

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marta Skelin**

**Estradiol i signalni putevi regulacije  
sekrecijske aktivnosti humanog  
endocerviksa**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2018.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marta Skelin**

**Estradiol i signalni putevi regulacije  
sekrecijske aktivnosti humanog  
endocerviksa**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2018.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Laboratoriju za neurogenetiku Hrvatskog instituta za istraživanje mozga.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Marija Ćurlin

## ZAHVALA

Hvala kolegicama i kolegama sa Zavoda za histologiju i embriologiju i HIIM-a, od kojih su mnogi postali i prijatelji, na kolegijalnosti, savjetima i praktičnoj pomoći te radnoj atmosferi kakvu se samo poželjeti može.

Hvala dr. sc. Saši Kralik Oguić iz Zavoda za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb na pomoći oko mjerenja serumskih koncentracija spolnih hormona.

Posebno hvala gđi Mireli Vranić i gđi Željki Punčec na pomoći oko pripreme uzoraka, rezanja i histoloških bojenja.

Hvala mom bratu Mihovilu na prekrasnoj ilustraciji u uvodu.

Veliko hvala mojoj prijateljici, dr.sc. Vilmi Dembitz. „Veliko hvala“ pokušava nagovijestiti moju zahvalnost koja zapravo daleko nadmašuje okvir ove zahvale.

Hvala mojoj mentorici, doc.dr.sc. Mariji Ćurlin, na vodstvu još od prvih, studentskih, znanstvenih pokušaja. Zahvalna sam joj na iskrenosti, temeljitom pristupu, podršci i razumijevanju. Kako u znanstvenom smislu, tako i u ljudskom.

Zahvalna sam svojim roditeljima, koji su mi uzor, na svemu što su mi omogućili i na što su me poticali da sama ostvarim.

Mojoj obitelji i prijateljima, na nepokolebljivoj vjeri u mene, pogotovo onda kad meni samoj nikako nije bilo jasno na temelju kojih to točno dokaza izvlače zaključak da ja to mogu i da će sve biti dobro.

## Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	Vrat maternice .....	1
1.2.	Uloga cervikalne sluzi .....	2
1.3.	Cervikalna sluz i neplodnost .....	2
1.4.	Građa i svojstva cervikalne sluzi .....	3
1.4.1.	Biokemijski sastav sluzi .....	3
1.4.2.	Svojstva sluzi ciklički se mijenjaju .....	3
1.4.3.	Utjecaj spolnih hormona na svojstva i sastav cervikalne sluzi .....	4
1.5.	Proizvodnja i izlučivanje sluzi .....	7
1.5.1.	Sinteza mucina i pohrana u sekrecijske mjehuriće .....	7
1.5.2.	Bubrenje i egzocitoza sekrecijskih mjehurića .....	8
1.6.	Formiranje sluzi .....	9
1.6.1.	Regulacija izlučivanja sluzi .....	10
1.7.	GABA i GABA-ergički sustav .....	11
1.7.1.	GABA .....	11
1.7.2.	GABA <sub>A</sub> receptor .....	11
1.7.3.	Glutamat-dekarboksilaza .....	12
1.7.4.	GABA-ergički sustav u perifernim organima .....	12
1.7.5.	Potencijalna uloga GABA-ergičkog sustava u endocerviksu .....	13
1.8.	Transmembranski regulator cistične fibroze, CFTR .....	14
1.8.1.	Građa CFTR-a .....	14
1.8.2.	Lokalizacija CFTR i uloga u oblikovanju sluzi .....	16
1.8.3.	CFTR i plodnost .....	17
1.9.	Pokusni modeli u istraživanju izlučivanja endocervikalne sluzi .....	18
1.9.1.	Glodavci .....	18
1.9.2.	Veliki sisavci .....	19

1.9.3.	Čovjek .....	19
2.	HIPOTEZA .....	21
3.	CILJEVI RADA.....	21
3.1.	OPĆI CILJ: .....	21
3.2.	SPECIFIČNI CILJEVI:.....	21
4.	MATERIJALI I METODE .....	22
4.1.	Uzorci tkiva endocerviksa.....	22
4.1.1.	Odabir ispitanica .....	22
4.1.2.	Postupci s prikupljenim tkivom .....	22
4.2.	Uzorci krvi .....	23
4.3.	Histološki, histokemijski i imunohistokemijski postupci .....	24
4.3.1.	Fiksacija i priprema parafinskih rezova tkiva .....	25
4.3.2.	Histološko bojenje hemalaunom i eozinom .....	25
4.3.3.	Histokemijska reakcija alcijanskim modrilom.....	25
4.3.4.	Histokemijska reakcija Schiffovim perjodnim reagensom .....	26
4.3.5.	Svjetlosna mikroskopija.....	26
4.3.6.	Kvantifikacija histokemijskog bojenja.....	27
4.3.7.	Elektronska mikroskopija .....	28
4.3.8.	Fluorescentna imunohistokemija .....	28
4.3.9.	Konfokalna mikroskopija.....	30
4.3.10.	Kvantifikacija fluorescentnog imunohistokemijskog bojenja.....	31
4.4.	Postupci s RNA.....	31
4.4.1.	Izolacija RNA iz cerviksa .....	31
4.4.2.	Određivanje koncentracije izolirane RNA .....	32
4.4.3.	Reakcija reverzne transkripcije .....	32
4.4.4.	Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....	32
4.4.5.	Elektroforeza DNA na agaroznom gelu.....	35

4.4.6.	Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....	35
4.4.7.	Odabir referentnih gena za qPCR .....	36
4.5.	Statistička analiza.....	37
5.	REZULTATI.....	38
5.1.	Podjela pacijentica u skupine prema fazi ženskog mjesečnog spolnog ciklusa..	38
5.2.	Žljezdana aktivnost endocerviksa .....	39
5.2.1.	Prisutnost žljezdanog epitela i mucina u uzorcima tkiva .....	39
5.2.2.	Kvantifikacija proizvodnje mucina u žljezdanom epitelu endocerviksa i korelacija proizvodnje mucina i faze ciklusa .....	41
5.3.	GABA-ergički sustav .....	42
5.3.1.	Zastupljenost podjedinica GABA <sub>A</sub> R u ljudskom endocerviksu .....	42
5.3.2.	Smještaj molekula GABA-ergičkog sustava u tkivu humanog endocerviksa ....	44
5.3.3.	Kvantifikacija izražaja proteina GAD u žljezdanom epitelu endocerviksa i usporedba s razinama spolnih hormona u serumu .....	47
5.3.4.	Kvantifikacija izražaja proteina GABA <sub>A</sub> R u žljezdanom epitelu endocerviksa i usporedba s razinama spolnih hormona u serumu .....	49
5.4.	CFTR.....	52
5.4.1.	Prisutnost i smještaj CFTR u tkivu ljudskog endocerviksa .....	52
5.4.2.	Kvantifikacija izražaja proteina CFTR u žljezdanom epitelu endocerviksa i usporedba s razinom mRNA CFTR-a u tkivu.....	54
5.4.3.	Usporedba izražaja proteina CFTR u žljezdanom epitelu endocerviksa s razinama hormona u krvi .....	55
5.4.4.	Usporedba izražaja proteina CFTR u apikalnom dijelu stanica žljezdanog epitela endocerviksa s razinama spolnih hormona u krvi.....	56
5.4.5.	Usporedba izražaja gena CFTR i VAMP8 u epitelu ljudskog endocerviksa .....	59
6.	RASPRAVA .....	60
6.1.	Ljudsko endocervikalno tkivo kao model za ispitivanje izlučivanja sluzi.....	60
6.2.	Histokemija nije idealna metoda za kvantifikaciju mucina u endocerviksu .....	62

6.3.	Molekule GABA-ergičkog sustava prisutne su u ljudskom endocerviksu .....	63
6.4.	Ekspresija molekula GABA-ergičkog sustava ne podržava hipotezu o ulozi GABA-e u hormonskoj regulaciji izlučivanja sluzi .....	64
6.5.	Moguće uloge GABA-ergičkog sustava u endocerviksu .....	65
6.6.	Razina izražaja CFTR-a podržava hipotezu o njegovoj ulozi u hormonskoj regulaciji otpuštanja sluzi iz lumena endocervikalnih kripti .....	66
6.6.1.	Izražaj CFTR-a u apikalnom dijelu stanica povezan je s razinom estradiola u serumu .....	66
6.6.2.	Promet CFTR-a regulira njegovu funkciju .....	67
6.6.3.	Progesteron poništava učinak estrogena na porast izražaja CFTR-a .....	68
6.7.	CFTR je prisutan na membranama fibroblasta ljudskog endocerviksa .....	69
7.	ZAKLJUČCI .....	70
8.	SAŽETAK .....	71
9.	SUMMARY .....	72
10.	LITERATURA .....	73
11.	BIOGRAFIJA .....	81

**Popis kratica:**

AB	alcijansko modrilo, engl. <i>Alcian Blue</i>
AU	proizvoljna jedinica, engl. <i>arbitrary unit</i>
cAMP	ciklički adenzin-monofosfat
cDNA	komplementarna DNA
CF	cistična fibroza
CFTR	transmembranski regulator cistične fibroze, engl. <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CIMA	kemiluminiscentni imunoesej, engl. <i>Chemiluminescent Microparticle Immunoassay</i>
Cq	kvantifikacijski ciklus
DAB	3',3' diaminobenzidintetraklorid
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EEF1A1	eukariotski translacijski faktor elongacije alfa 1
ER	endoplazmatski retikulum
GABA	$\gamma$ -aminomaslačna kiselina, engl. <i><math>\gamma</math> Amino-Butyric Acid</i>
GABAAR	receptor A za $\gamma$ -aminomaslačnu kiselinu
GAD	glutamat-dekarboksilaza, engl. <i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze
gDNA	genomska deoksiribonukleinska kiselina
GnRH	hormon oslobađanja gonadotropina, engl. <i>gonadotropin-releasing hormone</i>



IL-3	interleukin 3
LH	luteinizirajući hormon
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina
MUC5B	mucin koji oblikuje gel, engl. <i>gel-forming mucin</i>
MUC4	transmembranski mucin, engl. <i>membrane-spanning mucin</i>
PAS	Schiffov perjodni reagens, engl. <i>Periodic acid – Schiff</i>
PB	fosfatni pufer, engl. <i>Phosphate Buffered</i>
PBS	fosfatni pufer, engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom, engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKA	protein-kinaza A
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, engl. <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	ribonukleinska kiselina
ROI	područje interesa, engl. <i>Region of Interest</i>
RT-PCR	lančana reakcija polimerazom uz reverznu transkripciju
SNARE	receptor za topljivi protein koji se veže na NSF, engl. <i>Soluble NSF Attachment Protein REceptor</i>
VAMP8	Membranski protein 8 vezan uz mjehuriće, engl. <i>Vesicle-associated membrane protein 8</i>
VGAT	vezikularni prijenosnik GABA-e, engl. <i>vesicular GABA transporter</i>

# 1. UVOD

## 1.1. Vrat maternice

Vrat maternice, lat. *cervix uteri*, distalni je dio maternice građen pretežito od vezivnog tkiva, a od mišićnog tijela maternice odvojen je mišićno-vezivnim spojem. Cerviks je cilindrična struktura, kod nulipara prosječno duga 3 cm i promjera 2 cm, uz znatne varijacije. Cerviks protrudira u rodnicu te je zbog toga podijeljen u distalni, vaginalni dio, tzv. egzocerviks i proksimalni, supravaginalni, tzv. endocerviks. Duž cerviksa njegovom sredinom prolazi cervikalni kanal koji je u području egzocerviksa prekriven mnogoslojnim pločastim epitelom koji se nastavlja na pločasti epitel rodnice (1). Endocervikalni dio kanala prekriven je jednoslojnim cilindričnim epitelom koji se nastavlja na epitel endometrija maternice. Na taj način epitel cerviksa spaja maternicu i rodnicu. Prekrivanjem vaginalnog dijela cerviksa vaginalnom sluznicom nastaju forniksi rodnice. Tijekom embrionalnog razdoblja cervikalni kanal prekriven je cilindričnim epitelom paramezonefritičkih (Müllerovih) kanala koji kasnije tijekom fetalnog razdoblja, adolescencije i prve trudnoće, u kaudalnom dijelu biva zamijenjen mnogoslojnim pločastim epitelom (1).

Ispod epitela, stijenka cerviksa građena je pretežito od elastičnih i kolagenih vlakana uz malo glatkih mišićnih stanica (2). Mehanička funkcija cerviksa iz tog razloga primarno je potporna, a ne kontraktilna. Osim mehaničke uloge, cerviks ima ulogu u proizvodnji sluzi koja ima brojne funkcije u reproduktivnom zdravlju i prokreaciji. Žlijezde koje ovu sluz proizvode nisu tipične žlijezde kakve se susreću u cjevastim organima prekrivenim sluznicom. Umjesto uobičajene podjele na sekrecijski dio i odvodne kanale, „žlijezde“ endocerviksa građene su od sustava usjeklina i tunela nazvanih „kriptama“, prekrivenih jednoslojnim cilindričnim epitelom koji se izravno nastavlja na epitel endocerviksa. Taj epitel, cijelom svojom površinom, i onom koja oblaže lumen endocervikalnog kanala i onom unutar kripte, proizvodi sluz (3). Vrat maternice dnevno proizvodi oko 20 do 60 mg sluzi u zdrave žene reproduktivne dobi, dok sredinom ženskog mjesečnog spolnog ciklusa masa sluzi može narasti i do 700 mg na dan (4).

## **1.2. Uloga cervikalne sluzi**

Cervikalna sluz djeluje kao zaštita za spermije od neprijateljskog okoliša rodnice i fagocitoze vaginalnim leukocitima, filtrira morfološki normalne spermije i služi očuvanju velikog broja spermija unutar kripti cerviksa kako bi u periovulacijskom razdoblju olakšala njihov prolazak prema maternici (5–7). S druge strane, modulira njihovo gibanje u drugim dijelovima ciklusa, kada sprječava pristup spermija, mikroorganizama i mehaničkih čestica gornjem dijelu reproduktivnog sustava, a time i peritonealnoj šupljini, štiteći od infekcije. Očito je kako su mnoge od navedenih uloga cervikalne sluzi potrebne za uspješnu oplodnju i pitanje koje se nameće jest koji mehanizmi upravljaju promjenom svojstava cervikalne sluzi koja sudjeluju u plodnosti, odnosno neplodnosti.

## **1.3. Cervikalna sluz i neplodnost**

Neplodnost, definirana kao izostanak kliničke trudnoće nakon 12 ili više mjeseci redovnih nezaštićenih spolnih odnosa, prema istraživanju Svjetske zdravstvene organizacije od 1990. do 2010. pogađala je 1,9% žena koje su htjele prvo dijete (primarna neplodnost) te 1,5% žena koje su htjele ponovno roditi (sekundarna neplodnost). U konkretnim brojkama to znači kako otprilike 48,5 milijuna parova diljem svijeta niti nakon pet godina pokušavanja nije moglo začeti (8). Kada se podaci promatraju u strogom vremenskom periodu od godine dana, prema definiciji neplodnosti, vrlo visok postotak od 10% - 15% parova koji pokušavaju začeti traže pomoć radi liječenja neplodnosti. Uzroci neplodnosti mogu biti muški, ženski, kombinirani i nepoznati, a etiološki, riječ je o anatomskim, hormonskim, imunološkim, psihološkim i drugim uzrocima.

Dobro je poznata činjenica kako jedan od čimbenika koji utječe na plodnost može biti i cervikalna sluz, a abnormalnosti u svojstvima sluzi jedan od uzroka neplodnosti, odnosno subfertilnosti (1). Osim brojnih istraživanja promjene svojstava cervikalne sluzi vezanih uz cikličke promjene koncentracija i odnosa ženskih spolnih hormona u ženskom mjesečnom spolnom ciklusu, promatranje izlučene sluzi uspješno je korištena klinička metoda. Na ovaj način uspješno se prate plodna i neplodna razdoblja, prepoznaje ovulacija te odgađa ili pospješuje začeće (9–11). Cervikalna sluz s plodnošću može biti povezana na nekoliko načina – ne održavajući povoljan okoliš za preživljavanje spermija, imunološkom reakcijom, a posredno nesprječavanjem infekcije ili posjedovanjem fizikalnih svojstava zbog kojih se

spermiji otežano kreću (12). U ovom istraživanju proučavali smo mehanizam ovisnosti biofizičkih svojstava sluzi o cikličkim promjenama izlučivanja hormona.

#### **1.4. Grada i svojstva cervikalne sluzi**

##### **1.4.1. Biokemijski sastav sluzi**

Cervikalna sluz je hidrogel sastavljen od niskomolekularne komponente, cervikalne plazme, i komponente visoke molekulske mase, gel faze. Cervikalna se plazma sastoji uglavnom od elektrolita i organskih komponenti niže molekulske mase poput aminokiselina, kolesterola, lipida, glukoze, askorbinske kiseline i polisaharida (13), dok gel fazu sačinjavaju enzimi, baktericidni proteini, proteini plazme te mreža glikoproteina, mucina. Viskoznost cervikalne sluzi ovisi o velikim, jako glikoziliranim mucinima, a o različitom udjelu pojedinih mucina ovisi i udio vode u sluzi (14). Naime, dok u pre- i postovulacijskim fazama ženskog mjesečnog spolnog ciklusa cervikalna sluz sadrži oko 93% vode, ovaj se udio u sredini ciklusa može povećati do 98% (15). Ovisno o viskoznosti i sadržaju vode, ona funkcionira kao prepreka ili transportni medij za spermije.

##### **1.4.2. Svojstva sluzi ciklički se mijenjaju**

Dugo je poznato da se cervikalna sluz ciklički mijenja tijekom ženskog mjesečnog spolnog ciklusa, a istraživanje izlučivanja sluzi proizašlo je upravo iz njezine kliničke upotrebe. Promjene sluzi nastale kao posljedica hormonskih promjena tijekom ženskog mjesečnog spolnog ciklusa, nisu samo njihova „nuspojava“, nego su, praćenjem ovih promjena, omogućila neinvazivni uvid u hormonski status, praćenje ciklusa i planiranje obitelji. Različita svojstva sluzi Odeblad još 1969. godine objašnjava različitim udjelom dviju glavnih vrsta sekreta u sluzi koje označava kao tip E (estrogenska sluz) i tip G (progesteronska sluz). Tip E je prozirna, vodenasta i rijetka sluz koja prevladava u vrijeme ovulacije (oko 97% E i 3% tipa G), a nastaje pod utjecajem estrogena dok tip G, nastao pod dominacijom progesterona, odgovara gustoj, ljepljivoj sluzi koja dominira za vrijeme normalne luteinske faze ili pri upotrebi oralne ili druge hormonske kontracepcije.

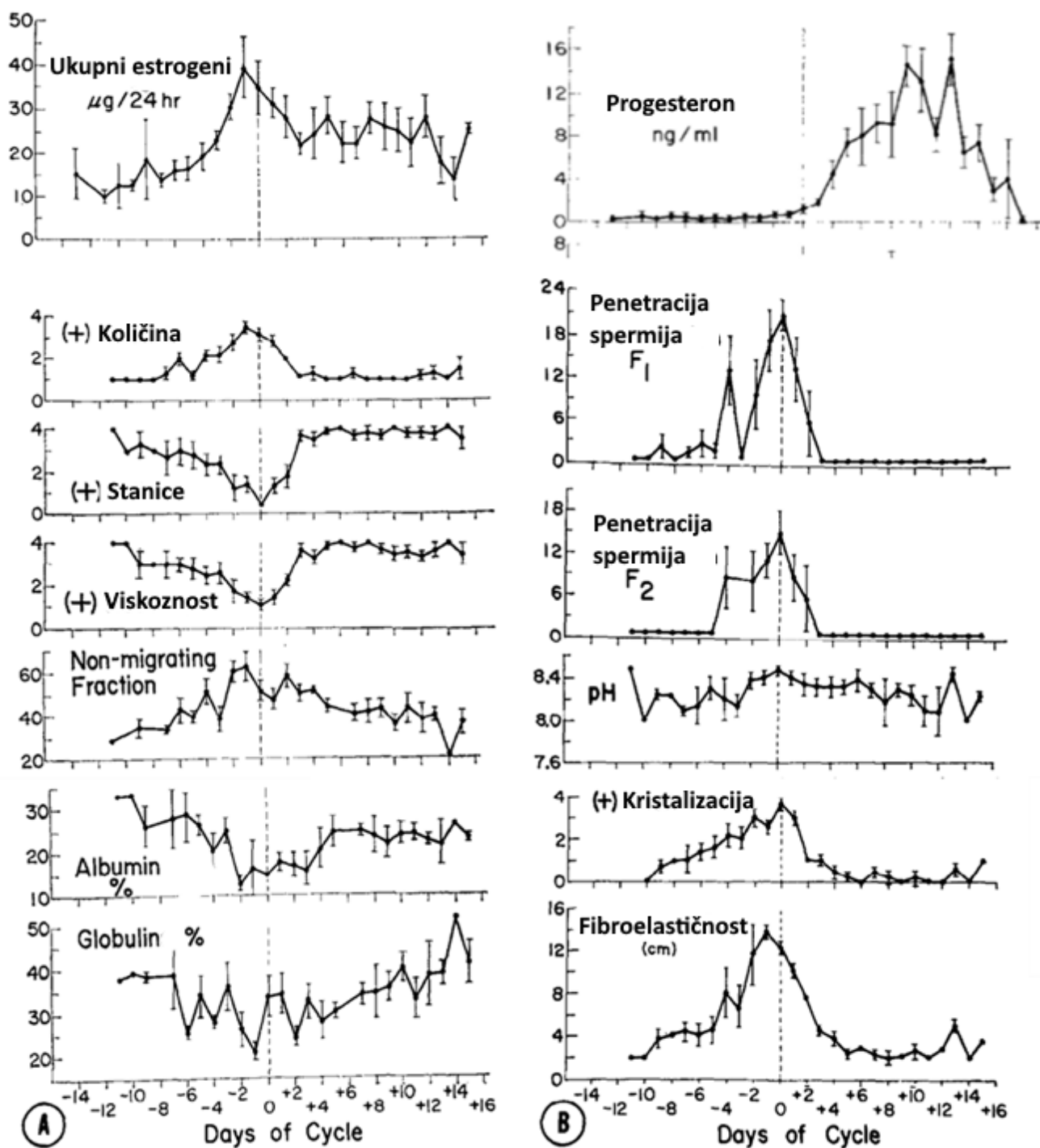
Prema smjernicama Svjetske Zdravstvene Organizacije, sluz se opisuje i boduje na temelju četiri kriterija: volumen izlučene sluzi, viskoznost, fibroelastičnost (prema njem *spinnbarkeit*) i kristalizaciji (prema engl. *ferning*) (16). Sluz varira tijekom ciklusa: od

visokog viskoziteta (često s mnogo staničnog sadržaja) neposredno prije menstruacije do vodenaste sredinom ciklusa neposredno prije ovulacije da bi se, do trenutka kada je završena ovulacija, viskoznost sluzi počela povećavati. *Spinnbarkeit* je termin koji se koristi za opisivanje fibroznosti i svojstava elastičnosti cervikalne sluzi, a provjerava se razvlačenjem sluzi između predmetnog i pokrovnog stakalca. *Ferning* se odnosi na stupanj i uzorak kristalizacije koji se opaža kada se cervikalna sluz osuši na staklenoj površini. Promjene ovih svojstava ukazuju na promjene u strukturi sluzi i njezinoj propusnosti za spermije.

### **1.4.3. Utjecaj spolnih hormona na svojstva i sastav cervikalne sluzi**

Analizom promjena svojstava cervikalne sluzi tijekom folikularne faze, sredine ciklusa i luteinske faze ciklusa pokazano je značajno povećanje količine, fibroelastičnosti i kristalizacije, penetracije spermija, sadržaja mucina i pH te smanjenje viskoznosti, broja stanica i albumina tijekom sredine ciklusa. Tijekom luteinske faze, svi ovi parametri kreću se u suprotnom smjeru, s iznimkom pH (17).

Najveća količina cervikalne sluzi i najveća fibroelastičnost primjećuju se dan prije naglog porasta luteinskog hormona (LH), a koincidiraju s vrhuncem razine ukupnih estrogena u urinu. Najmanja viskoznost i sadržaj stanica, a vrhunac kristalizacije, pH i penetracije spermija uočeni su na dan porasta LH, jedan dan nakon vrhunca koncentracije urinarnih estrogena (slika 1).



**Slika 1. Grafički prikaz promjena različitih svojstava cervikalne sluzi tijekom ženskog mjesečnog spolnog ciklusa.** Dan 0 = dan LH vrhunca (okomita točkasta linija). F1 i F2 pokazuju broj spermija u prvom i drugom mikroskopskom polju (x200) u *in vitro* testu prolaska spermija kroz cervikalnu sluz. NMF = frakcija cervikalne sluzi koja ne migrira, a sadrži uglavnom glikoproteine visoke molekulske mase (mucine). Okomite trake predstavljaju standardnu pogrešku srednje vrijednosti. Moghissi et al., s dopuštenjem preneseno iz American Journal Of Gynaecology (24)

Sadržaj proteina u cervikalnoj sluzi pokazao je nedvosmislen ciklički uzorak. Sadržaj albumina naglo se smanjio 2 dana prije i počeo rasti nakon porasta LH, a i globulini slijede sličan obrazac. Sadržaj mucina povećan je sredinom ciklusa, dosežući vrhunac dan prije porasta LH, nakon čega se razina mucina smanjuje dok na kraju luteinske faze ne padne na postmenstruacijsku razinu. Najzastupljeniji mucini u endocervikalnim žlijezdama su mucin koji oblikuje gel (engl. *gel-forming mucin*) MUC5B i transmembranski mucin (engl. *membrane-spanning mucin*) MUC4. Relativna razina mRNA, odnosno bjelančevina MUC5B i MUC4 mijenja se ovisno o danu ženskog mjesečnog spolnog ciklusa, odgovarajući na koncentraciju estrogena i progesterona u krvi (17). Razine i MUC4 i MUC5B mRNA rastu s porastom estrogena u ciklusu, a obrnuto su proporcionalne porastu progesterona. Kvantifikacija enzimsko vezanim imunoapsorbirajućim esejem (ELISA-om) dokazala je kako koncentracija proteina MUC5B bilježi nagao i dramatičan porast u periovulacijskom razdoblju te se smanjuje kako odmiče luteinska faza ciklusa, pod utjecajem progesterona. Za MUC4 ovakvo ispitivanje još nije uspješno izvedeno, što govori i o velikim poteškoćama u istraživanju mucina. Zbog veličine i glikozilacije, problematično ih je analizirati većinom dostupnih metoda (18,19). Analize biokemijskog sastava sluzi pokazale su da se glikoproteinske molekule, mucini, prije, za vrijeme i poslije ovulacije najviše razlikuju po građi šećernih ostataka (20).

Zanimljivo je i otkriće da se, iako ukupna količina izlučenih mucina oko ovulacije raste, njihova koncentracija smanjuje. Razlog tomu je porast volumena tekućine koji prati povećanje količine izlučenih mucina (21). Ova pojava povećanog volumena izlučene sluzi, kao i porast fibroelastičnosti i smanjenje viskoznosti mogli bi biti objašnjeni naglim porastom stvaranja upravo mucina MUC5B u vremenu ovulacije, budući da je karakteriziran izrazito velikom hidrofilnom domenom kojom adsorbira vodu i čini sluz rijetkom i propusnom za spermije. Usto se postavlja pitanje je li, kao jedini ne-pleomorfan mucin, zbog svoje stabilnosti upravo MUC5B ključan za stvaranje izduženih fibrilnih micela koje omogućuju kretanje i usmjeravanje spermija (19).

Raspored mucina u sluzi određuje njezinu propusnost za spermije ovisno organizira li se u gustu mrežu koja ih ne propušta ili u globularne strukture koje im omogućuju prolaz (22), a osim o hormonima ovisi o promjeni pH. Konkretno, pri smanjenju pH, odnosno u kiseloj okolini, sluz iz propusne globularne strukture prelazi u fibroznu, nepropusnu. Ove promjene proizlaze ponajviše iz građe MUC5B koja pri različitim vrijednostima pH uvjetuje međusobno povezivanje mucina u sfere ili u gustu mrežu.

