

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Mr Radmila B. Novaković

**Uticaj polifenola prirodnog porekla i
sintetskih otvarača kalijumovih kanala na
kontraktilnost izolovanog uterusa**

doktorska disertacija

BEOGRAD, 2014

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE**

Mr Radmila B. Novaković

**The effect of the polyphenols of natural origin
and the synthetic potassium channel openers
on contractility of the isolated uterus**

Doctoral Dissertation

BELGRADE, 2014

Doktorska disertacija urađena je na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Deo eksperimentalnog rada obavljen je na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta i u Laboratoriji za genetska ispitivanja, Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije.

Doktorska disertacija realizovana je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, TR 31020.

MENTOR:

Prof. dr Ljiljana Gojković-Bukarica, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

Akademik prof. dr Nebojša Radunović, dopisni član SANU, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Dragan Obradović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Milica Bajčetić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Nau. savetnik dr Melita Vidaković, naučni savetnik Instituta za Biološka Istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beograd

DATUM ODBRANE:_____

Iskreno se zahvaljujem:

Mom mentoru, prof. dr Ljiljani Gojković-Bukarici što je omogućila stvaranje ovog rada i učestvovala u njegovom oblikovanju, na razmeni ideja, na razumevanju i strpljenju, na dugogodišnjoj saradnji i vremenu koje smo provele u prijatnom druženju. Zahvaljujem se na pruženoj mogućnosti da studiram uticaj rezveratrola na uterus i za pruženu pomoći na tom putu.

Komentoru, akademiku Nebojši Radunoviću, što je podržavao ovo istraživanje omogućivši dostupnost vrlo specifičnog materijala koji je ovu studiju učinio jedinstvenom i kvalitetnijom. Zahvaljujem mu se na izuzetnom profesionalizmu, razumevanju i ljubaznosti.

Članovima komisije, nau. savetniku Meliti Vidaković, prof. dr Milici Bajčetić i prof. dr Draganu Obradoviću, na dragocenim savetima i podršci.

Prof. dr Jasmini Marković Lipkovki što je omogućila i M.Sc Sanji Ćirović što je sprovela deo istraživanja koji je doveo do izuzetnih zaključaka. Zahvaljujem im se na korisnim komentarima i sugestijama, na prijateljskoj saradnji i razumevanju.

M.Sc Bojani Ilić i dr Bojani Ćokić Beleslin, na izvođenju jednog dela eksperimenata, predusretljivosti, sugestijama, na vanrednoj kolegijalnosti, na prijateljskom odnosu. Članovima Laboratorije za genetska ispitivanja, Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, na ljubaznosti.

Mileni Zabunović, laboratorijskom tehničaru, za pomoć u eksperimentalnom radu, kao i za ukazano strpljenje i dugogodišnje prijateljsko razumevanje.

Prof. Helmut Heinle-u za pomoć koju je pružio tokom izrade ovog rada i saradnju.

Članovima Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju na kolegijalnosti.

Članovima Odeljenja humane reprodukcije, Klinike za genikologiju i akušerstvo, sestri Jovanki i Slavici na ljubaznosti i izdvojenom vremenu.

Mojoj dragocenoj porodici i prijateljicama, što su pomogli kada su mogli i što su bili uz mene kada nisu mogli da pomognu.

Radmila Novaković

*Mojoj porodici,
Jefimiji, Dimitriju, Tomislavu, Budimiru, Nadici, Ljiljani, Olgi, Ljubi,
posvećujem ovaj rad sa zahvalnošću i ljubavlju.*

SAŽETAK

Uticaj polifenola prirodnog porekla i sintetskih otvarača kalijumovih kanala na kontraktilnost izolovanog uterusa

Prirodni polifenoli su zastupljeni u velikom broju biljnih vrsta. Kao posebni izvori rezveratrola moglo bi se izdvojiti grožđe i vino, kao njegov produkt, a naringenina grejpfrut, njegov sok, hmelj i pivo.

Tokom poslednje decenije rezveratrol se našao u žiži naučne i šire javnosti kao supstanca koja usporava starenje, ima antikancerogena, antiinflamatorna, kardioprotektivna svojstva. Kao moguća mesta dejstva pokazan je veliki broj ćelijskih struktura, stoga je rezveratrol označen kao "jedan molekul - mnogo meta". Između ostalog, pokazano je da rezveratrol dovodi do relaksacije glatkih mišića mnogobrojnih krvnih sudova kao i glatkih mišića žučne kese. Kalijumovi kanali su direktno ili indirektno uključeni u mehanizam dejstva rezveratrola.

Za razliku od njega, naringenin, pripada manje proučavanoj grupi, flavonoidima. Njegov mehanizam inhibicije kontrakcija glatkih mišića uterusa još uvek nije proučen.

Pored velikog interesovanja za rezveratrol, njegov uticaj na kontraktilnost glatke muskulature uterusa nije izučavan. Stoga su ciljevi ove studije bili da ispitimo moguće inhibitorno dejstvo rezveratrola i naringenina na nekoliko eksperimentalnih modela negravidnog i gravidnog uterusa i da definišemo ulogu kalijumovih kanala u tim mehanizmima dejstva.

Nepoželjna kontraktilnost uterusa je uzrok poremećaja kao što su dismenoreja, kod negravidnog, a prevremeni porođaj, kod gravidnog uterusa. Do danas, ni jedan od ovih problema nije farmakološki rešen. Dismenoreja se uglavnom tretira nesteroidnim antiinflamatornim lekovima, koji nisu uspešni kod svih pacijenata i imaju izrazite neželjene efekte. Dodatno, prevremeni porođaj je uzrok morbiditeta novorođenčati u 50 % slučajeva. Malo je dokaza da lekovi koji se koriste za suzbijanje prevremenih kontrakcija zaista efikasni. Prevremeni porođaj je češći i ozbiljniji problem u grupi pacijenkinja iz programa *in vitro* oplodnje. Shodno tome, idealno sredstvo za prevenciju i lečenje neželjene

kontraktilnosti uterusa još uvek nije pronađen. Razvoj efikasnih i bezbednih agenata je važan istraživački cilj.

Dalje, imali smo za cilj da detektujemo proteine nekoliko podtipova K_{ATP} , BK_{Ca} i Kv kanala u glatko-mišićnom tkivu negravidnog uterusa pacova i gravidnog miometrijuma žena i definišemo njihovu ulogu u mehanizmu dejstva rezveratrola primenom selektivnih antagonista.

Studija je odobrena od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja i Komiteta za etička pitanja Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Životinje korišćene u eksperimentima su bile neparene ženke soja Wistar prosečne telesne mase oko 200 grama koje su držane pod standardnim uslovima, na sobnoj temperaturi uz uobičajenu smenu noći i dana i uz slobodan pristup hrani i vodi. Uzorci humanog miometriuma uzimani su nakon izvršenog porođaja operacijom kod porodilja kod kojih nije počeo porođaj, a bile su u trećem trimestru trudnoće. Demografski podaci porodilja bili su: prosečna starost 34,95 godina (raspon godina od 27 do 42), medijana perioda gestacije bila je 39 nedelja trudnoće (raspon od 37 do 40 nedelje trudnoće). Pacijentkinje (33) su bile iz programa vantelesne oplodnje (*in vitro* fertilizacija). Uzorci su plasirani u kupatila za izolovane organe i prećene su promene izometrijske tenzije mišića. Rezveratrol (1 - 100 μ M) i naringenin (1 μ M – 1 mM) su dodavani kumulativno u kupatilo za izolovane organe. Da bi testirali učešće K_{ATP} , BK_{Ca} Kv kanala u mehanizmu delovanja rezveratrola, selektivni blokatori K_{ATP} kanala, glibenklamid, BK_{Ca} kanala, iberiotoksin, neselectivni blokator, tetraetilamonijum (TEA), neselectivni blokator Kv kanala, 4- aminopiridin (4-AP), su testirani. Nakon eksperimenata konstruisane su koncentracijski-zavisne krive. Radi utvrđivanja kalijum nezavisnog mehanizma delovanja rezveratrola dizajnirani su eksperimenti sa " K^+ - rich, Ca^{2+} free" rastvorom. Testirani su i efekti sintetskih otvarača K^+ kanala, pinacidil i NS1619 i poređeni sa efektima rezveratrola.

Imunohistohemijskim bojenjem i *western blot* analizom ekspresije kanalskih proteina specifičnim antitelima Anti-Kir6.1, Anti-Kir6.2, Anti-Kv2.1, Anti-Kv4.2, Anti- $K_{Ca}1.1$ ispitivano je prisustvo Kir6.1 i Kir6.2 subjedinice K_{ATP} kanala, α - subjedinice Kv2.1 and Kv4.2 podtipa Kv kanala i $K_{Ca}1.1$ subjedinice BK_{Ca} kanala.

Rezultati su pokazali da rezveratrol ispoljava snažni inhibitorni efekat na spontane i indukovane kontrakcije negravidnog uterusa pacova. Na osnovu ostvarenog antagonizma

sa primenjenim blokatorima kalijumovih kanala, moglo bi se zaključiti da inhibitorni odgovor rezveratrola kod spontanih i faznih kontrakcija indukovanih oksitocinom uključuje različite kalijumove kanale u tkivu miometrijuma. Ali kada se primenjuje u visokim koncentracijama, rezveratrol ima dodatne mehanizme delovanja nezavisne od kalijumovih kanala. Efekat rezveratrola na tonične kontrakcije izazvane visokom koncentracijom oksitocina je nezavisan od kalijumovih kanala. Naringenin je koncentracijski zavisno inhibirao kontrakcije animalnog i humanog miometrijuma.

Način indukcije kontrakcije miometrijuma je uticao različito na efekte rezveratrola. Rezveratrol ispoljava i snažni inhibitorni efekat na kontraktilnost humanog IVF gravidnog miometrijuma. Na osnovu afiniteta blokatora kalijumovih kanala, čini se da rezveratrol deluje na oksitocinom izazvane kontrakcije modulišući kalijumove kanale, ali i da ima dodatni kalijum - nezavisni mehanizam/e dejstva, jer efekti velikih koncentracija nisu antagonizovani u celosti. Ovom studijom je po prvi put pokazan odnos ekspresije proteina K_{ATP} , BK_{Ca} , K_v kanala u tkivu glatke muskulature negravidnog uterusa pacova i u miometrijskim ćelijama gravidne materice žene iz IVF programa i pokazano prisustvo $K_v2.1$ i $K_{Ca}1.1$ podtipa u negravidnom i $K_v4.2$ u gravidnom miometrijumu.

Rezveratrol je bio statistički znatno jači od naringenina kod svih modela kontrakcija. Srednje efektivne koncentracije naringenina su bile slične kod svih modela, što nije bio slučaj sa rezveratrolom.

Poređenjem jačine i efikasnosti rezveratrola sa sintetičkim otvaračima kalijumovih kanala, pokazano je da rezveratrol nema profil « klasičnog » otvarača kalijumovih kanala.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu prihvatljivo je zaključiti da rezveratrol i naringenin imaju veliki potencijal da se koriste u prevenciji i tretmanu patološke i nepoželjne kontraktilnosti uterusa kao u slučaju dismenoreje i prevremenih porođaja.

Ključne reči: uterus, miometrijum, kontrakcije, kalijumovi kanali, rezveratrol, naringenin, imunohistohemijsko bojenje, western blot.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Farmakologija

UDK:

ABSTRACT

The effect of polyphenols of natural origin and synthetic potassium channel openers on contractility of the isolated uterus

Natural polyphenols are present in the large number of plant species. As special sources of resveratrol are grapes and wine, as well as its products, but also naringenin grapefruit sort, its juice, hop and beer.

During the last decade, resveratrol was in the focus of scientific and wider public as a substance that slows aging, has anti-cancer, anti-inflammatory, cardio-protective properties. As a possible site of action is shown by a large number of cellular structures, thus resveratrol is labeled as "one molecule - many targets". Among other things, it has been shown that resveratrol induces relaxation of smooth muscle of numerous blood vessels and smooth muscle of the gall bladder. Potassium channels are directly or indirectly involved in the mechanism of action of resveratrol.

Unlike resveratrol, naringenin belongs to the group being studied less, flavonoids. Its mechanism of inhibition of the contraction of uterine smooth muscle has not been studied. In addition to the great interest in resveratrol, its effects on the contractility of smooth muscles of the uterus have not been studied. Therefore, the aims of this study were to investigate the possible inhibitory effect of resveratrol and naringenin in several experimental models of pregnant and non pregnant uterus and to define the role of potassium channels in these mechanisms of action.

Irregular contractility of the uterus is the cause of the disorder, such as dysmenorrhoea in the non-gravid uterus, or premature labor in the pregnant uterus. To date, none of these problems is pharmacologically resolved. Dysmenorrhea is generally treated by non-steroidal anti-inflammatory drugs, which have not been successful for all patients, and have significant side effects. In addition, premature birth is the cause of newborn morbidity in 50% of cases. There is little evidence that the drugs used to combat premature contractions are really effective. Preterm birth is a common and serious problem in the female patients from *in vitro* fertilization program. Accordingly, an ideal tool for the prevention and treatment of unwanted uterine contractility has not been found yet. The development of effective and safe agents is an important research goal.

Furthermore, we aimed to detect proteins several subtypes of K_{ATP}, BK_{Ca} and K_v channels in smooth muscle tissue of non pregnant rat uterus and pregnant women myometrium, and define their role in the mechanism of action of resveratrol by using selective antagonists.

The study was approved by the Ethics Committee to protect the welfare of experimental animals and Ethics Committee of the Medical Faculty, University of Belgrade. The animals used in the experiments were not mated female Wistar rats, with a mean body weight about 200 grams, which were kept under standard conditions at a room temperature, under regular day and night shift and with free access to food and water. Samples of human miometriuma were taken after completion of childbirth operation in the mothers whose parturition has not started and were in the last third months of pregnancy. Demographics of mothers: average age of 34.95 years (age range 27 to 42), median duration of gestation was 39 weeks of pregnancy (range from 37 to 40 weeks of pregnancy). Patients (33) were participants of the reproduction *in vitro* fertilization program. The samples were placed in the bath for isolated organs and the changes of isometric muscle tension were followed. Resveratrol (1 μ M - 100 μ M) and naringenin (1 μ M - 1 mM) were added cumulatively to the bath for isolated organs. To test the involvement K_{ATP}, BK_{Ca} channels K_v between the activity of resveratrol, the selective blockers K_{ATP} channel, glibenclamide, BK_{Ca} channels, iberiotoxin, the non selective blocker, tetraethyl ammonium (TEA), the non selective blocker of K_v channels, 4- aminopyridine (4-AP) have been tested. After the experiments, the concentration-dependent curves were constructed. In the determination of potassium independent mechanism of action of resveratrol, experiments with "K⁺ - rich, Ca²⁺ free" solution were designed. The effects of synthetic openers of K channels, pinacidil and NS16 19 were tested and compared with the effects of resveratrol.

Immunohistochemical staining and western blot analysis of expression of channel protein specific antibodies Anti-Kir6.1, Kir6.2 Anti-Anti-Kv2.1, Kv4.2 Anti-Anti-KCa1.1 were used to investigate the presence of Kir6.1 and Kir6.2 K_{ATP} channel subunits, α - subunit Kv2.1 and Kv4.2 subtype K_v channels and KCa1.1 subunits of BK_{Ca} channels.

The results show that resveratrol exerts potent inhibitory effect on the spontaneous and induced contractions of non-pregnant rat uterus. Based on actual antagonism with the applied potassium channel blocker, it could be concluded that the inhibitory response of resveratrol in spontaneous and oxytocin-induced contraction phase involves different potassium channels in myometrial tissue. But when applied in high concentrations, resveratrol has additional

mechanisms of action independent of potassium channels. Effect of resveratrol on tonic contraction induced by high concentration of oxytocin is independent of potassium channels. Naringenin, concentration dependent, inhibited contraction of animal and human myometrium. Method of inducing contractions of myometrial affected differently to the effects of resveratrol. Resveratrol exerts a strong inhibitory effect on the contractility of human IVF pregnant myometrium. Based on the affinity of potassium channel blocker, it appears that resveratrol acts on oxytocin-induced contraction by modulating potassium channels, but has additional potassium - independent mechanism / s of action because the effects of high concentrations were not antagonized entirely. This study is the first to show the relation of protein expression K_{ATP} , BKCa, Kv channels in tissues of smooth musculature of non pregnant rat uterus and in the gravid uterine myometrial cells of women from IVF program, and to demonstrate the presence of Kv2.1 and KCa1.1 subtypes in non-pregnant and Kv4.2 in pregnant myometrium. Resveratrol showed statistically significantly greater potency of naringenin on all contraction models. Mean effective concentrations of naringenin were similar for all models, which was not the case by the resveratrol.

By comparing the potency of resveratrol with synthetic opener of potassium channels, it is shown that resveratrol does not have the profile of "classic" potassium channels opener.

Based on the results presented in this work, it is acceptable to conclude that resveratrol and naringenin have great potential to be used in the prevention and treatment of abnormal and undesirable uterine contractility, as in the case of dysmenorrhea and premature births.

Keywords: uterus, myometrium, contractions, potassium channels, resveratrol, naringenin, immunohistochemical staining, western blot.

Scientific field: Medicine

Major in: Pharmacology

UDK:

Skraćenice:

[Ca²⁺]_i, - unutarćelijska koncentracija jona Ca²⁺

4-AP - 4-aminopirimidin

AP - akcioni potencijal

ATP- adenzin-trifosfat

BK_{Ca} - kalcijum-zavisni kalijumovi kanali koji brzo sprovode jone

BKK- blokatori kalijumovih kanala

Ca kanali – kalcijumski kanali

CaCl₂- kalcijum-hlorid

COX - ciklooksigenaza

DAG - diacilglicerol

DMSO - dimetilsulfoksid

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

EC₅₀ - srednja efektivna koncentracija

FOK- fazne oksitocinom indukovane kontrakcije

GDP - gvanozin difosfat

GLB - glibenklamid

GTP - gvanozin trifosfat

i.j. - internacionalna jedinica

Ibtx - iberiotoksin

IK_{Ca}- kalcijum-zavisni kalijumovi kanali koji srednjom brzinom sprovode

I_{kr} - brza komponenta kasno-ispravljačke kalijumove struje

I_{ks} - kasno-ispravljačke kalijumove struje

IL - interleukin

IP₃ - inozitol-1,4,5-trifosfat

IVF - *in vitro* fertilisation – vantelesna oplodnja

K kanali - kalijumovi kanali

K⁺ joni - joni kalijuma

K_{ATP} kanali - ATP senzitivni kalijumovi kanali

K_{Ca} - kalcijum-zavisni kalijumovi kanali

KCl – kalijum-hlorid

Kir kanali - ulazno ispravljajući kalijumovi kanali

Kv kanali - voltažno-zavisni kalijumovi kanali

ml - mililitar

MLC kinaza - kinaza miozinskog lakog lanca

NSAIL – nesteroidni antiinflamatorni lekovi

OKK- otvarač/i kalijumovih kanala

OST - *oxytocin sensitivity* test

PGE_{2α} - prostaglandin E₂

PI - fosfatidilinozitol

ROS - *reactive oxygen species*, reaktivni kiseonični radikali

SIRT1 - histonska sirtuin deacetilaza 1

SK_{Ca} - kalcijum-zavisni kalijumski kanali koji sporo sprovode jone

SRK - spontane ritmičke kontrakcije

SUR - sulfonil-urea receptorska subjedinica

TEA – tetraetilamonijum hlorid

TNF α – factor nekroze tumora-alfa

TOK- tonične oksitocinom indukovane kontrakcije

VGCC - voltažno-zavisni kalcijumski kanali

SADRŽAJ

I UVOD	1
1. UTERUS	1
1.1 Anatomija uterusa	1
1.2 Fiziologija aktivnosti uterusa	3
1.3 Glatko-mišićna ćelija uterusa	4
1.4 Kontrakcije miometrijuma	5
1.4.1. Fazne i tonične kontrakcije indukovane oksitocinom	6
<i>Oksitocinski receptori</i>	6
1.5. Kalijumovi kanali u miometrijumu	8
1.5.1. Kanali sa šest transmembranskih domena - voltažno-zavisni K kanali	11
<i>Ca zavisni K kanali</i>	12
1.5.2. Kanali sa dva transmembranska domena – ulazno-ispravljački K kanali	13
<i>ATP- zavisni K kanali</i>	14
1.5.3. K kanali sa četiri transmembranska domena i dve pore	15
1.6. Pomoćne subjedinice	15
1.7. Modulatori K kanala	16
2. PROBLEM NEŽELJNE, ABERANTNE KONTRAKTILNOSTI UTERUSA	19
2.1. Dismenoreja	19
2.2. Prevrmeni porođaj	20
2.3. Vantelesna oplodnja - <i>in vitro</i> fertilizacija – IVF	22
3. POLIFENOLI PRIRODNOG POREKLA	24
3.1. Flavonoidi	25
3.1.1. Flavonoidi kao inhibitori enzima	26
<i>Hidrolaze</i>	26
<i>Oksidoreduktaze</i>	27
<i>Kinaze</i>	27
<i>Izomeraze</i>	27
3.1.2. Hormonsko dejstvo polifenola	27
3.2. NARINGENIN	29

3.3. REZVERATROL	31
<i>Rezveratrol i jonski kanali</i>	36
II CILJEVI ISTRAŽIVANJA	40
III MATERIJAL I METODE	42
1. IZOLOVANJE I PRIPREMA TKIVA ZA <i>in vitro</i> EKSPERIMENTE	42
1.1. Uzorci životinjskog uterusa	42
1.2. Uzorci humanog uterusa	43
1.3. Eksperimentalna procedura	44
1.4. Supstance i rastvori	45
3. IDENTIFIKACIJA K KANALA SPECIFIČNIM ANTITELIMA U GLATKO- MIŠIĆNOM TKIVU UTERUSA	46
3.1. <i>Western blot</i>	46
3.2. Imunohistohemijsko bojenje	47
4. OBRADA PODATAKA I STATISTIČKA ANALIZA	48
IV REZULTATI	49
1. EFEKTI REZVERATROLA NA KONTRAKCIJE IZOLOVANOG UTERUSA PACOVA	49
1.1. Efekti rezveratrola na SRK i kontrakcije indukovane oksitocinom kod izolovanog uterusa pacova	49
1.2. Uticaj različitih BKK na inhibiciju kontrakcija prouzrokovanu rezveratrolom	52
1.2.1. Spontane ritmičke kontrakcije – SRK	53
1.2.2. Fazne kontrakcije indukovane oksitocinom (0.02 nM) – FOK	54
1.2.3. Tonične kontrakcije indukovane oksitocinom (20 nM) – TOK	55
1.3. Efekti OKK na tonične oksitocinom indukovane kontrakcije	56
1.4. Efekti rezveratrola na kontrakcije indukovane oksitocinom u <i>K⁺-rich, Ca²⁺-free</i> rastvoru	57
1.5. Identifikacija subjedinica K _{ATP} , K _v i BK _{Ca} kanala <i>western blot</i> analizom u glatko-mišićnom tkivu uterusa pacova	60

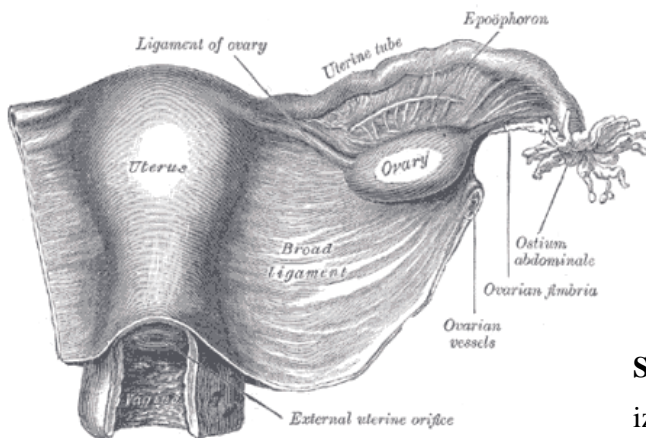
2. EFEKTI REZVERATROLA NA KONTRAKCIJE INDUKOVANE OKSITOCINOM KOD IZOLOVANOG HUMANOG MIOMETRIJUMA	61
2.1. Efekti rezveratrola na kontrakcije izazvane oksitocinom	61
2.2. Efekti pinacidila na kontrakcije izazvane oksitocinom	62
2.3. Identifikacija podjedinica K_{ATP} , K_V i BK_{Ca} kanala <i>western blot</i> analizom i imunohistohemijskim bojenjem u glatko-mišićnom tkivu humanog uterusa	63
3. EFEKTI NARINGENINA NA KONTRAKCIJE IZOLOVANOG UTERUSA PACOVA I ČOVEKA	66
3.1. Efekti naringenina na SRK i kontrakcije indukovane oksitocinom kod izolovanog uterusa pacova	66
3.2. Efekti naringenina na kontrakcije indukovane oksitocinom kod izolovanog humanog gravidnog miometrijuma	67
V DISKUSIJA	69
AKTUELNOST TEME	69
INHBITORNI EFEKTI REZVERATROLA NA NEGRAVIDNI UTERUS PACOVA	70
INHBITORNI EFEKTI REZVERATROLA NA GRAVIDNI HUMANI UTERUS	77
INHBITORNI EFEKTI NARINGENINA NA KONTRAKTILNOST NEGRAVIDNOG UTERUSA PACOVA I HUMANOG GRAVIDNOG UTERUSA	82
VI ZAKLJUČAK	84
VII LITERATURA	86
VIII DODATAK	105
LISTA PUBLIKOVANIH RADOVA IZ DOKTORATA	105
LISTA TABELA	108
LISTA ILUSTRACIJA	109
BIOGRAFIJA AUTORA	113

I UVOD

1. UTERUS

1.1. Anatomija uterusa

Materica (lat. *uterus*) spada u reproduktivne organe ženskog pola životinja i ljudi. Uloga materice je prihvatanje, rast i razvoj ploda tokom graviditeta. Razlike među vrstama ogledaju se i u anatomiji uterusa: vrste kao što su pacov, zec, svinja su *polytocous* vrste, tj. imaju dvorogi uterus gde su oba roga jasno odvojena i spojena samo u delu iznad grlića formirajući organ oblika *Y* slova. Uterus *monotocous* vrsta je jednostavnije strukture, gde su rogovi, ako postoje nerazvijeni i najveći deo organa čini telo uterusa, kao što je slučaj kod ljudi. Humani uterus je smešten duboko u pelvičnoj šupljini, dorzalno od mokraćnog mehura i ventralno od završnog dela rektuma. Pre reprodukcije uterus je kruškolikog oblika antero-posteriorno spljošten, vrhom usmeren naniže i u nazad. Njegov gornji kraj je „prikačen“ širokim, okruglim ligamentima, dok je donji deo smešten u fibrilnom tkivu karlice.



Slika 1. Anatomski prikaz uterusa (preuzeto iz Lewis Gray's Anatomy 20th ed, 1918)

Kod ljudi uterus se anatomski sastoji od dva dela: tela (*corpus*) i grlića (*cerviks*) (Aschoff, 1905). Negravidni korpus uterusa je dužine oko 5.5 cm, a cerviks oko 3.5 cm. Gornji deo cerviksa (*isthmus*) je dužine oko 0,5 - 1 cm i pretežno je građen od glatkih mišića. Najvećim delom telo materice je građeno od glatkih mišića (68.8 %) i vezivnog tkiva (31,2 %, Cretius, 1959). Glatka mišićna vlakna obavijena su kolakoneksinom, strukturom koja prenosi silu kontraktilnih elemenata. Mišićna vlakna oblikuju *Geortilerove citoskelete* tako što mišićni snopovi polaze iz oba roga uterusa, kaudalno, stvarajući spirale koje završavaju u cerviksu. Histološki posmatrano, uterus svih sisara sastoji se od tri sloja: unutrašnjeg - *endometrijuma* smeštenog uz lumen, središnjeg, glatko-mišićnog sloja - *miometrijuma* i spoljašnjeg - *perimetrijuma*. Miometrijum ljudi građen je od longitudinalnog i cirkularnog sloja mišića koji su međusobno isprepletani. Mišićna vlakna koja se završavaju u području *istmusa* tj. gornje trećine cerviksa čine fibromuskularnu strukturu koja stvara tkz. cervikalni sfinkter (Hughesdon, 1958). To su završeci spiralnih, odnosno helikoidalnih, vlakana koja polaze iz oba tubarna roga korpusa i koso, semicirkularno i cirkularno završavaju. Na taj je način razumljiv trojni descendenti gradijent koji su ustanovili Alvarez i Caldeyro-Barcia: kontrakcije miometrijuma javljaju se najpre na korpusu a najkasnije na cerviksu, jačina i trajanje kontrakcija slabi u istom smeru (Alvarez i Caldeyro-Barcia, 1954). Tokom graviditeta postoji funkcionalna povezanost između ova dva dela - korpus uterusa miruje i relaksiran je, dok je cerviks kontrahovan. U porođaju se ta stanja promene u relativno kratkom vremenu: korpus

počinje da se snažno kontrahuje, a cerviks se reaksira i širi što omogućava ekspulziju deteta.

Odstupanje od ovih fizioloških funkcija dovodi do komplikacija tokom graviditeta kao što su pobačaj ili prevremeni porođaj kada se radi o prevremenim kontrakcijama, ili do prenošenja kod izostalih trudova ili zastoja porođaja zbog preslabih kontrakcija. Malfunkcija cerviksa u obliku insuficijencije može izazvati pobačaj ili prevremeni porođaj, a u obliku spazmatičnog cerviksa otežava se ili u potpunosti onemogućuje porođaj vaginalnim putem.

Uterus, kao organ ima mogućnost izuzetnih promena. Osim brzih promena iz stanja mirovanja u stanje izuzetne kontraktilnosti, uterus se nakon porođaja menja svoju veličinu u relativno kratkom vremenskom periodu. Tokom trudnoće, ukupna masa mišića u miometrijumu povećava se oko deset puta, manjim delom zbog stvaranja novih mišićnih ćelija iz mioblasta, a većim delom rastom i rastezanjem postojećih ćelija. Težina uterusa tokom graviditeta se povećava oko 20 puta (od 50 na 1000 g) a volumen oko 1000 puta, od 5 ml na 5000 ml. Podsticaj za rast miofibrila u prvom redu, je rastezanje maternice sadržajem (fetus i plodova voda) ali i aktivnom hipertrofijom i hiperplazijom. Takođe, rast ploda prati i pasivno-plastična ekspanzija veziva i distenzija mišića. Ovakve promene mogu biti inicirane kako mehanički tako i hormonski (Garfield i sar., 1977).

Razumevanje aktivnosti uterusa moguće je samo uz poznavanje fizioloških događaja koji su vrlo složeni i nedovoljno ispitani. Histološka, biohemijska i molekularna ćelijska saznanja koja do sada imamo govore da je kontraktilnost uterusa izuzetno skladno orkestrirana koordinacija velikog broja činilaca: hormona, enzima, jona, itd.

1.2. Fiziologija aktivnosti uterusa

Fiziološke osobine glatko-mišićnog dela uterusa tj. miometriuma su:

1. kontrakcija – povremeno i privremeno skraćivanje glatko-mišićnih vlakana (na pr. tokom trudova)
2. retrakcija - trajno skraćenje vlakana (na taj način nestaje grlić i proširuje se; nakon porođaja se tim mehanizmom smanjuje veličina uterusa)

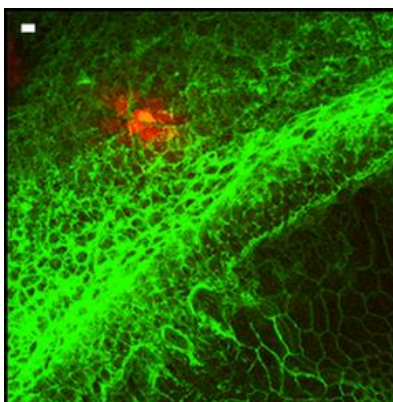
3. ritmičnost, odnosno SRK, koje su rezultat širenja impulsa od ćelije do ćelije, *pacemaker* aktivnost koja se postiže na više načina (ovo je naročito izraženo tokom poslednjeg meseca graviditeta kada SRK postaju sve jače i koordinisanije, zbog povećanog lučenja oksitocina i povećanja broja njegovih receptora na membranama ćelija miometrijuma).

1.3. Glatko-mišićna ćelija uterusa

Mišićna ćelija ili *miofibrila* je vretenastog oblika i osnova je strukture uterusa. Veličine je od 0.5 -1.0 μm kod negravidnog, do 100-300 μm kod gravidnog uterusa. Pojedinačne miofibrile uklopljene su u kolageno tkivo i dok ćelije miruju, međusobno nisu povezane. Kada dolazi do kontrakcije materice, miofibrile se povezuju međusobno kroz pukotine u kolagenom tkivu spojevima koji se nazivaju *gap junction* (pukotinaste veze). Ovi spojevi se umnožavaju uoči i za vreme porođaja, kada raste miometrijska kontraktilnost i nestaju nakon porođaja, dok se jedva mogu naći u ranoj trudnoći (Schneppenheim i sar., 1958). U trenutku nastajanja trudova ove veze postaju veoma važne, čak se može reći da su one bit mehanizma kontrakcije uterusa kako su to još 1982. godine utvrdili Huszar i Roberts (1982). Membrana miofibrile debljine je 8-10 nm i složene je građe. Broj receptora koji su smešteni u membrani je promenljiv i više faktora utiče na njihovu brojnost kao što je prethodno delovanje hormona ili antagonista. Najnoviji radovi govore da i broj i funkcija jonskih kanala zavisi od stanja, stadijuma graviditeta, starosti, uticaja hormona, da li je graviditet sa jednim fetusom ili više itd. (Song i sar., 1999, Knock i sar., 2001, Holdiman i sar., 2002, Lovasz i sar., 2011, Du i sar., 2013, Turton i sar., 2013).

Struktura koja omogućava koordinisane kontrakcije je *gap junction*. Prvi su te veze opisali Dewey i Barr 1962. godine i nazvali ih *nexus*. Takve proteinske veze između susednih mišićnih ćelija, građene od *koneksina*, povezuju citoplazme ćelija i omogućuju prolaz jona i metabolita kroz celu matericu. Razlikuju se 4 vrste takvih spojeva: jednostavno priljublivanje, intermedijarni spoj, dezmosom i pukotinski spoj (*gap junction*). Pukotinska veza izgleda poput nastavka protoplazme između ćelija (slika 2). Elektronskim mikroskopom pokazano je da se zapravo radi o pet do osam linearnih

struktura međusobno odvojenih prostorom prosečne širine 2 nm. To su agregacije proteina koje formiraju pore između dve susedne ćelije. Pore ili kanali u proteinima su električne veze za protok jona i metabolita između ćelija (Garfield i i sar., 1987). Pri pojavi većeg broja koneksiona, miometrijum funkcioniše kao jedinstvena celina (*funkcionalni sincicijum*) u kojem se nadražaj širi miogeno brzinom 1-3 cm/s. Električna provodljivost miometrijuma je tada visoka, a električni otpor tkiva je nizak.



Slika 2. Mikroskopski prikaz pukotinastih spojeva između ćelija (preuzeto sa: www.en.wikipedia.org/wiki)

1.4. Kontrakcije miometrijuma

Miometrijska kontrakcija proizvod je mnogobrojnih fizioloških procesa, koje orkestrira promena uterusne ekscitabilnosti kroz modulaciju jonskih kanala. Na osnovu načina na koji se kontrakcije odvijaju mogu se zapaziti *fazne* koje odlikuje brza kontrakcija i brza relaksacija i *tonične* kontrakcije koje su sporije i produžene i ne prati ih relaksacija. Fazne kontrakcije se mogu pobuditi na više načina: električnom stimulacijom, dejstvom hormona, dejstvom neurotransmitera ili kao rezultat spontanog ritmičkog generisanja iz samog mišićnog vlakna. Tonične kontrakcije u samom nastajanju su slične faznim, ali umesto rapidne repolarizacije membrane glatko – mišićne ćelije, ona se odlaže na duži vremenski period. Kontrakcije uterusa su po prirodi fazne, mada se mogu javiti i tonične, koje su nepoželjne. Eksperimenti na animalnom uterusu pokazuju da prolongirane, tonične kontrakcije mogu dovesti do smrti fetusa. One dovode do zatvaranja krvnih sudova u uterusu (Larcombe-McDouall i sar., 1999) i smanjenje protoka krvi kroz uterus, normalno,

dovodi i do smanjenja dotoka krvi i oksigenacije tkiva fetusa. Ti periodi smanjenja protoka krvi takođe uzrokuju i promene lokalnih metabolita kao što su ATP, H⁺, što može dodatno uticati na kontraktilnost uterusa (Harrison i sar., 1995).

