kDNK

Nakon izolovanja, RNK molekuli su prevedeni u komplementarnu DNK (kDNK) reakcijom reverzne transkripcije (RT). Prevođenje RNK u kDNK rađeno je po upustvima proizvođača korišćenog kita (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, SAD), koji se sastoji od: nasumičnih heksamernih prajmera, 100 mM rastvora sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, po 2 mM ATP, TTP, GTP i CTP), pufera za reverznu transkripciju, enzima reverzne transkriptaze i inhibitora RNaze. Za reakciju prevođenja RNK u kDNK pravljena je originalna smješa koja se sastoji od 10 μ l uzorka (3 μ g RNK rastvorene u DEPC vodi); 2 μ l pufera za reverznu transkripciju; 0,8 μ l 100 mM rastvora sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata; 2 μ l nasumičnih prajmera; 1 μ l enzima

MATERIJAL I METODE

reverzne transkriptaze; 1 μ l inhibitora RNaze i 3,2 μ l DEPC vode. Uzorci su inkubirani na 25 °C u trajanju od 10 minuta, a zatim na 37 °C, temperaturi optimalnoj za funkcionisanje reverzne transkriptaze, u trajanju od 120 minuta.

Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka 5 minuta na 85 °C, temperaturi na kojoj dolazi do inaktivacije enzima reverzne transkriptaze i razdvajanja sintetisanih lanaca kDNK. Uzorci kDNK su čuvani na -20 °C do dalje upotrebe.

4.8.2 Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (qRT-PCR)

U eksperimentima je korišćena mikroploča sa 96 bunarčića, prilagođena za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, Kalifornija, SAD) i u svaki od bunarčića je dodavano po 5 μ l reakcione smeše SYBR Green PCR Master Mix, koji sadrži potrebnu fluorescentnu boju SYBR Green, enzim AmliTaq Gold (DNK polimeraza), dNTP i po 0,5 μ l specifičnih prajmera (finalna koncentracija prajmera je 500 nM) za gen od interesa ili za referentni gene. Korišćeni parovi prajmera prikazani su u **Tabeli 4.4**. Potom je u svaki od bunarčića dodavano po 4 μ l odgovarajućeg uzorka kDNK. Svi uzorci su rađeni u kvadruplikatima. Bunarčići su zapečaćeni optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD), ploča je centrifugirana 2 minuta na 1200 x g, prenijeta u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000, Applied Biosystems, Kalifornija, SAD). Umnožavanje podrazumijeva inicijalnu denaturaciju 1 minut na 95 °C, a amplifikacija (40 ciklusa) je rađena kroz tri ciklusa: 15 sekundi na 95 °C (denaturacija lanaca), 1 minut na 60 °C (odnosno 5 °C više od T_m prajmera) za vezivanje prajmera i elongaciju lanaca. Po završenom umnožavanju se postepeno snižava temperatura termo bloka, uz praćenje smanjenja intenziteta fluorescence, koje odgovara disocijaciji nastalog proizvoda. Ovaj korak obezbjeđuje provjeru kontaminacije uzoraka genomskom DNK, kao i eventualnog nastanka tzv. dimera prajmera. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski program (7500 System software; Applied Biosystems, Kalifornija, SAD) za kvantitativni PCR. Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na

MATERIJAL I METODE

ekspresiju referentnog gena detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} , gdje je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i referentnog gena.

4.8.3 **End point PCR – identifikacija BEST-1 u humanom miometriju**

Genska ekspresija BEST-1 u humanom miometriju identifikovana je korišćenjem tehnike „end-point“ PCR (BioRad T100 Thermal Cycler (BioRad, Hertfordshire UK). Korišćeni parovi prajmera prikazani su u **Tabeli 4.4**. Najprije je optimizovana optimalna temperatura za vezivanje prajmera korišćenjem temperaturnog gradijenta, na osnovu kojeg su određene tri temperature (59.9, 55.8 and 52.4°C) na kojima je dalje rađena procedura. Svaka reakcija (10 μ L) sastojala se iz 2,5 μ L kDNK (10ng/ μ L), 0,5 μ L smješe prajmera (500nM), 5 μ L HotStarTaq® (Qiagen, Manchester UK) i 2,5 μ L vode (*nuclease free*). Umnožavanje je rađeno na željenom programu: 95°C vrući start (15minuta), praćeno sa 35 ciklusa koji podrazumijevaju: denaturaciju na 95°C (30 sekundi), temperaturni gradijent za vezivanje prajmera (30 sekundi) i ekstenziju na 72°C (1 minut). Nakon završetka postoji i korak finalne ekstenzije na 72°C 10 minuta. Uzorci su čuvani u frižideru do elektroforetskog razdvajanja.

4.8.3.1 **Gel elektroforeza - razdvajanje produkata**

Da bi vizuelizovali produkte i identifikovali njihove veličine, nakon umnožavanja isti su razdvajani na agaroznoj gel elektroforezi. Budući da su uočene dvije trake, njihovo razdvajanje je rađeno na 1% TAE gelu (za veći fragment) i na 2% TBE gelu (za manji fragment). Za vizuelizaciju korišćen je SYBR®Safe, a uzorci su razdvajani pri konstantnoj voltaži na 110V (60 – 90 minuta). Gelovi su skenirani pomoću ChemiDoc-It®^{TS2} Imager (UVP, Cambridge UK) a veličina fragmenta određena pomoću odgovarajućih markera. Da bi se potvrdilo odsustvo genomske DNK u originalnom RNK uzorku, kao i da bi se dodatno potvrdilo odsustvo DNK genomske kontaminacije pored uzoraka elektroforezom su razdvajani i –RT (uzorak bez reverzne transkriptaze) kao i NTC (od eng. no template control).

4.9 Imunohistohemijsko bojenje

Nakon deparafinizacije, presjeci uterusa su rehidratirani, a potom ispirani u 0,01 M fosfatnom puferu (pH 7,6; 10 minuta). Za bolju detekciju BEST-1 i BEST-2, prije postupka imunocitohemije, korišćena je tehnika demaskiranja antigena, koja ima za cilj bolje otkrivanje antigena, pošto u toku fiksacije tkiva dolazi do formiranja kovalentnih veza između aldehida iz fiksativa i antigena. Ovaj postupak zahtijeva tretiranje preparata 0,01 M citratnim puferom (pH 6) u mikrotalasnoj pećnici na 750 W, 3 x 7 minuta.

4.9.1 Imunohistohemijska PAP metoda

Nakon demaskiranja antigena i blokiranja endogene peroksidaze (0,3% H₂O₂ u metanolu), radi izbjegavanja pozadinskog bojenja, preseci su inkubirani u normalnom svinjskom serumu (engl. *normal swine serum*, Dako Dakopatts, Danska, razblaženje 1:10 u PBS) u trajanju od 1h. Presjeci potom nisu ispirani, već su inkubirani sa anti-pacovskim primarnim antitijelima, uzgojenim u zecu, za BEST-1 (Alomone Labs, Izrael, 1:50 u PBS) i za BEST-2 (Alomone Labs, Izrael, 1:50 u PBS), preko noći na 4 °C. Narednog dana, presjeci su isprani u PBS i inkubirani sa sekundarnim antitijelom (svinjski anti-zečiji IgG; Dakopatts, Danska) razblaženim u PBS 1:500, u trajanju od 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u PBS, vizuelizacija je obavljena pomoću hromogenog supstrata DAB (Dako A/S, Danska). Kontrastiranje je obavljeno Mayer hematoksilinom (Merck-Alkaloid, Alkaloid, Makedonija), dehidratacija serijom etanola rastuće koncentracije (96-100%) i montiranje pokrovnog stakla DPX (Fluka, Švajcarska).

4.9.2 Imunofluorescentna metoda

Nakon deparafinizacije, rehidratacije, ispiranja u 0,01 M fosfatnom puferu (pH 7,6; 10 minuta) i demaskiranja antigena, preseci su inkubirani u normalnom serumu magarca (engl. *normal donkey serum*, Sigma Aldrich, SAD; razblaženje 1:10) u trajanju od 60 minuta, sa ciljem blokiranja nespecifičnog bojenja. Presjeci potom nisu ispirani, već su inkubirani sa anti-pacovskim primarnim antitijelima, uzgojenim u zecu, za BEST-1 (Alomone Labs, Izrael, razblaženim 1:50 u PBS) i za

MATERIJAL I METODE

BEST-2 (Alomone Labs, Izrael, razblaženim 1:50) preko noći na 4 °C. Sledećeg dana višak antitela je ispran u PBS (3x10 minuta) i presjeci su inkubirani sa sekundarnim antitijelom konjugovanim sa Alexa Flour 488 fluorescentnom bojom (magareći anti-zečiji IgG; Molecular Probes Inc, SAD, razblaženim 1:400 u PBS), u trajanju od 2h. Nakon ispiranja, 10 x 5 minuta u PBS, montirana su pokrovna stakla Moviolom 4-88 (Sigma Aldrich, SAD). Preparati su analizirani i fotografisani korišćenjem Zeiss Axiovert (Carl Zeiss GmbH, Njemečka) fluorescentnog mikroskopa opremljenim kamerom i EC Plan-Apochromat.

4.10 EPR

Analiza interakcija H₂S sa enzimima rađena je korišćenjem EPR spektroskopije. Sva snimanja rađena su na Bruker spektrometru (Bruker Eleksys-II EPR, Oxford Instruments ESR900, SAD). Centar polja u svim mjerenjima bio je 3410G, frekvencija mikrotalasa je bila 9,4 GHz, modulaciona frekvencija nije mijenjana i iznosila je 100 kHz, opseg skeniranja podešen je u skladu sa širinom EPR spektra datog uzorka, a pojačanje je mijenjano po potrebi. Modulaciona amplituda (MA) i snaga mikrotalasa (P) su podešavani u zavisnosti od uzorka i njihove vrijednosti i navedene su uz svaki snimljeni EPR spektar. Sva snimanja urađena su na sobnoj temperaturi. Mjerenja su urađena korišćenjem kvarcnih kapilara u koje su postavljene teflonske tube sa uzorcima. Enzimi su bili netretirani ili tretirani Na₂S i KO₂ (Sigma Aldrich, St Louis, MO, SAD) u finalnim koncentracijama 2 mM i 1 mM (5% DMSO). Svi rastvori su napravljeni korišćenjem bidestilovane dejonizovane ultračiste vode . Uzorci su inkubirani 30 sekundi na sobnoj temperaturi, potom stavljeni u kvarcne EPR tube i brzo zamrzavani u hladnom izopentanu. Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu (prikazani su reprezentativni spektri). Spektri su bilježeni korišćenjem EW softvera (Scientific Software, Bloomington, IL, SAD).

4.11 Bioinformatička pomagala

4.11.1 Molekulsko modelovanje

Molekulsko modelovanje je *in silico* metoda kojom se predviđa terciarna struktura proteina iz primarne sekvence, odnosno modelovanje pokušava da predvidi sekundarnu, terciarnu i kvaternu strukturu proteina iz njegove primarne sekvence. Predviđanje strukture proteina je fundamentalno različit problem of dizajna proteina.

Modelovanje na osnovu homologa (engl. *homology modelling*), poznato kao komparativno modelovanje proteina je metoda kojom se konstruiše model ciljanog proteina iz njegove primarne sekvence (meta) i eksperimentalne strukture sličnog proteina (templata). Komparativno modelovanje proteina se zasniva na identifikaciji jednog ili više homologog proteina sa poznatom trodimenzionalnom strukturom i pravljenju preklopnih mapa aminokiselinskih ostataka između templata i mete. Molekulski doking (engl. *molecular docking*, protein-ligand docking) predstavlja računarsku metodu za pronalaženje najoptimalnije trodimenzionalne vezivne strukture proteina i njegovog liganda. Cilj molekuskog dokinga je predviđanje optimalne vezivne strukture između liganda i proteina, kao kad se vezuju *in vivo*. Doking predviđa moguće kandidate (poze), koji se rangiraju koristeći matematičke metode, najčešće scoring funkcije (engl. *scoring functions*), a najviše rangirana poza je ona za koju se predviđa da će se javljati pod fiziološkim uslovima u ćeliji. Postoje više različitih metoda dokinga koje se razlikuju prema aproksimacijama koje uzimaju u obzir, na primer reprezentacija molekula, evaluacija energije, uzorkovanje mogućih konformacija, a sve u cilju da se predvidi realna poza sa najmanjim računarskim zahtevima i najkraćim vremenom proračuna. Za sve simulacije korišćen je AutoDock Vina 1.1.2 softver (Trott i sar, 2010).

4.11.2 Metode i softver

AutoDock Vina koristi vrlo napredni algoritam zasnovan na metodi optimizacije gradijenata u svojoj lokalnoj proceduri optimizacije. Izračunavanje gradijenata, efektivno daje algoritmu 'osjećaj' u kom pravcu treba nastaviti

MATERIJAL I METODE

proračune. AutoDock Vina program koristi posebnu skoring funkciju - Vina skoring funkciju, posebno razvijenu za ovaj programski paket kako bi bila u skladu sa ostalim parametrima koje ovaj program koristi.

Vina skoring funkcija je izvedena koristeći prednosti empirijskih potencijala i empirijskih skoring funkcija. Ona koristi empirijske informacije dobijene iz analize najzastupljenijih konformacija receptor-ligand kompleksa. Vina skoring funkcija je dijelom zasnovana na *X-score* i *nalik X-score* funkciji, Vina skoring funkcija je podešena koristeći PDBbind.

4.11.3 Priprema receptora

4.11.3.1 Humana katalaza

Kristalna struktura humane katalaze (PDB Code 1QQW) je iskorišćena za modelovanje, bez prisustva liganada. Budući da je protein homotetramer, jedino je subjedinica A korišćena za modelovanje kako bi se skratilo ukupno vreme trajanja proračuna (Tehrani i sar, 2012). Gajstajger naelektrisanja (engl. *Geisteiger point charges*) su dodata svim atomima, osim atomu gvožđa, koristeći AutoDock Tools version 1.5.6 Sep_17_14 softverski paket (Sanner, 1999). Zasebno, naelektrisanje za Fe atom je postavljeno na +2.0 (Pang i sar, 2013).

4.11.3.2 Goveđa katalaza

Kristalna struktura goveđe katalaze (PDB Code 1TH3) je iskorišćena za modelovanje. Cijanid kao ligand je uklonjen da ne bi uticao na moguće vezivanje. Korišćena je subjedinica A tetramera korišćena za modelovanje Gajstajger naelektrisanja (engl. *Geisteiger point charges*) su dodati svim atomima, osim atomu gvožđa, koristeći AutoDock Tools version 1.5.6 Sep_17_14 softverski paket (Sanner, 1999). Zasebno, naelektrisanje za Fe atom je postavljeno na +2.0 (Pang i sar, 2013).

4.11.3.3 Humana CuZnSOD

Kristalna struktura humane CuZnSOD (PDB Code 2VOA) je iskorišćena za modelovanje. Korišćena je subjedinica A tetramera korišćena za modelovanje.

MATERIJAL I METODE

Gajstajger naelektrisanja (engl. *Geisteiger point charges*) su dodati svim atomima, osim atomima bakra i cinka, koristeći AutoDock Tools version 1.5.6 Sep_17_14 softverski paket (Sanner, 1999). Zasebno, naelektrisanja za atome bakra i cinka su postavljena na +2.0 (Pang i sar, 2013). Doking prostor (engl. *docking space*) je postavljen tako da obuhvata atome i bakra i cinka.

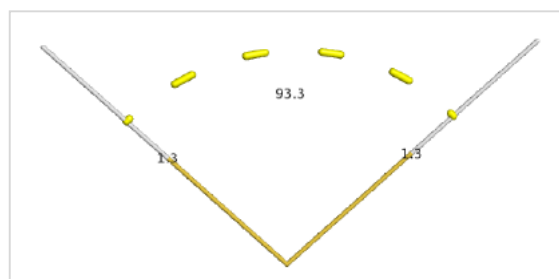
4.11.3.4 Goveđa CuZnSOD

Kristalna struktura goveđe CuZnSOD (PDB Code 1CB4) je korišćena za modelovanje. Cijanid kao ligand je uklonjen da ne bi uticao na potencijalno vezivanje. Korišćena je subjedinica A tetramera korišćena za modelovanje Gajstajger naelektrisanja (engl. *Geisteiger point charges*) su dodati svim atomima, osim atomima bakra i cinka, koristeći AutoDock Tools version 1.5.6 Sep_17_14 softverski paket (Sanner, 1999). Zasebno, naelektrisanja za atome bakra i cinka su postavljena na +2.0 (Pang i sar, 2013). Doking prostor (engl. *docking space*) je postavljen tako da obuhvata atome i bakra i cinka.

4.11.4 Priprema liganda

4.11.4.1 H₂S struktura

Struktura H₂S molekula je optimizovana na MM nivou teorije koristeći MMFF94 biomolekulska polja sila. Gajstajger naelektrisanja su dodata atomima koristeći AutoDock Tools verzija 1.5.6 Sep_17_14 softverski paket (Sanner i sar, 1999).



Slika 4.2 Struktura H₂S liganda prikazana u reprezentaciji štapica sa obilježenim karakterističnim H-S- rastojanjima i H-S-H uglom. Atom sumpora obojen je žuto, a atomi vodonika bijelo.

4.11.4.2 HS⁻ struktura

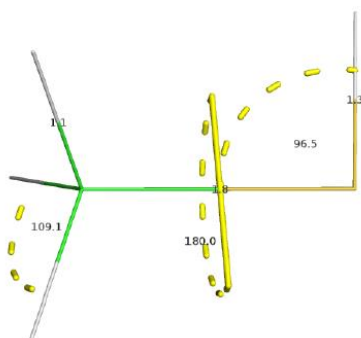
HS⁻ struktura je optimizovana na MM nivou teorije koristeći MMFF94 biomolekulska polja sila. Gajstajger naelektrisanja su dodata atomima koristeći AutoDock Tools verzija 1.5.6 Sep_17_14 softverski paket (Sanner i sar, 1999). Dodatno, naelektrisanje od -1.0 je dodato na atom sumpora.



Slika 4.3 Struktura HS⁻ liganda prikazana u reprezentaciji štapića sa obilježenim karakterističnim H-S rastojanjima. Atom sumpora obojen je žuto, a atom vodonika bijelo.

4.11.4.3 CH₃SH struktura

CH₃SH struktura je optimizovana na MM nivou teorije koristeći MMFF94 biomolekulska polja sila. Gajstajger naelektrisanja su dodata atomima koristeći AutoDock Tools verzija 1.5.6 Sep_17_14 softverski paket (Sanner i sar, 1999).



Slika 4.4 Struktura CH₃SH liganda prikazana u reprezentaciji štapića sa obeleženim karakterističnim rastojanjima, uglovima i diedarskim uglovima. Atom sumpora obojen je žuto, atom ugljenika zeleno, a atomi vodonika bijelo.

4.12 Statistička analiza podataka

Za potrebe statističke analize i kreiranje grafika i tabela korišćeni su: Microsoft excel, Origin 8 kao i Graphpad Prism 5. Kontraksije su analizirane na osnovu amplitude, frekvencije kao i AUC. Efekti tretmana izreženi su kao procenat kontrole. Rezultati su prikazani srednja vrednost (SV) ± standardna devijacija (SD). Efekat na kontraktilnu aktivnost uterusu je analiziran, u zavisnosti od prirode eksperimenta (tretmana, tipova aktivacije) sa: jednostrukom analizom varijanse (one-way ANOVA), dvostrukom analizom varijanse (two-way ANOVA), regresionom analizom kao i „post hoc Tukey” testom. Efekti Na₂S odnosno CH₃SH

MATERIJAL I METODE

na aktivnost antioksidativnih enzima je određen pomoću jednostruke analize varijanse i „post hoc Tukey” testom (za više grupa) i t-testom (za dvije grupe). Za poređenje nivoa ekspresije bestrofina korišćen je Student-ovo *t*-test u odnosu na aktin kao unutrašnju kontrolu (na proteinskom nivou); odnosno jednostruka analiza varijanse za relativnu ekspresiju u odnosu na adekvatne endogene kontrole (na nivou iRNK). Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrijednost vjerovatnoće od $p < 0,05$.

POGLAVLJE PETO

Rezultati

REZULTATI

5.1 Efekti natrijum-sulfida na kontraktilnost uterusa

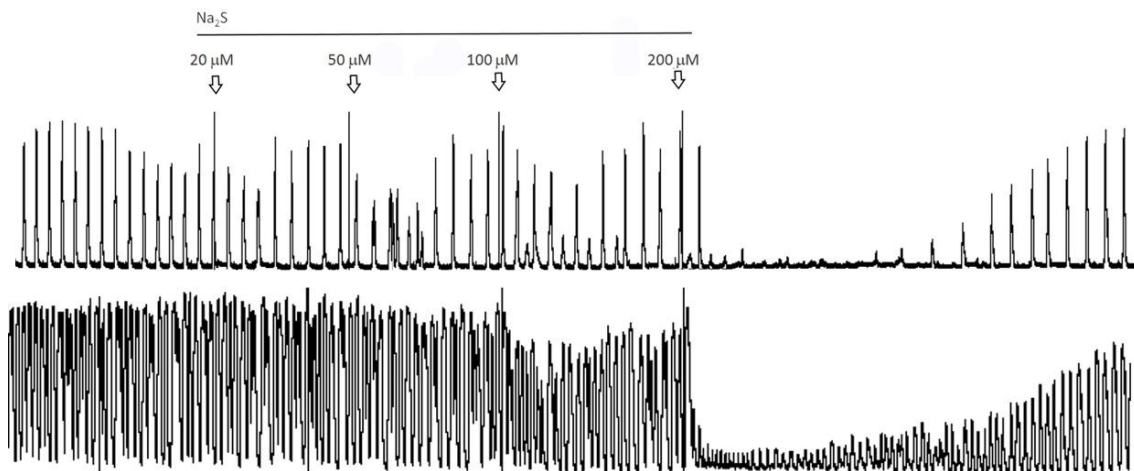
Kontraktilnost uterusa je posljedica aktivacije većeg broja signalnih puteva, koji imaju različito porijeklo. Svaki od ovih puteva favorizuje posebne ciljne strukture i nishodne puteve, čija aktivacija dovodi do realizacije krajnjeg fiziološkog efekta – kontrakcije. Potrebno je istaći da svaki od ovih puteva pokazuje izvjestan stepen funkcionalne nezavisnosti, ali samo koordinisana aktivnost različitih signalnih puteva dovodi do regulisanih kontrakcija. Stoga je u ovom radu efekat natrijum-sulfida ispitivan na uterusu pacova, čija je aktivnost različitog porijekla; na faznim kontrakcijama: spontano aktivne kontrakcije, kontrakcije indukovane jonima kalcijuma (4.9 mM), KCl (15mM) i oksitocinom (5 nM) kao i na toničnim kontrakcijama (KCl, 75mM). Efekti sulfida poređeni su sa efektima njegovih metaboličkih prekursora, ali i metabolita. Takođe, njegovi efekti su testirani u prisustvu rekativnih vrsti koje *in vivo* mogu modulirati njegov relaksantni potencijal. Poznato je da molekulske strukture na/u uterusu koje su ciljne za ostvarenje efekta relaksacije su enzimi (adenilat i guanilat ciklaze) i jonski kanali. Zbog toga je efekat sulfida na uterusu pacova testiran u prisustvu modulatora (inhibitora i aktivatora) pomenutih targeta koji mogu posredovati u relaksaciji izazvanoj sulfidom. Nakon toga, efekat sulfida je testiran i na humanom miometriju.

5.1.1 Efekti Na₂S na kontraktilnu aktivnost spontano-aktivnog i Ca²⁺-stimulisanog uterusa

Ispitivani su efekti rastućih koncentracija egzogenog Na₂S na izolovanom uterusu (spontano-aktivnom i Ca²⁺-aktiviranom). Uterusi su nakon stabilizacije tretirani Na₂S (20, 50, 100, 200 μM). Natrijum-sulfid je izazvao dozno-zavisnu, reverzibilnu relaksaciju spontano aktivnog ali i Ca²⁺-aktiviranom uterusa, smanjujući amplitudu, ali i frekvenciju kontrakcija (statistički značajni efekti uočeni su pri koncentracijama od 100 i 200 μM). Reprezentativni zapis efekta sulfida na kontrakcije dat je na **Slici 5.1**. Analiza smanjenja amplitude, frekvencija i AUC prikazana je na **Slici 5.2 i 5.3**. Efekat sulfida na spontano-aktivnom i Ca²⁺-aktiviranom uterusu se nije značajno razlikovao (EC₅₀ vrijednosti slične: 114 μM za

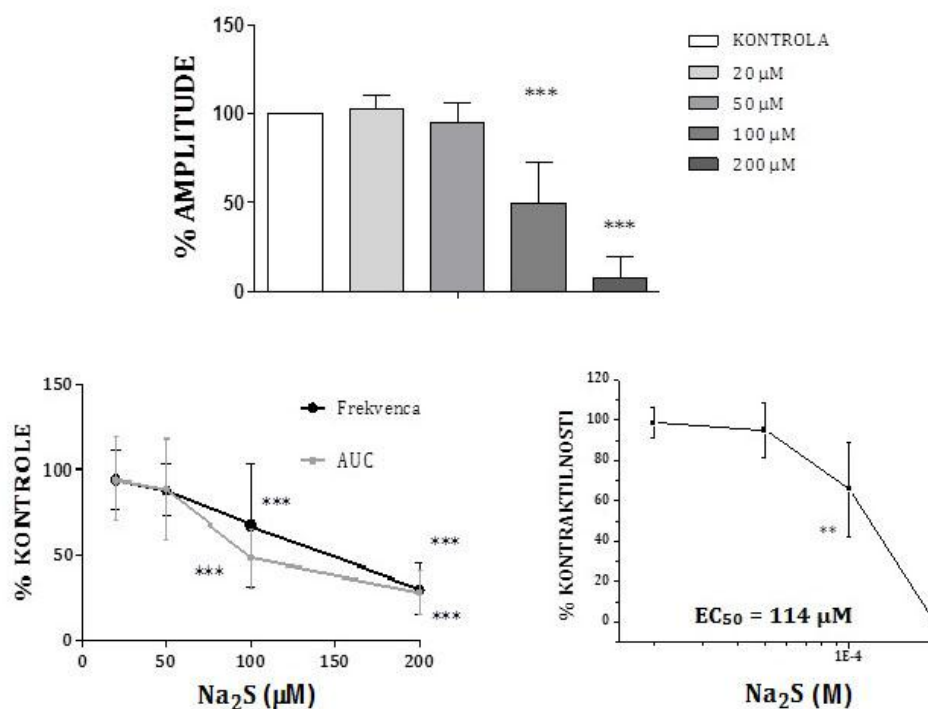
REZULTATI

spontano-aktivni i 94 μM za Ca^{2+} -aktivirani uterus). Jasno se uočava statistički značajno smanjenje kontraktilnosti u odnosu na kontrolne kontrakcije (bez sulfida).



Slika 5.1 Reprezentativni zapis efekta Na_2S na kontraktilnu aktivnost spontano-aktivnog (gore) i Ca^{2+} -aktiviranog uterusa (dolje).

Uterusi su nakon stabilizacije i uspostavljanja spontane aktivnosti, odnosno Ca^{2+} -aktivacije, tretirani rastućim koncentracijama Na_2S (20, 50, 100, 200 μM).

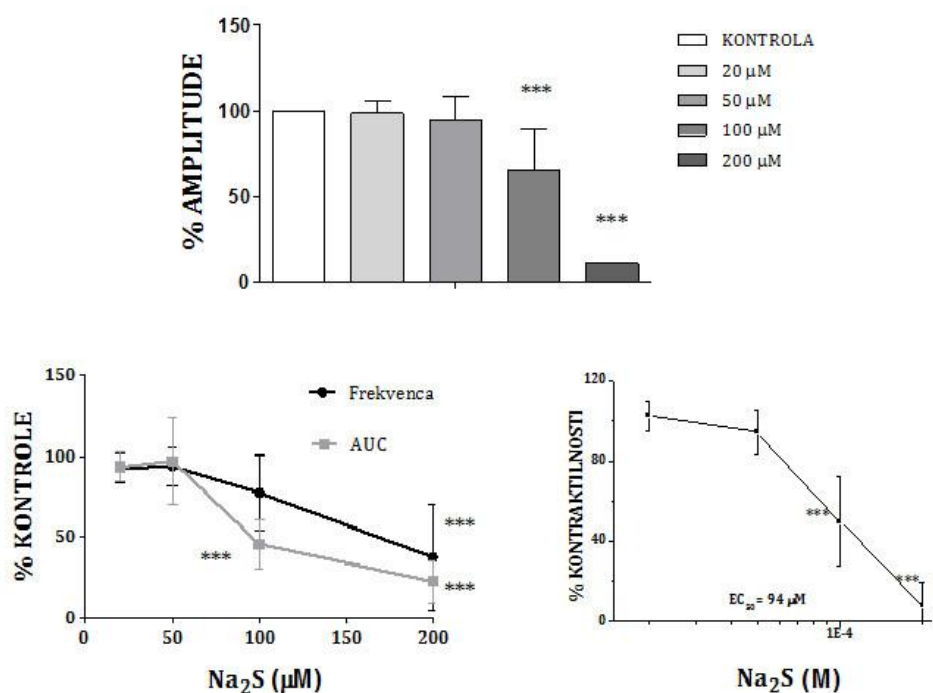


Slika 5.2 Efekat Na_2S na kontrakcije spontano-aktivnog uterusa:

dozno-zavisno smanjenje amplituda, frekvencija i AUC; dozno-zavisna kriva

Podaci su predstavljeni kao $\text{SV} \pm \text{SD}$. Podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse (faktor: Na_2S koncentracija; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (** $p < 0,001$).

REZULTATI



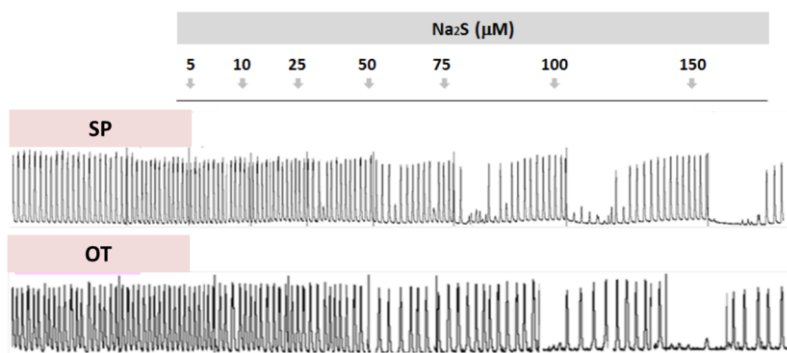
Slika 5.3 Efekat Na₂S na kontrakcije Ca²⁺-aktivnog uterusa: dozno-zavisno smanjenje amplituda, frekvencija i AUC; dozno-zavisna kriva

Podaci su predstavljeni kao $SV \pm SD$. Podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse (faktor: Na₂S koncentracija; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (***) $p < 0,001$).

5.1.2 Efekti Na₂S na kontrakcije uterusa stimulisane oksitocinom

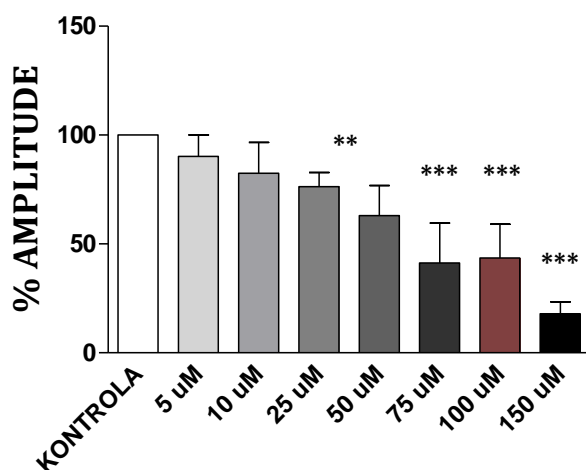
Ispitivani su efekti rastućih koncentracija egzogenog Na₂S na izolovanom uterusu aktiviranom oksitocinom (OT) (5 nM). Uterusi su nakon stabilizacije tretirani sa Na₂S (5-150 µM). Natrijum-sulfid je izazvao dozno-zavisnu reverzibilnu relaksaciju, utičući kako na amplitudu, tako i na frekvenciju kontrakcija. Reprezentativan zapis efekata sulfida na spontane i oksitocinom-indukovane kontrakcije prikazan je na **Slici 5.4**. Jasno se uočava da se efekat sulfida na kontraktilnost kod spontanih i oksitocinom-indukovanih kontrakcija ne razlikuje. Analiza efekata sulfida na kontraktilnost OT-indukovanih kontrakcija prikazana je na **Slici 5.5**. Statistički značajno smanjenje amplitude kontrakcija u odnosu na kontrolne kontrakcije (bez sulfida) uočava se pri koncentracijama sulfida većim od 50 µM.

REZULTATI



Slika 5.4 Reprezentativni zapis efekta Na_2S na kontraktilnu aktivnost spontano-aktivnog (gore) i OT-aktiviranog uterusa (dolje).

Uterusi su nakon stabilizacije tretirani rastućim koncentracijama Na_2S (5-150 μM).



Slika 5.5

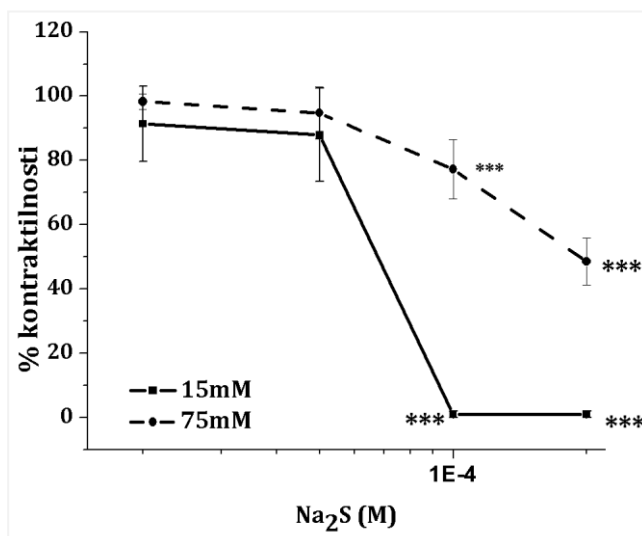
Efekat Na_2S na kontrakcije OT-aktivnog uterusa pacova: dozno zavisno smanjenje amplituda.

Podaci su predstavljeni kao $\text{SV} \pm \text{SD}$. Podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse (faktor: Na_2S koncentracija; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (** $p < 0,001$).