Osim promjene pH, pokazano je da na svojstva sluzi utječu i hidrogenkarbonatni ioni. U prilog važnosti hidrogenkarbonatnih iona govori i pokus u kojem je primijećeno kako ispiranje rodnice s  $\text{NaHCO}_3$  smanjuje viskoelastičnost cervikalne sluzi i poboljšava test prodiranja spermija kroz cervikalnu sluz i poslije-snošajni test interakcije spermija i cervikalne sluzi (23). Premda hidratacija i viskoelastičnost sluzi ovise o više čimbenika, prije svega o udjelu i glikozilaciji pojedinih vrsta mucina, očito su i koncentracija vodikovih i hidrogenkarbonatnih iona neki od tih čimbenika. Mehanizam hormonske regulacije prostorne organizacije i svojstava sluzi putem promjene pH i koncentracije hidrogenkarbonatnih iona još nije istražen.

## **1.5. Proizvodnja i izlučivanje sluzi**

Sluz se proizvodi u nekoliko koraka: sinteza, pohrana u sekrecijske mjehuriće, njihovo bubrenje, egzocitoza te razmotavanje i širenje. Za konačno oblikovanje sluzi odgovarajućih reoloških svojstava ključna je hidratacija oslobođenih nakupina mucina.

### **1.5.1. Sinteza mucina i pohrana u sekrecijske mjehuriće**

Mehanizmi sinteze mucina detaljno su istraženi tkivima pluća i crijeva ljudi (18) te na goveđem endocerviksu (25), a provedena istraživanja ukazuju kako sinteza mucina u ljudskom endocerviksu slijedi ista pravila. Dišni epitel pokazuje veliku sličnost sa žljezdanim stanicama endocerviksa, a Clara stanice i vrčaste stanice izlučuju sluz s istim mucinskim glikoproteinima kao i stanice endocerviksa. Proteinski dio mucina sintetizira se u endoplazmatskoj mrežici, retikulumu (ER) gdje se odvija i početna N-glikozilacija. U Golgijevom tjelešcu ovi proteini zatim prolaze O-glikozilaciju, gdje se šećerni lanci dodaju hidroksilnim skupinama treonina i serina. Nakon O-glikozilacije membranski vezani mucini umeću se u membranu, a mucini namijenjeni izlučivanju nakupljaju (multimeriziraju) u odjeljcima Golgijevog tjelešca. Njihovi homo-oligomeri osiguravaju viskoelastična svojstva sluzi, a formiraju se kroz disulfidne veze između njihovih cisteinskih amino- i karboksilnih terminalnih D-domena (25).

Potpuno dovršeni, polimerizirani, glikozilirani i sulfatirani mucini nakupljaju se u sekrecijskim zrcima koja ispunjavaju veći dio citoplazme žljezdanih stanica (26). U ovim zrcima mucini su pri niskom pH i visokoj razini  $\text{Ca}^{2+}$  pohranjeni do izlučivanja (27). Visoke koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{H}^+$  štite negativno nabijena mjesta na polianionskim mucinima od



elektrostatskog odbijanja i tako omogućuju visoku kondenzaciju mucina unutar zrnaca (28). Ovaj je proces vrlo važan zbog implikacija koje ima u kasnijem stvaranju sluzi. Da bi se iz izlučenih mucina formirala sluz, ovi naboji moraju biti uklonjeni kako bi se dotad zgusnuti mucini mogli razmotati i hidrirati. Neuspješno odvijanje ovog procesa pridonosi, primjerice, patologiji i kliničkoj slici cistične fibroze (29).

### **1.5.2. Bubrenje i egzocitoza sekrecijskih mjehurića**

Neposredno prije egzocitoze dolazi do bubrenja sekrecijskih mjehurića, pri čemu dolazi do širenja i hidratacije mucina. Na bubrenje utječu promjene u koncentraciji pH i kalcija, a u literaturi je objašnjeno na sljedeći način: širenje i hidrataciju mucina omogućuje izmjena kationa koja se događa kada dođe do fuzije membrana i nastane sekrecijska pora. Ioni natrija ulaze u granule mucina, i izmjenjuju se s kalcijevim ionima. Budući da su prema načelu elektroneutralnosti potrebna dva  $\text{Na}^+$  za svaki  $\text{Ca}^{2+}$ , povećanjem broja iona raste u mjehurićima osmotski tlak, molekule vode ulaze u njih i hidratiziraju mucine koji bubre (28). Bubrenje mjehurića odvija se kinetikom prvog reda, a obrnuto je proporcionalno koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{H}^+$  u izvanstaničnom okruženju (30).

Mehanizam regulacije otpuštanja mucina iz sekrecijskih mjehurića u stanicama endocervikalnih žlijezda nije posve jasan. Poznato je da brzi porast unutarstanične koncentracije kalcija izravno potiče reguliranu egzocitozu, a pokazano je da, osim kratkoročno, promjene njegove unutarstanične koncentracije mogu regulirati intenzitet egzocitoze i dugoročno (31). Za koordinaciju unutarstaničnog prijenosa i egzocitotskih procesa sekrecijskih mjehurića zadužene su dvije obitelji proteina: Rab i SNARE, receptori za topljivi protein koji se veže na NSF (engl. *Soluble NSF Attachment Protein REceptor*). Rab proteini su uključeni u usmjeravanje transporta mjehurića na njihova različita odredišta, dok međudjelovanje SNARE proteina u dvjema membranama omogućuje fuziju membrana i egzocitozu (32). Egzocitoza mucina iz zrnaca za pohranu može biti modulirana bioaktivnim čimbenicima kao što su hormoni, neurotransmitori, biološki aktivni peptidi ili patogeni (25).

Membranski protein 8 vezan uz mjehuriće (VAMP8, prema engl. *Vesicle-associated membrane protein 8*), nekad poznatiji kao endobrevin, protein je kompleksa SNARE koji sudjeluje u reguliranoj egzocitozi. Nakon što je otkriven proučavan je u kontekstu rane fuzije endosoma i autofagije, no kasnije je otkriveno kako važniju ulogu ima u egzocitozi (33,34).

VAMP8 je pomoću nekoliko metoda identificiran u dišnim putevima imunolokalizacijom na sekrecijskim zrcima mucina u vrčastim stanicama i pokusima na miševima s utišanim izražajem VAMP8. Smanjenjem funkcije VAMP8 smanjena je i bazalna i regulirana egzocitoza, potvrđujući njegovu ulogu u egzocitozi mucina (35). Budući da egzocitoza time nije potpuno nestala, vjerojatno druge molekule kompleksa SNARE imaju istu ulogu u egzocitotskim procesima.

## 1.6. Formiranje sluzi

Nakon egzocitoze, mucini se zadržavaju na vanjskoj površini stanica u obliku zgusnutih nakupina sluzi, egzosoma (36). Konačno formiranje sluzi uključuje ekspanziju i hidrataciju ovih kondenziranih nakupina mucina, kako bi sluz poprimila odgovarajuća reološka svojstva. I dok regulacija pH i koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  sudjeluju u regulaciji formiranja sluzi utjecajem na egzocitotički mjehurić, za normalno oslobađanje i širenje izlučenih mucina i hidrataciju sluzi nužno su potrebni  $\text{HCO}_3^-$  ioni.

Umjesto unutarstanične uloge u procesima koji dovode do egzocitoze, ioni  $\text{HCO}_3^-$  najvjerojatnije su u ovaj proces uključeni izvan stanice, gdje egzocitirani mucini trenutno budu izloženi visokim koncentracijama  $\text{HCO}_3^-$ . Jednom kad su mucini otpušteni iz stanice, kationi koji ih štite moraju biti uklonjeni kako bi omogućili dekondenzaciju, brzo širenje polimera odbojnim elektrostatskim silama, pri kojoj se molekularni volumen poveća za čak 1000 puta u svega nekoliko sekundi (28). Smatra se kako je ekstracelularni  $\text{HCO}_3^-$  koji lako tvori komplekse s  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{H}^+$ , ključan za uklanjanje 'kationskih štitova' s aniona mucina nakon egzocitoze granule (37,38). Oslobodene kationske zaštite, odbojne elektrostatske sile izloženih anionskih mjesta ne samo da šire molekule mucina, već rezultiraju i vrlo niskim koeficijentom trenja između mucina u sluzi i membranskih mucina, na ovaj način potičući istjecanje sluzi iz kripti cerviksa prema središnjem kanalu (39).

Ključna uloga hidrogenkarbonatnih iona u smanjenju viskoznosti sluzi dokazana je u plućima, crijevima i ženskom spolnom sustavu te se, na temelju rasprostranjenosti ovog mehanizma, smatra kako je možda riječ o univerzalnoj pojavi u formiranju sluzi, umjesto o mehanizmu specifičnom za pojedine organe (38–40).

U odsustvu  $\text{HCO}_3^-$ , sluz ostaje zaglavljena unutar kripti epitela endocerviksa, odnosno, u dišnom sustavu, unutar lumena mukoznih žlijezda (27). Ova je poteškoća primijećena prvi put u pacijentica oboljelih od cistične fibroze (41). Važnost  $\text{HCO}_3^-$  ocrtava se i u već spomenutom

pokusu ispiranja rodnice s  $\text{NaHCO}_3$ . Naime, poznato je kako visoko hidratizirana sluz smanjenog viskoelastičnosti, kakva je prisutna u vrijeme ovulacije, olakšava transport spermija kroz cerviks i omogućuje oplodnju.

### **1.6.1. Regulacija izlučivanja sluzi**

Pod utjecajem spolnih hormona istovremeno se mijenja više parametara koji u konačnici rezultiraju promjenom biofizičkih i funkcionalnih svojstava sluzi. Mehanizam hormonske regulacije je stoga složen i vjerojatno uključuje različite načine upravljanja sintezom mucina, pohranom u sekrecijske mjehuriće, njihovim bubrenjem i egzocitozom te razmotavanja i širenja sluzi. Ovisno o tipu procesa kojeg reguliraju, estrogeni i njihovi receptori mogu djelovati sporo, na klasičan, „genomski način“ ili brzo, na „negenomski“ način. Primjerice, povezanost razine mRNA MUC4 i MUC5B i koncentracije estrogena, upućuje na izravno djelovanje estrogena na transkripciju mucina preko estrogenog receptor unutar jezgre, dakle, sporim, genomskim djelovanjem (19). S druge strane, pokazano je da izlučivanje sluzi iz stanice dosljedno prati suptilne promjene koncentracije hormona, pa vjerojatno postoji mehanizam brze estrogenske regulacije egzocitoze već pripremljenih sekrecijskih mjehurića s mucinima (42). Takva brza regulacija bila bi neovisna o klasičnom genomskom djelovanju estrogena, temeljenom na dugotrajnim procesima aktivacije gena i sinteze bjelančevina – transkripcije, translacije i posttranslacijske modifikacije. Brzo, negenomsko djelovanje estrogenih receptora događa se na staničnoj membrani gdje oni pokreću signalnu reakciju i brzi stanični odgovor unutar nekoliko minuta (43). Negenomsko djelovanje estrogenog receptora na membrani presinaptičkih završetaka pokazano je na primjeru neurona koji otpuštaju hormon oslobađanja gonadotropina (GnRH, od engl. *gonadotropin-releasing hormone*) (44).

Mehanizmi i signalni putevi kojim spolni hormoni reguliraju pojedine procese u proizvodnji, izlučivanju i konačnom oblikovanju endocervikalne sluzi još su nepoznati. Jedan od načina otkrivanja tih mehanizama i molekula koje u njima sudjeluju jest proučavanje sličnih mehanizama regulacije proizvodnje sluzi u drugim organskim sustavima. Na taj način moguće je za pojedine procese u proizvodnji sluzi izdvojiti potencijalne regulacijske molekule i provjeriti njihovu ulogu u tkivu endocerviksa.

## 1.7. GABA i GABA-ergički sustav

### 1.7.1. GABA

$\gamma$ -aminomaslačna kiselina (GABA, prema engl.  *$\gamma$  Amino-Butyric Acid*) je glavni inhibicijski neurotransmitter u mozgu odraslih sisavaca. Ova molekula djeluje u središnjem živčanom sustavu, perifernom živčanom sustavu i nekim ekstraneuralnim tkivima. Njegova glavna uloga je smanjenje neuronske podražljivosti u živčanom sustavu, a u ljudi GABA izravno regulira i mišićni tonus. GABA djeluje na dvije vrste receptora: GABA<sub>A</sub> receptore (GABA<sub>A</sub>R) i GABA<sub>B</sub> receptore (GABA<sub>B</sub>R). GABA<sub>A</sub>R su ionski kloridni kanali i posreduju brzu inhibicijsku aktivnost GABA-e (45). GABA<sub>B</sub>R su transmembranski metabotropni receptori, a reguliraju K<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> kanale koji posreduju u dugoročnim inhibicijskim djelovanjima GABA-e.

GABA se sintetizira prvenstveno iz glutamata djelovanjem enzima glutamat-dekarboksilaze (GAD, prema engl. *Glutamic Acid Decarboxylase*). Nakon sinteze, GABA se pohranjuje u sinaptičke mjehuriće uz pomoć vezikularnog prijenosnika GABA-e (VGAT, prema engl. *vesicular GABA transporter*). U određenim situacijama aktiviraju se alternativni putevi sinteze GABA-e (46).

### 1.7.2. GABA<sub>A</sub> receptor

GABA<sub>A</sub> receptor ionski je kanal selektivan za kloridne ione. Središnji kanal, pora kroz koju selektivno prolaze Cl<sup>-</sup> reguliran je pomoću GABA-e, a okružuje ga pet podjedinica (45). Svaka izoforma ovih receptora sastoji se od pet homolognih ili istovjetnih podjedinica, a nije do kraja poznato koliko izoformi receptora postoji i na koji način se kombiniraju njihove podjedinice. GABA<sub>A</sub> receptori koji se nalaze na postsinaptičkoj membrani posreduju neuronsku inhibiciju koja se javlja u milisekundnom vremenskom rasponu dok oni smješteni na ekstrasinaptičkoj membrani reagiraju na okolišnu GABA-u i prenose dugotrajnu inhibiciju. GABA<sub>A</sub> receptori reagiraju na široku paletu lijekova, zbog različitih veznih mjesta koja im omogućavaju različita stanja aktivnosti. Neki od spojeva za koje GABA<sub>A</sub>R ima vezna mjesta su benzodiazepini, barbiturati, neurosteroidi i etanol (47).

### 1.7.3. Glutamat-dekarboksilaza

Glutamat-dekarboksilaza enzim je koji katalizira dekarboksilaciju glutamata i stvaranje GABA-e i CO<sub>2</sub>. Ovaj se enzim pojavljuje u dvije izoforme, GAD67 i GAD65, koje GABA-u sintetiziraju na različitim staničnim lokalizacijama, zbog njihove različite funkcije. Dok GAD65 pronalazimo u živčanim završecima u kojima njegova funkcija omogućuje neurotransmisiju, GAD67 je ravnomjerno raspoređen po stanici i sintetizira GABA-u za neuronsku aktivnost koja nije povezana s neurotransmisijom, kao što je sinaptogeneza i zaštita živčanog tkiva nakon ozljede (48).

Mnogi autori GABA-u i njezinu aktivnost istražuju posredno, ispitujući aktivnost GAD-a. U biosintezi neurotransmitera, kao i u ostalim biosintetskim putovima, jedan enzimski korak regulira opći tijek sinteze. Stoga dokazivanjem nazočnosti glavnog nadzornog enzima (što katalizira taj ključni korak sinteze) često dokazujemo i neurotransmittersku narav stanice, najčešće neurona (49). Jasno, to je uvjet *sine qua non*, ali nije dovoljan sam po sebi, zbog mnogih staničnih procesa koji mogu interferirati od sinteze do egzocitoze neurotransmitera.

### 1.7.4. GABA-ergički sustav u perifernim organima

Osim u središnjem živčanom sustavu, aktivnost GABA-e i GABA<sub>A</sub>R pronađena je i u perifernim tkivima. Uz ulogu u neuromuskularnim vezama u glatkom mišićju koje djeluju slično kao neuronske sinapse, GABA<sub>A</sub>R ima ulogu i u hipertrofiji i hiperplaziji stanica, embrionalnom razvoju, posredovanju imunološkog odgovora, izlučivanju inzulina te stvaranju sluzi (50–53).

Štakorska i ljudska gušterača izražavaju na svojim stanicama GABA receptor. Tako je u štakorskoj gušterači pokazano kako je GABA<sub>A</sub>R prisutan u  $\alpha$ , ali ne i u  $\beta$  i  $\gamma$  stanicama.  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića izlučuju GABA-u koja djeluje na GABA<sub>A</sub>R prisutan u  $\alpha$  stanicama i na taj način inhibira izlučivanje glukagona iz tih stanica (54).

U nadbubrežnoj žlijezdi GABA putem GABA<sub>A</sub>R utječe na steroidogenezu u kori nadbubrežne žlijezde, ali i regulira otpuštanje kateholamina iz srži, a smatra se da pritom GABA može imati autokrino i parakrino djelovanje (50).

GABA je rasprostranjena i u ženskom i muškom reproduktivnom sustavu. GABA-u i GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>B</sub> receptore nalazimo u intersticiju testisa, sjemenskim mjehurićima i prostati. Dokazana je i uloga GABA-e u akrosomskoj reakciji spermija (55). U ženskom

spolnom sustavu, hormoni jajnika kontroliraju motilitet maternice modificirajući konformaciju GABA<sub>A</sub>R. U štakorskom jajniku i uterusu pokazana je i povezanost koncentracije GABA-e i razine estrogena (56). Nalaz funkcionalnog GABA-ergičkog sustava potvrđen je i u ljudskom spolnom sustavu, u maternici, jajovodu, jajniku i cerviksu (57–59).

Zanimljivo je istraživanje uloge GABA-ergičkog sustava u dišnom sustavu kojim je pokazano kako GABA proizvedena u epitelu dišnih putova autokrino i parakrino preko GABA<sub>A</sub>R potiče pojačano izlučivanje sluzi u epitelnim stanicama (60). Djelovanje GABA-e uzrokovalo je depolarizaciju stanica i porast koncentracije kalcijevih iona koji zajedno s diacilglicerolom (DAG) djeluju kao drugi glasnici u aktivaciji egzocitoze sekrecijskih zrnaca u Clara stanicama (61). Djelovanje GABA-e rezultiralo je i jačim unutarstaničnim i izvanstaničnim obojenjem alcijanskim modrilom, ukazujući na veću proizvodnju mucina u epitelu dišnih putova. Pokusi na miševima senzibiliziranim antigenom bjelanjka pokazali su kako je izlaganje tom antigenu povećalo izražaj molekula GABA-ergičkog sustava, a izlaganje GABA-i proizvodnju sluzi i hiperplaziju stanica koje proizvode sluz (60). Ovakav primjer zanimljiv je u proučavanju izlučivanja sluzi u reproduktivnom sustavu zbog velike sličnosti građe epitela dišnog i reproduktivnog sustava te načina izlučivanja i sastava izlučene sluzi. Žljezdane stanice endocerviksa slične su Clarinim stanicama i vrčastim stanicama građom, sintetskom funkcijom i glikoproteinskim sastavom izlučene sluzi.

#### **1.7.5. Potencijalna uloga GABA-ergičkog sustava u endocerviksu**

Na modelu astme pokazano je da pojačano izlučivanje sluzi u dišnom epitelu potiče GABA koja se stvara u epitelnim stanicama, te autokrino i parakrino djeluje na njih (12,13). Slično mehanizmu otpuštanja prisutnom u GnRH neuronima, i stanice dišnog epitela otpuštaju GABA-u neovisno o akcijskom potencijalu (60). Rezultati našeg prethodnog istraživanja pokazali su da je receptor za GABA (GABA<sub>A</sub>R) prisutan u tkivu mišjeg i humanog endocerviksa, te smo na temelju primjera GnRH neurona i izlučivanja sluzi u dišnom epitelu predložili model po kojem GABA-ergički sustav sudjeluje u brznoj regulaciji izlučivanja sluzi u endocerviksu, pri čemu bi otpuštanje GABA-e bilo neovisno o akcijskom potencijalu, i regulirano negenomskim djelovanjem receptora za estrogene (59).

## 1.8. Transmembranski regulator cistične fibroze, CFTR

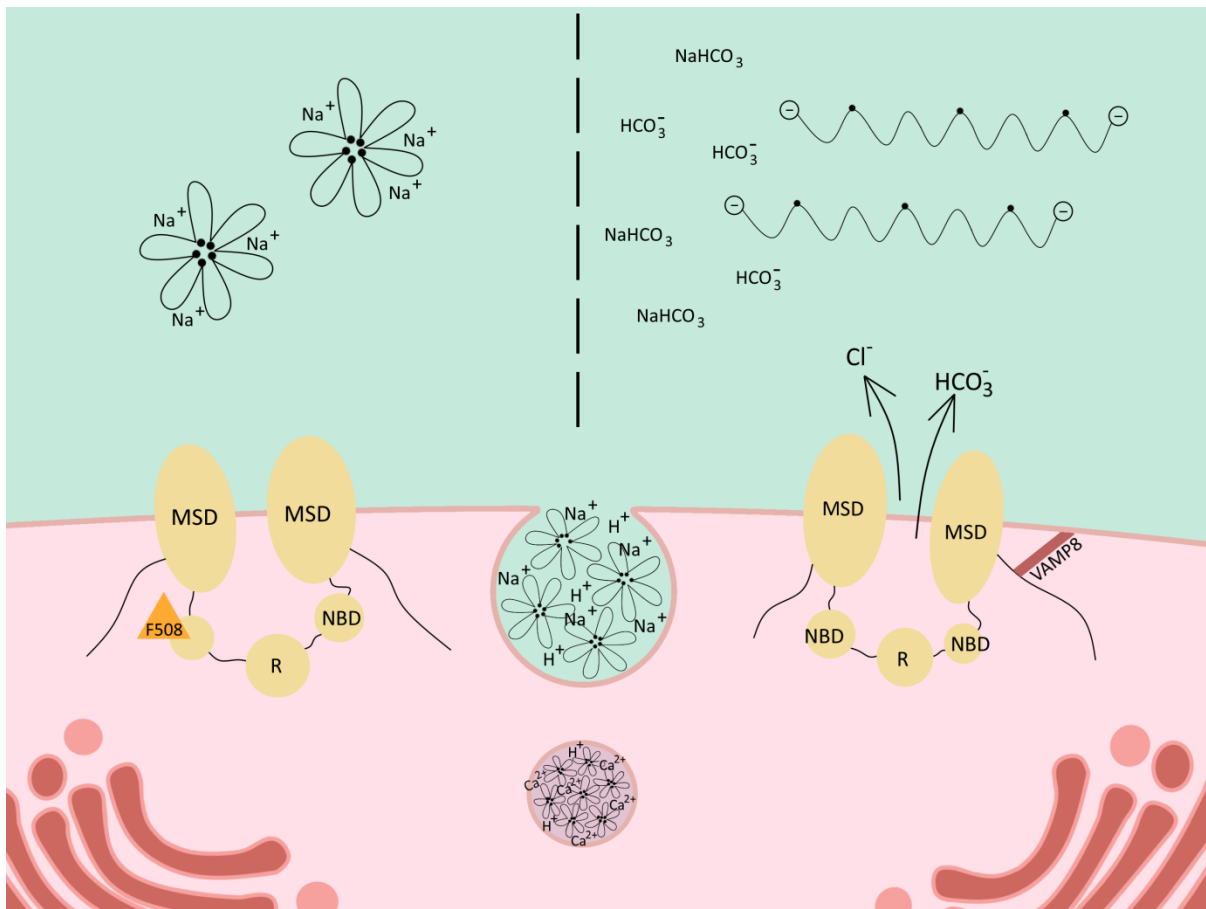
Visoka koncentracija kationa u sekrecijskim mjehurićima do koje dolazi zbog promjene pH i sastava iona tijekom sinteze mucina, omogućuje da mucini izlučivanje čekaju gusto pakirani u sekrecijske mjehuriće. Kako bi se oblikovala sluz reoloških svojstava koja omogućuju njezino slobodno otjecanje, potrebno je ukloniti naboj koji sprječava razmatanje i širenje mucina. Za uklanjanje naboja zaduženi su anioni, kloridni i hidrogenkarbonatni ioni, koji kelacijom pozitivno nabijenih iona vodika i kalcija omogućuju bubrenje mucina, koji se šire, navlače vodu i rastu volumenom te formiraju tekuću, pokretnu sluz (40).

Opisali smo kako je hidrogenkarbonatni ion,  $\text{HCO}_3^-$ , jedan od glavnih čimbenika zaduženih za ovaj proces i normalno formiranje sluzi. Prolaz kroz membranu omogućuje mu transmembranski regulator cistične fibroze, CFTR (prema engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), regulirani prijenosnik kloridnih i hidrogenkarbonatnih iona. Mutacije ovog ionskog kanala uzrokuju cističnu fibrozu, najčešću autosomno-recesivnu nasljednu bolest u ljudi. Uloga CFTR-a u formiranju sluzi shematski je prikazana na slici 2.

### 1.8.1. Građa CFTR-a

Izoliran 1989. godine, prije gotovo trideset godina, ovaj transmembranski protein jedinstven je po činjenici da je jedini ionski kanal u velikoj obitelji proteina prijenosnika ATP-a (ABC prijenosnici, prema engl. *ATP-binding cassette transporters*) (62). Iako je funkcijom potpuno različit, CFTR slijedi pravila građe ABC prijenosnika. Sastoji se od pet domena: dviju transmembranskih (MSD, prema engl. *membrane-spanning domain*), dviju domena koje vežu nukleotide (NBD, prema engl. *nucleotide-binding domain*) i jedinstvene regulacijske domene (R, prema engl. *regulatory domain*) (63). Uloga dviju transmembranskih domena je izgradnja pore kanala kojom prolaze ioni. Otvaranje i zatvaranje CFTR kao ionskog kanala strogo je kontrolirano ravnotežom aktivnosti unutarstanične kinaze i fosfataze te razinom ATP-a. Aktivacija protein-kinaze A ovisne o cAMP-u (PKA, prema engl. *protein kinase A*) uzrokuje fosforilaciju višestrukih serinskih ostataka unutar domene R. Jednom kad je domena R fosforilirana, protok kanalom je reguliran ciklusom hidrolize ATP-a na domenama NBD. Konačno, protein-fosfataze defosforiliraju domene R i vraćaju kanal u stanje mirovanja (63). CFTR je u početku bio poznat isključivo kao kloridni kanal koji propušta kloridne ione u procesu ovisnom o fosforilaciji, a neovisnom o ATP-u. Kasnije je pokazano kako se uz hidrolizu ATP-a odvija promjena selektivnosti kanala prema propuštanju

hidrogenkarbonatnih iona (64). Osim funkcija povezanih s protokom iona, većina studija provedenih na epitelnim staničnim modelima slaže se kako CFTR, u procesima ovisnima o cAMP-u, sudjeluje u regulaciji endocitoze, egzocitoze i recikliranja membrane u stanici (65). Povrh toga, ne samo da CFTR sudjeluje u regulaciji prometa membrana u stanici, već je prometu i sam podložan pa prema potrebi može biti pohranjen u mjehuriće blizu Golgijevog tjelešca ili smješten na apikalnoj površini stanice (66).



**Slika 2. Shematski prikaz procesa dekonenzacije i širenja egzocitiranih mucina u prisutnosti hidrogenkarbonatnih iona.** Ružičasto područje slike predstavlja unutarstanični odjeljak, a plavo lumen žlijezde. U unutrašnjosti stanice vidi se egzocitotički mjehurić s vrlo zgusnutim mucinima čiji su anionski krajevi zaštićeni ionima  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{H}^+$  (ljubičasto). Mjehurić tik prije egzocitoze bubri zbog zamjene  $\text{Ca}^{2+}$  s  $\text{Na}^+$ . Na desnoj polovici slike nalazi se funkcionalni CFTR koji u lumen žlijezde prenosi  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{Cl}^-$  koji skidaju „kationske štitove“ s mucina i omogućuju razmatanje molekula mucina ovisno o elektrostatskim silama. CFTR u membrani zadržava VAMP8. Lijeva polovica slike prikazuje mutirani  $\Delta\text{F508}$  CFTR, najčešću mutaciju u cističnoj fibrozi. Zbog nedostatka aniona u lumenu žlijezde kao posljedice disfunkcionalnog kanala CFTR, molekule mucina ostaju zgusnute i ne mogu formirati tekuću sluz. Domene CFTR-a: NBD – domena koje veže nukleotide, R – regulacijska domena, MSD – transmembranska domena.