Tonične kontrakcije imaju patološki značaj i za negravidni uterus. Mnogi nalazi ukazuju na to da su one odgovorne i za *dismenoreju* koja se manifestuje jakim bolovima, mučninom, povraćanjem, dijarejom, glavoboljom zbog prekomerne uterusne aktivnosti tokom menstruacije. Smatra se da je dismenoreja posledica kombinacije smanjenog protoka krvi i nedovoljne oksigenacije tkiva, kao i hiperkontraktilnosti glatke muskulature uterusa (Kostrzewska i sar., 1996). Od ovog poremećaja danas pati veliki broj žena i on je još uvek nedovoljno fiziološki razjašnjen i farmakološki rešen. Za njegovo lečenje uglavnom se koriste inhibitori ciklooksigenaze ali oni nisu ni dovoljno selektivni ni uspešni kod svih pacijentkinja (Rees, 1988).

Fazne, regularne kontrakcije esencijalne su za normalno funkcionisanje uterusa. Kod faznih kontrakcija frekvencija, trajanje i intenzitet variraju ali je suštinsko nastupanje perioda relaksacije posle svake kontrakcije.

1.4.1. Fazne i tonične kontrakcije indukovane oksitocinom

Oksitocinski receptori

Oksitocin se veže za membranski tip receptora koji se sastoji od ekstracelularnog, intramembranarnog i intracelularnog dela i poseduje sedam transmembranskih domena. Posle aktivacije receptora, signal se dalje prenosi putem specifičnih *G proteina* (Kawamata i sar., 2007). U humanom miometriju oni su u paru i označeni su kao G_q i G₁₁. α subjedinica heterotrimerskog G proteina hidrolizira gvanozin trifofat (GTP) u gvanozin difosfat (GDP) i na taj način oslobada $\beta\gamma$ podjedinicu, koja zatim stimuliše fosfolipazu C. Fosfolipaza C deli fosfatidilinozitol (PI) u diacilglicerol (DAG) i inozitol-1,4,5-trifosfat (IP₃). DAG aktivira protein kinazu C koja zavisi od Ca²⁺. Krajnji rezultat je povećana koncentracija unutarćelijskog Ca²⁺, uz pomoć IP₃, iz endoplazmatskog retikuluma i iz ekstracelularnog prostora, stvaranje Ca-kalmodulin kompleksa koji stimuliše MLC-kinazu

i nastajanje kontrakcije mišićne ćelije miometrijuma. Takođe, dovodi do aktivacije voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala. Ovo, dalje, uzrokuje aktivaciju kinaze koja fosforiliše laki lanac miozina, što opet vodi kontrakciji (Buxton, 2004). Pri kraju trudnoće u uterusu raste broj receptora za oksitocin 100-200 puta, što se odražava i na povećanu osetljivost prema oksitocinu. Estrogen i neki citokini podstiču ekspresiju oksitocinskih receptora, dok je delovanje progesterona na broj oksitocinskih receptora obrnuto (Bosmmar, 1998). Količina oksitocinskih receptora najveća je u fundusu, zatim u korpusu dok se najmanji broj oksitocinskih receptora nalazi u cerviksu. Stvaranje oksitocinskih receptora stimulirano je i samim oksitocinom (autostimulacija) koji se sintetiše lokalno u decidui.

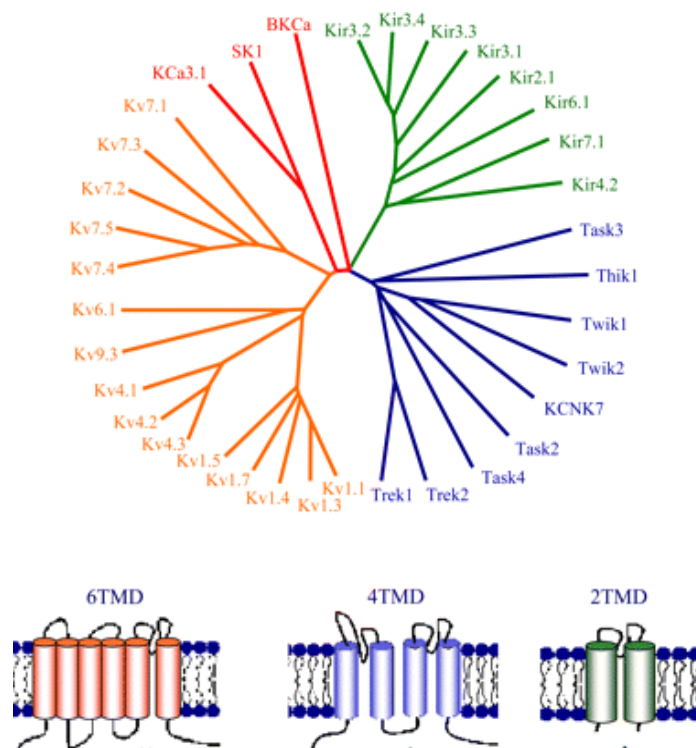
Već je pomenuto da vezivanje oksitocina aktivira receptor koji kasnije indukuje intracelularne signalne puteve (Holda i sar., 1996).

Međutim, aktivacija oksitocinskih receptora, takođe dovodi i do aktivacije L-tipa voltažno-zavisnih Ca kanala, što vodi depolarizaciji membrane i povećanju ulaska ekstracelularnog Ca^{2+} u ćeliju miometrijuma i promoviše kontrakcije glatkih mišića (Sanborn i sar., 2005). Uočeno je da niža koncentracija oksitocina, $< 10 \text{ nM}$, indukuje fazne kontrakcije, tako što aktivira unutarćelijske signalne puteve (IP_3 , oslobađanje jona Ca^{2+} iz sarkoplazmatskog retikuluma) i aktivira L-tip voltažno-zavisnih Ca kanala, što dalje povećava influks Ca^{2+} u ćeliju. Ovaj tip kontrakcija je neodrživ u odsustvu vanćelijskog Ca^{2+} i zavisi od njegove koncentracije (Novakovic i sar., 2013). Oksitocin u koncentraciji većoj od 10 nM indukuje toničnu kontrakciju i u odsustvu vanćelijskog Ca^{2+} , što ukazuje da ova dva tipa kontrakcija uključuju različite ćelijske puteve za nastanak kontrakcije. Tahara i saradnici (2002) su pokazali da kaskada RhoA/Rho kinaza je odgovorana za Ca^{2+} - nezavisni efekat oksitocina na kontrakcije miometrijuma. Razlike u efektima nižih ili viših koncentracija oksitocina mogu biti odraz direktne stimulacije L-tipa voltažno-zavisnih Ca kanala i povećanje unutarćelijskog Ca^{2+} ili direktno povećanje osetljivosti kontraktilnih elemenata prema Ca^{2+} (McKillen i sar., 1999).

1.5. Kalijumovi kanali u miometriju

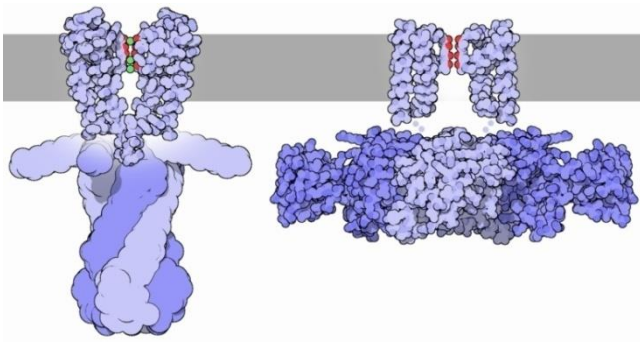
Promene u ekspresiji ili aktivnosti K kanala mogu dovesti do neadekvatne repolarizacije koja može prouzrokovati aberantnu aktivnost uterusa. Tako, promene K kanala mogu doprineti određenim patofiziološkim stanjima kao što je prevremeni porođaj, spontani pobačaj ili dismenoreja. Brojne studije su pokazale da otvaranje, aktivacija, različitih vrsta K kanala dovodi do relaksacije, odnosno inhibicije kontrakcija i ne gravidnog i gravidnog uterusa (Khan i sar., 1998 , Longo i sar., 2003, Morrison i sar., 1998, Novakovic i sar., 2007). Ove činjenice govore o značaju ovih kanala kao moguće mesto za delovanje lekova koji bi trebalo da spreče ili zaustave neželjenu kontraktilnost uterusa. Stoga je od izuzetnog značaja proučavanje njihove funkcije i ekspresije njihovih proteina jer je uočeno da zavise od različitih faktora, stadijuma graviditeta, uticaja hormona, starosti itd. (Lovasz i sar., 2011, Du i sar., 2013, Song i sar., 1999, Knock i sar., 2001).

K kanali su najraznovrsnija vrsta kanala i svaki (pod)tip ima posebnu fiziološku ulogu. Dugi niz godina struktura i tipovi K kanala bili su nepoznati zbog nedostataka specifičnih liganda za njihovu aktivaciju ili blokiranje. Progresivni pomak u istraživanju ovih struktura nastao je po otkriću životinjskih toksina koji su visoko specifični za pojedine tipove, ali i sa uvođenjem elektrofizioloških metoda („voltage clamp i „patch clamp“) koje su omogućile ispitivanja pojedinačnih kanala. Poslednjih godina detektovano je mnoštvo gena koji učestvuju u kodiranju ovih kanala, oni su klonirani i određene su im biofizičke osobine, ali to nije dovelo i do potpunog razjašnjenja njihove funkcije. Pokazano je da različite tipove K kanala čine više od 100 različitih proteinskih subjedinica koje su tkivno specifične (Coetzee i sar., 1999). Razumevanje uloge K kanala i detektovanje njihovih subjedinica/proteina u glatkih mišića materice je važno, uporedo sa povezivanjem disfunkcije ovih kanala sa određenim bolestima i poremećajima.



Slika 3. A Prikaz diverziteta K kanala: zeleno - K kanali sa dva transmembranska domena; plavo – dvoporni, K kanali sa četiri transmembranska domena; narandžasto – K kanali sa šest transmembranskih domena; crveno - Ca²⁺ zavisni K kanali. **B** Šematski prikaz topologije transmembranskih domena. (Preuzeto: <http://www.phylogeny.fr> website, “treeviewers,” Drawtree).

K kanali su membranske polimerne strukture na kojima je moguće razlikovati ekstracelularni i intracelularni otvor kao i transmembranski deo kanala u kojem je smešten mehanizam za otvaranje/zatvaranje („gating“ – srp. vratničenje). Ovaj mehanizam služi kao prekidač između otvorene i zatvorene konformacije kanala. Unutar kanala nalaze se naelektrisane regije kanalskih proteina, nazvane voltažni senzor i on određuju da li se „kapije“ otvaraju ili zatvaraju (slika 4). Kanal počinje kao tunel a onda se oko središnjeg dela membrane širi. Dužina provodne pore je oko 4.5 nm i završava se negativno naelektrisanim područjem koje promenom električnog naboja deluje kao filter za raspoznavanje različitih katjona, tzv. selektivni filter.



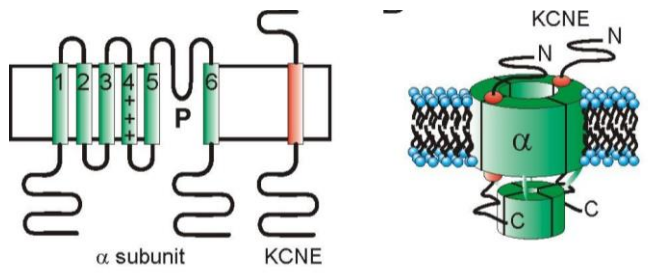
Slika 4. Grafički prikaz otvorenog (desno) i zatvorenog (levo) K kanala. Na vrhu je filter selektivan za K^+ jone, a pri dnu je „gating“ domen (preuzeto sa www.en.wikipedia.org/wiki/Potassium_channel).

Molekularne studije K kanala omogućile su njihovu klasifikaciju zasnovanu na primarnoj sekvenci amino-kiselina subjedinice koja sadrži poru. Postoji mnogo (pod)tipova i izoformi K kanala podeljenih u tri grupe na osnovu transmembranskih domena koji ulaze u sastav α subjedinice (Shieh i sar., 2000, Khan i sar., 2001). Podela je prikazana u tabeli 1.

Tabela 1. Podela K kanala (TM-transmembranski domen, tabela je napravljena prema Shieh i sar., 2000)

K kanali sa dva TM domena	K kanali sa četiri TM domena	K kanali sa šest TM domena	
		Kv	K _{Ca}
Kir1.x	TWIK	Kv1.x	K _{Ca} 1.x (BK)
Kir2.x	TREK	Kv2.x	K _{Ca} 4.x (BK)
Kir3.x	TASK	Kv3.x	K _{Ca} 5.x (BK)
Kir4.x	TALK	Kv4.x	K _{Ca} 2.x (SK)
Kir5.x	THIK	Kv7.x	K _{Ca} 3.x (IK)
Kir6.x	TRESK	Kv10.x	
Kir7.x		Kv11.x	
		Kv12.x	

1.5.1. Kanali sa šest transmembranskih domena - voltažno-zavisni K kanali



Slika 5. Shematski prikaz strukture voltažno-zavisnog K kanala (preuzeto sa www.mdc-berlin.de)

Voltažno-zavisni K kanali su multimeri koji se sastoje od četiri identične α subjedinice (slika 5). U svakoj subjedinici nalazi se šest transmembranskih domena, označenih od S1 do S6. Četiri β -subjedinice asociirane su sa α -subjedinicama i locirane na citoplazmatičnoj strani membrane (Monsuez, 1997). Između S5 i S6 domena nalazi se peptidna petlja (slika 5). Petlje α -subjedinica okrenute su ka lumenu pore i doprinose formiranju K^+ provodljive pore (Shieh i sar., 2000). Domen S4 je glavni deo voltažnog senzora neophodnog za aktiviranje Kv kanala. Mehanizmu otvaranja/zatvaranja takođe doprinosi međusobno elektrostatičko delovanje negativnih naelektrisanja na domenima S2 i S3 (Seoh i sar., 1996).

Članove ove klase, kao što su BK_{Ca} , *Shaker*, humani *ether-a-go-go* (hERG, IK_R), KCNQ (IK_S - KvLQT1 - minK) kanali, aktivira depolarizacija ćelijske membrane, što dovodi do izlaska K^+ jona iz citoplazme u vanćelijski prostor, u pravcu koncentracijskog gradijenta. Funkcija Kv kanala je da ostvare i održe negativni membranski potencijal i tako stvore ravnotežu depolarišućem delovanju Na^+ i Ca^{2+} jona. Inaktivacija je stanje neprovodljivosti u toku održavanja depolarizacije. Za Kv kanale, karakteristična su tri tipa inaktivacije N, P i C-tip. Veliki N-terminalni peptid, koji se nastavlja na S1 domen smatra se odgovornim za promene koje dovode do brze inaktivacije (Monsuez, 1997), dok C i P tipovi inaktivacije uključuju sporije razmeštanje spoljnog otvora i specifičnih ostataka u pori (Liu i sar., 1996).

Jedan od bolje proučenih tipova ove klase u miometrijumu su Ca zavisni K kanali.

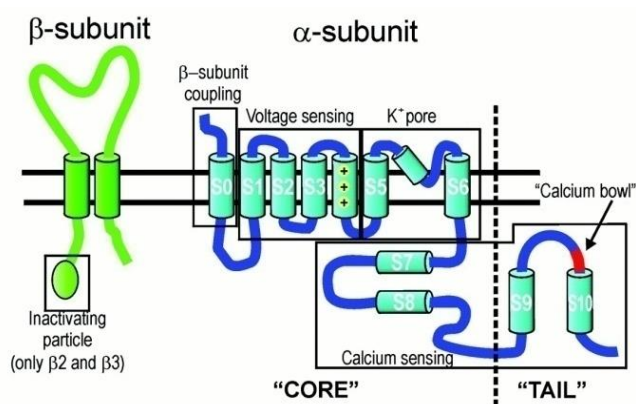
Ca zavisni K kanali osim voltažne zavisnosti, tj. depolarizacije, za otvaranje, zahtevaju i povećanu koncentraciju Ca^{2+} jona u citoplazmi (Brainard i sar., 2007). Oni se dele na: kanali sa velikom (BK_{Ca} , maxi K), intermedijernom (IK_{Ca}) i malom provodljivošću (SK_{Ca}).

- SK_{Ca} kanali se mogu aktivirati samo porastom koncentracije intracelularnog Ca^{2+} u vreme kada je membranski potencijal blizak potencijalu mirovanja. Ovi kanali imaju važnu ulogu u regulisanju frekvencije akcionog potencijala. Otkriveni su u glatkoj muskulaturi uterusu, a pretpostavlja se da imaju ulogu u regulaciji spontane aktivnosti (Rahbek i sar., 2014).

- IK_{Ca} podtip je otkriven u glatkim mišićima zida arteriola pankreasa pacova (Stuenkel, 1989). Podaci o ulozi koju ovaj podtip K kanala ima u glatkim mišićima su vrlo oskudni.

- BK_{Ca} (ili maxi K) su najbolje okarakterisani i izraženi u svim tkivima, osim u srcu. Sastoje se od četiri α kanalske i četiri β pomoćne subjedinice. Molekularno ispitivanje BK_{Ca} kanala (Atkinson i sar., 1991) pokazalo je da je bazična struktura kanalskog proteina homologa sa proteinima S1-S6 transmembranskih segmenata. Smatra se da je BK_{Ca} voltažno-zavisni kanal kome je dodat deo sa četiri nove subjedinice S7-S10, kako je shematski prikazano na slici 6 (Tseng-Crank i sar., 1994). Brainard i saradnici (2007) su opisali kanal kao strukturu čiji središnji region zahvata domene od S1 do S8, repni region S9 i S10, a povezani su „lako čuvanim linkerom“ smeštenim između S8 i S9. Neki modeli BK_{Ca} strukture uključuju i novi ekstracelularni transmembranski domen S0 (Wallner i sar., 1996) smešten na amino kraju, za koji se misli da igra važnu ulogu u regulaciji β subjedinica. Pretpostavlja se da su voltažna zavisnost, otvorenost kanala i provodljivost funkcija regiona S1-S6 (Tseng-Crank i sar., 1994), dok se Ca^{2+} osetljivost pripisuje β subjedinicama. Wallner je sa saradnicima (1996) objavio da β subjedinica miometrijske ćelije funkcionalno nije odvojena od α , dok nivo intracelularnog Ca^{2+} odgovara stanju neekscitirane ćelije. Sa povećanjem koncentracije Ca^{2+} unutar ćelije, β subjedinica se "pali" i deluje kao Ca^{2+} senzor. Takođe je naznačeno da u Ca^{2+} senzitivnosti, osim β subjedinica, veliki doprinos ima niz negativno naelektrisanih ostataka aspartata koji čine Ca^{2+} udubljenje ("bowl"). Ovo udubljenje je smešteno između S9 i S10 domena u regionu

repa α subjedinice u citoplazmi (Meera i sar., 1997). Ovaj tip K kanala je dobro proučen u glatkoj muskulaturi uterusa. Podjednako je zastupljen u negravidnom (Erulkar i sar., 1993; Perez i sar., 1993) i u gravidnom uterusu i ima istaknutu ulogu u održanju nekontraktilnog stanja mirovanja tokom graviditeta (Anwer i sar., 1993; Matharoo-Ball B i sar., 2003). BK_{Ca} kanali pokazuju veliku provodljivost, od oko 200pS i izuzetno su osetljivi na Ca^{2+} čak i u nanomolarnim koncentracijama. Stanje otvorenosti BK_{Ca} kanala raste sa depolarizacijom koja, kao što smo već govorili doprinosi povećanju intracelularnog Ca^{2+} što opet dovodi do daljeg povećanja kanalske aktivnosti.

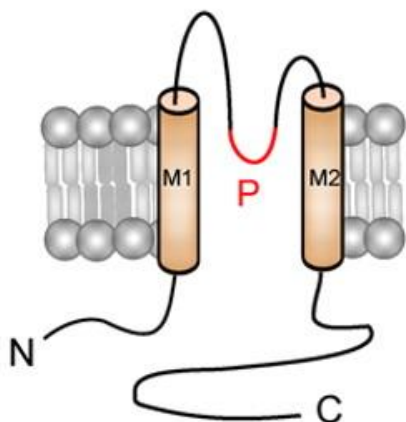


Slika 6. Shematski prikaz strukture Ca zavisnog K kanala (preuzeto iz Orio i sar., 2002)

1.5.2. Kanali sa dva transmembranska domena – ulazno-ispravljački K kanali

Ulazno - ispravljački K kanali pripadaju brojnoj klasi kanala sa četiri subjedinice od kojih svaka sadrži po dva transmembranska domena i petlju pore između njih (Hibinoi sar., 2010) homologno S5 i S6 domenima kod Kv (slika 7). Postojanje β subjedinica nije utvrđeno. Ovi kanali se ne aktiviraju depolarizacijom ćelijske membrane kao Kv već u toku maksimalne hiperpolarizacije tj. u toku repolarizacije i obezbeđuju povratak K^+ jona u ćeliju, igrajući bitnu ulogu u postizanju potencijala mirovanja. Ovo tzv. ulazno ispravljanje pripisuje se "gating" mehanizmu koji uz pomoć intracelularnog Mg^{2+} i poliamina (spermina, spermidina, itd.) onemogućava pristup K^+ jonima iz citoplazme kanalu pore (Liss i Roeper, 2001). Kir kanali su organizovani u tetramere kao i Kv kanali (Brainard i sar., 2007), mada je opisan i kompleksniji oktamerni raspored, kao u slučaju ATP-zavisnih

kalijumovih kanala (K_{ATP}). Kanali koji pripadaju ovoj klasi su kompleksni i pored četiri unutrašnja ispravljača, koji doprinose provođenju jona kroz poru, imaju i četiri regulatorne jedinice - sulfonilureja receptore, SUR (Inagaki i sar. 1997). U klasu Kir kanala ubrajaju se i ATP- zavisni K^+ kanali (K_{ATP}).

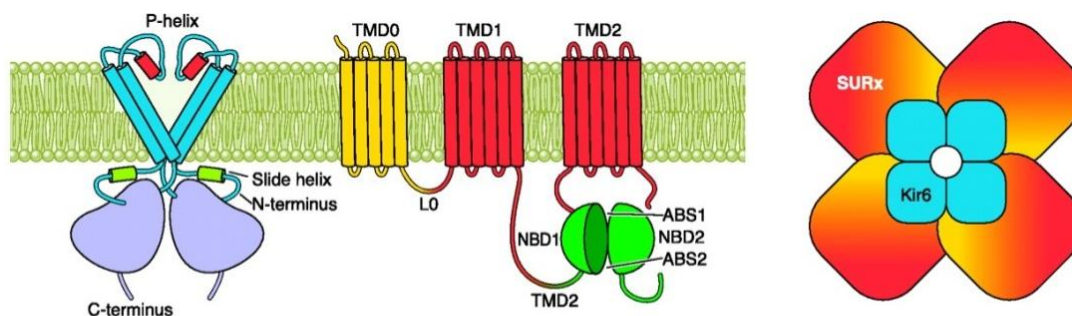


Slika 6. Shematski prikaz strukture Ca zavisnog K kanala (preuzeto iz Orio i sar., 2002)

ATP- zavisni K kanali prvi put su opisani kod srčanih miocita gde je uočeno njihovo zatvaranje u odgovoru na povećanje nivoa ATP u ćeliji (Noma, 1983). K_{ATP} su inhibirani (zatvoreni) u prisustvu fizioloških koncentracija (μM) ATP-a u ćeliji, a aktiviraju (otvaraju) se kada se smanji koncentracija intracelularnog ATP-a. Oni igraju važnu ulogu u sjedinjavanju ćelijskog metabolizma sa ekscitabilnošću što je najbolje ilustrovano kod β ćelija pankreasa gde povezuju nivo glukoze u plazmi sa lučenjem insulina. K_{ATP} kanali su Ca^{2+} i voltažno nezavisni i njihova uloga u tkivu glatkih mišića je manje jasna i odražava ogromnu raznolikost funkcija ovih tkiva. Kao što je već pomenuto, kanal se sastoji od dve jedinice: unutrašnjeg ispravljača i sulfonilurea receptora. Sulfonilurea receptor kloniran je 1995. godine (Aguilar-Bryan i sar., 1995). Ovi kanali su oktameri sastavljeni od četiri Kir6.x proteina, a svaki od njih vezuje po jednu sulfonilurea receptorsku subjedinicu (SUR1, SUR2A, SUR2B), kao što je prikazano na slici 8.

U zavisnosti od topologije, detektovano je više podtipova (Ascroft i Ascroft, 1990). Podtipovi 6.1 i 6.2 su prisutani u glatkim mišićima animalnog i humanog, gravidnog i negravidnog uterusa (Chien i sar., 1999, Novakovic i sar., 2013). Postojanje

K_{ATP} kanala u tkivu negravidnog uterusa pacova i humanog gravidnog miometrijuma potvrđeno je na nivou traskripta detekcijom mRNA za komplekse Kir6.1/SUR2B i Kir6.2/SUR1 (Chien i sar., 1999). Konkretno, prisustvo proteina Kir6.1 i Kir6.2 subjedinica u negravidnom tkivu pacova pokazano je i *western blot* analizom (Novakovic i sar., 2013).



Slika 8. Shematski prikaz strukture K_{ATP} kanala (preuzeto iz Flag i sar., 2010)

1.5.3. K kanali sa četiri transmembranska domena i dve pore

Ova klasa predstavljena je kanalima sa četiri transmembranska domena, S1 - S4, i tandemom pora između njih. Kanali koji pripadaju ovoj klasi su nađeni u glatkim mišićima animalnog (Hong i sar., 2013) i humanog uterusa (Bai i sar., 2005).

1.6. Pomoćne subjedinice

Ove subjedinice igraju raznoliku ulogu u modulaciji K kanalskih osobina, inaktivaciji, ekspresiji kanala na površini ćelije, transportu jona kroz kanalski kompleks i kao potencijalna mesta vezivanja endogenih i egzogenih liganda. Pomoćne subjedinice su funkcionalno povezane sa subjedinicama koje formiraju poru i pripomažu ili regulišu njihov rad. Na primer, Kv1.x kanali udružuju se sa citoplazmatičnim β jedinicama da bi

menjali kanalsku kinetiku (Xu i Li, 1998). Opisana je i uloga pratećih proteina, kao što su KChIP, u regulaciji funkcije i ekspresije Kv2.1, Kv1.3 i Kv4.3. Takođe, je pokazano da Kv5, Kv6, Kv8 i Kv9, sami od sebe nisu funkcionalni, već se udružuju sa Kv2.1 kanalima da bi promenili biofizičke osobine (Brainard i sar., 2007).

BK_{Ca} kanali uključuju različite β subjedinice koje se udružuju sa α subjedinicama u funkcionalan kanal (Meera i sar., 2000).

Najbolje proučene subjedinice su sulfonilurea receptori koji su pridruženi Kir 6.1 i Kir 6.2 subjedinicama koje sadrže poru kanala kao što je pokazano na slici 8 (Aguilar-Bryan i sar., 1995; Inagaki i sar., 1995). Ove komponente su mesta vezivanja mnogih supstanci (npr. glibenklamida), što vodi promeni konformacije kanala i njegovoj deaktivaciji.

1.7. Modulatori K kanala

Sa detaljnijim upoznavanjem K kanala, javio se i ogroman farmaceutski interes koji je uticao na otkrivanje i razvoj selektivnih modulatora K kanala, kao i re-evaluaciju postojećeg izbora lekova i supstanci sa uticajem na propustljivost ćelijske membrane za K⁺ jone. Uočeno je da ovi modulatori nude značajne terapijske mogućnosti na polju kardioprotekcije, korekcije funkcija vaskularnih i nevaskularnih mišića, neuralnog, imunog i sekretornog sistema.

OKK su hemijski heterogena grupa jedinjenja (Shieh i sar., 2001; tabela 1) sa zajedničkom osobinom da uzrokuju relaksaciju glatke muskulature aktivacijom – otvaranjem K_{ATP} (Jahangir i Terzic, 2005), BK_{Ca} kanala (Khan i sar., 1998).

Sintetski OKK se mogu podeliti na osnovu hemijske strukture.

Pinacidil je prototip hemijske grupe cijanogvanidina, i sintetisan je 1970. godine, ali je kao OKK identifikovan tek 1987. godine (Bray i sar., 1987). Njegovi analozi su P1705, P1075, njihova aktivnost je najverovarnije vezana za (3H)-15 oblik (Manley i sar., 1993). Pinacidil se danas koristi kao periferni vazodilatator, čije je dejstvo brzo i ekspanzivno (Ahnfelt-Røne, 1988). Podaci o uticaju pinacidila na glatku muskulaturu uterusa nedvosmisleno ukazuju da on vrlo efikasno relaksira ne gravidni (Cheuk i sar.,

1993, Kostrzewska i sar., 1996, Novakovic i sar., 2007, Lovasz i sar., 2011) i gravidni miometrijum (Morrison i sar., 1993, Khan i sar., 1998). U grupi *benzopirani*, osnovna supstanca je kromakalim. Opisujući njegovo dejstvo na glatku muskulaturu Hamilton i saradnici (1985) su termin OKK prvi put i uveli u literaturu. Kromakalim je mešavina većeg broja enantiomera čija je biološka aktivnost vezana za oblik (-)-3S,4R, koji je poznat pod generičkim nazivom levkromakalim (BRL38227) dok su ostali enantiomeri znatno slabiji. Novosintetisane supstance iz ove grupe su bimakalim i emakalim. Pored ovih postoje i sledeće grupe:

- tioformamidi - predstavnik ove grupe je racemat aprikalim (RP52891, RP49356) koji je prvenstveno sintetisan kao inhibitor K^+/H^+ ATP-aze.
- piridini – sa predstavnikom nikorandilom, koji je aktivator enzima gvanilne ciklaze čiji su efekti na K kanale otkriveni 1981. godine (Furukawa, 1981).
- pirimidini - minoksidil sulfat je jedini predstavnik ove grupe.
- benzotiadiazini - glavni predstavnik ove grupe je diazoksid, koji je ranije primenjivan kao antihipertenzivni lek. Međutim, zbog ozbiljnih neželjenih efekata (hiperglikemije) njegova primena u ovoj indikaciji je ograničena.
- druge supstance - u ovoj grupi se nalaze eksperimentalne kodirane supstance E4080, SCA40, bezimidazoli, metilpropanamidi, NS1619 i dr.

U BKK ubrajaju se supstance raznovrsne po hemijskom sastavu, od neorganskih katjona do prirodnih toksina. Svojstvo da sprečavaju efluks K^+ jona iz ćelije. Njihova specifičnost i efikasnost blokade variraju u širokom rasponu. Visoko selektivni blokator K_{ATP} , glibenklamid, je derivat sulfonil uree i našao je veliku primenu u terapiji dijabetesa. Koncentracije glibenklamida potrebne da se blokira K_{ATP} kanal u pankreasu (u nM) značajno su niže od koncentracija neophodnih za njihovu blokadu u uterusu (10mM, Novaković i sar., 2007; Sarah i Hollihgsworth, 1996), ili u krvnim sudovima (1-20 μ M, Gojković i sar., 1998). Supstance kao što su glibenklamid i tolbutamid, su visoko selektivni blokatori ovog tipa kanala i vezujući se za sulfonilurea receptor dovode do inaktivacije K_{ATP} kanala (Jahangir i Terzic, 2005). Koristeći tu njihovu osobinu uočeno je da relaksantno delovanje otvarača kalijumskih kanala - pinacidila na spontanu i

indukovanu kontraktilnost miometrijuma pacova, može biti antagonizovano glibenklamidom, na taj način i pokazano njihovo učešće u relaksaciji glatke muskulature (Novakovic i sar., 2007). Isti nalazi su pokazani i za humani miometrijum (Morrison i sar., 1993, Cheuk i sar., 1993 i Khan i sar., 1998a,b). Tolbutamid nema uticaja na relaksaciju miometrijuma postignutu OKK (Morrison i sar., 1993).

Kao značajne BKK drugih tipova K kanala pomenućemo:

- aminopiridine - 4-aminopiridin (4-AP, 500 μ M-5 mM), kao tipičan predstavnik ove grupe supstanci, je relativno selektivan za kasno i prolazno ispraviljačke K kanale (Beech i Bolton, 1989a). U milimolarnim (1-10mM) koncentracijama je neselektivan i blokira i K_{ATP} kanale (Wilson et al., 1988b) i BK_{Ca} (Ritchie, 1987). Vezuju se za mesto u pori između S5-S6 podjedinica, kao što je već pomenuto pri opisivanju strukture Kv kanala.
- kvaternerni amonijum joni (tetraetil amonijum, tetrabutil amonijum, tetrametil amonijum) su bili prvi i najviše korišćeni blokatori K kanala u eksperimentalnim uslovima, naročito TEA. Oni neselektivno blokiraju najveći broj podtipova K kanala, iako ne sve u istoj meri. Mesto vezivanja TEA je između S5-S6 subjedinica u pori, kao i 4-AP-a. Smeštajući se u samu poru on prouzrokuje fizički blok (Hille, 1992). U glatkoj muskulaturi BK_{Ca} su najosetljiviji K kanali na dejstvo TEA (0.1-1 mM, Beech and Bolton, 1989).

Danas se lekovi iz grupe modulatora K kanala primenjuju u lečenju neuralnih, kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa (Shieh i sar., 2000; Sanborn 2007).

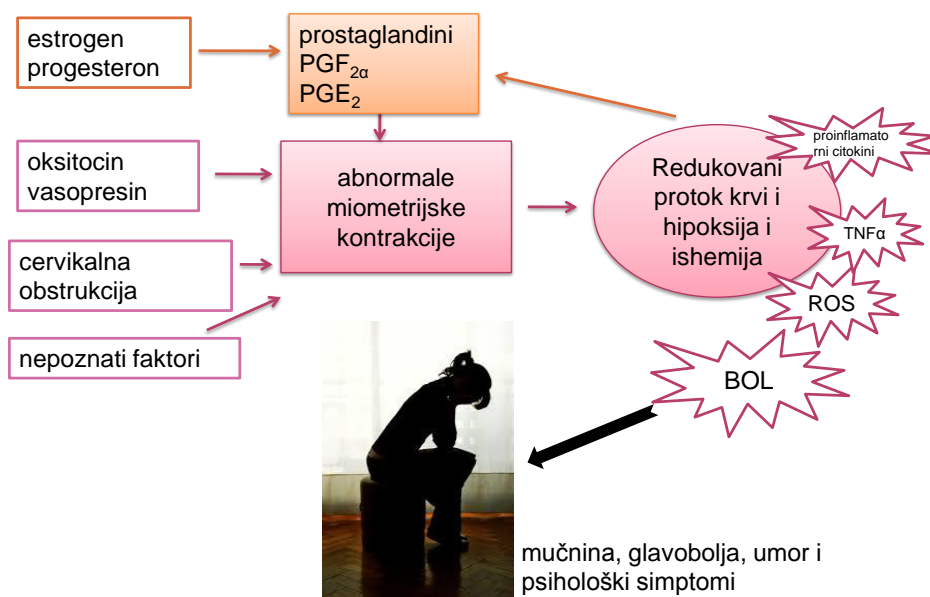
2. PROBLEM NEPOŽELJNE, ABERANTNE KONTRAKTILNOSTI UTERUSA

2.1. Dismenoreja

Dismenoreja (*dysmenorrhea*) je poremećaj koji se karakteriše abdominalnim bolom i bolom u donjem delu leđa koja traje najmanje dva dana tokom menstrualnog ciklusa i koji je vrlo čest kod mladih žena (20-24 godina starosti), sa prevalencom od 45-95%. Razlikuju se dva tipa dismenoreje:

1. primarna, bolne menstruacije bez pridruženih bolesti karlice,
2. sekundarna, bolne menstruacije izazvane nekom patologijom karlice.