5.1.3 Efekti Na_2S na kontrakcije uterusa stimulisane kalijum-hloridom

Ispitivani su efekti rastućih koncentracija egzogenog Na_2S na izolovanom uterusu, koji je aktiviran sa KCl: 15 mM – fazne kontrakcije i 75 mM – tonične kontrakcije. Uterusi su nakon stabilizacije tretirani sa Na_2S (20, 50, 100, 200 μM). Natrijum-sulfid je izazvao dozno-zavisnu, reverzibilnu relaksaciju, utičući i na amplitudu i na frekvenciju kontrakcija kod faznih kontrakcija, odnosno na amplitudu kod toničnih kontrakcija. Uočeno je da se relaksantni efekat sulfida razlikuje - više je izražen na faznim kontrakcijama (15 mM KCl), nego na toničnim (75 mM) (dvostruka analiza varijanse, statistički značajan efekat KCl koncentracije, $p < 0,001$). Potpuna relaksacija u slučaju faznih kontrakcija je uočena sa 100 μM Na_2S . Kod toničnih kontrakcija, tretman 100 i 200 μM Na_2S rezultirao je značajnim smanjenjem amplituda, ali ne i potpunom relaksacijom (**Slika 5.6**).

REZULTATI



Slika 5.6

Relaksantni efekat sulfida na uterusu prekontrahovanom sa 15 i 75 mM KCl.

Podaci su predstavljeni kao $SV \pm SD$. Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktor: Na₂S koncentracija i KCl kontrakcija; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (***) $p < 0,001$.

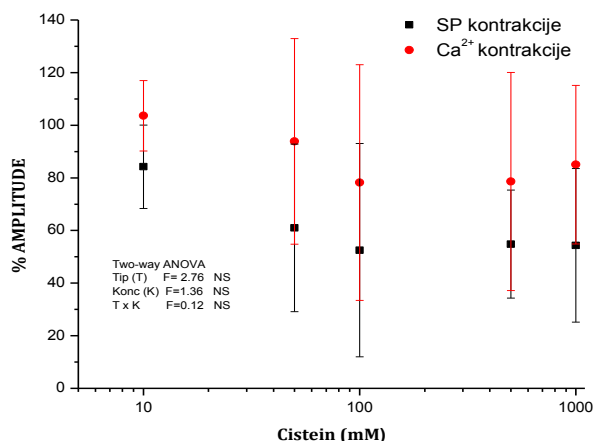
5.1.4 Poređenje efekata natrijum-sulfida sa efektima cisteina i homocisteina

Budući da cistein i homocistein, prekursori u sintezi vodnik-sulfida, u nekim patofiziološkim stanjima mogu postojati u povećanoj koncentraciji, cilj daljih eksperimenata bio je da se ispita njihov direktan efekat na kontraktlnost uterusu. Takođe, uzimajući u obzir da pKa vrijednosti cisteina, homocisteina i H₂S, odnosno zastupljenost njihovih molekulskih i anjonskih oblika (kiselina i njihovih konjugovanih baza), ovi eksperimenti omogućavaju i ispitivanje važnosti jonizacije -SH grupe u ostvarivanju relaksirajućeg efekta.

5.1.4.1 Efekat cisteina na kontraktlnost uterusu

Ispitivani su efekti rastućih koncentracija egzogenog cisteina na izolovanom uterusu (spontano-aktivnom i Ca²⁺-aktiviranom). Uterusi su nakon stabilizacije tretirani cisteinom (10-1000 μM) (Slika 5.7). Uočeno je da cistein dovodi do relaksacije, ali zbog varijacije u odgovoru različitih uterusu, efekat nije statistički značajan.

REZULTATI



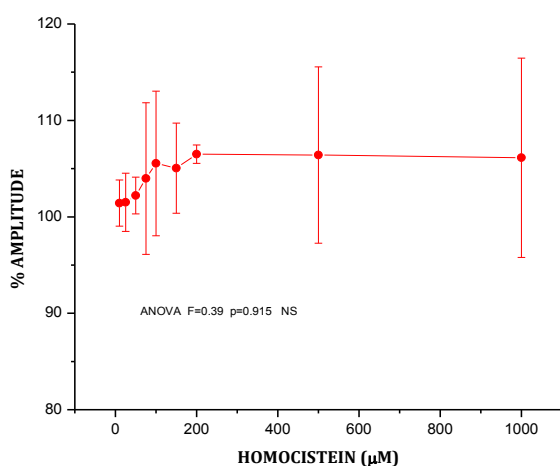
Slika 5.7

Efekat cisteina na kontrakcije spontanog i Ca²⁺-aktivnog uterusa pacova.

Podaci su predstavljeni kao $SV \pm SD$ ($n=8$). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktor: tip kontrakcije i koncentracija agensa; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (***) ($p < 0,001$).

5.1.4.2 Efekat homocisteina na kontraktilnost uterusa

Ispitivani su efekti rastućih koncentracija egzogenog homocisteina na izolovanom, OT-aktivnom uterusu. Uterusi su nakon stabilizacije tretirani homocisteinom (10-1000 μM), koji nije doveo do relaksacije. Efekti homocisteina prikazani su na **Slici 5.8**.



Slika 5.8

Efekat homocisteina na kontrakcije OT aktivnog uterusa pacova.

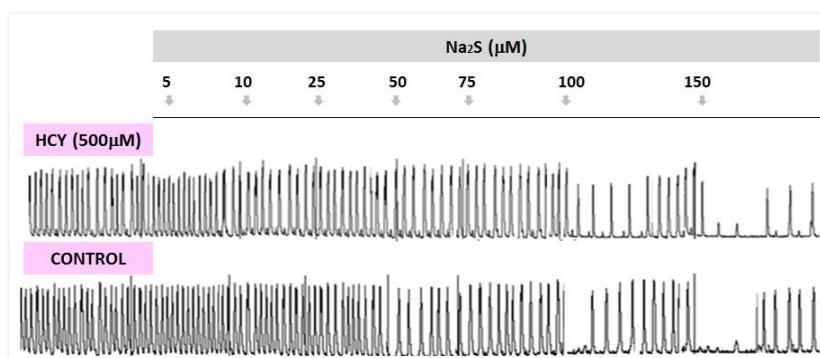
Podaci su predstavljeni kao $SV \pm SD$. Podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse (faktor: Na_2S koncentracija; $p < 0.05$ se smatra značajnim).

5.1.4.3 Da li hiperhomocisteinemija (in vitro) utiče na relaksantni potencijal H₂S?

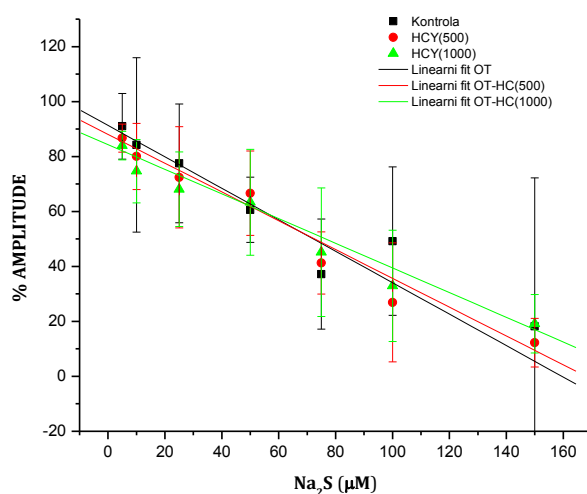
Poznato je da hiperhomocisteinemija može remetiti pravilnu kontraktilnost uterusa gravidnih ženki. Cilj ovih eksperimenata bio je da se ispita efekat hiperhomocistinemije (*in vitro*) na efekat Na_2S . Efekat rastućih doza Na_2S (5-150 μM) na kontraktilnost uterusa u estrusu negravidnih ženki (spontano-

REZULTATI

aktivnom i oksitocinom-stimulisanom) ispitavan je u prisustvu dvije koncentracije homocisteina (500 i 1000 μM). Uočeno je da homocistein, čak i u ovako visokom koncentracijama, ne utiče na relaksantni potencijala Na_2S . Reprezentativni, originalni zapis dat je na **Slici 5.9** a analiza efekata prikazana je na **Slici 5.10**. Dodavanje rastućih doza Na_2S je bez obzira na pretretman sa homocisteinom dozno-zavisno relaksiralo uterus (dvo faktorska analiza varijanse, statistički značajan efekat koncentracije Na_2S , $p < 0.001$). Dodavanje homocisteina pre dodavanja Na_2S nije dovelo do promene relaksantnih efekata Na_2S (dvo faktorska analiza varijanse, nema efekta pretretmana, niti interakcije).



Slika 5.9 Efekat Na_2S na kontraktilnu aktivnost OT-aktiviranog uterusu u prisustvu homocisteina. Uterusi su nakon stabilizacije i uspostavljanja aktivnosti tretirani najprije homocisteinom (500 μM), a zatim rastućim koncentracijama Na_2S (5-150 μM).



Slika 5.10

Efekat Na_2S na kontrakcije OT-aktivnog uterusu pacova u prisustvu homocisteina (500 i 1000 μM).

Relaksantni efekat je statistički ekstrapoliran pravom regresije (modeli su značajni, $p < 0.001$, a koeficijenti regresije su čak -0.99), pri čemu testiranje različitosti pravih F-testom nije statistički značajno (prave su veoma slične po nagibu i odsečku).

REZULTATI

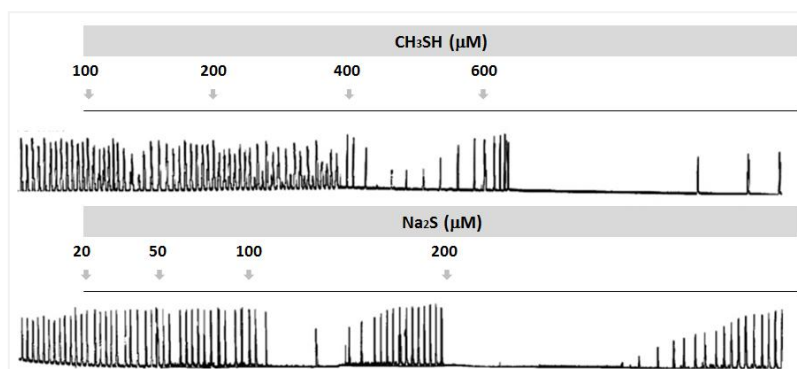
5.2 Poređenje efekata natrijum-sulfida sa efektima metantiola – uloga tiolatnog anjona

Prethodni eksperimenti su pokazali da sulfid ima relaksantno dejstvo, a da njegov prekursor (homocistein) nema u opsegu koncentracija koje se smatraju fiziološki relevantnim. Takođe, uočeno je da efekat jedinjenja koja sadrže-SH grupu može zavisiti od stepena njene jonizacije. S tim u vezi, cilj ovih eksperimenata bio je da se uporede efekti metantiola i sulfida. Naime, metantiol je na fiziološkom pH prisutan isključivo u molekulskom obliku, dok iz Na₂S mogu nastati molekulski H₂S i anjon HS⁻. Stoga, poređenje njegovih efekata sa efektima Na₂S osvjetljava važnost molekulskog, odnosno anjonskog oblika u regulaciji kontraktilnosti, kao i važnost metilacije kao načina modulacije efekata H₂S.

5.2.1 Efekat CH₃SH na kontraktilnost uterusa – poređenje sa Na₂S

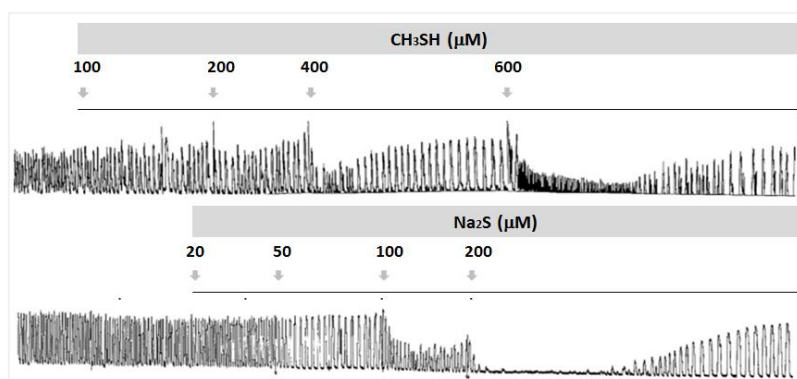
Efekat metantiola (100, 200, 400, 600 μM) ispitavan je na uterusu pacova (spontano-aktivnom i Ca²⁺-aktiviranom), a originalni zapis efekata dat je na **Slici 5.11 i 5.12**. Metantiol je slično sulfidu izazvao reverzibilnu dozno-zavisnu relaksaciju uterusa (statistički značajno smanjenje amplitude i frekvencije kontrakcija). Međutim efekat se razlikuje u odnosu na efekat izazvan sa Na₂S. Naime, relaksantni efekat CH₃SH je na spontanim kontrakcijama i na Ca²⁺-aktiviranom uterusu, uočen pri 400 μM, a potpuna relaksacija (odsustvo aktivnosti uterusa) dostignuta je pri 600 μM. Efekat je, slično efektu Na₂S, reverzibilan, ali je za razliku od Na₂S bila potrebna 3x veća koncentracija za dostizanje potpune relaksacije. Na **Slici 5.13** prikazani su različiti oblici njihovih dozno-zavisnih krivih (sigmoidna vs. linerana), koje karakterišu njihova dejstva. Dalje, poređeni su efekti, jediničnih koncentracija (CH₃SH – 600 μM i Na₂S - 200 μM) koje u oba slučaja dovode do potpune relaksacije (**Slika 5.14**). Urađena je detaljna analiza efekata – analiza amplituda i frekvencija tokom relaksacije, ali i oporavka (**Slika 5.15 i 5.16**).

REZULTATI



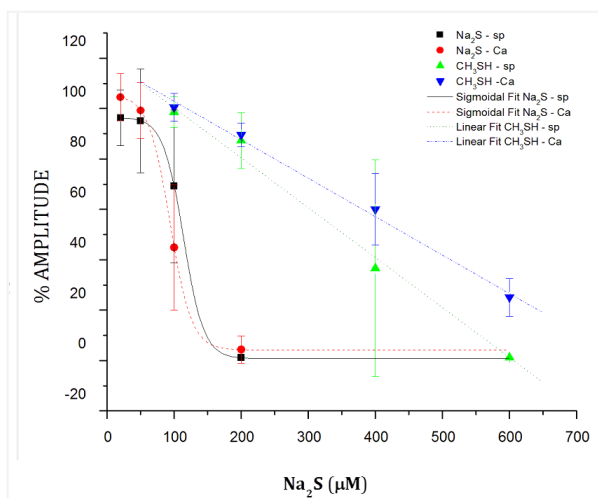
Slika 5.11 Reprezentativni zapisi efekata CH_3SH i Na_2S na kontraktilnu aktivnost spontano-aktivnog uterusa.

Uterusi su nakon stabilizacije i uspostavljanja spontane aktivnosti tretirani rastućim koncentracijama CH_3SH (100-600 μM) i Na_2S (5-150 μM).



Slika 5.12 Reprezentativni zapisi efekata CH_3SH i Na_2S na kontraktilnu aktivnost uterusa aktiviranog jonima Ca^{2+} .

Uterusi su nakon stabilizacije i uspostavljanja aktivnosti tretirani rastućim koncentracijama CH_3SH (100-600 μM) i Na_2S (20 -200 μM).

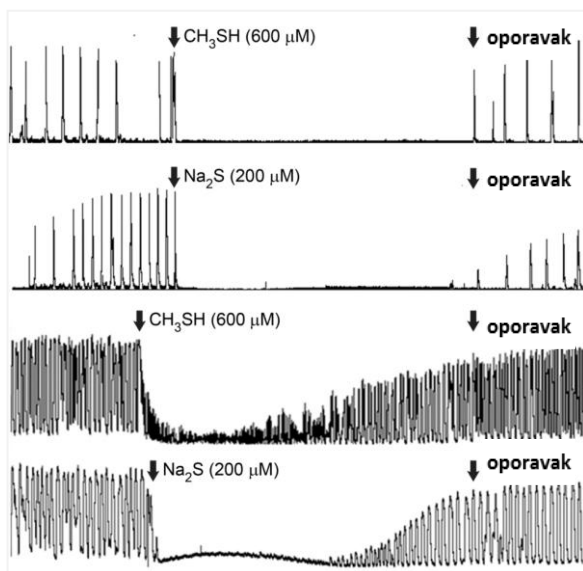


Slika 5.13

Dozno zavisna kriva – sigmoidalno vs. linearno fitovanje efekata CH_3SH i Na_2S .

Podaci su predstavljeni kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ ($n=8$). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktor: tip kontrakcije i koncentracija agensa; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (***) $p < 0,001$).

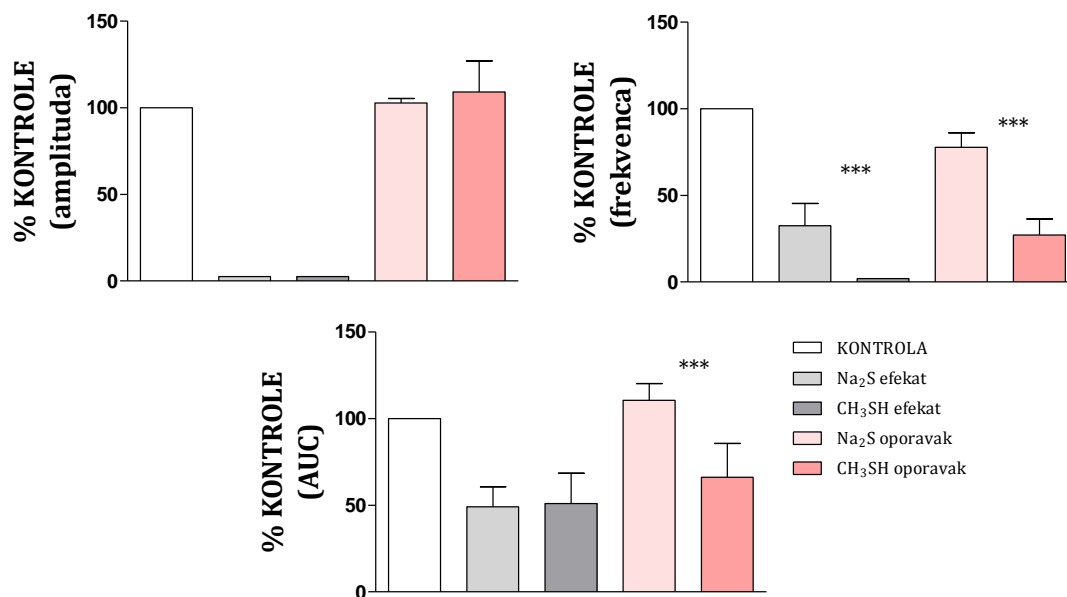
REZULTATI



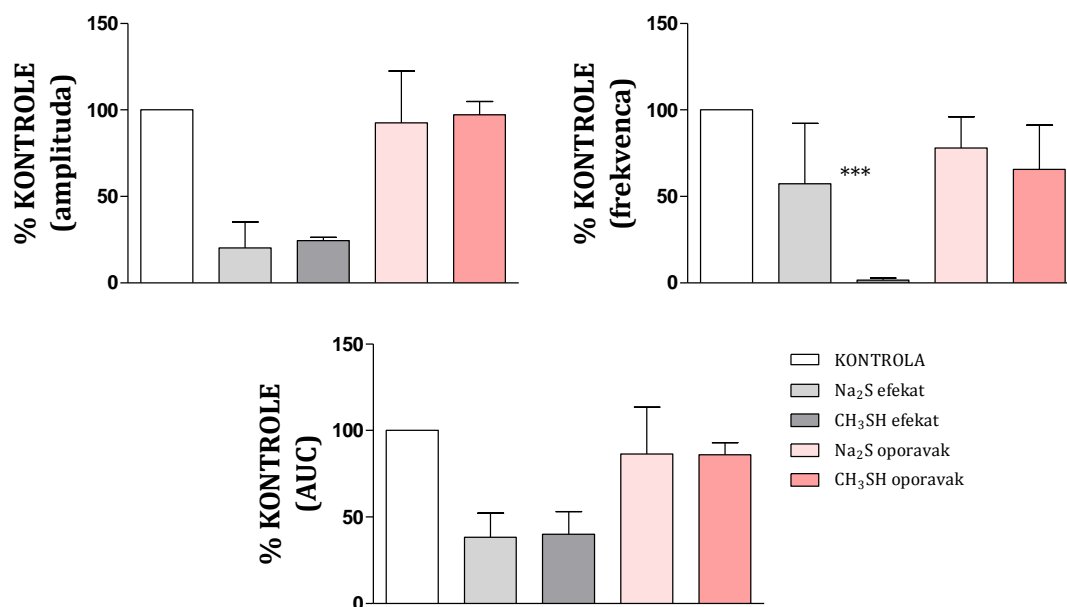
Slika 5.14
Reprezentativni zapisi efekata CH_3SH i Na_2S na kontraktilnu aktivnost spontano-aktivnog (gore) i Ca^{2+} -aktiviranog uterusa (dolje).

Uterusi su nakon stabilizacije i uspostavljanja spontane aktivnosti (gornji zapis), odnosno Ca^{2+} -aktivacije (donji zapis), tretirani sa CH_3SH (600 μM) i Na_2S (200 μM).

REZULTATI



Slika 5.15 Poređenje efekata Na₂S i CH₃SH na spontane kontrakcije uterusa pacova. Podaci su predstavljeni kao SV ± SD. Podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse (faktor: Na₂S koncentracija; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (***) $p < 0,001$).



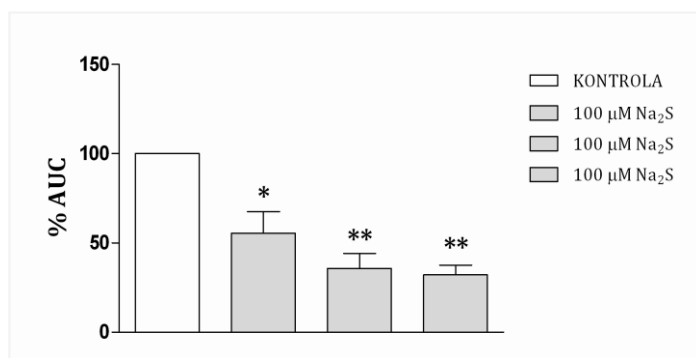
Slika 5.16 Poređenje efekata Na₂S i CH₃SH na Ca²⁺-aktivirane kontrakcije uterusa pacova. Podaci su predstavljeni kao SV ± SD. Podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse (faktor: Na₂S koncentracija; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (***) $p < 0,001$).

REZULTATI

5.3 Medijatori relaksantnog efekta Na₂S

5.3.1 Efekti konsekutivnih dodavanja Na₂S na kontraktilnost uterusa

Ispitivani su efekti konsekutivnih dodavanja egzogenog Na₂S na kontraktilnost izolovanog uterusa (spontano-aktivni i Ca²⁺-aktivirani uterus). Uterusi su nakon stabilizacije tretirani Na₂S (100 μM). Natrijum sulfid je izazvao reverzibilnu relaksaciju, utičući kako na amplitudu, tako i na frekvenciju kontrakcija. Nakon oporavka opet je dodat Na₂S u istoj koncentraciji (100 μM), sačekan je oporavak i opet je ponovljen tretman. Uočeno je da tretiranje uterusa sa Na₂S potencira njegov relaksantni efekat pri narednoj aplikaciji (**Slika 5.17**).



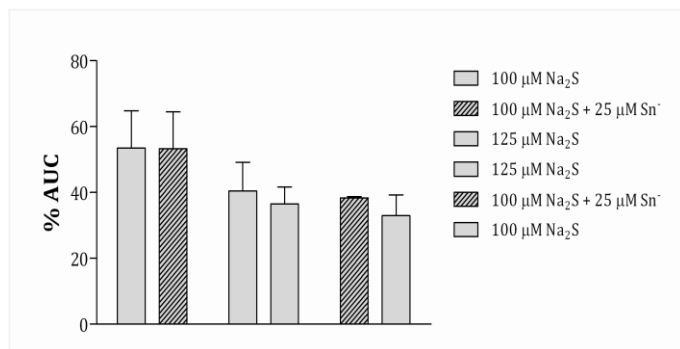
Slika 5.17

Efekat konsekutivnog dodavanja Na₂S na kontraktilnost uterusa pacova

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD. Podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse (faktor: Na₂S koncentracija; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (** $p < 0,001$).

5.3.2 Poređenje efekata Na₂S sa efektima Na₂S/polisulfida

U cilju ispitivanja da li relaksantni efekat sulfida potiču od polisulfida (koji su prisutni u rastvoru sulfida, a čija koncentracija zavisi od brojnih faktora), poređeni su efekti natrijum-sulfida sa efektima Na₂S/polisulfida (Sn). Oba tretmana dovela su do smanjenja kontrakcija, utičući kako na amplitudu, tako i na frekvenciju kontrakcija, međutim nisu uočene statistički značajne razlike (**Slika 5.18**).



Slika 5.18

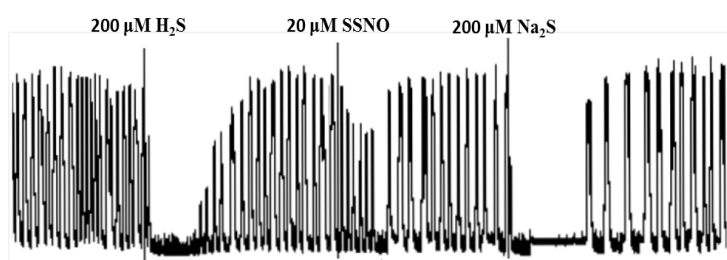
Poređenja efekata Na₂S i polisulfida na kontraktilnost uterusa pacova

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD. Podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse (faktor: Na₂S koncentracija; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (** $p < 0,001$).

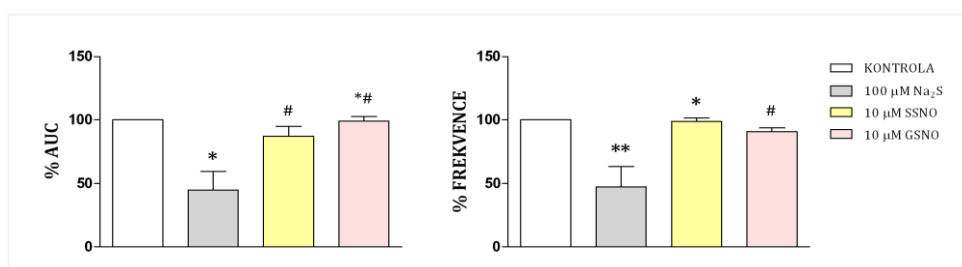
REZULTATI

5.3.3 Interakcija H₂S-•NO

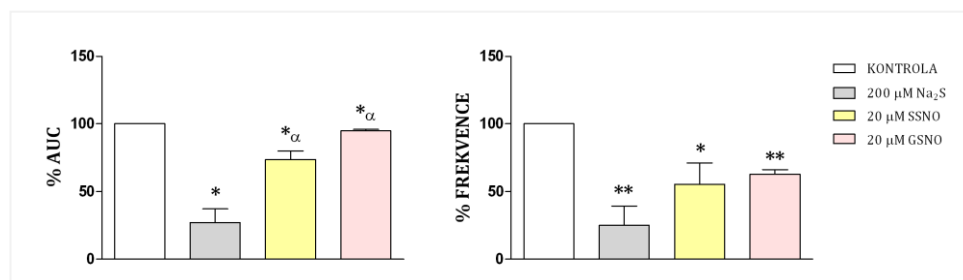
Efekat sulfida može biti moduliran sa •NO, a da li je ova modulacija relevantna u regulisanju kontraktilnosti uterusa, ispitano je kroz eksperimente gdje su testirani efekti GSNO (10 and 20 μM), kao i smješe sulfid/GSNO (100/10 μM i 200/20 μM) na kontraktilnost kalcijum-aktiviranog uterusa. Reprezentativan zapis efekata smješe sulfid/GSNO prikazan je na **Slici 5.19**. GSNO u testiranim koncentracijama (**Slika 5.20 i 5.21**), nije doveo do značajnih promjena. Produkt reakcije smješe sulfid/GSNO (100/10 μM) produkovao je minorne efekte, kako na amplitudu, tako i na frekvenciju kontrakcija (**Slika 5.20 i 5.21**). Efekti sulfid/GSNO („SSNO“) (200/20 μM) (**5.20 i 5.21**) bili su značajno manji u odnosu na efekat samog sulfida (200 μM), kako u pogledu smanjenja amplituda, tako i frekvencije. Ovo ukazuje na to da je •NO važan modulator relaksantnog efekta sulfida.



Slika 5.19
Reprezentivni zapis efekata sulfida i GSNO na kontraktilnost kalcijum-stimulisanog uterusa.



Slika 5.20 Poređenja efekata Na₂S (100μM), smješe Na₂S (100μM) i GSNO (10μM) – „SSNO“ i GSNO (10μM) na kontraktilnost uterusa pacova



Slika 5.21 Poređenja efekata Na₂S (200μM), smješe Na₂S (200μM) i GSNO (20μM) – „SSNO“ i GSNO (20μM) na kontraktilnost uterusa pacova

REZULTATI

5.4 Mehanizmi relaksantnog efekta natrijum-sulfida

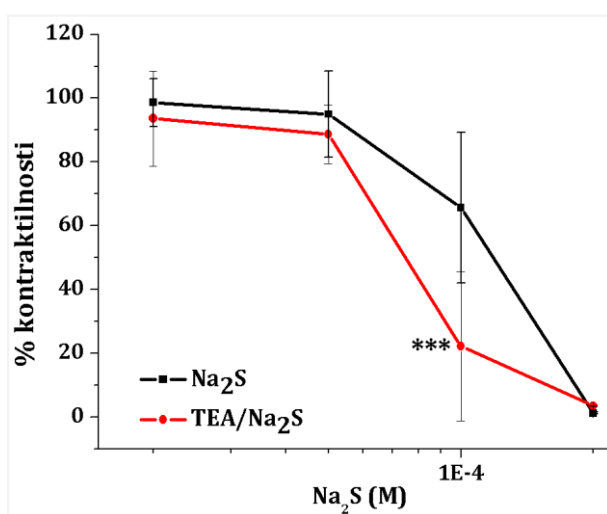
Da bi se razjasnio mehanizam relaksantnog efekta sulfida ispitivano je učešće pojedinačnih kanala iz tri grupe kanala (K^+ , Ca^{2+} i Cl^- kanali) važnih za regulaciju kontraktilnosti uterusa, kao i značaj klasičnih relaksacionih puteva indukovanih promjenom količine drugih glasnika (cAMP i cGMP).

5.4.1 Uloga K^+ kanala

Kako su prethodni eksperimenti pokazali da povećanje ekstraćelijskog K^+ utiče na efekat sulfida (vidi 5.1.3), ovi eksperimenti su dizajnirani u cilju ispitivanja uloge K^+ kanala u posredovanju njegovog relaksantnog efekta. Efekat sulfida je testiran na spontano-aktivnim i kalcijum-indukovanim uterusima, sa i bez odgovarajućih modulatora kalijumskih kanala: TEA (1 mM), glibenklamida (2 μ M) i 4-AP (1 mM).

5.4.1.1 Učešće K^+ kanala u relaksantnom efektu sulfida

Učešće K^+ kao medijatora u Na_2S -indukovanoj relaksaciji uterusa nije potvrđeno. Naime, neselektivni blokator, TEA, je pojačao relaksantni efekat sulfida na spontano-indukovanim kontrakcijama (statistički značajan ANOVA efekat tretmana $p < 0,001$; *post hoc* Tukey's HSD test, $p < 0,001$) (Slika 5.22). Pretretman kalcijum-aktiviranih uterusa TEA nije imao efekta (Slika 5.23).

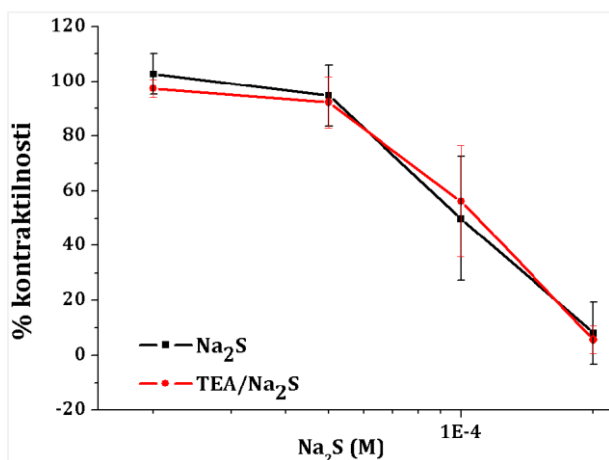


Slika 5.22

Efekat Na_2S na kontraktlnost spontano-aktivnog uterusa pacova sa i bez TEA (1 mM).

Podaci su predstavljeni kao $SV \pm SD$ ($n=8$). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na_2S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$).

REZULTATI



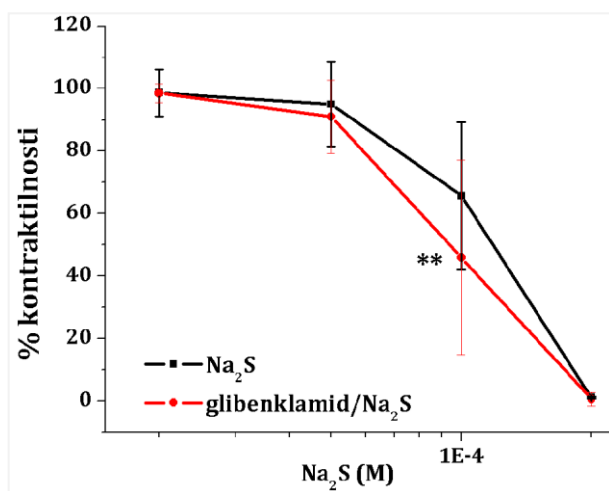
Slika 5.23

Efekat Na₂S na kontraktilnost Ca²⁺-aktiviranog uterusa pacova sa i bez TEA (1 mM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).

5.4.1.2 Uloga K_{ATP} kanala u relaksantnom efektu sulfida

Specifični inhibitor K_{ATP} kanala, glibenklamid, korišćen je u cilju ispitivanja učešća ovih kanala u odgovoru uterusa na Na₂S. Pretretman glibenklamidom nije inhibirao relaksaciju izazvanu sulfidom na spontano-aktivnim uterusima (Slika 5.24), zapravo uočeno je da je relaksantni efekat sulfida (100 μM) pojačan.