Promet CFTR-a u stanici (prema engl. *trafficking*) dodatni je način regulacije aktivnosti ovog proteina. S biokemijskog stajališta, prevladava mišljenje da je nezreli CFTR smješten u ER, dok ga zreli CFTR, koji čini većinski udio ukupnog staničnog CFTR-a, napušta i prisutan je ponajprije u distalnom dijelovima sintetskog puta proteina, uključujući Golgijevo tjelešce i apikalnu membranu (66). U regulaciji raspodjele zrelog CFTR-a između apikalne stanične membrane i Golgijevog tjelešca postoji brzi mehanizam endocitoze, recikliranja i egzocitoze CFTR ovisan o cAMP/PKA i kompleksnim interakcijama CFTR-a i membranskih i endosomalnih proteina. Jedan od primjera koji pokazuje zamršenost ove regulacije jest međudjelovanje kompleksa SNARE i CFTR-a. Pojedini proteini mebranskog kompleksa SNARE, kao što je sintaksin 6 potiču endocitozu i razgradnju CFTR-a. Nasuprot tome, sintaksin 16 potiče njegovo recikliranje, odnosno kruženje, ali ne i razgradnju. VAMP8, protein endosomskog kompleksa SNARE zadržava CFTR-a u apikalnoj membrani, produžujući njegovo djelovanje (67). Ovakva brza regulacija prisutnosti CFTR-a u apikalnoj membrani regulira i njegovu aktivnost ili neaktivnost, propusnost za ione klora i hidrogenkarbonata, te izlučivanje tekućine.

### **1.8.2. Lokalizacija CFTR i uloga u oblikovanju sluzi**

Izražaj i funkcija proteina CFTR opisani su u epitelnim stanicama gornjeg i donjeg dišnog sustava, probavnog trakta, uključujući gušteraču, jetru i žučni mjehur, u epitelu slinovnica kao i muškog i ženskog spolnog sustava (68,69). Mutacije koje uzrokuju manjkavu sintezu, obradu, zatvaranje, vodljivost ili smanjenu stabilnost CFTR kanala (deformirani kanal) dovode do cistične fibroze, nekad znane kao mukoviscidoze. Posljedica disfunkcije CFTR-a na apikalnoj membrani epitelnih stanica je dehidracija mucina, što dovodi do stvaranja guste i nepokretljive sluzi, odnosno mukocilijarne disfunkcije (70). Ovaj poremećaj, ovisno o promatranom organu ima različite posljedice: u dišnom sustavu javljaju se stalne infekcije i respiratorna insuficijencija, u probavnom sustavu pacijente koji boluju od cistične fibroze pogađaju mekonijski ileus, opstrukcija crijeva i insuficijencija gušterače, muškarci su neplodni zbog začepljenja sjemenovoda, a žene smanjeno plodne iz razloga koji u dosadašnjoj znanstvenoj literaturi još nije razjašnjen (29). Kod nerazjašnjene smanjene plodnosti kod žena koje boluju od cistične fibroze postoji nagovještaj kako bi to moglo biti zbog patološki izmijenjene cervikalne sluzi (41).

Glavna uloga CFTR-a u izlučivanju sluzi, koliko je zasad poznato, je izlučivanje hidrogenkarbonatnih iona u žljezdani lumen, osiguravajući izvan stanice okoliš s visokim

udjelom aniona. S mucina egzocitiranih u ovakav izvanstanični okoliš, ioni  $\text{HCO}_3^-$  brzo uklanjaju kationske štitove, te se mucini mogu raširiti i hidrirati. Pokazano je kako ova, detaljno istraжена uloga hidrogenkarbonata, izravno ovisi o CFTR-u te u slučaju njegove mutacije ili smanjene funkcije ne dolazi do ispravne dekondenzacije i hidracije mucina, a posljedično ni nastanka sluzi smanjene viskoznosti (38). Ovakva pak sluz ostaje zarobljena u manjim odvodnim kanalima, dovodeći do pankreatitisa u gušterači, mekonijskog ileusa u crijevima, respiratorne insuficijencije i infekcija u plućima te, potencijalno, smanjene plodnosti u ženskom reproduktivnom sustavu.

### 1.8.3. CFTR i plodnost

Izražaj CFTR-a u ženskom reproduktivnom sustavu dokazan je u cerviksu, jajniku, jajovodu, maternici i cerviksu (69,71). Premda funkcija CFTR-a u ovim tkivima nije posve razjašnjena, većina istraživanja usmjerena je na mehanizme prijenosa tekućine i njihove uloge u plodnosti (72). Izražaj mišjeg *Cfr*-a u maternici reguliran je hormonima jajnika pri čemu do povećane ekspresije dolazi kod povišene razine estrogena, a do smanjene ekspresije kod povišene razine progesterona. Isti je uzorak dokazan i u ljudskom endometriju, gdje ekspresija CFTR-a korelira s cikličkim promjenama u maternici (71). Dodatni dokazi o predloženoj ulozi CFTR-a u regulaciji tekućine u reproduktivnom sustavu su dva patološka stanja prisutna u općoj populaciji: hidrosalpinks i sindrom hiperstimulacije jajnika (OHSS, prema engl. *ovarian hyperstimulation syndrome*) (73,74). Navedena stanja posredno smanjuju plodnost povećanjem volumena tekućine u ženskom spolnom sustavu, a u oba poremećaja opažena je povećana ekspresija CFTR-a u reproduktivnim organima. Konačno, i pretjerano viskozna sluz za koju se pretpostavlja kako igra ulogu u neplodnosti žena oboljelih od cistične fibroze, može se pripisati neodgovarajućoj regulaciji tekućine u cervikalnom kanalu.

U slučaju neodgovarajućeg djelovanja CFTR-a, bilo zbog smanjenog broja ili poremećene funkcije ovih kanala, smanjen volumen tekućine izlučene iz epitela endocerviksa može uzrokovati nakupljanje guste, viskozne sluzi i dovesti do smanjene pokretljivosti spermija, analogno modelima u probavnom i dišnom sustavu. U slučaju utero-cervikalne sluzi u miša, pokazano je i kako je glavni uzrok smanjenog intraluminalnog prijenosa tekućine nedostatak  $\text{HCO}_3^-$  iona, a ne same sekrecije tekućine iz stanice u lumen (27).

S obzirom na očiglednu važnu ulogu u regulaciji izlučivanja i oblikovanja sluzi, te opisanu korelaciju sa spolnim hormonima, CFTR je izgledni kandidat za regulacijsku molekulu u signalnom putu hormonske regulacije izlučivanja sluzi u humanom endocerviksu.

## **1.9. Pokusni modeli u istraživanju izlučivanja endocervikalne sluzi**

U istraživanjima funkcije cerviksa, najčešće upotrebljavani modeli su stanice i tkiva cerviksa glodavaca, velikih sisavaca, kao što su svinje i krave, te ljudskog endocerviksa.

### **1.9.1. Glodavci**

Miš je najčešće korišten model za istraživanje bioloških procesa. To je mala, za uzgoj razmjerno jeftina životinja koja s čovjekom dijeli oko 95% gena. Ima dobro proučenu biologiju, te sekvencioniran i proučen genom. Prilagođena je životu u laboratorijskim uvjetima, jednostavno se njome rukuje, brzo se razmnožava i stvara velik broj potomaka. Relativno kratak reproduktivni ciklus koji traje 4 – 5 dana dodatna je prednost, specifična u istraživanju cervikalne sluzi. Sastoji se od 4 faze: proestrus, estrus, metaestrus i diestrus. One se jednostavno mogu pratiti svakodnevnim uzimanjem uzoraka stanica iz rodnice.

Štakor je, kao i miš, poliestrusna životinja, s istim fazama reproduktivnog ciklusa i često je korišten eksperimentalni model. Međutim, podaci o trajanju i određivanju faza ciklusa u štakora su kontradiktorni (75).

Iako su i štakor i miš već korišteni kao pokusni modeli u istraživanju funkcije endocerviksa i izlučivanja sluzi, ne mogu poslužiti kao odgovarajući model za proučavanje funkcije sekrecijskog epitela kakav se nalazi u humanom endocerviksu (72,76). Prije svega, histološka građa mišjeg i štakorskog endocerviksa razlikuje se od ljudske: epitelne stanice koje izlučuju sluz prisutne su samo u proestrusu (kod štakora u diestrusu i odljušte se već u proestrusu) i to kao jedan sloj cilindričnih stanica na površini mnogoslojnog epitela cervikovaginalne sluznice koja ne tvori kripte. Nadalje, zbog anatomske građe mišjeg i štakorskog cerviksa, odnosno puno kraćih udaljenosti od rodnice do maternice, sjemenska tekućina se u cerviksu ovih glodavaca zadržava mnogo kraće nego u čovjeka, pa niti nema bitnu ulogu u transportu i pohrani spermija (77). Iz ovih razloga nema potrebe niti za strogom regulacijom proizvodnje i izlučivanja sluzi u miša i štakora, pa oni ne mogu poslužiti kao vjerodostojni modeli u istraživanju te regulacije kod ljudi.

### **1.9.2. Veliki sisavci**

U svinja, reproduktivni ciklus (estrus) klasificira se prema spolnom ponašanju: estrus, gdje je svinja seksualno receptivna ili ne-estrus. Kao i ljudski spolni ciklus može se podijeliti u luteinsku i folikularnu fazu koje su odvojene ovulacijom. Dok mjesečni spolni ciklus žena počinje i završava početkom menstruacije, s ovulacijom usred ciklusa, u svinja ciklus započinje i završava ovulacijom. Osim toga, duljina ciklusa i hormonska fluktuacija su vrlo slične ljudskim. U svinja se pojavljuje značajan rast folikula tijekom luteinske faze budući da se folikularna faza djelomično preklapa s luteinskom fazom, što rezultira kraćim ciklusom (19 – 21 dan) nego kod žena, gdje su dvije faze strože odijeljene i ciklus stoga traje 28 dana. I kod žena i kod svinja do ovulacije dolazi spontano u kontinuiranim ciklusima koji su pod kontrolom osi hipotalamus – hipofiza – jajnik. Cerviks ženke svinje dijeli zajedničke karakteristike s ljudskim cerviksom. U obje vrste nalazimo jednoslojni cilindrični epitel s vrčastim stanicama koje izlučuju sluz, a količina izlučene sluzi ovisi o fazi ciklusa s povećanom količinom tijekom estrusa kod svinja i sredinom ciklusa u žena (oko ovulacije) (78).

U krava, reproduktivni ciklus, estrus, dijeli se također u proestrus, estrus, metaestrus i diestrus. Cerviks je građen slično ljudskom, s epitelom koji se uvlači i tvori kripte. Epitel endocerviksa je kubičan u diestrusu, a prema estrusu raste do cilindričnog. Izlučivanje sluzi najobilnije je u estrusu, razdoblju kada nastupa ovulacija, a sluz je, kao i ljudska, bistra i smanjene viskoznosti (79). Grananje sluzi na stakalcu, arborizacija, prihvaćena je kao kriterij estrogenskog djelovanja na sluz, a u kravljjoj estrusnoj cervikalnoj sluzi je vrlo izražena (80). Detaljnom analizom transkriptoma goveđeg endocerviksa u razdoblju oko estrusa pokazano je da promjene u biokemijskim i biofizikalnim svojstvima sluzi ovise o razinama steroidnih hormona (25).

### **1.9.3. Čovjek**

Ljudski uzorci tkiva endocerviksa dobar su eksperimentalni model za ispitivanje izražaja proteina i gena, promjena u strukturi cerviksa u različitim fazama ciklusa i trudnoći, kao i za imunološka i mikrobiološka ispitivanja. Fiziološke, dinamičke procese teže je proučavati. Naime, dok se životinjama mogu davati različiti agonisti, antagonisti i tvari kojima istraživač može prilagoditi uvjete organizma, kod ljudi to nije moguće i materijal kojim se barata je najčešće postoperativni materijal. Zbog toga je, razvojem znanstvene metodologije prema sve

većoj primjeni staničnih modela, već 70-ih godina razvijena prva imortalizirana kultura ljudskih endocervikalnih stanica. Nedavno su razvijeni i 3D modeli koji vjernije dočaravaju epitelnu funkciju zbog interakcije s vezivnom podlogom i apikalno-bazalnog usmjerenja stanice.

U staničnim modelima može se izlaganjem kombinacijama hormonskih koncentracija simulirati mjesečni spolni ciklus i promatrati ispitivane funkcije u dinamičkom sustavu, no postoje prigovori kako dobiveni rezultati nisu uvijek pouzdani. Nekoliko je razloga za to. Tijekom održavanja kulture stanica njihov se genetski materijal mijenja diobama i nemoguće je pratiti do kojih je sve promjena došlo. Stanična kultura korisna je metoda za proučavanje specifičnih funkcija pojedinih stanica, ali prikazuje izoliranu sliku određenog biološkog procesa, a ne odražava stvarnu ukupnost fizioloških ili patoloških interakcija. Na primjeru prometa CFTR-a u staničnim modelima primijećeno je kako zbog presnažnog izražaja CFTR-a dolazi do zasićenja mehanizama koji reguliraju promet CFTR-a u stanici te se dobiveni rezultati ne mogu vjerno translirati na stvarni fiziološki mehanizam (66). Zbog prednosti i nedostataka svakog pojedinog eksperimentalnog modela potrebno je izabrati model prilagođen fazi u napretku istraživanja.

## **2. HIPOTEZA**

U žljezdanim stanicama ljudskog endocerviksa prisutni su GABA<sub>A</sub>R, GAD i CFTR. Izražaji GABA<sub>A</sub>R, GAD i CFTR povezani su s koncentracijom estradiola u krvi, i izražaji GABA<sub>A</sub>R i GAD s intenzitetom izlučivanja mucina.

## **3. CILJEVI RADA**

### **3.1. OPĆI CILJ:**

Potvrditi prisutnost GABA<sub>A</sub>R, GAD i CFTR u žljezdanim stanicama ljudskog endocerviksa i ispitati povezanost jačine izražaja GABA<sub>A</sub>R, GAD i CFTR s koncentracijom estradiola u krvi te izražaj GABA<sub>A</sub>R i GAD s intenzitetom izlučivanja mucina.

### **3.2. SPECIFIČNI CILJEVI:**

1. Imunohistokemijskim i molekularnim metodama potvrditi prisutnost mRNA i proteina GABA<sub>A</sub>R, GAD, CFTR, a histokemijskim mucina u tkivu endocerviksa.
2. Kvantitativno odrediti:
  - a) koncentraciju estradiola u krvi,
  - b) izražaj proteina GABA<sub>A</sub>R, GAD i CFTR,
  - c) intenzitet izlučivanja mucina.
3. Prikazati:
  - a) odnos koncentracije estradiola u krvi i jačine izražaja GABA<sub>A</sub>R i GAD te odnos GABA<sub>A</sub>R i GAD i intenziteta izlučivanja mucina u GABA<sub>A</sub>R, pozitivnim stanicama
  - b) odnos koncentracije estradiola u krvi i izražaja CFTR.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Uzorci tkiva endocerviksa**

#### **4.1.1. Odabir ispitanica**

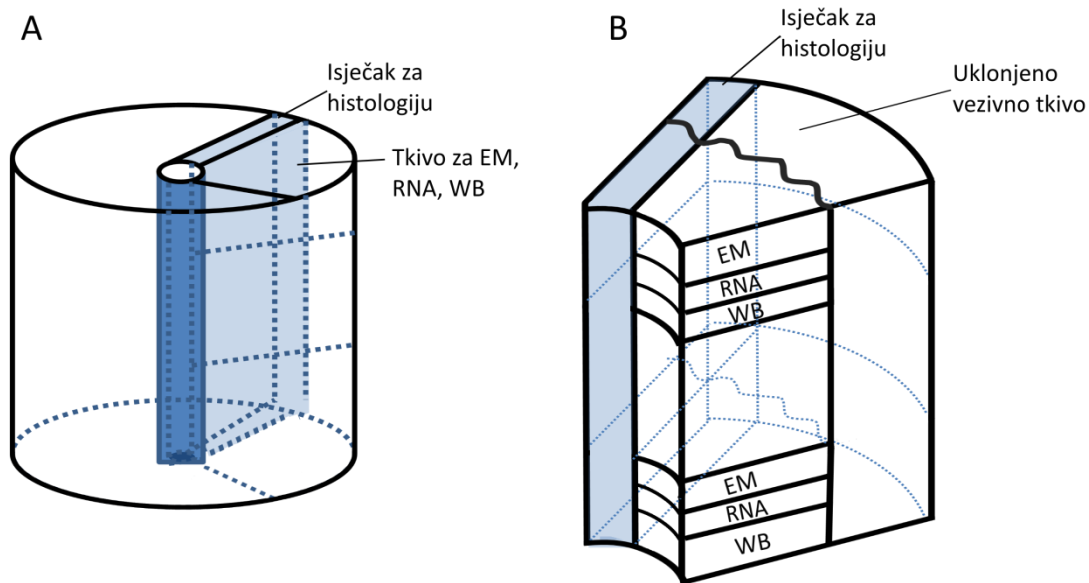
Za potrebe ovog istraživanja tijekom 24 mjeseca ispitano je 25 žena koje su bile podvrgnute operativnom zahvatu uklanjanja maternice i cerviksa (histerektomija). Ispitanice su bile u rasponu starosti od 41 do 56 godina, uz medijan starosti koji je iznosio 49 godina. Najčešće dijagnoze zbog kojih je bila indicirana histerektomija bili su miomi te prolaps uterusa. Budući da su uzorci cerviksa potrebni za ovo istraživanje trebali imati sačuvanu normalnu građu i funkcionalnost na razini tkiva i stanica, isključni kriteriji za odabir pacijentica bili su: maligni procesi reproduktivnog sustava, hormonska kontracepcija unutar zadnjih šest mjeseci, intrauterina spirala unutar zadnjih godinu dana, nepravilnosti u nalazu Papanicolau testa i menopauza. Zbog prisutnosti jednog ili više isključnih kriterija, 7 pacijentica je nakon uzimanja anamneze i mjerenja razine hormona u krvi isključeno iz daljnjeg istraživanja. Stoga je konačan broj ispitanica /uzoraka tkiva cerviksa bio osamnaest.

Pacijentice su bile obaviještene o postupku i svrsi istraživanja, uzeta je anamneza te su potpisale informirani pristanak za provođenje istraživanja i publikaciju rezultata.

#### **4.1.2. Postupci s prikupljenim tkivom**

Neposredno nakon što je operativni materijal bio uklonjen, tkivo je odneseno na Odjel za patologiju Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb, gdje ga je uvijek pripremao isti specijalist patologije na način opisan u nastavku teksta. Po stražnjem zidu cerviksa napravljen je okomiti rez. Tada je cijelom tom duljinom napravljen još jedan paralelni rez kako bi se dobio isječak cijele duljine cerviksa debljine oko 3 mm koji je odmah stavljen u 4%-tni paraformaldehid (slika 3. plavo obojeno područje). Tada je uzet još jedan takav isječak tkiva debljine oko 5 mm, od čijeg je vanjskog dijela, iza dubine do koje prodiru kripte žljezdanog tkiva, uklonjeno vezivno tkivo. Od kranijalne trećine isječka tkivo je narezano na tri komadića dimenzija 0,5 x 0,5 x 0,5cm. Prvi komadić je trenutno smrznut u krio-epruveti u tekućem dušiku, a zatim pohranjen na -80°C kako bi se kasnije mogao koristiti za izolaciju proteina. Drugi dio je spremljen u 1,5 mililitarsku epruvetu napunjenu otopinom RNAlater (Ambion, Invitrogen) i pohranjen na -20°C, kako bi se mogao koristiti za kasniju izolaciju RNA. Treći

dio je izrezan na kockice veličine 1mm x 1mm x 1mm koje su uronjene u 3mL otopine 1% glutaraldehida i 4% paraformaldehida u fosfatnom puferu (PB) i namijenjene su za elektronsku mikroskopiju. Ovi su uzorci do uklapanja pohranjeni na +4°C. Odgovarajući postupci ponovljeni su i na kaudalnoj trećini tkiva te pohranjeni za buduće eksperimentalne postupke.



**Slika 3 Shematski prikaz prikupljanja tkiva ljudskog endocerviksa. A.** Cilindar shematski prikazuje vrat maternice. **B.** Uvećani prikaz isječka tkiva. Plavo obojen je isječak cijelom duljinom prikupljen za histološke metode. Valovita linija označava granicu prodiranja kripti u tkivo cerviksa. EM – tkivo uzeto za elektronsku mikroskopiju, RNA – tkivo uzeto za izolaciju RNA, WB – tkivo uzeto za izolaciju proteina.

## 4.2. Uzorci krvi

Ujutro na dan operacijepacijenticama je izvađena krv koja je centrifugirana kako bi se razdvojili serum i stanična frakcija. Serum je pohranjen na -20°C. Koristeći kit za kemiluminiscentne imunoeseje (CIMA, prema engl. *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*), ARCHITECT Estradiol (Abbott) i ARCHITECT Progesteron (Abbott) prema uputama proizvođača iz uzoraka seruma određena je koncentracija estradiola i progesterona pomoću stroja ARCHITECT i1000SR Immunoassay Analyzer (Abbot).

Referentne vrijednosti serumskih razina hormona u pojedinim fazama ciklusa nalaze se u Tablici 1, a izračunate su kao centralna vrijednost hormonskih razina u serumu 90% populacije (81). Na osnovu referentnih vrijednosti pacijentice su, prema koncentraciji



estradiola i progesterona izmjerenog u njihovom serumu, podijeljene u one koje su u luteinskoj te one koje su u folikularnoj fazi mjesečnog spolnog ciklusa.

**Tablica 1. Referentne vrijednosti estradiola i progesterona u serumu tijekom ženskog mjesečnog spolnog ciklusa**

ESTRADIOL	
Folikularna faza	27-123 pg/mL
Periovulatorna faza	96-436 pg/mL
Luteinska faza	49-294 pg/mL
Postmenopauza	0-40 pg/mL
PROGESTERON	
Folikularna faza	≤ 0.89 ng/mL
Periovulatorna faza	≤ 12 ng/mL
Luteinska faza	1.8-24 ng/mL
Postmenopauza	≤ 0.20 ng/mL

#### 4.3. Histološki, histokemijski i imunohistokemijski postupci

Prikupljeni uzorci tkiva analizirani su histološkim histokemijskim i imunohistokemijskim postupcima. Kemijski sastav i pH otopina korištenih u ovim postupcima nalaze se u Tablici 2.

**Tablica 2. Otopine korištene u histokemijskim, imunohistokemijskim postupcima i elektronskoj mikroskopiji**

Otopina	Sastojci	Otapalo	pH
0,1M fosfatni pufer (PB)	0,2 M natrij-dihidrogen-fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) 0,2 M dinatrij-hidrogen-fosfat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	H <sub>2</sub> O	7,4
1M fosfatni pufer sa soli (PBS)	0,1 M PB NaCl	H <sub>2</sub> O	7,4
Tris-EDTA pufer	10 mM Tris baza 1 mM otopina EDTA 0,05% Tween 20	H <sub>2</sub> O	9,0
10mM natrijev citratni pufer	trinatrij-citrat-dihidrat 0,05% Tween 20	H <sub>2</sub> O	6,0
4% PFA-PB	4% paraformaldehid 1% glutaraldehid	0,1M PB	6,9

#### **4.3.1. Fiksacija i priprema parafinskih rezova tkiva**

Tkivo vrata maternice namijenjeno za histološku i histokemijsku analizu uronjeno je, neposredno nakon izolacije, u otopinu fiksativa sačinjenu od 4% paraformaldehida u 0,1M fosfatnom puferu (PBS). Volumen fiksativa bio je minimalno deset puta veći od volumena tkiva. Nakon 2 – 4 tjedna uzorci su stavljeni na ispiranje pod tekućom vodom preko noći. Slijedila je dehidracija u nizu vodenih otopina rastućih volumnih udjela etanola od 20% preko 50%, 70%, 96%, 99% do 100%, u svakoj otopini dva puta po 15 - 30 minuta. Potom su uzorci stavljeni u 100%-tni Bioclear (Biognost) na 5 – 15 minuta, zatim 5 - 15 minuta u mješavinu Bioclear-a i parafina u omjeru 1:1 na 58 – 60 °C, te u 100% parafin nekoliko sati na 56°C uz tri izmjene parafina. Nakon što su uzorci uspješno prožeti parafinom, pomoću kalupa su uklopljeni u parafinske blokove. Ovi blokovi su rezani na rezove debljine 5 µm i postavljeni na pozitivno nabijena predmetna stakalca Superfrost plus (Menzel-Gläser, ThermoScientific). Takvi rezovi pohranjeni su na sobnu temperaturu, te korišteni za histološka i histokemijska bojenja.

#### **4.3.2. Histološko bojenje hemalaunom i eozinom**

Bojenje hemalaunom i eozinom upotrijebljeno je radi prikazivanja i analize građe tkiva. Otopina hemalauna priprema se ukuhavanjem 1 g hematoksilina ( $C_{16}H_{14}O_6$ ), 0,2 g natrij-jodata ( $NaIO_3$ ), 50 g kalij alauna ( $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ), 50 g kloralhidrata ( $CCl_3CH(OH)_2$ ) u 1L destilirane vode. Nakon hlađenja pripremljena otopina se profiltrira. Parafinski rezovi su prije bojenja deparafinirani i rehidrirani uranjanjem u Bioclear (2 x 5 minuta), silazni niz alkohola (2 x 100%, 96%, 70%) i destiliranu vodu po 5 minuta. Zatim su uronjeni u otopinu hemalauna na 5 minuta, isprani u destiliranoj vodi, tekućoj vodi 10 minuta i opet u destiliranoj vodi. Nakon toga stakalca s rezovima uronjena su u 1% vodenu otopinu eozina 1 minutu, isprana destiliranom vodom i dehidrirana u nizu vodenih otopina rastućih volumnih udjela etanola (70%, 96%, 100%). Nakon uranjanja po 5 minuta u mješavinu Biocleara i alkohola u omjeru 1:1 te dva puta u Bioclear, rezovi su poklopljeni sredstvom za poklapanje Biomount (Biognost).

#### **4.3.3. Histokemijska reakcija alcijanskim modrilom**

Histokemijskom reakcijom alcijanskim modrilom (AB, prema engl. *Alcian blue*) plavom bojom se prikazuju kiseli mukopolisaharidi u vezivu, epitelu i sluzi. Parafinski rezovi su prije

bojenja deparafinirani i rehidrirani ranije opisanom metodom. Zatim su uronjeni u 1-2% vodenu otopinu AB na 3 minute, te isprani u destiliranoj vodi. Nakon 10 minuta uranjanja u običnoj vodi, stakalca s rezovima su uronjena u otopinu hematoksilina na 5 – 10 minuta, te isprana destiliranom vodom i dehidrirana uzlaznim nizom alkohola (70%, 96%, 100%). Nakon uranjanja po 5 minuta u mješavinu Biocleara i alkohola u omjeru 1:1 te dva puta u Bioclear, rezovi su poklopljeni sredstvom za poklapanje Biomount.

#### **4.3.4. Histokemijska reakcija Schiffovim perjodnim reagensom**

Histokemijskom reakcijom Schiffovim perjodnim reagensom (PAS, prema engl. *Periodic acid – Schiff*) crveno su obojeni neutralni mukopolisaharidi, mono i polisaharidi, kao i amino-, N-acetilamino- i deoksi-šećeri te sijalinske kiseline.

Schiffov reagens priprema se ukuhavanjem 1g bazičnog fuksina ( $C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$ ) u 200 mL vode, hlađenjem na 50°C, dodavanjem 20 mL 1M kloridne kiseline i hlađenjem na 25°C. Potom se doda 1 g Na metabisulfita ( $Na_2S_2O_5$ ), ostavi na +4°C preko noći i dodaje 2 g aktivnog ugljena.

Parafinski rezovi su prije bojenja deparafinirani i rehidrirani, a onda uronjeni u 0,5% perjodnu kiselinu ( $H_5IO_6$ ) na 10 minuta u mraku, isprani u destiliranoj vodi, te uronjeni u Schiffov reagens 30 – 60 minuta u mraku. Uzorci su potom neutralizirani uranjanjem u nekoliko izmjena 0,5% K-metabisulfita ( $K_2S_2O_5$ ), isprani tekućom i destiliranom vodom, te obojeni otopinom hemalauna 5 minuta i isprani u destiliranoj vodi, zatim nekoliko puta u tekućoj vodi i na kraju destiliranoj vodi. Slijedila je dehidracija uzlaznim nizom alkohola (70%, 96%, 100%). Nakon uranjanja po 5 minuta u mješavinu Biocleara i alkohola (1:1), te dva puta u Bioclear, rezovi su poklopljeni sredstvom za poklapanje Biomount.