Mnogobrojni faktori utiču na njen nastanak i progresiju (šema na slici 9), ali u prvom redu hormoni koji mogu povećati nivo prostaglandina, kao što su estrogen i progesteron. Povećani nivo prostaglandina stimuliše kontrakcije glatkih mišića materice koje se odlikuju prekomernom amplitudom, povećanom frekvencijom, smanjenim vremenom relaksacije između kontrakcija. Posledično, dolazi do vazokonstrikcije krvnih sudova materice, samim tim hipoksije i ishemije tkiva. Ishemija, dalje utiče na inflamaciju tj. na povećanje nivoa proinflamatornih citokina, interleukina IL2, IL4, IL6, TNF α (Chen i sar., 2014). Ova kaskada može da pokrene akumulaciju slobodnih radikala kao što je ROS *reactive oxygen species* (reaktivni kiseonični radikali), a hiperprodukcija ROS je uključena u patogenezu primarne dismenoreje. Nadalje, drugi faktori mogu dovesti do hiperkontraktivosti i istih posledica, kao što su hormoni, oksitocin i vasopresin, kao i neka patološka stanja.



Slika 9. Shematski prikaz patofiziologije primarne dismenoreje

Dismenoreja se uglavnom tretira nesteroidnim anti-inflamatornim lekovima (NAIL) koji smanjuju proizvodnju prostaglandina inhibicijom ciklooksigenaze. Međutim, NAIL nisu uspešni kod svih pacijenata i imaju izrazite neželjene efekte kao kardiovaskularni neželjeni događaji, poremećaj bubrega i digestivnog sistema (peptički ulkus i krvavljenje). Pošto NAIL proizvode mnoge sporedne efekte, terapija drugim supstancama, možda i prirodnog porekla bi bila zadovoljavajuća alternativa za lečenje dismenoreje (Kupittayanant i sar., 2014). Shodno tome, idealno sredstvo za prevenciju i lečenje aberantne kontraktilnosti uterusa još uvek nije pronađen i razvoj efikasnih i bezbednih agenata je važna istraživačka tema.

2.2. Prevremeni porodaj

Prevremeni (pretermijski) porodaj je onaj koji započne pre navršene 37. nedelje trudnoće. Prevremeni porodaj je jedan od vodećih problema u savremenom akušerstvu, jer se broj prevremenih porođaja u svetu i pored primene najsavremenijih

lekova i sredstava u proteklih 40 godina nije menjao (12%). Prevrmeni porođaj se smatra glavnim uzrokom neonatalnog morbiditeta i mortaliteta (preko 75%). Pojava kontrakcija koje povećavaju svoju frekvenciju i jačinu znači da je porođaj počeo, pre nego što je beba spremna da bude rođena. Vrlo bitan faktor je starost majke. Ukoliko žena rađa posle 35. godine, ovaj rizik se značajno povećava (Catalano i sar., 2010). Takođe, on je veći ukoliko majka ima neko hronično oboljenje (dijabetes, bubrežna i srčana oboljenja), da li ima neku infekciju ili hormonski poremećaj. Građa je takođe bitna, jer veći rizik imaju porodilje uzanih karlica, one koje su češće pod stresom, koje puše ili borave u sredini u kojoj ima pušača (Di Renzo i sar., 2011). Međutim, uprkos velikom napretku saznanja o faktorima koji pokreću proces porođaja i odgovorni su za njegovo sprovođenje, incidenca pretermiskog porođaja nije smanjena, a tome su mogući uzrok limitirane terapijske opcije. Takođe, jako je važno što ranije uočiti simptome prevremenog porođaja, jer su tada veće šanse da se spreči rađanje deteta nespremnog za život van organizma majke. Simptomi prevremenog porođaja su pre svega uočene kontrakcije materice 4 puta u toku sat vremena, osećaj pritiska u donjem delu trbuha i nelagodnost, postojanje obilnijeg sekreta iz vagine (Catalano i sar., 2010). Smatra se da je prevremeni porođaj započeo ukoliko možemo da dokažemo bar 4 kontrakcije za 20 minuta, ili 8 za 60 minuta, koje su praćene sa prevremenim prskanjem vodenjaka, skraćenjem grlića materice za polovinu ili njegovim širenjem. Tretman prevremenog porođaja podrazumeva intravensko davanje nekog od lekova za sprečavanje kontrakcija miometrijuma - tokolitika. Najčešći agensi koji se koriste su magnezijum sulfat i indometacin. Nekada su mnogo više bili primenjivani β -agonisti, kao što je terbutalin ili ritodrin. Ova sredstva su podjednako efikasna u odlaganju porođaja ali na kratak vremenski period, u proseku 48 sati, ali ispoljavaju višestruke i značajne sporedne efekate. Magnezijum sulfat ima veću toksičnost za porodilju od indometacina (Nanda i sar., 2006). S druge strane, indometacin se povezuje sa potencijalnom neonatalnom i fetalnom toksičnošću (Pryde i sar., 2004). Blokatori Ca^{2+} kanala, kao što je nifedipin, su korišćeni u tretmanu prevremenih kontrakcija, ali oni se ne smatraju standardnom terapijom. Mora se svakako uzeti u obzir i postojanje bolesti, kao što su dijabetes, hipertireoza majke, teška srčana oboljenja, gde davanje tokolitika nije dozvoljeno i čini više štete nego koristi. Tako, terapija tokoliticima je vrlo kontraverzna tema u ovoj oblasti. Tokom poslednje decenije, studije o tokolitičkim agensima su dale

različite rezultate koji su doprineli da se poveća sumnja u njihovu korisnost i bezbednost. Uprkos širokoj upotrebi, dokazi da su ovi lekovi bezbedni za majke i novorođenčad su kontradiktorni. Razvoj visoko specifičnog agoniste K kanala u glatkoj muskulaturi uterusa može imati terapeutsku vrednost u sprečavanju prevremenih porađaja.

2.3. Vantelesna oplodnja - *in vitro* fertilizacija - IVF

Problem prevremenog porađaja je češći i ozbiljniji u grupi žena iz programa IVF. Nedavni podaci ukazuju da jednoplodne "IVF trudnoće" su povezane sa znatno većim rizikom od neželjenih ishoda nego što je to slučaj sa spontanim jednoplodnim trudnoćama, kada se uporede varijable kao što je starost porodilja, njihovo zdravstveno stanje itd. Takođe, rizici koji uključuju perinatalnu smrt, prevremeni porađaj, nisku porođajnu težinu neonatusa su dvostruko veći od rizika istih događaja kod spontano začetih trudnoća (Van Voorhis, 2007). Rizici mogu uključivati i trudnički dijabetes, placentu previu, preeklampsiju, prevremeni porađaj (Kontic - Vučinic i sar., 2008). Međutim, studija Tabaš i saradnika (2005) je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u pojavama prevremenog i preterminskog prsnuća plodovih ovojaka, što neizostavno vodi prevremenom porađaju, između porodilja iz programa IVF i onih koje su spontano začele trudnoću, odnosno porodilja iz programa intrauterine inseminacije. U skorije vreme broj asistiranih oplodnja raste velikom brzinom. Internacionalna analiza prevalencije infertiliteta i obraćanja radi lečenja na uzorku od 172413 žena iz 25 zemalja, je utvrdila da je prosečna prevalencija infertiliteta 9% (Boivin i sar., 2007). Ova prevalencija varira od 3,5% do 16,7% u razvijenijim zemljama, i od 6,9% do 9,3% u manje razvijenim zemljama. Starost žena u vreme prvog porađaja se neprekidno povećava i u poslednjih trideset godina povećala se za 4 godine, te u Srbiji ona iznosi 25,6 godina (podaci iz 2003. godine), dok se broj porađaja smanjio u poslednjih pedeset godina za 44% uz alarmantni prirodni priraštaj od -3,3 u Srbiji (Kopitovic i sar., 2011).

Standardna klinička definicija neplodnosti je kada kod para posle godinu dana nezaštićenog odnosa ne dolazi do oplodnje. Starost žene ima negativni efekat na začeće i ovaj faktor se ne može zanemariti. Sa starošću žene opada plodnost, a povećava se stopa

pobačaja. Pored toga, stopa uspešnosti IVF tretmana opada značajno sa povećanjem starosti pacijentkinja, posebno kod starijih od 35 godina (Tabš i Radunović, 2002). Tako da čak postoje preporuke, da se sa IVF tretmanom kod žena starijih od 35 godina treba početi već nakon ciklusa od šest nezaštićenih odnosa (Van Voorhis, 2007).

Sam proces *in vitro* oplodnje podrazumeva stimulaciju jajnika, preuzimanje jajne ćelije, oplodnju, negu embriona i njegov transfer u matericu (Van Voorhis, 2007). Smanjena rezerva jajnih ćelija manifestuje smanjeni odgovor na lekove za stimulisanje ovulacije (Geoffrey i sar., 2010). Ovi testovi pored prognostičkih informacija olakšavaju izbor protokola za stimulaciju ovulacije. Postupak stimulacije jajnika počinje treći dan i sastoji se od režima hormonskih lekova koji stimulišu razvoj više od jednog folikula u jajnicima. Kod mnogih pacijenata koriste se injekcije gonadotropinima (obično molekuli analogni hormonu FSH) pod pažljivim ultrazvučnim kontrolama. Potreban je desetodnevni tretman. Spontana ovulacija tokom ciklusa se sprečava korišćenjem GnRH agonista koji počinju pre ili oko početka stimulacije, ili GnRH antagonista koji se koriste tokom zadnjih dana stimulacije; oba leka blokiraju prirodni iznenadni rast luteizirajućeg hormona (LH) i dozvoljavaju lekaru da započne proces ovulacije korišćenjem lekova, obično ljudskog horionskog gonadotropina. Kad se proceni da su folikuli dovoljno zreli, daje se ljudski horionski gonadotropin (hCG) koji izaziva ovulaciju. Uzimanje jajnih ćelija se vrši transvaginalno i neophodno je da igla probuši zid vagine uz ultrazvučno vođstvo da bi pristupili jajnicima. Folikuli se aspiriraju kroz iglu, potom se vrši oplodnja u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Oplođena jajna ćelija stavlja se u poseban medijum gde raste oko 48 sati kad zametak obično ima 6-8 ćelija. Embrioni koji se ocene kao najbolji vraćaju se u matericu pacijentkinje kroz tanak plastičan kateter koji prolazi kroz vaginu i cerviks (Van Voorhis, 2007).

Istraživanje molekularno biološke strukture materice žena koje su prošle procedure IVF može doprineti boljem razumevanju zašto su "IVF trudnoće" češće povezane sa znatno većim rizikom od neželjenog ishoda od spontano začetih trudnoća. Naša saznanja o mehanizmima koji leže u osnovi normalnog fiziološkog porođaja su znatno napredovala, ali podaci koji se odnose na analizu jonskih kanala u tkivu miometrijuma pacijentkinja iz programa IVF su oskudni.

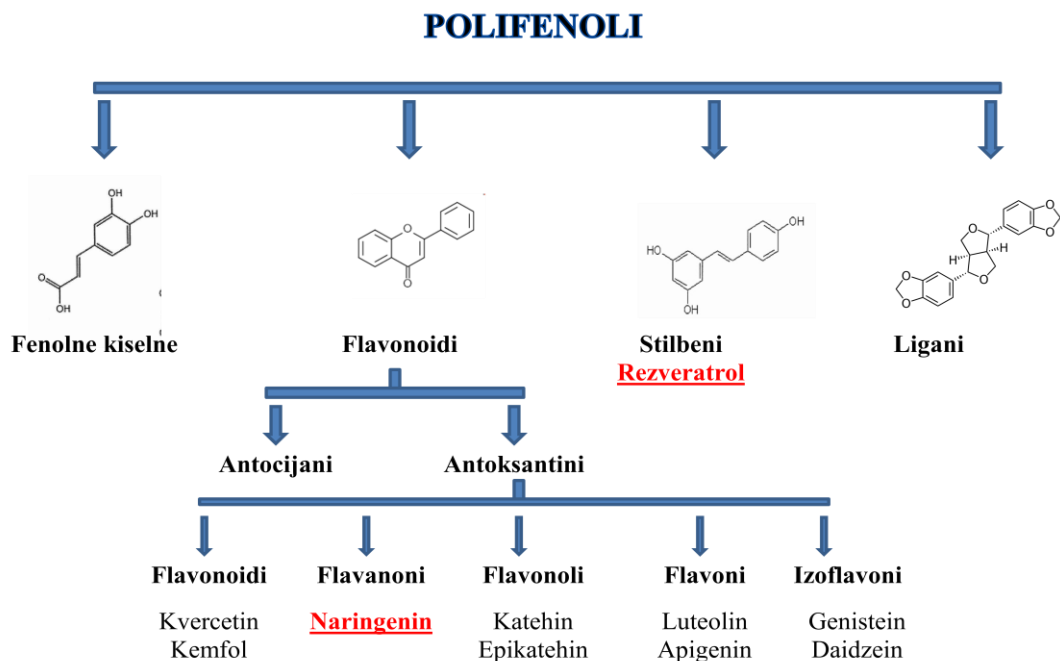
3. POLIFENOLI PRIRODNOG POREKLA

Polifenoli su strukturna klasa prirodnih ili sintetičkih organskih jedinjenja koju karakteriše prisustvo velikog broja fenolnih strukturnih jedinica. Broj i karakteristike tih fenolnih struktura su osnova jedinstvenih fizičkih, hemijskih i bioloških osobina polifenola (Quideau i sar., 2011). Polifenoli prirodnog porekla su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju višestruku ulogu u određivanju biljnih osobina kao što su boja, aroma, ukus, rast, otpornost prema patogenima, itd. Termin polifenoli je u upotrebi od 1894. godine. Prirodni polifenoli su se našli u žiži interesovanja kako naučne zajednice tako i javnosti tokom protekle decenije kada je pokazano da mogu imati značajnu ulogu u prevenciji kancera, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i neurodegenerativnih poremećaja itd. (Scalbert i sar., 2005). Polifenoli su najzastupljeniji antioksidansni konstituenti i njihov izvor je različita hrana biljnog porekla: voće, povrće, semenke, posebno orah, čokolada, vino, čaj, kafa.

Pretpostavka je nekih članova naučne javnosti da bi proizvodi prirodnog porekla, napravljeni od prirodnih supstanci, *a priori* trebalo da budu bezbedni za konzumiranje. Rezultat toga stvorio je povećanu potrošnju namernica koje su označene kao bogati izvori polifenola od stane opšte populacije. Na tržištu su se našli hrana i piće obogaćeni raznim vrstama polifenola. Takođe, kao koncentrisani izvor raznih kombinacija polifenola na tržištu su se našli dijetetski suplementi (SAD), prirodni zdravi proizvodi (Kanada), komplementarna alternativa lekovima (Australija), fitomedicina (Evropska Unija), tradicionalni lekovi (Kina). Shodno tome, ovakvi izvori polifenola su dostupni, možda čak i preporučeni, i trudnicama iako je broj naučnih radova o sigurnom konzumiranju ovakvih dodataka ishrani trudnica malobrojan. Postoji realna zabrinutost zbog potencijalne opasnosti po zdravlje i majke i deteta pri povećanom unosu pomenutih izvora polifenola (Chvarro i sar., 2008, Lim i sar., 2013). Takođe, od izuzetnog značaja je istražiti i sekundarne metabolite polifenola u tkivima odraslih i tkivima fetusa, kao i doze koje su fiziološki relevantne. Dakle, razumevanje uticaja ovih široko rasprostranjenih sredstava,

njihove moguće koristi ili/i negativnih efekta na reproduktivno zdravlje žene, graviditet i zdravlje fetusa su imperativ.

Na osnovu broja fenolnih prstenova polifenoli se mogu klasifikovati u četiri kategorije: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i ligane. Detaljnija podela je shematski prikazana na slici 7.



Slika 10. Klasifikacija i struktura glavnih klasa polifenola. Adaptirano na osnovu Cristiane i sar., 2013

3.1. Flavonoidi

Naziv “flavonoidi” je opšti naziv za biljne pigmente, koji pripadaju ogromnij grupi fenolnih jedinjenja, široko rasprostranjeni u namernicama biljnog porekla (Harborne i sar., 1964). Do danas je opisano preko 4000 različitih prirodnih flavonoida (Kandaswami i Middleton, 1994). Grupa flavonoida bi se u hemijskom smislu mogla podeliti na podgrupe:

antocijani i antoksanitini (dalja podela je prikazana na slici 10). Osnove ogromne varijabilnosti flavonoida su

- razlike u strukturi prstena i razlike u njihovim oksido/redukcijskim stanjima
- razlike u stepenu hidroksilacije i poziciji hidroksil grupe
- razlike u derivatizaciji hidroksil grupe, npr. metil grupom, karboksi-hidroksilnom (Havsteen, 2002).

3.1.1. Flavonoidi kao inhibitori enzima

Flavonoidi mogu inhibirati mnogobrojne enzime, kao što su: hidrolaze, oksidoreduktaze, DNA sintetaze, RNA polimeraze, fosfataze, protein-fosfokinaze, oksigenaze, amino kiselinske oksidaze i dr. U nekim slučajevima tip inhibicije je kompetitivni, ali mnogo češće je alosterički.

Hidrolaze

Među njima izdvaja se inhibiranje hijaluronidaza, jer one deluju na gubitak integriteta vezivnog tkiva (Hasato i sar., 1979). Glikoni čine barijeru u vezivnom tkivu i štite ga od različitih vrsta infekcija (bakterijskih, virusnih, metastaza), tako da hijaluronidaze svojim delovanjem na njih indirektno utiču na širenje infekcije (Huang i sar., 1997). Druga bitna potklasa hidrolaza koju flavonoidi mogu inhibirati su fosfolipaze (Kyo i sar., 1998). Ovi enzimi utiču na veze između fosfodiestera u biološkim membranama i često je posmatran uticaj flavonoida na permeabilitet membrane. Mnogi produkti delovanja fosfolipaza su drugi glasnici u daljem metabolizmu tako da regulacija aktivnosti fosfolipaza ima i šire posledice. Jedan od primera je inhibicija fosfolipaze A2 (PLA2) flavonoidima. Ovaj enzim svojim delovanjem utiče na oslobađanje arahidonske kiseline koja utiče na permeabilitet plazma membrane za jone kalijuma (Trujillo i sar., 2000).

Oksidoreduktaze

Najveći broj procesa biološkog transfera elektrona zahteva koenzime tipa nukleotida. Kako flavonoidi strukturalno "liče" na nukleotide kao aromatični oksido/redukcijski katalizatori mogu biti konkurenti nukleotidima pri vezivanju za određeno mesto na enzimu, ili u drugom slučaju mogu direktno interferirati u translatorskom stanju npr., "presresti" slobodne radikale pre glavnog recipijenta. Npr., izoenzime COX1 i COX2, koji se oslobađaju tokom primarnog inflamatornog odgovora, i trebalo bi da inhibiraju samo jednu formu. Acetilsalicilat (aspirin) inhibira oba izoenzima, što za posledicu ima velike neželjene efekte kao što su: krvarenje, supresija aktivacije limfocita (Barasoain i sar., 1980), kao i neuralne poremećaje; tako da bi moderna alternativa mogli biti flavonoidi koji omogućavaju razlikovanje i inhibiciju samo štetne izoforme.

Kinaze

Kinaze učestvuju u regulaciji metabolizma otuda je uticaj flavonoida na njih od značaja. Sve kinaze kao jedan od supstrata koriste ATP. Uticaj flavonoida na ove enzime može biti direktan (veivanjem za njih) ili indirektan npr. putem uticaja na receptore u membrani (GPCR) čija aktivacija dovodi do kaskade u kojoj učestvuju kinaze (P-kinaza, A-kinaza...) (Jinsart i sar., 1992).

Izomeraze

Najbolji primer inhibicije izomeraze od strane flavonoida je inhibicija DNA topoizomeraze II kvercetinom. Ovaj enzim deli DNK lanac superheliksa stvarajući dodatni zavoj ili odmotavajući krajeve superheliksa. Finalni korak spajanja krajeva DNK može biti blokiran kvercetinom. Rezultat ove inhibicije su jednolančani prekidi koji kasnije mogu da prouzrokuju dvolančane prekide i gubitak genetičke informacije (Freudenreich i Kreuzer, 1994).

3.1.2. Hormonsko dejstvo polifenola

Estrogenske karakteristike izoflavonoida uočene su pre 50 godina. U skorije vreme, ukupni efekti izoflavonoida, naročito iz soje, na ljudsko zdravlje izazivaju veliku debatu

zasnovanu na prepostavkama da imaju osobine slične estrogenu. Ono što još uvek nije do kraja razjašnjeno su njihove biohemijske „mete“ u ćeliji i mehanizmi delovanja izoflavonoida na njih.

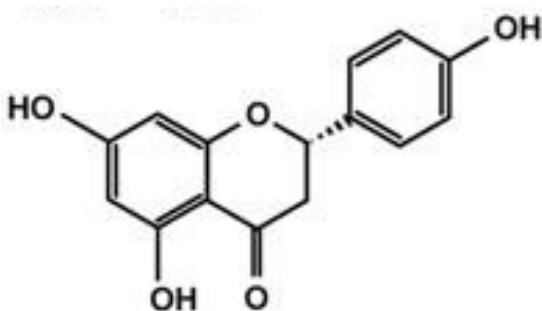
Izoflavonoidi imaju dugu istoriju u nauci, njihova estrogenska svojstva bila su poznata i pre određivanja i hemijskog sintetisanja prstenaste strukture steroida sisara 1920 g. Ideja da izoflavonoidi mogu imati „estrogenima sličnu aktivnost“ biva ozbiljnije shvaćena kada je učestali sterilitet stoke (ovaca i goveda) koja je hranjena uglavnom detelinom bila povezana sa prisustvom izoflavona fermononetina, biohanina i genisteina u njoj. Kasnije, sa istom grupom jedinjenja povezan je i „azijski paradoks“ – uočeno je da pojava kardiovaskularnih poremećaja uopšte, pa i kod žena u menopauzi, značajno je manja u azijskim zemljama u odnosu na Evropu i SAD. Simptomi menopauze su mnogo slabije izraženi, kao i učestalost karcinoma endometrijuma i dojke kod žena, odnosno kancera prostate kod muškaraca je znatno ređa. Ovakve pojave povezane su sa velikim udelom soje i hrane na bazi soje u ishrani stanovnika azijskih zemalja.

Danas pojam *fitoestrogeni* obuhvata nekoliko hemijski različitih grupa: izoflavone, stilbene, kumestanine, lignane. Zbog svojih hemijskih karakteristika (strukture, polarnosti, molekulske mase) sličnih estrogenu sisara ova jedinjenja pokazuju afinitet vezivanja za α i/ili β estrogenske receptore (ER). Pored toga što mogu da se vežu za ER fitoestrogeni poseduju određenu aktivnost selektivne modulacije ovih receptora (Hazel, 2003). Takođe, njihova „estrogenska aktivnost“ povezana je i sa uticajem na enzime koju učestvuju u metabolizmu endogenih hormona. Eksperimentalni podaci ukazuju na delovanje izoflavona na folikulostimulirajući i luteinizirajući hormon, dok je za rezveratrol potvrđeno dejstvo na aktivnost ciklooksigenaze i sintezu prostaglangina i tromboksana (Xia i sar., 2014). Flavonoidi mogu delovati kao hormoni i kod biljaka i kod životinja. Sonnenbichler i Pohl (1980) su izolovali aktivnu supstancu iz crvene deteline zvanu silibin i uočili da je hidroksilna grupa aglikona pozicionirana kao i kod estrogeana. Kako estrogeni imaju i anaboličko dejstvo (Sokolova i sar., 1978) prepostavilo se da i flavonoidi (fitoestrogeni) bi mogli imati iste efekte i uticati na rast životinja, međutim, to do sada nije potvrđeno. Uočeno je, na primer, da flavonoidi (5,7-dihidroksi-8-metoksi-flavon) mogu uticati na inhibiciju gravidnosti (Jain i sar., 1993). Ovaj efekat bio je poznat i u Srednjem veku, a danas je potvrđen savremenim metodama: posle odstranjivanja ovarijuma, dolazi do

disfunkcije koja rezultira nedostatkom estrogena koji se može nadomestiti dodatkom genisteina (izoflavon) ili 17- β -estradiola, čiji se efekti preklapaju (Squadrito i sar., 2000). Međutim, rasprava o fitoestrogenskom efektu flavonoida u literaturi je prilično kontraverzna, naročito u vezi mogućnosti terapije zamene estrogena flavonoidima u cilju poboljšanja endotelne disfunkcije. Poznato je da estradiol (E2) estrogen koji utiče na razvoj mlečnih žlezdi, razvoj uterusa, održavanje gravidnosti, ali ima efekta i na gustinu kostiju i ima zaštitnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja, kao i pri olakšavanju postmenstrualnih simptoma (Mikkola and Clarkson, 2002). Takođe, pokazano je da može stimulisati rast malignih estrogen - zavisnih tumora, kao što su tumori dojke i materice (Mikkola and Clarkson, 2002). Sa druge strane, nekoliko studija rađenih na populaciji žena sa Dalekog istoka pokazalo je da postoji korelacija između visokog unosa izoflavonoida soje (genisteina) i smanjene učestalosti hormon - zavisnih tumora (Adlercreutz i sar., 1999, Hazel, 2003).

3.2. NARINGENIN

Naringin i njegov aglikozilovan analog, (\pm)-naringenin su predstavnici flavanona (49,5,7-trihidroksiflavanone-7-ramnoglukoizid ili naringenin-7-ramnoglukoizid, slika 11).



Slika 11. Hemijska struktura naringenina (preuzeto iz Ly i sar., 2014)

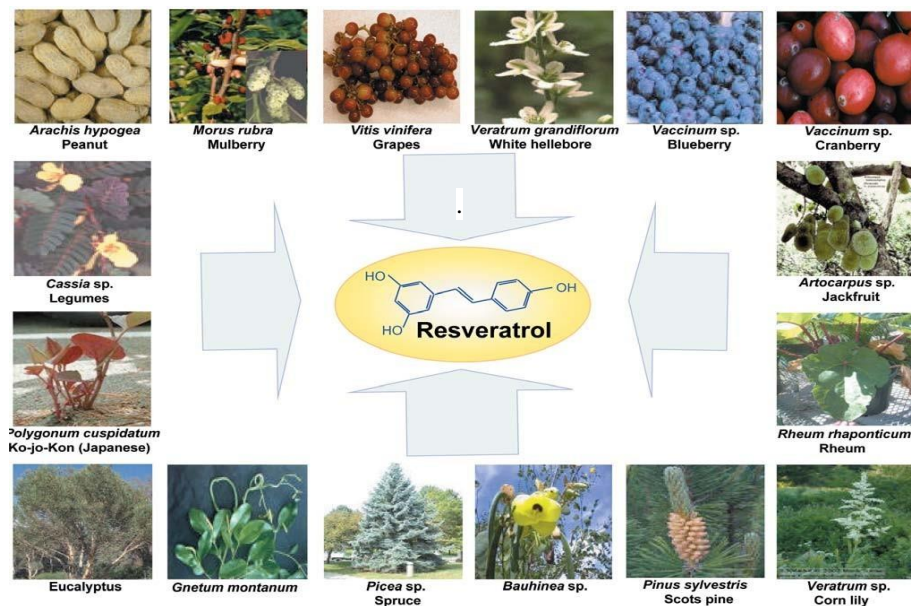
Naringin i naringenin imaju na raspolaganju hiralni centar na C2 poziciji srednjeg prstena i to rezultira stvaranjem dva stereoisomera (Ly i sar., 2014). Oba enantiomera se nalaze u voću i povrću i „doprinosu“ njihovom gorkom ukusu. Tako je najbogatiji izvor naringenina

i njegovog analoga, naringina, grejpfrut (*Citrus paradisi*). U proseku u 100 g grejpfruta sadržano je oko 50 mg naringenina koji je uzrok gorkog ukusa soka od grejpfruta. Osim grejpfruta, naringenin se nalazi u soku od narandže i u kori paradajza, dok je bogati izvor prenilnaringenina hmelj (Hazel, 2003). Poznato je da naringenin ima pozitivne efekte na zdravlje: ima antiinflamatorno, antioksidantno, estrogensko dejstvo, moduliše funkciju imunog sistema (Erlund i sar., 2001, Lim i sar., 2013). Od značaja je što je pokazano da naringenin ima antioksidantna svojstva. U nereproduktivnim tkivima naringenin inhibira proinflamatorne medijatore, kao što su PGE₂, ciklooksigenaze 1 i 2, TNF α kroz suzbijanje NF- κ B (Park i sar., 2012). Oksidativni stres je promoter nekoliko poremaćaja koji mogu da se loše odraze na graviditet kao trudnički dijabetes ili preeklampsija (Al - Gubori i sar., 2010, Lappas i sar., 2011). Lim i saradnici (2014) su opisali uticaj naringenina, kurkumina, kao modulatora inflamatornog odgovora reproduktivnom tkivu, placenti, fetalnim membranama i miometriju. Pokazano je da ova tri flavonoida mogu signifikantno smanjiti infekciju i inflamaciju putem inhibicije NF- κ B koji igra važnu ulogu u iniciranju prevremenog porođaja. Takođe, pokazano je u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima da naringenin i njegov derivat 8-prenilnaringenin, u velikoj meri zastupljen u hmelju i pivu, imaju „osobine“ estrogena tj. da su vrlo potentni fitoestrogeni (Kretzschmar i sar., 2007).

Kada je u pitanju interakcija naringenina sa K kanalima malobrojni su podaci. Elektrofiziološkim metodama pokazano je da naringenin dovodi do aktivacije ovih BK_{Ca} kanala u preparatima aorte i repne arterije pacova (Saponara i sar., 2006). Pokazano je da relaksira glatke mišićne kolone aktivacijom BK_{Ca} kanala (Yang i sar., 2014). Naringenin blokira i srčane HERG kanale, utičući na repolarizaciju kardiomiocita (Scholz i sar., 2005). Takođe, dokazano je *voltage clamp* metodom da naringenin u koncentraciji od 100 μ M direktno i kompetitivno aktivira Kir3.1 i Kir3.4 kanale vezujući se za njihove vanćelijske domene koji spajaju transmembranske domene M1-M2 (Yow i sar., 2011). Prema našim saznanjima, o efektima naringenina ili njegovih analoga na K kanale glatke muskulature uterusa nema podataka.

3.3. REZVERATROL

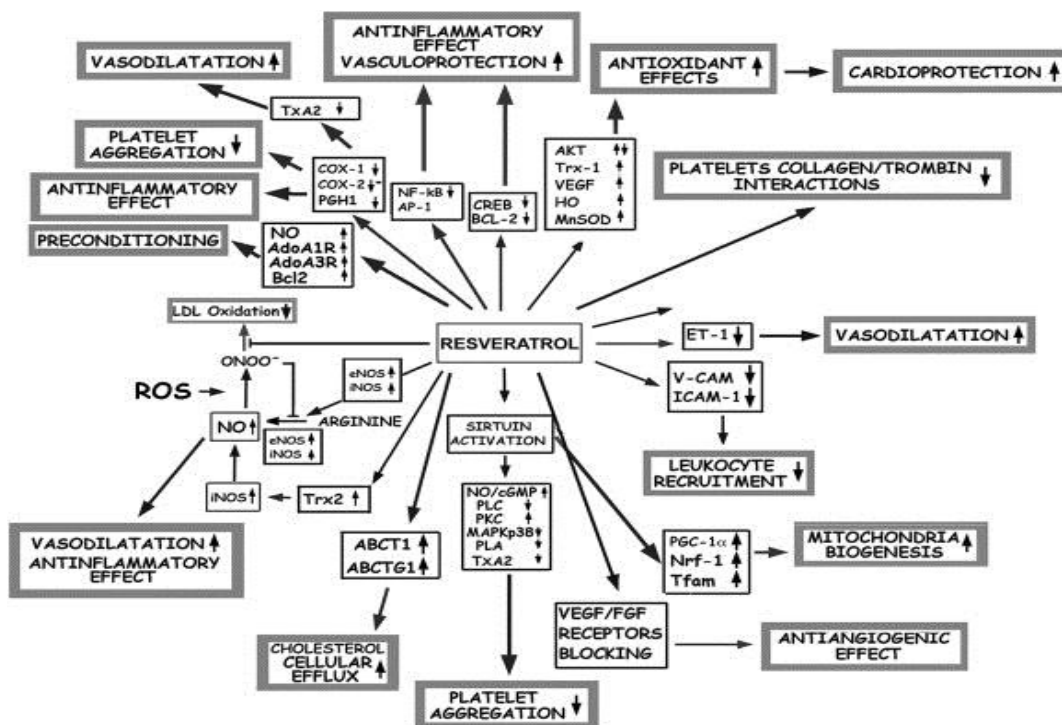
Rezveratrol je hemijski jednostavno jedinjenje 3,4,5 -trihidroksi -trans- stilben (slika 12). Može se javiti kao *trans*-rezveratrol i *cis*-rezveratrol ili u obliku glikozida piseida. Kao hemijski entitet, rezveratrol je poznat od 40-tih godina prošlog veka kada je prvi put izolovan iz korena bele čemerike (*Veratum album*), a kasnije i iz korena *Polygonum cuspidatum* (Pirola i Frojdo, 2008). Naziv rezveratrol potiče od rezorcinolnog derivata izolovanog iz biljaka roda *Veratum sp.* Sa botaničkog gledišta rezveratrol deluje kao fitoaleksin, odnosno stvara se u biljkama kao odgovor na gljivičnu infekciju ili neki drugu vrstu stresa. U kineskoj i japanskoj tradicionalnoj medicini poznati su biljni ekstrati koji su sadržali rezveratrol u lečenju gljivičnih infekcija, kožnih oboljenja, kardiovaskularnih oboljenja (Arichi i sar., 1982., Vastano i sar., 2000). Rezveratrol je prisutan u znatnoj meri je i u dudu, orahu, grožđu i vinu, kao njegovom proizvodu (Atanacković i sar, 2012).



Slika 12. 72 različite biljne vrste mogu biti izvor rezveratrola (preuzeto sa www.naturalbiology.com)

Od 80-tih godina broj istraživanja koja su bila usmerena ka identifikaciji farmakološkog svojstva rezveratrola naglo je počeo da raste. Na modelu raka kože miša pokazano je njegovo antitumorsko delovanje (Jang i sar., 1997) i interesovanje za rezveratrol se još više podiže. U samu žižu naučne i opšte javnosti dolazi kada biva povezan, sa još nekim polifenolima, za izraz „Francuski paradoks“. „Francuski paradoks“ je prvi opisao St. Leger sa saradnicima (1979), i odnosi se na relativno nisku incidencu kardiovaskularnih bolesti među stanovništvom južne Francuske, i uprkos unosu velike količine zasićenih masnih kiselina koji je glavni uzrok za nastanak koronarne bolesti (St. Leger i sar., 1979). Prve studije koje su uvele ovaj pojam zasnovane su na podacima koje je posedovala vlada Francuske. Opsežne epidemiološke studije, poput MONICA studije, tokom kojih su korišćeni identični kriterijumi za određivanje stope koronarne bolesti u različitim populacijama, potvrdila je smanjenje stope koronarnih događaja od severa do juga Evrope (Kuulasmaa i sar., 2000; Tunstall-Pedoe i sar., 2000). Tada je registrovana značajno niža stopa koronarnih događaja u Francuskoj i ostalim mediteranskim zemljama, povezana s globalnim faktorima rizika (uključujući faktore poput krvnog pritiska, LDL i HDL lipoproteina, holesterola, starosti, pola, pušenja i intolerancije glukoze). Iako su faktori rizika bili slični u populacijama drugih razvijenih zemalja, kod njih je stopa koronarnih događaja bila upadljivo veća. Razlozi za ovu nepodudarnost otvorili su novo istraživačko polje u farmakologiji. Rezveratrol dobija veliku pažnju javnosti 2010 godine na 1. Internacionalnom skupu o rezveratrolu i zdravlju (Hensilki, Danska) kada je sastavljen set preporuka za njegovu upotrebu.

Kada je reč o njegovoj farmakodinamiji, ovaj stilben je sa pravom dobio naziv „jedan molekul - mnoge mete“. Zapravo, tokom proteklih par decenija u prekliničkim studijama pokazani su mnogobrojni molekuli i ćelijske strukture kao mesto dejstva rezveratrola, a jedan deo toga je shematski ilustrovan na slici 13.