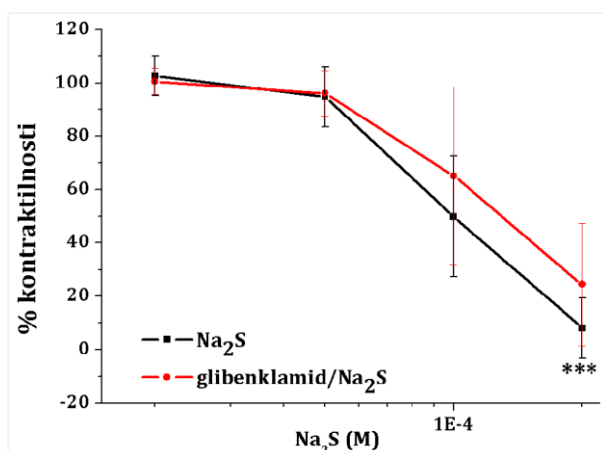
Slika 5.24

Efekat Na₂S na kontraktilnost spontano-aktivnog uterusa pacova sa i bez glibenklamida (2 μM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).

Rezultati prikazani na Slici 5.25 pokazuju da glibenklamid nije inhibirao relaksantni efekat sulfida na uterusima aktiviranim jonima kalcijuma u potpunosti. Naime, značajan antagonistički efekat glibenklamida uočen je samo pri efektu Na₂S od 200 μM (statistički značajan ANOVA efekat tretmana $p < 0,01$, *post hoc* Tukey's test, $p < 0,001$).

REZULTATI



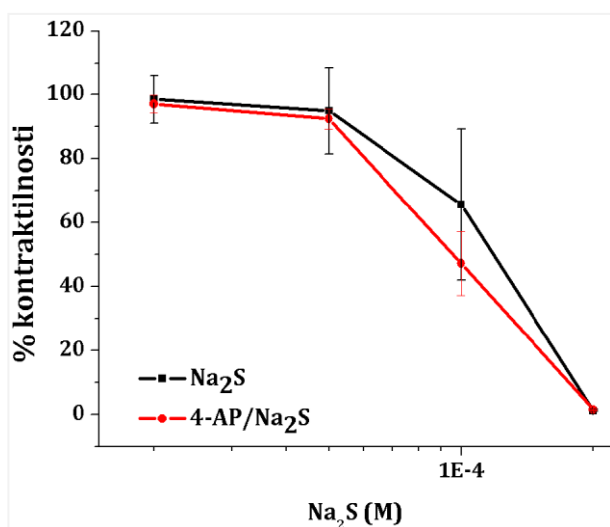
Slika 5.25

Efekat Na₂S na kontraktibilnost Ca²⁺-aktiviranog uterusa pacova sa i bez glibenklamida (2 μM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).

5.4.1.3 Uloga Kir kanala u relaksantnom efektu sulfida

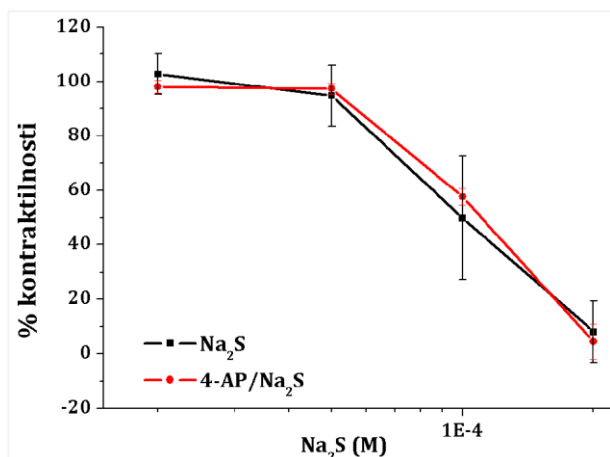
Da bi ispitali ulogu Kir kanala u relaksaciji uterusa indukovanoj sa Na₂S, korišćen je 4-AP kao blokator ovih kanala. Prisustvo 4-AP nije uticalo na efekat Na₂S i na spontano-aktivnim, i na kalcijumom aktiviranim uteruisima (Slika 5.26 i 5.27).



Slika 5.26

Efekat Na₂S na kontraktibilnost spontano aktivnog uterusa pacova sa i bez 4-AP (1 mM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).



Slika 5.27

Efekat Na₂S na kontraktibilnost Ca²⁺-aktiviranog uterusa pacova sa i bez 4-AP (1 mM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).

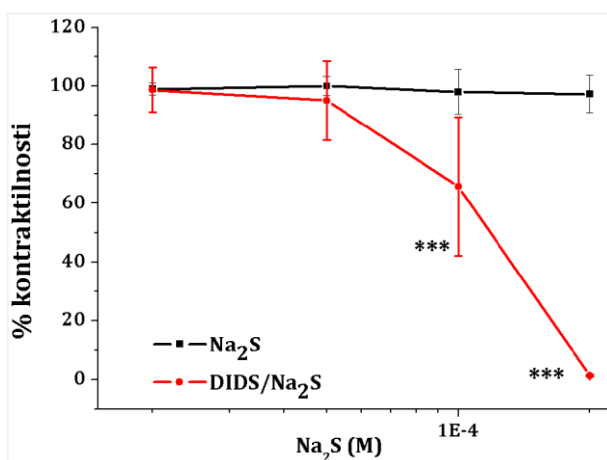
REZULTATI

5.4.2 Uloga Cl⁻ kanala u relaksantnom efektu sulfida

Eksperimenti su dizajnirani u cilju ispitivanja uloge Cl⁻ kanala, kao posrednika u relaksantnom efektu sulfida. Efekat sulfida je testiran na spontano-aktivnim i kalcijum-indukovanim uterusima, sa i bez odgovarajućih modulatora hloridnih kanala: DIDS, TMEM-16A, TA, IAA-94 i NFA. Takođe korišćen je De Jalon rastvor bez HCO₃⁻ da bi se razlikovali efekte DIDS, budući da je DIDS blokator hloridnog kanala, ali i Cl⁻/HCO₃⁻ jonoizmjenjivača.

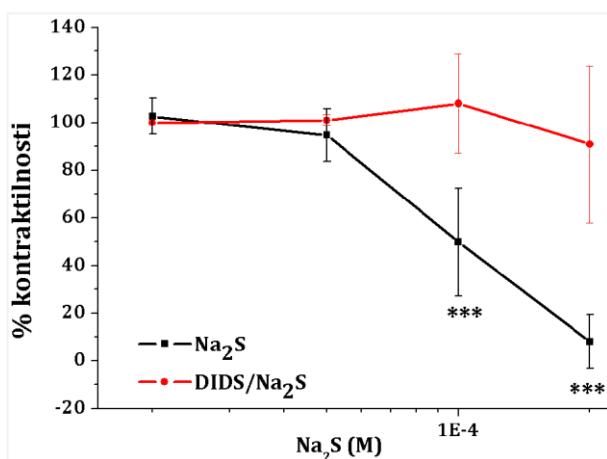
5.4.2.1 Uloga BEST-1 kanala

Da bi ispitivali ulogu hloridnih kanala (bestrofina) u relaksaciji uterusa indukovanoj Na₂S, korišćen je DIDS kao blokator ovih kanala. Pretretman sa DIDS je inhibirao relaksantni efekat Na₂S u potpunosti, kako na sponatano-aktivnim, tako i na kalcijumom aktiviranim uterusima (**Slika 5.28 i 5.29**). Jasno se uočava da u prisustvu DIDS, sulfid ne dovodi do relaksacije uterusa, što ukazuje na to da je sulfidom indukovana relaksacija posredovana kanalom osjetljivim na DIDS.



Slika 5.28
Efekat Na₂S na kontraktlnost spontano-aktivnog uterusa pacova sa i bez DIDS (100 μM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).



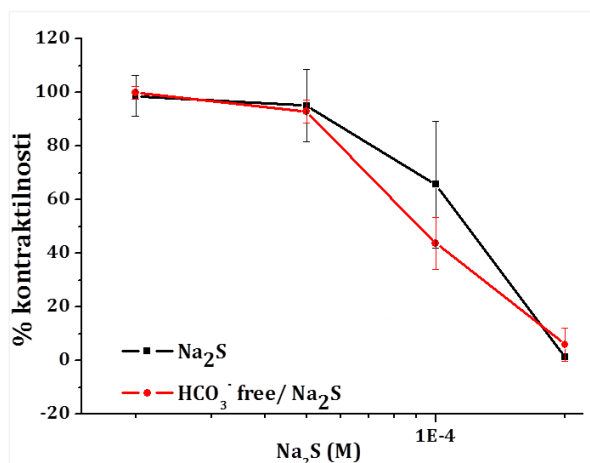
Slika 5.29
Efekat Na₂S na kontraktlnost Ca²⁺-aktiviranog uterusa pacova sa i bez DIDS (100 μM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).

REZULTATI

5.4.2.2 Efekat De Jalon rastvora bez HCO_3^-

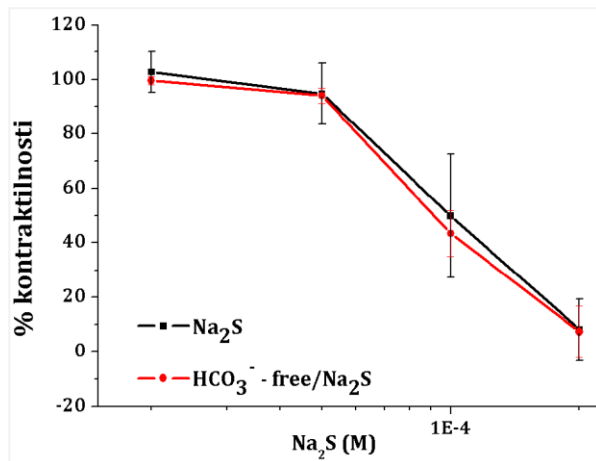
Da bi diskiriminisali efekte DIDS, efekat Na_2S je ispitivan u De Jalon rastvoru bez HCO_3^- . Odsusutvo HCO_3^- anjona nije uticalo na relaksantni efekat Na_2S , što ukazuje da je hloridni kanal posrednik u relaksaciji. Rezultati su prikazani na **Slici 5.30 i 5.31**.



Slika 5.30

Efekat Na_2S na kontraktibilnost spontano aktivnog uterusa pacova sa i bez HCO_3^- .

Podaci su predstavljeni kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ ($n=8$). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na_2S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$).



Slika 5.31

Efekat Na_2S na kontraktibilnost Ca^{2+} -aktiviranog uterusa pacova sa i bez HCO_3^- .

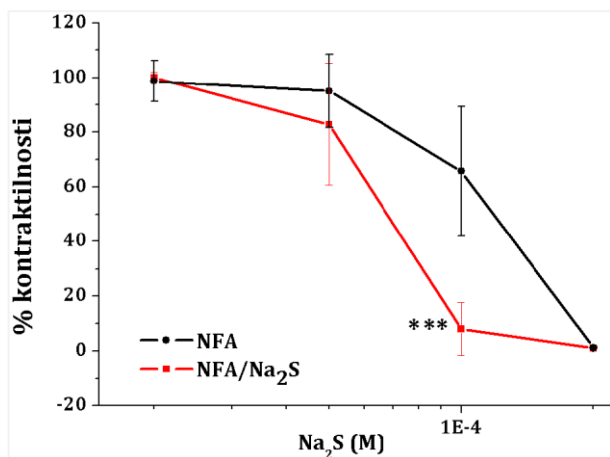
Podaci su predstavljeni kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ ($n=8$). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na_2S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$).

5.4.2.3 Uloga CaCC kanala u relaksantnom efektu natrijum-sulfida

Da bi ispitali ulogu hloridnih kanala aktiviranih kalcijumom u Na_2S -indukvanoj relaksaciji uterusa pacova, korišćeni su NFA i TA kao blokatori ovih kanala. Ovi inhibitori nisu inhibirali relaksantni efekat Na_2S , na spontan-aktivnim, kao ni na kalcijum-aktiviranim uterusima (NFA, **Slika 5.32 i 5.33**; TA, **Slika 5.34 i 5.35**). Naime, pretretman spontano-aktivnih uterusa NFA i TA

REZULTATI

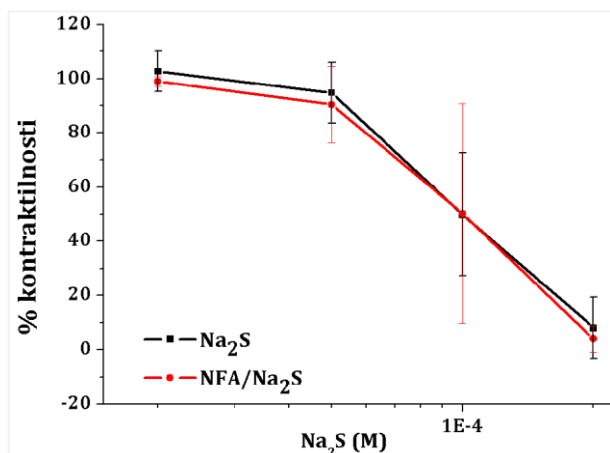
potencirao je relaksantni efekat sulfida. Njihov efekat na kontrakcijama aktiviranim jonima kalcijuma razlikovao se budući da je NFA pretretman potencirao relaksaciju izazvanu sulfidom na spontano aktivnim uterusima, snižavajući dozu potrebnu za relaksaciju (statistički značajan ANOVA efekat tretmana $p < 0,001$).



Slika 5.32

Efekat Na₂S na kontraktilnost spontano-aktivnog uterusa pacova sa i bez NFA (10 μM).

Podaci su predstavljeni kao $SV \pm SD$ (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$).

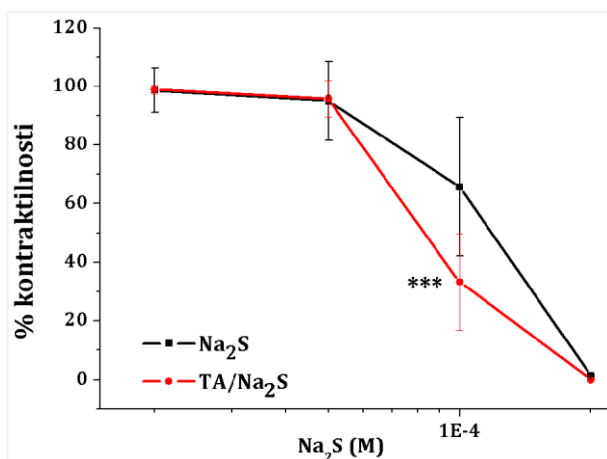


Slika 5.33

Efekat Na₂S na kontraktilnost Ca²⁺-aktiviranog uterusa pacova sa i bez NFA (10 μM).

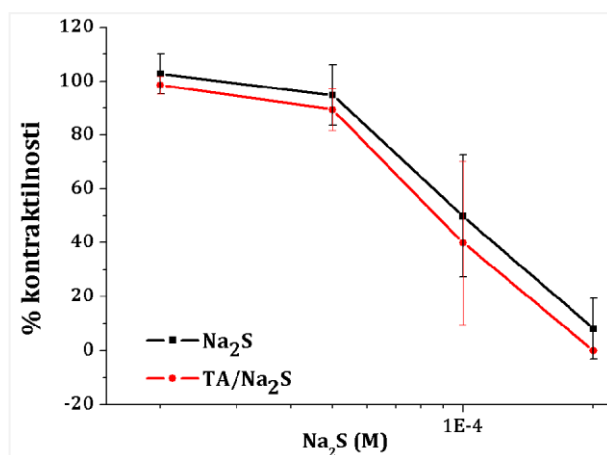
Podaci su predstavljeni kao $SV \pm SD$ (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$).

REZULTATI



Slika 5.34
Efekat Na₂S na kontraktilnost spontano-aktivnog uterusa pacova sa i bez TA (50 μM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i post hoc Tukey's HSD testom (*-p<0,05, **-p<0,01, ***-p<0,001).



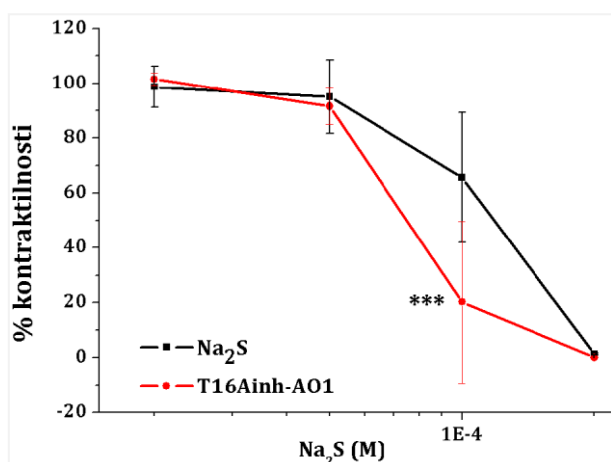
Slika 5.35
Efekat Na₂S na kontraktilnost Ca²⁺-aktiviranog uterusa pacova sa i bez TA (50 μM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i post hoc Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).

5.4.2.4 Uloga ANO-1 kanala

Inhibicija ANO-1 kanala (TMEM16A) nije rezultirala promjenama u relaksantnom efektu sulfida (**Slika 5.36 i 5.37**). Naime, pretretman spontano-aktivnih uterusa T16Ainh-A01 potencirao je relaksantni efekat sulfida, dok na kalcijumom aktiviranim uterusima nije doveo do statistički značajnih promjena.

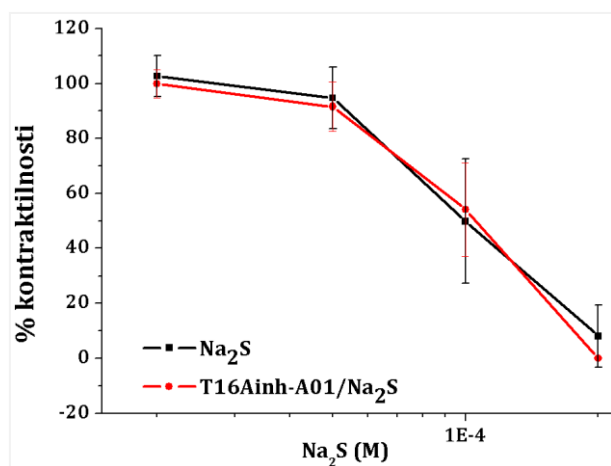
REZULTATI



Slika 5.36

Efekat Na₂S na kontraktilnost spontano-aktivnog uterusu pacova sa i bez T16Ainh-A01 (5 μM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).



Slika 5.37

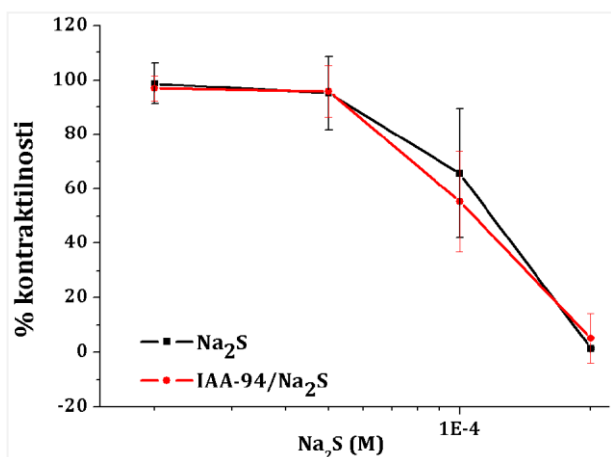
Efekat Na₂S na kontraktilnost Ca²⁺-aktiviranog uterusu pacova sa i bez T16Ainh-A01 (5 μM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).

5.4.2.5 Uloga CLC-1

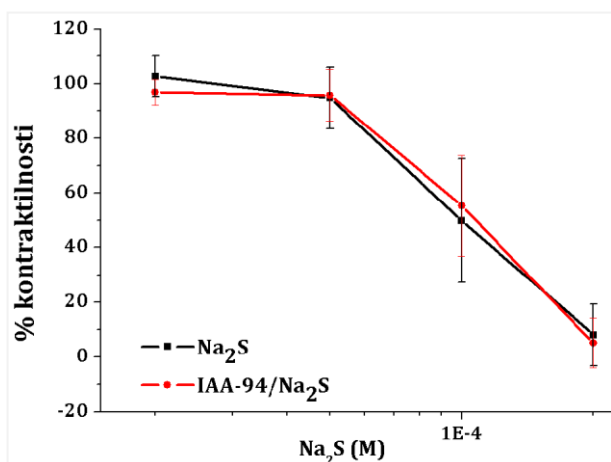
Specifični inhibitor CLC-1 kanala (IAA-94), korišćen je u cilju ispitivanja učešća ovih kanala u odgovoru uterusu na Na₂S. Rezultati prikazani na **Slici 5.38 i 5.39** pokazuju da CLC-1 nisu posrednici u efektima sulfida, budući da pretretman sa IAA-94 nije antagonizovao relaksantni efekat sulfida.

REZULTATI



Slika 5.38
Efekat Na₂S na kontraktlnost spontano-aktivnog uterusa pacova sa i bez IAA-94 (25 μM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).



Slika 5.39
Efekat Na₂S na kontraktlnost Ca²⁺-aktiviranog uterusa pacova sa i bez IAA-94 (25 μM).

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001).

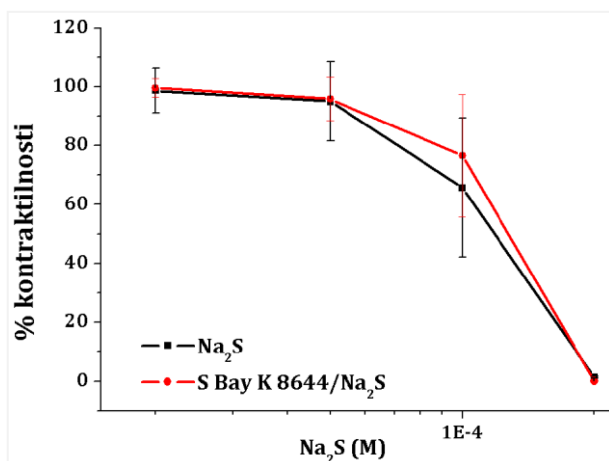
5.4.3 Uloga kalcijumovih kanala

L-tip Ca²⁺ kanala je jedan od glavnih regulatora kontraktlnosti faznih, ali i toničnih kontrakcija. Naime, porijeklo toničnih kontrakcija vezano je za veće stanje otvorenosti L-tipa Ca²⁺ kanala, koje nastaje usled jake depolarizacije, što konačno rezultira većom kontrakcijom. Eksperimenti su dizajnirani u cilju ispitivanja uloge kalcijumskih kanala, kao posrednika u relaksantnom efektu sulfida, testiranjem efekata S-Bay K 8644 (0,1 μM) aktivatora L-tipa Ca²⁺ kanala, na efekat sulfida na spontano-aktivnim i kalcijumom indukovanim uterusima.

REZULTATI

5.4.3.1 Uloga L-tipa kanala

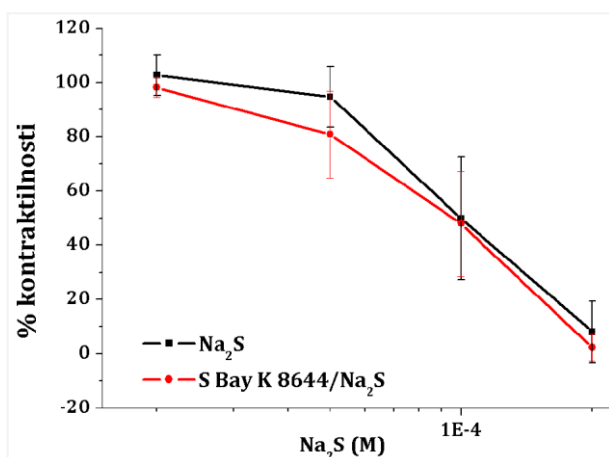
Specifični aktivator L-tipa kalcijumskih kanala, korišćen je u cilju ispitivanja učešća ovih kanala u odgovoru uterusa na Na_2S . Rezultati prikazani na Slici 5.40 i 5.41 pokazuju da S-Bay K 8644 nije inhibirao relaksantni efekat sulfida.



Slika 5.40

Efekat Na_2S na kontraktlnost spontano-aktivnog uterusa pacova sa i bez S-Bay K 8644 (0.1 μM).

Podaci su predstavljeni kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ ($n=8$). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na_2S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$).



Slika 5.41

Efekat Na_2S na kontraktlnost Ca^{2+} -aktiviranog uterusa pacova sa i bez S-Bay K 8644 (0,1 μM).

Podaci su predstavljeni kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ ($n=8$). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na_2S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (*- $p<0,05$, **- $p<0,01$,***- $p<0,001$)

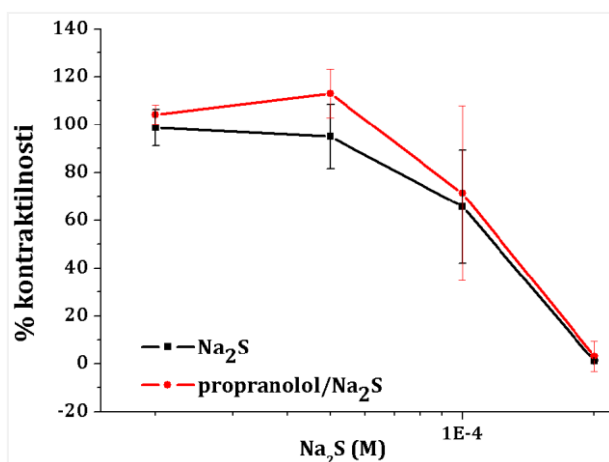
5.4.4 Uloga cAMP i cGMP puteva u relaksantnom efektu natrijum-sulfida

Uloga klasičnih relaksacionih puteva indukovanih promjenom količine drugih glasnika (cAMP i cGMP) ispitivana je primjenom β -blokatora (propranolol) i inhibitorom solubilne guanilat-ciklaze (metilensko plavo).

REZULTATI

5.4.4.1 Uloga β -adrenoreceptora

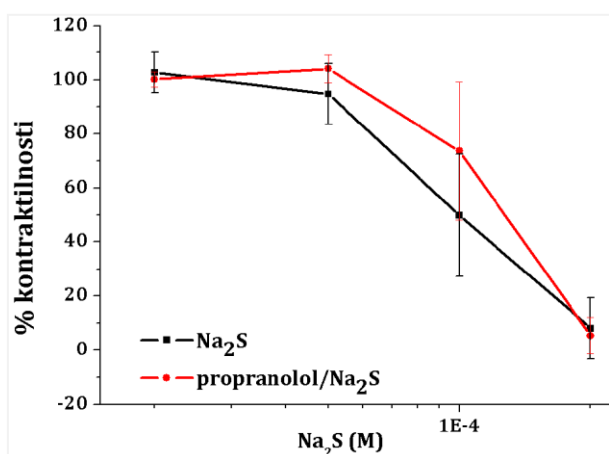
Inhibitor β -adrenoreceptora (propranolol), korišćen je u cilju ispitivanja učešća cAMP zavisnog signalnog puta u relaksantnom efektu Na_2S . Rezultati prikazani na **Slici 5.42** i **5.43** pokazuju da relaksacija izazvana sulfidom nije cAMP zavisna.



Slika 5.42

Efekat Na_2S na kontraktilnost spontano-aktivnog uterusa pacova sa i bez propranolola ($1 \mu\text{M}$).

Podaci su predstavljeni kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ ($n=8$). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na_2S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,01$).



Slika 5.43

Efekat Na_2S na kontraktilnost Ca^{2+} -aktiviranog uterusa pacova sa i bez propranolola ($1 \mu\text{M}$).

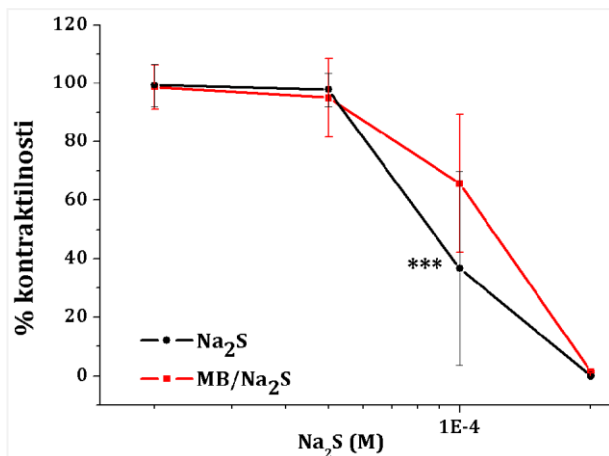
Podaci su predstavljeni kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ ($n=8$). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na_2S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$).

5.4.4.2 Uloga sGC

Učešće cGMP-zavisnog signalnog puta u relaksantnom efektu Na_2S testirano je primjenom metilenskog plavog, inhibitora sGC. Rezultati prikazani na **Slici 5.44** i **5.45** pokazuju da metilensko plavo nije inhibirao relaksantni efekat sulfida. Naime, relaksantni efekat je samo parcijalno antagonizovan pri jediničnim

REZULTATI

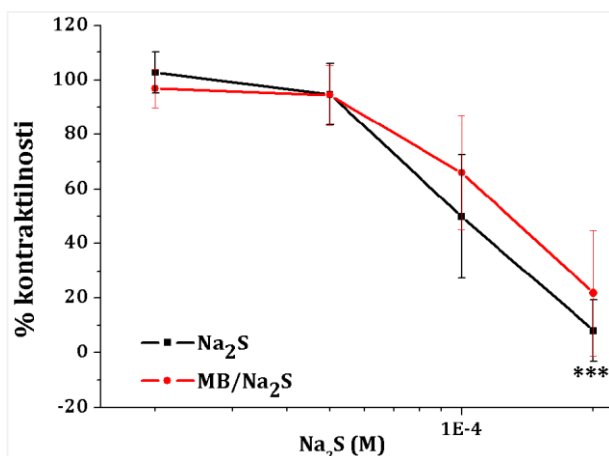
koncentracijama (100 μM kod spontanih kontrakcija i 200 μM kod kalcijum-indukovanih).



Slika 5.44

Efekat Na₂S na kontraktilnost spontano-aktivnog uterusa pacova sa i bez metilenskog-plavog (1 μM).

Podaci su predstavljeni kao $SV \pm SD$ (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$).



Slika 5.45

Efekat Na₂S na kontraktilnost Ca²⁺-aktiviranog uterusa pacova sa i bez metilnskog-plavog (1 μM).

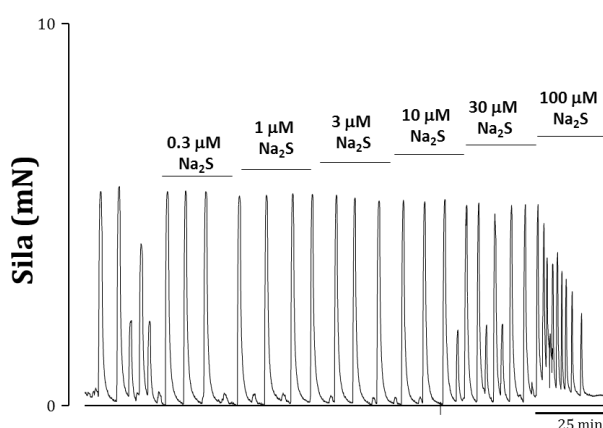
Podaci su predstavljeni kao $SV \pm SD$ (n=8). Podaci su analizirani dvostrukom analizom varijanse (faktori: Na₂S koncentracija i pretretman) i *post hoc* Tukey's HSD testom (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$).

REZULTATI

5.5 Efekti sulfida na kontraktilnost humanog miometrijuma

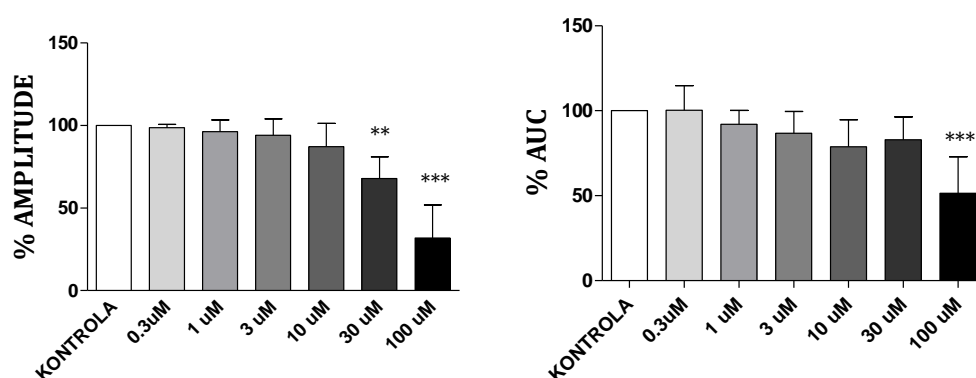
5.5.1 Efekti ATB-346, HTB i naproksena na kontraktilnost humanog miometrijuma

Ispitivani su efekti rastućih koncentracija egzogenog Na₂S na kontrakcije spontanog aktivnog trudnog humanog mioemtrijuma. Miometrijumi su nakon stabilizacije tretirani Na₂S sa (0,3 – 100 μM). Natrijum-sulfid je izazvao dozno-zavisnu, relaksaciju, smanjujući amplitudu, ali i frekvenciju kontrakcija (statistički značajni). Reprezentativni zapis dat je na **Slici 5.46**. Analiza smanjenja amplitude i AUC prikazana je na **Slici 5.47**.



Slika 5.46
Reprezentivni zapis efekata Na₂S na spontano aktivne kontrakcije humanog miometrijuma.

Miometrijumi su nakon stabilizacije i uspostavljanja spontane aktivnosti, odnosno Ca²⁺-aktivacije, tretirani rastućim koncentracijama Na₂S (0,3 – 100 μM).