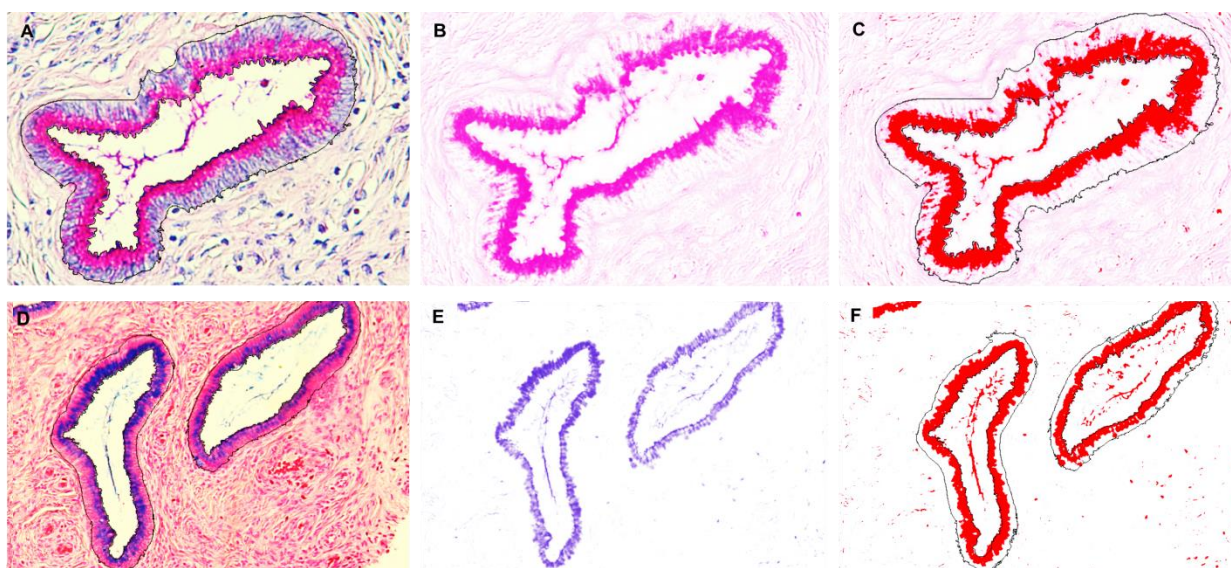
#### **4.3.5. Svjetlosna mikroskopija**

Obojeni histološki rezovi analizirani su svjetlosnim mikroskopom Nikon Eclipse 200 te dokumentirani priključenom kamerom Nikon Coolpix 4500 (Minato). Po svakom rezu snimljeno je minimalno 10 kadrova koji sadržavaju žljezdani epitel.

#### 4.3.6. Kvantifikacija histokemijskog bojenja

Neutralni polisaharidi obojeni crveno PAS-om te kiseli polisaharidi obojeni plavo koristeći AB analizirani su FIJI inačicom programa Image-J (slika 4.). Postupak kvantifikacije sastojao se od razdvajanja boja funkcijom programa *Color Deconvolution*. Boje su izabrane označavanjem na slici plave, crvene te područja na slici bez tkiva. Na ovaj način dobivene su tri odvojene slike epitela, za kvantifikaciju AB korištena je plava slika, za PAS crvena. Zatim su označena područja epitela na slici kao „područja interesa“ (ROI, prema engl. *region of interest*). Izmjerena je površina ROI. Korištenjem programske funkcije *Automatic Treshold* označena je površina epitela prekrivena bojom te je izmjerena i ova površina. Postupak je ponovljen za svaku sliku pojedinog uzorka, podaci su uneseni u tablicu i rezultat prikazan kao omjer površine epitela obojene zbog prisustva polisaharida te ukupne površine epitela.

Ukupna površina pokrivena mucinima izračunata je kao aritmetička sredina površine prekrivene kiselim mucinima i površine prekrivene neutralnim mucinima, jer su se većim dijelom te dvije površine preklapale, budući da je sluz sastavljena od kombinacije kiselih i neutralnih mucina.



**Slika 4. Mjerenje udjela epitela obojenog metodama PAS i AB. A – C.** tkivo ljudskog endocerviksa obojeno PAS-om. **A.** epitel endocerviksa obojen PAS-om i omeđen crnom linijom - mjeri se površina unutar linija. **B.** metodom *Color Deconvolution* izdvojena crvena boja na uzorku. **C.** crvenom bojom označena mjerena površina neutralnih mucina sa slike B dobivena funkcijom *Automatic Treshold*, epitel je omeđen plavom linijom kako bi se izbjegla kvantifikacija sadržaja lumena. **D – F.** tkivo ljudskog endocerviksa obojeno metodom AB. **D.** epitel endocerviksa obojen metodom AB i označen crnom linijom, mjeri se površina unutar linija. **E.** metodom *Color Deconvolution* izdvojena plava boja na preparatu. **F.** crvenom bojom označena mjerena površina kiselih mucina sa slike E dobivena funkcijom *Automatic Treshold*, epitel okružen plavom linijom kako bi se izbjegla kvantifikacija sadržaja lumena.

#### **4.3.7. Elektronska mikroskopija**

Uzorci tkiva narezani na komadiće veličine 1mm x 1mm x 1mm nakon imerzije u fiksativu (4% paraformaldehid, 1% glutaraldehid u 0,1M PB), isprani su u 0,1M PB, te postfiksirani 1 sat u 1%-tnoj otopini OsO<sub>4</sub>. Nakon ispiranja u 0,1M PB, uzorci su dehidrirani u uzlaznom nizu etanola, te primjenom acetona kao međukoraka uklopljeni u smolu Durcupan (Fluka Sigma-Aldrich). Polutanki i ultratanki rezovi rezani su ultramikrotomom PowerTome XL Ultramicrotome (RMC Products). Polutanki rezovi debljine 1 μm, obojeni bojom toluidinsko modriilo (0,1% toluidin, 1% Na-tetraborat u vodi), poslužili su za odabir odgovarajućih ultratankih rezova na svjetlosnom mikroskopu. Ultratanki rezovi debljine 70 nm kontrastirani su 2%-tnom otopinom uranil acetata u vodi i otopinom olovnog citrata po Reynoldsu. Rezovi su analizirani transmisivskim elektronskim mikroskopom TEM902A (Zeiss) i snimljeni kamerom Canon PowerShot S50.

#### **4.3.8. Fluorescentna imunohistokemija**

Za određivanje prisutnosti i smještaja bjelančevina u tkivu upotrijebljena je metoda imunohistokemije. Metoda se temelji na uporabi ciljno usmjerenih protutijela koristeći osnovni princip u imunologiji da se određeno protutijelo veže i prepozna samo ciljni antigen.

Za izvođenje imunohistokemije, slijeđen je protokol koji nakon deparafinacije i rehidracije koristi otkrivanje antigena posredovano toplinom. Umjesto uobičajenog zagrijavanja uzoraka do vrenja u mikrovalnoj pećnici ili vodenoj kupelji, uzorci su u puferskoj otopini sastava i kiselosti prilagođenoj protutijelu (tablica 3) stajali preko noći na 70°C. Nakon otkrivanja antigena uslijedilo je blokiranje nespecifičnih veznih mjesta 7%-tnim magarećim serumom. Isti magareći serum u 2%-tnom udjelu dodan je i u fosfatni pufer (PBS) s 0,5% Tritona x-100 (Sigma-Aldrich) koji je korišten za inkubaciju primarnim protutijelom.

Proteini ispitivani imunofluorescencijom su molekule GABA-ergičkog sustava, GABA<sub>A</sub> receptor, GAD, i VGAT te CFTR. Popis korištenih protutijela i odgovarajućih metoda otkrivanja antigena su u Tablici 1.

Za prikaz korišteno je primarno monoklonsko mišje protutijelo koje se veže na izvanstaničnu domenu GABA<sub>A</sub>R β2 i β3 lanaca (GABA<sub>A</sub>R, Millipore) u omjeru 1:100, a za

otkrivanje antigena GABA<sub>A</sub>R na parafinskim rezovima korišten je Tris-EDTA pufer s 0,05% Tween 20 (Sigma-Aldrich).

Nakon otkrivanja antigena natrijevim citratnim puferom, pH 6, GAD je prikazana otopinom pročišćenog zečjeg poliklonskog protutijela uzgojenim na C-završetku glutamat-dekarboksilaze 65 (GAD65/67; Millipore), u omjeru 1:500.

Za prikaz VGAT-a, nakon otkrivanja antigena ranije spomenutim Tris-EDTA puferom, upotrijebljeno je pročišćeno zečje poliklonsko protutijelo na N-terminalnu regiju SLC32A1, istoznačnice za VGAT, (engl. *human solute carrier family 32 member 1*, Abcam) otopljeno u PBS-u u omjeru 1:500.

Nakon tretiranja 50 mM natrijevim citratnim puferom uz pH 6, korišteno je mišje monoklonsko protutijelo na prvu izvanstaničnu petlju CFTR-a razrijeđeno u omjeru 1:100 u PBS-u s 2% magarećim serumom.

**Tablica 3. Protutijela korištena u imunohistokemijskom postupku**

Specifičnost	Proizvođač	Serijski broj	Tip	Otkrivanje antigena	Razrjeđenje
<b>Primarna</b>					
GABA <sub>A</sub> R	Merck – Millipore	05-474	Monoklonsko, mišji IgG, anti-ljudsko	Tris-EDTA pufer, pH 9	1:100
GAD	Merck – Millipore	ABN904	Poliklonsko, zečji IgG, anti-ljudsko	10 Mm natrijev citratni pufer (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> ·5 H <sub>2</sub> O), pH 6	1:500
VGAT	Abcam	ab42939	Poliklonsko, zečji IgG, anti-ljudsko	Tris-EDTA pufer, pH 9	1:500
CFTR	Abcam	[CF3] (ab2784)	Monoklonsko, mišji IgG, anti-ljudsko	50 Mm natrijev citratni pufer (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> ·5 H <sub>2</sub> O), pH 6	1:100
<b>Sekundarna</b>					
Mišji IgG	Thermo Fisher Scientific	A11034	Magareći IgG, konjugirano s Alexa Fluor 488		1:500
Zečji IgG	Thermo Fisher Scientific	#7074	Magareći IgG, konjugirano s Alexa Fluor 488		1:500

Najmanji šum u pozadinskom signalu i najbolji signal uočeni su pri inkubaciji s primarnim protutijelom na 4°C preko noći te je takva metoda upotrijebljena u ovim eksperimentima. Nakon inkubacije u otopini primarnog protutijela, stakalca su isprana PBS-om i 2,5 h inkubirana u 1:500 otopini fluorescentno obilježenog sekundarnog protutijela AlexaFlour 488 dye (Thermo Fisher Scientific) uzgojenog u magarcu protiv protutijela zeca ili miša, ovisno o korištenom primarnom protutijelu.

Nakon ispiranja, rezovi su obojeni 40,6-diamidin-20-fenilindoldihidroklorid (DAPI; Roche Diagnostic; 1: 8000 u H<sub>2</sub>O), ponovno isprani i poklopljeni vodenim medijem Fluoromount (Sigma-Aldrich). Budući da je kvantifikacija signala bazirana na intenzitetu fluorescencije svakog pojedinačnog uzorka, kako bi se izbjegla varijabilnost i utjecaj autofluorescencije, za svaki uzorak napravljena je negativna kontrola. Negativna kontrola bila je sljedeći serijski rez histološkog preparata. Rezovi tkiva namijenjeni negativnim kontrolama bili su tretirani na isti način kao i ispitivani uzorci, s razlikom da je u inkubaciji izostavljeno primarno protutijelo.

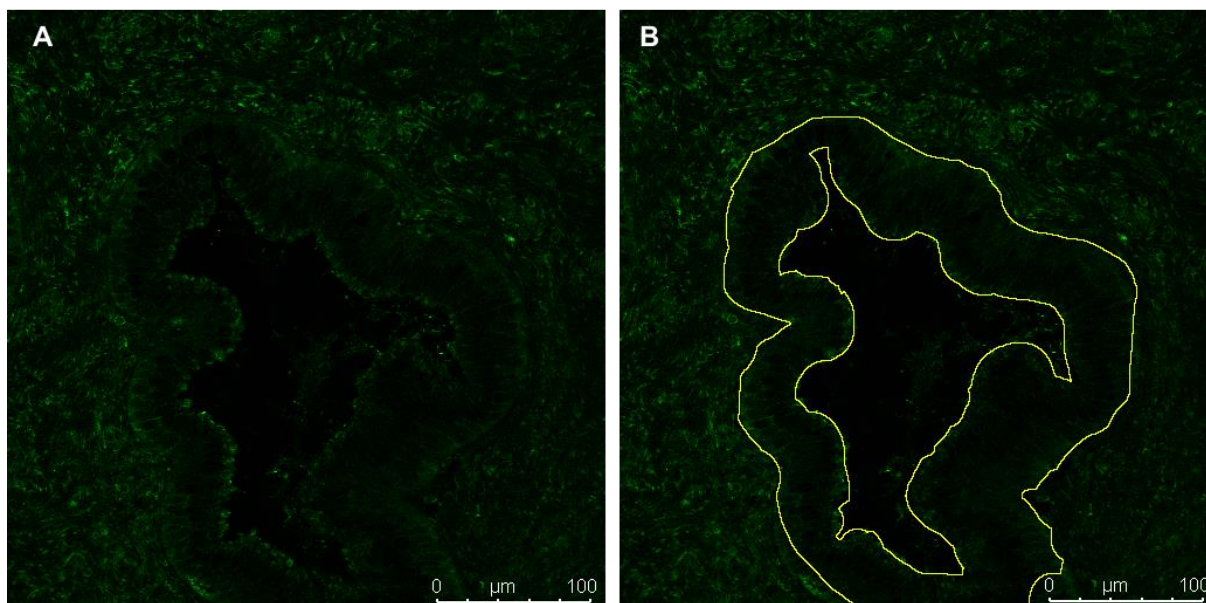
#### **4.3.9. Konfokalna mikroskopija**

Uzorci tkiva pripremljeni postupkom imunohistokemije analizirani su konfokalnom mikroskopijom Leica TCS SP8 (Leica Microsystems), uz pripadajući software LAS X. U ovom istraživanju snimanje uzoraka obojenih fluorescentnom imunohistokemijom je standardizirano i svi uzorci su snimani pod istom jačinom lasera, duljinom ekspozicije, kontrastom i optičkom debljinom. Snimanje je provodio nezavisni znanstvenik mikroskopičar, a sve snimke korištene za kvantifikaciju proteina snimljene su iz prvog pokušaja, radi skraćivanja vremena izlaganja snimanog područja fluorescentnom izvoru svjetlosti. Mikroskopiranje i snimanje provedeno je unutar tjedan dana od izvođenja imunohistokemijskog postupka. Po pojedinačnom preparatu, nasumično je odabrano i dokumentirano 9 područja koja sadržavaju žljezdani epitel, vertikalno presječen. Ova metoda uglavnom je obuhvaćala sav epitel prisutan u uzorku. Sve snimke uzete su pri povećanju 40x, uz 0,75 optičko povećanje pod istim uvjetima ekspozicije, jačine lasera, kontrasta i digitalnog *offseta* kako bi bile međusobno usporedive. Optička debljina reza u svim snimkama iznosila je 1 μm, a obuhvatila je najjači signal u danom preparatu. Fluorescencija je stimulirana laserskom svjetlošću valne duljine 488 nm uz očitavanje signala u zelenom kanalu dobivenom sustavom spektralne difrakcije na prizmi. Snimke nisu digitalno obrađivane prije postupka kvantifikacije. Negativne kontrole snimljene su identičnim postupkom.

#### 4.3.10. Kvantifikacija fluorescentnog imunohistokemijskog bojenja

Fuorescentni signal analiziran je FIJI inačicom programa Image-J (slika 5). Postupak kvantifikacije sastojao se od označavanja epitela kao ROI na svakoj snimci. Zatim bi se izmjerio intenzitet signala na odabranom području i površina tog područja. Kako bi se izračunao težinski intenzitet signala po površini, intenzitet signala pomnožen je s površinom koja mu pripada, a dobiveni umnošci svih 9 područja (9 snimaka) jednog preparata su zbrojeni te podijeljeni zbrojem površina odgovarajućih područja interesa. Postupak je ponovljen za sve uzorke, sva protutijela te negativne kontrole.

Kako bi uzorci bili međusobno usporedivi, negativna kontrola za svaki uzorak kvantificirana je na isti način kao i uzorak te je vrijednost intenziteta njezine fluorescencije, autofluorescencija, oduzeta od vrijednosti intenziteta fluorescencije uzorka.



**Slika 5. Mjerenje intenziteta imunofluorescencije na parafinskom rezu epitela ljudskog endocerviksa. A.** Tkivo ljudskog endocerviksa inkubirano je s mišjim monoklonalnim protutijelom na prvu izvanstaničnu petlju CFTR-a, a zatim sekundarnim protutijelom Alexa Flour 488. **B.** Žutom linijom označen je epitel na slici A, potom je izmjeren intenzitet fluorescencije i površina unutar žute linije.

#### 4.4. Postupci s RNA

##### 4.4.1. Izolacija RNA iz cerviksa

Uzorci tkiva vrata maternice ranije smrznuti u *RNAlater* homogenizirani su štapnim homogenizatorom u 1mL hladnog TRI Reagenta (Ambion, Invitrogen). U epruvetu je dodano



200  $\mu$ L kloroforma i snažno vorteksirano. Nakon vorteksiranja, epruveta je odstajala na sobnoj temperaturi 10 minuta i potom je centrifugirana 15 minuta na 12000 g pri 4 °C. Gornja, vodena faza je odstranjena u čistu, prethodno označenu epruvetu. U epruvetu je zatim dodano 500  $\mu$ L izopropanola, snažno protreseno te ostavljeno na -20°C preko noći. Slijedilo je centrifugiranje na 12000 g, 8 minuta na 4 °C. Izopropanol je odstranjen, a talog ispran s 1 mL 70% etanola i centrifugiran na 7500 g, 5 minuta na 4 °C. Nakon odstranjivanja etanola talog je otopljen u 50  $\mu$ g vode bez RNAza (DEPC voda). Dodatno pročišćavanje izolirane RNA izvedeno je pomoću komercijalnog kita RNeasy Mini Kit (QIAGEN) uz DNazu I iz komercijalnog kita RNase-Free DNase Set (QIAGEN).

#### **4.4.2. Određivanje koncentracije izolirane RNA**

Radi provjere količine i kvalitete izolirane RNA određena je njezina koncentracija pomoću NanoDrop 1000 spektrofotometra, te je očitana koeficijent optičke gustoće (OD, prema engl. *optic density*) 260/280. U daljnjim eksperimentima korištena je RNA čiji je OD bio između 1.80 i 2.10.

#### **4.4.3. Reakcija reverzne transkripcije**

Za reverznu transkripciju korišten je kit TaqMan® HighCapacity RNA-to-cDNA Kit (4374966, Applied Biosystems) s inhibitorom RNaza. Kit se sastoji od pufera za reverznu transkripciju (10X RT Buffer), nasumičnih početnica (10X RT Random Primers), mješavine deoksiribonukleozid-trifosfata (25X dNTPMix), reverzne transkriptaze (MultiScribe® Reverse Transcriptase) i inhibitora RNaza (RNaseInhibitor). Izolirana RNA pojedinačnih uzoraka razrijeđena je prema izmjerenim koncentracijama kako bi ukupno 1  $\mu$ g RNA svakog uzorka ušlo u reakciju. Reverzna transkripcija reakcijske smjese ukupnog volumena 20  $\mu$ L izvedena je u 2720 ThermalCycler (Applied Biosystems) po programu: 25°C 10min; 37°C 120 min; 85°C 5 min; hlađenje na 4°C. Ovako dobivena cDNA pohranjena je na -20°C do korištenja u lančanoj reakciji polimerazom te kvantitativnoj lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu.

#### **4.4.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)**

Lančana reakcija polimerazom (PCR, prema engl. *polymerase chain reaction*) brza je i specifična metoda u kojoj se odabrani odsječci DNA umnažaju u velikom broju kopija. Kao

kalup za umnažanje korištena je cDNA dobivena reakcijom reverzne transkripcije RNA iz vrata maternice. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25  $\mu\text{L}$  sadrži: 200 nmol početnica, 200  $\mu\text{mol}$  smjese nukleotida (dNTP), 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 1X pufer za DNA polimerazu, 1,25 jedinica GoTaq DNA polimeraze (Promega) i 1  $\mu\text{L}$  uzorka cDNA.

Reakcija se odvijala u stroju za lančanu reakciju polimerazom (AppliedBiosystem 2720 ThermalCycler) pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija uzoraka 2 minute na  $95^\circ\text{C}$ , nakon toga slijedi 30 ciklusa koji sadrže denaturaciju (10 sekundi na  $95^\circ\text{C}$ ), lijepljenje početnica na temperaturi ovisnoj o početnicama (tablica 4) i produljivanje lanaca (90 sekundi na  $72^\circ\text{C}$ ), te završna polimerizacija svih nedovršenih lanaca DNA, 7 minuta na  $72^\circ\text{C}$ . Za  $\text{GABA}_A$  receptor dizajnirane su početnice za šest tipova  $\alpha$  podjedinica (GABRA1, GABRA2, GABRA3, GABRA4, GABRA5, GABRA6), tri  $\beta$  podjedinice (GABRB1, GABRB2, GABRB3), tri  $\gamma$  (GABRG1, GABRG2, GABRG3) te  $\delta$  (GABRD),  $\epsilon$  (GABRE),  $\pi$  (GABRP) i  $\theta$  (GABRQ) podjedinice. Kao dio GABA-ergičkog sustava ispitana je prisutnost RNA molekule GAD65/67, dok je za umnažanje glasničke RNA VGAT-a koristeći dvije početnice izveden tzv. ugnježđeni PCR (engl. *nested PCR*). Prvi PCR proveden je s cDNA iz tkiva endocerviksa, dok je u drugom ona zamijenjena produktom prve reakcije lančanom polimerazom (2 mL svakog) na višoj temperaturi i s obje početnice smještene unutar početnica korištenih u prvoj reakciji (tablica 4).

Početnice su dizajnirane iz slijeda nukleotida ispitivanih mRNA, preuzetog s internetske stranice Nacionalnog centra za informacije o biotehnologiji Nacionalne knjižnice medicine Sjedinjenih Država, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Identifikacija korištenih sekvenci nalazi se u tablici 4. Dizajnirane su koristeći program Primer3web, inačica 4.1.0, dostupan na internetskoj stranici <http://primer3.ut.ee/>. Svi parovi početnica, osim prvog para početnica za VGAT, dizajnirani su kako bi obuhvatili mjesta spajanja introna i time bili neučinkoviti u umnažanju genomske DNA (gDNA). Iz ovog razloga genomska je DNA korištena kao negativna kontrola.

**Tablica 4. Oligonukleotidne početnice korištene u PCR reakciji za dokazivanje prisutnosti RNA u ljudskom endocervikalnom tkivu**

<b>Gen</b>	<b>Referentna sekvenca GenBank</b>	<b>Početnica (50–30)</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Veličina produkta (bp)</b>
GABRA1	NM_000806.5	TGAGCATCAGTGCCAGAAAC TTGCTGTTGGAGCGTAAGTG	58	231
GABRA2	NM_000807.3	CCAATCAATCGGAAAGGAGA GGAGAGAATTCCGAGCACTG	54	248
GABRA3	NM_000808.3	ATTCTCCCTGGAACCACTGG CAGTCACTGCATCTCCAAGC	58	211
GABRA4	NM_001204267.1	GCCCCATTGAAATTTTGAGA GGACACTCCGCACTTATGGT	54	159
GABRA5	NM_000810.3	TGACAGCTCACTTCCACCTG ACACGGCTATGAACCAGTCC	58	240
GABRA6	NM_000811.2	CACAGAAGGCCAAAAGGAAG TTTATTGGCCTCGGAAGATG	58	173
GABRB1	NM_000812.3	TCCTGGCTCTGCTGGAGTAT AGGAGTACATGGTGGCCTTG	58	237
GABRB2	NM_000813.2	GCACCTTGGAATTGAGAGC CTGGGATAGGAACCTGTGGA	53	172
GABRB3	NM_000814.5	CTTGACAATCGAGTGGCTGA TCATCCGTGGTGTAGCCATA	54	242
GABRG1	NM_173536.3	AGGGGTGAGGTTGGTCTTCT TACTGTGGGCCCTCACTCCT	60	212
GABRG2	NM_198903.2	GATGCACACTGGATCACCAC GGCAATAGAACGAGACCAA	58	245
GABRG3	NM_033223.4	ACTGGATCACCACACCCAAT CTGATAAAGCCGCCATGATT	58	236
GABRD	NM_000815.4	AACGCCGACTACAGGAAGAA TGTAGGAGCCCATCAGGTTC	60	175
GABRE	NM_004961.3	TCTGTTGGAGTTTGCTGTGC CCATCACTTCCCTCAGTGGT	58	189
GABRP	NM_014211.2	GGAGTTCACCTGGCTGAGAG TCCTCCGAAGCTCAAACCTGT	58	158
GABRQ	NM_018558.3	GCTCCCCAACATTTCTGTGA GAGCTGACTCCGTCTTCCAC	60	240
GAD67	NM_000817.2	CTCAACGGCATAGAAAGGGC CACTGAATTGCCTTGTCCCC	54	197
VGAT (SLC32A1) (prvi PCR)	NM_080552.2	AACAAGTCCCAGGCCAAGAT GCGGCCGAAGATGATGAGAAA	54	416
VGAT (SLC32A1) (drugi PCR)	NM_080552.2	CGAGGGAGACATCCATTATCA AGAAACAACCCCAGGTAGCC	57	216
CFTR	NM_000492.3	ATGGGAGAAGTGGAGCCTTC CTCGTTGACCTCCACTCAGT	58	247

#### 4.4.5. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu

Rezultati lančane reakcije polimerazom provjereni su elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Za pripravu gela, agaroz (Promega) je pomiješana s puferom za elektroforezu (89 mM Tris-HCl, 89 mM borna kiselina, 2 mM / EDTA, pH 8.0). Nakon zagrijavanja u mikrovalnoj pećnici, smjesa je ohlađena na 50 °C, te joj je dodano 10 µL boje za prikazivanje nukleinskih kiselina na gelu GelRed (Biotium). Nakon polimerizacije na gel su naneseni uzorci DNA te se elektroforeza odvijala pod naponom 10-15 mV/cm gela.

#### 4.4.6. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Uz pomoć komercijalnog kita, tzv. *Master Mix-a* (TF-TAQMAN GEX MMIX, 4369514), probe koja odgovara genu kojeg ispituje i referentnog gena (engl. *reference* ili *housekeeping gene*), slijedeći MIQE smjernice određena je razina pojavnosti ispitivanih gena (82). Metoda koja je korištena za kvantifikaciju RNA u tkivu humanog endocerviksa (tzv. Taqman metoda) temelji se na specifičnom vezivanju fluorogene sonde za ciljnu molekulu i kvantifikaciji fluorescentnog signala. Korištene su komercijalno dizajnirane probe TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) (tablica 5) za koje proizvođač jamči stopostotnu amplifikaciju. Svi su geni navedeni prema službenim simbolima Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (*NCBI*, engl. *National Center for Biotechnology Information*).

**Tablica 5. Popis TaqMan® proba izražaja gena na razini mRNA u komercijalno dostupnom priboru TaqMan® High Capacity RNA-to-cDNA Kit.**

Identifikacijska oznaka gena	Ime gena	Identifikacijska oznaka testa	Referentna sekvenca GenBank NCBI-a
EEF1A1	Eukariotski translacijski faktor elongacije 1 alfa 1	Hs00265885_g1	NM_001402.5
GABRA1	Podjedinica alfa 1 receptora gama-aminomaslačne kiseline A	Hs00971228_m1	NM_000806.5
GAD1	Glutamat-dehidrogenaza	Hs01065893_m1	NM_000817.2
SIC32A1	Vezikularni transporter gama amino-maslačne kiseline	Hs00369773_m1	NM_080552.2
CFTR	Transmembranski regulator cistične fibroze	Hs00357011_m1	NM_000492.3
VAMP8	Membranski protein povezan s vezikulama 8	Hs00186809_m1	NM_003761.4

Ovim se probama izbjegava nespecifična fluorescencija te su geni međusobno usporedivi zbog podjednake, potpune, amplifikacije. Rezultati usporedbe izražaja mRNA i proteina prikazani su  $\Delta C_t$  metodom.  $\Delta C_t$  metodom znači kako je svaki pojedinačni uzorak relativiziran korištenjem unutarnje kontrole, referentnog gena EEA1F1, nakon čega ih je moguće međusobno usporediti prema broju ciklusa u kojem se pojavljuje izražaj njihove mRNA za CFTR.

Prema uputama proizvođača za jedan uzorak nanosi se: 9  $\mu$ L otopine cDNA (1  $\mu$ L cDNA + 8  $\mu$ L depc H 2 O), 1  $\mu$ L Taqman probe te 10  $\mu$ L Taqman Master Mixa (TF-TAQMAN GEX MMIX, 4369514). Ispitivani uzorci u triplikatu se nanose u pločice s 96 jažica (FG-TCII REACTION PLT-96 WELL, 4306737) u volumenu od 20  $\mu$ L po jažici. RT-PCR izveden je pomoću stroja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) u 45 ciklusa.