Slika 13. Shematski prikaz potencijalnih mesta delovanja rezveratrola (preuzeto sa www.naturalbiology.com)

Molekularne mete rezveratrola uključuju i one na koje ova supstanca direktno utiče i one koje modulira indirektno kroz promene nivoa ekspresije. Preko 20 molekula je identifikovano za koje se rezveratrol direktno vezuje (Harikumar i Aggarwal, 2008).

Jedan od ciljnih molekula rezveratrola koji je zadobio veliku pažnju je NAD⁺ zavisna histonska sirtuin deacetilaza 1 (SIRT1). Zapravo, SIRT1 je molekul sa mnogobrojnim ciljnim mestima, tj. reguliše širok spektar bioloških procesa (Zhang i Kraus, 2010). Kao klasa III histonskih deacetilaza mogu reagovati sa hromatin vezanim proteinima i histon modifikujućim enzimima (Zhang i Kraus, 2010). Pored histona, SIRT1 mogu da interaguju sa širokim spektrom faktora transkripcije i time utiče na modulaciju

gena, na primer, na taj način utiče na suzbijanje inflamacije kroz kontrolu ekspresije NF- κ B. Osim toga, reguliše i ekspresiju različitih enzima uključenih u ćelijski ciklus (apoptozu, procese protiv starenja, metabolizam masti itd.) (Xia i sar., 2014).

Rezveratrol poseduje i antitumorsku aktivnost, odnosno sprečava nastanak i razvoj malignih ćelija (Jang i sar., 1997). Visoka koncentracija rezveratrola (50 mM) izazva smrt ćelija u modelu ljudskog neuroblastoma (van Ginkel i sar., 2007). Takođe, pokazano je da rezveratrol u koncentraciji od 100 mM tokom 48 h dovodi do apoptoze malignih ćelija debelog creva (DLD1 i HT29 ćelije) (Trincheri i sar., 2007). Potvrđeno je da primena rezveratrola u dozi 10 mg/kg tokom dva dana dovodi do smanjenja napredovanja maligniteta (Shukla i Singh, 2011).

Antiinflamatorna aktivnost rezveratrola povezana je sa inhibicijom ciklooksigenaze-1 (COX1) i ciklooksigenaze-2 (COX2) (Kundu i sar., 2006), ali sa uticajem na smanjenje proizvodnje prostaglandina E2 (PGE2) i formiranje ROS u mikroglijalnim ćelijama aktiviranim lipopolisaharidom (LPS) (Candelario-Jalil i sar., 2007, Kim i sar., 2007). Jedna studija je pokazala da rezveratrol ima analgetički efekat putem inhibicije COX1 i COX2 enzima (Bertelli i sar., 2008). Pored iznetog, rezveratrol suprimira aktivnost 15 T- i B-limfocita i makrofaga (Sharma i sar., 2007). Rezveratrol aktivira i kaspaza-zavisnu i kaspaza-nezavisnu apoptozu aktiviranih T-limfocita miševa (Singh i sar., 2007).

Osim pomenutog, bitno je da rezveratrol reguliše homeostazu redoks sistema kod sisara održavajući aktivnost nekoliko antioksidativnih enzima, uključujući glutation peroksidazu, glutation-S-transferazu i glutation reduktazu (Yen i sar., 2003). Pokazano je da rezveratrol je potentan inhibitor oksidacije nezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav LDL-holesterola. U stvari, pokazano je da je rezveratrol moćniji u prevenciji oksidacije katalizovane bakrom od flavonoida, na čemu se i zasniva njegova antioksidativna aktivnost na nivou LDL-holesterola (Frankel i sar., 1993).

Dostupni su mnogobrojni naučni dokazi da rezveratrol deluje kardioprotektivno (Petrovski i sar, 2011, Gojkovic-Bukarica i sar., 2013, Xia i sar., 2013, Platiša i sar, 2014), a u osnovi ovog dejstva su njegova antioksidativna, antiagregaciona, antiaterogena, antiinflamatorna i vazodilatatorna dejstva (Gojkovic-Bukarica i sar., 2013). Arteroskleroza je oboljenje koje karakteriše nagomilavanje lipida i fibroznih komponenata u arterijama.

Rezveratrol suprimira napredovanje arteroskleroze na nekoliko načina. Pre svega, utiče povoljno na endotelnu funkciju balansirajući produkciju endotel zavisnih relaksirajućih faktora povećavajući stvaranje azot monoksida (NO) dok inhibira produkciju vazokonstriktora endotelina (ET-1). Pored dejstva na endotel rezveratrol u koncentracijama većim od 1 μ M dovodi do vazorelaksacije preko dejstva na jonske kanale kalijumove i kalcijumske (Novakovic i sar., 2006, Gojkovic-Bukarica i sar., 2008).

Takođe, dejstvo rezveratrola na inflamaciju preko inhibicije sinteze COX2 posledično inhibira i stvaranje PGE2 koji je uključen u sve faze razvoja arteroskleroze. Postoje i studije koje ukazuju da je u osnovi antiinflamatornog delovanja rezveratrola inhibicija NF- κ B, koji se nalazi u endotelnim i glatko mišićnim ćelijama i uključen je u transkripciju više gena uključenih u inflamaciju. Ushodna regulacija inducibilne NO sintaze igra bitnu ulogu u vaskularnom oksidativnom stresu, endotelnoj disfunkciji i proarterogenoj inflamaciji. Rezveratrol smanjuje njenu ekspresiju i tako deluje vaskularno protektivno (Gojkovic-Bukarica i sar., 2013). U dozi od 10 – 1000 μ M/L inhibira i agregaciju trombocita, i sprečava na taj način razvoj arterosklerotičnog plaka što dodatno utiče na sprečavanje progresije arteroskleroze (Fan i sar., 2008).

U literaturi postoje opisi još nekoliko mogućih mehanizama dejstva rezveratrola, ali kako oni nisu bliski temi ovog rada neće biti detaljno diskutovani. Takođe, pokazano je da efekti rezveratrola zavise od primenjene koncentracije (Novakovic i sar., 2013, Gojkovic-Bukarica i sar., 2014), što je ilustrovano u tabeli 3.

Tabela 2. Efekti rezveratrola primenjenog u različitim koncentracijama (tabela preuzeta i adaptirana iz Gojkovic-Bukarica i sar., 2013.)

Koncentracija rezveratrola	Efekti
50 nM	Indukuje aktivnost eNOS i aktivira ERK.
0.15-0,25 μ M	Inhibira aktivaciju trombocita
10 μ M	Popravlja srčanu funkciju posle ishemijsko/reperfuzijskog oštećenja. Štiti srce od ishemijsko/reperfuzijskog oštećenja prekondicioniranjem miokarda.
25 μ M	Ispoljava kardioprotekciju u manjem stepenu.
2,5 mg/kg	Ublažava srčanu disfunkciju u dijabetesu izazvanom streptozotocinom
2,5-5 mg/kg	Popravlja funkciju srca posle ishemije. Smanjuje apoptozu kardiomiocita i infarkt miokarda.
22,4 mg/kg	Produžava životni vek miševa na hiperkalorijskoj dijeti pojačavajući ekspresiju SIRT1
50-100 μ M	Inhibira metaboličke aktivnosti i ćelijsku proliferaciju
1- 100 μ M	Inhibira kontrakcije

Rezveratrol i jonski kanali

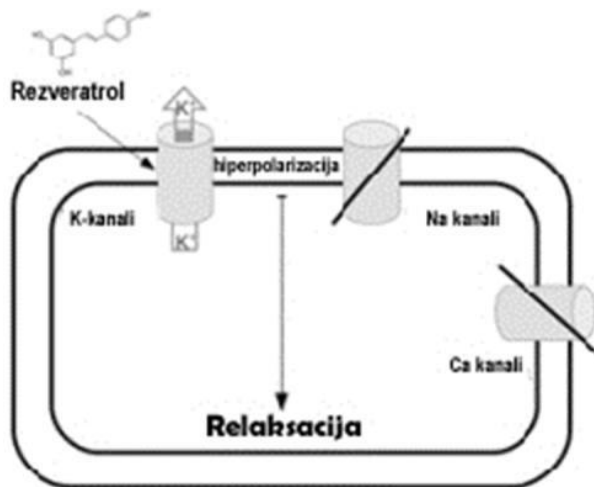
Na osnovu iznetog, može se zaključiti da je rezveratrol moćan regulator genomskih i negenomskih procesa koji uključuju DNK transkripciju, aktivnost enzima, sekreciju, apoptozu, modulaciju mitohondrijalne aktivnosti, ali između ostalih i regulaciju membranskog potencijala kroz modulaciju membranskih jonskih kanala i/ili unutarćelijskog Ca^{2+} (McCalley i sar., 2014).

U Laboratoriji za krvne sudove, Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dugi niz godina se ispituje kalijum zavisno dejstvo rezveratrola na modelima raznih krvnih sudova. Publikovane su desetine radova u kojima je pokazano da ovaj stilben dovodi do inhibicije kontrakcija jednim delom, aktivirajući direktno ili indirektno K kanale (Novaković i sar., 2006 a,b, Gojković-Bukarica i sar., 2008, Protić i sar., 2012, Novaković i sar., 2013, Gojković-Bukarica i sar., 2013, Protić i sar., 2014).

Dejstvo rezveratrola na K_{ATP} kanale opisano je na modelu srca pacova, kada je pokazano da ova supstanca otvaranjem ovog podtipa K kanala skraćuje trajanje AP i posledično, smanjuje kontrakcije srčane muskulature (Buluc i sar., 2007). Nedavno, relaksacija humane umbilikalne vene povezana je sa efektima rezveratrola u koncentraciji od 16 μ M na K_{ATP} kanale. Na potpuno drugačijim modelima, odnosno u β ćelijama pankreasa, elektrofiziološkim metodama je pokazano da se rezveratrol vezuje za regulatornu SUR1 jedinicu K_{ATP} kanala i tako blokira ove kanale (Hambrock i sar., 1998). Slično je pokazano na ćelijskoj kulturi insulinoma (Jakab i sar, 2008).

Može se reći da su BK_{Ca} kanali veza između metaboličkog i električnog stanja ćelije, jer depolarizacija kao i povećana koncentracija unutarćelijskog Ca^{2+} ih mogu aktivirati. Dejstvo rezveratrola sa ovim tipom K kanala povezano je na modelu glatkih mišića uterusu, vene *porte*, epitelijalnih ćelija retine, β ćelijama pankreasa (Novaković i sar., 2013, Protić i sar., 2012, Sheu i sar., 2008 i 2009, Chen i sar., 2007). Chen i sar. (2007) sugerišu da do aktivacije BK_{Ca} kanala na modeli ćelija pankreasa, ne dolazi direktno do aktivacije, već posredno usled povećane koncentracije unutarćelijskog Ca^{2+} . Međutim, u ćelijama endotela pokazano je da rezveratrol stimuliše ove kanale putem koji je nezavisan od Ca^{2+} (Chen i sar., 2008).

Kada je u pitanju relacija rezveratrol - Kv kanali postoji, takođe, velika diskrapanca u rezultatima. Na nekoliko modela krvnih sudova, humanih i životinjskih, uočeno je da Kv kanali učestvuju u relaksaciju koju je proizveo rezveratrol (Novakovic i sar 2006a, b, Gojkovic-Bukaca i sar., 2008). Nasuprot tome, na modelu ćelija pankreasa pokazano je da rezveratrol može da blokira ovaj tip K kanala (Chen i sar., 2007).



Slika 14. Uloga K kanala u relaksaciji glatkih mišića krvnih sudova koju izaziva rezveratrol (preuzeto iz: Gojkovic-Bukarica i sar., 2013)

Ove razlike u rezultatima, mogu biti objašnjene drugačijim eksperimentalnim modelima, odnosno selektivnošću rezveratrola za različite vrste i tkiva, što će detaljno biti razmatrano u diskusiji ovog rada.

Pored pomenutih procesa, postoji značajani dokazi da rezveratrol utiče na Ca^{2+} homeostazu, jednim delom može da deluje kao ligand za trans - membranske proteine (Sheu i Wu 2009), uključujući voltažno-zavisne Ca kanale (VGCC) i plazma membrana Ca ATPazu (PMCA) (Sareen i sar., 2007, Sulaiman i sar., 2010). Na modelima krvnih sudova, takođe, je pokazan Ca zavisni mehanizam rezveratrola (Novakovic i sar., 2006a, Protic i sar., 2012).

Međutim, uprkos velikom interesovanjem za efekte rezveratrola na raznim glatkim mišićima, uticaj rezveratrola na kontraktilnost materice nije definisan. Postoje dokazi da rezveratrol relaksira arterijske krvne sudove i povećava protok krvi do fetusa uterusa *in vivo*, *ex vivo* (Poudel i sar., 2013) i *in vitro* (Naderali i sar., 2000). Kada je u pitanju veza rezveratrol - K kanali - glatki mišići uterusa, može se slobodno reći da su nalazi malobrojni. Prema našim saznanjima, postoji samo jedna studija koja se bavi efektima rezveratrola na negravidni uterus. Hsia i sar. (2011) su pokazali da rezveratrol inhibira kontrakcije negravidnog uterusa pacova indukovane prostaglandinom $F2\alpha$, -okitocinom, acetilholinom i karbaholom. Takođe, su pokazali da rezveratrol može da inhibira i kontrakcije indukovane visokomolarnim rastvorom K^+ i aktivatorom Ca kanala (Bai K 8644), što ukazuje na Ca - zavisno dejstvo ove supstance. Oni su zaključili da rezveratrol

suzbija povećanje unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} do kojeg dolazi delovanjem agonista na različite receptore.

Stoga, od značaja je da se ovim istraživanjem bliže definiše dejstvo biljnih polifenola na glatke mišiće kako gravidnog tako i negravidnog uterusa, jer su ove supstance aktivni principi velikog broja biljaka i dijetetskih proizvoda koji su prisutni u ishrani. Takođe, je od naučnog značaja ispitati mehanizam dejstva rezveratola na kontraktilnost glatkih mišića materice, kao i detektovati tipove K kanala u ovom tkivu.

Uzimajući u obzir sve navedeno postavljena je **radna hipoteza:**

Rezveratrol i naringenin izazivaju koncentracijski - zavisnu relaksaciju animalnog negravidnog i humanog gravidnog uterusa aktivacijom K kanala. Rezveratrol i naringenin imaju i dejstva koja ne zavise od modulacije K kanala.

II CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U okviru istraživanja ove doktorske disertacije razmatra se mogućnost razvoja lekova, potencijalnih tokolitika na bazi prirodnih polifenola, rezveratrola i naringenina, koji su prisutni u namernicama prirodnog porekla. Razvoj visoko specifičnog agoniste K kanala u glatkoj muskulaturi uterusa može imati terapeutsku vrednost u regulaciji i sprečavanju nepoželjne kontraktilnosti u poremećajima kao što su dismenoreja i prevremeni porođaj.

Sa obzirom da uticaj rezveratrola na glatke mišiće materice kako humane tako i životinjske, kako gravidne tako i negravidne nije istražen, mi smo definisali sledeće ciljeve ove studije:

1. Ispitati efekte rezveratrola na tri modela kontrakcija izolovanog negravidnog uterusa pacova (spontane ritmičke kontrakcije, fazne oksitocinom-indukovane kontrakcije i tonične oksitocinom-indukovane kontrakcije) i definisati ulogu K_{ATP} , BK_{Ca} i K_v kanala u mehanizmu delovanja rezveratrola.
2. Ispitati efekte rezveratrola na oksitocinom-indukovane kontrakcije IVF gravidnog humanog miometrijuma. Definirati ulogu K_{ATP} , BK_{Ca} i K_v kanala u mehanizam delovanja rezveratrola.

3. U okviru mehanizma dejstva proučiti dodatne mehanizme delovanja rezveratrola koji nisu vezani za aktivaciju kalijumovih kanala.
4. Uporediti efekte rezveratrola sa efektima sintetskih otvarača kalijumovih kanala – pinacidilom i NS 1619.
5. Ispitati efekte naringenina na tri modela kontrakcija izolovanog negravidnog uterusa pacova (spontane ritmičke kontrakcije, fazne i tonične kontrakcije indukovane oksitocinom) i kontrakcije gravidnog uterusa žena iz programa *in vitro* fertilizacije i uporediti efekte naringenina sa efektima rezveratrola.
6. Odrediti ekspresiju K_{ATP} (Kir6.1, Kir6.2 subjedinica), BK_{Ca} ($K_{Ca1.1}$ α subjedinice) i Kv kanala (α subjedinice Kv2.1, Kv4.2 podtipova) i kvantifikovati njihov odnos u glatko-mišićnom tkivu negravidnog uterusa pacova i gravidnog uterusa žena iz programa *in vitro* fertilizacije.

III MATERIJAL I METODE

Istraživanja čiji su rezultati prikazani i diskutovani u ovom radu sprovedana su na izolovanom uterus neparenih ženki pacova soja Wistar i glatko-mišićnom sloju humanog uterusa (miometrijumu) uzorkovanog od pacijentkinja kojima je porođaj izveden operacijom („carskim rezom” – *sectio caesarea*) na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije. Sva ispitivanja vršena su u saglasnosti sa Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije („Službeni glasnik RS“, broj 41/09), odgovarajućim pravilnikom („Službeni glasnik RS“, broj 39/10) kao i međunarodnom zakonskom regulativom (Directive 2010/63/EU and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed) uz poštovanje smernica „Dobre laboratorijske prakse“. Studija je odobrena od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja (dozvola br. 4211/2) i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (dozvola br. 440/X-5).

1. IZOLOVANJE I PRIPREMA TKIVA ZA *in vitro* EKSPERIMENTE

1.1. Uzorci životinjskog uterusa

Životinje korišćene u eksperimentima su bile neparene ženke soja *Wistar* prosečne telesne mase oko 200 grama koje su držane pod standardnim uslovima, na sobnoj

temperaturi uz uobičajenu smenu noći i dana i uz slobodan pristup hrani i vodi. Da bi se izbegao eventualni uticaj lekova za omamljivanje ili otrova za usmrćivanje na rezultate sprovedenih eksperimenata, životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom i iskrvavljenjem posle presecanja obe karotidne arterije. Potom je abdomen otvaran u obliku slova V i izolovana su oba roga uterusa. Po izdvajanju, preparat je održavan u kupatilu za izolovane organe (TSZ-04/1.2, Experimetria, Budimpešta, Mađarska) na temperaturi od 37 °C u Krebs Ringer rastvoru kroz koji je propuštana mešavina od 95 % kiseonika i 5 % ugljendioksida, pH 7.4. Deo roga uterusa dužine 1 cm je smeštan u kupatilo tako što je jednim krajem uz pomoć konca bio fiksiran za nosač na dnu kupatilaca (10 ml), a drugim krajem vezan za transdjuser (TSZ-04/1.2, Experimetria, Budimpešta, Mađarska) koji registruje promene izometrijske tenzije mišića. Postepeno, preparati su istezani do optimalne tačke zatezanja od 1 g (Hughes i Hollingsworth, 1995). Pre početka eksperimenata preparati su inkubirani 45 minuta. Korišćen je po jedan preparat za svaki eksperiment. Kontraksije se beležene IsoLAB softverom (Elunit, Beograd, Srbija) koji je povezan sa transdjuserom.

1.2. Uzorci humanog uterusa

Uzorci miometrijuma uzimani su nakon izvršenog porađaja operacijom od 33 pacijentkinja kod kojih nije počeo porođaj, a bile su u trećem trimestru trudnoće. Demografski podaci majki bili su: prosečna starost 34,95 godina (raspon godina od 27 do 42), medijana perioda gestacije bila je 39 nedelja trudnoće (raspon od 37 do 40 nedelje trudnoće). Pacijentkinje su bile iz programa vantelesne oplodnje (*in vitro* fertilizacija). Program *in vitro* fertilizacije i nega tokom graviditeta sprovedeni su u skladu sa preporukama 'Fertility' (NICE kliničkog vodiča 11, 2004). Porodilje nisu primale tokolitičke lekove 24h pre porađaja carskim rezom. Indikacije za carski rez su bile prethodni porođaj carskim rezom, karlični položaj bebe, cefalopelvična disproporcija. Biopsija miometrijuma rađena je iz središta gornjeg dela od reza. Neposredno nakon uzimanja, uzorak tkiva prosečne veličine 10x5x5 mm stavljan je u Krebs Ringerov rastvor i na njemu su sprovedeni eksperimenti merenja izometrijske tenzije ili je čuvan na 4°C

najviše 12h do eksperimentalnog rada. Deo tkiva je zamrzavan u tečnom azotu i ostavljan na - 80 °C za *western blot* analizu ili odlagan u formalinu (10 %) za imunohistohemijsko bojenje specifičnim antitelima.

Za farmakološke eksperimente, preparat je isecan na veličinu 10x2x2 mm i stavljan u kupatilo za izolovane organe (TSZ-04/1.2, Experimetria, Budimpešta, Mađarska), tako što je pričvršćivan donjim delom za nosač u kupatilu (10 ml) ispunjenom Krebs Ringerovim rastvorom. Gornji kraj preparata povezivan je hiruškim koncem za transdjuser (TSZ-04/1.2, Experimetria, Budimpešta, Mađarska). Postepeno preparati su istezani do optimalne tačke zatezanja od 2 g (Khan i sar., 1999). Pre početka eksperimenata preparati su inkubirani 45 minuta (37 °C u Krebs–Ringer rastvoru kroz koji je propušтана mešavina od 95 % kiseonika i 5 % ugljendioksida, pH 7.4). Korišćen je po jedan preparat za svaki eksperiment. Kontraksije se beležene IsoLAB softverom (Elunit, Beograd, Srbija) koji je povezan sa transdjuserom.

Pratni podaci koji su bili neophodni tokom istraživanja uzimalo je medicinsko osoblje porodilišta iz medicinske dokumentacije porodilje. Podaci od interesa za ovu studiju bili su: da li je porodilja iz program vantelesne oplodnje ili je spontani graviditet, datum porađaja, da li su počele porađajne kontrakcije (takvi uzorci nisu uključeni u ovo istraživanje), da li je planiran ili hitni carski rez, starost porodilje, u kojoj nedelji graviditeta (gestaciona starost) je porađaj obavljen.

1.3. Eksperimentalna procedura

U posebnim serijama eksperimenata ispitivan je inhibitorski potencijal rezveratrola i naringenina na kontrakcije glatke muskulature životinjskog i humanog uterusa. Kod animalnih preparata posle perioda inkubacije, 37 % preparata je pokazivalo spontanu ritmičku aktivnost. U takvim slučajevima, preparati bi se ostavili oko 30 min da se stabilizuju kontrakcije pre davanja supstanci. U drugim serijama eksperimenata, kontrakcije su izazivane oksitocinom kod životinjskih preparata sa 0.2 nM (fazne kontrakcije), 20 nM (tonične kontrakcije), kod uzoraka humanog miometrija sa 2 nM. Nakon stabilizacije kontrakcija (~ 30 minuta) davan je rezveratrol (1 – 100 μM) ili

naringenin (1 μM – 1 mM) direktno u kupatilce na kumulativni način i konstruisane su koncentracijski-zavisne krive. U cilju poređenja efekata rezveratrola sa OKK korišćeni su NS 1619 (0.001-100 μM), selektivni otvarač BK_{Ca} kanala i pinacidil (0.001-100 μM) prevalentno otvarač K_{ATP} kanala, na kumulativni način direktnim davanjem rastućih koncentracija u kupatilce. Za svaki eksperiment konstruisane su koncentracijski-zavisne krive. Veća koncentracija davana je tek pošto je prethodna postigla ekvilibrijum efekta ili 10-20 minuta ako je efekat izostao. Kontrolom su se smatrale amplitude i frekvencija kontrakcija neposredno pre davanja supstanci.

U narednim serijama eksperimenata ispitivan je potencijalni antagonizam rezveratrola sa BKK (glibenklamidom, tetraetilamonijumom-TEA, iberiotoksinom, 4-aminopirimidinom- 4-AP). Blokatori su davani 20 minuta pre rezveratrola ili OKK i u njihovom prisustvu konstruisane su ponovo koncentracijski-zavisne krive.

Da bi se ispitao efekat rezveratrola na kontrakcije koje su zavisile isključivo od unutarćelijskog izvora Ca^{2+} , upotrebljen je sledeći protokol: 1. Tkivo je inkubirano u Krebs Ringer rastvoru 45 minuta, zatim je taj rastvor zamenjen rastvorom bogatim K^+ i bez prisustva Ca^{2+} "*K⁺ rich, Ca²⁺ free*". Tkivo je potom stimulisano sa 20 nM oksitocina što je dovelo do izazivanja kontrolne tonične kontrakcije. Ponovljena su prva dva koraka, tkivo je inkubirano ponovo u Krebs Ringerovom a potom "*K⁺ rich, Ca²⁺ free*" rasvoru. U sledećem koraku davane su pojedinačne koncentracije rezveratrola (1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM and 100 μM) i posle 10 minuta izazivana je kontrakcija oksitocinom. Kontrolne kontrakcije su smatrane kao 100%.

Sprovedeni su i eksperimenti u kojima su testirani potencijalni efekti rastvarača supstanci koje smo koristili, tj. etanola, dimetilsulfoksid (DMSO) i propilen glikola na kontrakcije uterusa i nije uočen nikakav uticaj.

1.4. Supstance i rastvori

Rezveratrol i NS 1619 su rastvarani u 70% (v/v) etanolu, dok su dalja razblaženja pravljena destilovanom vodom neposredno pre upotrebe. Radne koncentracije etanola u ovom slučaju nisu bile veće od 0.01% (v/v) u kupatilcu. Glibenklamid je rastvaran u

propilen glikolu. Pinacidil je rastvaran u destilovanoj vodi uz dodatak kapi 0.1 N HCl, dalja razblaženja su pravljena neposredno pre upotrebe u destilovanoj vodi. Naringenin je rastvaran u DMSO, dalja razblaženja pravljena su u rastvoru destilovana voda: DMSO u odnosu 50 : 50 neposredno pre upotrebe. Iberiotoksin, 4-AP i oksitocin su rastvarani u destilovanoj vodi. Sadržaj Krebs Ringer rastvora bio je sledeći (izražen u mmol/l): NaCl 120, KCl 5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glukoza 11. *K⁺- rich, Ca²⁺- free* rastvor bio je pripremen bez CaCl₂ dodavanjem 1 mM EGTA, i koncentracija KCl (60 mM) je bila povećana izoosmotskom zamenom NaCl. Svi lekovi su davani direktno u kupatilce u zapremini od 50 µL. Koncentracije supstanci su izražavane kao molarna koncentracija (M) supstance u rastvoru kojim je bilo ispunjeno kupatilo za izolovane organe. Zbog fotosenzitivnosti rezveratrola svi eksperimenti su izvođeni u mraku.

Proizvođač oksitocina bio je Galenika, Srbija, pinacidila Leo Pharmaceutical, Danska, dok svih ostalih korišćenih supstanci Sigma-Aldrich Inc., SAD.

3. IDENTIFIKACIJA K KANALA SPECIFIČNIM ANTITELIMA U GLATKO-MIŠIĆNOM TKIVU UTERUSA

Uzorci tkiva koji su se koristili za *western blot* bili su ispirani Krebs Ringerovim rastvorom i zamrzavani u tečnom azotu, a potom čuvani na -80°C. Uzorci za imunohistohemijsku identifikaciju K kanala specifičnim antitelima odlagani su u formalin.

3.1 *Western blot*

Uzorci izolovanog uterusa pacova i humanog miometrijuma homogenizovani su u RIPA puferu sa proteaznim inhibitorima (Roche Applied Science, Mannheim, Nemačka). Čeliski lizati su potom centrifugirani na 11000 obrtaja, na 4°C tokom 20 minuta i supernatant je prebečen u nove tube. Koncentracija proteina u supernatantu određivana je

na 595 nm spektrofotometra koristeći *Bio-Rad Protein* probe metodom po Bradford-u. Pre odvajanja proteina elektroforezom (SDS-PAGE) na 4-12% Bis-Tris gelu (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD), dodati su *LDS Sample Buffer* i *Reducing Agent* i potom su proteini inkubirani/denaturisani 10 minuta na 70°C. Nakon elektroforeze odvojeni proteini su prebačeni na nitrocelulozne membrane. Membrane su blokirane sa 5% mlekom u prahu i 0.1% *Tween 20* jedan sat na sobnoj temperaturi. Potom su membrane inkubirane preko noći na 4 °C sa pojedinačnim primarnim antitelima (Anti-Kir6.1; Anti-Kir6.2; Anti-Kv2.1; Anti-Kv4.2; Anti-K_{Ca}1.1; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) i ispitivano je prisustvo Kir6.1 i Kir6.2 subjedinice K_{ATP} kanala, α - subjedinice Kv2.1 i Kv4.2 podtipa Kv kanala i K_{Ca}1.1 subjedinice BK_{Ca} kanala. Membrane su potom inkubirane sa sekundarnim HRP-konjugovanim anti-zečjim antitelom 1.5 h na sobnoj temperaturi. *Western blotting* kit (Roche, Applied Science, Mannheim, Nemačka) je upotrebljen za hemiluminiscirajuću detekciju proteina. Posle vizuelizacije na hiperosetljivom filmu, antitela su uklanjana sa membrana pomoću 0.2 M NaOH. Kada su membrane isprane nanošeno je specifično antitelo za β -aktin (Abcam, Cambridge, Engleska). Ponovljena je vizuelizacija na filmu. Kvantifikacija proteina tipova K kanala urađena je u odnosu na β -aktin. *ImageQuant* softver je korišćen za kvantitativnu analizu (Beleslin-Cokic i sar., 2011).

3.2 Imunohistohemijsko bojenje

Parafinski preseci humanog tkiva uterusa debljine 5 μ m su deperafinirani i dehidrirani. Za dalja antigen pretraživanja korišćen je citratni pufer (pH 6.0) tokom 20 minuta u mikrotalasnoj pećnici. Korišćena su ista primarna antitela kao u *western blot* metodi rastvorena u odnosu 1:50 i inkubirana na tkivima 1h na sobnoj temperaturi. Preseci su onda tretirani *EnVision™ Detection System* (Dako, Nemačka) koristeći 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) kao supstrat i kontrast hemotoksilinu. Negativne kontrole su pravljene bez prisustva primarnog antitela i bojeni metodom *EnVision™*. Pločice su posmatrane pod svetlosnim mikroskopom BX53 sa kamerom DP12-CCD (Olympus, Nemačka).

4. OBRADA PODATAKA I STATISTIČKA ANALIZA

Amplitude faznih kontrakcija su merene od početka do vrha šiljka, dok su amplitude toničnih kontrakcija merene od bazne linije do platoa. Frekvencija faznih kontrakcija je računana kao broj kontrakcija-relaksacija (ciklusa) u 10 minuta. Srednje vrednosti amplitude i frekvencije tokom kontrolnog perioda uzimane su kao 100%.

Koncentracija agoniste koja proizvodi 50% maksimalnog efekta smatrana je za srednju efektivnu koncentraciju (EC_{50}) i računata je za svaki eksperiment uz pomoć grafikona linearnom interpolacijom i predstavljena kao pD_2 vrednost ($pD_2 = -\log EC_{50}$). Rezultati su izražavani kao srednje vrednosti \pm standardna greška (s.e.m.); n označava broj eksperimenata. Za poređenje većeg broja grupa podataka korišćena je parametarska, jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA), a za poređenje dve grupe Studentov t -test. Verovatnoća, $P < 0.05$ je smatrana statistički značajnom. Za proračune korišćen je kompjuterski program GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, SAD).

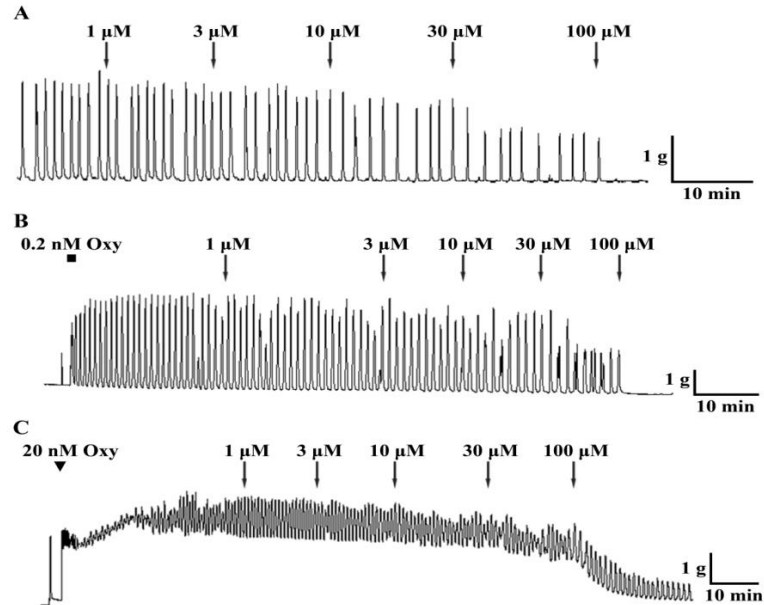
IV REZULTATI

1. EFEKTI REZVERATROLA NA KONTRAKCIJE IZOLOVANOG UTERUSA PACOVA

U ovom delu studije ispitivali smo inhibitorni potencijal rezveratrola na SRK, fazne (FOK) i tonične (TOK) kontrakcije indukovane oksitocinom (0.2 nM, odnosno 20 nM) izolovanog uterusa pacova.

1.1. Efekti rezveratrola na SRK i kontrakcije indukovane oksitocinom kod izolovanog uterusa pacova

SRK longitudinalnih mišićnih traka uterusa pacova imale su amplitudu prosečno 2.29 ± 0.9 g i frekvenciju 10.07 ± 1.20 kontrakcija u 10 minuta, kao što je prikazano na originalnim zapisima eksperimenata, slika 15 A (n = 12). Rezveratrol (1 – 100 μ M) koncentracijski-zavisno inhibira SRK sa pD_2 vrednošću 4.53 ± 0.20 i maksimalnim efektom 93.64 ± 2.53 %, n = 12 (slika 16 A). Iste koncentracije rezveratrola signifikantno utiču i na smanjenje frekvencije u koncentracijski-zavisnom maniru sa 10.07 ± 1.20 (kontrola) do 3.00 ± 0.89 (100 μ M rezveratrola) kontrakcija / 10 minuta, $P < 0.05$, pD_2 vrednost je bila 4.34 ± 0.66 , n = 12. Rezultati su predstavljani kao pD_2 vrednosti u tabeli 3.



Slika 15. Originalni eksperimentalni zapisi efekta rezvertrola (1 – 100 μM) na kontrakcije negravidnog uterusa pacova: **(A)** SRK, **(B)** fazne kontrakcije izazvane oksitocinom (0.2 nM, kvadrat), **(C)** tonične kontrakcije izazvane oksitocinom (20 nM, trougao)

Aplikacija nanomolarnih koncentracija oksitocina (0.2 nM) u kupatilo za izolovane organe dovodi do nastanka faznih kontrakcija prosečne amplitude 2.95 ± 0.70 g i frekvencije 11.59 ± 1.08 (n = 12, slika 15 B). Rezveratrol (1 – 100 μM) koncentracijski zavisno i statistički značajno inhibira amplitudu FOK sa pD_2 vrednošću 4.66 ± 0.28 , maksimalnim odgovorom 93.67 ± 3.00 %, n = 12, (slika 16 B). Rezveratrol u istim koncentracijama inhibira i frekvenciju ovih kontrakcija, rezultati su prikazani u tabeli 3.