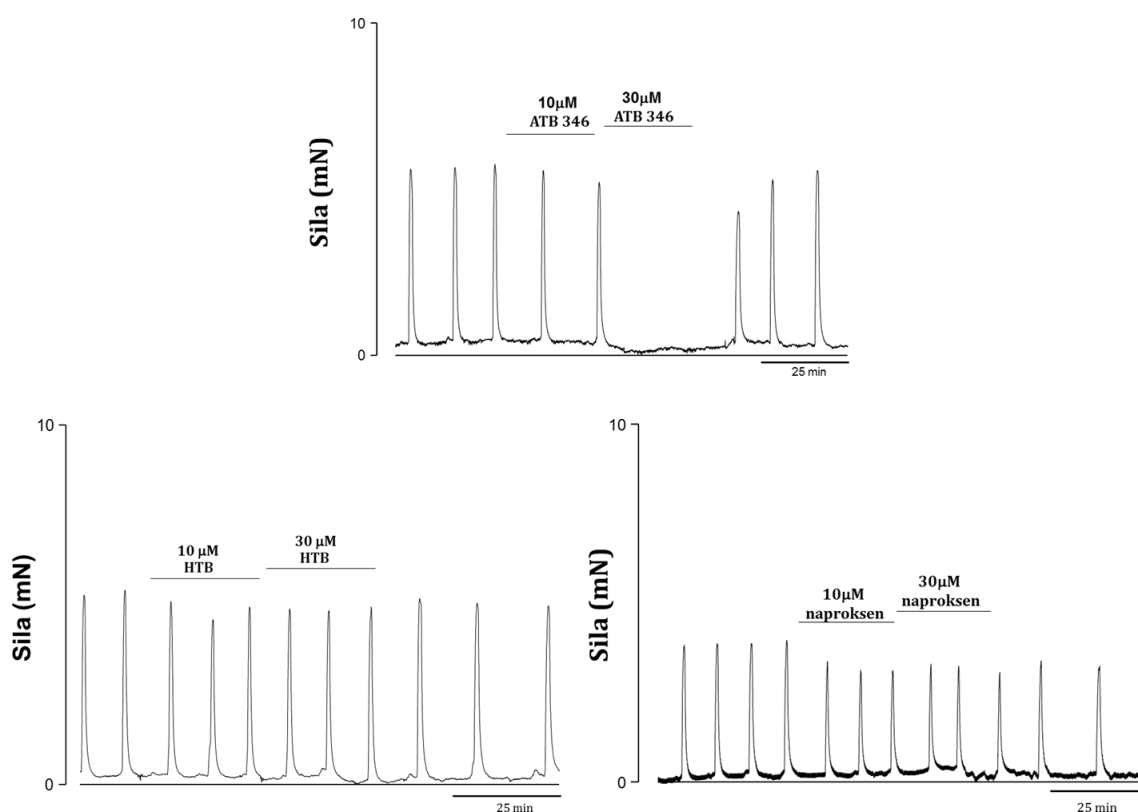


Slika 5.47 Efekat Na₂S na kontrakcije spontano-aktivnog humanog miometrijuma: dozno zavisno smanjenje amplituda i AUC.

Podaci su predstavljeni kao SV ± SD. Podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse (faktor: Na₂S koncentracija; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (***) $p < 0,001$).

REZULTATI

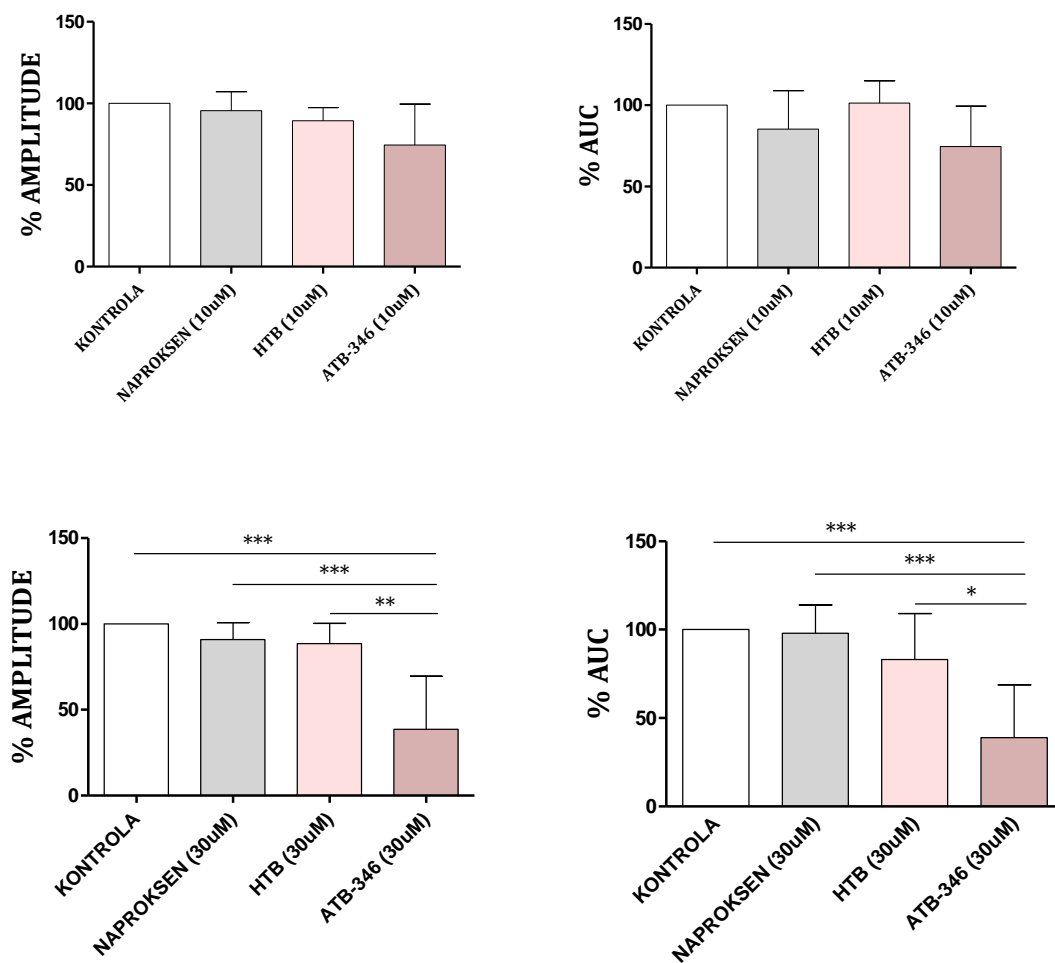
U ovoj studiji su ispitivani i efekti donora sulfida ATB-346, agensa koji je nastao kovalentnim vezivanjem HTB (donor sulfida) i naproksena. Oba roditeljska jedinjenja su identifikovani kao potencijalni tokolitici, stoga je testiranje ATB-346 od osobitog značaja. Naproksen i HTB su testirani u ekvimolarnim koncentracijama u odnosu na ATB-346. Reprezentativni zapis dat je na **Slici 5.48**. Analiza smanjenja amplitude i AUC prikazana je na **Slici 5.49**. Jasno se uočava da ATB-346 relaksira humani miometrijum pri 30 μM i efekat je znatno potentniji od efekta HTB i naproksena (koji u ekvimolarnoj koncentraciji nemaju statistički značajan efekat na kontraktilnost).



Slika 5.48 Reprezentativni zapis efekata ATB-346, HTB i naproksena na kontraktilnu aktivnost humanog miometrijuma.

Miometrijumi su nakon stabilizacije i uspostavljanja spontane aktivnosti, tretirani sa ATB-346 (10 i 30 μM), HTB (10 i 30 μM), i naproksenom (10 i 30 μM)

REZULTATI



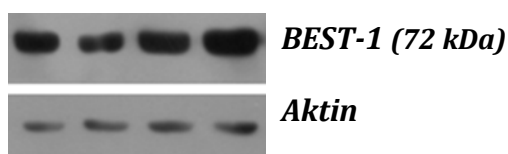
Slika 5.49 Poređenje efekata ATB-346, HTBB i naproksena na kontrakcije spontano-aktivnog humanog miometrijuma: dozno zavisno smanjenje amplituda i AUC.

Podaci su predstavljeni kao $SV \pm SD$. Podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse (faktor: Na_2S koncentracija; $p < 0.05$ se smatra značajnim) i *post hoc* Tukey's HSD testom (** $p < 0,001$).

REZULTATI

5.6 Proteinska ekspresija bestrofinskih kanala

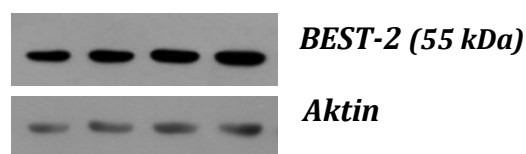
Prethodni eksperimenti su potvrdili da je sulfidom izazvana relaksacija osjetljiva na DIDS, da bestrofini mogu biti medijatori iste. Da bi se utvrdila relevantnost ove hipoteze bilo je potrebno utvrditi da li su bestrofini uopšte zastupljeni u uterusu pacova. Ovi eksperimenti takođe omogućavaju uvid u fiziološku relevantnost bestrofina u regulisanju kontraktilnosti uterusa. Ispitana je proteinska ekspresija bestrofina (BEST-1 i BEST-2) u uterusu pacova u estrusu. Kvantifikacija je urađena u negravidnim uterusima ženki u fazi estrusa. Reprezentativne slike *Western blot* analize prikazane su na **Slici 5.50 i 5.51**. Nivo ekspresije bestrofina mjeren je u odnosu na β -aktin. Kao što se vidi, BEST-1 i BEST-2 su eksprimirani u uterusu pacova u estrusu. Međutim, zastupljenost BEST-1 u odnosu na BEST-2 je nešto veća (**Slika 5.52**).



Slika 5.50

Proteinska ekspresija BEST-1

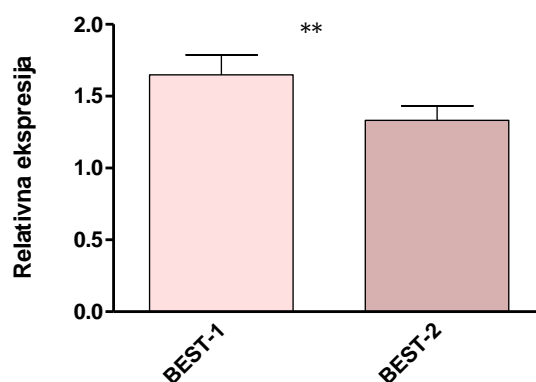
Reprezentativna slika *Western blot* analize koja prikazuje zastupljenost BEST-1 u uterusima pacova u estrusu.



Slika 5.51

Proteinska ekspresija BEST-2

Reprezentativna slika *Western blot* analize koja prikazuje zastupljenost BEST-2 u uterusima pacova u estrusu.

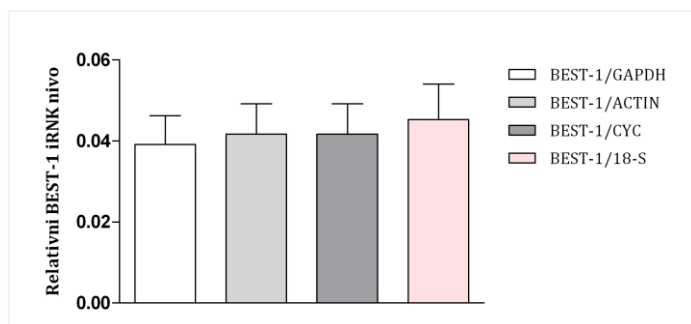
**Slika 5.52 Relativna ekspresija BEST-1 i BEST-2**

izražena u odnosu na aktin kao endogenu kontrolu. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ iz četiri nezavisna eksperimenta i podaci su analizirani Studentovim *t*-testom ($p < 0,05$).

REZULTATI

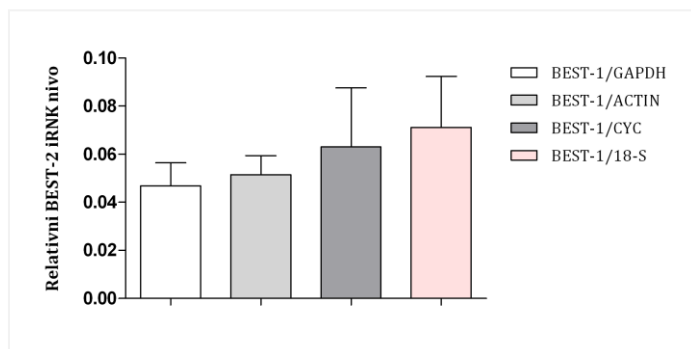
5.7 Genska ekspresija bestrofina

Pokazana prisutnost bestrofina na proteinskom nivou u uterusu pacova, inicirala je dalje eksperimente koji su za cilj imali ispitivanje ekspresije BEST-1 i BEST-2 na nivou iRNK u uterusu pacova u estrusu. Ovi eksperimenti dodatno doprinose rastvjetljenju fiziološke relevantnosti bestrofina u regulisanju kontraktilnosti uterusa. Kvantifikacija je urađena u negravidnim uterusima ženki u fazi estrusa. Ekspresija bestrofina mjerena je u odnosu na endogene kontrole: glicerladehid-3-fosfat-dehidrogenazu (GAPDH), β -aktin, CYC A i 18S. Kao što se vidi, BEST-1 i BEST-2 su eksprimirani u uterusu pacova u estrusu (Slika 5.53 i 5.54).



Slika 5.53 Relativna ekspresija BEST-1 iRNK u uterusu pacova u estrusu.

Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ iz četiri nezavisna eksperimenta i podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse.



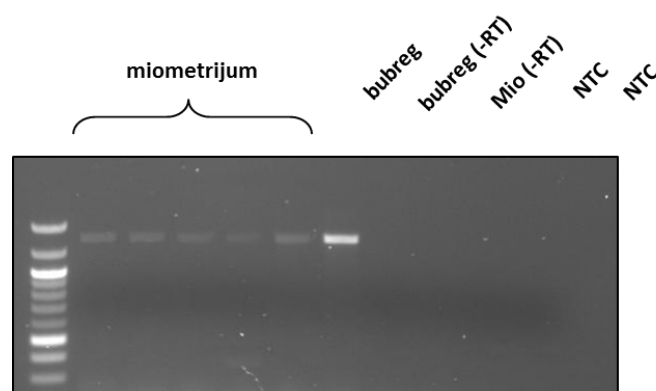
Slika 5.54 Relativna ekspresija BEST-2 iRNK u uterusu pacova u estrusu.

Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ iz četiri nezavisna eksperimenta i podaci su analizirani jednostrukom analizom varijanse.

Efekti sulfida na humanom miometriju zajedno sa rezultatima koji su nedvosmisleno pokazali da je sulfidom izazvana relaksacija uterusa pacova posredovana bestrofinima, a koji su u uterusu pacova eksprimirani na genskom i proteinskom nivou, ohrabrila je dodatne studije ispitivanja njihove ekspresije u humanom miometriju. Genska ekspresija u humanom miometriju identifikovana je korišćenjem tehnike „end-point“ PCR. Najprije su detektovana

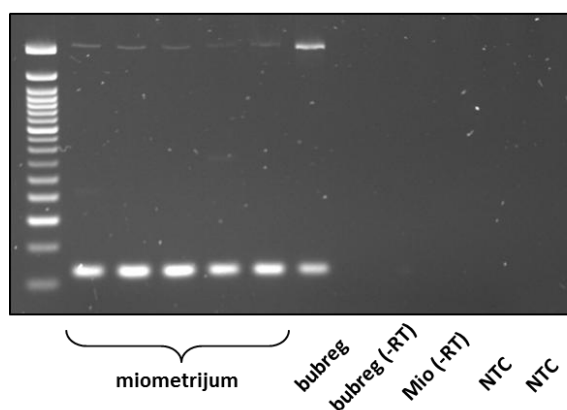
REZULTATI

dva produkta veličina aproksimativno 110bp kao i produkt od 1300bp (prema literaturnim podacima, ovo bi bila veličina produkta transkript varijante 7). Manji produkt odgovara veličini produkta (112bp) koji su predložili Milenković i sar., 2015 (u ovoj studiji korišćeni su prajmeri iz citirane studije) i transkript varijanti 1 i 3. U cilju boljeg razdvajanja ovih produkata uzorci su razdvajani elektroforetski na 1% TAE agaroznom gelu i 2% TBE agaroznom gelu (**Slika 5.55 i 5.56**).



Slika 5.55 Ekspresija BEST-1 iRNK u humanom uterusu.

Na slici je prikazan produkt (1300 bp) amplifikacije 5 uzoraka miometrijuma, bubrega (kao pozitivne kontrole), - RT (uzorak bez Reverzne transkriptaze) da bi se potvrdilo odsustvo genomske DNA u originalnom RNA uzorku kao i NTC (od eng. no template control) da bi se dodatno potvrdilo odsutvo DNA genomske kontaminacije.



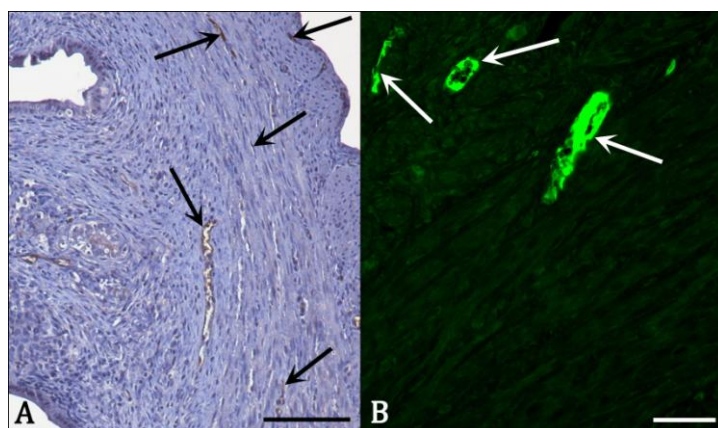
Slika 5.56 Ekspresija BEST-1 iRNK u humanom uterusu.

Na slici je prikazan produkt (110 bp) amplifikacije 5 uzoraka miometrijuma, bubrega (kao pozitivne kontrole), - RT (uzorak bez Reverzne transkriptaze) da bi se potvrdilo odsustvo genomske DNA u originalnom RNA uzorku kao i NTC (od eng. no template control) da bi se dodatno potvrdilo odsutvo DNA genomske kontaminacije.

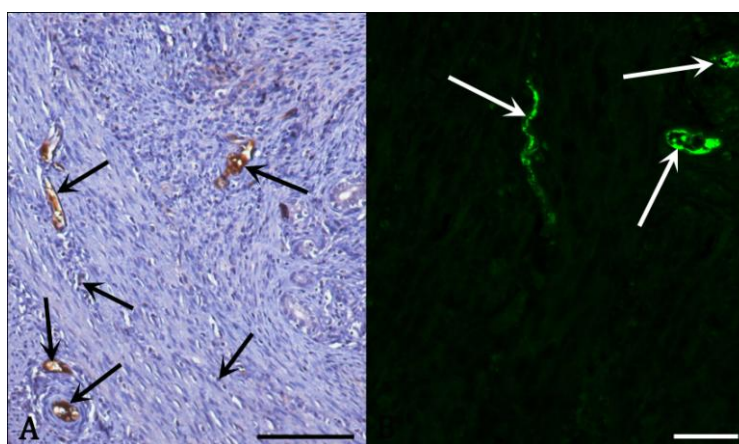
REZULTATI

5.8 Imunohistohemijaska analiza

Nakon što je utvrđeno da su bestrofini prisutni u uterusu na proteinskom i genskom nivou, bilo je potrebno identifikovati njihovu lokalizaciju. Imunohistohemijaska analiza pokazala je da su oba kanala BEST-1 i BEST-2, predominantno subcelularno lokalizovana u pojedinačni ćelijama u longitudinalnom i cirkularnom mišićnom sloju uterusa, adultnih ženki pacova u stadijumu estrusa (**Slika 5.57 i 5.58**).



Slika 5.57 (A) Imunohistohemijaski (PAP metoda; Bar 100 μm) i **(B)** imunofluorescentno- (50 μm) obilježen BEST-1 u glatkim ćelijama mišićnog sloja uterusa adultnih ženki pacova u stadijumu estrusa. Strelice – subcelularna lokalizacija BEST-1 u glatkim mišićnim ćelijama.



Slika 5.58 (A) Imunohistohemijaski (PAP metoda; Bar 100 μm) i **(B)** imunofluorescentno- (50 μm) obilježen BEST-2 u glatkim ćelijama mišićnog sloja uterusa adultnih ženki pacova u stadijumu estrusa. Strelice – subcelularna lokalizacija BEST-2 u glatkim mišićnim ćelijama.

REZULTATI

5.9 Ispitivanje redoks-osjetljivosti relaksantnog efekta vodonik-sulfida

U razmatranju dominantnih aspekata H₂S biohemije, koja učestvuje u njegovim efektima, ističu se slabe redukcione osobine H₂S i nukleofilne osobine HS⁻. Imajući to u vidu, oksidanti, metalni centri i tioli su među prvim postuliranim targetima sulfida.

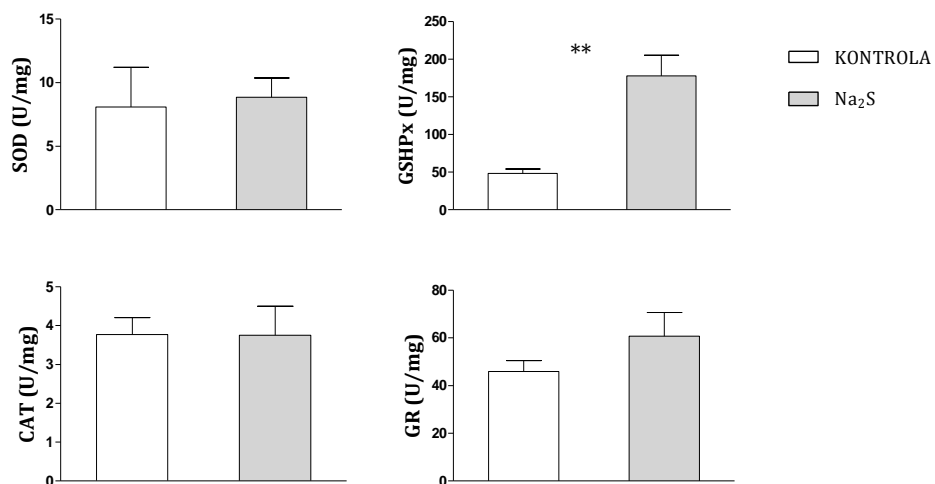
5.9.1 Aktivnosti antioksidativnih enzima

Cilj ovih eksperimenata bio je da se ispita efekat sulfida na aktivnost antioksidativnih enzima i da se dobijeni rezultati uporede sa: (i) efektom CH₃SH (što može pomoći u diskriminaciji efekata molekuskog i anjonskog oblika sulfhidrila), (ii) efektom pretretmana blokatorima jonskih kanala i modulatorima signalnih puteva (što osvjetljuje ulogu redoks događaja u modulaciji onih targeta koji učestvuju u Na₂S-indukovanoj relaksaciji).

5.9.1.1 Efekat sulfida na aktivnost antioksidativnih enzima u uterusu

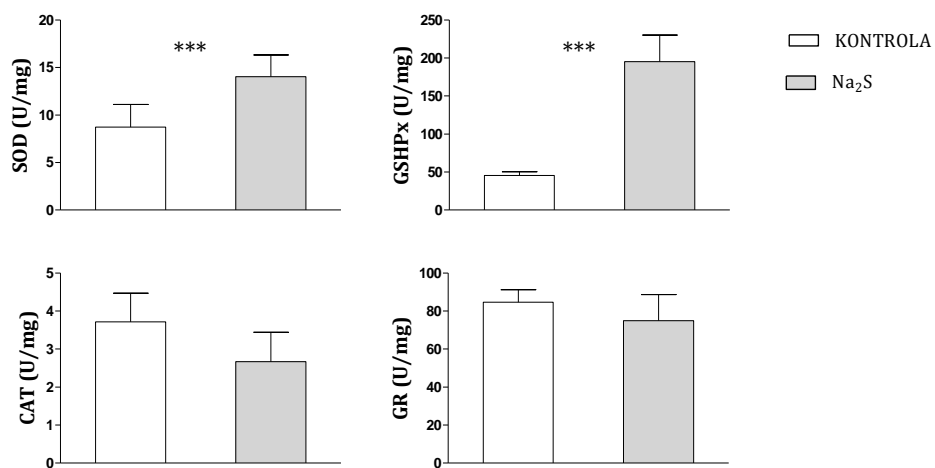
Efekat Na₂S na aktivnost antioksidativnih enzima na spontano-aktivnim i kalcijum-aktiviranim uterusima izmjeren je nakon tretiranja istih sa Na₂S (20-200 μM). Aktivnosti enzima u uterusima tretiranim sa Na₂S upoređeni su sa aktivnostima iz kontrolnih, netretiranih uterusu. Uočeno je da su efekti kalcijum-zavisni budući da: (i) porast aktivnosti SOD (**Slika 5.59 i 5.60**) nakon tretmana Na₂S uočen je samo kod kalcijum-aktiviranih uterusu, (ii) tretman sulfidom doveo je do porasta GSH-Px aktivnosti (**Slika 5.59 i 5.60**) u oba slučaja, (iii) promjene u GR aktivnosti (**Slika 5.59 i 5.60**) i (iv) aktivnosti katalaze nisu uočene (**Slika 5.59 i 5.60**).

REZULTATI



Slika 5.59 Promjene u aktivnostima antioksidativnih enzima u spontano-aktivnom uterusu pacova u estrusu nakon tretmana Na₂S (20-200μM).

Rezultati su prikazani kao SV ± SD. **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001.



Slika 5.60 Promjene u aktivnostima antioksidativnih enzima u Ca²⁺-indukovanom uterusu pacova u estrusu nakon tretmana Na₂S (20-200μM).

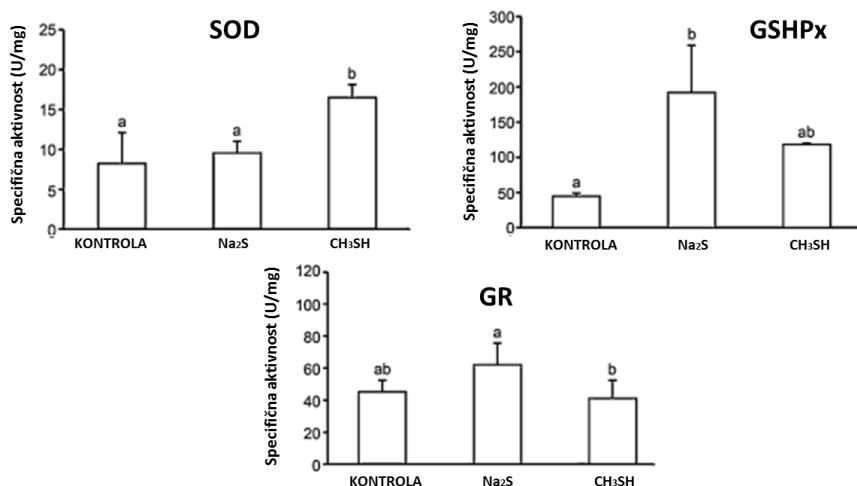
Rezultati su prikazani kao SV ± SD. **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001.

REZULTATI

5.9.1.2 Efekat CH₃SH na aktivnost antioksidativnih enzima u uterusu - poređenje sa efektima sulfida

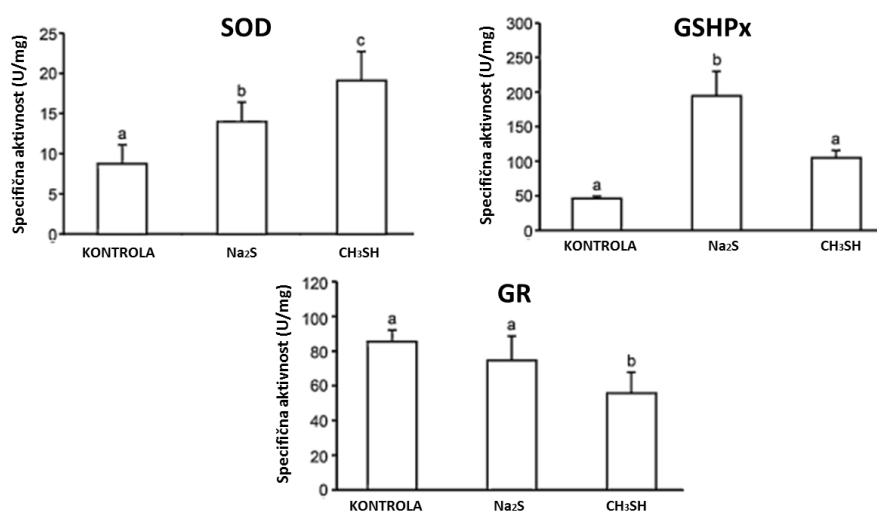
Ispitivan je efekat CH₃SH na aktivnost antioksidativnih enzima na spontan-aktivnim i kalcijum-aktiviranim uterusima nakon tretmana istih metantiolom (100-600 μM). Uočeno je da se efekti metantiola razlikuju u odnosu na efekte Na₂S: (i) nisu kalcijum-zavisni (ii) efekti na pojedinačne enzime su različiti u odnosu na efekte Na₂S.

Naime kod spontano aktivnih uterusa tretiranih CH₃SH uočeni su sledeći efekti: (i) povećana aktivnost SOD ($p < 0,01$), (ii) smanjena GR aktivnost ($p < 0,05$) nakon tretmana CH₃SH i (iii) nepromjenjena aktivnost GSH-Px. S druge strane, tretman Na₂S: (i) nije doveo do promjena u aktivnosti SOD, (ii) povećao je aktivnost GSH Px ($p < 0,01$), i (iii) GR aktivnost je bila slična onima iz kontrolnih uzoraka (**Slika 5.61**). Tretman kalcijum-aktiviranih uterusa CH₃SH, rezultirao je: (i) povećanom aktivnošću SOD ($p < 0,001$), (ii) smanjenom aktivnošću GR ($p < 0,001$) i (iii) nepromjenjenom aktivnošću GSH-Px. U slučaju Na₂S tretmana dobijeni su sledeći rezultati: (i) povećana aktivnost SOD ($p < 0,001$), (ii) povećana aktivnost GSH-Px ($p < 0,001$) i (iii) neizmjenjena aktivnost GR u odnosu na aktivnosti u kontrolnim uzorcima (**Slika 5.62**).



Slika 5.61 Promjene u aktivnostima antioksidativnih enzima u spontano-aktivnom uterusu nakon tretmana metantiolom (100-600 μM): kontrole (n=6), Na₂S (n=6) i CH₃SH (n=6). Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Razlike su testirane sa jednostrukom analizom i *post hoc* Tuckey's HSD testom (različita slova označavaju statistički značajne razlike određene *post hoc* testom). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. SOD specifična aktivnost ($F=9,7$; $p < 0,001$), GSHPx specifična aktivnost ($F=10,4$; $p < 0,001$), GR specifična aktivnost ($F=5,06$; $p < 0,05$).

REZULTATI



Slika 5.62 Promjene u aktivnostima antioksidativnih enzima u Ca²⁺-aktiviranom uterusu : nakon tretmana metantioiom (100-600 μM): kontrole (n=6), Na₂S (n=6) i CH₃SH (n=6). Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Razlike su testirane sa jednostrukom analizom varijanse i *post hoc* Tuckey's HSD testom (različita slova označavaju statistički značajne razlike određene *post hoc* testom). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. SOD specifična aktivnost (F=21,5; p<0,001), GSHPx specifična aktivnost (F=17,5; p<0,001), GR specifična aktivnost (F=13,4; p<0,05)

5.9.1.3 Efekat pretretmana modulator/Na₂S na aktivnost antioksidativnih enzima u uterusu – poređenje sa efektima sulfida

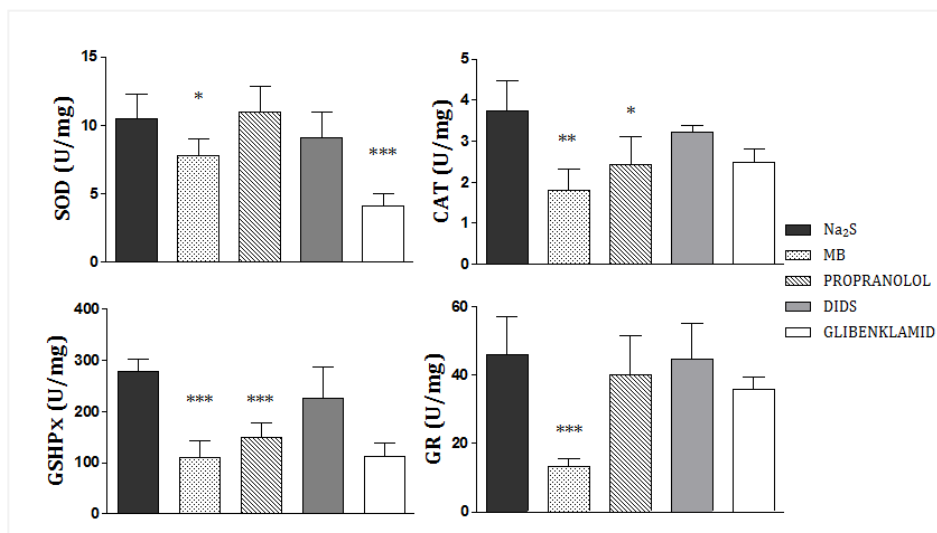
Tretman uterusa Na₂S doveo je do promjena u aktivnostima enzima antioksidativnog sistema, ali se promjene kvalitativno i kvantitativno razlikuju - zavisne su od tipa aktivacije (spontano-aktivne i Ca²⁺-indukovane), kao i od tipa pretretmana.

U slučaju spontano-aktivnih uterusa, pretretman MB/Na₂S doveo je do statistički značajnog pada aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px i GR u odnosu na Na₂S-tretirane kontrole. Uterusi koji su bili pretretirani glibenklamidom prije tretmana Na₂S pokazali su niži nivo SOD i GSH-Px u odnosu na kontrole tretirane samo Na₂S. Pad aktivnosti CAT i GSH-Px uočen je kod uterusa pretretiranih propranololom. Pretretman DIDS-om nije imao efekta na aktivnosti enzima u poređenju sa efektima samog Na₂S (**Slika 5.63**).

Kod Ca²⁺-aktiviranih uterusa pretretman MB doveo je do pada aktivnosti svih ispitivanih enzima osim katalaze. U poređenju sa Na₂S-tretiranom kontrolom, pretretman propranololom smanjio je aktivnost CAT. Glibenklamid je doveo do

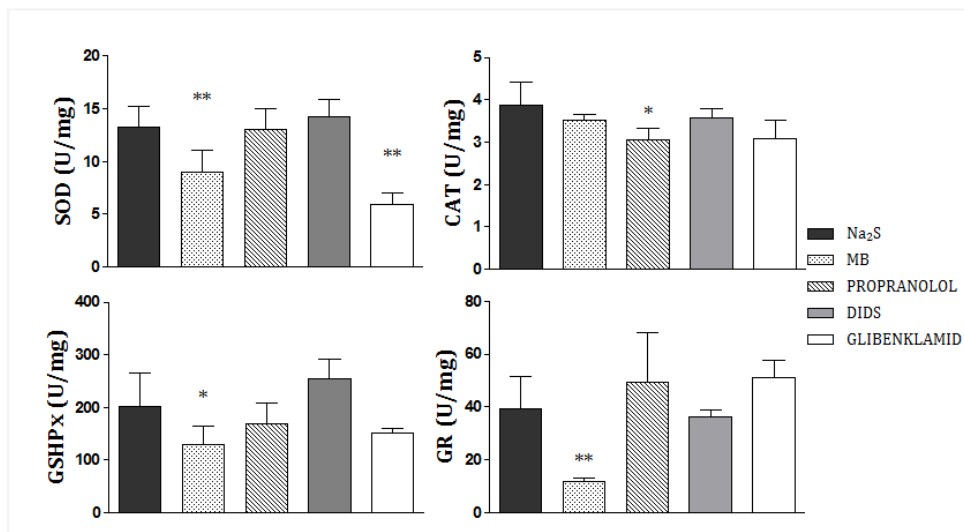
REZULTATI

smanjenja SOD i CAT aktivnosti, dok DIDS analogno spontanim kontrakcijama nije imao efekta na aktivnost enzima (Slika 5.64).