Očitani su kvantifikacijski ciklusi ( $C_q$ ), prethodno poznati kao ciklus praga ( $C_t$ ) za ispitivane, ciljne gene i referentne gene koji služe za normalizaciju rezultata. Izračunata je razlika u  $C_q$  vrijednostima ( $\Delta C_q$ ) između ciljnog gena i referentnog gena, a  $\Delta C_q$ -ovi različitih uzoraka sa serumskom koncentracijom estradiola uspoređeni su izravno. Kod usporedbe dvaju gena korištena je metoda relativne kvantifikacije po Livaku (83).

#### **4.4.7. Odabir referentnih gena za qPCR**

Normalizacija u tumačenju rezultata qPCR-a podrazumijeva usporedbu izmjerenog izražaja ciljnog gena s izmjerenim izražajem referentnog gena, unutarnje kontrole, kako bi se ujednačile razlike do kojih može doći zbog varijacija u uzorcima cDNA, dobivenih izolacijom RNA i reverznom transkripcijom, te neujednačene učinkovitosti amplifikacije. Na taj način moguće je međusobno uspoređivati rezultate dobivene iz različitih uzoraka. Upotreba referentnih gena najčešće je prihvaćena kao najprikladnija strategija normalizacije, no njihova korisnost za određena tkiva ili vrste stanica i specifični eksperimentalni dizajn mora biti eksperimentalno potvrđena (82). Iako je GAPDH najčešće korišten referentni gen u literaturi, postoje dokazi kako on nije dobar izbor za kvantifikaciju izražaja gena u endocerviksu, jer nema stabilnu ekspresiju u tom tkivu. Naime, da bi neki gen mogao biti upotrijebljen kao unutarnja kontrola, on mora imati stabilnu ekspresiju unutar ispitivanog tkiva. Gen koji je odabran za ovo istraživanje, eukariotski translacijski faktor elongacije alfa 1 (EEF1A1, prema

engl. *Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha* ) pokazuje stabilnu ekspresiju unutar cerviksa, kako kod zdravih tako i kod cerviksa s karcinomatозnim promjenama (84,85).

#### **4.5. Statistička analiza**

Za statističku analizu upotrijebljeni su SPSS verzija 25 i RStudio 1.1. Za grafičke prikaze korišten je RStudio 1.1. Normalnost podataka testirana je testom Shapiro-Wilk. Razlike između kvantitativnih varijabli analizirane su korištenjem t-testa ili Mann Whitney U testa, kako je bilo prikladno. Kontinuirane varijable prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, osim ako nije naglašeno drukčije. Kvalitativne varijable prikazane su kao broj i odgovarajući postotak, osim ako nije naznačeno drugačije. Procjene korelacija između kvantitativnih varijabli vršene su Pearsonovom i Spearmanovom metodom. Ponegdje je za uporabu Pearsonovog testa korelacije bila potrebna normalizacija podataka logaritamskom transformacijom numeričke varijable, što je naglašeno posebno. Svi statistički testovi korišteni u ovom radu bili su dvostrani. U svim inferencijalnim statističkim testovima, p vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Podjela pacijentica u skupine prema fazi ženskog mjesečnog spolnog ciklusa

Pacijenticama je na osnovi izmjerenih koncentracija estradiola i progesterona u serumu određena faza ženskog mjesečnog spolnog ciklusa, te su na temelju toga podijeljene u dvije skupine: skupina pacijentica u folikularnoj fazi i skupina pacijentica u luteinskoj fazi spolnog ciklusa (Tablica 6). Analizom serumskih vrijednosti u nekih su pacijentica pronađene postmenopauzalne vrijednosti hormona te su isključene iz daljnjeg istraživanja, a u jednom je slučaju došlo do zgrušavanja krvi te vrijednosti hormona nisu mogle biti određene. Od preostalih 18 uzoraka 10 uzoraka pripadalo je folikularnoj fazi ciklusa, a 8 uzoraka luteinskoj fazi.

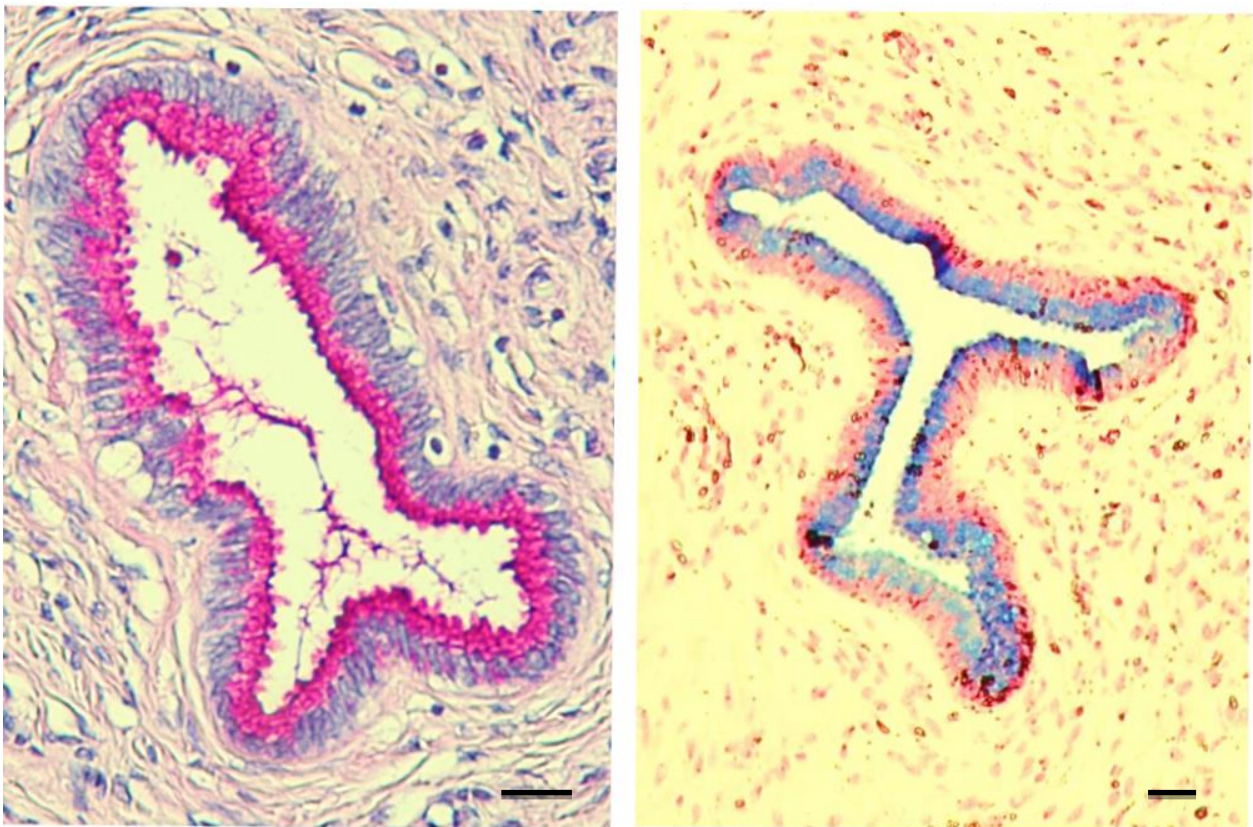
**Tablica 6. Raspodjela pacijentica po fazama ženskog mjesečnog spolnog ciklusa s pripadajućim izmjerenim koncentracijama estrogena i progesterona u serumu**

<b>Redni broj pacijentice</b>	<b>Estradiol (pmol/L)</b>	<b>Progesteron (nmol/L)</b>	<b>Određena faza ciklusa</b>
1	24,76	0,31	folikularna
2	35,64	0,16	folikularna
3	159,14	0,22	folikularna
4	112,62	0,22	folikularna
5	134,66	0,19	folikularna
6	64,74	0,19	folikularna
7	135,47	0,13	folikularna
8	346,57	0,22	folikularna
9	431,72	0,19	folikularna
10	397,17	0,41	folikularna
11	229,05	0,47	luteinska
12	157,78	8,02	luteinska
13	60,39	1,57	luteinska
14	74,27	1,95	luteinska
15	41,35	2,01	luteinska
16	44,89	2,45	luteinska
17	105,28	4,28	luteinska
18	74,27	12,42	luteinska

## 5.2. Žljezdana aktivnost endocerviksa

### 5.2.1. Prisutnost žljezdanog epitela i mucina u uzorcima tkiva

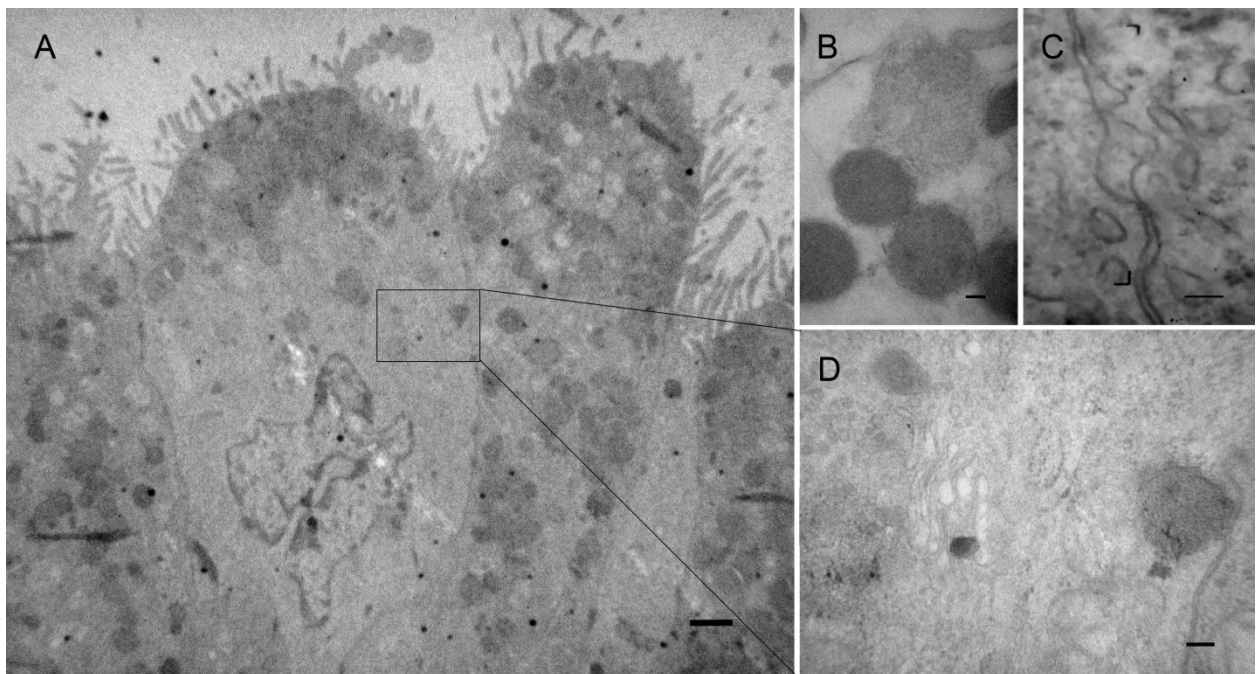
U svrhu provjere mogu li odabrani uzorci tkiva cerviksa poslužiti za analizu izražaja ispitivanih proteina, napravljena je histološka i histokemijska analiza tkiva. Histološka analiza tkiva potvrdila je prisutnost jednoslojnog cilindričnog žljezdanog epitela na površini endocerviksa i u endocervikalnim kriptama, okruženog gustim neformiranim vezivnim tkivom. Histokemijsko bojenje AB potvrdilo je postojanje neutralnih mucina, a PAS reakcija pokazala je prisutnost kiselih mucina. Ovime je potvrđena sekrecijska aktivnost endocervikalnog žljezdanog epitela u trenutku biopsije, a time i mogućnost analize histoloških preparata tkiva endocerviksa za ispitivanje izlučivanja cervikalne sluzi (slika 6).



Slika 6. Žljezdani epitel ljudskog endocerviksa proizvodi kisele (PAS pozitivne) i neutralne (AB pozitivne) mucine. A. PAS (crveno) obojena zrnca mucina. B AB (plavo) obojena zrnca mucina. Veličina crte mjerila: 20  $\mu$ m



Elektronsko-mikroskopska analiza sekrecijskih stanica na površini endocerviksa i u endocervikalnim kriptama pacijentice u kasnoj folikularnoj fazi ženskog mjesečnog spolnog ciklusa (estradiol = 159,14 pmol/L, progesteron = 0,22 nmol/L) pokazala je prisutnost sekrecijskih zrnaca u različitim fazama sazrijevanja i sekrecije ukazujući na aktivnu sekreciju u tom epitelu (slika 7A i 7B). Vidljivo je kako su stanice međusobno različitog oblika, s različitim rasporedom i udjelom pojedinih tipova sekrecijskih mjehurića. Dodatna analiza ultrastrukture sekrecijskih stanica pokazala je prisutnost mnoštva organela koje sudjeluju u sintezi glikoproteina, prije svega hrapave i glatke endoplazmatske mrežice, Golgijevog tjelešca i prijenosnih mjehurića (slika 7 D). Također, uočena su obilna uvrnuća staničnih membrana na lateralnim površinama stanica (slika 7 C). Ta se uvrnuća na nekim mjestima šire i čini se da se nadovezuju na sustav unutarstaničnih membranskih struktura i mjehurića.



**Slika 7. Elektronsko-mikroskopske snimke sekrecijskih stanica u endocerviksu.** **A.** Sekrecijske stanice s različitim rasporedom i udjelom pojedinih tipova sekrecijskih mjehurića u apikalnom dijelu stanice. **B.** Tamni sekrecijski mjehurići ispunjeni gusto pakiranom sluzi i svjetliji mjehurić u trenutku egzocitoze sada već djelomično raširenih molekula mucina. **C.** Uvrnuća lateralnih membrana stanica koja se nadovezuju na unutarstanične membranske strukture. **D.** Povećano područje iz slike A: Golgijevo tjelešce i bogata hrapava i glatka endoplazmatska mrežica. Veličina crte mjerila: u A 1 µm, u B, C i D 100 nm.

## 5.2.2. Kvantifikacija proizvodnje mucina u žljezdanom epitelu endocerviksa i korelacija proizvodnje mucina i faze ciklusa

Kako bi se utvrdilo slijede li odabrani uzorci već pokazanu korelaciju proizvodnje mucina i razine spolnih hormona, odnosno faze ciklusa, izmjeren je intenzitet proizvodnje mucina i stavljen u korelaciju s izmjerenim razinama hormona u krvi pacijentica, te s fazama ciklusa po kojima su pacijentice grupirane u skupine (tablica 3). Prosječni udio ukupnog epitela obojenog histokemijskim postupcima AB i PAS u folikularnoj fazi iznosio je  $69,23 \pm 9,87$ , a u luteinskoj fazi  $55,65 \pm 16,88$ , uz  $p = 0,058$ ). Usporedba intenziteta proizvodnje mucina između dvije skupine pacijentica grupirane prema fazi ciklusa pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika u proizvodnji sluzi među navedenim skupinama (tablica 7).

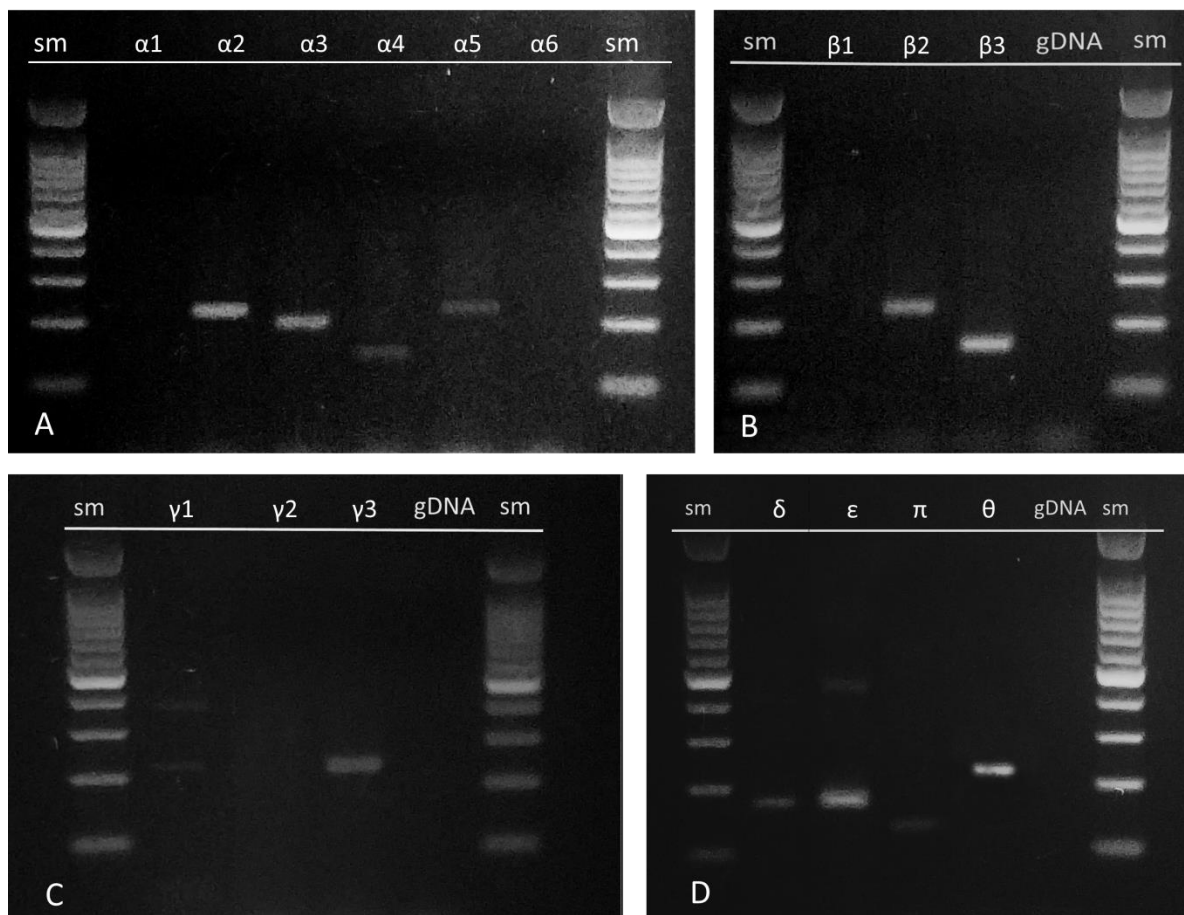
**Tablica 7. Udio epitelne površine obojene postupcima AB i PAS**

		Aritmetička sredina	SD	Medijan	Minimum	Maksimum	Raspon	p <sup>a</sup>
% epitela obojen AB	Folikularna faza	56,25	19,68	53,42	23,89	8,31	63,43	0,269
	Luteinska faza	46,14	16,13	46,72	24,08	72,95	48,87	
% epitela obojen PAS	Folikularna faza	82,22	15,31	90,00	51,42	100,00	48,58	0,115
	Luteinska faza	65,15	25,97	67,74	25,00	96,00	71,00	
% ukupno obojenog	Folikularna faza	69,23	9,87	66,37	58,31	88,66	30,35	0,058
	Luteinska faza	55,65	16,88	56,67	26,75	84,48	57,72	

### 5.3. GABA-ergički sustav

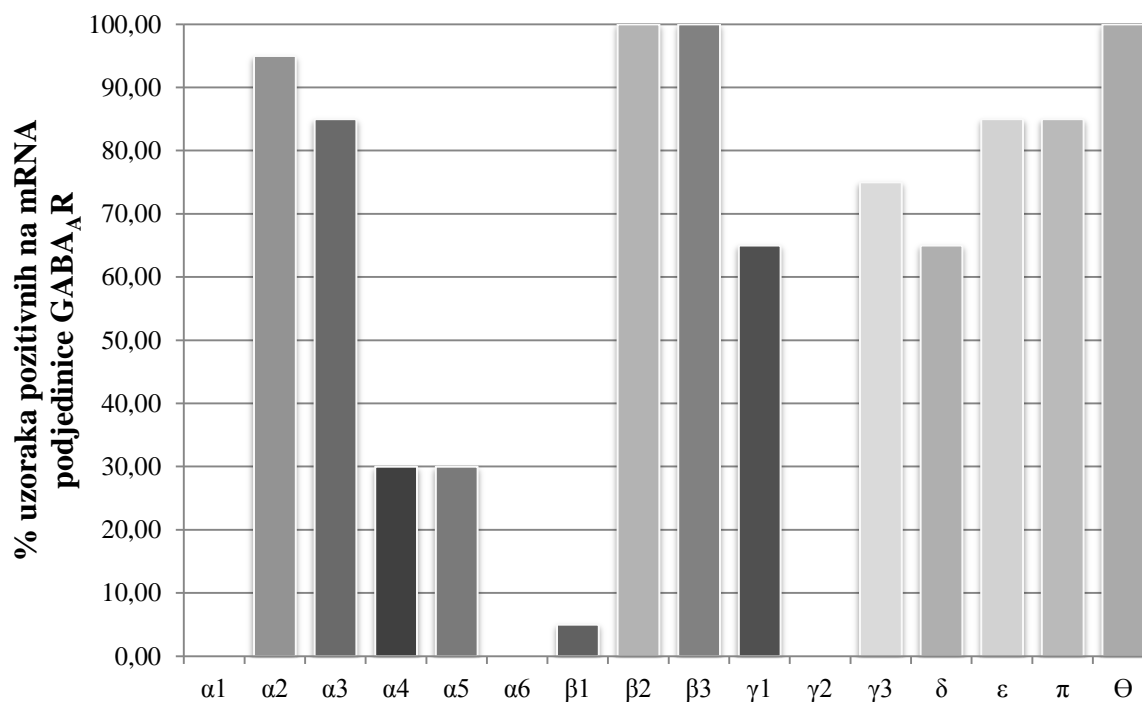
#### 5.3.1. Zastupljenost podjedinica GABA<sub>A</sub>R u ljudskom endocerviksu

U svrhu provjere nalaze li se u endocervikalnom tkivu podjedinice GABA<sub>A</sub>R koje bi potvrdile postojanje funkcionalnog GABA receptora, provedena je analiza prisutnosti podjedinica GABA<sub>A</sub>R RT-PCR-om. Rezultati ovog ispitivanja pokazali su kako su podjedinice GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$  1-6,  $\gamma$  1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  prisutne s različitom učestalošću u uzorcima tkiva endocerviksa (slika 8). U najvišem postotku (100%), prisutne su podjedinice  $\beta$  2,  $\beta$  3 te  $\theta$ , a slijede  $\alpha$  2,  $\epsilon$  i  $\pi$  s prisutnošću u 85% cerviksa. 75% uzoraka cerviksa izražava podjedinicu  $\gamma$  3, 65% podjedinice  $\gamma$  1 i  $\delta$ . Podjedinice  $\alpha$  4 i 5 pojavljuju se u 30% uzoraka.  $\beta$ 1 prisutna je samo u 5% uzoraka, dok se  $\alpha$  1 i  $\alpha$  6, kao ni  $\gamma$  2 ne pojavljuju niti u jednom ispitivanom uzorku tkiva endocerviksa (slika 9).



**Slika 8. Primjer prikaza prisutnosti mRNA podjedinica GABA<sub>A</sub>R ( $\alpha$  1-6,  $\gamma$  1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$  i  $\pi$ ) u jednom uzorku endocerviksa ispitanih postupkom RT-PCR. A. Podjedinice  $\alpha$  1-6.  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5 prisutne su u tkivu ljudskog endocerviksa, a  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 6 nisu. B.  $\beta$ 2 i  $\beta$ 3 prisutne su tkivu ljudskog endocerviksa, a  $\beta$ 1 nije. C. Podjedinice  $\gamma$  1-3.  $\gamma$ 1 i  $\gamma$ 3 su prisutne, a  $\gamma$ 2 nije. D. Podjedinice  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  i  $\theta$  su prisutne u tkivu ljudskog endocerviksa. gDNA je korištena kao negativna kontrola. sm – ljestvica veličine po 100 parova baza, s najintenzivnijom prugom na**

500pb. Očekivane veličine PCR produkta izražene u parovima baza su:  $\alpha 1 - \alpha 6$ : 231, 248, 211, 159, 240, 173;  $\beta 1 - \beta 3$ : 237, 172, 242;  $\gamma 1 - \gamma 3$ : 212, 245, 236;  $\delta - \theta$ : 175, 189, 158, 240.

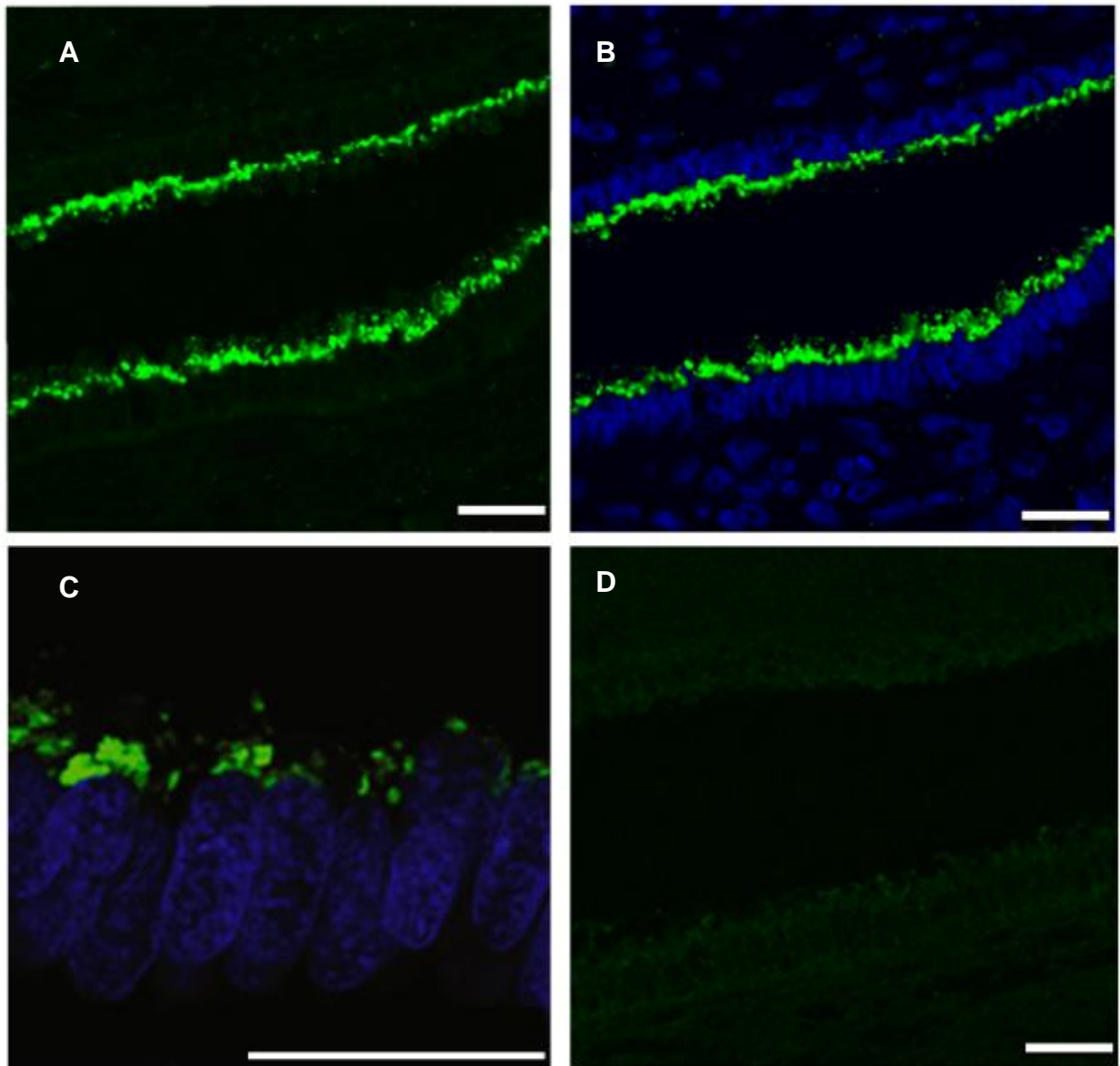


**Slika 9. Prisutnost mRNA pojedinačnih podjedinica GABA<sub>A</sub>R u ljudskom endocervikalnom tkivu.** Podjedinice GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 1-6$ ,  $\beta 1-3$ ,  $\gamma 1-3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  i  $\theta$  prisutne su u tkivu s različitom učestalošću. Nisu prisutne podjedinice  $\alpha 1$  i  $\alpha 6$ , kao ni  $\gamma 2$ .