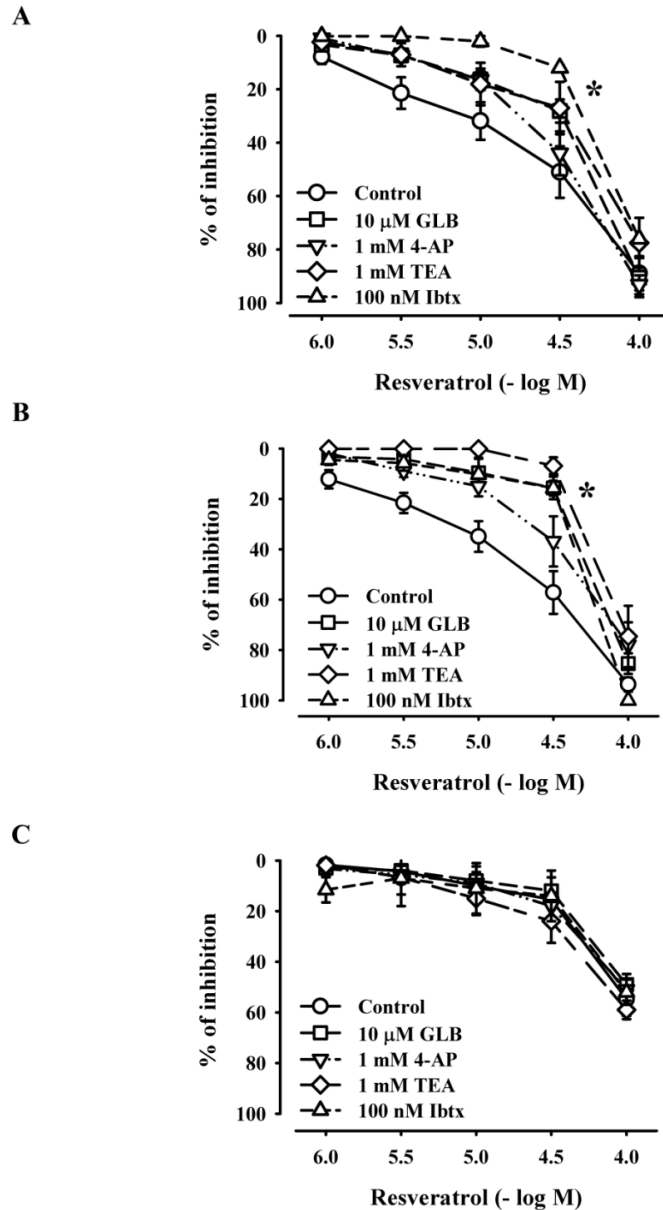
Tabela 3. Efekti rezveratrola na frekvenciju SRK i faznih kontrakcija izazvanih oksitocinom (0.2 nM) u odsustvu i u prisustvu BKK

Rezveratrol koncentracije (μM)		1	3	10	30	100
SRK	Kontrola	9.14*	8.43	7.44	6.57*	3.00*
	GLB	12.14*	7.00	8.86	7.86	2.57*
	TEA	12.25	7.5	6.5	6.00	2.50
	Ibtx	6.00	5.75	5.50	4.66	3.67
	4-AP	8.00	6.50	6.25	4.75	2.50
Fazne kontrakcije indukovane oksitocinom (0.2 nM)	Kontrola	10.42*	8.50	7.25	5.40*	3.00*
	GLB	6.33	6.33	6.00	6.00**	1.67*
	TEA	6.71	5.86	5.71	5.00	1.14**
	Ibtx	8.50	8.00	7.50	7.00	1.50**
	4-AP	5.75	5.50	4.25	3.50	2.50

Svaka pD_2 vrednost predstavljena je kao srednja vrednost za n eksperimenata. * $P < 0.05$ kada se porede pD_2 vrednosti u odsustvu i u prisustvu BKK.

Oksitocin u koncentraciji od 20 nM indukuje toničnu kontrakciju koju može da prati i pojava faznih kontrakcija (slika 13 C). Rezveratrol (1 – 100 μM) koncentracijski zavisno i statistički značajno inhibira TOK sa pD_2 vrednošću 4.06 ± 0.29 i maksimalnim odgovorom $54.78 \pm 4.52 \%$, $n = 9$.

1.2. Uticaj različitih BKK na inhibiciju kontrakcija prouzrokovanu rezveratrolom



Slika 16. Koncentracijski-zavisne krive za rezveratrol dobijene u odsustvu (krug) i prisustvo glibenklamida (10 uM, kvadrat), 4-AP (1 mM, trougao dole), TEA (1 mM, romb) i iberiotoksina (100 nM, trougao gore) na izolovanom negravidnom uterusu pacova na modelima: **(A)** SRK, **(B)** FOK i **(C)** TOK. Tačke su srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju SEM (n = 5-12). * P < 0.05.

1.2.1. Spontane ritmičke kontrakcije - SRK

Da bi ispitali da li su u mehanizam dejstva rezveratrola uključeni K kanali koristili smo BKK: glibenklamid, visoko specifični blokator K_{ATP} kanala, TEA nespecifični i iberiotoksin visoko specifični blokator BK_{Ca} kanala, 4-AP nespecifični blokator K_v tipa. Takođe, da bi poredili dejstvo rezveratrola sa OKK koristili smo visoko selektivni otvarač BK_{Ca} kanala, NS 1619 i pinacidil koji je selektivan za K_{ATP} kanale.

Glibenklamid (10 μ M, n = 7), visoko selektivni blokator K_{ATP} kanala dovodi do statistički značajnog pomeranja koncentracijski-zavisne krive za rezveratrol u desno. Vrednosti pD_2 su bile 4.53 ± 0.20 u odsustvu i 4.33 ± 0.40 u prisustvu glibenklamida, $P < 0.05$. Međutim, glibenklamid ne dovodi do supresije maksimalnog odgovora kod SRK (93.64 ± 2.53 % u odsustvu i 90.50 ± 5.21 % u prisustvu glibenklamida, $P > 0.05$, slika 16 A).

TEA (1 mM, n = 6), statistički značajno antagonizuje inhibiciju SRK postignutu rezveratrolom. Vrednosti pD_2 su bile 4.53 ± 0.20 kod kontrolne krive u odnosu na 4.40 ± 0.30 u prisustvu TEA, $P < 0.05$). TEA signifikantno antagonizuje i maksimalni odgovor: 93.64 ± 2.53 % u odsustvu u odnosu na 77.50 ± 3.08 % u prisustvu TEA, $P < 0.05$, slika 16 A.

Iberiotoksin (100 nM, n = 5), signifikantno utiče na inhibiciju SRK rezveratrolom, pD_2 vrednost kod kontrolne krive je bila 4.53 ± 0.20 u odnosu na 4.20 ± 0.51 u prisustvu iberiotoksina, $P < 0.05$. Dovodi do signifikantnog antagonizma maksimalnog odgovora, 93.64 ± 2.53 % kod kontrolne krive u odnosu na 76.20 ± 5.66 % u prisustvu iberiotoksina, $P < 0.05$, slika 16 A.

Predominantni blokator K_v tipa, 4-AP (1 mM, n = 9), signifikantno utiče na inhibiciju SRK rezveratrolom, pD_2 vrednost kod kontrolne krive je bila 4.53 ± 0.20 u odnosu na 4.41 ± 0.50 u prisustvu 4-AP, $P < 0.05$, ali ne dovodi do signifikantnog antagonizma maksimalnog odgovora, 93.64 ± 2.53 % kod kontrolne krive u odnosu na 93.22 ± 6.47 % u prisustvu 4 - AP, $P > 0.05$, slika 16 A.

Kada se posmatra uticaj primenjenih BKK na frekvenciju SRK, uočeno je da iberiotoksin (100 nM, n = 5) i TEA (1 mM, n = 6) statistički značajno utiču na inhibiciju frekvencije do koje dovodi rezveratrol (pD_2 vrednosti su bile: 4.34 ± 0.66 kod kontrole u

odnosu na 3.47 ± 0.41 u prisustvu iberiotoksina; odnosno, 4.01 ± 0.37 u prisustvu TEA, $P < 0.05$). Glibenklamid ($10 \mu\text{M}$, $n = 7$) i 4-AP (1 mM , $n = 9$) ne utiču na redukciju frekvencije do koje dovodi rezveratrol, $P > 0.05$ (pD_2 vrednosti su 4.36 ± 0.30 , odnosno 4.33 ± 0.59 , tabela 3).

1.2.2. Fazne kontrakcije indukovane oksitocinom (0.02 nM) - FOK

Oksitocin u nanomolarnim koncentracijama (0.2 nM) indukuje stvaranje faznih kontrakcija prosečne amplitude $2.95 \pm 0.70 \text{ g}$ i frekvencije 11.59 ± 1.08 ($n = 12$, slika 15 B). Rezveratrol ($1 - 100 \mu\text{M}$) visoko statistički značajno i koncentracijski-zavisno inhibira amplitudu i frekvenciju FOK sa pD_2 vrednošću 4.66 ± 0.28 , dok je maksimalni odgovor bio $93.67 \pm 3.00 \%$, $n = 12$, (slika 16 B). Rezveratrol u istim koncentracijama je inhibirao i frekvenciju na koncentracijski-zavisan način, pD_2 vrednost je bila 4.69 ± 0.38 , $n = 12$, slika 15 B.

Glibenklamid ($10 \mu\text{M}$, $n = 5$) statistički značajno antagonizuje inhibiciju FOK postignutu rezveratrolom. Vrednosti pD_2 su bile 4.66 ± 0.28 u odsustvu i 4.26 ± 0.73 u prisustvu glibenklamida, $P < 0.05$ (tabela 4). Glibenklamid dovodi i do supresije maksimalnog odgovora: $93.67 \pm 3.00 \%$ kontrola u odnosu na $85.40 \pm 5.19 \%$ u prisustvu glibenklamida, $P < 0.05$, (slika 16 B).

TEA ($n = 5$) u koncentraciji od 1 mM izaziva statistički značajnu supresiju inhibicije FOK koju prouzrokuje rezveratrol, pD_2 vrednosti su bile 4.66 ± 0.28 bez prisustva TEA u odnosu na 4.19 ± 0.72 u prisustvu TEA, $P < 0.05$) i maksimalnog odgovora, $93.67 \pm 3.00 \%$ bez prisustva TEA u odnosu na $74.60 \pm 7.44 \%$ u prisustvu TEA, $P < 0.05$, $n = 5$, slika 16 B.

Iberiotoksin (100 nM , $n = 5$) dovodi do statistički značajne supresije inhibicije FOK koju prouzrokuje rezveratrol, pD_2 vrednosti su bile 4.66 ± 0.28 bez prisustva iberiotoksina u odnosu na 4.30 ± 0.21 u prisustvu iberiotoksina, $P < 0.05$, ali ne dovodi do supresije maksimalnog odgovora, $93.67 \pm 3.00 \%$ bez prisustva iberiotoksina u odnosu na $94.56 \pm 1.68 \%$ u prisustvu iberiotoksina, $P > 0.05$, $n = 5$, slika 16 B.

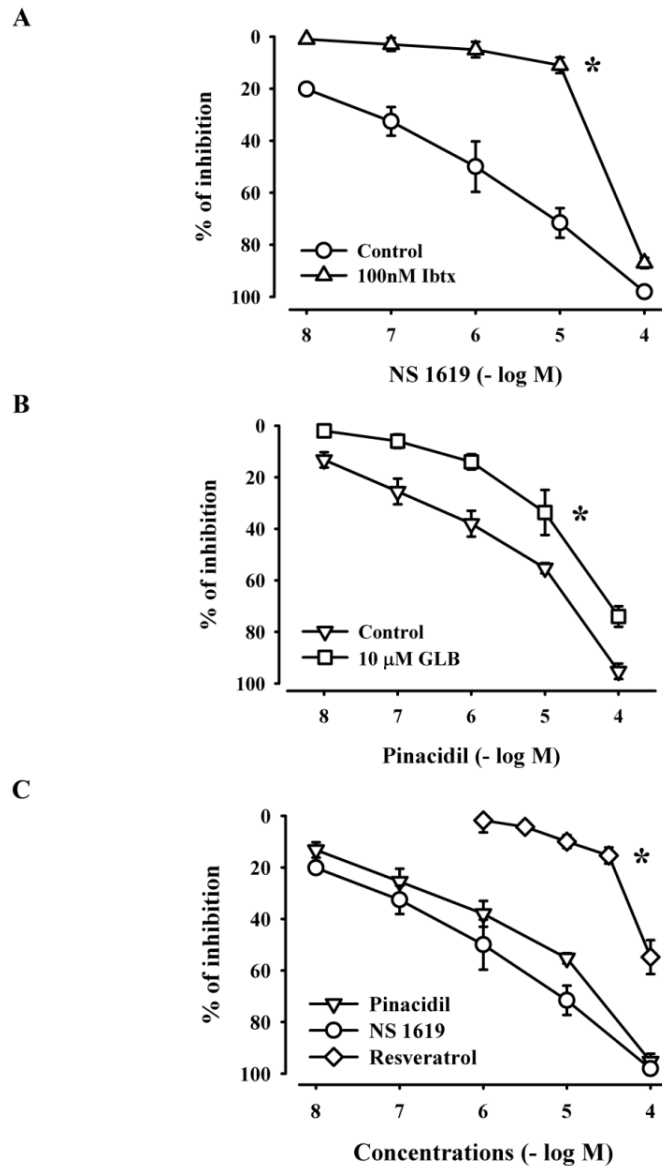
Do statistički značajne supresije inhibicije FOK koju prouzrokuje rezveratrol dovodi 4-AP (1 mM), pD₂ vrednosti su bile 4.66 ± 0.28 bez prisustva 4-AP u odnosu na 4.34 ± 0.55 u prisustvu 4-AP, $P < 0.05$, $n = 7$ i maksimalnog odgovora, 93.67 ± 3.00 % bez prisustva 4-AP u odnosu na 78.00 ± 6.00 % u prisustvu 4 - AP, $P < 0.05$, slika 16 B.

Iberiotoksin (100 nM, $n = 5$) i TEA (1 mM, $n = 5$) statistički značajno smanjuju redukciju frekvencije FOK do koje dovodi rezveratrol (pD₂ vrednosti: 4.69 ± 0.38 kontrola u odnosu na 4.30 ± 0.62 u prisustvu iberiotoksina, odnosno 4.35 ± 0.71 u prisustvu TEA, $P < 0.05$. Glibenklamid (10 μ M, $n = 5$) i 4 - AP (1 mM, $n = 7$) ne dovode do statistički značajnog smanjivanja redukcije frekvencije FOK (pD₂ vrednosti: 4.67 ± 0.83 , odnosno 4.60 ± 0.59).

1.2.3. Tonične kontrakcije indukovane oksitocinom (20 nM) - TOK

Oksitocin (20 nM) u koncentracijama većim od 10 nM indukuje toničnu kontrakciju koju može, ali ne mora da prati i pojava faznih kontrakcija (slika 15 C). Kod ovog tipa kontrakcije uočeno je da rezveratrol dovodi do koncentracijski-zavisne relaksacije gde je pD₂ vrednost 4.06 ± 0.29 , a maksimalni odgovor 54.78 ± 4.52 %, $n = 9$. Svi primenjeni BKK, glibenklamid (10 μ M, $n = 5$), TEA (1 mM, $n = 5$), iberiotoksin (100 nM, $n = 5$) i 4 - AP (1 mM, $n = 5$) nisu doveli do pomeranja koncentracijski-zavisne krive za rezveratrol u desno, ni do supresije maksimalnog odgovora TOK (slika 16 C).

1.3. Efekti OKK na tonične oksitocinom indukovane kontrakcije



Slika 17. Efekti OKK NS 1619 i pinacidila poređeni sa efektima rezveratrola na TOK. **(A)** Koncentracijski – zavisna kriva za NS 1619, visoko specifični otvarač BK_{Ca} kanala u odsustvu (krug) i prisustvu (trougao) iberiotoksina (100 nM); **(B)** koncentracijski – zavisna kriva za pinacidil, predominantni otvarač K_{ATP} kanala u odsustvu (trougao) i prisustvu (kvadrat) glibenklamida (10 μ M); **(C)** odnos potentnosti: koncentracijski – zavisne krive za NS 1619 (krug), pinacidil (trougao dole) i rezveratrol (romb). Tačke su srednje vrednosti a vertikalne linije pokazuju SEM (n = 5-12). * P < 0.05

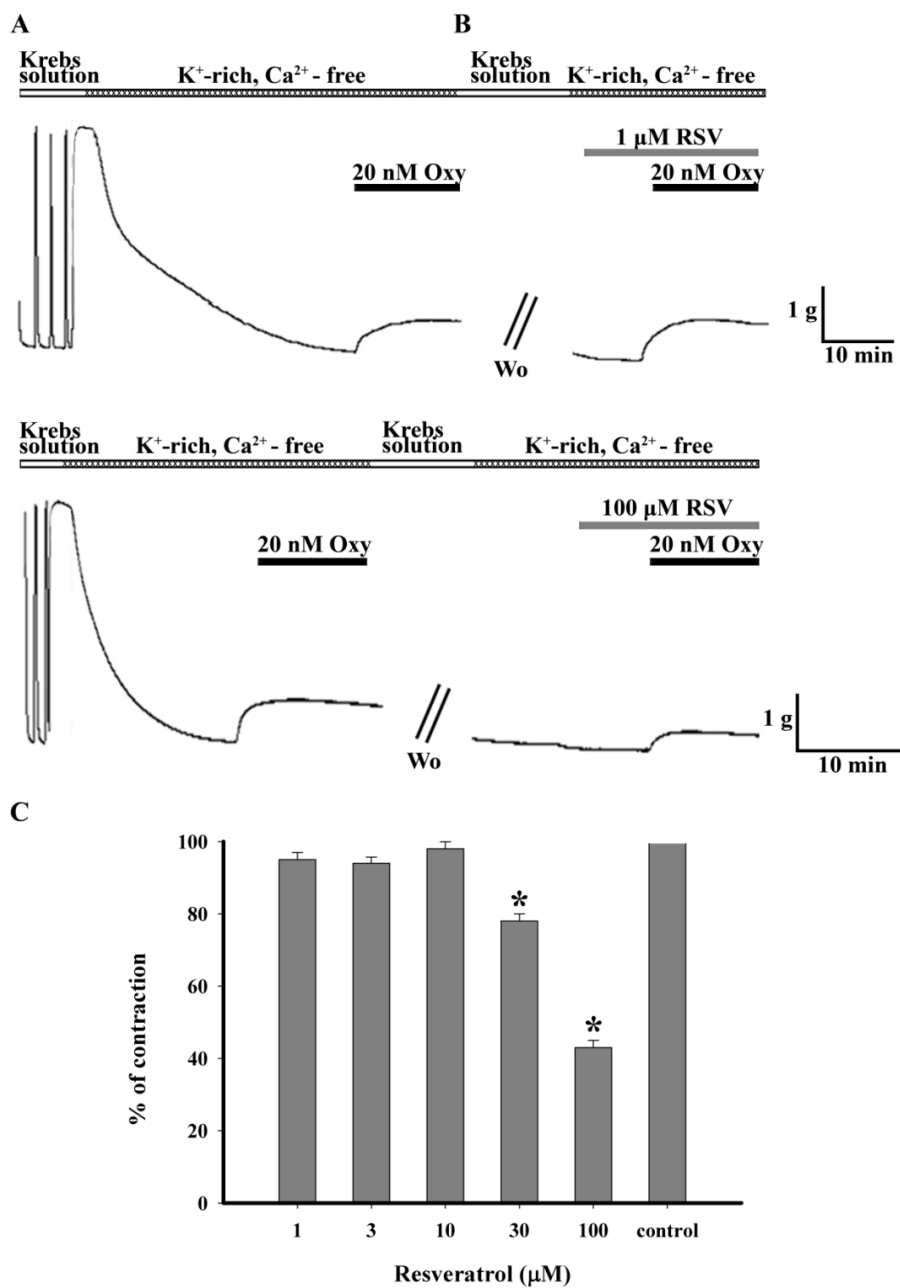
Da bi uporedili relaksantne efekte rezveratrola sa klasičnim OKK ispitivali smo dejstvo NS 1619, visoko specifičnog otvarača BK_{Ca} kanala i pinacidila, predominantnog otvarača K_{ATP} kanala na sva tri modela kontrakcija. Pokazano je da NS 1619 (10 nM - 100 μM, n = 5) relaksira TOK u koncentracijski-zavisnom maniru i pD₂ vrednost je bila 6.00 ± 0.34, a maksimalni odgovor 98.82 ± 1.02 %. Iberiotoksin (100 nM, n = 5) je visoko selektivan blokator BK_{Ca} kanala i statistički značajno je uticao na pomeranje koncentracijski-zavisne krive za NS 1619 (pD₂ vrednosti: kontrola 6.00 ± 0.34 u odnosu na 4.48 ± 0.64 u prisustvu iberiotoksina, P < 0.05). Takođe, maksimalni odgovor je suprimiran u prisustvu iberiotoksina (98.82 ± 1.02 % kontrola u odnosu na 87.00 ± 5.12 % u prisustvu iberiotoksina, P < 0.05, slika 17 A). Pinacidil (10 nM – 100 μM, n = 5) koncentracijski-zavisno inhibira TOK sa pD₂ vrednošću 5.29 ± 0.20 i maksimalnim odgovorom 95.25 ± 1.08 %. U prisustvu glibenklamida (10 μM, n = 5) koncentracijski – zavisna kriva za pinacidil se statistički signifikantno pomera u desno i pD₂ vrednost je bila 4.61 ± 0.71, a maksimalni odgovor 74.84 ± 2.96, P < 0.05 (slika 17 B). Posle statističke analize utvrđeno je da postoji signifikantna razlika između pD₂ vrednosti za rezveratrol i NS 1619, odnosno pinacidil (4.06 ± 0.29 > 5.29 ± 0.20 > 6.00 ± 0.34, P < 0.05). Ovaj odnos prikazan je koncentracijski–zavisnim krivama na slici 17 C.

1.4. Efekti rezveratrola na kontrakcije indukovane oksitocinom u *K⁺-rich, Ca²⁺-free* rastvoru

Kada se Krebs Ringerov rastvor zameni „*K⁺-rich, Ca²⁺-free*“ rastvorom dolazi do nestajanja SRK i FOK (n = 4 ukupno, podaci nisu prikazani). Aplikacija 20 nM u ovim istim uslovima dovodi do nastajanja tonične kontrakcije. Rezveratrol u koncentracijama manjim od 30 μM nema efekta na toničnu kontrakciju nastalu u „*K⁺-rich, Ca²⁺-free*“ rastvoru (% amplitude kontrakcije: 100 % kontrola, bez prisustva rezveratrola u odnosu na 100 % u prisustvu 1 μM, 3 μM ili 10 μM rezveratrola, n = 15 ukupno, P > 0.05, slika 18 A, C). Međutim, rezveratrol u koncentracijama većim od 30 μM značajno redukuje toničnu kontrakciju (% amplitude kontrakcije: 100 % bez prisustva rezveratrola u odnosu na 65 ±

2 % u prisustvu 30 μ M, odnosno $47 \% \pm 2 \%$ u prisustvu 100 μ M rezveratrola $P < 0.05$, $n = 10$ oba, slika 18 B, C).

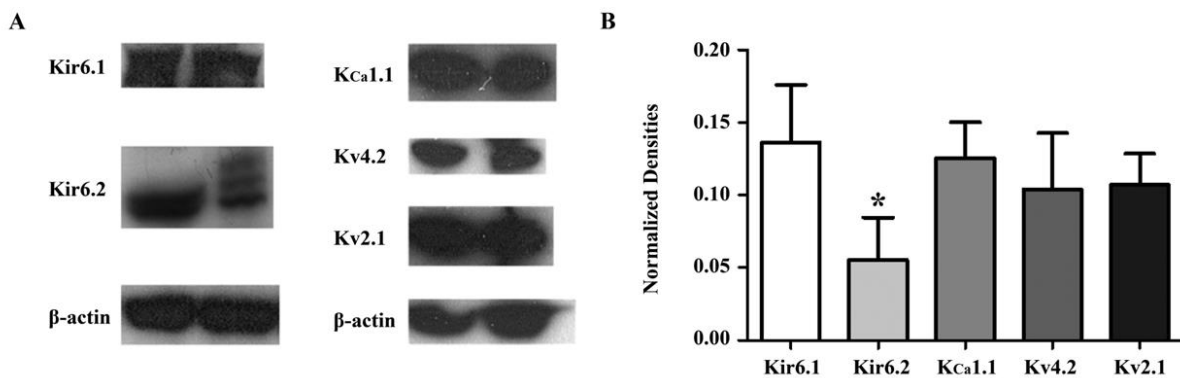
Blokatori koji su upotrebljeni pri analizi uključenosti K kanala u mehanizam dejstva rezveratrola nisu menjali bazalni tonus kao ni SRK ili kontrakcije indukovane oksitocinom ($n = 12$ ukupno, podaci nisu prikazani).



Slika 18. Originalni eksperimentalni zapisi pokazuju efekte 1 μ M i 100 μ M rezveratrola na kontrakcije indukovane oksitocinom (20 nM) u rastvoru " K^+ -rich, Ca^{2+} free"; **(A)** kontrakcija indukovana oksitocinom - kontrola; **(B)** kontrakcija indukovana oksitocinom nakon pretretmana sa 1 μ M ili 100 μ M rezveratrola; **(C)** efekti različitih koncentracija rezveratrola (1-100 μ M) na kontrakcije izazvane oksitocinom (20 nM) u rastvoru „ K^+ -rich, Ca^{2+} free“ predstavljeni histogramom. Kolone su srednje vrednosti amplitude kontrakcija \pm SEM u prisustvu pojedinačnih koncentracija rezveratrola (n = 5, svaka). Amplituda kontrakcija u odsustvu rezveratrola je uzeta kao 100% - kontrola. * P < 0.05 kada se porede efekti pojedinačnih koncentracija rezveratrola.

1.5. Identifikacija subjedinica K_{ATP} , K_v i BK_{Ca} kanala *Western blot* analizom u glatko-mišićnom tkivu uterusa pacova

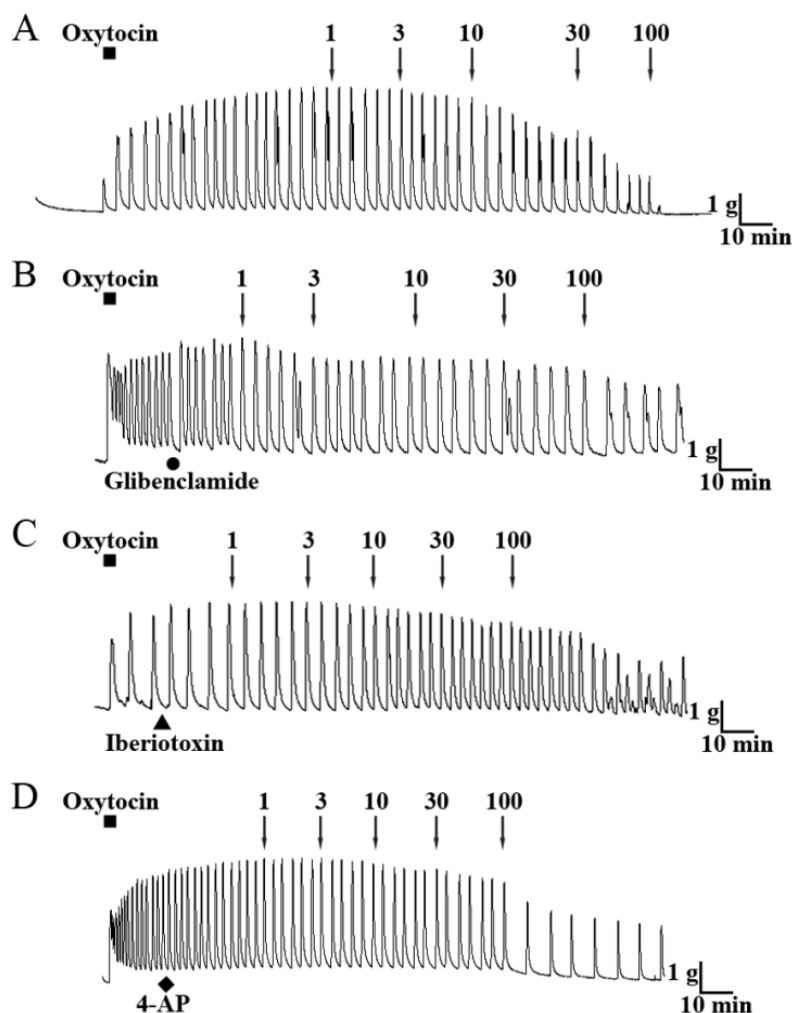
Western blot analizom detektovane su Kir6.1 i Kir6.2 subjedinice K_{ATP} kanala, α -subjedinica $K_v2.1$ i $K_v4.2$ podtipa K_v kanala i $K_{Ca}1.1$ podjedinica BK_{Ca} kanala u glatkom mišićnom sloju negravidnog uterusa pacova ($n = 5$ u svakoj grupi, slika 19 A). Rezultati su normalizovani u odnosu na ekspresiju β -aktina. Densitometrija je korišćena prilikom kvantifikovanja nivoa zastupljenosti proteina Kir6.1, Kir6.2, $K_v2.1$, $K_v4.2$ i $K_{Ca}1.1$. Poređenje pomoću densitomerije pokazalo je značajno niži nivo ekspresije Kir6.2 proteina u odnosu na druge ispitivane podtipove K kanala. Nije bilo značajne razlike u gustini i zatamljenosti traka, tj. u ekspresiji među ostalim ispitivanim tipovima K kanal (slika 19 B).



Slika 19. Ekspresija proteina Kir6.1 i Kir6.2 subjedinica K_{ATP} kanala, (A) subjedinice $K_v2.1$ i $K_v4.2$ tipa K_v kanala i $K_{Ca}1.1$ subjedinice BK_{Ca} kanala u odnosu na β -aktin pokazana *western blot* analizom kod negravidnog uterusa pacova. (B) Kvantitativno određivanje *western blot* signala proteina K kanala izraženi kao srednje vrednosti \pm SEM densitometrijskih jedinica za svaki tip K kanala prikazan kao histogram ($n = 5$, svaki). * $P < 0.05$ kada se uporedi ekspresija proteina Kir6.2 subjedinice sa ekspresijom proteina Kir6.1, $K_v2.1$ i $K_v4.2$ i $K_{Ca}1.1$ subjedinica proteina

2. EFEKTI REZVERATROLA NA KONTRAKCIJE INDUKOVANE OKSITOCINOM KOD IZOLOVANOG HUMANOG MIOMETRIJUMA

2.1 Efekti rezveratrola na kontrakcije izazvane oksitocinom



Slika 20. Originalni eksperimentalni zapisi. **(A)** Efekat rezveratrola (1 - 100 μ m) na kontrakcije izazvane oksitocinom (2 nM, kvadrat) IVF gravidnog miometrijuma; **(B)** efekat rezveratrola u prisustvu glibenklamida (10 μ m, krug); **(C)** efekat rezveratrola u prisustvu iberiotoksina (100 nM, trougao); **(D)** efekti rezveratrola u prisustvu 4-AP (1 mM, romb)

Oksitocin u koncentraciji od 2 nM dat u medijum kupatila za izolovane organe dovodi do nastajanja faznih kontrakcija prosečne amplitude 4.95 ± 0.08 g i frekvencije 2.65 ± 0.35 kontrakcija u 10 minuta kao što je prikazano na slici 20 A (n = 12). Rezveratrol (1 – 100 μ M) statistički značajno inhibira ove kontrakcije u koncentracijski-zavisnom maniru sa pD_2 vrednošću 4.52 ± 0.11 i maksimalnim odgovorom 82.25 ± 1.50 %, n = 12 (slika 20 A).

Glibenklamid (10 μ M, n = 5) je proizveo statistički značajno pomeranje koncentracijski-zavisne krive za rezveratrol u desno, pD_2 vrednosti su bile: 4.52 ± 0.11 kontrola u odnosu na 4.21 ± 0.13 u prisustvu glibenklamida, $P < 0.05$. Takođe, glibenklamid je doveo i do statistički značajne supresije maksimalnog odgovora (82.25 ± 1.50 % kontrola u odnosu na 59.33 ± 4.30 % u prisustvu glibenklamida, $P < 0.05$, slike 20 B i 21 A).

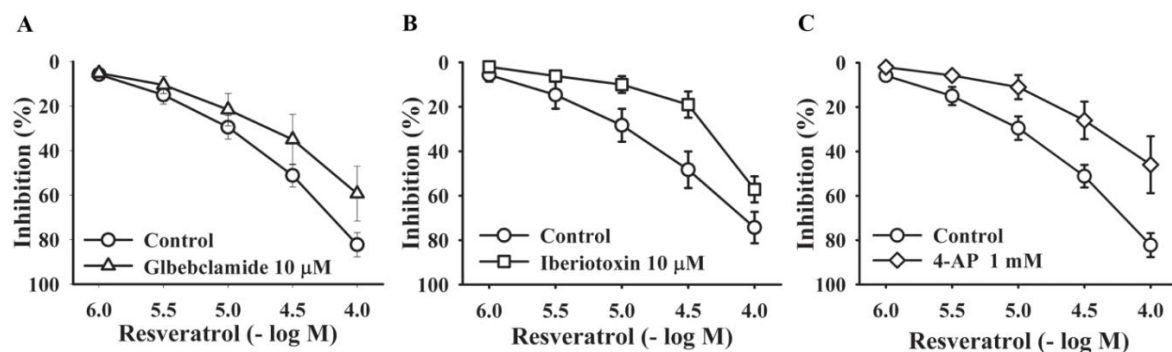
Iberiotoksin (100 nM, n = 5) je antagonizovao efekat rezveratrola na koncentracijski-zavisni način, pD_2 vrednosti: 4.52 ± 0.11 kontrolne krive u odnosu na 4.09 ± 0.19 u prisustvu iberiotoksina, $P < 0.05$) uz nepotpunu supresiju maksimalnog odgovora (82.25 ± 1.50 % kontrolna kriva u odnosu na 57.16 ± 2.60 % u prisustvu iberiotoksina, $P < 0.05$, slike 20 C, 21 B).

Aplikacija 4-AP (1 mM, n = 7) je statistički značajno antagonizovala efekte rezveratrola, pD_2 vrednosti: 4.52 ± 0.11 kontrolna kriva u odnosu na 4.00 ± 0.15 u prisustvu 4 - AP, $P < 0.05$, uz statistički značajnu, ali ne potpunu supresiju maksimalnog odgovora, 82.25 ± 1.50 % kontrola u odnosu na 51.00 ± 3.00 % u prisustvu 4 - AP, $P < 0.05$, slike 20 D, 21 C).

2.2. Efekti pinacidila na kontrakcije izazvane oksitocinom

Da bi uporedili efekat rezveratrola sa efektima OKK testiran je uticaj pinacidila na kontrakcije gravidnog miometrijuma izazvane oksitocinom. Pinacidil (10 nM – 100 μ M, n = 5) je statistički značajno inhibirao kontrakcije na koncentracijski-zavisan način sa vrednošću pD_2 4.53 ± 0.10 i maksimalnim odgovorom 84.25 ± 2.08 %. Nepostoje

statistički značajne razlike između pD_2 vrednosti i maksimalnih odgovora rezveratrola i pinacidila (pD_2 vrednost rezveratrola bila je 4.52 ± 0.11 u odnosu na pD_2 vrednost pinacidila 4.53 ± 0.10 ; maksimalni odgovor rezveratrola 82.25 ± 1.50 u odnosu na maksimalni odgovor pinacidila $84.25 \% \pm 2.08 \%$, $P > 0.05$, oba).

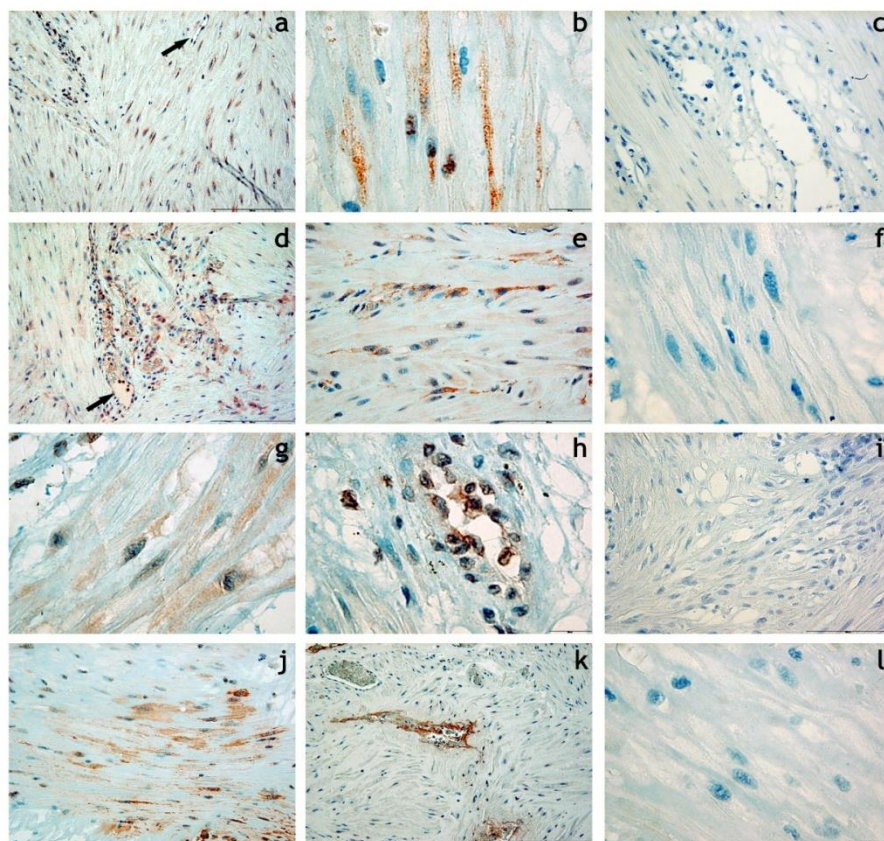


Slika 21. Antagonizam inhibitorynog efekta rezveratrola u prisustvu BKK na kontrakcije izazvane oksitocinom IVF gravidnog miometriuma. (A) Koncentracijski-zavisne krive za rezveratrol u odsustvu (krug) i prisustvu glibenklamida (10 μ M, trougao), (B) iberiotoksina (100 nm, kvadrat), (C) 4 - AP (1 mM, romb). Tačke su srednje vrednosti i vertikalne linije pokazuju SEM (n = 5-12).