Slika 5.63 Promjene u aktivnostima antioksidativnih enzima u spontano-aktivnom uterusu pacova u estrusu nakon tretmana modulator /Na₂S poređenje sa Na₂S.

Rezultati su prikazani kao SV ± SD.**p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001.



Slika 5.64 Promjene u aktivnostima antioksidativnih enzima u Ca²⁺-aktiviranom uterusu pacova u estrusu nakon tretmana kombinacijom modulator/Na₂S poređenje sa Na₂S.

Rezultati su prikazani kao SV ± SD.**p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001.

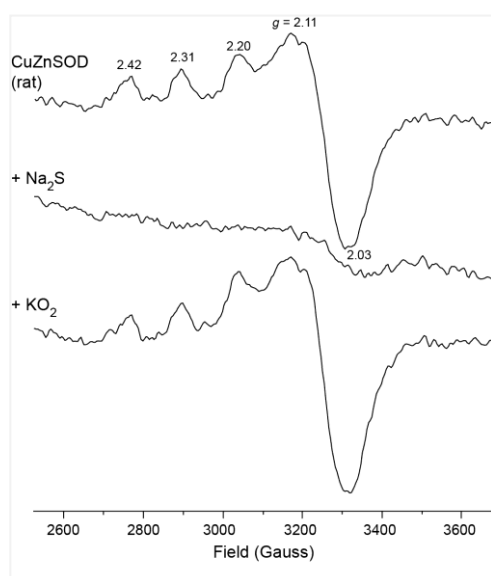
REZULTATI

5.9.1.4 EPR karakterizacija efekata sulfida na antioksidativne enzime (SOD)

Budući da je pokazan efekat tretmana sulfidom na aktivnosti enzima u uterusu, cilj daljih eksperimenata bio je da se ispita direktan efekat sulfida na prečišćene enzime, EPR (elektronska paramagnetna rezonanca) tehnikom, koja nedvosmisleno može pokazati učešće radikalskih vrsti i/ili promjena na metalnim centrima enzima, a koje mogu biti odgovorne za pokazane efekte sulfida. Odnos koncentracija enzim/sulfid, koji je testiran *in vitro*, odabran je tako da najpribližnije odgovara *in vivo* uslovima.

5.9.1.5 Efekat sulfida na SOD

Rezultati „low-T EPR“ spektroskopije pokazali su da sulfid ($\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$) indukuje redukciju Cu^{2+} do Cu^{1+} , dok $\text{O}_2^{\cdot-}$ nije uzrokovao EPR-detektibilne promjene. Ovo jasno ukazuje da je aktivni centar dismutaze „otvoreniji“ za efekat sulfida u poređenju sa superoksidom (**Slika 5.65**).

**Slika 5.65****EPR spektar Cu^{2+} u CuZnSOD – efekat sulfida.**

(CuZnSOD 100 μM , HEPES, 50 mM, pH = 7,4; Na_2S (2 mM) i KO_2 (1 mM)).

REZULTATI

5.9.2 Molekulsko modelovanje interakcija sulfida sa targetnim proteinima

Budući da su metaloenzimi (poput SOD i katalaze) identifikovani kao potencijalne ćelijske mete sulfida, a rezultati ove studije su pokazali da modulacija antioksidativnih enzima sulfidom može biti važna u regulaciji kontraktilnosti, pokušali smo da detaljniji mehanistički uvid dobijemo molekulskim modelovanjem interakcija sulfida sa CuZnSOD i CAT. Takođe, rezultati farmakoloških eseja ukazali su da bestrofini jedni od posrednika sulfidom izazvane relaksacije uterusu. Efekti, su upoređeni sa efektima CH₃SH za koji smo utvrdili da može biti koristan za razumijevanje mehanizama kojima H₂S odnosno HS⁻ ostvaruje svoje efekte. Dodatno, molekulsko modelovanje zajedno sa prethodnim rezultatima doprinosi razumijevanju mehanizama kojima sulfid generalno ostvaruje svoje efekte u ćeliji, a koji mogu biti od fundamentalnog, biohemijskog značaja, za brojne ćelijske procese, ne samo regulaciju kontraktilnosti.

Molekulsko modelovanje interakcija H₂S, HS⁻ i CH₃SH sa humanom katalazom pokazalo je da je preferirano vezujuće mjesto za sva tri liganda direktno iznad jona Fe³⁺ sa gornje strane hema, budući da je donja strana hema zatvorena Tyr358 prstenom, koji formira kompleks sa jonom Fe (**Slika 5.66 i 5.67**). Molekulsko modelovanje interakcija sa goveđom katalazom pokazalo je da je preferirano mjesto vezivanja sva tri liganda slično humanoj odmah iznad hema za jon Fe, budući da je donja strana hema zatvorena Ty357-Fe prstenom. Od tri razmatrana liganda HS⁻ ima najveći afinitet vezivanja (**Slika 5.68 i 5.69**). U slučaju humane CuZnSOD, molekulsko modelovanje predviđa da se sva tri liganda vezuju najvećim afinitetom za jon Cu²⁺, kao i da HS⁻ ima najveći afinitet (**Slika 5.70 i 5.71**). Vezujuće mjesto za goveđu CuZnSOD je isto kao i kod humane CuZnSOD, ali se vezujući afiniteti razlikuju (**Slika 5.72 i 5.73**). Molekulsko modelovanje je pokazalo da je predviđeni afinitet vezivanja najveći za HS⁻ i da CH₃SH ima najmanji, osim u slučaju humane katalaze, gdje je predviđeno da imaju isti afinitet, ali i dalje veći nego H₂S. Važno je primjetiti da se vezujući afiniteti za H₂S i HS⁻ ne razlikuju mnogo u vrijednostima. Geometrijska razlika ovdje nema uticaja budući da se voluminoznost ova dva liganda značajno ne razlikuje, s obzirom da se razlikuju

REZULTATI

samo u jednom H atomu (zanemarljivo mala razlika u odnosu na veliki atom sumpora). Razlika u vezivanju CH₃SH za humanu katalazu može biti posljedica različite strukture proteina, gdje je hem pozicioniran tako da može dovesti do distorzije vezujućeg džepa, a posljedično utiče i na vezujuće preference sva tri testirana liganda.

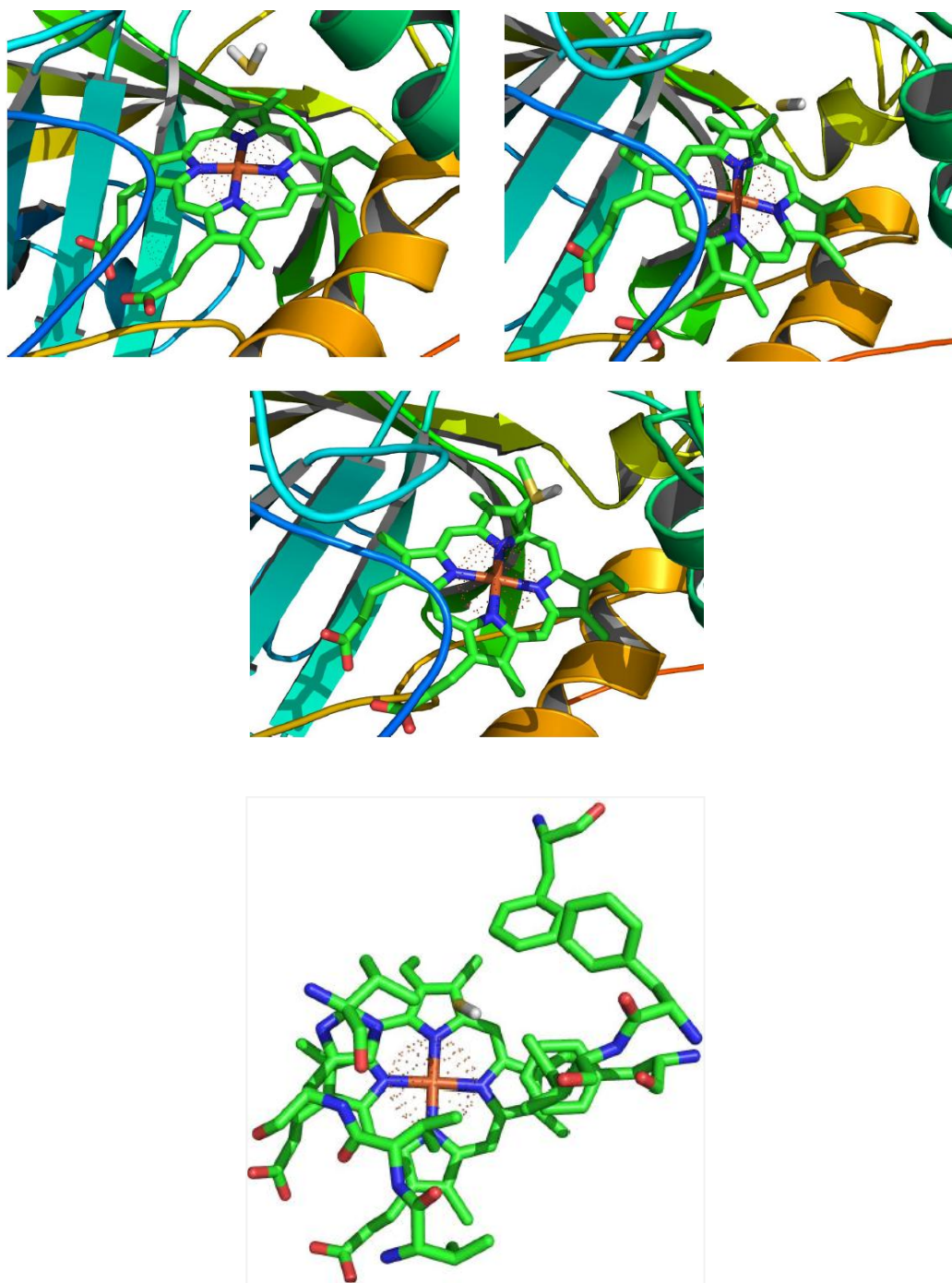
Molekulasko modelovanje interakcija H₂S, HS⁻ i CH₃SH sa bestrofinom prikazano je na **Slici 5.74-5.76**. Pozicija cisteina koji mogu biti porednici u efektima datih jedinjenja je prikazana na **Slici 5.77**.

REZULTATI



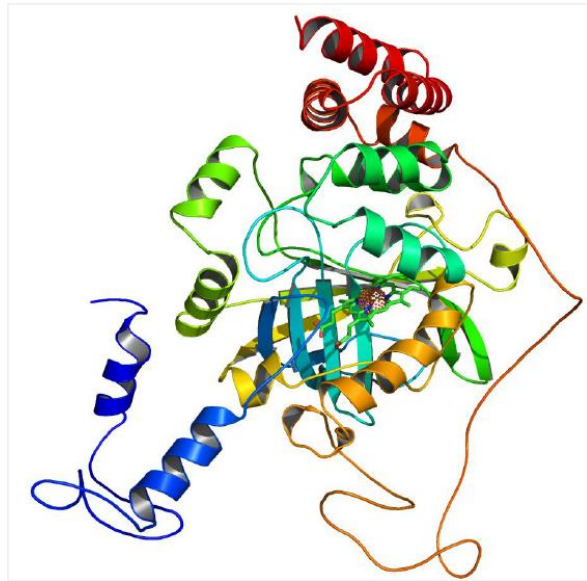
Slika 5.66 Grafički prikaz kristalne strukture humane katalaze 1TH3 domena A, sa molekulom hema i jonom Fe.

REZULTATI



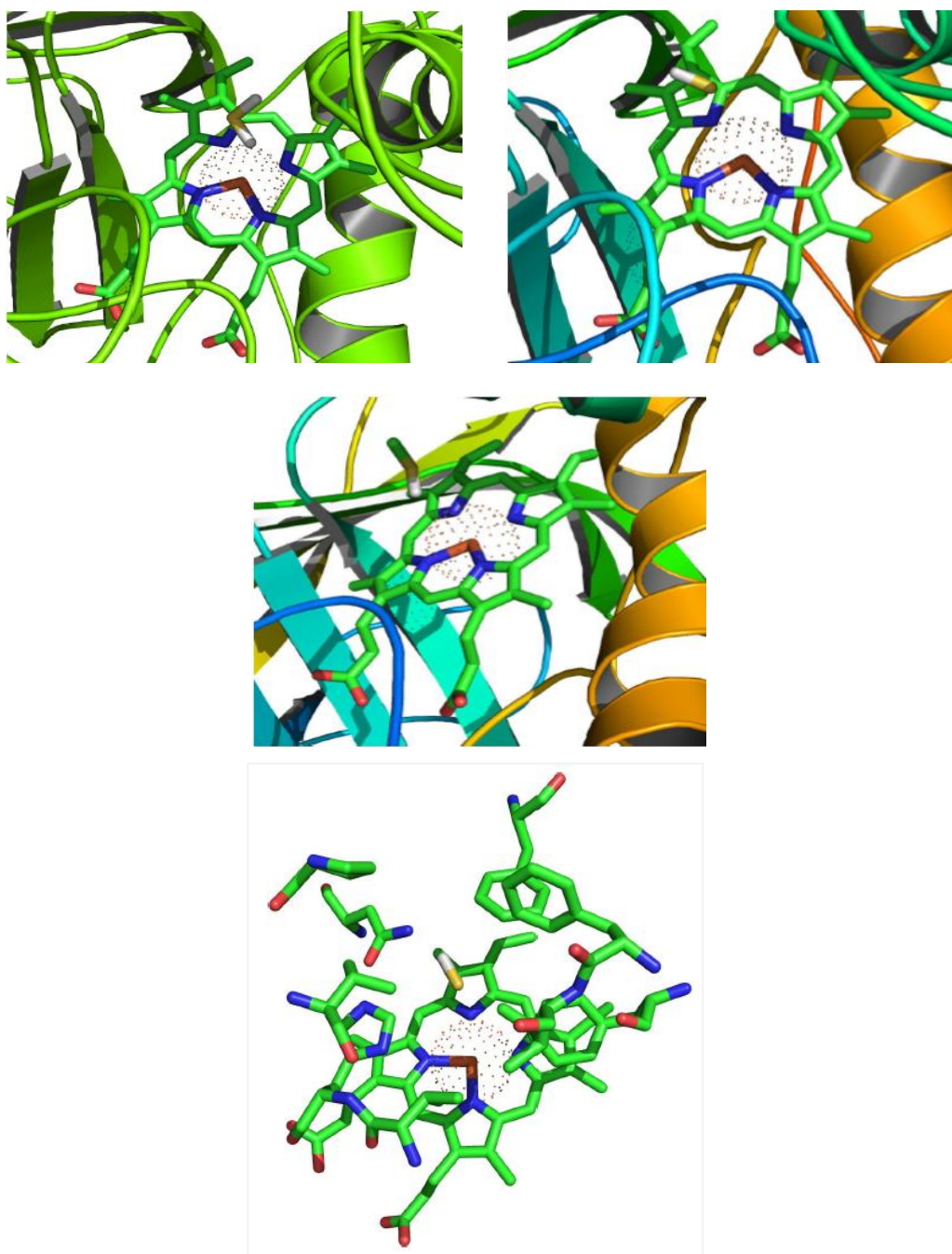
Slika 5.67 Molekulsko modelovanje interakcija humane katalaze i: H₂S (gore lijevo; afinitet -0,2 kcal/mol); **HS⁻** (gore desno; afinitet -0,3 kcal/mol), **CH₃SH** (sredina; afinitet -0,3 kcal/mol). Interagujući ostaci: Val73, His74, Val116, Phe153, Phe161, Phe164, Ile165, HEM.

REZULTATI



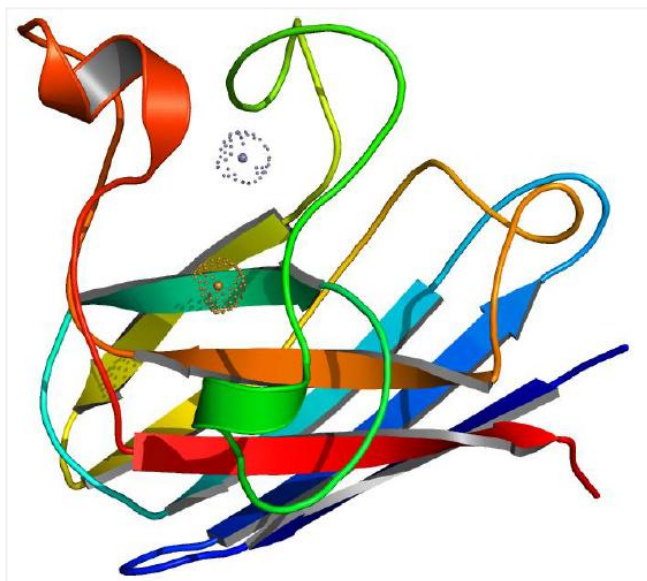
Slika 5.68 Grafički prikaz kristalne strukture goveđe katalaze 1TH3 domena A, sa molekulom hema i jonom Fe.

REZULTATI



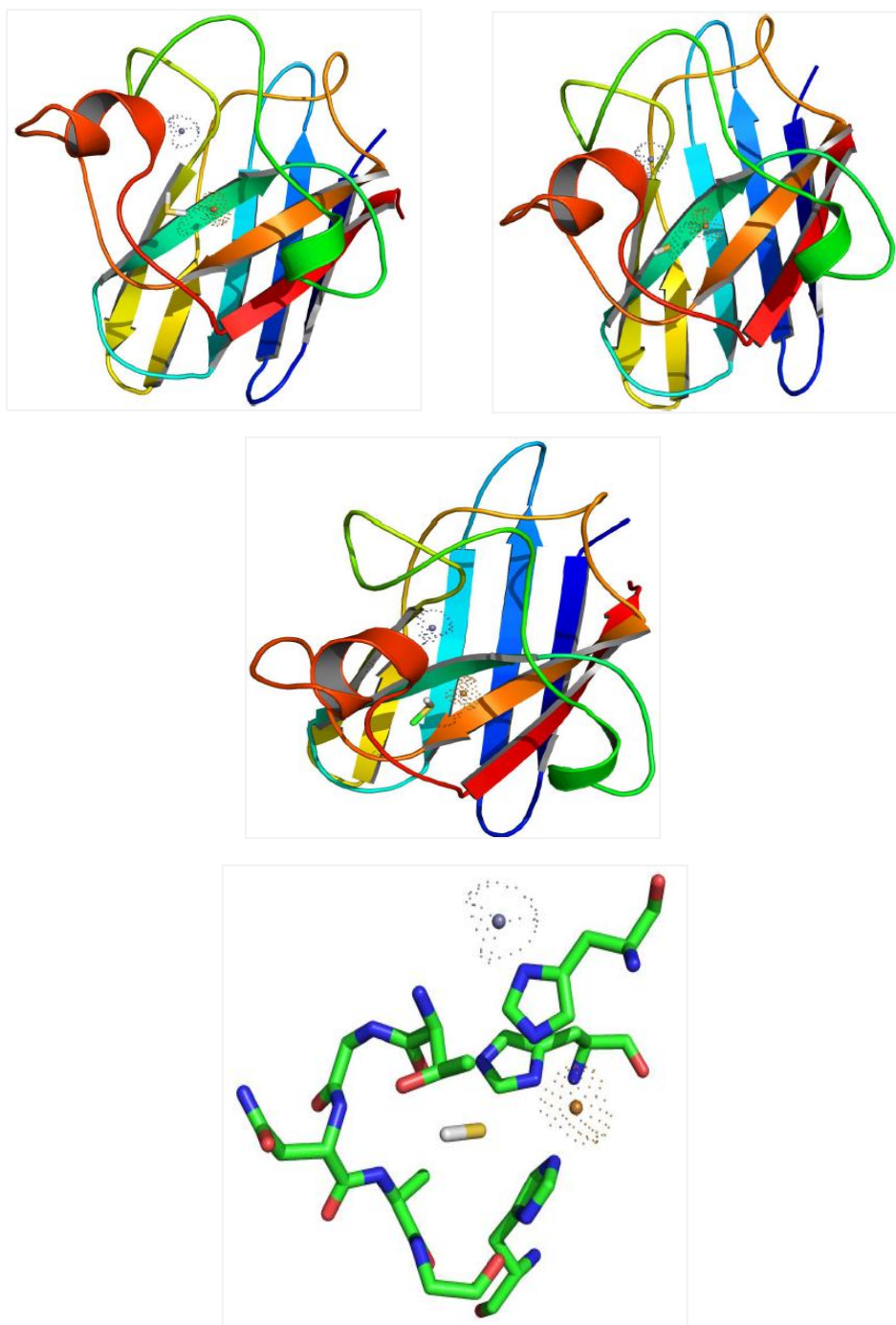
Slika 5.69 Molekulsko modelovanje interakcija goveđe katalaze i: H_2S (gore lijevo; afinitet $-0,1$ kcal/mol); HS^- (gore desno; afinitet $-0,2$ kcal/mol), CH_3SH (sredina; afinitet $0,0$ kcal/mol). Interagujući ostaci: Val73, Val74, Val115, Pro128, Asn147, Phe152, Phe160, Phe163, Ile164, HEM

REZULTATI



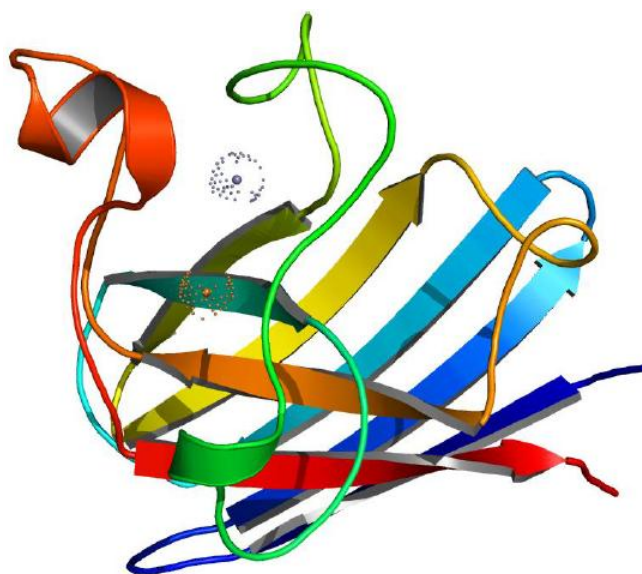
Slika 5.70 Grafički prikaz kristalne strukture humane SOD 1CB4 domena, sa jonima Cu i Zn.

REZULTATI



Slika 5.71 Molekulsko modelovanje interakcija humane SOD i: H₂S (gore lijevo; afinitet 0,8 kcal/mol); **HS⁻** (gore desno; afinitet 0,7 kcal/mol), **CH₃SH** (sredina; afinitet 3,5 kcal/mol). Interagujući ostaci: His46, His63, His120, Thr137, Gly138, Asn139, Ala140, Gly141, Cu, Zn

REZULTATI



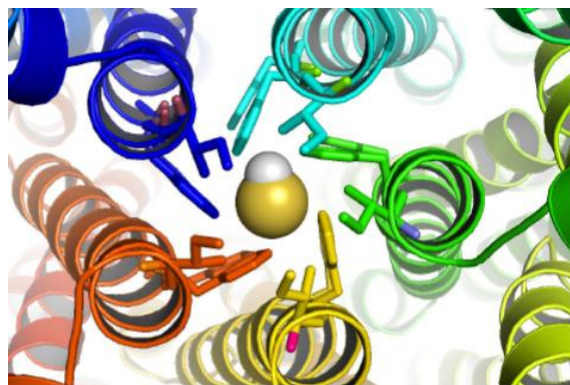
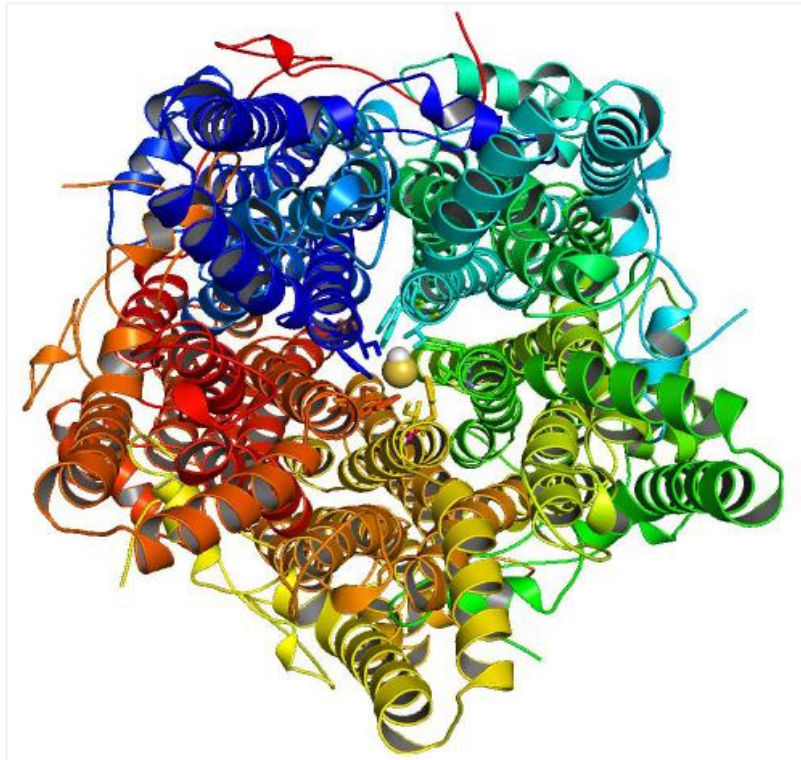
Slika 5.72 Grafički prikaz kristalne strukture goveđe SOD 1CB4 domena, sa jonima Cu i Zn.

REZULTATI



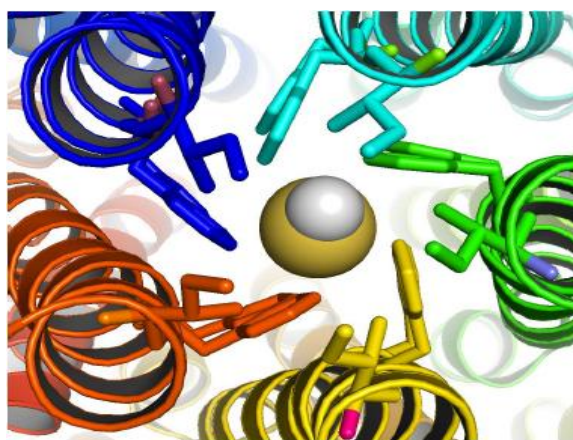
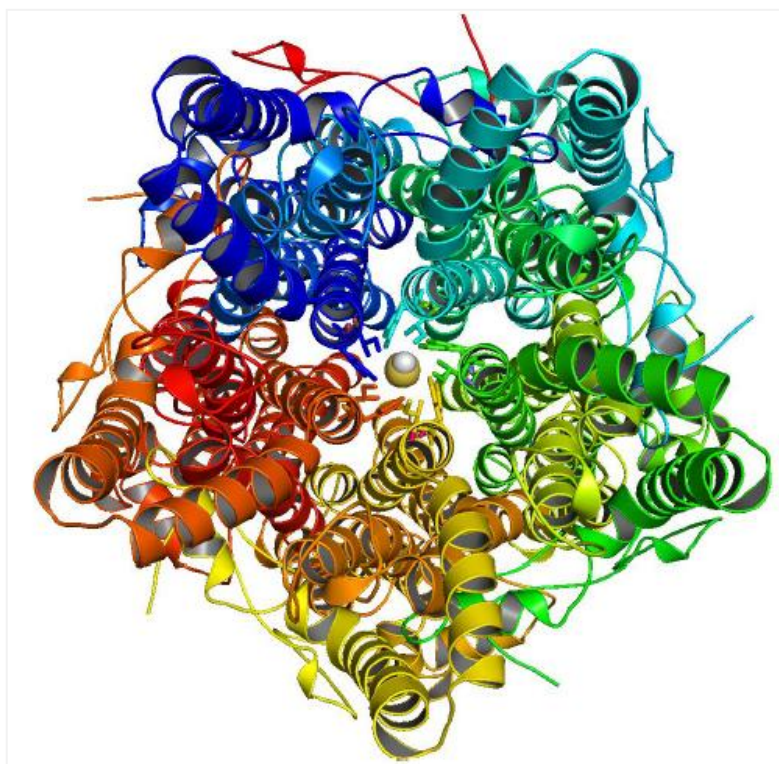
Slika 5.73 Molekulsko modelovanje interakcija goveđe SOD i: H_2S (gore lijevo; afinitet $-0,4$ kcal/mol); HS^- (gore desno; afinitet $-0,5$ kcal/mol) i CH_3SH (sredina; afinitet $+0,4$ kcal/mol). Interagujući ostaci: His46, Gly59, Pro60, His61, Lys134, Thr135, Arg141, Cu, Zn

REZULTATI



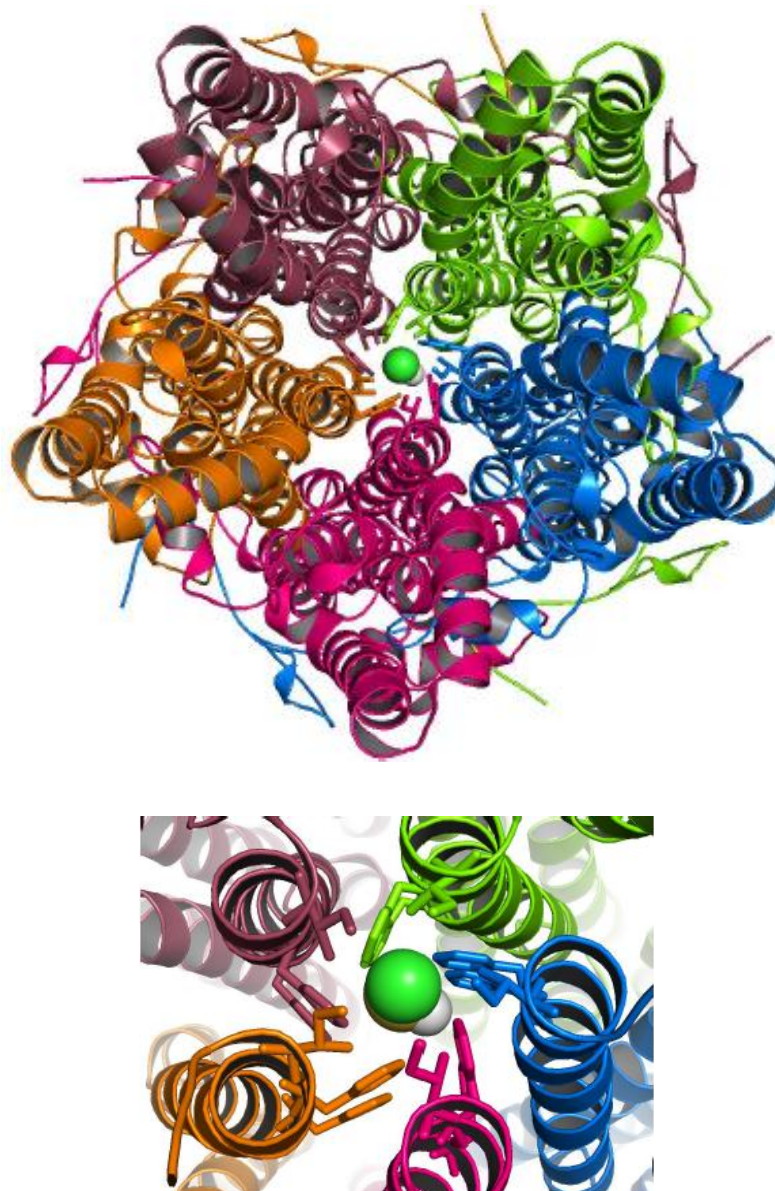
Slika 5.74 Molekularno modelovanje interakcija bestrofina sa H_2S (afinitet $-0,8$ kcal/mol)

REZULTATI



Slika 5.75 Molekulsko modelovanje interakcija bestrofina sa HS⁻ (afinitet -0,8 kcal/mol)

REZULTATI



Slika 5.76 Molekulsko modelovanje interakcija bestrofina sa CH₃SH (afinitet -1,4 kcal/mol).

POGLAVLJE ŠESTO

Diskusija

DISKUSIJA

Razmišljanje o vodonik-sulfidu kao gasovitom transmitteru nalazi svoje utemeljenje u otkrićima azot(II)-oksida i ugljenik(II)-oksida kao gasovitih transmitera. On je prošao sličan put „od toksina do signalnog molekula“. Vodonik-sulfid prvi spominju alhemičari, označavajući ga kao *aer hepaticus* (Myers, 2007). 1777. godine Carl Wilhelm Scheele bio je prvi hemičar koji je okarakterisao H₂S, opisujući ga kao „sulfurovani vodonik“ (Gadalla i Snyder, 2010). Vodonik-sulfid ima karakterističan miris, u koncentraciji od 4 ppm izaziva glavobolje, a u većim koncentracijama (>500 ppm) je letalan za ljude. Njegova toksičnost vezana je za inhibiciju citohrom c oksidaze. Pet puta je toksičniji u odnosu na CO (Lloyd, 2006). S druge strane, u ljudskom organizmu H₂S najviše nastaje u želucu pomoću bakterija koje redukuju sulfat, ali i razgrađuju aminokiseline koje sadrže sumpor (poput cisteina i metionina), sulfonovane polisaharide i lipide koji sadrže sumpor (Lloyd, 2006).

Vodonik-sulfid je prepoznat kao signalni molekul u uterusu koji ima konstruktivnu ulogu u regulaciji kontraktilnosti. Neregulisanakontraktilnost uterusa može biti uzrok brojnih oboljenja poput dismenoreje ili endometrioze. Istraživanja su usmjerena ka razumijevanju fiziologije uterusa – čime i kako je kontrolisan, kao i na razvoj agensa koji bi ciljano modulirao kontrakcije uterusa. Krajni cilj je razvoj agenasa (tokolitika) koji mogu biti upotrebljeni za sprečavanje prevremenog porođaja, koji nastaju kao posljedica neregulisano pojačanih kontrakcija nastalih usled različitih patoloških procesa. Do sada je identifikovano nekoliko inhibitora aktivnosti miometrijuma poput peptida srodnog kalcitoninu CGRP (od engl. *calcitonin gene-related peptide*) (Anouar i sar, 1998), •NO (Buxton i sar, 2001) i CO (Acevedo i Ahmed, 1998). Uzimajući u obzir sve navedeno, identifikacija endogenog molekula koji bi kontrolisano smanjivao kontrakcije je krajni cilj istraživanja. Vodonik-sulfid predstavlja agens velikog potencijala, budući da se u uterusu endogeno (enzimatski) sintetiše (Patel i sar, 2009). Njegovo nastajanje je gestacijski regulisano, a pokazano je da smanjuje kontrakcije humanog uterusa (Robinson i Wray, 2012).