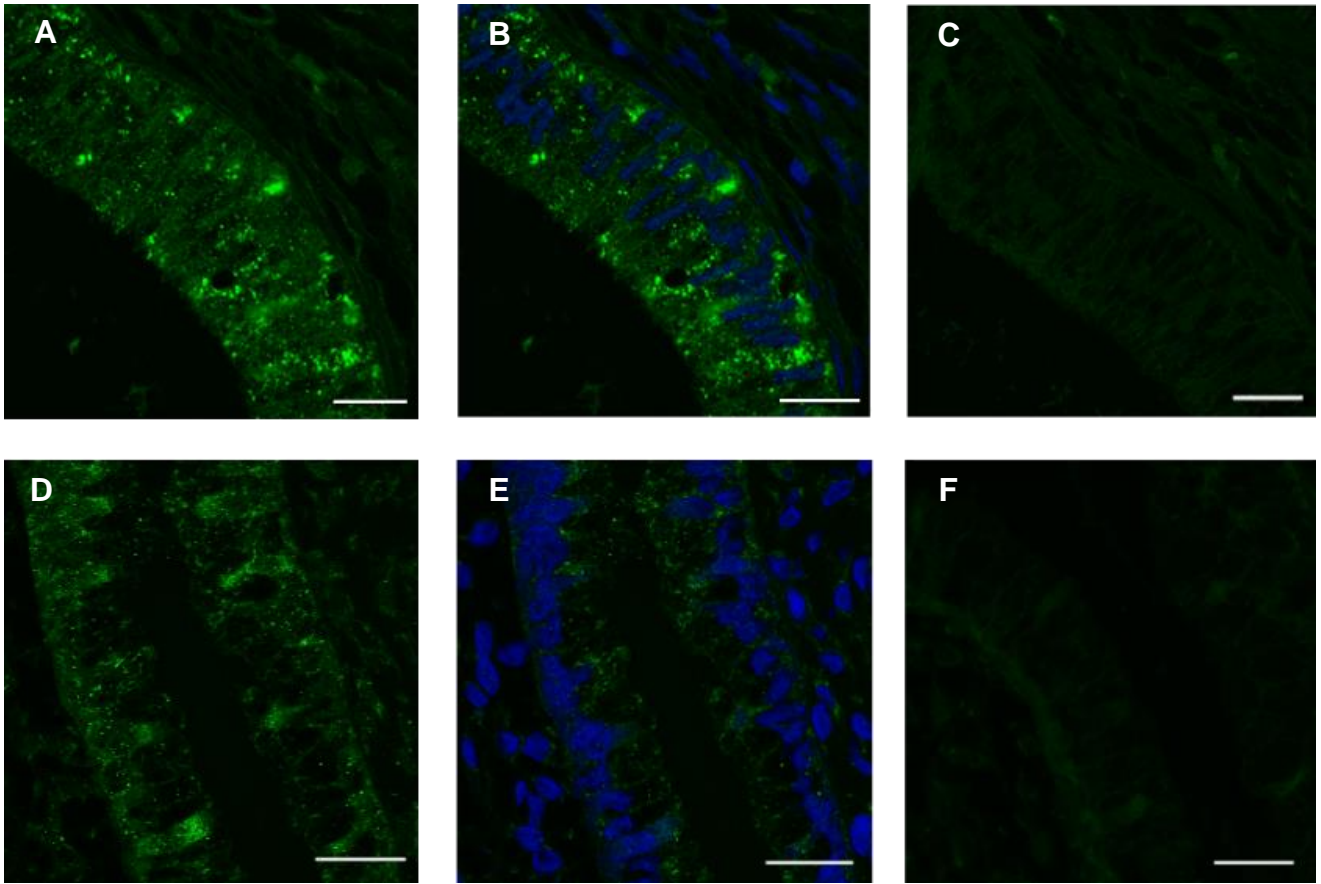
### 5.3.2. Smještaj molekula GABA-ergičkog sustava u tkivu humanog endocerviksa

Kako bi se, nakon dokazane mRNA molekula GABA-ergičkog sustava potvrdila njihova prisutnost na razini proteina te ispitaio njihov smještaj unutar tkiva, analizirane su snimke fluorescentne imunohistokemijske reakcije na antigene GABA<sub>A</sub>R, VGAT-a i GAD-a dobivene konfokalnim mikroskopom. Ova analiza potvrdila je prisutnost GABA<sub>A</sub>R i pokazala njegov smještaj unutar tkiva endocerviksa (slika 10). Anti-GABA<sub>A</sub>R pozitivan signal vidljiv je kao nakupina fluorescentnih točaka, uvijek na istoj visini unutar cilindričnih epitelnih stanica, u apikalnoj trećini stanica. Pri jačem povećanju jasno se vidi supranuklearni smještaj fluorescentnog signala gdje GABA<sub>A</sub>R izgleda kao da priliježe na jezgru (slika 10 C). To je područje ispod apikalne nakupine sekrecijskih zrnaca ispunjenih mucinima, a bogato je membranskim strukturama kao što su Golgijevo tjelešce, glatka i hrapava endoplazmatska mrežica, te uvrnuća lateralnih staničnih membrana (slika 7).

Snimka fluorescentne imunohistokemijske reakcije na antigen GAD65/67-a prikazuje točkaste nakupine ovog proteina kroz cijelu stanicu (slika 11 A i 11 B). Fluorescentna imunohistokemijska reakcija s anti-VGAT protutijelom pokazala je difuznu raspodjelu ovog proteina u epitelu ljudskog endocervika. (slika 11 D i 11 E).



**Slika 10. Snimka imunohistokemijskom reakcijom označenog GABA<sub>A</sub>R u žljezdanom epitelu ljudskog endocerviksa. A. Snimka samo fluorescentno zeleno označenog GABA<sub>A</sub>R. B. Snimka kao u A s dodatno prikazanim plavo obojenim jezgrama(DAPI). C. Snimka kao u B pri jačem povećanju. D. Negativna kontrola. Veličina crte mjerila: 25μm**



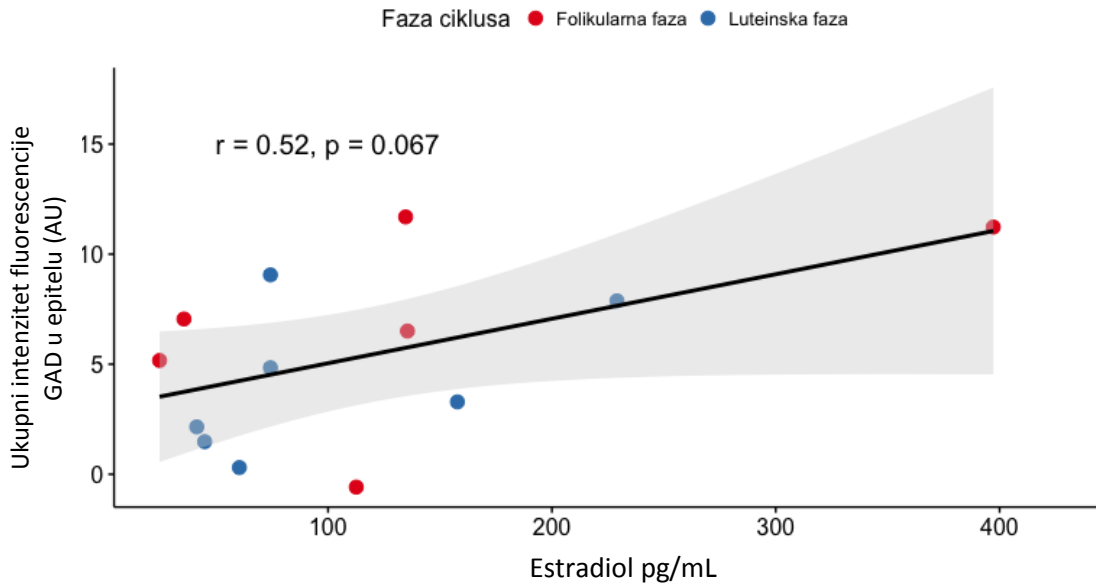
**Slika 11.** Prikaz imunohistokemijskom reakcijom označenih GAD i VGAT u tkivu ljudskog endocerviksa. **A.** fluorescentno zeleno označeni GAD. **B.** fluorescentno zeleno obilježen GAD, jezgre označene plavom bojom (DAPI). **D.** fluorescentno zeleno obilježen VGAT. **E.** fluorescentno zeleno obilježen VGAT, jezgre označene plavom bojom (DAPI). **C i F.** Negativne kontrole. Veličina crte mjerila: 25 $\mu$ m

### 5.3.3. Kvantifikacija izražaja proteina GAD u žljezdanom epitelu endocerviksa i usporedba s razinama spolnih hormona u serumu

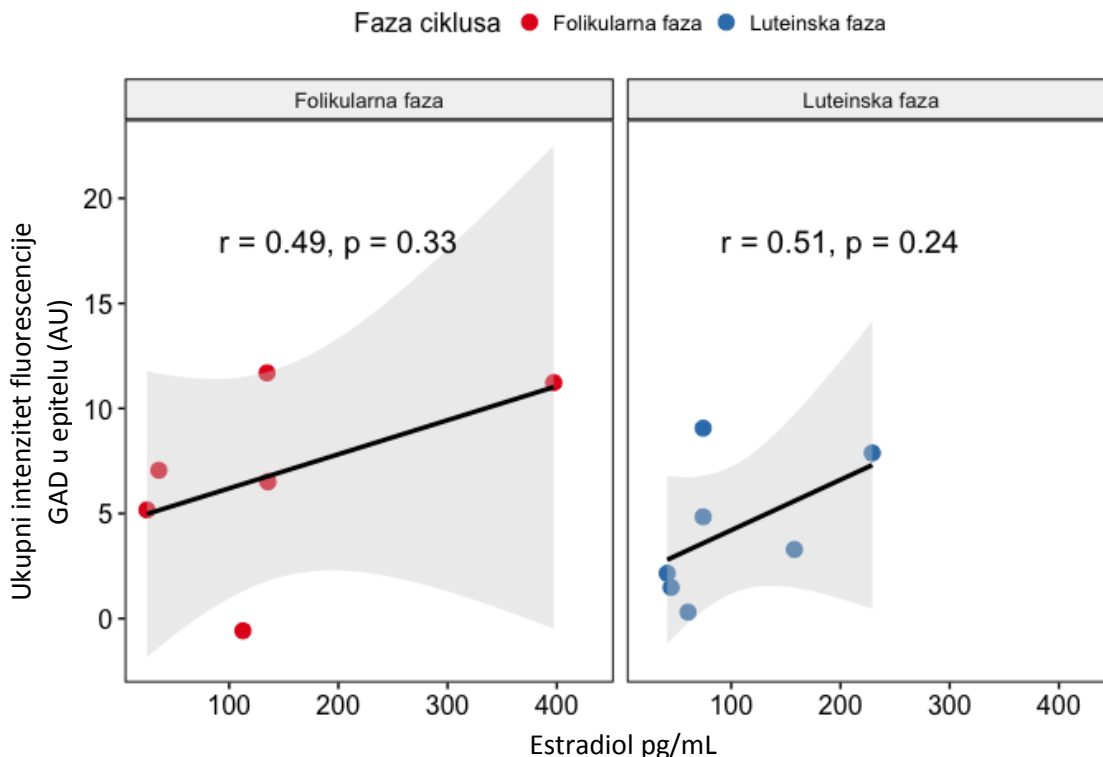
S ciljem ispitivanja povezanosti razine hormona u krvi i izražaja proteina GAD u epitelu ljudskog endocerviksa, kvantificiran je intenzitet fluorescencije imunohistokemijske reakcije protutijela na antigen proteina GAD u epitelu uzoraka tkiva i prikazan kao intenzitet fluorescencije po površini mjerenog epitela mjeren u proizvoljnim jedinicama (AU, prema engl. *arbitrary units*). Kako bi se utvrdio odnos između koncentracije estradiola u serumu (pg/mL) te ukupnog intenziteta fluorescencije GAD-a (AU) u epitelu, izveden je Spearmanov test (slika 12). Nije pronađena statistički značajna povezanost ( $r=0.52$ ,  $n=13$ ,  $p=0,067$ ).

Kako bi se utjecaj estrogena sagledao neovisno o utjecaju progesterona, odvojeno je izračunata povezanost izražaja GAD-a (AU) sa serumskim estradiolom (pg/mL) za svaku skupinu pacijentica podijeljenih prema fazama ženskog mjesečnog spolnog ciklusa (slika 13). Nije pronađena statistički značajna korelacija niti u folikularnoj fazi ( $r=0.49$ ,  $n=6$ ,  $p=0,33$ ), niti u luteinskoj fazi ženskog mjesečnog spolnog ciklusa ( $r=0.51$ ,  $n=7$ ,  $p=0,24$ ).  $\beta$  testa iznosi 0,47. Ovi rezultati govore kako izražaj GAD, molekule zadužene za sintezu GABA-e nije ovisan o razinama estradiola niti progesterona u serumu.





**Slika 12. Grafički prikaz Spearmanovog testa odnosa koncentracije estradiola u serumu (pg/mL) te ukupnog intenziteta fluorescencije GAD-a u epitelu (AU).** Uzorci su označeni crvenom i plavom bojom ovisno o fazi ženskog mjesečnog spolnog ciklusa, prema legendi na slici. Korelacija nije statistički značajna ( $r=0.52, n=13, p=0,067$ ). Sivo područje na grafu predstavlja interval pouzdanosti.



**Slika 13. Grafički prikaz Spearmanovog testa odnosa koncentracije estradiola u serumu (pg/mL) te ukupnog intenziteta fluorescencije GAD-a (AU) u epitelu uzoraka tkiva podijeljenih u dvije skupine prema fazi ciklusa.** Crvene točke označuju uzorke u folikularnoj fazi ( $r=0.49, n=6, p=0,33$ ), a plave u luteinskoj fazi ciklusa ( $r=0.51, n=7, p=0,24$ ). Rezultat nije statistički značajan. Sivo područje predstavlja interval pouzdanosti

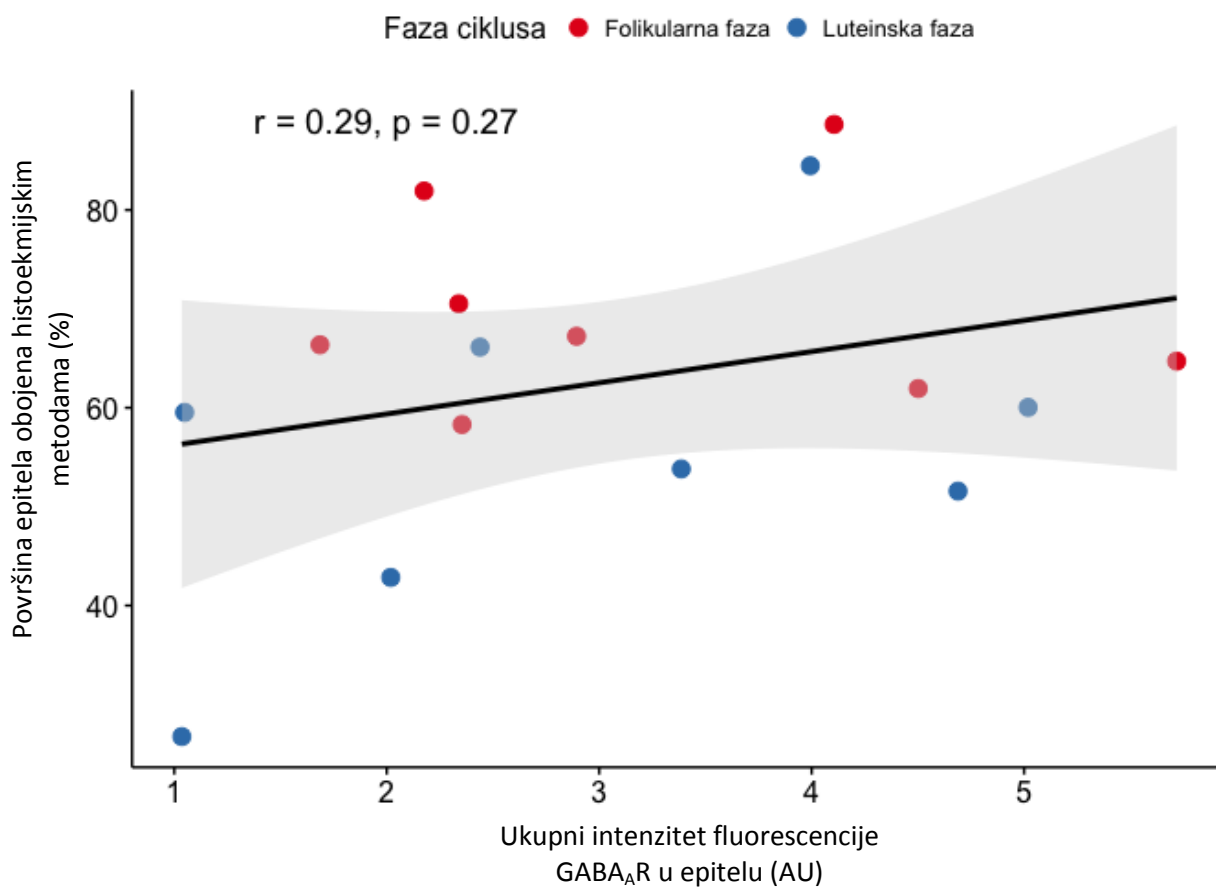
### **5.3.4. Kvantifikacija izražaja proteina GABA<sub>A</sub>R u žljezdanom epitelu endocerviksa i usporedba s razinama spolnih hormona u serumu**

Kako bi se utvrdio odnos između koncentracije estradiola u serumu (pg/mL) te ukupnog intenziteta fluorescencije GABA<sub>A</sub>R-a (AU) u epitelu ljudskog endocerviksa izveden je Spearmanov test (slika 14). Rezultat testa pokazao je da ne postoji statistički značajna korelacija ( $r=-0.056$ ,  $n=14$ ,  $p=0,84$ ). B vrijednost testa iznosi 0,15.

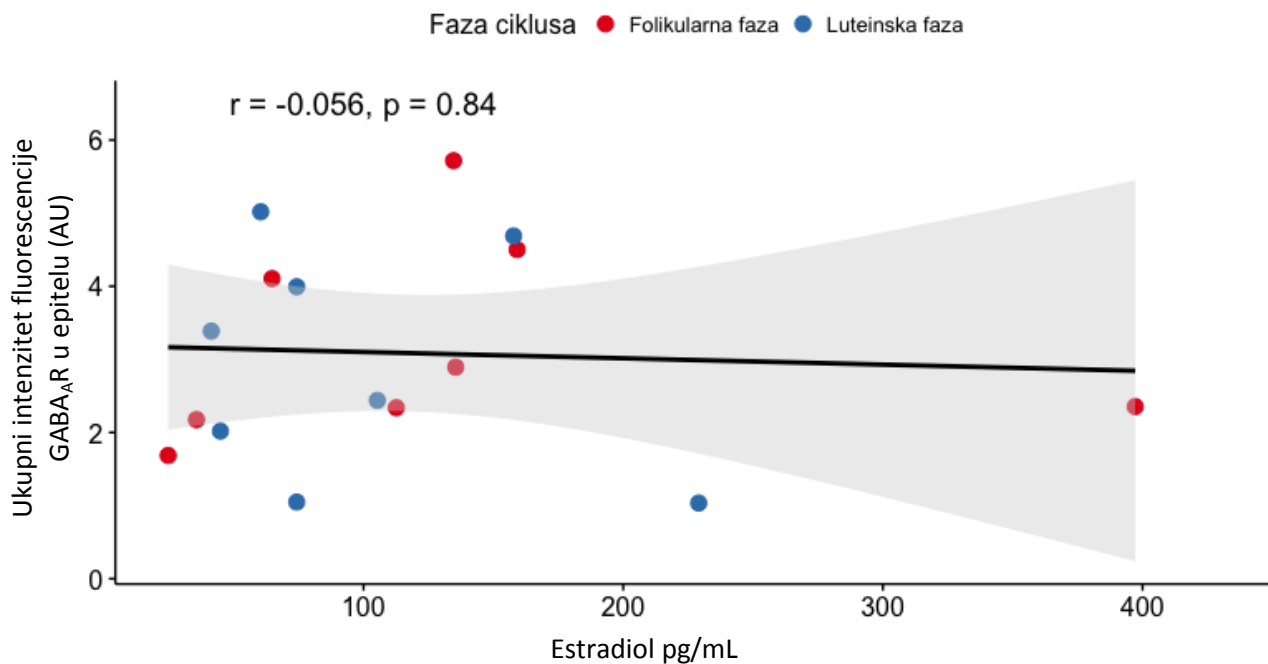
Kako bi se utjecaj estrogena sagledao neovisno o utjecaju progesterona, odvojeno je izračunata povezanost izražaja GABA<sub>A</sub>R-a (AU) sa serumskim estradiolom (pg/mL) za svaku skupinu pacijentica podijeljenih prema fazama ženskog mjesečnog spolnog ciklusa (slika 15). Nije pronađena statistički značajna korelacija u folikularnoj fazi ( $r=0.029$ ,  $n=8$ ,  $p=0,95$ ), niti u luteinskoj fazi ciklusa ( $r=-0.26$ ,  $n=8$ ,  $p=0,53$ ).

Kako bi se prikazao odnos ukupnog intenziteta fluorescencije GABA<sub>A</sub>R-a (AU) u epitelu i ukupne površine obojene histokemijskim postupcima (%), izveden je Spearmanov test. Ne postoji statistički značajna korelacija ( $r=-0.29$ ,  $n=16$ ,  $p=0,27$ ). Ovaj rezultat govori kako izražaj GABA<sub>A</sub>R nije povezan s količinom mucina izmjerenom u epitelu.

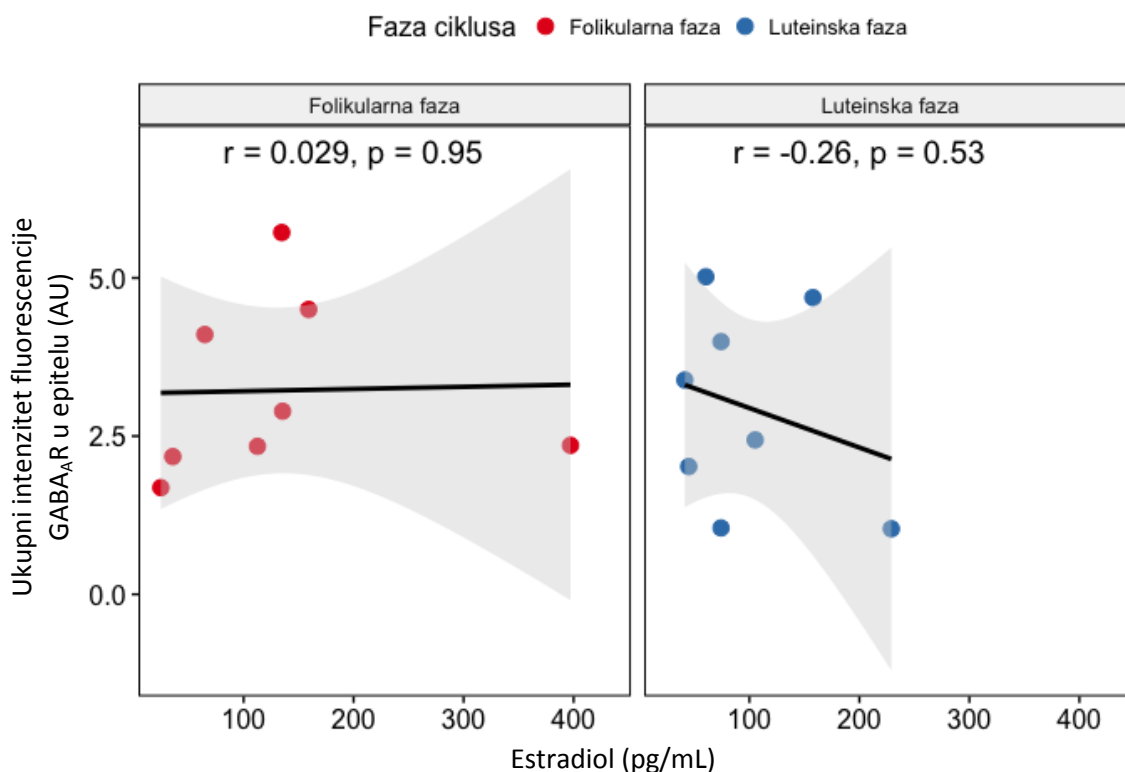
Prema ovim rezultatima, izražaj GABA<sub>A</sub>R nije povezan sa serumskim razinama estradiola niti progesterona, a posljedično niti fazom ciklusa. Zajedno promatrani, rezultati analize izražaja molekula GABA-ergičkog sustava govore kako ovaj sustav nije pod izravnim utjecajem koncentracije spolnih hormona u serumu te nema ulogu u izlučivanju sluzi reguliranom hormonima.



**Slika 14. Grafički prikaz Spearmanovog testa odnosa ukupnog intenziteta fluorescencije  $GABA_A R$ -a (AU) u epitelu i ukupne površine epitela obojene histokemijskim postupcima (%). Ne postoji statistički značajna korelacija. ( $r=0.29, n=16, p=0.27$ ).**



Slika 15. Grafički prikaz Spearmanovog testa odnosa koncentracije estradiola u serumu (pg/mL) te ukupnog intenziteta fluorescencije GABA<sub>A</sub>R-a (AU) u epitelu. Ne postoji statistički značajna korelacija. ( $r = -0.056, n = 16, p = 0.84$ ). Sivo područje na grafu predstavlja interval pouzdanosti.



Slika 15a. Grafički prikaz Spearmanovog testa odnosa koncentracije estradiola u serumu (pg/mL) te ukupnog intenziteta fluorescencije GABA<sub>A</sub>R-a (AU) u epitelu uzoraka podijeljenih prema fazi ciklusa. Crvene točke označuju folikularnu fazu ( $r = 0.029, n = 8, p = 0.95$ ), a plave luteinsku fazu ciklusa ( $r = -0.26, n = 8, p = 0.53$ ). Rezultat nije statistički značajan. Sivo područje predstavlja interval pouzdanosti.