2.3. Identifikacija subjedinica K_{ATP} , K_v i BK_{Ca} kanala *Western blot* analizom i imunohistohemijom bojenjem u glatko-mišićnom tkivu humanog uterusa

Imunohistohemijom bojenje je pokazalo ekspresiju četiri subjedinice K kanala u ćelijama gravidnog miometriuma. U svim analiziranim uzorcima glatko-mišićnog sloja miometriuma detektovane su subjedinice Kir6.1 i Kir6.2 K_{ATP} kanala, α -subjedinica $K_{Ca1.1}$ BK_{Ca} kanala i α -subjedinica $K_v4.2$ kanala što je prikazano na slici 22. Kako se može videti na slikama 22 a, d, h i k ove subjedinice su prisutne u glatko-mišićnim ćelijama gravidnog miometriuma ali i u endotelu krvnih sudova. Ekspresija ove četiri kanalske subjedinice u glatko-mišićnoj ćeliji je bila uglavnom citoplazmatska, ali sa promenljivom pokrivenošću površine citoplazme (ekstenzijom) i promenljivim intenzitetom (slika 22 a, b, d, e, g, j). Raspodela Kir6.2 subjedinice bila je najrasprostranjenija jer je prisutana na svim glatko-mišićnim ćelijama miometriuma (slika

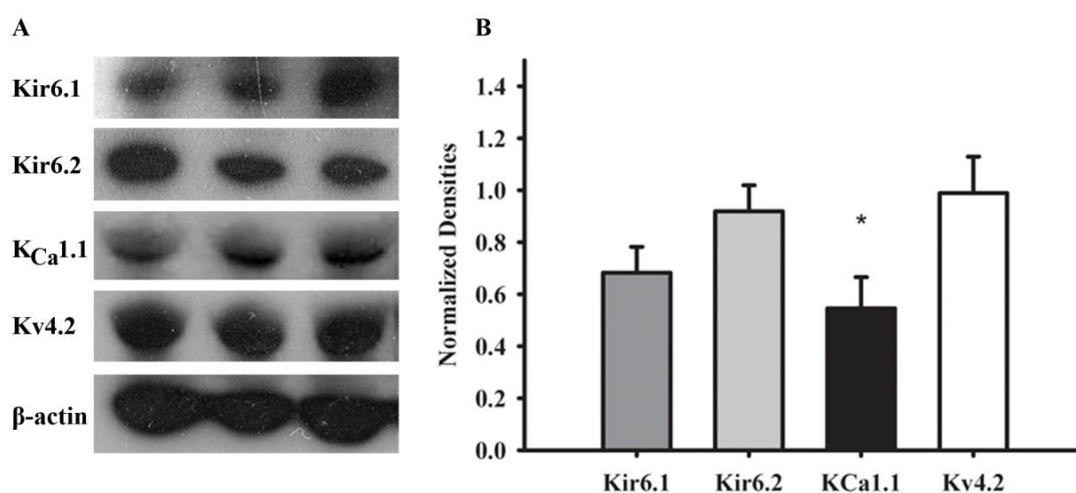
22 e). Subjedinica Kir6.1 je detektovana u pojedinačnim glatko-mišićnim ćelijama (slika 22 a, b). α -subjedinica Kv4.2 kanala i $K_{Ca}1.1$ su detektovane na grupama glatko-mišićnih ćelija (slika 22 g, j). Kanal Kv4.2 je pokazao najintenzivnije bojenje što se uočava na slici 22 j i k. Pored toga što imaju difuznu citoplazmatsku ekspresiju, kanali Kir6.1, Kir6.2 i Kv4.2 pokazuju i snažnu granularnu perinuklearnu ekspresiju.



Slika 22. Detekcija četiri različita podtipa K kanala u humanom IVF gravidnom miometriju imunohistochemijskim bojenjem; ekspresija subjedinice Kir6.1 K_{ATP} kanala u ćelijama glatkih mišića uterusa i endotelnim ćelijama krvnih sudova (strelica) (a, b); difuzna ekspresija subjedinica Kir6.2 K_{ATP} kanala u ćelijama glatkih mišića uterusa i endotelnim ćelijama krvnih sudova (strelica) (d, e); ekspresija $K_{Ca}1.1$ subjedinice BK_{Ca} kanala u ćelijama glatkih mišića uterusa (g) i endotelnim ćelijama krvnih sudova (h); ekspresija α -subjedinice Kv4.2 kanala u ćelijama glatkih mišića uterusa (j) i endotelnim ćelijama krvnih sudova (k). Negativne kontrole (c, f, i, l).

Western blot analiza takođe je detektovala Kir6.1 i Kir6.2 subjedinice K_{ATP} , α - subjedinicu Kv4.2 i $K_{Ca}1.1$ subjedinice BK_{Ca} kanala u glatko mišićnim ćelijama gravidnog uterusa (n = 5, svaki, slika 23 A). Rezultati su normalizovani u odnosu na ekspresiju β -aktina. Kako bi se kvantifikovalo relativna zastupljenost eksprimiranih proteina Kir6.1, Kir6.2, Kv2.1, Kv4.2 i $K_{Ca}1.1$ korišćena je densitometrija (slika 23 B).

Imunohistohemijsko bojenje i *Western blot* analiza nisu detektovali ekspresiju α -subjedinice Kv2.1 podtipa Kv kanala u analiziranim uzorcima.



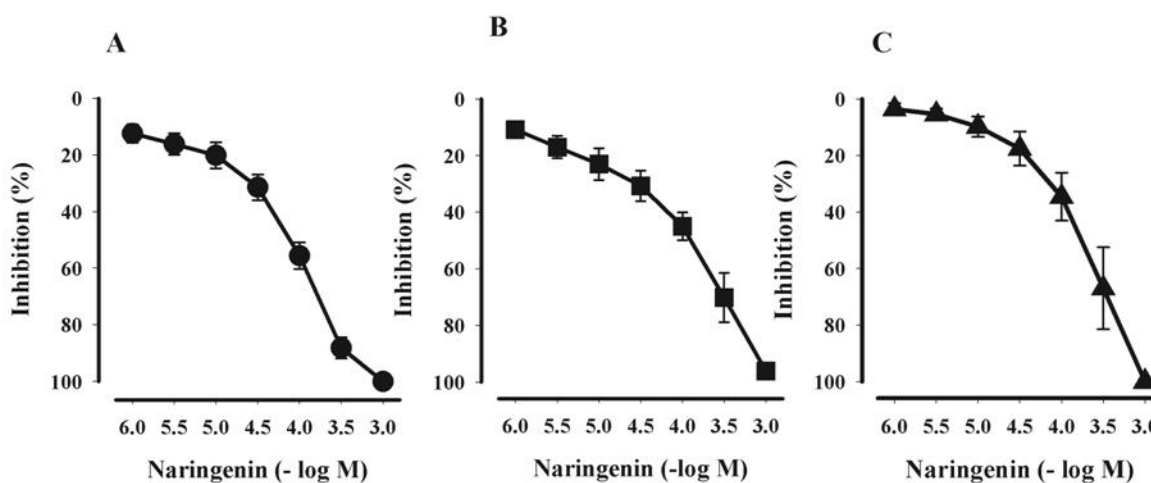
Slika 23 (A) Ekspresija proteina Kir6.1 i Kir6.2 subjedinice K_{ATP} kanala, α - subjedinice Kv4.2 kanala i $K_{Ca}1.1$ subjedinice BK_{Ca} kanala u odnosu na β - aktin analizirana *western blot* metodom. **(B)** Kvantitativno određivanje *western blot* signala K kanala izraženih kao srednje vrednosti \pm SEM densitometrijskih jedinica za svaku posmatranu subjedinicu prikazan kao histogram (n = 5, svi; * P < 0,05).

3. EFEKTI NARINGENINA NA KONTRAKCIJE IZOLOVANOG UTERUSA PACOVA I ČOVEKA

U ovom delu studije želeli smo da uporedimo efekte rezveratrola sa drugim polifenolom, naringeninom. Ispitali smo inhibitorni potencijal naringenina na SRK, fazne i tonične kontrakcije indukovane oksitocinom (0.2 nM, odnosno 20 nM) izolovanog uterusa pacova i humanog IVF gravidnog miometrijuma.

3.1. Efekti naringenina na SRK i kontrakcije indukovane oksitocinom kod izolovanog uterusa pacova

Longitudinalne mišićne trake uterusa pacova pokazivale su SRK prosečne amplitude 2.45 ± 0.8 g i frekvencije 10.11 ± 1.12 kontrakcija u 10 minuta (podaci nisu prikazani). Naringenin ($1\mu\text{M}$ - 1 mM) koncentracijski-zavisno inhibira SRK sa pD_2 vrednošću 4.12 ± 0.40 i maksimalnim efektom 94.00 ± 3.00 %, $n = 7$ (slika 24 A). Iste koncentracije naringenina ($1\mu\text{M}$ - 1 mM) signifikantno utiču i na smanjenje amplitude faznih kontrakcija indukovanih oksitocinom (0.2 nM) sa pD_2 vrednošću 3.90 ± 0.26 i maksimalnim odgovorom 94.40 ± 2.68 %, $n = 6$ (slika 24 B). Tonična kontrakcija je, takođe, inhibirana naringeninom ($1\mu\text{M}$ - 1 mM) potentnošću sličnom kao kod faznih oksitocinskih kontrakcija, $pD_2 = 3.76 \pm 0.50$, $P > 0.05$ i maksimalnim efektom 99.98 ± 0.34 %, $P > 0.05$, $n = 6$ (slika 24 C). Ne postoji statistički značajna razlika između pD_2 vrednosti između SRK i FOK (4.12 ± 0.40 u odnosu na 3.90 ± 0.26 , $P > 0.05$), odnosno TOK (4.12 ± 0.40 u odnosu na 3.76 ± 0.50 , $P > 0.05$). Ne postoji statistički značajna razlika ni kada su u pitanju maksimalni odgovori.



Slika 24. Koncentracijski – zavisne krive za naringenin (1 μ M – 1 mM): (A) SRK, (B) fazne oksitocinom-indukovane kontrakcije i (C) tonične oksitocinom-indukovane kontrakcije negravidnog uterusa pacova.

Poređenje potentnosti rezveratrola i naringenina je pokazalo statistički značajnu razliku između pD_2 vrednosti posmatranih po tipovima kontrakcija i podaci su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Odnos potentnosti rezveratrola i naringenina

pD_2	SRK	FOK	TOK
Rezveratrol	4.53 \pm 0.20*	4.66 \pm 0.28*	4.06 \pm 0.29*
Naringenin	4.12 \pm 0.40	3.90 \pm 0.26	3.76 \pm 0.50

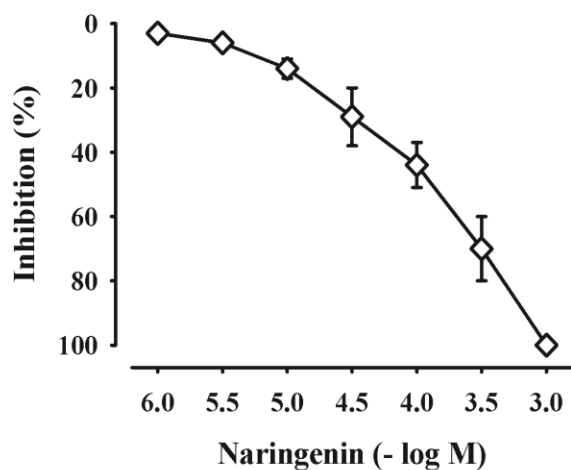
* $P < 0.05$

3.2. Efekti naringenina na kontrakcije indukovane oksitocinom kod izolovanog humanog gravidnog miometrijuma

Oksitocin u koncentraciji 2 nM dat u medijum kupatila za izolovane organe dovodi do nastajanja faznih kontrakcija. Naringenin (1 μ M - 1 mM) statistički značajno i

koncentracijski-zavisno inhibira ove kontrakcije sa pD_2 vrednošću 3.89 ± 0.34 i maksimalnim odgovorom $99.99 \pm 0.50 \%$, $n = 5$ (slika 25).

Poređenje potentnosti rezveratrola i naringenina pokazalo je statistički značajnu razliku između njihovih pD_2 vrednosti: 4.52 ± 0.11 u odnosu na 3.89 ± 0.34 , $P < 0.05$.



Slika 25. Koncentracijski – zavisna kriva za naringenin ($1 \mu\text{M} - 1 \text{mM}$) na modelu kontrakcija indukovanih oksitocinom (2nM) kod humanog gravidnog miometrijuma

V DISKUSIJA

AKTUELNOST TEME

Polifenoli su sastavni deo mnogih biljnih namernica koje se koriste u ishrani čoveka. Rezveratrol se nalazi u žiži kako naučne, tako i šire javnosti poslednjih deset godina. Za to vreme broj radova koji su ispitivali dejstvo rezveratrola na različitim modelima u *in vitro* i kliničkim ispitivanjima *in vivo* je porastao na približno 7000. Prvi radovi koji su pokazali njegovo vazorelaksantno dejstvo proizašli su iz naše laboratorije. Međutim, pored ovakve brojnosti radova, relaksantni efekti rezveratrola na glatku muskulaturu negravidnog pacovskog uterusa je opisan samo u jednom radu (Hsia et al., 2011). Prema nama dostupnoj literaturi, ova studija je prva koja ispituje dejstvo ovog polifenola na kontraktilnost humane gravidne materice. Definisati efekte polifenola na ovakvom modelu je od velikog naučnog značaja ako se uzme u obzir da su rezveratrol i naringenin sastavni deo velikog broja biljaka i dijetetski proizvodi koji ih sadrže se nalaze već dugi niz godina u slobodnoj prodaji kao dodatak ishrani čak preporučeni tokom graviditeta. Posebni doprinos je što se ispitivanja odnose na grupu porodilja iz programa *in vitro* fertilizacije, jer su neželjeni ishodi, kao što je prevremeni porođaj, mnogo češći u ovoj populaciji u odnosu na porodilje sa spontanom graviditetom (Van Voorhis, 2007).

Mehanizam relaksantnog dejstva rezveratrola nije u potpunosti razjašnjen. Pokazano je da on uključuje jonske kanale (Audrey i sar., 2013) samim tim i K kanale

(Novakovic i sar., 2006 a, b, Gojkovic-Bukarica i sar., 2008, Novaković i sar., 2013). Ova studija, takođe, po prvi put prikazuje odnos ekspresije tri najznačajnija tipa K kanala, K_{ATP} , BK_{Ca} , K_v , u negravidnom i gravidnom miometriju analiziran *western blot* metodom i imunohistohemijskim bojenjem. Uzimajući u obzir činjenicu da odnos, brojnost i aktivnost tipova K kanala u miometriju zavisi od graviditeta, uticaja hormona, starosti i može se očekivati bolja slika o relaksantnom mehanizmu rezveratrola i uključenost K kanala.

Razvoj visoko selektivnog agoniste K kanala u glatkoj muskulaturi uterusa može imati terapijsku vrednost u regulaciji dismenoreje i sprečavanju prevremenih porođaja.

INHIBITorni EFEKTI REZVERATROLA NA NEGRAVIDNI UTERUS PACOVA

Ova studija je pokazala da rezveratrol značajno smanjuje amplitudu i frekvenciju faznih kontrakcija izazvanih niskom dozom oksitocina (0.2 nM) sa EC_{50} 29 μ M i SRK sa EC_{50} 23 μ M. U studiji Hsia i sar. (2011) kontrakcije izazvane oksitocinom su bile manje osetljive na rezveratrol nego što je ovde pokazano, odnosno, 100 μ M rezveratrola prouzrokovalo je 40 % inhibicije kontrakcija. Međutim, autori su u svojim eksperimentima koristili značajno veću koncentraciju oksitocina (1 μ M u odnosu na 0.2 nM korišćenih u ovom radu). Uočeno je da su tonične kontrakcije izazvane višom koncentracijom oksitocina, u ovom radu sa 20 nM, tri puta manje osetljive na rezveratrol; EC_{50} vrednost je bila 87 μ M. Takođe, publikovano je da su fazne kontrakcije negravidnog uterusa miša izazvane malom koncentracijom oksitocina osetljivije na verapamil u odnosu na toničnu komponentu (Kawamata i sar., 2007). Naši nalazi su u skladu sa podacima dobijenim na eksperimentalnom modelu žučne kese zamorca, rezveratrol je mnogo potentnije inhibirao fazne kontrakcije u odnosu na bazalnu tenziju (Wang i sar., 2008). Sa druge strane, ako posmatramo relaksaciju toničnih kontrakcija aorte i arterije mezenterike pacova rezveratrol je bio mnogo potentniji (EC_{50} = 10 μ M, oba), ali osetljivost arterije mamarije je bila slična kao u ovoj studiji (EC_{50} = 30 μ M) (Novakovic i sar., 2006 a,b, Gojkovic-Bukarica i sar., 2008). Iz ovih poređenja nameće se zaključak da postoje očigledne razlike u osetljivosti na rezveratrol među tipovima kontrakcija, tkivima i vrstama.

U cilju da se analizira doprinos K kanala u inhibiciji kontrakcija uterusa prouzrokovane rezveratrolom, koristili smo supstance za koje se zna da poseduju mogućnost da blokiraju K kanalsku aktivnost.

Prema rezultatima koji su ovde izneti, čini se da BK_{Ca} kanali uključeni u mehanizam kojim rezveratrol dovodi do redukcije frekvencije obe vrste faznih kontrakcija. Iberiotoksin, visoko selektivni blokator BK_{Ca} kanala je statistički značajno uticao na smanjenje redukcije frekvencije faznih kontrakcija rezveratrolom. Prethodni nalazi o uticaju ibareiotoksina na frekvenciju kontrakcija su kontradiktorni. Ranije je pokazano da iberiotoksin utiče na povećanje frekvencije SRK humanog miometrijuma (Anwer i sar., 1993), dok su Taggart i Wray (1998) pokazali da ista supstanca nije imala očigledan efekat na učestalost. Štaviše, ni TEA niti 4-AP nisu uticali na kontrakcijski interval SRC, što sugeriše da ovi BKK ne utiču na frekvenciju značajno i to se slaže sa nalazima Aaronson i sar. (2006). Pokazano je da na frekvenciju kontrakcija uterusa izazvanih oksitocinom utiče oslobađanje Ca²⁺ iz sarkoplazmatskog retikuluma (Shmygol i sar., 2006). Takođe je poznato da iberiotoksin kod kulture izolovanih ćelija humanog miometrijuma dovodi do depolarizacije i povećanja unutarćelijske koncentracije Ca²⁺ (Anwer i sar., 1993). Uzevši u obzir da je nedavno pokazano da rezveratrol može uticati na smanjenje unutarćelijskog Ca²⁺, odnosno na njegovo oslobađanje iz sarkoplazmatskog retikuluma aorte pacova (Shen i sar., 2013, McCalley i sar., 2014). Moguće je da rezveratrol dovodi do "otvaranja" BK_{Ca} kanala, repolarizacija ćelijske membrane smanjuje ulazak vanćelijskog Ca²⁺ i time utiče na unutarćelijsku koncentraciju Ca²⁺ i učestalost kontrakcija, odnosno njihovo odlaganje. Alternativno objašnjenje bi bilo da rezveratrol smanjuje koncentraciju unutarćelijskog Ca²⁺ direktno (Shen i sar., 2013, McCalley i sar., 2014), ali kako inaktivacija BK_{Ca} kanala iberiotoksinom i TEA antagonizuje redukciju frekvencije od strane rezveratrola, verovatniji je prvi zaključak.

Funkcionalne studije pokazuju da K_{ATP} kanali imaju važnu ulogu u regulaciji kontraktibilnosti materice (Lovasz i sar., 2011). Stimulacija ovih kanala relaksira glatke mišiće uterusa (Brainard i sar., 2007, Novakovic i sar., 2007). Gledajući molekulsku strukturu, K_{ATP} kanali se sastoje od dve subjedinice, prve ulazno ispravljačke jedinice, čiji sastavni delovi formiraju poru, Kir6.1 ili Kir6.2, i druge, regulatorne subjedinice, SUR1, SUR2A ili SUR2B. Ove subjedinice su udružene u oktamerni kompleks (Aguilar-Bryan i

sar., 1998). Osobine, brojnost i aktivnost ovih kanala su različiti u različitim tkivima. Ovakvom diverzitetu doprinosi različito kombinovanje subjedinica koje formiraju kanal. Opšte je prihvaćeno da je glibenklamid selektivni blokator K_{ATP} kanala. U ovoj studiji, je pokazano da glibenklamid antagonizuje efekat rezveratrola na SRC i faznim kontrakcijama indukovanim oksitocinom što ukazuje na uključenost K_{ATP} kanala u mehanizam delovanja rezveratrola. Slično je pokazano i na modelu srca pacova, rezveratrol je redukovao srčano-mišićne kontrakcije i skraćivao trajanje akcionog potencijala usled aktiviranja K_{ATP} kanala (Buluc i sar., 2007). Međutim, glibenklamid nije antagonizovao efekat rezveratrola na toničnim oksitocinom-indukovanim kontrakcijama. Takođe, prethodne studije su pokazale da relaksantni efekat rezveratrola na toničnim kontrakcijama mezenterične arterije pacova i humane arterije mamarije nije blokirao glibenklamid (Novakovic i sar., 2006 a,b). Shodno tome, čini se da K_{ATP} kanali nisu uključeni u put kojim rezveratrol izaziva relaksaciju kod toničnih kontrakcija uterusa. Razlog ovim razlikama leži možda u činjenici da u nastajanju fazne odnosno tonične kontrakcije uterusa indukovane oksitocinom učestvuju različiti unutarćelijski putevi što će biti diskutovano malo kasnije. Drugi mogući razlog je tkivna selektivnost ovih kanala. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja otkriva odnos u ekspresiji proteina Kir6.1 i Kir6.2 subjedinice K_{ATP} kanala u negravidnom uterusu pacova. Dobijeni rezultati ukazuju da je nivo ekspresije proteina Kir6.1 subjedinice bio veći nego Kir6.2 subjedinice kada je njihova ekspresija normalizovana u odnosu na ekspresiju β - aktina. Raniji radovi su pokazala sličan odnos ekspresije ove dve subjedinice kanala (Kir6.1/SUR2B i Kir6.2/SUR1) u glatkom mišiću negravidnog uterusa pacova i čoveka, ali samo na transkripcionom nivou (Chien i sar., 1999, Curley i sar., 2002). Nedavno je još jedna studija pokazala odnos u ekspresiji proteina Kir6.1 i Kir6.2 subjedinica ali u tkivu humanog gravidnog miometrijuma i nivo ekspresije Kir6.1 proteina bio je manji u poređenju sa Kir6.2 (Xu i sar., 2011). Sve je više dokaza koji govore u prilog ideji da ekspresija K_{ATP} kanala zavisi od gestacijskog stadijuma i porađajnog doba, odnosno početka intenzivnih porođajnih kontrakcija (Longo i sar., 2003). Kako je pokazano da Kir6.1/SUR2B subjedinice imaju nishodnu regulaciju u kasnoj u trudnoći, tj. smanjuje se njihova brojnost i aktivnost u odnosu na ranu trudnoću (Xu i sar., 2011) razlike u odnosu ekspresije protein Kir6.1 / Kir6.2 kod negravidnog i gravidnog miometrijuma ne iznenađuju.

Prethodni radovi su pokazali da OKK dovode do relaksacije različitih tipova glatke muskulature krvnih sudova preko aktivacije BK_{Ca} kanala (Stockbridge i sar., 1991). Zanimljivo, Malinovski i sar. su zaključiti da perivaskularno masno tkivo humane arterije mamarije oslobađa relaksantni faktor koji izgleda da deluje uz učešće BK_{Ca} kanala glatkih mišića (Malinowski i sar., 2013). Prethodni farmakološki podaci su pokazali da su BK_{Ca} kanali bogato zastupljeni u tkivu miometrijuma i da posreduju u relaksaciji glatkih mišića materice (Matharoo-Ball i sar., 2003). Njihova aktivnost se pokreće skoro odmah po depolarizaciji membrane i povećeva se srazmerno povećanju [Ca²⁺]_i, obezbeđujući vezu između metaboličkog i električnog stanja ćelija. Na različitom eksperimentalnom modelu, Chen i sar. (2007) su referisali da rezveratrol aktivira BK_{Ca} kanale u β ćelijama pankreasa indirektno, kroz povećanje unutarćelijskog Ca²⁺. Nasuprot tome, nađeno je da u endotelijalnim ćelijama rezveratrol stimuliše BK_{Ca} kanale preko Ca²⁺ - nezavisnog mehanizma (Li i sar., 2000). Kako bi analizirali mogućnost učešća BK_{Ca} kanala u inhibitorni efekat rezveratrola kod SRK i indukovanim kontrakcijama miometriuma korišćeni su iberiotoksin i TEA. Iberiotoksin je visoko specifičan blokator BK_{Ca} kanala (Anwer i sar., 1993). TEA selektivno blokira ovaj tip kanala sa IC₅₀ vrednošću oko 2 mM, dok u većim koncentracijama (do 10 mM), TEA blokira druge tipove K- kanala (Aaronson i sar., 2006). Koncentracija TEA koja je korišćena u našoj studiji je optimalna da inhibira BK_{Ca} kanale. Prema dobijenim rezultatima sa iberiotoksinom, TEA i rezveratrolom na SRK i na faznim oksitocinom-indukovanim kontrakcijama, može se zaključiti da su BK_{Ca} kanali uključeni u mehanizma delovanja rezveratrola na negravidni uterus. Međutim, efekti rezveratrola na tonične oksitocinom indukovane kontrakcije nisu bili antagonizovani iberiotokinom i TEA i ukazuju da BK_{Ca} kanali nisu uključeni u mehanizam relaksacije ovog tipa kontrakcija. Analizom *western blot* smo potvrdili prisustvo BK_{Ca} kanala u glatkim mišićima uterusa pacova. U osnovi, BK_{Ca} kanali se sastoje od 4 α subjedinice koje čine poru kanala i od 4 regulatorne β subjedinice čije kombinovanje i modifikacija u ogromnoj meri doprinose fenotipskoj i funkcionalnoj različitosti ovih kanala (Matharoo-Ball i sar., 2003.). Subjedinica koja sadrži poru je kodirana samo jednim genom, ali mogu postojati nekoliko proteina koji variraju od 83 do 110 kDa, pokazujući nastale post translacione modifikacije (Benkusky i sar., 2000, Rosenfeld i sar., 2008). Ova studija je

pokazala ekspresiju proteina od ~ 83 kDa α subjedinice BK_{Ca} kanala u negravidnom uterusu pacova.

Zapazili smo da je 4-AP (1 mM), dominantan bloker Kv kanala, antagonizirao efekat rezveratrola na SRC i faznim oksitocinom-indukovanim kontrakcijama. Ranije, na modelu SRK negravidnog uterusa pacova, pokazano je da su Kv kanali inhibirani 4-AP u rasponu koncentracija od 1-5 mM (Brainard i sar., 2007). Međutim, relaksantni efekat rezveratrola na toničnom tipu oksitocinom-indukovanih kontrakcija nije antagonizovan 4-AP. Na isti način 4 - AP ne menja relaksaciju postignutu rezveratrolom na toničnim kontrakcijama retinalne arteriole (Nagaoka i sar., 2007). Nasuprot tome, niz studija je pokazao da Kv kanali učestvuju u efektima rezveratrola na toničnim kontrakcijama različitih krvnih sudova (Novakovic i sar., 2006, Gojkovic-Bukarica i sar., 2008). Nasuprot ovome, na sasvim drugačijem modelu, pokazano je da rezveratrol može da inhibira Kv kanale u β ćelijama pankreasa (Chen i sar., 2007). Ove razlike u antagonizmu rezveratrola i 4-AP u različitim tkivima mogu biti posledice drugačije ekspresije ili funkcije različitih, mnogobrojnih podtipova Kv kanala. Na primer, pokazano je da ćelije glatkih mišića materice sadrže najmanje tri vrste Kv struja: 4-AP neosetljivu, 4-AP osetljivu, brzo deaktivirajuću struju i 4-AP osetljivu sporo, inaktivirajuću struju (Smith i sar., 2007). Fenotipski posmatrano, dva glavna podtipa Kv kanalskih struja registrovane su elektrofiziološkim metodama. Oni se razlikuju po farmakološkoj senzitivnosti i označene su kao: odloženo-ispravljačka (Kv2.x) i brza inaktivirajuća struja (Kv4.x) (Brainard i sar., 2007). Stoga, pokušali smo da utvrdimo da li su Kv4.2 i Kv2.1 kanalski proteini prisutni u negravidnom miometriju pacova. Rezultati *western blot* analize su potvrdili ekspresiju proteina oba tipa u sličanom odnosu. Ekspresija nekoliko Kv1.x i Kv4.x podtipova je pokazana na nivou gena i proteina u ćelijama miometrijuma miša (Smith i sar., 2007). Međutim, broj eksprimiranih subjedinica izgleda da je mnogo veći od broja registrovanih Kv tipova struja. Smith i saradnici (2007) pokazali su da Kv4.2 podtip molekularna meta za 4-AP u uterusu miša. U više navrata je pokazano da je Kv2.1 podtip kanala eksprimiran u srcu, mozgu i neuronima (Bou-Abboud i sar., 2000, Antonucci i sar., 2001). Međutim, do danas nema dokaza da je Kv2.1 podtip Kv kanala eksprimiran u tkivu miometrijuma. Nalaz dobijen na modelu vaskularne glatke muskulature ukazuje da je Kv2.1 struja 4-AP osetljiva (Wareing i sar., 2006). Shodno tome, čini se mogućim da je efekat rezveratrola na

faznim kontrakcijama posredovan Kv4.2 i Kv2.1 podtipovima kanala prisutnih u negraavidnom uterusu pacova.

Prema iznetim podacima, moglo bi se zaključiti da K_{ATP} , iberiotoksin, TEA i 4-AP osetljivi kanali su uključeni u inhibiciju SRC i faznih okitocinom-indukovanih kontrakcija materice pacova ostvarenu rezveratrolom. Slični rezultati su dobijeni za OKK, pinacidil na tkivu humane gravidne materice i radijalne arterije (Khan i sar., 1998, Gojkovic-Bukarica i sar., 2011).

Tokom ove studije, takođe je uočeno da visoke koncentracije ($\geq 30 \mu\text{M}$) rezveratrola nisu pokazivale statistički značajan antagonizam sa primenjenim BKK, što navodi na zaključak da rezveratrol samo jednim delom inhibira fazne kontrakcije putem aktivacije K kanala. Slično, K kanalski nezavisni efekti visokih koncentracija rezveratrola dobijeni su na aorti i uterusu pacova (Novakovic i sar., 2006a, Hsia i sar., 2011). U prilog svemu ovome ide i to da ni jedan od primenjenih BKK nije antagonizovao efekte rezveratrola na modelu toničnih kontrakcija uterusa. Iako aktivacija K kanala imaju udeo u mehanizmu rezveratrola, ona izgleda, nema osobine poznatih OKK. Da bismo razmotrili ovu navodnu sličnost, odnosno razliku sa OKK, testirali smo inhibitorno dejstvo NS 1619, visoko selektivnog otvarača BK_{Ca} kanala i pinacidil, dominantni otvarač K_{ATP} kanala. Obe testirane supstance su izazvale jaču relaksaciju toničnih kontrakcija nego rezveratrol. Prema afinitetima iberiotoksina i glibenklamida, efekti NS 1619 i pinacidila na modelu toničnih kontrakcija su posredovani BK_{Ca} , odnosno K_{ATP} kanalima.

Vrlo je interesantan nalaz, da dva tipa kontrakcija iako su indukovane istim uterotonikom, oksitocinom imaju različitu osetljivost na rezveratrol. Razlike između efekata rezveratrola na kontrakcije izazvane niskim i visokim koncentracijama oksitocina mogu se objasniti uključivanjem različitih ćelijskih komponenti i unutarćelijskih medijatora u inicijaciju i održavanje faznih, odnosno toničnih kontrakcija. Dakle, oksitocin, pri niskim koncentracijama indukuje fazne kontrakcije kod izolovanog negraavidnog uterusa pacova koje se mogu objasniti ulaskom Ca^{2+} putem voltažno-zavisnog L-tipa Ca^{2+} kanala. Oksitocin, u visokim koncentracijama proizvodi toničnu kontrakciju koja je rezultat dodatnih mehanizma koji se nadovezuju na Ca^{2+} influks, kao što su Rho kinaze (Edwards i sar., 1986, Tahara i sar., 2002). Stoga, da bi istražili da li rezveratrol utiče na unutarćelijske komponente koje su uključene u stvaranje i održavanje (vidi Uvod) tonične

oksitocinske kontrakcije urađena je serija eksperimenata u K^+ -rich, Ca^{2+} -free Krebsovom rastvoru. Pod ovakvim eksperimentalnim uslovima isključen je ulaz vanćelijskog Ca^{2+} (odsustvo vanćelijskog Ca^{2+} - Ca^{2+} -free), dok visoka koncentracija vanćelijskog K^+ (K^+ -rich, 60mM), sprečava izlaz K^+ jona iz ćelije nasuprot hemijskom gradijentu. U ovim uslovima, SRK i fazne oksitocinom-indukovane kontrakcije su bile poništene, ali primena 20 nM oksitocina indukovala je toničnu kontrakciju. Interesantno je da rezveratrol u koncentracijama nižim od 30 μ M nije relaksirao kontrakcije koje su nastale podsrestvom samo unutarćelijskih medijatora. Ovi nalazi pružaju jasnu podršku za prepostavku da rezveratrol u koncentracijama većim od 30 μ M može da inhibira kontrakcije negravidnog uterusa putem koji ne uključuje membranske K i Ca kanale, već uključuje unutarćelijske puteve nastanka i održavanja tonične kontrakcije.

Prema našim zapažanjima, rezveratrol može da proizvede relaksaciju negravidnog uterusa aktivacijom različitih tipova K kanala u glatkim mišićima i / ili inhibicijom signalnih puteva uključenih u nastanak i održanje tonične kontrakcije indukovane oksitocinom. Ovaj zaključak je u skladu sa istraživanjima na modelu glatkih mišića žučne kese zamorca (Wang i sar., 2008) . Međutim, neophodni su dodatni eksperimenti da bi se bliže definisala uloga unutarćelijskih mehanizama delovanja rezveratrola na tonični tip kontrakcija indukovanih oksitocinom. Imajući u vidu da je nedavno referisano da geni koji kodiraju transport Ca^{2+} imaju bitnu ulogu u definisanju transporta Ca^{2+} i samim tim i kontraktilnosti glatke muskulature materice i reproduktivnim funkcijama (Choi i sar., 2011), moglo bi biti od interesa da se istraži da li je rezveratrol u interakciji sa ovim molekulskim strukturama.