U ovoj tezi okarakterisana je relaksacija uterusa izazvana sulfidom i ispitani su mehanizmi (jonski kanali i sekundarni glasnici) koji mogu biti

DISKUSIJA

posrednici u relaksantnom efektu sulfida. Takođe, ispitan je efekat sulfida na redoks-homeostazu, što može biti osobito važno u stanjima kada je uterus izložen oksidativnom disbalansu. Poseban akcenat je stavljen na identifikaciju ciljnih molekula, kao i vrsta koji posreduju, odnosno moduliraju efekat sulfida, što predstavlja fundamentalne mehanizme na kojima se može zasnivati razvoj adekvatnog terapeutika. Prvi rezultati ovog istraživanja pokazali su da je vodonik-sulfid potentan relaksant kontrakcija negravidnog uterusa pacova. Uočeni su sledeći efekti: i) Na_2S izaziva koncentraciono-zavisno, reverzibilno smanjenje kontraktilnosti uterusa, utičući na amplitudu i frekvenciju kontrakcija, ii) redukuje fazne kontrakcije spontano-aktivnih uterusa, uterusa stimuliranih jonima kalcijuma, KCl (15mM) i oksitocinom, kao i tonične kontrakcije izazvane depolarizacijom koncentracijom KCl (75mM). Nisu uočene razlike u efektima Na_2S na spontano-aktivnim, oksitocinom- i kalcijumom- aktiviranim kontrakcijama, dok se efekat razlikovao na faznim (15mM), odnosno toničnim (75mM), kontrakcijama indukovanim sa KCl . Ovi rezultati ukazuju da se relaksantni efekat Na_2S ostvaruje preko njegovog uticaja na membranski potencijal, ali implicira i posredovanje određenog(ih) kanala, kao medijatora relaksacije. Ispitivanja ovih mehanizama sprovedena su u narednim koracima istraživanja, a opisana u tekstu koji sledi.

Vodonik-sulfid je dvobazna slaba kiselina koja u vodenom rastvoru postoji kao H_2S , HS^- i S^{2-} . Na osnovu Henderson–Hasselbach jednačine, uzimajući u obzir pK_a vrijednosti, u biološkim sistemima pri fiziološkom pH 7,4 i temperaturi od 37 °C, sulfid će postojati više od 80% kao HS^- (Dombowski i sar, 2005). Ipak, budući da su sve tri vrste prisutne u vodenom rastvoru, nemoguće je odrediti i pripisati biološku aktivnost pojedinačno bilo kojoj. Stoga termin „vodonik-sulfid“, odnosno „ H_2S “, ukazuje na prisustvo sve tri vrste.

Da bi ispitali biološki značaj efekta sulfida, važno je sagledati efekte njegovih prekursora, ali i metabolita. Biološki prekursori vodonik-sulfida, cistein i homocisten, mogu uticati na kontraktilnost uterusa. S druge strane, cilj ovih eksperimenata bio je i da se utvrdi da li stepen jonizacije $-\text{SH}$ grupe prekursora vodonik-sulfida, ali i njega samog, ima efekat na kontraktilnost uterusa. Rezultati ove studije su pokazali da cistein slabo relaksira uterus. Rezultati prethodnih

DISKUSIJA

studija pokazali su relaksirajući efekat cisteina na uterus, ističući važnost generisanja H_2S *in situ*, pomoću prisutnih enzima CBS i CSE (You i sar, 2011). Saglasno sa ovim, inhibitori ovih enzima blokirali su relaksaciju indukovanu cisteinom. Takođe, uočeno je i da je efekat cisteina izraženiji na negravidnom uterusu u odnosu na gravidini. Imajući u vidu da je njegova produkcija gestacijska regulisana (Robinson i Wray, 2012), s obzirom da ekspresija ovih enzima opada tokom trudnoće, jasno je da je efekat cisteina izraženiji na netrudnom uterusu zbog prisustva enzima koji ga prevode do H_2S .

Važan biološki prekursor vodonik-sulfida je homocistein. Rezultati skorašnje studije pokazali su da hiperhomocisteinemija, koja je posljedica delecije CBS ($Cbs^{+/-}$), indukuje prevremeni porođaj kod miša (Sonne i sar, 2013). Hiperaktivnost uterusa pripisana je isključivo povećanoj koncentraciji homocisteina, bez osvrta na manjak H_2S . U ovoj tezi ispitan je efekat homocisteina na kontraktilnost uterusa, u kome su enzimi za produkciju H_2S prisutni i pokazano je da on ne utiče na kontrakcije, u koncentracijama koje su fiziološki relevantne (neznatan efekat na kontraktilnost je uočen pri koncentracijama većim od 1000 μM). Takođe, pokazano je da povećana koncentracija homocisteina, ne utiče na relaksantni potencijal Na_2S , što kvalifikuje vodonik-sulfid kao agens velikog potencijala za ciljano moduliranje kontrakcija uterusa.

Metabolizam, odnosno eliminacija vodonik-sulfida ostvaruje se njegovim metilovanjem do metantiola. Metantiole je na fiziološkom pH prisutan isključivo u molekulskom obliku, dok iz Na_2S nastaju molekulski H_2S i anjon HS^- . Kako se efekti vodonik-sulfida i hidrogen-sulfidnog anjona ne mogu odvojeno ispitati, pošto su ove dvije vrste uvijek u ravnoteži, poređenje efekata Na_2S sa efektima metantiola, osvetljava ulogu molekulskog, odnosno anjonskog oblika u regulaciji kontraktilnosti. Dodatno, ovo ispitivanje je od biološkog značaja pošto otkriva važnost metilacije kao načina modulacije efekata H_2S . U ovoj tezi pokazano je da metantiole relaksira uterus pacova i, slično sulfidu, utiče na amplitudu i frekvenciju kontrakcija. Međutim, njihove dozno-zavisne krive se razlikuju, kriva metantiola je pomjerena udesno u odnosu na krivu sulfida, tj. za sličan efekat bila je potrebna 3x veća koncentracija metantiola (600 μM). Uočeno je, takođe, da su oba efekta

DISKUSIJA

reverzibilna, ali da im se oporavak razlikuje. Relaksantni efekat metantiola, koji je uporediv u pogledu inteziteta relaksantnog efekta sa efektom sulfida, dostignut je tek pri koncentraciji od 600 μM . Sulfid je pri mnogo nižoj koncentraciji izazvao relaksaciju (prema HH jednačini: 40 μM H_2S i 160 μM HS^-). Uočena relaksacija metantiola u ovoj koncentraciji može biti posljedica njegove toksičnosti (npr. inhibicije respiracije) (Finkelstein i Benevenga, 1986). Potentniji efekat sulfida, može biti posljedica prisustva visoko reaktivnog HS^- koji može biti glavni medijator relaksirajućeg efekta sulfida (Mijušković i sar, 2014). Takođe, ovi rezultati ukazuju da metilacija vodonik-sulfida može biti način modulacije H_2S efekata *in vivo*, budući da se ista ostvaruje aktivnošću enzima S-metil tranferaze.

Opisani rezultati govore u prilog tezi da je stepen jonizacije $-\text{SH}$ grupe povezan sa stepenom relaksacije, budući da homocistein i metantiole ne dovode do relaksacije u fiziološki-relevantnim koncentracijama (stepen jonizacije njihovih $-\text{SH}$ grupa je nizak u uslovima fiziološkom pH; pKa homocisteina je 10,86 a metantiola 10,4), ističući važnost HS^- u ostvarivanju relaksirajućeg efekta sulfida.

Rezultati ove studije pokazali su da sulfid sa sličnim potencijalom relaksira spontane, kao i kalcijumom, odnosno oksitocinom indukovane kontrakcije uterusa. Kalcijum i oksitocin su snažni stimulatori kontrakcija uterusa, čija aktivnost ima različito porijeklo – kod kalcijum-indukovanih kontrakcija dominantna je uloga vanćelijskog kalcijuma, a kod oksitocin-indukovanih presudnu ulogu imaju unutarćelijska skladišta kalcijuma. Stoga, bilo je važno uporediti efekte sulfida na sva tri tipa kontrakcija. Pokazano je da je i pored intenzivne stimulacije uterusa kalcijumom i oksitocinom sulfid izazvao relaksaciju na sličan način i kao kod spontanih kontrakcija.

Natrijum-sulfid smanjuje amplitudu, ali i frekvenciju kontrakcija uterusa, ne razlikujući porijeklo nastanka istih. Ovaj nalaz ukazuje na ulogu pejsmejker ćelija, odnosno nekih njihovih konstituenata. Koncept pejsmejker mehanizma koji inicira akcione potencijale u uterusu je predložen, ali detaljni mehanizmi nisu poznati. Ćelije poznate kao ICC ćelije identifikovane su u drugim glatkim mišićima za koje je pokazano da imaju pejsmejker ulogu (Sanders i sar, 2012; Sergeant i sar, 2000). Ćelije nalik ICC su pronađene u miometriju (Ciontea i sar, 2005;

DISKUSIJA

Duquette i sar, 2005), ali njihova uloga u kontraktilnosti nije jasno utvrđena. Za razliku od ostalih glatkih mišića, miometrijum pacova ima samo akcione potencijale nalik šiljku (Burdyga i sar, 2009). Odgovarajuće generisana sila kontrakcije je zavisna od karakteristika pomenutih potencijala. Svaki od akcionih potencijala korelira sa individualnim Ca^{2+} šiljkom i prolaznim povećanjem sile (Burdyga i sar, 2009). Veća frekvencija akcionih potencijala povećava frekvenciju Ca^{2+} šiljaka, što rezultuje u većoj produkciji sile – rezultat njihovog sumiranja (Mironneau, 1973; Burdyga i sar, 2009). Akcioni potencijali osim što su odgovorni za generisanje sile, važni su i za frekvenciju i trajanje kontrakcija. Oni dovode do aktivacije L-tipa voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala, ulaska jona kalcijuma i generisanja kontrakcije, stoga frekvencija akcionih potencijala određuje frekvenciju kontrakcija. Inhibitori kalcijum-aktiviranih hloridnih kanala snažno smanjuju frekvenciju spontanijih kontrakcija u miometrijumu (Jones i sar, 2004) i predloženi su kao glavni pejsmejker kanali u glatki mišićima (Sanders i sar, 2012). Ovi kanali predstavljaju glavni provodni put za Cl^- u miometrijumu, doprinose membranskom potencijalu i podstiču frekvencu pejsmejker ćelija (Wray i sar, 2015). Međutim, molekularni identitet ovih kanala još uvijek nije utvrđen. Nekoliko kandidata je predloženo, uključujući bestrofine (Leblanc i sar, 2005; Greenwood, 2008), CLCA (Leblanc i sar, 2005), kao i anoktamine (Caputo i sar, 2008; Scudieri i sar, 2012; Pedemonte i Galietta, 2014). Brojni kandidati su predloženi, ali samo dvije familije, BEST i TMEM proteini, su ponovili svojstva nativnih CaCC u ekspresionim sistemima (Liu i sar, 2014).

Rezultati ove teze idu u prilog hipotezi da se relaksantni efekat sulfida ostvaruje preko hloridnog kanala koji direktno ili indirektno ima ulogu u predvođenju kontrakcija (Mijušković i sar, 2015). Naime, DIDS je jedini od serije testiranih modulatora uspio da inhibira relaksantni efekat sulfida na uterus pacova. U skladu sa ovim rezultatima, inhibicija relaksacije DIDS-om pokazana je na mezenteričnoj arteriji pacova (White i sar, 2013). Budući da je DIDS inhibitor $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ jonoizmjenjivača, predloženo je da se relaksacija ostvaruje aktivnošću pomenutog izmjenjivača i pH zavisnim pomjenama (Lee i sar, 2007). Izostavljanje HCO_3^- nije uticalo na relaksirajući efekat sulfida, negirajući ulogu jonoizmjenjivača

DISKUSIJA

u odgovoru uterusu na Na_2S . Nedavna studija pokazala je da je DIDS visoko selektivan za BEST-1 u poređenju sa TMEM16A (ANO-1) kanalima (Liu i sar, 2014). Specifični inhibitori CaCC za TMEM16A kanale - T16Ainh-AO1, TA i NFA, nisu uspjeli da inhibiraju relaksaciju indukovanu Na_2S . Ovi inhibitori pokazuju mali stepen inhibicije BEST-1 u odnosu na TMEM16A (Liu i sar, 2014). Hloridni kanali su predloženi da posreduju u efektima vodonik-sulfida (Tang i sar, 2010). Valja pomenuti da su studije na izolovanom kanalu pokazale da su unutarćelijski hloridni kanali medijatori efekta sulfida (Malekova i sar, 2009). Specifičan inhibitor unutarćelijskih hloridnih kanala (CLIC1) nije uticao na efekat sulfida.

Na fiziološkom pH, sulfid je prisutan dominantno kao HS^- . Imajući u vidu hemijsku strukturu HS^- , moguće je da sulfidni anjon može da interferira sa hloridnim kanalom, ili njegovim transporterom, i da su ovi efekti poremećeni kada je poremećen i Cl^- gradijent, što ovdje može biti slučaj. Sličnu interpretaciju u pogledu interferiranja sulfidnog anjona sa hloridnim kanalom/transporterom postavili su Dombowski i saradnici (Dombowski i sar, 2006). U skladu sa ovim, efekat sulfida testiran je faznim kontrakcijama, izazvanim 15 mM KCl, i toničnim, indukovanim 75 mM KCl, i uočeno je da je relaksacija na toničnim kontrakcijama mnogo potentnija nego na faznim. Ove razlike mogu biti posljedica interferencije Cl^- i HS^- . Interesantno je da je na mezenteričnim arterijama pacova pokazano da su upravo bestrofini esencijalni za fazne, ali ne i za tonične osobine kontraktilnosti (Broegger i sar, 2011).

Iako su mehanizmi aktivacije i regulacije bestrofina još uvijek nedovoljno proučeni, postoje indikacije da su oni Cl^- kanali (Hartezell i sar, 2008). Ipak, ideja da su bestrofini hloridni kanali bila je dovedena u pitanje nalazima drugih istraživača koji su pokazali da mBEST-1 *knockout* nije doveo do ukidanja CaCC struja (Marmorstein i sar, 2006). Ovo zapažanje, zajedno sa drugim da bestrofini regulišu Ca^{2+} -aktivirane kanale, sugeriše da su oni zapravo regulatori kanala. Međutim, uočene razlike u biofizičkim svojstvima različitih bestrofina sugerišu da se provodni put Cl^- ostvaruje preko bestrofina. Ove razlike bi bilo teško objasniti ukoliko su bestrofini samo regulatori kanala. Slično kao ostali anjonski kanali, za razliku od katjonskih, bestrofini nemaju veliku specifičnost u razlikovanju anjona.

DISKUSIJA

Vjerovatno nije postojao snažan evolutivni pritisak da se razvije specifičnost kao kod katjonskih kanala, budući da je Cl^- predominantan monovalentni anjon. U slučaju bestrofina, pokazano je da provodljivost ovih kanala prema monovalentnim anjonima opada u nizu: $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ (Hofmeisterova ili liotropna sekvenca). Tako, u slučaju mBEST-2, provodljivost SCN^- je mnogo manja u odnosu na Cl^- , dok su provodljivosti ova dva jona kod mBEST-1 vrlo slične. Ove razlike između mBEST-1 i mBEST-2 sugerišu da fine razlike u strukturi pore mogu biti presudne za specifičnost pojedinih bestrofina (Hartzell i sar, 2008).

Gorepomenuta sekvenca određuje propustljivost kanala za anjone: anjoni koji se lakše dehidrišu (liotropi) lakše prolaze kanal nego anjoni koji ostaju jače vezani sa vodom (kosmotropi) (Linsdell, 2001; i tamo citirane reference). Veza između propustljivosti kanala za određeni anjon i energije hidratacije anjona podržava hipotezu da je anjonska dehidratacija limitirajući korak koji određuje propustljivost. Ovo takođe objašnjava razliku između anjona i katjona, budući da se anjoni mnogo teže dehidrišu u odnosu na katjone iste veličine (Linsdell, 2001; i tamo citirane reference). Liotropna permeabilnost sugeriše da su elektrostatičke interakcije anjona sa porom kanala manje važne od hidrofobnih sila (Eisenman i Horn, 1983), što objašnjava zašto je pora više propusna za veće jone (poput SCN^-), koji se mnogo lakše dehidrišu, u odnosu na male jone (F^-) (Qu i Hartzell, 2004).

Liotropni anjoni se takođe vezuju jako za pore kanala. Primjera radi, u slučaju GABA_A i receptora za glicin anjonska sekvenca je inverzna liotropnom nizu, sugerišući da se anjoni sa najvećom permeabilnošću najjače vezuju za poru kanala (Bormann i sar, 1987). Predloženo je i da su permeabilnost i vezivanje anjona dva odvojena procesa koja su kontrolisana sličnim silama, tj. oba su određena malom razlikom energija između anjon-voda i anjon-kanal interakcija (Smith i sar, 1999). Ovo može biti od značaja za razumijevanje mehanizma kojim sulfid dovodi do relaksacije koja je posredovana hloridnim kanalom – bestrofinom. Naime, poznato je da se struje Cl^- smanjuju u prisustvu anjona koji se jako vezuju za poru kanala. Primjera radi, liotropni SCN^- , I^- i ClO_4^- značajno smanjuju struju Cl^- (Linsdell, 2001). Imajući u vidu specifičnu prirodu HS^- (odnos radijusa i naelektrisanja) jonom sa jedne strane, ali i hemijske razlike sa druge, na prvom mjestu izraženu

DISKUSIJA

nukleofilnost, kao i činjenicu da je uvijek u ravnoteži sa H_2S , otvara mogućnosti za interesantne interpretacije njegovih interakcija sa porom kanala. U ovoj tezi urađeno je molekulsko modelovanje interakcija H_2S/HS^- i CH_3SH sa porom bestrofina. Rezultati su pokazali da metantiool ima najveći afinitet vezivanja za poru, dok je afinitet vezivanja H_2S i HS^- isti, što se može pojasniti gore-navedenim svojstvom liotropne permeabilnosti koja je karakteristična za mBEST-2, tj. činjenicom da su hidrofobne sile važnije od elektrostatičkih za propustljivost bestrofina (Eisenman i Horn, 1983). Imajući u vidu hemijska svojstva H_2S i HS^- pretpostavili smo da neki kritični cisteinski ostaci u pori kanala mogu biti važni za modifikaciju izazvanu sulfidom, a onda i posljedičnu relaksaciju. Naime, analizom cisteinskih ostataka uočeno je da su oni raspoređeni simetrično oko pore kanala. Interesantno je da se wtBEST-1 inaktivira agensima koji modifikuju sulfhidrile, budući da je BEST-1 mutant (mutiran za regulatorni cistein) rezistentan na takvu inaktivaciju (Sun i sar, 2002).

Reverzibilne promjene na proteinima u kojima posreduju signalne vrste generalno podrazumijevaju modifikacije na tiolima cisteina (Eaton, 2006). Transfer sumpora u biosintetskim reakcijama, kao i redoks-regulisana posttranslaciona modifikacija proteina su prepoznati kao glavni mehanizam kojim vodonik-sulfid modulira aktivnost proteina. Tako je predloženo da su efekti vodonik-sulfida posredovani S-persulfidacijom, koja je i eksperimentalno pokazana na K_{ATP} i L-tipu kanala (Mustafa i sar, 2009; Zhang i sar, 2012). Ono što je važno spomenuti je da se ova modifikacija ne može ostvariti direktno preko H_2S , budući da je H_2S slab reduktant, te ne može redukovati disulfidne veze do persulfidnih (Greiner i sar, 2013). Postavlja se pitanje kako se onda hemijski ova modifikacija odigrava? U rastvoru sulfida se generiše određena koncentracija polisulfida (nekada su i sami kristali sulfida onečišćeni polisulfidima). Predloženo je da upravo polisulfidi kao oksidujuće vrste mogu biti odgovorne za ove modifikacije i efekte sulfida (Greiner i sar, 2013).

Uzastopni tretmani uterusa sulfidom (istom koncentracijom - 100 μM) pojačavaju efekat sledećeg tretmana, tj. izgleda da efekat sulfida izaziva neke promjene koje sledeću relaksaciju čine favorizovanijom. Da bi ispitali da li su

DISKUSIJA

polisulfidi medijatori u ovim modifikacijama efekat sulfida je poređen sa efektom polisulfida i nisu uočene razlike u pogledu njihove potentnosti i izazvane relaksacije. Ovaj nalaz ukazuje na ograničenu ulogu polisulfida u relaksaciji uterusa sa Na₂S. Takođe, i u slučaju da je persulfidacija važna za relaksantni efekat sulfida, polisulfidi nisu važni medijatori.

Alternativan mehanizam može biti objašnjen nedavno postuliranom atraktivnom hipotezom (Mishanina i sar, 2015). Jasno je da H₂S ne može direktno reagovati sa tiolima i da je njegova eventualna autooksidacija do reaktivnijih intermedijera (HSOH i HSSH) spora da bi bila fiziološki relevantna. Nasuprot tome, proteini posjeduju reaktivne cisteine sa generalno niskim pK_a vrijednostima. Reaktivni cisteini su često nađeni u proteinskom mikrokruženju sa pozitivnim elektrostatičkim potencijalom koje stabilizuju tiolatni anjon. Upravo njihova reaktivnost čini ih osjetljivim na oksidativne modifikacije, uključujući formiranje disulfida, S-glutationaciju, S-nitrozilaciju ili generisanje sulfenske kiseline. U slučaju proteina sa disulfidnim mostovima, nukleofilni napad sa HS⁻ može dovesti do formiranja persulfida. (Weerapana i sar, 2010). S druge strane, imajući u vidu niske koncentracije disulfida u reduktivnom miljeu ćelije, kao i skromnu reaktivnost sulfida spram disulfida, fiziološki značaj ovog mehanizma tek treba da se utvrdi.

Iako su bestofini identifikovani kao članovi familije hloridnih kanala, relativno malo se zna o njihovoj fiziološkoj ulozi, osim uloge hBEST-1 u oku (Hartzell i sar, 2005). Bestofini su prvi identifikovani kao genetička veza hBEST-1 i juvenilne forme makularne degeneracije tzv. „BEST bolesti” – (Marquardt i sar, 1998).

Istraživanja sprovedena u ovoj studiji pokazala su po prvi put da su BEST-1 i BEST-2 ekspimirani u uterusu u estrusu na nivou mRNA, ali i na nivou proteina, sugerišući njihovu ulogu u regulaciji kontrakcija. Nivo ekspresije ovih proteina je sličan, dok se uočavaju dramatične razlike u pogledu mRNA, što može ukazivati da stepen njihove translacije nije isti. Proteinska ekspresija potvrđena je i imunohistohemijski. Detaljnija imunohistohemijska analiza pokazala je da su oba

DISKUSIJA

BEST-1 i BEST-2 predominantno unutarćelijski lokalizovana u longitudinalnom i cirkularnom mišićnom sloju uterusa.

Efekat povećanja vanćelijskog KCl na relaksantni efekat sulfida, može biti vezan i za aktivaciju K^+ . Moguće učešće ovih kanala u mehanizmima koji posreduju sulfidom-izazvanu relaksaciju ispitano je korišćenjem različitih inhibitora. Kalcijumski kanali, a specifično Kir kanali, ne posreduju u efektima sulfida i ovaj efekat je pokazan i na spontano-aktivnim i na kalcijumomaktiviranim uterusima. U literaturi postoje brojni podaci da se sulfidom izazvana relaksacija na vaskularnim i nevaskularnim tkivima pre svega ostvaruje preko ATP osjetljivih K^+ kanala (Zhao i sar, 2001; Tang i sar, 2005). Studije na humanom miometriju pokazale su da je relaksacija izazvana sporim donorom GYY4137 posredovana ovim kanalima (Robinson i Wray, 2012). Dobijeni rezultati u ovoj studiji isključuju K_{ATP} kanale kao medijatore efekata sulfida na kontrakcije negravidnog uterusa. Naime, glibenklamid (inhibitor K_{ATP} kanala) inhibirao je relaksaciju izazvanu sulfidom samo na kalcijum-aktiviranim kontrakcijama i to pri dozi od 200 μM . Ovi rezultati su u saglasnosti sa drugim studijama koje nisu potvrdile K_{ATP} kanale kao glavne nosioce efekata sulfida (Dhaese i Lefebvre, 2009; Streeter i sar, 2012). Premda su K_{ATP} kanali eksprimirani u miometriju, oni imaju ograničenu funkcionalnu važnost (Aaronson i sar, 2006) sugerišući postojanje drugih ciljnih struktura važnih u ostvarivanju efekata sulfida.

Tonične kontrakcije su snažnije od faznih, a porijeklo ovih razlika vezano je za depolarizaciju membrane (kod toničnih), koja posljedično vodi ka većoj otvorenosti L-tipa kalcijumskih kanala i snažnijem ulasku kalcijuma. Shodno tome, može biti da relaksacija izazvana sulfidom nastaje kao posljedica inhibicije ulaza kalcijuma. Međutim, prisustvo aktivatora L-tipa kanala nije inhibiralo relaksaciju izazvanu sulfidom. Važno je spomenuti da su L-tip Ca^{2+} kanali ranije identifikovani kao moguće mete u relaksaciji miometrijuma (Robinson i Wray, 2012). Rezultati navedene studije su pokazali da S-Bay (aktivator ovih kanala) inhibira relaksaciju uterusa cisteina, što nužno ne mora značiti da je medijator i efekata sulfida, te ovakvu interpretaciju treba uzeti sa rezervom. Zanimljivo je spomenuti da se pojačanje kontrakcija uterusa aktivnošću oksitocina ostvaruje aktiviranjem

DISKUSIJA

unutarćelijskih puteva, ali i L-tipa kalcijumskih kanala. Budući da prisustvo oksitocina nije uticalo na efekat sulfida, ovaj nalaz indirektno negira učešće ovih puteva u njegovom relaksantom efektu. S druge strane važno je naglasiti da oksitocin povećava frekvenciju akcionih potencijala, što posljedično dovodi do povećanja frekvencije kontrakcija (Taira i Marshall, 1967; Osa i Taga, 1973). Ovo povećanje frekvencija može biti posljedica oksitocin-indukovane aktivacije CaCC kanala (Arnaudeau i sar, 1994). Sulfid je u testiranim koncentracijama inhibirao relaksaciju i smanjio frekvencije, što dokazuje da je njegov efekat na mehanizme iniciranja kontrakcija izuzetno snažan.

Bestrofini su predloženi kao regulatori voltažno-zavisnih L-tipa Ca²⁺ kanala (Reichhart i sar, 2010), pri čemu regulatornu ulogu najvjerojatnije ostvaruju kroz direktnu interakciju sa β3 i β4 subjedinicama (Milenkovic i sar, 2011). Takođe je predloženo da BEST-1 funkcionišu kao unutarćelijski Cl⁻ kanali, koji pomažu pri akumulaciji, ali i otpuštanju Ca²⁺ iz njegovih skladišta, budući da djeluje kao njegov kontra jon (Strauss i sar, 2014). Ukoliko se ovi mehanizmi ostvaruju kombinovano, bestrofini bi predstavljali efikasan način kontrole kalcijum-aktiviranog hloridnog transporta (Milenkovic i sar, 2011). Učešće bestrofina kao medijatora u relaksantnom efektu sulfida, može objasniti zašto su upravo kanali L-tipa bili poentirani kao mete u relaksaciji. S druge strane, vodonik-sulfid modulira Ca²⁺ događaje koji vode porijeklo iz endoplazminog retikuluma (Kida i sar, 2013). Nadalje, pokazano je da sulfid redukuje unutarćelijske Ca²⁺ signale koje posreduju u spontanijama kontrakcijama miometrijuma (Robinson i Wray, 2012). Inhibitorni efekti sulfida na unutarćelijske Ca²⁺ struje inhibirani su u prisustvu sGC inhibitora (Moustafa i Habara, 2014). Sekundarni glasnici, cAMP i cGMP su važni regulatori kontraktilnosti uterusa (Aguilar i Mitchell, 2010). Rezultati ovog istraživanja negiraju učešće β-adrenoreceptora u efektima sulfida, budući da propranolol nije antagonizovao relaksaciju. S druge strane, pretreman metilenskim plavim smanjio je Na₂S izazvanu relaksaciju, slično glibenklamidu, samo u slučaju Ca²⁺-aktiviranih uterusa (efekat je značajan samo za posljednju koncentraciju u tertmanu sulfidom). Ovaj nalaz implicira da je signaling sulfida u ćeliji divergentan i da vjerovatno podrazumijeva brojne mehanizme i uzajamnu

DISKUSIJA

komunikaciju (engl. *crossstalk*) različitih puteva. Konkretno, izgleda da je efekat sulfida moduliran sa •NO. Relaksantni efekat sulfida je smanjen u prisustvu •NO donora, S-nitrozoglutaciona (Berenyiova i sar, 2015). Takođe, pokazano je da •NO donor SNP smanjuje H₂S indukovanu relaksaciju uterusa (Filipovic i sar, 2013). Važno je istaći da se DIDS-senzitini BEST kanali aktiviraju sa •NO, budući da DIDS kompletno inhibira GSNO posredovanu BEST aktivaciju (Duta i sar, 2006).

Jasno je da će efekti sulfida pratiti sled događaja koja odgovara njegovim fizičko-hemijskim svojstvima. Za očekivati je da se efekat sulfida na kontraktilnost uterusa ostvaruje najprije preko membranskih meta, jonskih kanala kroz koje može da prođe ili da ih modifikuje. Vodonik-sulfid slobodno difunduje kroz membranu za razliku od HS⁻ (Mathai i sar, 2009). Ulazak u ćeliju podrazumijevao bi pomjeranje ravnoteže ka H₂S ukoliko kanal za HS⁻ ne bi postojao. Međutim, HS⁻ specifičan bakterijski kanal je nedavno identifikovan (Czyzewski i Wang, 2012). Prisustvo ovog kanala u drugim živim sistemima do sada nije ispitivano. Efekti sulfida na unutarćelijske događaje koji će posljedično dovesti do smanjenja unutarćelijskog kalcijuma, a onda i relaksacije mogu biti posredovani brojnim molekulima. Senzitivnost na kalcijum, a posljedično i kontraktilna aktivnost uterusa je modulirana reaktivnim vrstama, kao i sistemom (antioksidativni enzimi) koji reguliše njihov nivo (Appiah i sar, 2009). Egzaktna veza između reaktivnih, oksidujućih vrsta i efekata sulfida je često kompleksna, ponekad i kontradiktorna, a u uterusu još uvijek slabo proučena. Interesantno je uvidjeti da sulfid osim što reaguje sa reaktivnim vrstama može da modulira enzime koji su uključeni u regulaciju njihovog nivoa. Treba istaći metaloproteine poput CuZnSOD i CAT budući da HS⁻ ima veliki afinitet za metalo-centre (Searcy i sar, 1995; Haouzi i Klingerman, 2013). Nedavne studije su pokazale da su signalne mreže vodonik-sulfida i ROS međusobno povezane (Predmore i sar, 2012). Ova integracija je osobito važna za razumijevanje mehanizama koji promovišu kontraktilnost miometrijuma, naročito jonskih kanala, a posebno -SH grupa istih, koje su veoma osjetljive na dejstvo ROS (Paulsen i Carroll, 2013).

Kao što je već rečeno, sulfid je redukujući agens koji učestvuje u jedno- i dvo- elektronskim redoks-reakcijama. U literaturi postoje podaci da je oksidacija

DISKUSIJA

sulfida posredovana radikalskim mehanizmima koji još uvijek nisu jasno utvrđeni (Nagy i sar, 2014). Ovo je otežano činjenicom da su radikalske vrste visoko reaktivne i da one dalje iniciraju lančane reakcije, što otežava kinetičke analize. Prvi intermedijer koji nastaje pri jedno-elektronskoj oksidaciji je visoko reaktivni HS• radikal. Biološki značaj ove reakcije nije još uvijek okarakterisan. Međutim, iz praktičnih razloga, u kontekstu oksidacije sulfida na vazduhu, korisno je spomenuti da je ova reakcija termodinamički nefavorizovana (Luther i sar, 2011). Premda je dvo-elektronska oksidacija sulfida termodinamički povoljna, ona zahtijeva veliku energiju aktivacije zbog problema sa spin sparivanjem sa O₂ (Luther i sar, 2011). Stoga oksidacija sulfida sa O₂ odvija se u realnom vremenu samo u prisustvu prelaznih metala (Tapley i sar, 1999). Rezultati ove studije pokazali su da sulfid utiče na aktivnost enzima antioksidativnog sistema u uterusu. Takođe, poređeni su efekti sulfida i metantiola na aktivnost datih enzima, da bi se utvrdila važnost metilacije - da li se njome može modulirati H₂S signalizacije i time dati novi smisao metilaciji kao modifikaciji od važnosti za regulaciju aktivnosti gasovitih transmitera, kao i da bi se pokušali razlikovati efekti molekulskog H₂S i anjonskog HS⁻. Povećanje CuZnSOD nakon tretmana sulfidom primjećeno je samo u slučaju Ca²⁺-aktiviranih uterusu. Meki karakter sumpora obezbjeđuje njegovo jako vezivanje za jone bakra. Za koordinaciju Cu-S je nedavno pokazano da je od izuzetne fiziološke važnosti u detekciji ispraljivih sumpornih jedinjenja, budući da se aktivacija mirisnih receptora ostvaruje koordinacijom sumpora i bakra (Duan i sar, 2012). EPR spektar Cu²⁺ u pacovskoj CuZnSOD pokazao je da HS⁻/H₂S dovodi do redukovanja Cu²⁺ do „EPR tihog” Cu¹⁺, koji se primjećuje kao gubitak CuZnSOD signala, za razliku od superoksida koji nije doveo do promjena. Ovo upućuje da je aktivni centar CuZnSOD otvoren za efekte HS⁻/H₂S, i u saglasnosti je sa prethodnim zapažanjima da CuZnSOD katalizuje HS⁻ oksidaciju (predložena reakcija: HS⁻ + H⁺ + O₂ → S⁰ + H₂O₂), uz redukciju Cu²⁺ do Cu¹⁺ (Searcy i sar, 1996). Studije Perry i saradnika (2010) pokazale su da prva polu-reakcija dismutacije superoksid-anjon-radikala, koju katalizuje SOD, počinje vezivanjem O₂⁻ za Cu²⁺ koji potom biva redukovan do Cu¹⁺, dok se O₂⁻ oksiduje do kiseonika. Most koji je postojao između jona bakra i histidina biva ukinut (HisCu, ZnSODHis63) ostavljajući protonovan

DISKUSIJA

His63N1. U drugoj polu-reakciji, proton sa His63N1 i elektron sa Cu^{1+} se doniraju $\text{O}_2^{\bullet-}$ što rezultuje oksidacijom Cu^{1+} do Cu^{2+} , a $\text{O}_2^{\bullet-}$ se redukuje do H_2O_2 . Rezultati molekuskog modelovanja sprovedenog u ovoj studiji pokazuju da H_2S , HS^- i CH_3SH vezuju za jon Cu u aktivnom mjestu humane i goveđe CuZnSOD. Interesantno je uočiti da HS^- ima najveći afinitet vezivanja. Takođe jasno se ističe uloga His63 u interakciji i stabilizaciji HS^- u slučaju humane, odnosno His61 u slučaju goveđe CuZnSOD. Persulfidacija cisteinskog ostatka na SOD pokazana je masenom spektrometrijom i pokazano je da stabilizuje enzim naspram agregacije indukovane oksidacijom bez uticaja na katalitičku aktivnost (De Beus i sar, 2004).