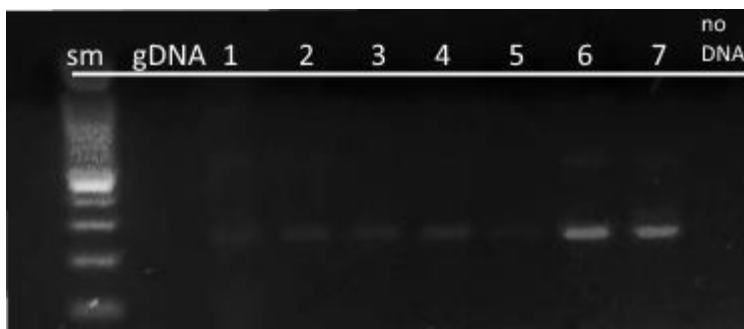
## 5.4. CFTR

### 5.4.1. Prisutnost i smještaj CFTR u tkivu ljudskog endocerviksa

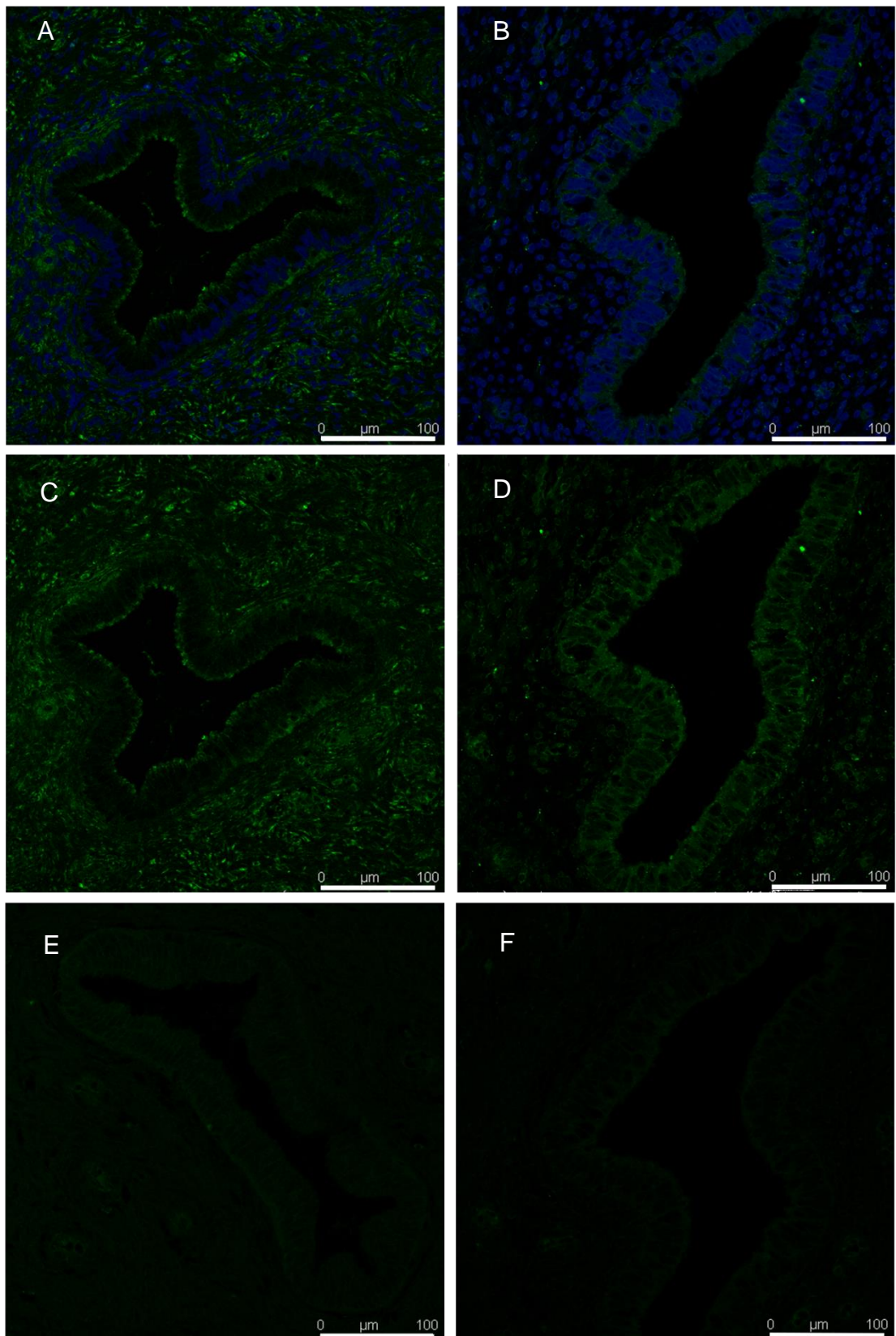
U svrhu istraživanja prisutnosti CFTR-a u endocerviksu, metodom RT-PCR ispitana je prisutnost glasničke RNA CFTR-a. Ovom metodom dokazana je prisutnost mRNA CFTR u tkivu ljudskog endocerviksa (slika 16).

Prisutnost i smještaj CFTR-a u tkivu endocerviksa na razini proteina, ispitani su fluorescentnom imunohistokemijskom reakcijom primjenom monoklonskog mišjeg protutijela na prvu izvanstaničnu domenu CFTR-a. Rezultati fluorescentne imunohistokemijske reakcije dokazuju prisutnost proteina CFTR u sekrecijskom jednoslojnom cilindričnom epitelu endocerviksa (slika 17). Uzorci tkiva različitih pacijentica razlikuju se u obrascu izražaja CFTR-a. Neki uzorci imaju jače izražen signal u apikalnom dijelu stanica (slika 17 A i 17 C).

Osim u žljezdanom epitelu, CFTR je prisutan i u fibroblastima u okolnom vezivnom tkivu.



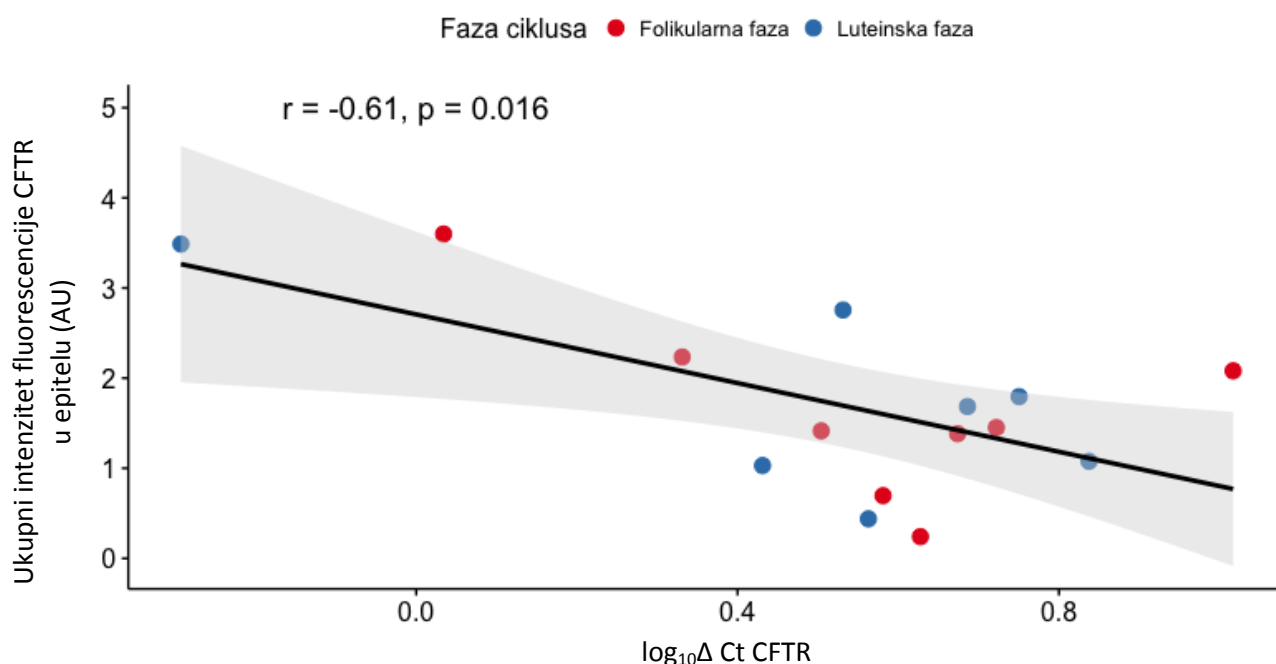
**Slika 16. Elektroforetski prikaz rezultata RT-PCR-a kojim je dokazana prisutnost mRNA CFTR-a u sedam uzoraka tkiva ljudskog endocerviksa.** Očekivana veličina produkta PCR-a za mRNA CFTR je 247pb. Sm - označnik veličine DNA (po 100 pb, najintenzivnija pruga je 500 pb); 1 – 7 oznake uzoraka tkiva ljudskog endocerviksa;; gDNA - kontrola kontaminacije uzoraka genomskom DNA; no DNA - negativna kontrola reakcije.



**Slika 17. Prikaz smještaja CFTR-a u tkivu ljudskog endocerviksa. A i B** Dva različita uzorka tkiva sa zelenim fluorescentnim signalom za CFTR i plavo obojenim jezgrama (DAPI). **C i D.** Ista dva uzorka tkiva bez prikazanih jezgara. **E i F.** Negativne kontrole za ista dva uzorka tkiva. Crta mjerila veličine: 100 µm.

#### 5.4.2. Kvantifikacija izražaja proteina CFTR u žljezdanom epitelu endocerviksa i usporedba s razinom mRNA CFTR-a u tkivu

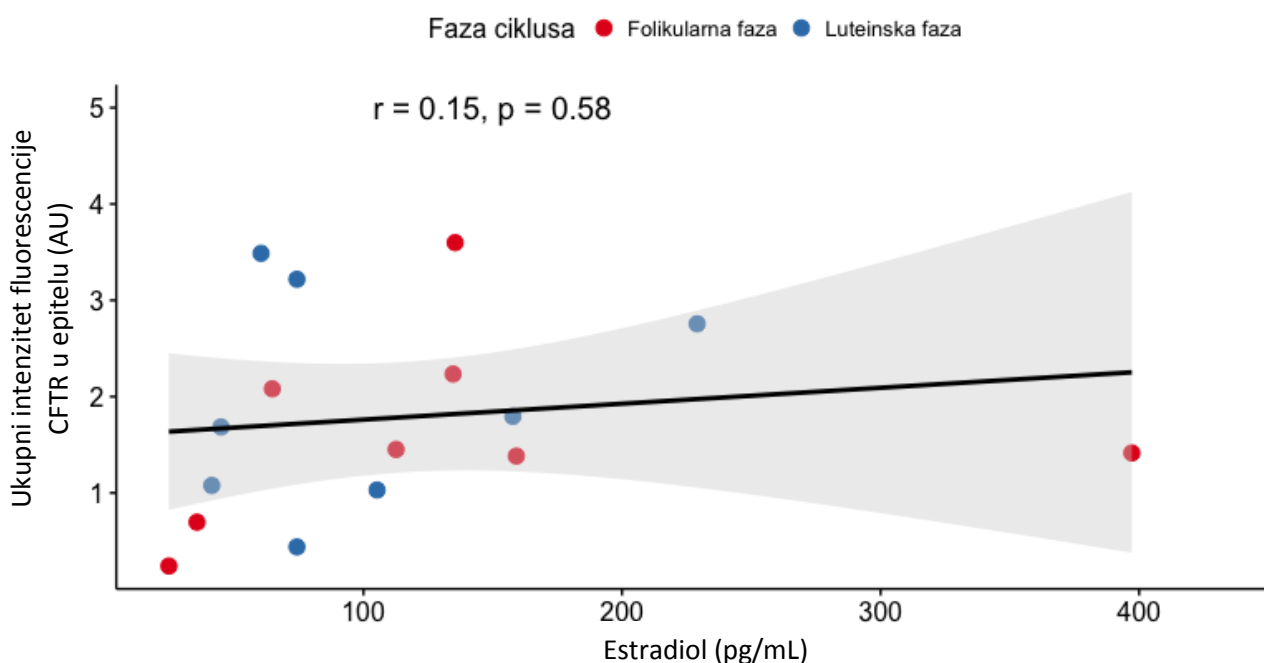
Kako bi se ispitalo prati li količina proteina CFTR u tkivu endocerviksa izražaj CFTR-a na razini mRNA, kvantificiran je izražaj proteina CFTR mjerenjem ukupnog intenziteta fluorescencije CFTR-a u epitelu svakog uzorka, te je kvantificirana mRNA CFTR za iste te uzorke. Pearsonovim testom određen je odnos kvantificiranih proteina CFTR i razine mRNA CFTR (slika 18). računanjem odnosa između logaritamski transformiranih vrijednosti razlike broja ciklusa u kojem se umnaža mRNA CFTR u ispitivanom uzorku i intenziteta fluorescencije CFTR u istom uzorku. Pronađena je značajna negativna korelacija između logaritamski transformirane vrijednosti kvantifikacijskog ciklusa CFTR ( $\log_{10}\Delta Cq$  CFTR) i ukupnog intenziteta fluorescencije CFTR-a (AU) u epitelu ( $r = -0,61$ ,  $n = 14$ ,  $p = 0,016$ ), uz  $\beta$  vrijednost testa koja iznosi 0,51. Budući da  $\Delta Cq$  CFTR vrijednost predstavlja razliku broja ciklusa u kojem se mRNA CFTR-a i mRNA EEA1F1, regulatornog gena, počinje umnažati, obrnuto je proporcionalan s količinom RNA u uzorku. Rezultat ovog ispitivanja znači da razina mRNA CFTR-a u tkivu pozitivno korelira s izražajem proteina.



**Slika 18.** Grafički prikaz Pearsonovog testa kojim je određen odnos između logaritamski transformiranih vrijednosti razlike broja ciklusa u kojem se umnaža mRNA CFTR u ispitivanom uzorku i intenziteta fluorescencije pojavnosti proteina (AU) u istom uzorku. Postoji jaka negativna korelacija između ove dvije vrijednosti- značajna ( $r = -0,61$ ,  $n = 15$ ,  $p = 0,016$ ). Siva površina označava interval pouzdanosti.

### 5.4.3. Usporedba izražaja proteina CFTR u žljezdanom epitelu endocerviksa s razinama hormona u krvi

U cilju sagledavanja moguće povezanosti estradiola s izražajem proteina CFTR, Spearmanovim testom je izračunat odnos ukupnog intenziteta fluorescencije CFTR-a u epitelu i koncentracija hormona izmjerenih u serumu pacijentica od kojih su prikupljeni uzorci tkiva (slika 19). Nije pronađena značajna korelacija između koncentracije estradiola (pg/mL) i ukupnog intenziteta fluorescencije CFTR-a (AU) u epitelu ( $r = 0,15$ ,  $n = 16$ ,  $p = 0,58$ ).  $\beta$  vrijednost testa iznosi 0,36.



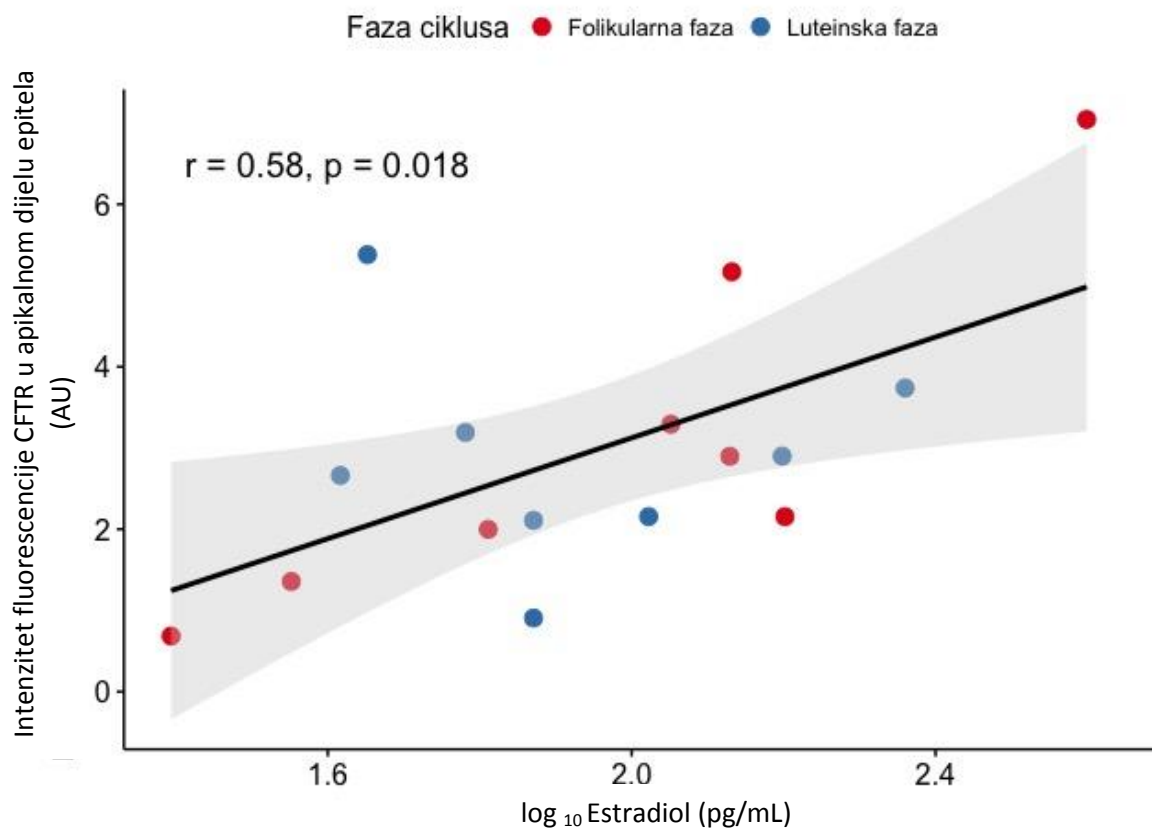
**Slika 19. Grafički prikaz Spearmanovog testa kojim je određen odnos koncentracije estradiola (pg/mL) i ukupnog intenziteta fluorescencije CFTR-a (AU) u epitelu.** Ne postoji značajna korelacija između koncentracije estradiola (pg/mL) i ukupnog intenziteta fluorescencije CFTR-a (AU) u epitelu ( $r = 0,15$ ,  $n = 16$ ,  $p = 0,58$ ). Siva površina na grafu predstavlja interval pouzdanosti.



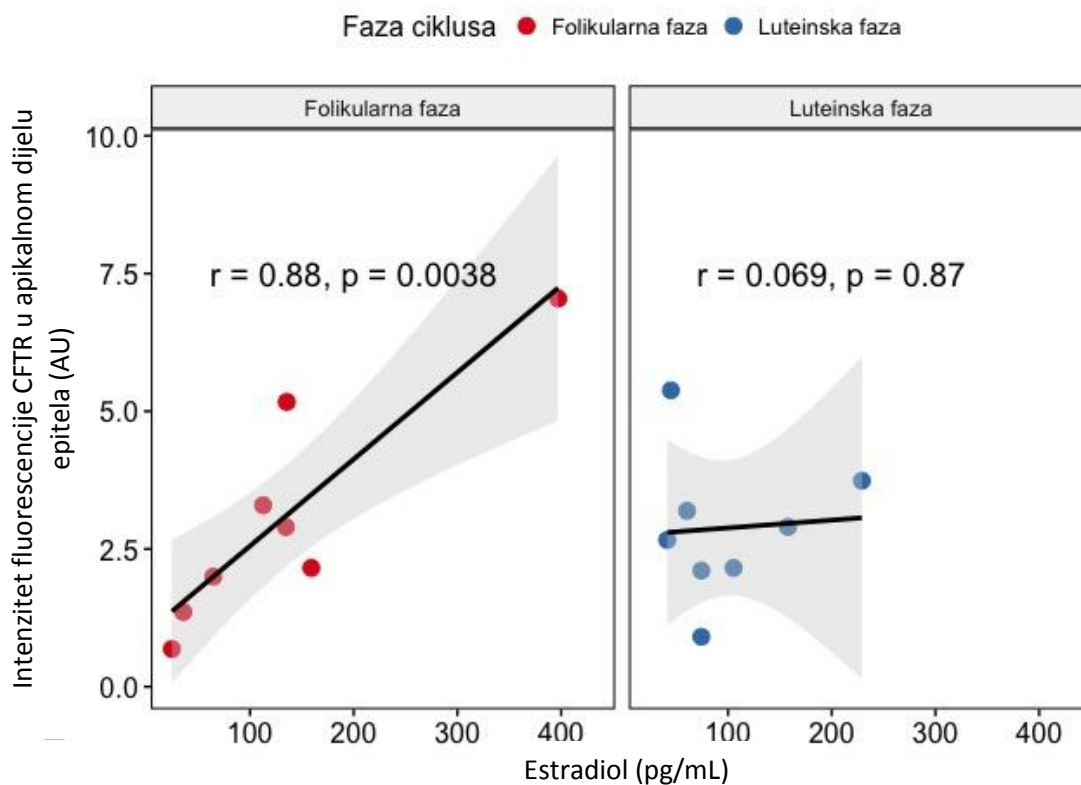
#### **5.4.4. Usporedba izražaja proteina CFTR u apikalnom dijelu stanica žljezdanog epitela endocerviksa s razinama spolnih hormona u krvi**

Promatranjem snimki imunohistokemijski prikazanih proteina CFTR u žljezdanom tkivu endocerviksa uočena je jači intenzitet fluorescencije u apikalnim dijelovima stanica nekih uzoraka. Kako bi se provjerila povezanost izražaja CFTR u apikalnom dijelu stanice, na mjestu gdje se očekuje njihovo djelovanje, s razinom estradiola u serumu, kvantificirana je fluorescencija imunohistokemijske reakcije lokalizirana unutar 3  $\mu\text{m}$  od apikalne membrane. Izveden je Spearmanov test kako bi se utvrdio odnos između logaritamski transformiranih vrijednosti koncentracije serumskog estradiola (pg/mL) i intenziteta fluorescencije CFTR-a (AU) u apikalnom dijelu epitela (slika 20). Pronađena je statistički značajna snažna pozitivna korelacija između estradiola (pg/mL) i intenziteta fluorescencije CFTR-a (AU) u apikalnom dijelu epitelnih stanica ( $r = 0,67$ ,  $n = 15$ ,  $p = 0,00045$ ) uz  $\beta = 0,48$ . Ovaj rezultat govori u prilog povezanosti porasta izražaja CFTR-a u apikalnom dijelu stanica s porastom serumske razine estradiola.

Kako bi se utjecaj estrogena sagledao neovisno o utjecaju progesterona, odvojeno je izračunata povezanost izražaja GABA<sub>A</sub>R-a sa serumskim estradiolom (pg/mL) za svaku skupinu pacijentica podijeljenih prema fazama ženskog mjesečnog spolnog ciklusa (Slika 21.). Izveden je Pearsonov test kako bi se odredio odnos između logaritamski transformiranih vrijednosti estradiola (pg/mL) i intenziteta fluorescencije CFTR-a (AU) u apikalnom dijelu stanica. Test je pokazao statistički značajnu jaku pozitivnu korelaciju između logaritamski transformiranih vrijednosti koncentracije serumskog estradiola (pg/mL) i intenziteta fluorescencije CFTR-a u apikalnom dijelu epitelnih stanica (AU) u folikularnoj fazi ( $r = 0,86$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0,006$ ). B vrijenost ovog testa iznosi 0,15. Značajne korelacije nije bilo između logaritamski transformiranih vrijednosti estradiola (pg/mL) i intenziteta fluorescencije (AU) u apikalnom dijelu epitelnih stanica za pacijentice u luteinskoj fazi ( $r = -0,085$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0,084$ ). Ovi rezultati pokazuju još snažniju povezanost porasta izražaja CFTR-a pri niskoj razini progesterona, u folikularnoj fazi, te izostanak povezanosti u luteinskoj fazi, karakteriziranoj porastom progesterona, što govori o negativnom učinku progesterona na ekspresiju CFTR-a.



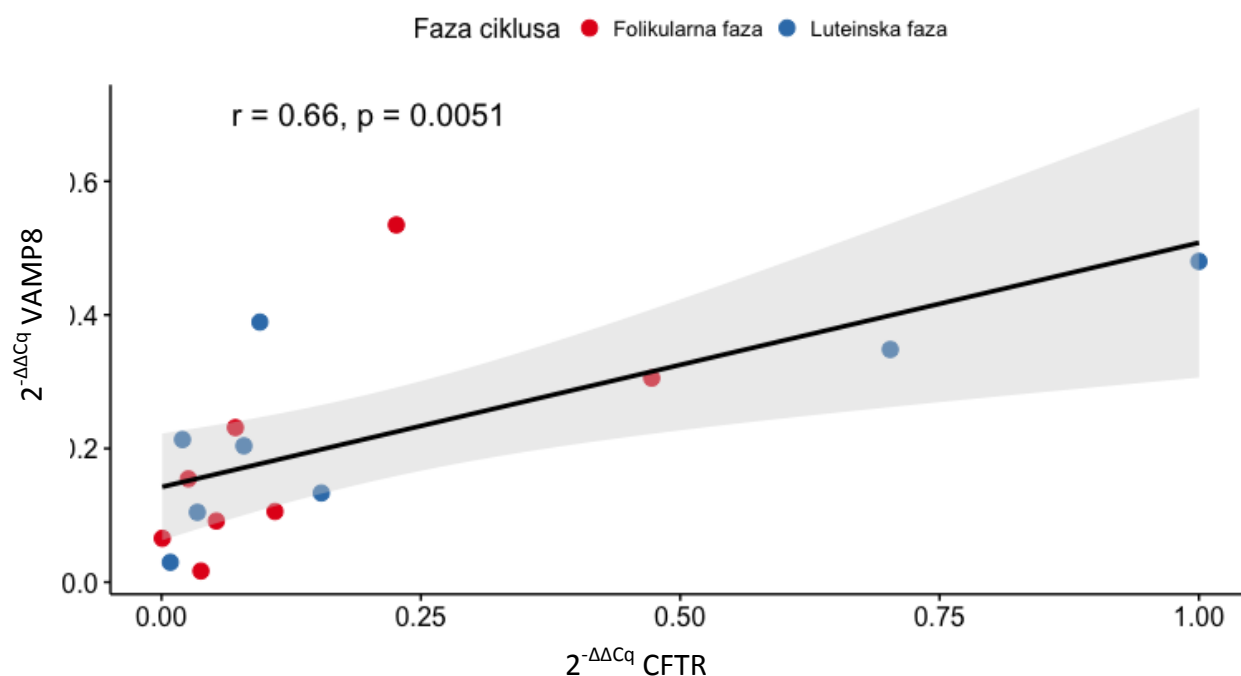
**Slika 20. Grafički prikaz Pearsonovog testa kojim je utvrđen odnos između koncentracije estradiola u serumu (pg/mL) i intenziteta fluorescencije CFTR-a u apikalnom dijelu žljezdanih stanica.** Postoji jaka pozitivna korelacija između koncentracije estradiola (pg/mL) i intenziteta fluorescencije CFTR-a (AU) u apikalnom dijelu stanica, koja je statistički značajna ( $r_s = 0,67, n = 16, p = 0,00045$ ). Siva površina na grafu predstavlja interval pouzdanosti.



**Slika 21.** Grafički prikaz Spearmanovog testa odnosa logaritamski transformiranih vrijednosti koncentracije estradiola (pg/mL) i intenziteta fluorescencije CFTR-a u apikalnom dijelu žljezdanih stanica u uzorcima endocervikalnog tkiva podijeljenih u dvije skupine prema fazi ciklusa. Postoji jaka, statistički značajna, pozitivna korelacija između log<sub>10</sub> estradiola (pg/mL) i intenziteta fluorescencije CFTR-a u apikalnom dijelu stanica (AU) u folikularnoj fazi ( $r = 0,86$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0,006$ ). Značajne korelacije nema između log<sub>10</sub> estradiola (pg/mL) i intenziteta fluorescencije u apikalnom dijelu stanica (AU) kod pacijentica u luteinskoj fazi ( $r = -0,085$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.084$ ). Siva površina na grafu predstavlja interval pouzdanosti.

#### 5.4.5. Usporedba izražaja gena CFTR i VAMP8 u epitelu ljudskog endocerviksa

Kako bismo ispitali povezanost izražaja CFTR-a i VAMP8, molekule SNARE kompleksa koja sudjeluje u regulaciji njegovog prometa u stanici zadržavajući ga na apikalnoj membrani, usporedili smo odnos razina mRNA CFTR-a prikazanu pomoću Livak metode i razinu mRNA VAMP8 prikazanu istom metodom (slika 22.). Pronađena je statistički značajna jaka pozitivna korelacija između  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  CFTR i  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  VAMP8 ( $r=0.66$ ,  $n=16$ ,  $p=0,0051$ ). B vrijednost testa iznosi 0,48. Ovaj rezultat govori u prilog hipotezi o regulaciji aktivnosti CFTR-a moderiranjem njegovog smještaja unutar stanice, odnosno zadržavanjem ovog proteina na apikalnoj membrani endocervikalnih stanica.



**Slika 22. Grafički prikaz Spearmanovog testa kojim su uspoređeni  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  CFTR i  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  VAMP8.** Pronađena je statistički značajna jaka pozitivna korelacija između  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  CFTR i  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  VAMP8 ( $r=0.66$ ,  $n=16$ ,  $p=0,0051$ ). Sivo područje predstavlja interval pouzdanosti.

## 6. RASPRAVA

Ovo istraživanje dizajnirano je kako bi pridonijelo razumijevanju mehanizama uključenih u izlučivanje sluzi u ljudskom endocerviksu. Osnovno pitanje od kojeg kreće jest na koji način spolni hormoni reguliraju pojedine procese u proizvodnji, izlučivanju i konačnom oblikovanju endocervikalne sluzi karakterističnih biokemijskih i funkcionalnih svojstava. Na temelju sličnih procesa u drugim organskim sustavima, prije svega u dišnom sustavu, ispitali smo ulogu dvaju ionskih kanala, GABA<sub>A</sub> receptora te transmembranskog regulatora cistične fibroze u ovim kompleksnim procesima. Na temelju sličnosti s dišnim sustavom gdje uz pojačanu ekspresiju GABA<sub>A</sub>R dolazi do pojačanog izlučivanja sluzi u astmi, pretpostavili smo ulogu GABA<sub>A</sub>R u regulaciji egzocitoze mješurica mucina. Tu smo pretpostavku istražili tako da smo ispitali prisutnost molekula GABA-ergičkog sustava u epitelu endocerviksa, njihovu povezanost s razinama estrogena u serumu i izlučivanjem mucina iz epitela. Kako je uloga CFTR opisana u hidrataciji sluzi u plućima, kao posljedica izlučivanja hidrogenkarbonatnih iona i širenja mucina, pretpostavili smo mu analognu ulogu u izlučivanju endocervikalne sluzi. Hipotezu da CFTR sudjeluje u stvaranju pogodnog okoliša za razmatanje mucina i uklanjanje kationskog naboja nakon što napuste stanicu i egzocitotski mješuric, ispitali smo istraživši prisutnost CFTR-a u tkivu endocerviksa, njegovu lokalizaciju unutar stanice i povezanost s razinama ženskih spolnih hormona u serumu.