Sumarni zaključak ovog dela studije je da rezveratrol ispoljava snažni inhibični efekat na spontane i indukovane kontrakcije negravidnog uterusa pacova. Način indukcije kontrakcija miometrijuma uticalo je različito na efekte rezveratrola. Na osnovu ostvarenog antagonizma sa primenjenim BKK, moglo bi se zaključiti da inhibični odgovor rezveratrola kod faznih kontrakcija uključuje različite tipove K kanala u tkivu negravidnog miometrijuma. Međutim, kada se primenjuje u visokim koncentracijama, rezveratrol ima dodatne mehanizme delovanja nezavisne od K kanala. Činjenica da je efekat rezveratrola na tonične kontrakcije izazvane visokom koncentracijom oksitocina uglavnom nezavisan od K kanala, zahteva dodatno rasvetljavanje.

Posebni doprinos je i to što je po prvi put pokazan odnos ekspresije proteina K_{ATP} , BK_{Ca} , K_v kanala u tkivu glatke muskulature negravidnog uterusa pacova. Takođe, ovo je prva studija koja je pokazala prisustvo proteina $K_v2.1$ podtipa K_v kanala i protein $Kir6.1$ i $Kir6.2$ podjedinica K_{ATP} kanala u pomenutom tkivu.

Na osnovu rezultata prikazanih ovde prihvatljivo je zaključiti da rezveratrol ima veliki potencijal da se koristi u prevenciji i lečenju abnormalne i nepoželjne kontraktilnosti negravidnog uterusa, kao u slučaju dismenoreje. Koncentracije rezveratrola koje smo koristi u našoj studiji odgovaraju rasponu doza koje su definisane za upotrebu kod ljudi (Hsia i sar., 2011).

INHIBITORNI EFEKTI REZVERATROLA NA GRAVIDNI HUMANI UTERUS

Sagledavajući dosad dostupnu literaturu može se reći da je ovo prva studija koji prikazuje inhibitorne efekte rezveratrola na kontraktilnost humane gravidne materice. Pokazano je da rezveratrol statistički značajno smanjuje amplitudu faznih kontrakcija izazvanih oksitocinom IVF gravidnog humanog miometrijuma. Osetljivost gravidnog humanog miometrijuma na rezveratrol bila je slična kao osetljivost faznih kontrakcija indukovanih oksitocinom kod negravidnog uterusa pacova, ali i arterije *uterine* (Novaković i sar., 2013, Naderali i sar., 2000). Postoje razlike između EC_{50} vrednosti rezveratrola dobijene ovde i EC_{50} vrednosti dobijene na modelima rzičitih vrsta humanih i pacovskih krvnih sudova (Novakovic i sar., 2006b, Gojkovic-Bukarica i sar., 2008, Nagaoka i sar., 2007) i glatkih mišića žučne kese (Wang i sar., 2008). Ova razlika u dobijenim rezultatima na različitim eksperimentalnim modelima sugerise selektivnost koja zavisi od vrste tkiva. Ovi nalazi ne iznenađuju jer je u prethodnom delu istraživanja pokazano da različiti način pokretanja kontrakcije utiče različito na efekte rezveratrola.

U cilju da se analiziranja učešća K kanala u inhibiciji kontrakcija humanog IVF gravidnog miometrijuma do koje dovodi rezveratrol, koristili smo supstance za koje se zna da imaju sposobnost otvaranja tj. aktiviranja, odnosno blokiranja K kanala.

Da bi analizirali mogućnost da inhibitorni efekat rezveratrola na kontrakcije humanog gravidnog miometrija pacijentkinja iz IVF programa, je posredovan K_{ATP} kanalima, testirali smo glibenklamid, visoko specifični blokator K_{ATP} kanala. Glibenklamid je antagonizirao efekat rezveratrola na kontrakcijama indukovanim oksitocinom, što upućuje na uključenost ovog tipa kanala u mehanizma delovanja rezveratrola. Ovi podaci su u pozitivnoj korelaciji sa rezultatima dobijenim za pacovski negravidni miometrija i muskulaturu srca (Buluc i sar., 2007, Novakovic i sar., 2013). Nasuprot tome, ranije studije su pokazale da relaksantni efekat rezveratrola na tončnim kontrakcijama pacovske arterije mezenterične i humane unutrašnje mamilarne arterije nije bio blokiran glibenklamidom (Novakovic i sar., 2006, Gojkovic-Bukarica i sar., 2008). Već je pomenuto da se K_{ATP} kanali sastoje od subjedinica koje formiraju poru - Kir6.1 ili Kir6.2 i regulatorne subjedinice SUR1, SUR2A ili SUR2B i da udruživanjem formiraju oktamerni kompleks (Aguilar-Bryan i sar., 1998). Prisustvo svih pet subjedinica potvrđeno je molekularnim metodama u glatkoj muskulaturi humanog uterusa (Du i sar., 2013). Prethodni radovi su pokazali dva kombinacije subjedinica K_{ATP} kanala: Kir6.1 sa SUR2B i Kir6.2 sa SUR1 u glatkim mišićima gravidnog uterusa pacova i žena na transkripcionom nivou (Chien i sar., 1999, Curlei i sar., 2002). Rezultati imunohistohemijskog bojenja predstavljeni ovde su potvrdili postojanje obe subjedinice pore, Kir6.1 i Kir6.2 u IVF gravidnom humanom miometriju. Pored toga, *western blot* analiza je pokazala da nivo ekspresije proteina Kir6.2 bio veći nego Kir6.1 subjedinice kada su normalizovani u odnosu na ekspresiju β -aktina. Ovi nalazi su u skladu sa istraživanjima na ljudskom spontano gravidnom miometriju (Xu et al., 2011). Pokazano je ranije da kvantitet K_{ATP} kanala sastavljenih od Kir6.1 i SUR2B subjedinica bio značajno različit u glatko-mišićnom tkivu negravidnog humanog uterusa u odnosu na gravidni. Nivo ekspresije u negravidnom je bio veći nego u gravidnom pred kraj trudnoće (Karl i sar., 2002). Odnos između farmakološkog dejstva različitih OKK i molekularne kompozicije K_{ATP} kanala su uzajamno zavisni. Odnosno, pinacidil aktivira K_{ATP} kanale koji sadrže SUR2A i SUR2B, ali ne utiče na kanale sadrže SUR1 subjedinice (Iokoshiki i sar., 1998); diazoksid aktivira kanale sa SUR1 ili SUR2B ali ne i sa SUR2A subjedinicom (Inagaki i sar., 1996). Nikorandil aktivira kanale sa SUR2B i ne aktivira one sa SUR1 subjedinicom (Shindo i sar., 1998). Elektrofiziološka istraživanja na β ćelijama pankreasa otkrila su da rezveratrol može imati SUR1 - specifično

dejstvo (Hambrock i sar., 2007). Moguće je da rezveratrol može da proizvede relaksaciju IVF gravidne materice, aktivacijom Kir6.2/SUR1 kombinacije kanala. Međutim, na osnovu njegovog antagonizma i blokatora BK_{Ca} i Kv kanala, izgleda da mehanizam inhibicije rezveratrola uključuje više ciljeva u miometrijskoj ćeliji.

Aktivacija BK_{Ca} kanala inhibira kontrakcije glatkih mišića materice (Brainard i sar., 2007). Već je napomenuto, da je iberiotoksin visoko specifični blokator BK_{Ca} kanala (Anver i sar., 1993). Prema dobijenim rezultatima sa iberiotoksinom i rezveratrolom razumno je zaključiti da su BK_{Ca} kanali uključeni u mehanizma delovanja rezveratrola kod humanog IVF gravidnog miometrijuma. Slično, iberiotoksin je antagonizirao efekat rezveratrola na modelu faznih kontrakcija negravidnog uterusa (Novakovic i sar., 2013). Na modelu β ćelija, Chen i saradnici (2007) su izložili da rezveratrol aktivira BK_{Ca} kanale kroz povećanje intracelularnog Ca²⁺. Slično tome, pokazano je na modelu glatkih mišića vene porte; BK_{Ca} kanali su bili uključeni u inhibitorni efekat rezveratrola utičući na Ca kanale i / ili transport Ca²⁺ u ćeliji (Protic i sar., 2013). Pod fiziološkim uslovima, priliv Ca²⁺ putem L-tipa Ca-kanala stimuliše BK_{Ca} kanale što olakšava jonski efluks K⁺, kaskadno dovodi do hiperpolarizacije ćelijske membrane. Moguće je da rezveratrol modulira homeostazu intracelularnog Ca²⁺ i povratno i indirektno reguliše efluks K⁺ jona. U miocitima, rezveratrol povećava refrakterni period i smanjuje prag depolarizacije membrane (Chen i sar., 2007).

Podaci ukazuju na umešanost BK_{Ca} kanala u inhibitorni efekat rezveratrola, ali prema nepotpunom antagonizmu sa iberiotoksinom, čini se da rezveratrol inhibira gravidni miometrijum delujući još na neke dodatne ćelijske strukture. Rezultati eksperimenata iz *western blot* analize i imunohistohemijskog bojenja specifičnim antitelima pokazali su prisustvo BK_{Ca} kanala uglavnom u citoplazmi glatko-mišićnih ćelija IVF gravidne materice. Uprkos tome što su BK_{Ca} kanali kodirani od strane samo jednog gena, njihov diverzitet je velik. Alternativno spajanje, posttranslacione modifikacije stvaraju ovu raznovrsnost (Orio i sar., 2005, Ian i Aldrich, 2010). Raznovrsnost BK_{Ca} u okviru ove velike superfamilije proteina se uvećava udruživanjem subjedinica koje sadrže poru – α sa jednim ili više pomoćnih, regulatornih β subjedinica formirajući hetero-oligomere koji funkcionišu kao tetrameri. Ekspresija α subjedinice je izuzetno tkivno specifična. Prisustvo α subjedinica potvrđeno u transkriptu i na nivou proteina u gravidnom i negravidnom

uterus kako animalnom tako i humanom (Chanrachakul i sar., 2003, Karli i sar., 2004, Novaković i sar., 2013). Takođe, rezultati iz ove dela studije su u skladu sa navedenim nalazima.

Voltažno-zavisni K kanali su velika, izuzetno raznovrsna grupa. Podaci predstavljeni u ovom delu su pokazali da 4-AP antagonizirao efekat rezveratrola na kontrakcijama IVF gravidnog miometrijuma. Prethodno, istraživanja su potvrdila da Kv kanali učestvuju u efektima rezveratrola u različitim krvnim sudovima i faznim kontrakcijama negravidne materice pacova (Novakovic i sar., 2006 a, b, Gojkovic - Bukarica i sar., 2008, Novaković i sar., 2013). Međutim, relaksantni efekat rezveratrola na toničnim kontrakcijama uterusa i arteriole retine nisu bili blokirani 4-AP (Nagaoka sar., 2007, Novakovic sar., 2013). Na različitom eksperimentalnom modelu je pokazano da rezveratrol može da inhibira Kv kanale u β ćelijama (Chen i sar., 2007). Već su pomenute tri odvojene Kv struje u ćelijama miometrijuma: 4-AP neosetljiva, 4-AP osetljiva, brzo inaktivirajuća struja, 4-AP osetljiva sporo inaktivirajuća struja (Smith et al., 2007). Ove različite komponenti Kv struja razlikuju se i po provodljivosti i osetljivosti na lekove. Utvrđeno je da kanali podtipa Kv1-4 spadaju u sporo inaktivirajuće struje i da su osetljivi na 4-AP (Suzuki i Takimoto, 2005). Kada posmatramo rezultate molekularnih analiza, može se primetiti da je ekspresija Kv kanala veća u odnosu na K_{ATP} i BK_{Ca} . Podaci u literaturi o miometrijskim Kv kanalima su retki. Nedavno, pokazano je na animalnom modelu prisustvo proteina subjedinica koje formiraju poru Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv4.2 i Kv4.3 kanala u miometrijumu miša. Za sada ne postoje nalazi molekularne ekspresije proteina Kv4.x kanala u glatkoj muskulaturi humane materice. U ovom radu, najintenzivnije bojenje specifičnim anti-telima je pokazao kanal Kv4.2. Isti odnos je potvrđen i *western blot* analizom: α subjedinica Kv4.2 kanala bila je najizraženija kada su trake svih tipova ispitivanih kanala normalizovane u odnosu na ekspresiju β - aktina. Nekoliko studija urađenih na modelu materice miša i pacova su pokazale da se nivo transkripcije informacione RNK Kv4.3 podtipa smanjuje tokom graviditeta (Song i sar., 2001). Činjenica da je, imunohistohemijsko bojenje i *western blot* potvrdili prisustvo α subjedinice Kv4.2 kanala u humanom IVF gravidnom miometrijumu sugeriše da ovaj podtip kanala nema nishodnu regulaciju tokom progresije trudnoće. Ova pretpostavka je u

skladu sa istraživanjima na uterusu miša u terminu porođaja (Smith i sar., 2007). Uzeti zajedno, ovi nalazi ukazuju na moguću ulogu Kv4.2 kanale u akciji rezveratrola.

Na osnovu farmakoloških rezultata prikazanih ovde, moglo bi se zaključiti da su K_{ATP} , iberiotoksin - i 4-AP - osetljivi kanali uključeni u inhibiciju do koje dovodi rezveratrol kod oksitocinom indukovanim kontrakcijama IVF gravidnog miometrijuma. Slično tome, OKK, kao što je pinacidil, pokazuju veći afinitet za jedan tip kanala ali mogu da aktiviraju i druge, pokazuju nespecifični antagonizam sa nekoliko selektivnih blokatora K kanala (Khan i sar., 1998, Gojkovic - Bukarica i sar., 2011). Kako bi uporedili farmakološki profil rezveratrol sa OKK testirali smo efekte pinacidila na IVF gravidni miometrium. Pod opisanim eksperimentalnim uslovima, pinacidil je dovodio do inhibicije oksitocinskih kontrakcija sa skoro istovetnom pD_2 vrednošću kao rezveratrol. Potentnost pinacidila dobijena za kontrakcije indukovane oksitocinom IVF gravidnog miometrijuma bila je niža od potentnosti dobijene na modelu kontrakcija, takođe, indukovanih oksitocinom kod spontano gravidnog miometrijuma (pD_2 vrednosti su bile 4.53 odnosno 5.6 i 6.13, Longo i sar., 2003, Morrison i sar., 1998). Međutim, pD_2 vrednost pinacidila dobijena na modelu negravidnog humanog miometrijuma (7.80) je bila znatno veća od pD_2 vrednosti pinacidila dobijene na spontano gravidnom miometrijumu (6.13) (Kostrzevska i sar., 1996, Morrison i sar., 1998). Slična korelacija je uočljiva i za druge OKK, aprikalim i BRL 38227 tj. oni su bili statistički značajno potentniji u relaksaciji negravidnog u odnosu na gravidni miometrijum (Cheuk i sar., 1993). Ovi podaci navode na ideju da promene u zastupljenosti i funkciji K kanala zavise od gestacionog doba (stadijuma trudnoće) kao i hormonskog statusa utičući na efikasnost i potenciju OKK. Alternativno objašnjenje bi moglo biti, da su uzorci miometrijuma prikupljeni od pacijenkinja različite starosne dobi. Poznato je da je IVF tretman značajno češći vid začeća kod žena starijih od 33 godina, nego kod mlađih žena (Van Voorhis 2005). Kada je sagledana starost porodilja iz grupe kod kojih je trudnoća spontano začeta, raspon starosnog doba je bio 19-37 godina (srednja vrednost ~ 30 godina, Cheuk i sar., 1993, Longo i sar., 2003). U grupi porodilja iz IVF programa, ovaj opseg je bio između 27-42 godina (srednja vrednost ~ 35 godina). Nedavno je pokazano da regulacija i kvantitet K_{ATP} kanala se povećava sa starosnom dobi u glatko-mišićnom tkivu humane materice, miometrijum porodilja starijih od 35 godina imaju više K_{ATP} kanala nego miometrijum mlađih od 35 godina (Du i sar., 2013). Povezanost starosne

dobi i kontraktilnost miometrijuma pokazana je još u nekoliko studija. Pokazano je da kontraktilna sposobnost negravidnog miometrijuma opada sa godinama, bilo da su u pitanju SRK ili indukovane (Arrowsmith i sar., 2012). Dodatno, pronađene su značajne razlike u kontraktilnim svojstvima između miometrijuma pojedinačnih trudnoća u odnosu na blizanačke (Turton i sar., 2013) i gestacionog doba – “prenešena“ trudnoća je povezana sa slabim kontraktilnim sposobnostima miometrijuma (Arrowsmith i sar., 2012).

Uzevši u obzir navedeno, može se zaključiti da rezveratrol ispoljava snažni inhibični efekat na kontraktilnost humanog IVF gravidnog miometrijuma. Na osnovu afiniteta blokatora K kanala, čini se da rezveratrol deluje na oksitocinom izazvane kontrakcije modulišući K kanale, ali i da ima dodatni K kanalski nezavisni mehanizam/e akcije i da su potrebna dalja istraživanja da se identifikuju unutarćelijski ciljevi rezveratrola u ćeliji humanog miometrijuma. Ova studija je pokazala i odnos ekspresije proteina K_{ATP} , K_v i BK_{Ca} kanala u miometrijskim ćelijama gravidne materice žene iz IVF programa. Po prvi put je pokazano prisustvo proteina $K_v4.2$ kanala u tkivu gravidnog humanog miometrijuma.

Postoje značajni dokazi da rezveratrol pokazuje veliki potencijal kao terapijski agens u prevenciji i lečenju abnormalne kontraktilnosti uterusa.

INHIBITorni EFEKTI NARINGENINA NA KONTRAKTILNOST NEGRAVIDNOG UTERUSA PACOVA I HUMANOG GRAVIDNOG UTERUSA

Na osnovu prethodno iznetih rezultata za negravidni uterus pacova, može se uvideti da je rezveratrol pokazao statistički znatno veću potentnost od naringenina kod sva tri modela kontrakcija. Srednje efektivne koncentracije naringenina su bile slične kod sva tri modela, što nije bio slučaj sa rezveratrolom. Moglo bi se reći, da inhibicija do koje dovodi naringenin ne zavisi od načina indukcije kontrakcija, odnosno od stanja u kom se nalazi ćelija. U stvari, afinitet naringenina za ciljna mesta u miocitu ne varira. Pod prepostavkom da deluje na jonske kanale, njegov afinitet za njih ne zavisi od konformacionog stanja kanala, kao što je to bio slučaj sa rezveratrolom. U prilog ovome govori i činjenica da je

srednja efektivna koncentracija naringenina pri inhibiciji oksitocinom indukovanih kontrakcija gravidnog miometrijuma slična onoj koja je zabeležena kod modela negravidnog animalnog uterusa. Moglo bi se zaključiti da naringenin ne pokazuje različitu selektivnost za različita tkiva kao rezveratrol.

Slična istraživanja sa naringeninom na glatko-mišićnom tkivu uterusa, su retka. Zapravo, studija Hsia i sar. (2008) je pokazali da *adlay hull* ekstrat biljke *Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf* odnosno, naziv na kineskom joj je *Yi-yi-la* se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini za lečenje dismenoreje. Kako je HPLC metodom određeno, ovaj ekstrat sadrži veći broj polifenola, među kojima naringenin i kvercetin. Ova grupa istraživača pokazala je da naringenin i kvercetin inhibiraju kontrakcije negravidnog uterusa pacova indukovane $PGF_{2\alpha}$. Interesantno, koncentracija naringenina je bila 175 $\mu\text{g/ml}$, što je u skladu sa vrednostima utvrđenim u ovom radu (126 μM kod faznih kontrakcija, odnosno 199 μM kod toničnih indukovanih oksitocinom, odnosno 129 μM kod gravidnog humanog miometrijuma). Ako razmatramo, uticaj naringenina na kontraktilnost umbilikalnih venskih krvnih sudova, srednje efektivne koncentracije su bez signifikantne razlike (176 μM , Protic i sar., 2014).

Za razliku od rezveratrola, inhibitorni efekti naringenina, izgleda, ne zavise ni od vrste tkiva i tipa kontrakcije, odnosno načina indukcije kontrakcija. Prikazane činjenice navode na ideju da rezveratrol i naringenin imaju drugačije mehanizme dejstva. Nekoliko radova ukazuju da su K kanali uključeni u mehanizam dejstva naringenina. U oocitama *Xenopus sp.* pokazano je da naringenin direktno aktivira rekombinantni humani G protein-aktivirajući Kir kanal, vezujući se za vanćelijsku petlju između dva segmenta (Yow i sar., 2011). U vaskularnim glatko-mišićnim ćelijama naringenin dovodi do endotel-nezavisne vazodilatacije kroz aktivaciju BK_{Ca} kanala (Saponara i sar., 2006).

Kada je u pitanju mehanizam dejstva kojim naringenin ihhibira kontrakcije glatko-mišićnog tkiva uterusa ostaje da se detaljno ispita u budućim istraživanjima. Ono što se sa sigurnošću može reći u zaključku je da rezveratrol znatno potentnije inhibira kontraktilnost uterusa od naringenina.

VI ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru farmakološke analize efekata rezveratrola i molekularne analize kalijumovih kanala u tkivu pacovskog negravidnog i tkivu humanog gravidnog uterusa pacijentkinja iz programa IVF, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Ova studija jasno pokazuje da rezveratrol ispoljava snažni inhibitorski efekat na spontane i indukovane kontrakcije negravidnog i gravidnog uterusa. Način indukcije kontrakcije miometrijuma uticalo je različito na efekat rezveratrola.
2. Na osnovu ostvarenog antagonizma sa primenjenim blokatorima kalijumovih kanala, moglo bi se zaključiti da inhibitorski odgovor rezveratrola kod spontanih ritmičkih i faznih kontrakcija indukovanih oksitocinom uključuje različite tipove K kanala u tkivu miometrijuma. Međutim, kada se primenjuje u visokim koncentracijama, rezveratrol ima dodatne mehanizme delovanja nezavisne od K kanala. Činjenica da je efekat rezveratrola na tonične kontrakcije izazvane visokom koncentracijom oksitocina uglavnom nezavisan od K kanala, zahteva dodatno rasvetljavanje.
3. Doprinos ove studije je što je po prvi put pokazala odnos ekspresije proteina K_{ATP} , BK_{Ca} , Kv kanala u tkivu glatke muskulature negravidnog uterusa pacova i gravidnog uterusa žena iz IVF programa. Takođe, ovo je prva studija koja je pokazala prisustvo proteina Kv2.1 podtipa Kv kanala i protein Kir6.1 i Kir6.2 subjedinica K_{ATP} kanala u tkivu glatke muskulature negravidnog uterusa pacova, kao i Kv4.2 u tkivu gravidnog humanog miometrijuma. Postoji razlika u ekspresiji tipova K kanala u zavisnosti od fiziološkog stanja uterusa, odnosno negravidnog i gravidnog stanja.

4. Na osnovu rezultata prikazanih ovde prihvatljivo je zaključiti da rezveratrol ima veliki potencijal da se koristi u prevenciji i lečenju abnormalne i nepoželjne kontraktilnosti uterusa kao u slučaju dismenoreje i prevremenih porođaja.
5. Naringenin inhibira spontane i indukovane kontrakcije negravidnog i gravidnog uterusa. Rezveratrol znatno potentnije inhibira kontraktilnost uterusa od naringenina ali nema profil sintetskih otvarača kalijumovih kanala

VII LITERATURA

Aaronson PI, Sarwar U, Gin S, Rockenbauch U, Connolly M, Tillet A, et al. 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: 815-24.

Adlercreutz H, Yamada T, Wähälä K, Watanabe S. Maternal and neonatal phytoestrogens in Japanese women during birth. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180(3 Pt 1):737-43.

Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science.* 1995;268(5209):423-6.

Aguilar-Bryan L, Clement JP 4th, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol Rev.* 1998; 078: 227-45.

Ahnfelt-Rønne I. Pinacidil: history, basic pharmacology, and therapeutic implications. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988;12 Suppl 2:S1-4.

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(10):1634-50.

Alvarez H, Caldeyro-Barcia R. The normal and abnormal contractive waves of the uterus during labour. *Gynaecologia.* 1954;138:190-212.

Antonucci DE, Lim ST, Vassanelli S, Trimmer JS. Dynamic localization and clustering of dendritic Kv2.1 voltage-dependent potassium channels in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2001; 108: 69-81.

Anwer K, Oberti C, Perez GJ, Perez-Reyes N, McDougall JK, Monga M, et al. Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. *Am J Physiol*. 1993; 265: C976-85.

Anwer K, Sanborn BM. Changes in intracellular free calcium in isolated myometrial cells: role of extracellular and intracellular calcium and possible involvement of guanine nucleotide-sensitive proteins. *Endocrinology*. 1989;124(1):17-23.

Appiah I, Milovanovic S, Radojicic R, Nikolic-Kokic A, Orescanin-Dusic Z, Slavic M, et al. Hydrogen peroxide affects contractile activity and anti-oxidant enzymes in rat uterus. *Br J Pharmacol*. 2009; 158: 1932-41.

Arrowsmith S, Kendrick A, Hanley JA, Noble K, Wray S. Myometrial physiology--time to translate? *Exp Physiol*. 2014;99(3):495-502.

Aschoff L. Zur Zervix-Frage. *Monatsschr Geburtsh Gynäkol*. 1905;22:611-5.

Atanacković M, Petrović A, Jović S, Gojković- Bukarica Lj, Bursać M, Cvejić J. Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry*. 2012; 131: 513-518.

Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science*. 1991;253(5019):551-5.

Bai X, Bugg GJ, Greenwood SL, Glazier JD, Sibley CP, Baker PN, Taggart MJ, Fyfe GK. Expression of TASK and TREK, two-pore domain K⁺ channels, in human myometrium. *Reproduction*. 2005;129(4):525-30.

Barasoain I, Rojo JM, Portolés A. "In vivo" effects of acetylsalicylic acid and two ether derived compounds on primary immune response and lymphoblastic transformation. *Immunopharmacology*. 1980;2(4):293-300.

Beleslin-Čokić BB, Čokić VP, Wang L, Piknova B, Teng R, Schechter AN, et al. Erythropoietin and hypoxia increase erythropoietin receptor and nitric oxide levels in lung microvascular endothelial cells. *Cytokine*. 2011; 54: 129-35.

Benkusky NA, Fergus DJ, Zuccherro TM, England SK. Regulation of the Ca²⁺-sensitive domains of the maxi-K channel in the mouse myometrium during gestation. *J Biol Chem.* 2000; 275: 27712-9.

Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol.* 2008; 586(21): 5047-61.

Bertelli A, Falchi M, Dib B, Pini E, Mukherjee S, Das DK. Analgesic resveratrol? *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(3):403-4.

Bogacka I, Bogacki M, Gaglowska M, Kurzynska A, Wasielek M. In vitro effect of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) ligands on prostaglandin E₂ synthesis and secretion by porcine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *J Physiol Pharmacol.* 2013; 64: 47-54.

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygen KG. International estimates of infertility prevalence and treatment –seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction* 2007; 22: 1506-1512

Bossmar T. Treatment of preterm labor with the oxytocin and vasopressin antagonist Atosiban. *J Perinat Med.* 1998;26(6):458-65.

Bou-Abboud E, Li H, Nerbonne JM. Molecular diversity of the repolarizing voltage-gated K⁺ currents in mouse atrial cells. *J Physiol.* 2000; 529: 345-58.

Brainard AM, Korovkina VP, England SK. Potassium channels and uterine function. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18: 332-9.

Buluc M, Ayaz M, Turan B, Demirel-Yilmaz E. Resveratrol-induced depression of the mechanical and electrical activities of the rat heart is reversed by glyburide: evidence for possible K(ATP) channels activation. *Arch Pharm Res.* 2007; 30: 603-7.

Buxton IL. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation. *Mol Pharmacol.* 2004;65(5):1051-9.

Candelario-Jalil E, de Oliveira AC, Gräf S, Bhatia HS, Hüll M, Muñoz E, Fiebich BL. Resveratrol potently reduces prostaglandin E₂ production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *J Neuroinflammation.* 2007;4:25.

Catalano RD, Lannagan TR, Gorowiec M, Denison FC, Norman JE, Jabbour HN. Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition? *Mol Hum Reprod.* 2010;16(5):311-9.

Chanrachakul B, Matharoo-Ball B, Turner A, Robinson G, Broughton-Pipkin F, Arulkumaran S & Khan RN 2003 Immunolocalization and protein expression of the alpha subunit of the large-conductance calcium-activated potassium channel in human myometrium. *Reproduction*. 126 43-8.

Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. Use of multivitamins, intake of B vitamins, and risk of ovulatory infertility. *Fertil Steril*. 2008;89(3):668-76.

Chen CX, Kwekkeboom KL, Ward SE. Self-report pain and symptom measures for primary dysmenorrhoea: A critical review. *Eur J Pain*. 2014; *in press*

Chen WP, Su MJ, Hung LM. In vitro electrophysiological mechanisms for antiarrhythmic efficacy of resveratrol, a red wine antioxidant. *Eur. J. Pharmacol*. 2007; 554: 196–204.

Chen WP, Chi TC, Chuang LM, Su MJ. Resveratrol enhances insulin secretion by blocking K (ATP) and K (V) channels of beta cells. *Eur J Pharmacol*. 2007; 568: 269-77.

Chen Y, Zhao W, Yang JS, Cheng Z, Luo H, Lu Z, Tan M, Gu W, Zhao Y. Quantitative acetylome analysis reveals the roles of SIRT1 in regulating diverse substrates and cellular pathways. *Mol. Cell Proteomics*. 2012;11:1048-1062.

Chen YR, Yi FF, Li XY, Wang CY, Chen L, Yang XC, et al. Resveratrol attenuates ventricular arrhythmias and improves the long-term survival in rats with myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2008; 22: 479-85.

Chen CX, Kwekkeboom KL, Ward SE. Self-report pain and symptom measures for primary dysmenorrhoea: A critical review. *Eur J Pain*. 2014. *in press*

Cheuk JM, Hollingsworth M, Hughes SJ, Piper IT & Maresh MJ 1993 Inhibition of contractions of the isolated human myometrium by potassium channel openers. *Am J Obstet Gynecol*. 168 953-60.

Chien EK, Zhang Y, Furuta H & Hara M Expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in female rat reproductive tissues: overlapping distribution of messenger ribonucleic acid for weak inwardly rectifying potassium channel subunit 6.1 and sulfonyleurea-binding regulatory subunit 2. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 180 1121-6.

Choi KC, An BS, Yang H, Jeung EB. Regulation and molecular mechanisms of calcium transport genes: do they play a role in calcium transport in the uterine endometrium? *J Physiol Pharmacol.* 2011; 62: 499-504.

Chuang CC, McIntosh MK. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annu Rev Nutr.* 2011;31:155-76.

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, et al. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 868: 233-85.

Curley M, Cairns MT, Friel AM, McMeel OM, Morrison JJ, Smith TJ. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8: 941-5.

Danforth DN The fibrous nature of human cervix and its relation to the isthmic segment in gravid and nongravid uterus. *Am J Obstet Gynecol.* 1947;53:541-57.

Dewey MM, Barr L. Intercellular Connection between Smooth Muscle Cells: the Nexus. *Science.* 1962;137(3531):670-2.

Di Renzo GC, Roura LC, Facchinetti F, Antsaklis A, Breborowicz G, Gratacos E, Husslein P, Lamont R, Mikhailov A, Montenegro N et al. Guidelines for the management of spontaneous preterm labor: identification of spontaneous preterm labor, diagnosis of preterm premature rupture of membranes, and preventive tools for preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal.* 2011; 24: 659-67.

Du Q, Jovanović S, Tulić L, Sljivančanin D, Jack DW, Zijić V, Abdul KS, Tulić I & Jovanović A KATP channels are up-regulated with increasing age in human myometrium. *Mech Ageing Dev.* 2013; 134: 98-102.

Edwards D, Good DM, Granger SE, Hollingsworth M, Robson A, Small RC, et al. The spasmogenic action of oxytocin in the rat uterus--comparison with other agonists. *Br J Pharmacol.* 1986; 88: 899-908.

Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr.* 2001; 131(2):235-41.

Erulkar SD, Ludmir J, Ger B, Nori RD. Expression of different potassium channels in cells isolated from human myometrium and leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168(5):1628-39.

Fan E, Zhang L, Jiang S, Bai Y. Beneficial effects of resveratrol on atherosclerosis. *J Med Food.* 2008;11(4):610-4.

Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC, Nichols CG. Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev.* 2010;90(3):799-829.

Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* 1993;341(8852):1103-4.

Freudenreich CH, Kreuzer KN. Localization of an aminoacridine antitumor agent in a type II topoisomerase-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(23):11007-11.

Garfield RE, Sims S, Daniel EE. Gap junctions. Their presence and necessity in myometrium during parturition. *Science.* 1977; 198:958-60.

Garfield RE, Hayashi RH, Harper MJ. In vitro studies on the control of human myometrial gap junctions. *Int J Gynaecol Obstet.* 1987;25(3):241-8.

Gojkovic-Bukarica L, Novakovic A, Kanjuh V, Bumbasirevic M, Lesic A, Heinle H. A role of ion channels in the endothelium-independent relaxation of rat mesenteric artery induced by resveratrol. *J Pharmacol Sci.* 2008; 108: 124-30.

Gojkovic-Bukarica L, Savic N, Peric M, Markovic-Lipkovski J, Cirovic S, Kanjuh et al. Effect of potassium channel opener pinacidil on the contractions elicited electrically or by noradrenaline in the human radial artery. *Eur J Pharmacol.* 2011; 654: 266-73.

Gojkovic-Bukarica L, Beleslin-Cokic BB, Novakovic AN, Peric MS, Markovic-Lipkovski JZ, Cirovic SZ, Nezic DG, Lesic AR, Kanjuh VI & Heinle H. The effects of potassium channel opener P1075 on the human saphenous vein and human internal mammary artery. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;57: 648-55.

Hambrock A, de Oliveira Franz CB, Hiller S, Grenz A, Ackermann S, Schulze DU, Drews G & Osswald H Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. *J Biol Chem.* 2007;282: 3347-56.

Harborne JB, Paxman GJ. Genetics of antocyanin product in the radish. *Heredity* (Edinb). 1964;19:505-6.

Harel Z, Riggs S, Vaz R, Flanagan P, Harel D. The use of the leukotriene receptor antagonist montelukast (Singulair) in the management of dysmenorrhea in adolescents. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2004; 17: 183-6.

Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*. 2008;7:1020-1035.

Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*. 2008;7(8):1020-35.

Harrison SD, Nghiem HV, Shy K. Uterine rupture with fetal death following blunt trauma. *AJR Am J Roentgenol*. 1995;165(6):1452.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. 2002;96(2-3): 67-202.

Hazato T, Naganawa H, Kumagai M, Aoyagi T, Umezawa H. beta-Galactosidase-inhibiting new isoflavonoids produced by actinomycetes. *J Antibiot* (Tokyo). 1979;32(3):217-22.

Hazel SJ. A novel early chorioallantoic membrane assay demonstrates quantitative and qualitative changes caused by antiangiogenic substances. *J Lab Clin Med*. 2003;141(3):217-28.

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*. 2010;90(1):291-366.

Hillier K, Wallis P. Prostaglandins, steroids and the human cervix, u: Ellwood DA, Anderson AM (eds). *The cervix in pregnancy and labor. Clinical and biochemical investigations*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1981;34-40.

Holda JR, Oberti C, Perez-Reyes E, Blatter LA. Characterization of an oxytocin-induced rise in $[Ca^{2+}]_i$ in single human myometrium smooth muscle cells. *Cell Calcium*. 1996;20(1):43-51.

Holdiman AJ, Fergus DJ & England SK 17beta-Estradiol upregulates distinct maxi-K channel transcripts in mouse uterus. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;192: 1-6.

Hong SH, Sung R, Kim YC, Suzuki H, Choi W, Park YJ, Ji IW, Kim CH, Myung SC, Lee MY, Kang TM, You RY, Lee KJ, Lim SW, Yun HY, Song YJ, Xu WX, Kim HS, Lee SJ. Mechanism of Relaxation Via TASK-2 Channels in Uterine Circular Muscle of Mouse. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2013;17(4):359-65.

Horrigan FT & Aldrich RW Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J Gen Physiol.* 2002;120: 267-305.

Hsia SM, Kuo YH, Chiang W, Wang PS. Effects of adlay hull extracts on uterine contraction and Ca²⁺ mobilization in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Sep;295(3):E719-26.

Hsia SM, Wang KL, Wang PS. Effects of resveratrol, a grape polyphenol, on uterine contraction and Ca²⁺ mobilization in rats in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 2011; 152:2090-9.