Mjerenje aktivnosti katalaze u uterusima nakon tretmana sulfidom nije pokazalo razlike u odnosu na aktivnosti u kontrolnim uzorcima. Modelovanje interakcija na goveđoj katalazi pokazalo je, takođe, da se ligandi vezuju za isto vezujuće mjesto, Fe na gornjoj strani hema, dok je hem sa donje strane zatvoren zbog Tyr-Fe kompleksa između hema i Tyr357. U ovom slučaju HS^- se pokazao kao ligand najvećeg afiniteta vezivanja. Molekulska modelovanja pokazalo je da sva tri liganda (H_2S , HS^- i CH_3SH) pokazuju preferencije ka jonu Fe, kao vezujućem mjestu na humanoj katalazi, na gornjoj strani hema koje sa Tyr358 formira prsten. Modelovanje na humanoj katalazi nasuprot svim ostalim modelovanjima pokazalo je da su afiniteti vezivanja HS^- i CH_3SH identični. Rezultati EPR spektroskopije jasno pokazuju da sulfid ($\text{HS}^- / \text{H}_2\text{S}$) redukuje Fe^{3+} u hemu katalaze, a može da se nagradi i kompleks. Prethodne studije pokazale su da sulfid inhibira katalazu, a predloženi mehanizam podrazumijeva formiranje kompleksa anjona sa gvožđem iz hema (Niccols, 1961; Benetti i sar, 2013).

Sposobnost CH_3SH i H_2S da inhibiraju katalazu (Beers i Sizer, 1954) ukazuje da mehanizmi relaksacije mogu da budu posredovani povećanim nivoom H_2O_2 (Appiah i sar, 2009). Efekti CH_3SH na antioksidativne enzime u ovoj studiji ukazuju da inkubacija sa CH_3SH može rezultirati povećanim nivoom H_2O_2 , sudeći po povećanoj produkciji H_2O_2 usled aktivacije SOD, kao i smanjenog uklanjanja uz pomoć GSH. Važan aspekt mehanizma koji posreduje u efektima H_2O_2 su oksidativne modifikacije kritičnih sulfhidrilnih ostataka. Naime, pokazano je da oksidacija vaskularnih tiola na Kv kanalima vodi relaksaciji (Rogers i sar, 2006).

DISKUSIJA

Takođe, pokazano je da relaksatorni efekat H_2O_2 na uterusu podrazumijeva aktivnost Kv kanala (Appiah i sar, 2012).

S druge strane, H_2S/HS^- promoviše uklanjanje peroksida usled povećanja aktivnosti GSH-Px. Ovaj kritični rezultat ukazuje da H_2O_2 ne posreduje u relaksantnom efektu sulfida, ali da može biti važan u efektima CH_3SH . Imajući u vidu rezultate molekuskog modelovanja zajedno sa efektima na aktivnosti enzima, izgleda da HS^- i H_2S imaju različitu ulogu u regulaciji aktivnosti. Takođe, molekulski H_2S i CH_3SH mogu indukovati relaksaciju indirektnim mehanizmima. Uzimajući u obzir konstantu brzine reakcije hidroksil-radikala sa CH_3SH (Lee i Tang, 1983), jasno je da metantiolel može imati konstruktivnu ulogu u fiziologiji uterusa, kao i da metilovanje sulfida može biti način modulacije njegovih efekata.

Vezivanje sulfida za metalne centre predstavlja molekulski mehanizam kojim sulfid ostavaruju svoje efekte, a čije ishodište zavisi od koncentracije sulfida – ovi mehanizmi su do određenog nivoa dio njegovih regulatornih efekata i signalinga, a sa druge strane i osnovni razlog njegove toksičnosti – inhibicija respiratornog lanca usled vezivanja za cihrom c oksidazu (Pietri i sar, 2011). Ovaj efekat je karakterističan za sve gasovite transmitere koji pokazuju tzv. „bell-shaped dose-response“ (Szabó i Papapetropoulos, 2011). Ova karakteristika jasno se ogleda na primjeru reverzibilne modulacije cihrom c oksidaze izazvane sulfidom, koja je povezana sa stanjem nalik hibernaciji identifikovanoj kod miša (Blackstone i sar, 2005). Sulfid može da se veže za Fe^{3+} u hemu cihrom c oksidaze, a redukcija Fe^{3+} je takođe uočena (Pietri i sar, 2005).

Jasno je da su biohemijske interakcije tiola i reaktivnih vrsta dio njihovog signalizacije. Imajući u vidu redoks-prirodu vodonik-sulfida, kao i redoks-osjetljive ostatke proteina (u ovom slučaju jonskih kanala) koji su važni posrednici kontraktilnosti uterusa, cilj daljih studija bio je da se ispita da li su efekti modulatora na sulfid-indukovanu relaksaciju redoks-osjetljivi.

Rezultati pokazuju da se aktivnost antioksidativnih enzima u uterusima pretretiranim DIDS, a zatim tretiranim Na_2S , ne razlikuju od aktivnosti u uterusu nakon aplikacije samo Na_2S . Ovi rezultati ukazuju da relaksacija posredovana DIDS-osjetljivim hloridnim kanalom ne interferira sa antioksidativnim sistemom.

DISKUSIJA

Međutim, inhibicija K_{ATP} kanala glibenklamidom dovela je do smanjena SOD aktivnosti, dok je smanjenje GSH-Px aktivnosti nađeno samo kod spontanijih kontrakcija. Ovi rezultati impliciraju da ograničeni efekat sulfida u prisustvu glibenklamida, uočen samo na kontrakcijama indukovanim kalcijumom, može biti vezan za ROS-zavisne događaje. Razlike u efektima blokade K_{ATP} kanala uočene na spontanijim i kalcijumom indukovanim kontrakcijama mogu biti vezane upravo za smanjenu aktivnost GSH-Px, a onda i posljedično povećanje dostupnosti relaksirajućeg H_2O_2 . Takođe, pokazano je da inhibicija K_{ATP} kanala u mitohondrijama glibenklamidom dovodi do poremećaja u međusobnom signalingu ROS i Ca^{2+} (Li i sar, 2014). Važno je istaći da su BEST kanali koji su nađeni u endoplazminom retikulumu (Kunzelmann i sar, 2007) regulisani stresom porijeklom iz ove organele i međusobnu komunikaciju ROS i Ca^{2+} (Lee i sar, 2012).

Detektovani efekti sulfida na antioksidativne enzime omogućavaju razumijevanje fundamentalnih mehanizama kojim se relaksacija (uz učešće ROS) odvija, ali obezbjeđuju i uvid u potencijal sulfida da reguliše kontrakcije uterusa koje se karakterišu oksidativnim disbalansom, kao u slučaju dijabetesa ili pretjerane gojaznosti (Agarwal i sar, 2005). Kontrakcije koje vode prevremenom porođaju se takođe karakterišu povećanim oksidativnim stanjem, zbog izuzetne aktivnosti mitohondrija (Agarwal i sar, 2012). Sulfid može direktno da modulira enzime što posljedično mijenja njihovu aktivnost, ali hronični tretmani mogli bi modulirati i nivo ekspresije ovih enzima u uterusu kroz adaptivne mehanizme, što kvalifikuje sulfid i kao obećavajući preventivni agens. Naime, pokazano je da sulfid povećava antioksidativni kapacitet u torakalnoj aorti hipertenzivnih pacova, utičući pozitivnu na ekspresiju SOD (Xue i sar, 2015).

Opšte uzev, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazali su da se sulfidom-izazvana relaksacija na uterusu pacova odvija preko DIDS-senzitivnog kanala. Komponente relaksacije su redoks-osjetljive, a sulfid modulira aktivnost glavnih enzima antioksidativne odbrane. Identifikovani mehanizmi trebalo bi da olakšaju razvoj adekvatnog terapeuta koji bi regulisao kontrakcije.

Biologija humanog rođenja sa aspekta regulacije kontraktilnosti uterusa je kompleksna i još uvijek slabo izučena. Nekontrolisana hiperkontraktilnost trudnog

DISKUSIJA

uterusa vodi prevremenom porođaju. Uprkos decenijskim naporima tretman prevremenih porođaja je bez suštinskog napretka. Animalni modeli su se pokazali kao vrlo korisni u izučavanju mehanizama koji regulišu kontraktilnost uterusa. Ovo je naročito važno za razumijevanje mehanizama koji leže u osnovi prevremenih porođaja, kao i za dizajn potencijalnog tretmana. Ipak, primenljivost trenutnih životinjskih modela koji bi imitirali fiziološke uslove humane trudnoće je ograničena činjenicom da različite vrste regulišu i iniciraju rađanje na različit način. Stoga su humane studije od neprocjenjivog značaja (Mitchell i Taggart, 2009).

U okviru ove studije ispitani su efekti sulfida na kontrakcije trudnog humanog miometrijuma. Pokazano je da je sulfid potentan relaksant. U poređenju sa prethodnim humanim studijama (Robinson i Wray, 2012) rezultati ovog istraživanja pokazali su da sulfid relaksira miometrijum pri znatno nižim koncentracijama ($30\mu\text{M}$) koje se čine više fiziološki relevantnim. Ove razlike mogu biti posljedica različitih korišćenih donora, kao i same pripreme sulfida.

Efekti sulfida poređeni su sa efektima ATB-346, donorom H_2S koji je zapravo derivat naproksena. Odabir ovog donora našao je ishodište u rezultatima prethodnih studija koje su pokazale njegove benefitne efekte naročito u stanjima vezanim sa inflamacijom (Campolo i sar, 2013). Takođe, poznato je da prevremeni porođaji mogu biti indukovani inflamacija-posredovanim događajima (Romero i sar, 2007; Gomez-Lopez i sar, 2014). Imajući u vidu vezu između unutaruterinske infekcije i prevremenog porođaja, postoji interes da se ispituju efekti antiinflamatornih agenasa kao mogućih terapeutika (Rinaldi i sar, 2011).

Poznato je da kontrakcije miometrijuma zavise od sinhronizacije događaja u individualnim ćelijama (koji zavise od količine unutarćelijskog kalcijuma) i unutarćelijske komunikacije. Pokazano je da inflamacija dovodi do povećanja kontrakcija miometrijuma. Tako, $\text{IL-1}\beta$ (engl. *interleukin 1\beta*) povećava otvorenost kalcijumskih kanala (Tribe i sar, 2003), dok $\text{TNF}\alpha$ (engl. *tumor-necrosis factor \alpha*) povećava oksitocinom-indukovane kontrakcije (Barata i sar, 2004). Izgleda da inflamacija učini miocyte na bilo koji kontraktilni agens. Takođe, $\text{IL-1}\beta$ stimuliše aktivnost fosfodiesterazu koja katalizuje razgradnju cAMP, koji sa svoje strane

DISKUSIJA

održava uterus u stanju mirovanja tokom trudnoće (Oger i sar, 2002). Efekti IL-1 β vezani su i za stimulaciju ekspresije ciklooksigenaze (engl. *cyclooxygenase*, COX) i produkciju prostaglandina i njihovih receptora (Bartlett i sar, 1999), čineći njihovu stimulaciju olakšanom i pojačanom.

Prethodne studije pokazale su da predstavnici NSAID (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) grupe jedinjenja relaksiraju uterus (Sawdy i sar, 1998; 2003; Slattery i sar, 2001). Premda bi se očekivalo da je relaksacija posredovana inhibicijom COX, to nije pokazano u svim studijama. Naime, indometacin inhibira uterus direktno preko kalcijumskih kanala (Sawdy i sar, 1998), dok drugi autori predlažu da je NSAID-indukovana relaksacija ostvarena inhibicijom COX (Slattery i sar, 2001). Iako se npr. naproksen pokazao efikasan u smanjenju inflamacije, upotreba nesteroidnih antiinflamatornih supstanci je ograničena njihovom toksičnošću. S tim u vezi, problem toksičnosti se pokušao prevazići modifikovanjem naproksena kovalentnim vezivanjem hemijske grupe (TZB), koja donira H₂S koji se pokazao kao snažan antiinflamatorni i antioksidativni agens. Rezultati ove teze takođe potvrđuju da H₂S ima antioksidativnu ulogu budući da može da interaguje sa reaktivnim vrstama, ali i da modulira aktivnost enzima koji regulišu njihov nivo. Ova kombinacija selektivne inhibicije COX i H₂S-otpuštanja, čini se obećavajućom u smanjenju toksičnosti izazvane „klasičnim” naproksenom.

Ako se uzmu u obzir gore-pomenuti mehanizmi kojim inflamacija može dovesti do prevremenih porođaja, važno je istaći literaturne podatke koju idu u prilog tezi da vodonik-sulfid može biti terapeutik velikog potencijala. Naime, ATB-346 je snažan inhibitor COX (Campolo i sar, 2013), a takođe je pokazano i da sulfid endogeno inhibira fosfodiesterazu, dovodeći do porasta cAMP (Bucci i sar, 2010), moćnog relaksanta. ATB-346 relaksira uterus pri koncentracijama od 30 μ M. Budući da se sam agens sastoji iz dva entiteta koja pojedinačno mogu dovesti do relaksacije, dalja ispitivanja su testirala efekte roditeljskih jedinjenja – naproksena i TZB (H₂S donora). Uočeno je da je relaksantni efekat ATB-346 znatno potentniji od efekta TZB i naproksena. Uzroci pojačanog efekta ATB-346 u odnosu na naproksen najvjerovatnije su vezani za otpuštanje H₂S čiji je relaksantni potencijal već okarakterisan (Campolo i sar, 2013). Slično ovome, značajno smanjenje

DISKUSIJA

gastrointestinalne toksičnosti ATB-346 u odnosu na naproksen, vjerovatno da je posljedica protektivnog efekta H₂S na mukoza, zahvaljujući njegovim antiinflamatornim svojstvima (Campolo i sar, 2013). Takođe je uočeno da je efekat TBZ u ekvimolarnim koncentracijama (u odnosu na naproksen i ATB-346) značajno manji nego efekat ATB-346. Ovo može upućivati na to da otpuštanje H₂S nije veliko iz samog TBZ, dok se kovalentno ne veže za neko drugo jedinjenje, u ovom slučaju naproksen. Prethodne studije su ovo i eksperimentalno potvrdile (Wallace i Wang, 2015). Sličan pristup u poboljšanju farmakološkog profila supstanci očigledan je na primjeru „•NO-modifikovanja“, koji je sada proširen van granica nesteroidnih antiinflamatornih lijekova. Nakon ovakve hemijske intervencije modifikovani agensi su farmakološki potentniji od roditeljskih jedinjenja (Keeble i Moore, 2002).

Imajući u vidu vezu inflamacije i nastanka prevremenog porođaja, koji je bez obzira na porijeklo i tok događaja posredovan poremećenim kontrakcijama uterusa, ATB-346 se čini kao agens izbora u specifičnim stanjima disfunkcionalnog uterusa. Rezultati obezbjeđuju osnovu za dalja ispitivanja, posebno *in vivo* efekata ATB-346 na modelu prevremenog porođaja izazvanog inflamacijom.

POGLAVLJE SEDMO

Zaključci

ZAKLJUČCI

Vodonik-sulfid ima važnu ulogu u regulaciji kontraktilnosti uterusa. Predstavlja agens velikog potencijala, budući da relaksira uterus pacova, kao i humani miometrijum (netrudni ali i gravidni uterus). Na osnovu rezultata ove teze izvedeni su sledeći zaključci koji su organizovani u tri cjeline:

(I) Efekti sulfida na uterus pacova:

1. Natrijum-sulfid izaziva koncentraciono-zavisno, reverzibilno smanjenje kontraktilnosti uterusa, ne razlikujući porijeklo nastanka kontrakcija. Ovi rezultati ukazuju da se efekat sulfida ostvaruje preko nekog posrednika koji je od ključne važnosti za nastanak svih tipova kontrakcija.
2. Primjenjen je nov način analize efekata sulfida. Na fiziološkom pH iz sulfida nastaju molekularni H_2S i anjon HS^- . Razlikovanje efekata ovih vrsta urađeno je poređenjem efekata sulfida sa efektima metantiola. Kako se H_2S i HS^- , ne mogu razdvojiti, CH_3SH je poslužio kao "imitator" efekata H_2S (jer je u molekularnom obliku). Potentniji efekat sulfida može biti posljedica prisustva HS^- jona. Štaviše, ovo osvjetljava njegovu važnost kao glavnog posrednika u relaksirajućem efektu sulfida. Takođe, ovo ukazuje da metilacija vodonik-sulfida može biti način modulacije H_2S efekata *in vivo*.
3. U cilju identifikacije ciljne mete sulfida, korišćeni su inhibitori/aktivatori jonskih kanala (K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), kao i modulatori koji dovode do promjene količine drugih glasnika (cAMP i cGMP). Utvrđeno je da je relaksacija izazvana sulfidom posredovana DIDS-osjetljivim hloridnim kanalom (bestrofinom).
4. Prisustvo bestrofina potvrđeno je u uterusu pacova i na proteinskom i na nivou iRNK. Imunohistohemijska analiza pokazala je da su bestrofini subcelularno lokalizovani u longitudinalnom i cirkularnom mišićnom sloju uterusa. Ovi rezultati su dodatno osnažili tezu da je sulfidom izazvana relaksacija uterusa posredovana bestrofinima.
5. Relaksantni efekat sulfida moduliran je sa $\bullet NO$ ali ne i polisulfidima. Modulatorna uloga $\bullet NO$ čini se važnom budući da se isti u uterusu endogeno proizvodi.

ZAKLJUČCI

6. Tretman uterusa sulfidom doveo je do promjene u aktivnosti antioksidativnih enzima, što ukazuje na to da je relaksacija izazvana vodonik-sulfidom redoks- osjetljiva.

(II) Efekti sulfida na humani miometrijum:

7. Rezultati eksperimenata na uterusu pacova usmjerili su dalja istraživanja na ispitivanje efekata sulfida na humanom trudnom miometrijumu. Pokazano je da je bestrofin prisutan u humanom uterusu.
8. Sulfid je potentan relaksant trudnog humanog miometrijuma. Ovo svojstvo je od ključne važnosti za razvoj adekvatnog tokolitika koji može biti upotrebljen za sprečavanje prevremenog porođaja
9. Poređeni su efekti sulfida sa efektima ATB-346 (nastao kovalentnom modifikacijom naproksena vezivanjem farmakofore koja donira H₂S/HS⁻). ATB-346 je dizajniran za tretman inflamatornih stanja, te je ispitivanje njegovog relaksantnog potencijala važno osobito ako se ima na umu da inflamatorni medijatori mogu dovesti do pojačane kontraktilnosti uterusa, a tako i do prevremenog porođaja.
10. Do sada je ATB-346 ispitivan na različitim modelima inflamacije, ali ne i njegov relaksantni potencijal. Imajući u vidu njegovu strukturu koja se sastoji od dvije farmakofore, koje dovode do relaksacije, bilo je od interesa ispitati njegov efekat na kontraktilnost. Rezultati su pokazali da je relaksantni efekat ATB-346 najveći.

(III) Generalni zaključak:

11. Rezultati ove teze daju doprinos u razumijevanju efektornih vrsta kao i ciljnih molekularnih struktura koje posreduju u relaksantnom efektu sulfida. Ovi mehanizmi ne moraju nužno biti važni samo za ostvarivanje efekata sulfida na uterusu, već oni mogu biti generalizovani mehanizmi kojim sulfid ostvaruje svoje biohemijske efekte.

POGLAVLJE OSMO

Literatura

LITERATURA

1. Aaronson PI, Sarwar U, Gin S, Rockenbauch U, Connolly M, Tillet A, Watson S, Liu B, Tribe RM. A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 815-824.
2. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 1996; 16: 1066-1071.
3. Acevedo CH, Ahmed A. Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone during pregnancy. *J Clin Invest* 1998; 101: 949-955.
4. Adorante JS. Regulatory volume decrease in frog retinal pigment epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 1995; 268:C89-C100.
5. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 28.
6. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10: 49.
7. Aguilar HN, Mitchell BF. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update* 2010; 16: 725-744.
8. Aguilar-Bryan L, Clement JP 4th, Nelson DA. Sulfonylurea receptors and ATP-sensitive potassium ion channels. *Methods Enzymol.* 1998; 292: 732-744.
9. Allen BG, Walsh MP. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 362-368.
10. Amédée T, Mironneau C, Mironneau J. The calcium channel current of pregnant rat single myometrial cells in short-term primary culture. *J Physiol* 1987; 392: 253-272.
11. Anouar A, Schirar A, Germain G. Relaxant effect of the calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the nonpregnant and pregnant rat uterus. Comparison with vascular tissue. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 357: 446-453.
12. Appiah I, Milovanovic S, Radojicic R, Nikolic-Kokic A, Orescanin-Dusic Z, Slavic M, Trbojevic S, Skrbic R, Spasic MB, Blagojevic D. Hydrogen peroxide affects rat uterine contractile activity and endogenous antioxidative defence. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 1932-1941.
13. Appiah I, Nikolic-Kokic A, Orescanin-Dusic Z, Radojicic R, Milovanovic S, Spasic M, Blagojevic D. Reversible oxidation of myometrial voltage-gated potassium channels with hydrogen peroxide. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012:105820.
14. Arnaudeau S, Lepretre N, Mironneau J. Chloride and monovalent ion-selective cation currents activated by oxytocin in pregnant rat myometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 491-501.
15. Arrowsmith S, Wray S. Oxytocin: its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. *J Neuroendocrinol* 2014; 26: 356-369.
16. Milenkovic A, Brandl C, Milenkovic VM, Jendryke T, Sirianant L, Wanitchakool P, Zimmermann S, Reiff CM, Horling F, Schrewe H, Schreiber R, Kunzelmann K, Wetzel CH, Weber BH. Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: E2630-E2639.
17. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464-1476.
18. Bailie CA, Vedernikov YP, Saade GR, Garfield RE. Prostaglandin-induced activation of uterine contractility in pregnant rats does not involve potassium channels. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 453-457.

LITERATURA

19. Barata H, Thompson M, Zielinska W, Han YS, Mantilla CB, Prakash YS, Feitoza S, Sieck G, Chini EN. The role of cyclic-ADP-ribose-signaling pathway in oxytocin-induced Ca^{2+} transients in human myometrium cells. *Endocrinology* 2004; 145: 881-889.
20. Bartlett SR, Sawdy R, Mann GE. Induction of cyclooxygenase-2 expression in human myometrial smooth muscle cells by interleukin-1 β : involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Physiol* 1999; 520: 399-406.
21. Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 1984; 13: 25-97.
22. Beers RF Jr, Sizer IW. Sulfide Inhibition of Catalase. *Science* 1954; 120: 32-33.
23. Begenisich T, Nakamoto T, Ovitt CE, Nehrke K, Brugnara C, Alper SL, Melvin JE. Physiological roles of the intermediate conductance, Ca^{2+} -activated potassium channel Kcnn4. *J Biol Chem* 2004; 279: 47681-47687.
24. Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, Patel HD, Isbell TS, Patel RP, Darley-Usmar VM, Doeller JE, Kraus DW. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 17977-17982.
25. Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL, Wallace JL, Teixeira SA, Florenzano J, Costa SK, Muscará MN, Ferreira HH. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. *Eur J Pharmacol* 2013;698: 463-469.
26. Berenyiova A, Grman M, Mijuskovic A, Stasko A, Misak A, Nagy P, Ondriasova E, Cacanyiova S, Brezova V, Feelisch M, Ondrias K. The reaction products of sulfide and S-nitrosoglutathione are potent vasorelaxants. *Nitric Oxide* 2015; 46:123-130.
27. Bernstein K, Vink JY, Fu XW, Wakita H, Danielsson J, Wapner R, Gallos G. Calcium-activated chloride channels anoctamin 1 and 2 promote murine uterine smooth muscle contractility. *Am J Obstet Gynecol* 2014; 211: 688.e1-10.
28. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol* 2008; 586: 5047-5061.
29. Blackstone E, Morrison M, Roth MB. H_2S induces a suspended animation-like state in mice. *Science* 2005; 308: 518.
30. Blanks AM, Zhao ZH, Shmygol A, Bru-Mercier G, Astle S, Thornton S. Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium. *J Physiol* 2007; 581: 915-926.
31. Bormann J, Hamill OP, Sakmann B. Mechanism of ion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 1987; 385: 243-286.
32. Bradley AB, Morgan KG. Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. *J Physiol* 1987; 385: 437-448.
33. Brainard AM, Korovkina VP, England SK. Potassium channels and uterine function. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18: 332-339.
34. Broderick R; Broderick K. Ultrastructure and calcium stores in the myometrium. In Uterine function: molecular and cellular aspects. 1990; Plenum Press, New York.
35. Broegger T, Jacobsen JC, Secher Dam V, Boedtker DM, Kold-Petersen H, Pedersen FS, Aalkjaer C, Matchkov VV. Bestrophin is important for the rhythmic but not the tonic contraction in rat mesenteric small arteries. *Cardiovasc Res* 2011; 91: 685-693.
36. Brown A, Cornwell T, Korniyenko I, Solodushko V, Bond CT, Adelman JP, Taylor MS. Myometrial expression of small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels depresses phasic uterine contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C832-840.

LITERATURA

37. Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Pyriochou A, Roussos C, Roviezzo F, Brancaleone V, Cirino G. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1998-2004.
38. Burdyga T, Borisova L, Burdyga AT, Wray S. Temporal and spatial variations in spontaneous Ca events and mechanical activity in pregnant rat myometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144 Suppl 1: S25-32.
39. Buxton IL, Kaiser RA, Malmquist NA, Tichenor S. NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 206-214.
40. Campolo M, Esposito E, Ahmad A, Di Paola R, Wallace JL, Cuzzocrea S. A hydrogen sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor markedly accelerates recovery from experimental spinal cord injury. *FASEB J* 2013; 27: 4489-4499.
41. Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galletta LJ. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 2008; 322: 590-594.
42. Carballal S, Trujillo M, Cuevasanta E, Bartesaghi S, Moller MN, Folkes LK, Garcia-Bereguian MA, Gutierrez-Merino C, Wardman P, Denicola A, Radi R, Alvarez B. Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic Biol Med* 2011; 50: 196-205.
43. Cavallini D, Federici G, Barboni E. Interaction of proteins with sulfide. *Eur J Biochem* 1970; 14: 169-174.
44. Challis JRG, Lye SJ. Parturition-estrogen. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. 1994, pp. 996-997.
45. Chen KY, Morris JC. Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen. *Environ Sci Technol* 1972, 6: 529-537.
46. Chung HS, Wang SB, Venkatraman V, Murray CI, Van Eyk JE. Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circ Res* 2013 18;112: 382-392.
47. Ciontea SM, Radu E, Regalia T, Ceafalan L, Cretoiu D, Gherghiceanu M, Braga RI, Malincenco M, Zagrean L, Hinescu ME, Popescu LM. C-kit immunopositive interstitial cells (Cajal-type) in human myometrium. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 407-420.
48. Claiborne A. Assay for catalase. In: Greenwald, RA. Boca Raton FL, editors. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. United States: CRC Press. 1985, pp 283-284.
49. Cleland LG, Bielicki J, Vernon-Robertsand B, Betts WH. Cellular and medical aspects. In: Greenwald RA, Cohen G, editors. *Oxy radicals and their scavenger systems*. New York: Elsevier Biomedical. 1983, pp 268-273.
50. Cole WC, Garfield RE, Kirkaldy JS. Gap junctions and direct intercellular communication between rat uterine smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1985; 249: C20-31.
51. Cole WC, Garfield RE. Evidence for physiological regulation of myometrial gap junction permeability. *Am J Physiol* 1986; 251: C411-420.
52. Collins PL, Moore JJ, Lundgren DW, Choobineh E, Chang SM, Chang AS. Gestational changes in uterine L-type calcium channel function and expression in guinea pig. *Biol Reprod* 2000; 63: 1262-1270.
53. Cortese-Krott MM, Fernandez BO, Santos JL, Mergia E, Grman M, Nagy P, Kelm M, Butler A, Feelisch M. Nitrosopersulfide (SSNO(-)) accounts for sustained NO bioactivity of S-nitrosothiols following reaction with sulfide. *Redox Biol* 2014; 2: 234-244.

LITERATURA

54. Criddle DN, De Moura RS, Greenwood IA, Large WA. Effect of niflumic acid on noradrenaline-induced contractions of the rat aorta. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 1065-1071.
55. Czyzewski BK, Wang DN. Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* 2012; 483: 494-497.
56. de Beus MD, Chung J, Colon W. Modification of cysteine 111 in Cu/Zn superoxide dismutase results in altered spectroscopic and biophysical properties. *Protein Sci* 2004; 13: 1347-1355.
57. Dhaese I, Lefebvre RA. Myosin light chain phosphatase activation is involved in the hydrogen sulfide-induced relaxation in mouse gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 2009; 606: 180-186.
58. Dickson VK, Pedi L, Long SB. Structure and insights into the function of a Ca-activated Cl channel. *Nature* 2014; 516: 213-218.
59. Dombkowski RA, Russell MJ, Schulman AA, Doellman MM, Olson KR. Vertebrate phylogeny of hydrogen sulfide vasoactivity. *Am J Physiol* 2005; 288: R243-252.
60. Dombkowski RA, Doellman MM, Head SK, Olson KR. Hydrogen sulfide mediates hypoxia-induced relaxation of trout urinary bladder smooth muscle. *J Exp Biol* 2006; 209: 3234-3240.
61. Doujaiji B, Al-Tawfiq JA Hydrogen sulfide exposure in an adult male. *Ann Saudi Med* 2010; 30: 76-80.
62. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001; 293: 2449-2452.
63. Dreja K, Voldstedlund M, Vinten J, Trandum-Jensen J, Hellstrand P, and Sward K. Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1267-1272.
64. Driska SP, Aksoy MO, and Murphy RA. Myosin light chain phosphorylation associated with contraction in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 1981; 240: C222-233.
65. Duan X, Block E, Li Z, Connelly T, Zhang J, Huang Z, Su X, Pan Y, Wu L, Chi Q, Thomas S, Zhang S, Ma M, Matsunami H, Chen GQ, Zhuang H. Crucial role of copper in detection of metal-coordinating odorants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 3492-3497.
66. Duquette RA, Shmygol A, Vaillant C, Mobasher A, Pope M, Burdya T, Wray S. Vimentin-positive, c-kit-negative interstitial cells in human and rat uterus: a role in pacemaking? *Biol Reprod* 2005; 72(2): 276-283.
67. Duta V, Duta F, Puttagunta L, Befus AD, Duszyk M. Regulation of basolateral Cl(-) channels in airway epithelial cells: the role of nitric oxide. *J Membr Biol* 2006; 213: 165-174.
68. Eaton P. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1889-1899.
69. Eisenman G, Horn R. Ionic selectivity revisited: the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels. *J Membr Biol* 1983; 76: 197-225.
70. Fernhoff NB, Derbyshire ER, Marletta MA. A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 21602-21607.
71. Filipovic MR, Miljkovic J, Nauser T, Royzen M, Klos K, Shubina T, Koppenol WH, Lippard SJ, Ivanović-Burmazović I. Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H₂S and S-nitrosothiols. *J Am Chem Soc* 2012; 134: 12016-12027.
72. Filipovic MR, Eberhardt M, Prokopovic V, Mijuskovic A, Orescanin-Dusic Z, Reeh P, Ivanovic-Burmazovic I. Beyond H₂S and NO interplay: hydrogen sulfide and nitroprusside react directly to give nitroxyl (HNO). A new pharmacological source of HNO. *J Med Chem* 2013; 56: 1499-1508.

LITERATURA

73. Finkel T. From sulfenylation to sulphydration: what a thiolate needs to tolerate. *Sci Signal* 2012; 5: e10.
74. Finkelstein A, Benevenga NJ. The effect of methanethiol and methionine toxicity on the activities of cytochrome c oxidase and enzymes involved in protection from peroxidative damage. *J Nutr* 1986; 2:204-215.
75. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97-112.
76. Fujihara H, Walker LA, Gong MC, Lemichez E, Boquet P, Somlyo AV, Somlyo AP. Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by *in vitro* ADP-ribosylation with chimeric toxin DC3B. *Mol Biol Cell* 1997; 8: 2437-2447.
77. Gadalla MM, Snyder SH. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J Neurochem* 2010; 113(1): 14-26.
78. Gaston B. Nitric oxide and thiol groups. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 323-333.
79. Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 756-763.
80. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 1974; 30: 665-668.
81. Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M. Immune cells in term and preterm labor. *Cell Mol Immunol* 2014; 11: 571-581.
82. Greenwood I. Simply the best? Identity of vascular cGMP-dependent Cl⁻ current revealed. *Circ Res* 2008; 103: 782-783.
83. Greiner R, Pálkás Z, Bäsell K, Becher D, Antelmann H, Nagy P, Dick TP. Polysulfides link H₂S to protein thiol oxidation. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19: 1749-1765.
84. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990, 280: 1-8.
85. Halliwell B, Gutteridge JMC, editori. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press; 2007.
86. Haouzi P, Klingerman CM. Fate of intracellular H₂S/HS⁻ and metallo-proteins. *Respir Physiol Neurobiol* 2013; 188: 229-230.
87. Hartzell C, Putzier I, Arreola J. Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 719-758.
88. Hartzell C, Qu Z, Putzier I, Artinian L, Chien LT, Cui Y. Looking chloride channels straight in the eye: bestrophins, lipofuscinosis, and retinal degeneration. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 292-302.
89. Hartzell HC, Qu Z, Yu K, Xiao Q, Chien LT. Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiol Rev* 2008; 88: 639-672.
90. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 150-166.
91. Hillock CJ, Crankshaw DJ. Inhibitory prostanoid EP receptors in human non-pregnant myometrium. *Eur J Pharmacol* 1999; 378: 99-108.
92. Holdiman AJ, Fergus DJ, England SK. 17beta-Estradiol upregulates distinct maxi-K channel transcripts in mouse uterus. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 192: 1-6.

LITERATURA

93. Honore E, Amedee T, Martin C, Dacquet C, Mironneau C and Mironneau J. Calcium channel current and its sensitivity to (+) isradipine in cultured pregnant rat myometrial cells. An electrophysiological and a binding study. *Pflugers Arch* 1989; 414: 477-483.
94. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 527-531.
95. http://www.78stepshealth.us/human-physiology/images/3204_835_1095-infundibulum-uterine-tube.jpg
96. <http://images.tutorvista.com/content/animal-morphology/female-rat-reproductive-system.jpeg>
97. http://www.esse.wustl.edu/~nehorai/research/ra/uterus_model_files/Figure1.jpg
98. <http://www.zuniv.net/physiology/book/images/n2-11.jpg>
99. http://www.esse.wustl.edu/~nehorai/research/ra/uterus_model_files/Figure3.jpg
100. <http://www.cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP026%20VSM%20contraction.png>
101. <https://www.caymanchem.com/images/articles/page/2165-1.jpg>
102. <http://www.madsci.org/posts/archives/1999-09/936854566.Ch.r.html>
103. <http://www.impactaging.com/papers/v5/n8/full/100590/Figure1.jpg>
104. Hughes MN, Centelles MN, Moore KP. Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1346-1353.
105. Inagaki N, Gonoi T, Clement JP 4th, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995; 270: 1166-1170.
106. Inoue Y, Nakao K, Okabe K, Izumi H, Kanda S, Kitamura K, Kuriyama H. Some electrical-properties of human pregnant myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 1090-1098.
107. Isomoto S, Kondo C, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol* 1997; 47: 11-39.
108. Jacob C, Winyard PG. Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine. Germany: Wiley WCH. 2009.
109. Janssen LJ, Sims SM. Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. *J Physiol* 1992; 453: 197-218.
110. Janssen LJ, Sims SM. Ca(2+)-dependent Cl⁻ current in canine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995; 269: C163-169.
111. Jensen BS, Strøbaek D, Olesen SP, Christophersen P. The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets* 2001; 2: 401-422.
112. Jmari K, Mironneau C, Mironneau J. Inactivation of calcium channel current in rat uterine smooth muscle: evidence for calcium- and voltage-mediated mechanisms. *J Physiol* 1986; 380: 111-126.
113. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C849-C868.
114. Jones K, Shmygol A, Kupittayanant S, Wray S. Electrophysiological characterization and functional importance of calcium-activated chloride channel in rat uterine myocytes. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2004; 448: 36-43.

LITERATURA

115. Kage S, Nagata T, Takekawa K, Kimura K, Kudo K, Imamura T. The usefulness of thiosulfate as a indicator of hydrogen sulfide poisoning in forensic toxicological examination: A study with animal experiments. *Jpn J Forensic Toxicol* 1992; 10: 223-227.
116. Kao CY. Electrophysiological properties of uterine smooth muscle. In: Wynn R, editor. *Biology of the uterus*. New York: *Plenum Press*. 1989, p403.
117. Keeble JE, Moore PK. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 295-310.
118. Khan I, Tabb T, Garfield RE, Jones LR, Fomin VP, Samson SE, Grover AK. Expression of the internal calcium pump in pregnant rat uterus. *Cell Calcium* 1993; 14: 111-117.
119. Khan RN, Matharoo-Ball B, Arulkumaran S, Ashford ML. Potassium channels in the human myometrium. *Exp Physiol* 2001; 86: 255-264.
120. Kida M, Sugiyama T, Yoshimoto T, Ogawa Y. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Eur J Pharm Sci* 2013; 48: 211-215.
121. Kim YC, Koh SD, Sanders KM. Voltage-dependent inward currents of interstitial cells of Cajal from murine colon and small intestine. *J Physiol* 2002; 541: 797-810.
122. Kimura Y, Dargush R, Schubert D, Kimura H. Hydrogen sulfide Protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 661-670.
123. Kitazawa T, Kobayashi S, Horiuti K, Somlyo AV, Somlyo AP. Receptor-coupled permeabilized smooth muscle. Role of the phosphatidylinositol cascade, G-proteins, and modulation of the contractile response to Ca^{2+} . *J Biol Chem* 1989; 10: 5339-5342.
124. Knock GA, Smirnov SV, Aaronson PI. Voltage-gated K^+ currents in freshly isolated myocytes of the pregnant human myometrium. *J Physiol* 1999; 518: 769-781.
125. Kobayashi S, Kanaide H, Nakamura M. Complete overlap of caffeine- and K^+ depolarization-sensitive intracellular calcium storage site in cultured rat arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 15709-15713.
126. Korovkina VP, Fergus DJ, Holdiman AJ, England SK. Characterization of a novel 132-bp exon of the human maxi-K channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C361-367.
127. Kumar D, Barnes AC. Studies in human myometrium during pregnancy. II. Resting membrane potential and comparative electrolyte levels. *Am J Obstet Gynecol* 1961, 82: 736-741.
128. Kunzelmann K, Milenkovic VM, Spitzner M, Soria RB, Schreiber R. Calcium-dependent chloride conductance in epithelia: is there a contribution by Bestrophin? *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2007; 454: 879-889.
129. Kunzelmann K: TMEM16, LRRC8A, bestrophin: chloride channels controlled by $Ca(2+)$ and cell volume. *Trends Biochem Sci* 2015; 40: 535-543.
130. Kupittayanant S, Luckas MJ, Wray S. Effect of inhibiting the sarcoplasmic reticulum on spontaneous and oxytocin-induced contractions of human myometrium. *BJOG*. 2002; 109: 289-296.
131. Kuriyama H, Suzuki H. Changes in electrical properties of rat myometrium during gestation and following hormonal treatments. *J Physiol* 1976; 260: 315-333.
132. Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T, Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev* 1998; 78: 811-920.
133. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

LITERATURA

134. Lammers WJ, Arafat K, el-Kays A, el-Sharkawy TY. Spatial and temporal variations in local spike propagation in the myometrium of the 17-day pregnant rat. *Am J Physiol* 1994; 267: C1210-1223.
135. Lammers WJ, Hamid R. The initiation, continuation, and termination of spontaneous episodes of circus movements in the pregnant myometrium of the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1515-1526.
136. Large WA, Wang Q. Characteristics and physiological role of the Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in smooth muscle. *Am J Physiol* 1996; 271: C435-454.
137. Leblanc N, Ledoux J, Saleh SN, Sanguinetti A, Angermann J, O'Driscoll K, Britton F, Perrino BA, Greenwood IA. Regulation of calcium-activated chloride channels – a complex picture emerges. *Can J Physiol Pharmacol* 2005; 83: 541-556.
138. Lee JH, Tang IN. Absolute rate constants for the hydroxyl radical reactions with CH₃SH and C₂H₅SH at room temperature. *J Chem Phys* 1983; 78: 6646-6650.
139. Lee SE, Ahn DS, Lee YH. Role of T-type Ca channels in the spontaneous phasic contraction of pregnant rat uterine smooth muscle. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009; 13: 241-249.
140. Lee SW, Cheng Y, Moore PJ, Bian JS. Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 1142-1147.
141. Lee YH, Hwang MK, Morgan KG, Taggart MJ. (2001). Receptor-coupled contractility of uterine smooth muscle: from membrane to myofilaments. *Exp Physiol* 2001; 86: 283-288.
142. Lee WK, Chakraborty PK, Roussa E, Wolff NA, Thévenod F. ERK1/2-dependent bestrophin-3 expression prevents ER-stress-induced cell death in renal epithelial cells by reducing CHOP. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823: 1864-1876.
143. Levitt MD, Furne J, Springfield J, Suarez F, DeMaster E. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *J Clin Invest* 1999; 104: 1107-1114.
144. Li DL, Ma ZY, Fu ZJ, Ling MY, Yan CZ, Zhang Y. Glibenclamide decreases ATP-induced intracellular calcium transient elevation *via* inhibiting reactive oxygen species and mitochondrial activity in macrophages. *PLoS ONE* 2014; 9: e89083.
145. Li L, Moore PK. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 84-90.
146. Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; 51: 169-187.
147. Li Q, Lancaster JR Jr. Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide* 2013; 35: 21-34.
148. Linsdell P. Relationship between anion binding and anion permeability revealed by mutagenesis within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Physiol* 2001; 531: 51-66.
149. Lipscombe D, Helton TD, Xu W. L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol* 2004; 92: 2633-2641.
150. Liu Y, Zhang H, Huang D, Qi J, Xu J, Gao H, Du X, Gamper N, Zhang H. Characterization of the effects of Cl⁻ channel modulators on TMEM16A and bestrophin-1 Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *Pflugers Arch* 2014; 467: 1417-1430.
151. Lloyd D. Hydrogen sulfide: Clandestine microbial messenger? *Trends Microbiol* 2006; 14: 456-462.
152. Longo M, Jain V, Vedernikov YP, Hankins GD, Garfield RE, Saade GR. Effects of L-type Ca(2+)-channel blockade, K(+)(ATP)-channel opening and nitric oxide on human uterine contractility in relation to gestational age and labour. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 159-164.

LITERATURA

153. Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 4-24.
154. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
155. Luther GW 3rd, Findlay AJ, Macdonald DJ, Owings SM, Hanson TE, Beinart RA, Girguis PR. Thermodynamics and kinetics of sulfide oxidation by oxygen: a look at inorganically controlled reactions and biologically mediated processes in the environment. *Front Microbiol* 2011; 2: 62.
156. Malekova L, Krizanova O, Ondrias K. H₂S and HS(-) donor NaHS inhibits intracellular chloride channels. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28:190-194.
157. Marcondes FK, Bianchi FI, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Br J Biol* 2002; 62: 609-614.
158. Marmorstein LY, Wu J, McLaughlin P, Yocom J, Karl MO, Neussert R, Wimmers S, Stanton JB, Gregg RG, Strauss O, Peachey NS, Marmorstein AD. The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (Best-1). *J Gen Physiol* 2006; 127: 577-589.
159. Marquardt A, Stohr H, Passmore LA, Kramer F, Rivera A, Weber BH. Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1517-1525.
160. Marshall JM. Regulation of activity in uterine smooth muscle. *Physiol Rev Suppl* 1962; 5: 213-227.
161. Mathai JC, Missner A, Kügler P, Saparov SM, Zeidel ML, Lee JK, Pohl P. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 16633-16638.
162. Matthew A, Shmygol A, Wray S. Ca²⁺ entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol Res* 2004; 37: 617-624.
163. Maylie J, Bond CT, Herson PS, Wei-Sheng L, Adelman JP. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J Physiol* 2004; 554: 255-261.
164. Mijušković A, Oreščanin-Dušić Z, Nikolić-Kokić A, Slavić M, Spasić MB, Spasojević I, Blagojević D. Comparison of the effects of methanethiol and sodium sulphide on uterine contractile activity. *Pharmacol Rep* 2014; 66: 373-379.
165. Mijušković A, Kokić AN, Dušić ZO, Slavić M, Spasić MB, Blagojević D. Chloride channels mediate sodium sulphide-induced relaxation in rat uteri. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 3671-3686.
166. Milenkovic VM, Krejcova S, Reichhart N, Wagner A, Strauss O. Interaction of bestrophin-1 and Ca²⁺ channel β -subunits: identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus. *PLoS One* 2011; 6: e19364.
167. Milenkovic A, Brandl C, Milenkovic VM, Jendryke T, Sirianant L, Wanitchakool P, Zimmermann S, Reiff CM, Horling F, Schrewe H, Schreiber R, Kunzelmann K, Wetzel CH, Weber BH. Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: E2630-E2639.
168. Mironneau J. Excitation-contraction coupling in voltage clamped uterine smooth muscle. *J Physiol* 1973; 233: 127-141.
169. Mishanina TV, Libiad M, Banerjee R. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat Chem Biol* 2015; 11: 457-464.
170. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.

LITERATURA

171. Mitchell BF, Taggart MJ. Are animal models relevant to key aspects of human parturition? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R525-545.
172. Miyoshi H, Yamaoka K, Garfield RE, Ohama K. Identification of a non-selective cation channel current in myometrial cells isolated from pregnant rats. *Pflugers Arch* 2004; 447: 457-464.
173. Monga M, Sanborn BM. Uterine biological and the control of myometrial contraction. In: Carsten ME, Miller JD, editors. *Uterine Function: Molecular and Cellular Aspects*. New York: Plenum. 1992, pp. 95-101.
174. Morrison JJ, Ashford ML, Khan RN, Smith SK. The effects of potassium channel openers on isolated pregnant human myometrium before and after the onset of labor: potential for tocolysis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1277-1285.
175. Moustafa A, Habara Y. Hydrogen sulfide regulates Ca(2+) homeostasis mediated by concomitantly produced nitric oxide via a novel synergistic pathway in exocrine pancreas. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 747-758.
176. Mueller EG Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 185-194.
177. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417: 1-13.
178. Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. H₂S signals through protein S-sulfhydrylation. *Sci Signal* 2009; 2: ra72.
179. Münzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur Heart J* 2010; 31: 2741-2748.
180. Myers RL. *The 100 most important chemical compounds: A reference guide*. Westport: Greenwood press. 2007.
181. Nagy P, Winterbourn CC. Rapid reaction of hydrogen sulfide with the neutrophil oxidant hypochlorous acid to generate polysulfides. *Chem Res Toxicol* 2010; 23: 1541-1543.
182. Nagy P, Pálincás Z, Nagy A, Budai B, Tóth I, Vasas A. Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 876-891.
183. Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao JH, Xue X, Okumura K. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF- κ B and JNK. *Cell Death Differ* 2006; 13: 730-737.
184. Nathan C, Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 349-361.
185. Niccols P. The formation and properties of sulphmyoglobin and sulphcatalase. *Biochem J* 1961; 81: 374-383.
186. Nishida M, Sawa T, Kitajima N, Ono K, Inoue H, Ihara H, Motohashi H, Yamamoto M, Suematsu M, Kurose H, van der Vliet A, Freeman BA, Shibata T, Uchida K, Kumagai Y, Akaike T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 714-724.
187. Njie-Mbye YF, Opere CA, Chitnis M, Ohia SE. Hydrogen sulfide: role in ion channel and transporter modulation in the eye. *Front Physiol*. 2012; 3: 295.
188. Noda M, Yasuda-Fukazawa C, Moriishi K, Kato T, Okuda T, Kurokawa K, Takuwa Y. Involvement of rho in GTP gamma S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett* 1995; 3: 246-250.
189. Oger S, Mehats C, Dallot E, Ferre F, Leroy MJ. Interleukin-1 β induces phosphodiesterase 4B2 expression in human myometrial cells through a prostaglandin E₂- and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5524-5531.

LITERATURA

190. Okamoto S, Nakamura T, Cieplak P, Chan SF, Kalashnikova E, Liao L, Saleem S, Han X, Clemente A, Nutter A, Sances S, Brechtel C, Haus D, Haun F, Sanz-Blasco S, Huang X, Li H, Zaremba JD, Cui J, Gu Z, Nikzad R, Harrop A, McKercher SR, Godzik A, Yates JR 3rd, Lipton SA. S-nitrosylation-mediated redox transcriptional switch modulates neurogenesis and neuronal cell death. *Cell Rep* 2014; 8: 217-228.
191. Osa T, Taga F. Electrophysiological comparison of the action of oxytocin and carbachol on pregnant mouse myometrium. *Jpn J Physiol* 1973; 23: 81-96.
192. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 74-77.
193. Pang X, Han K, Cui Q. A simple but effective modeling strategy for structural properties of non-heme Fe(II) sites in proteins: test of force field models and application to proteins in the AlkB family. *J Comput Chem* 2013; 34: 1620-1635.
194. Parkington HC, Coleman HA. Ionic mechanisms underlying action potentials in myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1988; 15: 657-665.
195. Parkington HC, Coleman HA. The role of membrane potential in the control of uterine motility. In: Carsten ME, Miller JD, editors. *Uterine Function: Molecular and Cellular Aspects*. New York: Plenum Press. 1990, pp. 195-248.
196. Parkington HC, Tonta MA, Brennecke SP, Coleman HA. Contractile activity, membrane potential, and cytoplasmic calcium in human uterine smooth muscle in the third trimester of pregnancy and during labor. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 1445-1451.
197. Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson RJ. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 10.
198. Paulsen CE, Carroll KS. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev* 2013; 113: 4633-4679.
199. Pavlik J, Noll B, Oliver A, Schulz C, Scheidt R. Hydrosulfide (HS-) coordination in iron porphyrinates. *Inorg Chem* 2010; 49: 1017-1026.
200. Pedemonte N, Galletta LJ. Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiol Rev* 2014; 94: 419-459.
201. Pérez G, Toro L. Differential modulation of large-conductance KCa channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium. *Am J Physiol* 1994; 266: C1459-1463.
202. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 2003; 83: 117-161.
203. Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 245-262.
204. Pietri R, Granell L, Cruz A, De Jesús W, Lewis A, Leon R, Cadilla CL, López-Garriga J. Tyrosine B10 and heme-ligand interactions of *Lucina pectinata* hemoglobin II: control of heme reactivity. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1747: 195-203.
205. Pietri R, Román-Morales E, López-Garriga J. Hydrogen sulfide and heme proteins: knowledge and mysteries. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 393-404.
206. Popat A, Crankshaw DJ. Variable responses to prostaglandin E(2) in human non-pregnant myometrium. *Eur J Pharmacol* 2001; 416: 145-152.
207. Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17: 119-140.
208. Pressman EK, Tucker JA Jr, Anderson NC Jr, Young RC. Morphologic and electrophysiologic characterization of isolated pregnant human myometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 1273-1279.

LITERATURA

209. QuZ, Hartzell HC. Determinants of anion permeation in the second transmembrane domain of the mouse bestrophin-2 chloride channel. *J Gen Physiol* 2004; 124: 371-382.
210. Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C769-783.
211. Reichhart N, Milenkovic VM, Halsband CA, Cordeiro S, Strauss O. Effect of bestrophin-1 on L-type Ca²⁺ channel activity depends on the Ca²⁺ channel beta-subunit. *Exp Eye Res* 2010; 91: 630-639.
212. Reimer RK, Roberts JM. Activation of uterine smooth muscle contraction: Implications for eicosanoid action and interactions. *Semin. Perinatol NY* 1986; 10: 276.
213. Riemer RK, Heymann MA. Regulation of uterine smooth muscle function during gestation. *Pediatr Res* 1998; 44: 615-627.
214. Rinaldi SF, Hutchinson JL, Rossi AG, Norman JE. Anti-inflammatory mediators as physiological and pharmacological regulators of parturition. *Expert Rev Clin Immunol* 2011; 7: 675-696.
215. Robinson H, Wray S. A new slow releasing, H₂S generating compound GYY4137 relaxes spontaneous and oxytocin-stimulated contractions of human and rat pregnant myometrium. *PLoS One* 2012; 7: e46278.
216. Rogers PA, Dick GM, Knudson JD, Focardi M, Bratz IN, Swafford AN Jr, Saitoh S, Tune JD, Chilian WM. H₂O₂-induced redox sensitive coronary vasodilation is mediated by 4-aminopyridine-sensitive K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: 2473-2482.
217. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 2007; 25: 21-39.
218. Rosenthal R, Bakall B, Kinnick T, Peachey N, Wimmers S, Wadelius C, Marmorstein A, Strauss O. Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells. *FASEB J* 2006; 178-180.
219. Sanborn BM. Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. *J Soc Gynecol Investig* 2000; 7: 4-11.
220. Sanders KM, Zhu MH, Britton F, Koh SD, Ward SM. Anoctamins and gastrointestinal smooth muscle excitability. *Exp Physiol* 2012; 97: 200-206.
221. Sanner MF. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model* 1999; 17: 57-61.
222. Sawdy R, Knock GA, Bennett PR, Poston L, Aaronson PI. Nimesulide and indomethacin inhibit contractility and the Ca²⁺ channel current in myometrial smooth muscle from pregnant women. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1212-1217.
223. Sawdy RJ, Sullivan MH, Bennett PR. The effects of non-steroidal anti-inflammatory compounds on human myometrial contractility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 109: 33-40.
224. Scudieri P, Sondo E, Ferrera L, Galiotta LJ. The anoctamin family: TMEM16A and TMEM16B as calcium-activated chloride channels. *Exp Physiol* 2012; 97: 177-183.
225. Searcy DG, Whitehead JP, Maroney MJ. Interaction of Cu,Zn superoxide dismutase with hydrogen sulfide. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318: 251-263.
226. Searcy DG. HS:O₂ oxidoreductase activity of Cu,Zn superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1996; 334: 50-58.
227. Searcy DG, Lee SH. Sulfur reduction by human erythrocytes. *J Exp Zool* 1998; 282: 310-322.

LITERATURA

228. Senchyna M, Crankshaw DJ. Operational correlates of prostanoid TP receptor expression in human non-pregnant myometrium are unaffected by excision site or menstrual cycle status of the donor. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1524-1528.
229. Sergeant GP, Hollywood MA, McCloskey KD, Thornbury KD, McHale NG. Specialized pacemaking cells in the rabbit urethra. *J Physiol* 2000; 526: 359-366.
230. Shmigel AV, Eisner DA, Wray S. Properties of voltage-activated $[Ca^{2+}]_i$ transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. *J Physiol* 1998; 511: 803-811.
231. Shmygol A, Gullam J, Blanks A, Thornton S. Multiple mechanisms involved in oxytocin-induced modulation of myometrial contractility. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 827-832.
232. Shmygol A, Blanks AM, Bru-Mercier G, Gullam JE, Thornton S. Control of uterine Ca^{2+} by membrane voltage: toward understanding the excitation-contraction coupling in human myometrium. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1101: 97-109.
233. Shmygol A, Noble K, Wray S. Depletion of membrane cholesterol eliminates the Ca^{2+} -activated component of outward potassium current and decreases membrane capacitance in rat uterine myocytes. *J Physiol* 2007; 581: 445-456.
234. Slattery MM, Friel AM, Healy DG, Morrison JJ. Uterine relaxant effects of cyclooxygenase-2 inhibitors *in vitro*. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 563-569.
235. Smith SS, Steinle ED, Meyerhoff ME, Dawson DC. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Physical basis for lyotropic anion selectivity patterns. *J Gen Physiol* 1999; 114: 799-818.
236. Somlyo AP, Somlyo AV. Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 138-143.
237. Somlyo AP, Somlyo AV. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol Scand* 1998; 4: 437-448.
238. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 2000; 522: 177-185.
239. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle nonmuscle myosin II: modulated by G proteins kinases myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003; 4: 1325-1358.
240. Song J, Zhang X, Qi Z, Sun G, Chi S, Zhu Z, Ren J, Qiu Z, Liu K, Myatt L, Ma RZ. Cloning and characterization of a calcium-activated chloride channel in rat uterus. *Biol Reprod* 2009; 80: 788-794.
241. Song M, Helguera G, Eghbali M, Zhu N, Zarei MM, Olcese R, Toro L, Stefani E. Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones. *J Biol Chem* 2001; 276: 31883-31890.
242. Song M, Zhu N, Olcese R, Barila B, Toro L, Stefani E. Hormonal control of protein expression and mRNA levels of the MaxiK channel alpha subunit in myometrium. *FEBS Lett* 1999; 460: 427-432.
243. Sonne SR, Bhalla VK, Barman SA, White RE, Zhu S, Newman TM, Prasad PD, Smith SB, Offermanns S, Ganapathy V. Hyperhomocysteinemia is detrimental to pregnancy in mice and is associated with preterm birth. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 1149-1158.
244. Sperelakis N, Inoue Y, Ohya Y. Fast Na^+ channels and slow Ca^{2+} current in smooth muscle from pregnant rat uterus. *Jpn J Pharmacol* 1992; 58: 96-106.
245. Stasko A, Brezova V, Zalibera M, Biskupic S, Ondrias K. Electron transfer: a primary step in the reactions of sodium hydrosulphide, an H_2S/HS^- donor. *Free Radic Res* 2009; 43: 581-593.
246. Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 539-577.

LITERATURA

247. Stocker M. Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 758-770.
248. Strauss O, Müller C, Reichhart N, Tamm ER, Gomez NM. The role of bestrophin-1 in intracellular Ca(2+) signaling. *Adv Exp Med Biol* 2014; 801: 113-119.
249. Streeter E, Hart J, Badoer E. An investigation of the mechanisms of hydrogen sulfide-induced vasorelaxation in rat middle cerebral arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012; 385: 991-1002.
250. Sun H, Tsunenari T, Yau KW, Nathans J. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4008-4013.
251. Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 917-935.
252. Szabó C, Papapetropoulos A. Hydrogen sulphide and angiogenesis: mechanisms and applications. *Br J Pharmacol* 2011; 164: 853-865.
253. Taggart MJ. Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? *News Physiol Sci* 2001; 16: 61-65.
254. Taira N, Marshall JM. Action of oxytocin antagonists on electrical and mechanical activity of the uterus. *Am J Physiol* 1967; 212: 725-731.
255. Tang G, Wu L, Liang W, Wang R. Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 1757-1764.
256. Tang G, Wu L, Wang R. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37: 753-763.
257. Tapley DW, G.R. Buettner, J.M. Shick. Free radicals and chemiluminescence as 1251 products of the spontaneous oxidation of sulfide in seawater, and their biological 1252 implications. *Biol Bull* 1999; 196: 52-56.
258. Tehrani HS, Moosavi-Movahedi AA, Ghourchian H, Ahmad F, Kiany A, Atri MS, Ariaeenejad Sh, Kavousi K, Saboury AA. Effect of compatible and noncompatible osmolytes on the enzymatic activity and thermal stability of bovine liver catalase. *J Biomol Struct Dyn* 2013; 31: 1440-1454.
259. Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. *J Physiol* 2006; 572: 617-624.
260. Thanan R, Techasen A, Hou B, Jamnongkan W, Armartmuntree N, Yongvanit P, Murata M. Development and characterization of a hydrogen peroxide-resistant cholangiocyte cell line: A novel model of oxidative stress-related cholangiocarcinoma genesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 464: 182-188.
261. Tharp DL, Bowles DK. The intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (KCa3.1) in vascular disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2009; 7: 1-11.
262. Tiranti V, Viscomi C, Hildebrandt T, Di Meo I, Mineri R, Tiveron C, Levitt MD, Prella A, Fagiolari G, Rimoldi M, Zeviani M. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat Med* 2009; 15: 200-205.
263. Tribe RM, Moriarty P, Dalrymple A, Hassoni AA, Poston L. Interleukin-1 β induces calcium transients and enhances basal and store operated calcium entry in human myometrial smooth muscle. *Biol Reprod* 2003; 68: 1842-1849.
264. Tritthart HA, Mahnert W, Fleischhacker A, Adelwöhrer N. Potassium channels and modulating factors of channel functions in the human myometrium. *Z Kardiol* 1991; 80 Suppl 7: 29-33.

LITERATURA

265. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010; 31: 455-461.
266. Vazquez FG, Zhang J, Millero FJ. Effect of metals on the rate of the oxidation of H₂S in seawater. *GeophysRes Lett* 1989; 16: 1363-1366.
267. Wallace JL, Wang R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat Rev Drug Discov* 2015; 14: 329-345.
268. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 2003; 27: 201-206.
269. Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 2010; 468: 790-795.
270. White BJ, Smith PA, Dunn WR. Hydrogensulphide mediated vasodilatation involves the release of neurotransmitters from sensory nerves in pressurized mesenteric small arteries isolated from rats. *Br J Pharmacol* 2013; 168: 785-793.
271. Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau JL, Wong BS, Armstrong JS, Moore PK. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 794-798.
272. Wickenden A. K(+) channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol Ther* 2002; 94: 157-182.
273. Wray S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am J Physiol* 1993; 264: C1-18.
274. Wray S, Jones K, Kupittayanant S, Li Y, Matthew A, Monir-Bishty E, Noble K, Pierce SJ, Quenby S, Shmygol AV. Calcium signaling and uterine contractility. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10: 252-264.
275. Wray S. Insights into the uterus. *Exp Physiol* 2007; 92: 621-631.
276. Wray S, Noble K. Sex hormones and excitation-contraction coupling in the uterus: the effects of oestrous and hormones. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 451-461.
277. Wray S, Burdyga T, Noble D, Noble K, Borysova L, Arrowsmith S. Progress in understanding electro-mechanical signaling in the myometrium. *Acta Physiol (Oxf)* 2015; 213: 417-431.
278. Xue H, Zhou S, Xiao L, Guo Q, Liu S, Wu Y. Hydrogen sulfide improves the endothelial dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Physiol Res* 2015, *in press*.
279. Xu J, Yu W, Jan YN, Jan LY, Li M. Assembly of voltage-gated potassium channels - conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the alpha-subunits. *J Biol Chem* 1995; 270: 24761-24768.
280. You XJ, Xu C, Lu JQ, Zhu XY, Gao L, Cui XR, Li Y, Gu H, Ni X. Expression of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase in human pregnant myometrium and their roles in the control of uterine contractility. *PLoS One* 2011; 6:e23788.
281. Young RC, Smith LH, McLaren MD. T-type and L-type calcium currents in freshly dispersed human uterine smooth muscle cells. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 785-792.
282. Young RC, Zhang P. Functional separation of deep cytoplasmic calcium from subplasmalemmal space calcium in cultured human uterine smooth muscle cells. *Cell Calcium* 2004; 36: 11-17.
283. Young RC, Zhang P. Inhibition of in vitro contractions of human myometrium by mibefradil, a T-type calcium channel blocker: support for a model using excitation-contraction coupling, and autocrine and paracrine signaling mechanisms. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12: e7-12.
284. Young RC. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1101: 72-84.

LITERATURA

285. Young RC, Bemis A. Calcium-activated chloride currents prolongs the duration of contractions in pregnant rat myometrial tissue. *Reprod Sci* 2009; 16: 734-739.
286. Zhang R, Sun Y, Tsai H, Tang C, Jin H, Du J. Hydrogen sulfide inhibits L-type calcium currents depending upon the protein sulfhydryl state in rat cardiomyocytes. *PLoS ONE* 2012; e37073.
287. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 2001; 20: 6008-6016.
288. Zyrianov VV, Sumovskaya AY, Shostak AA. Application of electron spin resonance for evaluation of the level of free radicals in the myometrium in full-term pregnancy with normal labour and uterine inertia. *J Biosci* 2003; 28: 19-21.

BIOGRAFIJA

Biografija

BIOGRAFIJA

Biografija autora:

Ana Mijušković je rođena 14. decembra 1987. godine u Nikšiću. Osnovne studije biohemije završila je na Hemijskom fakultetu 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,81. Eksperimentalni deo završnog rada uradila je na Univerzitetu u Dublinu, u laboratoriji prof. dr Enrika Marsilija, kao Hamilton stipendista Nacionalnog centra za senzorna istraživanja. Master studije je završila 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,80. Zbog postignutih rezultata, Hemijski fakultet je Ani dodelio nagradu za najboljeg studenta školske 2010/2011. Ana Mijušković je dobitnik nagrade "Đorđe Stefanović", koja se dodeljuje najboljem studentu Katedre za biohemiju, kao i nagrade za izuzetan uspeh tokom studiranja koju dodeljuje Srpsko hemijsko društvo. Doktorske studije na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta upisala je 2011. godine pod mentorstvom prof. dr Ljube Mandić i prof. dr Mihajla B. Spasića. Eksperimentalni deo doktorske teze radila je u okviru projekta: „Molekularni mehanizmi redoks signalinga u homeostazi, adaptaciji i patologiji“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, na odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Tokom postdiplomskih studija je kao COST (BM1005; *Gasotransmitters: from basic science to therapeutic applications*) STSM stipendista boravila je u laboratoriji dr Karola Ondriasa na Institutu za molekularnu fiziologiju i genetiku, Slovačke akademija nauka. Bila je i stipendista SAIA (Nacionalni program stipendija Slovačke) koja joj je omogućila nastavak istraživanja u istoj laboratoriji u Bratislavi. Zahvaljujući dosadašnjem radu i postignutim akademskim rezultatima, učestvovala je na letnjoj školi "Gasotransmitter Chemistry and Biology" (Kapri, Italija) organizovanoj za 15 najboljih evropskih doktoranata koji se interesuju za ovu oblast. Jedan deo disertacije uradila na Univerzitetu u Liverpulu, u grupi profesorke Wray, direktorom istraživačkog centra za prevremene porođaje u Liverpulu. Projekat je podržan od FEBS-a (The Federation of European Biochemical Societies) koji joj je obezbedio tromesečnu stipendiju (Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe).

Autor je i koautor sedam radova koji su štampani u međunarodnim časopisima, sedam saopštenja na međunarodnim skupovima koja su štampana u izvodu a učestvovala je i na osam međunarodnih konferencija.

Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije kao i Srpskog biološkog društva.

PRILOZI

Prilozi

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Ана Мијушковић _____
број индекса _____ БХ 17/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Механизми релаксантног ефекта натријум-сулфида на утерус пацова in vitro:

ефекторне врсте и циљне молекулске структуре

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

У Београду, 8. 9. 2015.

Потпис докторанда



Прилог 2.

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

Име и презиме аутора _____ Ана Мијушковић _____

Број индекса _____ БХ 17/2011 _____

Студијски програм _____ доктор биохемијских наука _____

Наслов рада Механизми релаксантног ефекта натријум-сулфида на утерус
пацова *in vitro*: ефекторне врсте и циљне молекулске структуре

Ментор : **Проф. Др Љуба Мандић,**
редовни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду

Проф. Др Михајло Б. Спасић,
научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша
Станковић“, Универзитет у Београду

Потписани/а _____ Ана Мијушковић _____

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

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

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

У Београду, _____ 8. 9. 2015. _____

Потпис докторанда


Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Механизми релаксантног ефекта натријум-сулфида на утерус

пацова in vitro: ефекторне врсте и циљне молекулске структуре

која је моје ауторско дело.

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

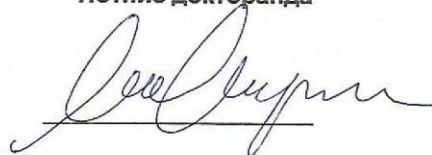
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

У Београду, 8. 9. 2015.

Потпис докторанда



PRILOZI

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

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

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

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

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

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

Прилог 4

Списак радова проистеклих из тезе:

Mijuskovic A, Orescanin-Dusic Z, Nikolic-Kokic A, Slavic M, Spasic MB, Blagojevic D (2015) Chloride channels mediate sodium sulphide-induced relaxation in rat uteri. *Br J Pharmacol* 172, 3671-3686. (IF= 4,842) (M21)

Mijuskovic A, Orescanin-Dusic Z, Nikolic-Kokic A, Slavic M, Spasic MB, Spasojevic I, Blagojevic D (2014) Comparison of the effects of methanethiol and sodium sulphide on uterine contractile activity. *Pharmacol Rep* 66, 373-379. (IF=1,928) (M23)