Hughesdon P. The fibromuscular structure of the cervix and its changes during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Emp.* 1958;149:105-12.

Huszar G, Roberts JM. Biochemistry and pharmacology of the myometrium and labor: regulation at the cellular and molecular levels. *Am J Obstet Gynecol.* 1982;142(2):225-37.

Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J & Seino S A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron.* 1996;16:1011-7.

Jahangir A, Terzic A. K_{ATP} channel therapeutics at the bedside. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:99-112.

Jakab M, Lach S, Bacová Z, Langelüdecke C, Strbák V, Schmidt S, Iglseider E, Paulmichl M, Geibel J, Ritter M. Resveratrol inhibits electrical activity and insulin release from insulinoma cells by block of voltage-gated Ca⁺ channels and swelling-dependent Cl⁻ currents. *Cell Physiol Biochem.* 2008;22(5-6):567-78.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997;275(5297):218-20.

Jinsart W, Ternai B, Buddhasukh D, Polya GM. Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and other kinases by mangostin and gamma-mangostin. *Phytochemistry*. 1992;31 (11):3711-3.

Kandaswami C, Middleton E Jr. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol*. 1994;366:351-76.

Kawamata M, Tonomura Y, Kimura T, Sugimoto Y, Yanagisawa T, Nishimori K. Oxytocin-induced phasic and tonic contractions are modulated by the contractile machinery rather than the quantity of oxytocin receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E992-9.

Khan RN, Matharoo-Ball B, Arulkumaran S, Ashford ML. Potassium channels in the human myometrium. *Exp Physiol*. 2001; 86: 255-64.

Khan RN, Morrison JJ, Smith SK, Ashford ML. Activation of large-conductance potassium channels in pregnant human myometrium by pinacidil. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 178: 1027-34.

Kim YA, Kim GY, Park KY, Choi YH. Resveratrol inhibits nitric oxide and prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-activated C6 microglia. *J Med Food*. 2007;10(2):218-24.

Knock GA, Smirnov SV, Aaronson PI. Voltage-gated K⁺ currents in freshly isolated myocytes of the pregnant human myometrium. *J Physiol*. 1999; 518: 769-81.

Kontic-Vucinic O, Terzic M & Radunovic N. The role of antioxidant vitamins in hypertensive disorders of pregnancy. *J Perinat Med*. 2008;36: 282-90.

Kopitović V, Milatović S, Pjević AT, Bjelica A, Bujas I, Tabs N. Results and experiences after 1000 IVF cycles at the Clinic for Gynecology and Obstetrics in Novi Sad. *Med Pregl*. 2011;64(11-12):565-9.

Kostrzewska A, Laudański T & Batra S. Inhibition of contractile responses of human myometrium and intramyometrial arteries by potassium channel openers. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1996;75: 886-91.

Kretzschmar G, Vollmer G, Schwab P, Tischer S, Metz P, Zierau O. Effects of the chemically synthesized flavanone 7-(O-prenyl)naringenin-4'-acetate on the estrogen signaling pathway in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;107(1-2):114-9.

Kundu JK, Shin YK, Kim SH, Surh YJ. Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF-kappaB in mouse skin by blocking IkappaB kinase activity. *Carcinogenesis*. 2006; 27(7):1465-74.

Kupittayanant S, Munglue P, Lijuan W, Promprom W, Budhaklala N, Wray S. Finding new agents in medicinal plants to act on the myometrium. *Exp Physiol*. 2014;99(3):530-7.

Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen H, Evans A, Ferrario M, Tuomilehto J. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet*. 2000; 355(9205):675-87.

Kyo R, Nakahata N, Sakakibara I, Kubo M, Ohizumi Y. Baicalin and baicalein, constituents of an important medicinal plant, inhibit intracellular Ca²⁺ elevation by reducing phospholipase C activity in C6 rat glioma cells. *J Pharm Pharmacol*. 1998;50(10):1179-82.

Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauguel-de Mouzon S, Jawerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(12):3061-100.

Larcombe-McDouall J, Buttell N, Harrison N, Wray S. In vivo pH and metabolite changes during a single contraction in rat uterine smooth muscle. *J Physiol*. 1999;518(Pt 3):783-90.

Li H, Xia N, Förstermann U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide*. 2012;26:102–110.

Li HF, Chen SA, Wu SN. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca⁽²⁺⁾-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2000; 45: 1035-45.

Lim R, Barker G, Wall CA, Lappas M. Dietary phytochemicals curcumin, naringenin and apigenin reduce infection-induced inflammatory and contractile pathways in human placenta, foetal membranes and myometrium. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(7):451-62.

Liss B, Roeper J. A role for neuronal K(ATP) channels in metabolic control of the seizure gate. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(12):599-601

Liu S, Rasmusson RL, Campbell DL, Wang S, Strauss HC. Activation and inactivation kinetics of an E-4031-sensitive current from single ferret atrial myocytes. *Biophys J*. 1996;70(6):2704-15.

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: 159-64.

Lovasz N, Ducza E, Gaspar R, Falkay G. Ontogeny of sulfonylurea-binding regulatory subunits of K(ATP) channels in the pregnant rat myometrium. *Reproduction*. 2011; 142: 175-81.

Malinowski M, Deja MA, Janusiewicz P, Golba KS, Roleder T, Wos S. Mechanisms of vasodilatory effect of perivascular tissue of human internal thoracic artery. *J Physiol Pharmacol*. 2013; 64: 309-16.

Manley PW, Quast U, Andres H, Bray K. Synthesis of and radioligand binding studies with a tritiated pinacidil analogue: receptor interactions of structurally different classes of potassium channel openers and blockers. *J Med Chem*. 1993;36(14):2004-10.

Matharoo-Ball B, Ashford ML, Arulkumaran S, Khan RN. Down-regulation of the alpha- and beta-subunits of the calcium-activated potassium channel in human myometrium with parturition. *Biol Reprod*. 2003; 68: 2135-41.

McCalley AE, Kaja S, Payne AJ, Koulen P. Resveratrol and calcium signaling: molecular mechanisms and clinical relevance. *Molecules*. 2014; 19(6):7327-40.

McKillen K1, Thornton S, Taylor CW. Oxytocin increases the [Ca²⁺]_i sensitivity of human myometrium during the falling phase of phasic contractions. *Am J Physiol*. 1999;276(2 Pt 1):E345-51.

Meera P, Wallner M, Song M, Toro L. Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(25):14066-71.

Mikkola TS, Clarkson TB. Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res*. 2002;53(3):605-19.

Monsuez JJ. Cardiac potassium currents and channels--part I: basic science aspects. *Int J Cardiol.* 1997;61(3):209-19.

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;169:1277-85.

Naderali EK, Smith SL, Doyle PJ, Williams G. The mechanism of resveratrol-induced vasorelaxation differs in the mesenteric resistance arteries of lean and obese rats. *Clin Sci (Lond).* 2001;100(1):55-60.

Nagaoka T, Hein TW, Yoshida A, Kuo L. Resveratrol, a component of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48: 4232-9.

Nanda, K; Grimes, DA (2006). "Magnesium sulfate tocolysis: Time to quit". *Obstetrics and Gynecology* 108 (4): 986–989.

National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK) 2004 Principles of care. In *Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems.* London (UK): RCOG Press.

Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature.* 1986;305(5930):147-8.

Novakovic A, Bukarica LG, Kanjuh V, Heinle H. Potassium channels-mediated vasorelaxation of rat aorta induced by resveratrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*2006;99:360-4.

Novakovic A, Gojkovic-Bukarica L, Peric M, Nezic D, Djukanovic B, Markovic-Lipkovski J et al. The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery. *J Pharmacol Sci.* 2006; 101: 85-90.

Novakovic R, Ilic B, Beleslin-Cokic B, Radunovic N, Heinle H, Scepanovic R & Gojkovic-Bukarica L The effect of resveratrol on contractility of non-pregnant rat uterus: the contribution of K(+) channels. *J Physiol Pharmacol.* 2013; 64:795-805.

Novakovic R, Milovanovic S, Protic D, Djokic J, Heinle H, Gojkovic-Bukarica L. The effect of potassium channel opener pinacidil on the non-pregnant rat uterus. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*2007;101:181-6.

Olafsdottir LB, Gudjonsson H, Jonsdottir HH, Björnsson E, Thjodleifsson B. Natural history of irritable bowel syndrome in women and dysmenorrhea: a 10-year follow-up study. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:534204.

Orio P, Latorre R. Differential effects of beta 1 and beta 2 subunits on BK channel activity. *J Gen Physiol.* 2005;125:395-411.

Orio P, Torres Y, Rojas P, Carvacho I, Garcia ML, Toro L, Valverde MA, Latorre R. Structural determinants for functional coupling between the beta and alpha subunits in the Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel. *J Gen Physiol.* 2006;127(2):191-204.

Park HY, Kim GY, Choi YH. Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor- κ B and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *Int J Mol Med.* 2012;30(1):204-10.

Parkington HC, Coleman HA. Ionic mechanisms underlying action potentials in myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1988;15(9):657-65.

Pérez GJ, Toro L, Erulkar SD, Stefani E. Characterization of large-conductance, calcium-activated potassium channels from human myometrium *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168(2):652-60.

Piper I, Minshall E, Downing SJ, Hollingsworth M, Sadraei H. Effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. *Br J Pharmacol.* 1990; 101: 901-7.

Pirola L, Fröjdö S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life.* 2008; 60: 323-32.

Platiša MM, Gal V, Nestorović Z, Gojković-Bukarica L. Quantification of the acute effect of a low dose of red wine by nonlinear measures of RR and QT interval series in healthy subjects. *Comput Biol Med.* 2014;53:291-6.

Poudel R, Stanley JL, Rueda-Clausen CF, Andersson IJ, Sibley CP, Davidge ST, Baker PN. Effects of resveratrol in pregnancy using murine models with reduced blood supply to the uterus. *PLoS One.* 2013;8(5):e64401.

Protić D, Beleslin-Čokić B, Novaković R, Kanjuh V, Heinle H, Sćepanović R, et al. Effect of Wine Polyphenol Resveratrol on the Contractions Elicited Electrically or by Norepinephrine in the Rat Portal Vein. *Phytother Res*. 2013;27:1685-93.

Pryde PG, Janeczek S, Mittendorf R. Risk-benefit effects of tocolytic therapy. *Expert Opin Drug Saf*. 2004;3(6):639-54.

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50(3):586-621.

Rahbek M, Nazemi S, Odum L, Gupta S, Poulsen SS, Hay-Schmidt A, Klaerke DA. Expression of the small conductance Ca^{2+} -activated potassium channel subtype 3 (SK3) in rat uterus after stimulation with 17β -estradiol. *PLoS One*. 2014;9(2):e87652.

Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(6):446-56.

Rosenfeld CR, Word RA, DeSpain K, Liu XT. Large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels contribute to vascular function in nonpregnant human uterine arteries. *Reprod Sci*. 2008; 15: 651-60.

Sanborn BM, Ku CY, Shlykov S, Babich L. Molecular signaling through G-protein-coupled receptors and the control of intracellular calcium in myometrium. *J Soc Gynecol Investig*. 2005;12(7):479-87.

Sanborn BM, Held B, Kuo HS. Specific estrogen binding proteins in human cervix. *J Steroid Biochem*. 1975;6:1107-12.

Saponara S, Testai L, Iozzi D, Martinotti E, Martelli A, Chericoni S, Sgaragli G, Fusi F, Calderone V. (+/-)-Naringenin as large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2006;149(8):1013-21.

Sareen D, Darjatmoko SR, Albert DM, Polans AS. Mitochondria, calcium, and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer. *Mol. Pharmacol*. 2007; 72: 1466–1475.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45(4):287-306.

Schneppenheim P, Hamperl H, Kaufmann C, Ober KG. Die Beziehungen des Schleimepithels zum Plattenepithel an dem Zervix uteri im Lebenslauf der Frau. Arch Gynäkol 1958;190:303.

Scholz EP, Zitron E, Kiesecker C, Lück S, Thomas D, Kathöfer S, Kreye VA, Katus HA, Kiehn J, Schoels W, Karle CA. Inhibition of cardiac HERG channels by grapefruit flavonoid naringenin: implications for the influence of dietary compounds on cardiac repolarisation. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2005;371(6):516-25.

Schotborgh CE & Wilde AA. Sulfonylurea derivatives in cardiovascular research and in cardiovascular patients. Cardiovasc Res. 1997;34:73-80.

Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. Neuron. 1996;16(6):1159-67.

Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK, Agrewala JN. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. Clin Exp Immunol. 2007;147(1):155-63.

Shen M, Zhao L, Wu RX, Yue SQ, Pei JM. The vasorelaxing effect of resveratrol on abdominal aorta from rats and its underlying mechanisms. Vascul Pharmacol. 2013; 58: 64-70.

Sheu SJ, Wu TT. Resveratrol protects against ultraviolet A-mediated inhibition of the phagocytic function of human retinal pigment epithelial cells via large-conductance calcium-activated potassium channels. Kaohsiung J Med Sci. 2009;25(7):381-8.

Sheu, SJ, Bee YS, Chen CH. Resveratrol and large-conductance calcium-activated potassium channels in the protection of human retinal pigment epithelial cells. J. Ocul. Pharmacol. 2008; 24: 551–555.

Sheu, SJ, Wu, TT. Resveratrol protects against ultraviolet A-mediated inhibition of the phagocytic function of human retinal pigment epithelial cells via large-conductance calcium-activated potassium channels. Kaohsiung J. Med. Sci. 2009; 25: 381–388.

Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. Pharmacol Rev. 2000;52(4):557-94.

Shindo T, Yamada M, Isomoto S, Horio Y & Kurachi Y. SUR2 subtype (A and B)-dependent differential activation of the cloned ATP-sensitive K⁺ channels by pinacidil and nicorandil. *Br J Pharmacol.* 1998;124:985-91.

Shmygol A, Gullam J, Blanks A, Thornton S. Multiple mechanisms involved in oxytocin-induced modulation of myometrial contractility. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 27: 827-32.

Shukla Y, Singh R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci.* 201;1215:1-8.

Singh NP, Hegde VL, Hofseth LJ, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) ameliorates experimental allergic encephalomyelitis, primarily via induction of apoptosis in T cells involving activation of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor. *Mol Pharmacol.* 2007;72(6):1508-21.

Smith RC, McClure MC, Smith MA, Abel PW, Bradley ME. The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007;5:41.

Sokolova VE, Vasil'chenko EA, Izmailova IK. Anabolic action of flavonoids. *Farmakol Toksikol.* 1978;41(3):323-7.

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;460:427-32.

Sonnenbichler J, Pohl A. Mechanism of silybin action, IV. Structure-action relationship (author's transl). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1980;361(11):1757-61.

Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Cucinotta D, Minutoli L, Deodato B, Ferlito M, Campo GM, Bova A, Caputi AP. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovasc Res.* 2000; 45(2):454-62.

St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet.* 1979;1(8124):1017-20.

Stockbridge N, Zhang H, Weir B. Effects of K⁺ channel agonists cromakalim and pinacidil on rat basilar artery smooth muscle cells are mediated by Ca⁽⁺⁺⁾-activated K⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181:172-8.

Stuenkel EL. Single potassium channels recorded from vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1989;257(3 Pt 2):H760-9.

Sulaiman M, Matta MJ, Sunderesan NR, Gupta MP, Periasamy M, Gupta M. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 298: H833–H843.

Suzuki T, Takimoto K. Differential expression of Kv4 pore-forming and KChIP auxiliary subunits in rat uterus during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288: E335-41.

Tabš D, Radunović N. Role of maternal and paternal age in an assisted reproductive program. *Medicinski pregled*, 2002; 55:(11-12):535-538.

Tabš D, Vejnović T, Radunović N. Preeclampsia and eclampsia in parturients from the in vitro fertilization program. *Medicinski pregled.* 2004; 57:(1-2):7-12.

Taggart MJ, Wray S. Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *J Physiol.*1998;511:133-44.

Tahara M, Morishige K, Sawada K, Ikebuchi Y, Kawagishi R, Tasaka K, et al. RhoA/Rho-kinase cascade is involved in oxytocin-induced rat uterine contraction. *Endocrinology.*2002;143:920-9.

Trew GH, Brown AP, Gillard S, Blackmore S, Clewlow C, O'Donohoe P, Wasiak R. In vitro fertilisation with recombinant follicle stimulating hormone requires less IU usage compared with highly purified human menopausal gonadotrophin: results from a European retrospective observational chart review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010. 8: 137.

Trincheri NF, Follo C, Nicotra G, Peracchio C, Castino R, Isidoro C. Resveratrol-induced apoptosis depends on the lipid kinase activity of Vps34 and on the formation of autophagolysosomes. *Carcinogenesis.* 2008; 29(2):381-9.

Trujillo MM1, Ausina P, Savineau JP, Marthan R, Strippoli G, Advenier C, Pinto FM, Candenias ML. Cellular mechanisms involved in iso-osmotic high K⁺ solutions-

induced contraction of the estrogen-primed rat myometrium. *Life Sci.* 2000;66(25):2441-53.

Tseng-Crank J, Foster CD, Krause JD, Mertz R, Godinot N, DiChiara TJ, Reinhart PH. Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca(2+)-activated K⁺ channel isoforms from human brain. *Neuron.* 1994;13(6):1315-30.

Tunstall-Pedoe H, Vanuzzo D, Hobbs M, Mähönen M, Cepaitis Z, Kuulasmaa K, Keil U. Estimation of contribution of changes in coronary care to improving survival, event rates, and coronary heart disease mortality across the WHO MONICA Project populations. *Lancet.* 2000; 355(9205):688-700.

Turton P, Arrowsmith S, Prescott J, Ballard C, Bricker L, Neilson J, Wray S. A comparison of the contractile properties of myometrium from singleton and twin pregnancies. *PLoS One.* 2013;8(5):e63800.

van Ginkel PR, Sareen D, Subramanian L, Walker Q, Darjatmoko SR, Lindstrom MJ, Kulkarni A, Albert DM, Polans AS. Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clin Cancer Res.* 200; 13(17):5162-9.

Van Voorhis BJ. Clinical practice. In vitro fertilization. *N Engl J Med.*2007;356:379-86.

Wallner M, Meera P, Toro L. Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K⁺ channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14922-7.

Wang LD, Qiu XQ, Tian ZF, Zhang YF & Li HF. Inhibitory effects of genistein and resveratrol on guinea pig gallbladder contractility in vitro. *World J Gastroenterol.*2008;14:4955-60.

Wareing M, Bai X, Seghier F, Turner CM, Greenwood SL, Baker PN, et al. Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 291: R437-46.

Woessner JF Jr. Total, latent and active collagenase during the course of postpartum involution of the rat uterus. *Biochem J.* 1979;180:95-102.

www.naturalbiology.com

www.en.wikipedia.org/wiki

www.phylogeny.fr website, “treeviewers”

www.mdc-berlin.de

www.neurology.org

Xia N, Förstermann U, Li H. Resveratrol as a Gene Regulator in the Vasculature. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2014;401-408.

Xu C, You X, Gao L, Zhang L, Hu R, Hui N, et al. Expression of ATP-sensitive potassium channels in human pregnant myometrium. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011; 9: 35.

Xu T, Hui L, Juan YL, Min SG, Hua WT. Effects of moxibustion or acupoint therapy for the treatment of primary dysmenorrhea: a meta-analysis. *Altern Ther Health Med*. 2014; 20(4):33-42.

Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y & Kurachi Y Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J Physiol*. 1997; 499:715-20.

Yan J & Aldrich RW. LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature*. 2010;466: 513-6.

Yang Z, Pan A, Zuo W, Guo J, Zhou W. Relaxant effect of flavonoid naringenin on contractile activity of rat colonic smooth muscle. *J Ethnopharmacol*. 2014;155(2):1177-83.

Yen GC, Duh PD, Lin CW. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res*. 2003;37(5):509-14.

Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T & Sperelakis N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1998;274:C25-37.

Yow TT, Pera E, Absalom N, Heblinski M, Johnston GA, Hanrahan JR, Chebib M. Naringin directly activates inwardly rectifying potassium channels at an overlapping binding site to tertiapin-Q. *Br J Pharmacol*. 2011 Jul;163(5):1017-33.

Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010; 1804: 1666-1675.

Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1804(8):1666-75

VIII DODATAK

LISTA PUBLIKOVANIH RADOVA IZ DOKTORATA

Rad publikovan u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

1. **Novakovic R**, Ilic B, Beleslin-Cokic B, Radunovic N, Heinle H, Scepanovic R, Gojkovic-Bukarica L. The effect of resveratrol on contractility of non-pregnant rat uterus: the contribution of K(+)channels. J Physiol Pharmacol. 2013;64(6):795-805. (IF 2.72)

Saopštenja sa skupa međunarodnog značaja štampana u celini (M33)

1. **Novakovic Radmila**, Protic Dragana, Radunovic Nebojsa, Heinle Helmut, Vladimir Kanjuh, Ida Leskosek-Cukalovic, Slobodan Jovic and Gojkovic-Bukarica Ljiljana. Resveratrol relaxes smooth muscles of rat uterus. Proceedings of 6th Central European Congress on Food, pp 2-3. 23-26 May 2012, Novi Sad, Serbia.

Saopštenja sa skupa međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

1. **Novakovic Radmila**, Protic Dragana, Radunovic Nebojsa, Heinle Helmut, Cvejic Jelena, Gojkovic-Bukarica Ljiljana. Resveratrol Relaxes Smooth Muscles of Rat Uterus. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011; 109: 114-114.

2. **Novakovic R**, Protic D, Radunovic N, Kanjuh V, Gojkovic-Bukarica L. The relaxation of non-pregnant rat uterus by wine polyphenol resveratrol. Eur J Clin Invest 2012;42:86.

3. **Novakovic R**, Protic D, Radunovic NV, Heinle HH, Kanjuh VI, Gojkovic Bukarica LC. The wine polyphenol resveratrol relaxes smooth muscles of the non-pregnant rat uterus. 6th European Congress of Pharmacology - EPHAR 2012 Volume 10 - Issue 3

4. **Radmila Novaković**, Dragana D Protić, Nebojša V Radunović, Vladimir I Kanjuh, Ljiljana C Gojković-Bukarica. The relaxation of non-pregnant rat myometrium by resveratrol with participation of the NO–cGMP pathway. BMC Pharmacology and Toxicology 2012.
5. **Novakovic R**, Protic D, Radunovic N, Heinle H, Gojkovic-Bukarica L. The relaxation of non-pregnant rat uterus by wine polyphenol resveratrol. 6th Central European Congress on Food, May 23-26. 2012, Novi Sad, Serbia (abstract book pg 178).
6. **Novakovic Radmila B**, Beleslin-Cokic Bojana B, Ilic Bojana B, Radunovic, Nebojsa V, Protic Dragana D, Hainle H, Scepanovic R, Gojkovic-Bukarica Ljiljana. Contribution of different K⁺ channels in the effects of resveratrol on the phasic and tonic contractions of non-pregnant rat uterus. European journal of clinical investigation 2013;43:102-103. Portugalija April 17-20 Organizator: European Society for Clinical Investigation ESCI.
7. **Novakovic R**, Beleslin-Čokić B, Ilić Bojana, Radunović N, Protić D, Heinle H, Šćepanović R, Gojković-Bukarica L. The relaxation of pregnant human myometrium by natural polyphenol resveratrol. Humboldt-Kolleg, Resources of Danubian region: The possibility of cooperation and utilization, Belgrade, June 12-15, 2013, Book of abstracts, P71.
8. **Novakovic R**, Cirovic S, Markovic-Lipkovski J, Radunovic N, Heinle H, Gojkovic-Bukarica Lj. Polyphenol resveratrol relaxes pregnant human myometrium. European Journal of Clinical Investigation. 2014; 44:85-85. Organizator: European Society for Clinical Investigation ESCI.
9. **R. Novakovic**, B. Beleslin-Cokic, B. Ilic, N. Radunovic, H. Heinle, L. Gojkovic-Bukarica. Antiinflammatory polyphenol resveratrol has potential to be used in prevention and treatment of primary dysmenorrhea . Symposium on occasion of 30 years of “Blaubeuren Conferences” of the Tübingen Institute of Physiology with special participation from Danubian countries. Blaubeuren. April 4th-5th, 2014.

Saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu (M62)

1. **Novaković Radmila**, Protić Dragana, Radunović Nebojsa, Heinle Helmut, Gojković-Bukarica Ljiljana, Vladimir Kanjuh. Rezveratrol relaksira glatke mišiće uterusa pacova. 13. kongres farmakologa I 3. kongres kliničke farmakologije Srbije, sa međunarodnim učešćem. Palič, 05. - 08. oktobar 2011.

2. **Novaković R**, Radunović N, Marković-Lipkovski J, Čirović S, Heinle H, Gojković-Bukarica Lj. POLYPHENOL RESVERATROL RELAXES PREGNANT HUMAN MYOMETRIUM. Treći kongres fiziologa Srbije sa međunarodnim učešćem. Abstract book: „Molecular, cellular and integrative basis of health, disease: transdisciplinary approach“. Beograd, Srbija. 29-31. Oct. 2014.

LISTA TABELA

Tabela 1. Podela K kanala (TM-transmembranski domen, tabela je napravljena prema Shieh i sar., 2000)

Tabela 2. Efekti rezveratrola primenjenog u različitim koncentracijama (tabela preuzeta i adaptirana iz Gojkovic-Bukarica i sar., 2013)

Tabela 3. Efekti rezveratrola na frekvenciju SRK i faznih kontrakcija izazvanih oksitocinom (0.2 nM) u odsustvu i u prisustvu BKK.

Tabela 4. Odnos potentnosti rezveratrola i naringenina.

LISTA ILUSTRACIJA

Slika 1. Anatomski prikaz uterusa (preuzeto iz Lewis Gray's Anatomy 20th ed, 1918)

Slika 2. Mikroskopski prikaz pukotinastih spojeva između ćelija (preuzeto sa: www.en.wikipedia.org/wiki)

Slika 3. A Prikaz diverziteta K kanala: zeleno - K kanali sa dva transmembranska domena; plavo – dvoporni, K kanali sa četiri transmembranska domena; narandžasto – K kanali sa šest transmembranskih domena; crveno - Ca^{2+} zavisni K kanali. **B** Šematski prikaz topologije transmembranskih domena. (Preuzeto: <http://www.phylogeny.fr> website, “treeviewers,” Drawtree).

Slika 4. Grafički prikaz otvorenog (desno) i zatvorenog (levo) K kanala. Na vrhu je filter selektivan za K^+ jone, a pri dnu je „gating“ domen (Preuzeto sa www.en.wikipedia.org/wiki/Potassium_channel).

Slika 5. Shematski prikaz strukture voltažno-zavisnog K kanala (preuzeto sa www.mdc-berlin.de)

Slika 6. Shematski prikaz strukture Ca zavisnog K kanala (preuzeto iz Orío i sar., 2002)

Slika 7. Shematski prikaz strukture ulazno-ispravljačkog K kanala (preuzeto sa www.neurology.org)

Slika 8. Shematski prikaz strukture K_{ATP} kanala (preuzeto iz Flagg i sar., 2010)

Slika 9. Shematski prikaz patofiziologije primarne dismenoreje

Slika 10. Klasifikacija i struktura glavnih klasa polifenola. Adaptirano na osnovu Cristiane i sar., 2013

Slika 11. Hemijska struktura naringenina (preuzeto iz Ly i sar., 2014)

Slika 12. 72 različite biljne vrste mogu biti izvor rezveratrola (preuzeto sa www.naturalbiology.com)

Slika 13. Shematski prikaz potencijalnih mesta delovanja rezveratrola (preuzeto sa www.naturalbiology.com)

Slika 14. Uloga K kanala u relaksaciji glatkih mišića krvnih sudova koju izaziva rezveratrol (preuzeto iz Gojkovic-Bukarica i sar., 2013)

Slika 15. Originalni eksperimentalni zapisi efekta rezveratrola (1 – 100 μM) na kontrakcije negravidnog uterusa pacova: **(A)** SRK, **(B)** fazne kontrakcije izazvane oksitocinom (0.2 nM, kvadrat), **(C)** tonične kontrakcije izazvane oksitocinom (20 nM, trougao)

Slika 16. Koncentracijski-zavisne krive za rezveratrol dobijene u odsustvu (krug) i prisustvu glibenklamida (10 μM , kvadrat), 4-AP (1 mM, trougao dole), TEA (1 mM, romb) i iberiotoksina (100 nM, trougao gore) na izolovanom negravidnom uterusu pacova na modelima: **(A)** SRK, **(B)** FOK i **(C)** TOK. Tačke su srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju SEM (n = 5-12). * P < 0.05.

Slika 17. Efekti OKK NS 1619 i pinacidila poređeni sa efektima rezveratrola na TOK. **(A)** Koncentracijski-zavisna kriva za NS 1619, visoko specifični otvarač BK_{Ca} kanala u odsustvu (krug) i prisustvu (trougao) iberiotoksina (100 nM); **(B)** koncentracijski-zavisna kriva za pinacidil, predominantni otvarač K_{ATP} kanala u odsustvu (trougao) i prisustvu (kvadrat) glibenklamida (10 μM); **(C)** odnos potentnosti: koncentracijski-zavisne krive za NS 1619 (krug), pinacidil (trougao dole) i rezveratrol (romb). Tačke su srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju SEM (n = 5-12). * P < 0.05

Slika 18. Originalni eksperimentalni zapisi pokazuju efekte 1 μM i 100 μM rezveratrola na kontrakcije indukovane oksitocinom (20 nM) u rastvoru " K^+ -rich, Ca^{2+} free"; (A) kontrakcija indukovana oksitocinom - kontrola; (B) kontrakcija indukovana oksitocinom nakon pretretmana sa 1 μM ili 100 μM rezveratrola; (C) efekti različitih koncentracija rezveratrola (1-100 μM) na kontrakcije izazvane oksitocinom (20 nM) u rastvoru „ K^+ -rich, Ca^{2+} free“ predstavljani histogramom. Kolone su srednje vrednosti amplitude kontrakcija \pm SEM u prisustvu pojedinačnih koncentracija rezveratrola (n = 5, svaka). Amplituda kontrakcija u odsustvu rezveratrol je uzeta kao 100% - kontrola. * P <0.05 kada se porede efekti pojedinačnih koncentracija rezveratrola.

Slika 19. Ekspresija proteina Kir6.1 i Kir6.2 podjedinica K_{ATP} kanala, (A) podjedinice Kv2.1 i Kv4.2 tipa Kv kanala i $K_{Ca1.1}$ podjedinice BK_{Ca} kanala u odnosu na β -aktin pokazana *western blot* analizom kod negravidnog uterusu pacova. (B) Kvantitativno određivanje *western blot* signala proteina K kanala izraženi kao srednje vrednosti \pm SEM densitometrijskih jedinica za svaki tip K kanala prikazan kao histogram (n = 5, svaki). *P<0.05 kada se upoređi ekspresija proteina Kir6.2 subjedinice sa ekspresijom proteina Kir6.1, Kv2.1 i Kv4.2 i $K_{Ca1.1}$ subjedinica proteina.

Slika 20. Originalni eksperimentalni zapisi. (A) Efekat rezveratrola (1 - 100 μM) na kontrakcije izazvane oksitocinom (2 nM, kvadrat) IVF gravidnog miometrijuma; (B) efekat rezveratrola u prisustvu glibenklamida (10 μM , krug); (C) efekat rezveratrola u prisustvu iberiotoksina (100 nM, trougao); (D) efekti rezveratrola u prisustvu 4-AP (1 mM, romb)

Slika 21. Antagonizam inhibitornog efekta rezveratrola u prisustvu BKK na kontrakcije izazvane oksitocinom IVF gravidnog miometriuma. (A) Koncentracijski-zavisne krive za rezveratrol u odsustvu (krug) i prisustvu glibenklamida (10 μM , trougao), (B) iberiotoksina (100 nM, kvadrat), (C) 4 - AP (1 mM, romb). Tačke su srednje vrednosti i vertikalne linije pokazuju SEM (n = 5-12).

Slika 22. Detekcija četiri različita potipa K kanala u humanom IVF gravidnom miometriju imunohistochemijskim bojenjem; ekspresija subjedinice Kir6.1 K_{ATP} kanala u ćelijama glatkih mišića uterusa i endotelnim ćelijama krvnih sudova (strelica) (a, b); difuzna ekspresija subjedinica Kir6.2 K_{ATP} kanala u ćelijama glatkih mišića uterusa i endotelnim ćelijama krvnih sudova (strelica) (d, e); ekspresija $K_{Ca1.1}$ subjedinice BK_{Ca} kanala u ćelijama glatkih mišića uterusa (g) i endotelnim ćelijama krvnih sudova (h); ekspresija α - subjedinice Kv4.2 kanala u ćelijama glatkih mišića uterusa (j) i endotelnim ćelijama krvnih sudova (k). Negativne kontrole (c, f, i, l).

Slika 23 (A) Ekspresija proteina Kir6.1 i Kir6.2 subjedinice K_{ATP} kanala, α - subjedinice Kv4.2 kanala i $K_{Ca1.1}$ subjedinice BK_{Ca} kanala u odnosu na β - aktin analizirana *western blot* metodom. **(B)** Kvantitativno određivanje *western blot* signala K kanala izraženih kao srednje vrednosti \pm SEM densitometrijskih jedinica za svaku posmatranu subjedinicu prikazan kao histogram (n = 5, svi; * P < 0,05).

Slika 24. Koncentracijski–zavisne krive za naringenin (1 μ M – 1 mM): **(A)** SRK, **(B)** fazne oksitocinom-indukovane kontrakcije i **(C)** tonične oksitocinom-indukovane kontrakcije negravidnog uterusa pacova.

Slika 25. Koncentracijski–zavisna kriva za naringenin (1 μ M – 1 mM) na modelu kontrakcija indukovanih oksitocinom (2 nM) kod humanog gravidnog miometrija

BIOGRAFIJA AUTORA

Radmila B. Novaković rođena je 14. 3. 1972. god. u Vranju, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju sa odličnim uspehom kao nosilac Vukove diplome. Diplomirala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Opšta biologija, smer Primenjena genetika.

Poslediplomske studije upisala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Uparedna fiziologija i ekofiziologija, školske 2005. godine, a 20. 10. 2009. godine odbranila magistarski rad pod nazivom: "Uticaj modulatora ATP-zavisnih kalijumskih kanala na kontraktilnost izolovanog uterusu pacova".

U periodu od 2001. god. do 2006. god. mr Radmila Novaković je bila zaposlena na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu, na Institutu za medicinska istraživanja. Od 2002.-2004. g. radila je u Laboratoriji za eksperimentalnu farmakologiju i toksikologiju, potom na Odeljenju za kliničku i eksperimentalnu molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Od jula do decembra 2010. god. bila je saradnik u naučno-istraživačkom projektu Prof. dr Ljiljane Gojković-Bukarice. Tokom 2011. godine bila je učesnik na međunarodnom projektu, podržanom od strane „German Academic Exchange Service (DAAD)“ i sponzorisanom od strane „German Federal Foreign Office“.

Mr Radmila Novaković je trenutno zaposlena na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu u svojstvu istraživača-saradnika u okviru nacionalnog projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Doktorsku disertaciju je prijavila pod rukovodstvom mentora prof. dr Ljiljane Gojković-Bukarice i komentora dopisnog člana SANU prof. dr Nebojše Radunovića na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, čija je izrada odobrena na III sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka održanoj 1. 3. 2011. godine.

Autor je i koautor 12 radova štampanih u celini u međunarodnim i domaćim časopisima i brojnih saopštenja sa naučnih skupova. Član je Srpskog farmakološkog društva i Evropskog društva farmakologa (EPHAR).

IX PRILOZI

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Radmila Novaković

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

“Uticaj polifenola prirodnog porekla i sintetskih otvarača kalijumovih kanala na kontraktilnost izolovanog uterusa”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30. 11. 2014.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Radmila Novaković

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada: "Uticaj polifenola prirodnog porekla i sintetskih otvarača kalijumovih kanala na kontraktilnost izolovanog uterusa"

Mentor Prof. dr Ljiljana Gojković-Bukarica

Potpisani _____

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30. 11. 2014.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“Uticaj polifenola prirodnog porekla i sintetskih otvarača kalijumovih kanala na kontraktilnost izolovanog uterusa”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30. 11. 2014.



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.