### 6.1. Ljudsko endocervikalno tkivo kao model za ispitivanje izlučivanja sluzi

Istraživanje uloge GABA<sub>A</sub>R u regulaciji izlučivanja sluzi započeli smo na mišu kao najpristupačnijem modelu u našim uvjetima. Miš je poslužio kao dobar model za ispitivanje postojanja molekula GABA-ergičkog sustava u cervikalnom epitelu, ali kao model izlučivanja sluzi ima neke nedostatke. Ukratko, to su razlike u histološkoj građi mišjeg i ljudskog cerviksa, drugačije organizirani spolni ciklusi te mnogo kraće udaljenosti od rodnice do maternice zbog kojih cervikalna sluz u miša nema bitnu ulogu u transportu i pohrani spermija koje u ljudi ima (77). Zbog navedenih razlika upitno je koliko se zaključci iz pokusa na mišjem modelu mogu translirati na ljudsku fiziologiju izlučivanja cervikalne sluzi.

Kako bismo ispitali ulogu ovih kanala u izlučivanju sluzi u ljudskom endocerviksu, odlučili smo istraživanje provesti na uzorcima tkiva endocerviksa bolesnica, prikupljenim nakon histerektomije, i uzorcima krvi istih bolesnica. Prednost izrade pokusa na uzorcima ljudskog tkiva jest što daje stvarnu biološku sliku, s punim kontekstom arhitekture tkiva,

interakcije veziva i epitela i neizmijenjenih stanica. Takvi su uzorci idealni za određivanje prisutnosti ispitivanih molekula jer sadrže sve molekule koje se u trenutku fiksacije nalaze u tkivu i koje sudjeluju u svim staničnim procesima u tom trenutku. Pored toga, sačuvana morfologija tkiva i stanica omogućuje vizualizaciju određenih bioloških procesa u stvarnom biološkom kontekstu, kao što je primjerice prikazivanje sekrecijskih mjehurića u trenutku egzocitoze (slika 7B), te precizno određivanje unutarstaničnog smještaja molekula postupcima imunohistokemije i imunoelektronske mikroskopije. Uz izmjerene koncentracije spolnih hormona u serumu može se dodati i dinamička komponenta kojom se izmjerene vrijednosti prisutnih proteina i mRNA može postaviti u kontekst hormonskog utjecaja na regulaciju njihovog izražaja.

I dok stanična kultura omogućuje izravno praćenje utjecaja hormona u dodanom mediju na stanične procese, ipak je riječ o izmijenjenoj biološkoj slici. Primarnoj kulturi stanica nedostaje kontekst arhitekture tkiva i interakcije epitela s vezivom na kojem se nalazi, a u 3D i imortaliziranim kulturama nalaze se izmijenjene stanice, čije je promjene ekspresije receptora i citoarhitekture teško provjeriti i pratiti utjecaj ovih promjena na dobivene rezultate istraživanja. Zato je, u slučaju ispitivanja ionskih kanala čija funkcija još nije opisana u ljudskom endocerviksu, kontekst stvarne biološke slike bitan, a ljudsko tkivo trenutno najbolji model u izvornom biološkom okruženju koji daje vrijednu informaciju o stvarnim biološkim procesima u određenom trenutku.

Poteškoća u radu s ljudskim tkivom leži ponajviše u prikupljanju ovog tkiva. Budući da je naše istraživanje ispitivalo mehanizme u izlučivanju sluzi u fiziološkim uvjetima, istraživanje je ograničeno na „zdrave“ cervikse, bez patoloških promjena cerviksa i/ili bez malignih promjena u spolnom sustavu. Nadalje, zdravim ženama se prilikom histerektomije ne uklanja uvijek cerviks, kako bi se u što većem broju slučajeva očuvala stabilnost zdjelice. Također, budući da je riječ o istraživanju čije je temeljno pitanje utjecaj hormona na potencijalne mehanizme koji sudjeluju u izlučivanju sluzi, isključni kriteriji su bili vrlo strogi. Kako su pacijentice koje boluju od mioma, kao najčešće dijagnoze zbog koje je pacijenticama u našem istraživanju rađena histerektomija često u perimenopauzi, iz istraživanja su naknadno isključene pacijentice čije su serumske razine hormona odgovarale menopauzi, iako klinički nisu bile tako procijenjene. Konačno je za analizu fiziološke prisutnosti i regulacije GABA-ergičkog sustava i regulatora cistične fibroze nakon dvogodišnjeg sakupljanja odabrano osamnaest uzoraka koji su odgovarali svim unaprijed postavljenim kriterijima za proučavanje mehanizama u izlučivanju cervikalne sluzi. Budući da je broj uzoraka podložan navedenim

ograničenjima, velika je pažnja posvećena optimizaciji kvantifikacijskih i ostalih eksperimentalnih postupaka kako bi dobiveni rezultati prikazivali što je moguće stvarniju sliku odnosa među istraživanim molekulama. Ključni koraci u optimizaciji tih postupaka bili su odabir referentnih gena za kvantifikaciju genskih transkripata qPCR-om i postavljanje strogih pravila izvođenja i mikroskopiranja fluorescentne imunohistokemije za kvantifikaciju ekspresije bjelančevina u tkivu.

Vrijednost ovog istraživanja je i u činjenici da je jedno od vrlo malog broja istraživanja koje se provodi na zdravom ljudskom endocervikalnom tkivu. Ispitivano ljudsko tkivo obično je materijal promijenjene citoarhitekture zbog različitih stupnjeva cervikalne intraepitelne neoplazije, pa su istraživanja na zdravom tkivu nepromijenjene citoarhitekture rijetka. Fiziološki modeli se obično proučavaju na kulturama stanica, koje, iako stalno napreduju, ne mogu zamijeniti biološku sliku koju daje cjelovito tkivo.

## **6.2. Histokemija nije idealna metoda za kvantifikaciju mucina u endocerviksu**

Na temelju koncentracije estrogena i progesterona u serumu podijelili smo prikupljene uzorke cerviksa u dvije skupine, prema folikularnoj i luteinskoj fazi ciklusa. Kao preduvjet za istraživanje uloge ispitivanih molekula u procesima proizvodnje i izlučivanja sluzi, u svim smo ispitivanim uzorcima postupcima histokemije i elektronske mikroskopije provjerili postoji li u njima žljezdani epitel te odvijaju li se u tim žljezdanim stanicama procesi proizvodnje i izlučivanja sluzi. Također je trebalo provjeriti do koje mjere se na sakupljenim uzorcima može ispitivati dinamika tih procesa. U tu svrhu analizirali smo prikupljene uzorke histokemijskim metodama koje prikazuju mucine i provjerili korelaciju s fazama ciklusa. Budući da je klinički, ali i eksperimentalno dokazano da je izlučivanje sluzi jače u folikularnoj fazi i periovulacijski, očekivali smo veći postotak površine obojene histokemijskim metodama vidjeti u skupini u folikularnoj fazi. Usporedba količine sluzi prisutne u epitelu u folikularnoj i sluzi prisutne u epitelu u luteinskoj fazi određene histokemijom, međutim, iako nešto veća u folikularnoj skupini, nije pokazala statistički značajnu razliku među ovim skupinama ( $p=0,058$ ). Ovi rezultati, dakle, nisu uspjeli potvrditi rezultate nekih ranijih istraživanja koja su primjenom histokemijskih metoda prikazala ne samo razliku među fazama ciklusa, nego i između gornjeg i donjeg dijela cerviksa te velikih i malih žlijezda (86). Naše istraživanje nije provedeno pod potpuno istim uvjetima te bi razlike u pH korištenih otopina mogle biti uzrok različitim rezultatima. Budući da je iz kliničke prakse i mnogih drugih istraživanja jasno kako proizvodnja sluzi zaista prati povišenje

estrogena (42), zaključujemo da eksperimentalni model kvantifikacije izlučivanja sluzi na histološkim preparatima nije idealan za kvantifikaciju dinamičnog procesa izlučivanja sluzi. Naime, histološki preparati pokazuju stanje tkiva u trenutku fiksacije i kvantificirani su samo mucini koji se u tom trenu nalaze u epitelu. Na ovaj način moguće je, primjerice, epitel koji je svoj sadržaj netom izlučio u lumen žlijezde označiti kao „neaktivan“. Ovom problemu moglo bi se doskočiti prikupljanjem sluzi prije uklanjanja cerviksa i pribrajanjem rezultata ove kvantifikacije kvantifikaciji unutarstaničnih mucina. Iz navedenih razloga, naglasak u ovom istraživanju smo stavili na ciljeve kojima se ispituje stanje tkiva u određenom trenutku (prisutnost i smještaj pojedinih molekula u tkivu) i na korelaciju izražaja tih molekula s koncentracijama hormona u serumu.

### **6.3. Molekule GABA-ergičkog sustava prisutne su u ljudskom endocerviksu**

U ranijem smo istraživanju pokazali kako je GABA<sub>A</sub>R prisutan u cilindričnom epitelu mišjeg endocerviksa koji proizvodi sluz (59). U istom istraživanju pokazali smo i prisutnost GAD, VGAT i GABA<sub>A</sub>R-a u epitelu ljudskog endocerviksa. Pošto smo u navedenom istraživanju dokazali prisutnost  $\beta 2/3$  podjedinice GABA<sub>A</sub>R-a, u ovom istraživanju ispitali smo prisutnost svih podjedinica GABA<sub>A</sub>R-a i pokazali da su podjedinice GABA<sub>A</sub>R prisutne u tkivu u različitim udjelima, u kombinacijama koje nagoviještaju stvaranje funkcionalnih receptora (45,87). U prilog funkcionalnosti GABA<sub>A</sub>R-a govori i prisutnost enzima koji sudjeluju u stvaranju i obradi GABA-e, VGAT i GAD. Unutarstanična supranuklearna lokalizacija GABA<sub>A</sub>R-a koja odgovara području epitelnih stanica bogatom membranskim strukturama kao što je Golgijevo tjelešće, glatka endoplazmatska mrežica i mnoštvo transportnih mjehurića (slika 7D), a na koje se dovezuju sekrecijska zrnca ispunjena mucinom u različitim fazama sazrijevanja, te mnogobrojna uvrnuća lateralnih staničnih membrana navela su nas na hipotezu o ulozi GABA<sub>A</sub>R-a u otpuštanju tih sekrecijskih mjehurića. Budući da je izlučivanje sluzi najobilnije pri najvišoj razini estrogena u ciklusu pretpostavili smo kako je uloga GABA-e u izlučivanju sluzi povezana s estrogenom. Vodeći se činjenicom da se najintenzivnije periovulacijsko izlučivanje sluzi regulira relativno brzo, pretpostavili smo da estrogen djeluje na izlučivanje sluzi neovisno o procesima prepisivanja gena. Ovakvo djelovanje estrogena se javlja na primjeru neurona koji otpuštaju gonadotropine. Ne-klasični učinak estradiola na presinaptičke mjehuriće putem klasičnih estrogenskih receptora uzrokuje otpuštanje GABA-e koja djeluje na receptor smješten na GnRH neuronima. Estradiol



uzrokuje migraciju vezikula GABA-e prema sinaptičkoj membrani te, bez uključivanja transkripcijskih procesa, izlučivanje GABA-e (44).

Osim u ženskom spolnom sustavu, dokazano je kako estradiol povećava proizvodnju sluzi i u plućima (88). U epitelu dišnog sustava, u astmi, istraživanja su pokazala kako GABA-ergički sustav ima ključnu ulogu u hiperprodukciji sluzi. Izražaj molekula ovog sustava pojačan je u odgovoru na izlaganje alergenima, a zatim u bronhalnim epitelnim stanicama autokrino i parakrino izlučena GABA preko GABA<sub>A</sub>R-a uzrokuje depolarizaciju epitela te pojačanu sintezu i oslobađanje mucina (60). Agonistički se vezujući na GABA<sub>A</sub>R, GABA je posrednik u izlučivanju i pojačanoj proizvodnji sluzi uzrokovanoj nikotinom u pušenju (89). U ovom slučaju GABA je izravno uključena te se antagoniziranjem njezinog učinka atenuira i nikotinom potaknuta proizvodnja sluzi.

Na temelju ovih saznanja pretpostavili smo kako bi GABA-ergički sustav u endocerviksu mogao biti reguliran djelovanjem estradiola, gdje bi se GABA autokrino ili parakrino izlučivala, vezala na GABA<sub>A</sub>R, depolarizirala stanicu i omogućila egzocitozu postojećih mucina i pojačano stvaranje novih.

#### **6.4. Ekspresija molekula GABA-ergičkog sustava ne podržava hipotezu o ulozi GABA-e u hormonskoj regulaciji izlučivanja sluzi**

Kako bismo provjerili postoji li mogućnost da estradiol regulira GABA-ergički sustav u endocerviksu, usporedili smo ekspresiju GABA-ergičkog sustava u endocerviksu s razinama estradiola u serumu. Očekivali smo kako bi, u slučaju da GABA<sub>A</sub>R i GAD sudjeluju u egzocitozi mjehurića u koje se pakiraju mucini ili pojačanoj sintezi mucina, njihova ekspresija trebala biti povezana i s fazama ciklusa i intenzitetom izlučivanja sluzi. No, kvantitativna analiza izražaja GABA<sub>A</sub>R i GAD unutar stanica pokazala je kako izražaj molekula GABA-ergičkog sustava nije povezan s razinama hormona izmjerenih u serumu. Osim toga, ne pronalazimo ni povezanost izražaja komponenti GABA-ergičkog sustava s fazama ciklusa ni količinom sluzi u epitelu. Ovi rezultati ukazuju kako GABA-ergički sustav nije izravno reguliran razinom ženskih spolnih hormona te kako vjerojatno nije presudan u izlučivanju sluzi u endocerviksu.

Dakle, pretpostavka o mogućoj ulozi GABA-ergičkog sustava u hormonskoj regulaciji izlučivanja sluzi ovim istraživanjem nije potvrđena, ali nije u potpunosti ni isključena. Potrebna su dodatna istraživanja i na većem broju uzoraka humanih tkiva i na staničnim

kulturama koja će dodatno ispitati povezanost izražaja GABA-ergičkih molekula s količinom izlučene sluzi.

## **6.5. Moguće uloge GABA-ergičkog sustava u endocerviksu**

Unatoč negativnim rezultatima istraživanja uloge GABA-ergičkog sustava u hormonskoj regulaciji izlučivanja sluzi, sinteza kompleksnih podjedinica GABA receptora te enzima za sintezu GABA-e (GAD) i njezino pohranjivanje u egzocitotske mjehuriće (VGAT) upućuje na zaključak da stanica posjeduje aktivan GABA-ergički sustav. Biološka je paradigma kako stanica ne ulaže nepotrebno energiju na energetski zahtjevne procese sinteze proteina bez funkcije pa zaključujemo da GABA-ergički sustav ima zasad nerazjašnjenu ulogu u aktivnosti epitelnih stanica u endocerviksu.

GABA-ergički signalni put može imati ulogu u regulaciji proizvodnje sluzi neovisno o spolnim hormonima, na poticaj nekih drugih čimbenika, kao što i u dišnom sustavu GABA sudjeluje u regulaciji proizvodnje sluzi na poticaj nikotina, ovalbumina ili interleukina 13 (60,89). Uloga GABA-ergičkog sustava u izlučivanju sluzi ne mora biti jednoznačna, što pokazuje nedavno objavljeno istraživanje čiji su rezultati u suprotnosti s ulogom GABA<sub>A</sub>R-a u izlučivanju sluzi u plućima. Na primjeru akutnog kolitisa pokazano je djelovanje GABA-e preko GABA<sub>A</sub>R u smanjenju izlučivanja sluzi te smanjenoj proliferaciji i pojačanoj apoptozi vrčastih stanica koje proizvode sluz u kolonu (90). Nadalje, GABA<sub>A</sub>R je ionski kanal koji može prenositi anione iz stanice u lumen žlijezde. S obzirom da se sluz izlučena egzocitozom iz sekrecijskih stanica treba dodatno raširiti i hidratizirati, moguće je da i anioni izbačeni iz stanica putem GABA<sub>A</sub>R pridonose tom procesu, zajedno s CFTR-om. Budući da se prije egzocitoze mora dogoditi bubrenje ovisno o kalciju i otvaranje sekrecijskih zrnaca ispunjenih mucinima (30,31,44), a GABA<sub>A</sub>R u GnRH neuronima djeluje na porast unutarstaničnog kalcija, i ovaj mehanizam bi mogao biti ispitan u budućim istraživanjima.

Istraživanje uloge GABA-ergičkog sustava u debelom crijevu, osim što je pokazalo negativnu korelaciju izlučivanja sluzi i djelovanja GABA-e, povezalo je pojačanu aktivnost GABA-e s većom propusnošću sluznice zbog slabljenja međustaničnih spojeva (90). Aktivnost GABA-e u ovom slučaju smanjila je i izlučivanje proupalnih interleukina i citokina. Budući da je sluznica endocerviksa prva zaštitna barijera prodoru patogena u ženski spolni sustav, a nasuprot tome mora biti spremna za prihvatanje spermija, imunomodulatorni sustavi pružaju široko područje mogućnosti daljnjih istraživanja. Većina istraživanja endocervikalne

sluznice danas se bavi upravo različitim mehanizmima u podlozi propusnosti epitela, izlučivanja imunoloških faktora zbog modulacije upale te adhezije bakterija (91). Endocerviks je glavno mjesto propusnosti sluznice za infekciju HIV-om kao i preferencijalno stanište obligatne unutarstanične bakterije *Chlamydie trachomatis* (92).

## **6.6. Razina izražaja CFTR-a podržava hipotezu o njegovoj ulozi u hormonskoj regulaciji otpuštanja sluzi iz lumena endocervikalnih kripti**

Danas je na primjeru dišnih putova s velikom sigurnošću poznato kako je uloga hidrogenkarbonatnih iona ključna za formiranje sluzi normalnih reoloških svojstava. Zadaća hidrogenkarbonata je omogućavanje širenja i hidratizacije već egzocitiranih mucina, a da bi se hidrogenkarbonatni ioni našli u okolišu u koji su mucini izlučeni zadužen je CFTR. Temeljeći našu hipotezu o ulozi CFTR-a u regulaciji reoloških svojstava cervikalne sluzi i na primjerima iz literature u kojoj je uloga CFTR-a u ženskom spolnom sustavu proučavana već više od trideset godina, pretpostavili smo povezanost izražaja proteina CFTR-a s razinama spolnih hormona u serumu.

Nakon što smo dokazali prisutnost mRNA CFTR-a u tkivu endocerviksa, primjenom visoko specifičnog monoklalnog protutijela pokazali smo lokalizaciju CFTR-a u endocervikalnom tkivu, u epitelnim stanicama te na membranama fibroblasta.

### **6.6.1. Izražaj CFTR-a u apikalnom dijelu stanica povezan je s razinom estradiola u serumu**

Kvantifikacijom ukupnog CFTR-a u epitelu primijetili smo trend povezanosti izražaja CFTR-a s porastom serumskog estradiola, ali nismo dobili značajnu povezanost njegove ekspresije s razinama hormona.

Iako je prva kvantifikacija CFTR-a u ljudskom cerviksu provedena 1997. godine i nije pokazala razliku u razinama mRNA u različitim fazama ciklusa (93), kasnija istraživanja na tkivima ženskog spolnog sustava štakora pokazala su povećanje izražaja CFTR-a s porastom estrogena i smanjenje s porastom progesterona (76,94). Vođeni pozitivnom korelacijom razine estradiola i ekspresije i uloge CFTR-a u životinjskim tkivima, daljnjom usporedbom mikroskopskih snimki različitih uzoraka, primijetili smo razliku u intenzitetu fluorescentnog imunohistokemijskog signala pri apikalnoj membrani stanice. Uz podatke o prometu CFTR-a

kojim se regulira njegova funkcija u prijenosu iona, pretpostavili smo kako bi s porastom razine estrogena mogao rasti izražaj apikalno smještenog CFTR-a. Zaista, usporedba odnosa izražaja apikalnog intenziteta fluorescencije imunohistokemijske reakcije CFTR-a i estrogena potvrdila je hipotezu o porastu prisutnosti CFTR-a u apikalnom dijelu stanice s porastom estrogena.

Ovi rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima o utjecaju spolnih hormona na izražaj CFTR-a, te ukazuju na to da je istraživanje na ljudskom cerviksu iz 1997. godine dalo lažno negativni rezultat (93). Više je mogućih razloga koji su doveli do ovih lažno negativnih rezultata. Endocervikalne stanice dobivene su brisom pomoću četkice. Tim postupkom nisu dobro očuvane epitelne stanice, a vjerojatno je došlo i do krvarenja pa su u brisu prisutne bile i drugi stanični materijal. Stoga nije moguće reći da je zasigurno kvantificiran samo CFTR u epitelu. U tom je istom istraživanju ekspresija CFTR-a i GAPDH-a analizirana pomoću RT-PCR-a, a rezultati gel-elektroforeze PCR-a korišteni su za kvantifikaciju ekspresije. I dok je PCR metoda vrlo osjetljiva za dokazivanje prisutnosti mRNA, nezahvalna je i nedovoljno precizna za njezinu kvantifikaciju (95). Dodatno, tom je prilikom kvantificiran izražaj CFTR-a u ukupnom epitelu endocerviksa, kao što je učinjeno i u prvom mjerenju u našem istraživanju koje je pokazalo tek trend povezanosti izražaja CFTR-a s razinom estrogena, bez statističke značajnosti.

### **6.6.2. Promet CFTR-a regulira njegovu funkciju**

Porast izražaja CFTR-a u apikalnom dijelu stanice uz porast estrogena usmjerio nas je na regulaciju smještaja CFTR-a u stanici. Promet CFTR-a, odnosno kontrola njegove unutarstaničnog smještaja vrlo je bitna metoda regulacije njegovog djelovanja (66), a za regulaciju ovog prometovanja je zadužen i kompleks SNARE. Ovaj složeni proteinski kompleks ima ulogu u endocitozi, egzocitozi, autofagiji i mnogim drugim staničnim procesima koji uključuju membranske interakcije i vezikularni prijenos. Budući da cijeli kompleks SNARE nadilazi obujam ovog istraživanja, fokusirali smo se na njegovu komponentu VAMP8. Ova molekula, čija je uloga dokazana u egzocitozi mucina u vrčastim stanicama epitela dišnih putova koje proizvode sluz građom, funkcijom i sastavom sličnoj sluzi proizvedenoj u epitelnim stanicama endocerviksa (35), molekula je kompleksa SNARE koja je zadužena za vezivanje proteina CFTR za apikalnu membranu. Rezultati našeg istraživanja po prvi put su pokazali snažnu povezanost razine genske ekspresije VAMP8 i CFTR-a u endocerviksu. Budući da je apikalna lokalizacija CFTR-a presudna za njegovu

ulogu u regulaciji ionskog protoka, a ta je funkcija ključna za normalno formiranje sluzi (39), ovi rezultati nagovještavaju kako u endocerviksu VAMP8 sprječava recikliranje CFTR-a, zadržavajući ga u membrani i na taj način pojačava njegovu funkciju, kao što to čini u plućima (30).

### **6.6.3. Progesteron poništava učinak estrogena na porast izražaja CFTR-a**

Budući da literaturni podaci govore o suprotnom djelovanju progesterona na izražaj CFTR-a u štakorskom uterusu i cerviksu, pretpostavili smo kako je takav učinak prisutan i u epitelu ljudskog endocerviksa (96). Podijelili smo uzorke endocerviksa u dvije skupine, folikularnu i luteinsku, prema fazi ciklusa i usporedili svaku skupinu pojedinačno s razinom serumskog estradiola. Na ovaj način simulirali smo izlaganje stanica samo estrogenu (folikularna faza) i estrogenu i progesteronu (luteinska faza). Vrlo snažna pozitivna povezanost izražaja CFTR-a i razine estrogena u toj skupini dodatno je potvrdila našu hipotezu. Nasuprot tome, skupina uzoraka iz luteinske faze kada rastući progesteron interferira s djelovanjem estrogena pokazala je potpuni izostanak povezanosti izražaja CFTR-a i razine estrogena. Potpuni izostanak povezanosti razine CFTR-a i estrogena u uzorcima u luteinskoj fazi pokazuje da progesteron poništava učinke estrogena na izražaj ovog proteina i utišava ga. Ovi rezultati potvrdili su literaturne podatke koji su ovakav uzorak pokazali na štakoru, a nedavno i na majmunu (76,96). Dobiveni rezultati pokazuju da bi CFTR mogao imati ulogu u hormonski reguliranom širenju molekula mucina, hidrataciji i otpuštanju sluzi iz lumena endocervikalnih kripti. Ta je uloga posebno važna u predovulacijskom razdoblju kada se pod utjecajem rastuće razine estrogena pojačano izlučuje sluz smanjene viskoznosti i veće propusnosti za spermije.

Ovakav rezultat u skladu je s već navedenim istraživanjima koja su pronašla pojačan izražaj CFTR-a u tkivima maternice, jajovoda i cerviksa štakora i majmuna, ali i s očekivanjima postavljenima zbog istraživanja sluzi u plućima, cističnoj fibrozi i promjeni svojstava sluzi tijekom ženskog mjesečnog spolnog ciklusa. U kliničkoj je praksi u žena koje boluju od cistične fibroze primijećeno pogoršanje respiratorne kliničke slike u periovulacijskom periodu zbog sluzi koja se pod utjecajem estrogena pojačano izlučuje, ali se u nedostatku funkcionalnog CFTR-a ne hidratizira te ima nepovoljna reološka svojstva, pojačanu viskoznost i slabiju pomičnost (97). U prilog ovome govori i slabija plodnost žena s cističnom fibrozom koja još nije potpuno razjašnjena (29). Međutim, istraživanja pokazuju kako izmijenjen prijenos tekućine i iona cijelom dužinom ženskog reproduktivnog sustava,

endokrini poremećaji, te nepravilnosti u ženskom mjesečnom spolnom ciklusu kao posljedica nedostatka CFTR-a mogu objasniti neplodnost kod žena i u mišjih modela s cističnom fibrozom (72,98).

#### **6.7. CFTR je prisutan na membranama fibroblasta ljudskog endocerviksa**

Iako je ovo istraživanje bilo usmjereno na izražaj CFTR-a u epitelu, pokazana je i prisutnost CFTR na membranama fibroblasta. Ovo otkriće je novost, budući da u ljudskim fibroblastima CFTR još nije pokazan. Funkcionalno, pojava ovog transportera u vezivnom tkivu nije neobjašnjiva. Cerviks tijekom trudnoće prolazi kroz velike promjene morfologije i strukture, omekšavajući i sazrijevajući (99). Jedan od mehanizama u podlozi promjena koje uključuju povećavanje volumena tkivne tekućine i bubrenje tkiva jest i različit izražaj akvaporina, prijenosnika tekućine čija je funkcija povezana s CFTR-om (73,100,101). Jasno, potencijalna uloga CFTR-a u vezivnom tkivu endocerviksa još je nepoznanica i otvara vrata novim istraživanjima.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Molekule GABA-ergičkog signalnog puta, GAD, VGAT i GABA<sub>A</sub>R prisutne su u sekrecijskom epitelu ljudskog endocerviksa.
2. Prvi put detaljno je ispitana prisutnost podjedinica koje tvore GABA<sub>A</sub>R-a u tkivu ljudskog endocerviksa. Kombinacija prisutnih podjedinica u tkivu nagoviješta stvaranje funkcionalnih GABA<sub>A</sub> receptora.
3. Izražaj proteina GAD-a i GABA<sub>A</sub>R-a u epitelu endocerviksa nije povezan sa serumskim koncentracijama ženskih spolnih hormona, kao niti s količinom mucina u epitel mjerenom histokemijskim metodama.
4. U sekrecijskom epitelu ljudskog endocerviksa prisutna je mRNA CFTR-a, kao i protein CFTR. Među uzorcima tkiva različitih pacijentica primijećen je promjenjiv izražaj CFTR-a u apikalnom dijelu stanice.
5. Izražaj proteina CFTR-a u apikalnom dijelu epitela endocerviksa povećava se s porastom razine estrogena u krvi, što potvrđuje pretpostavku o mogućoj ulozi CFTR u hormonskoj regulaciji oblikovanja sluzi.
6. Progesteron poništava učinke estrogena na porast razine CFTR-a u epitelu endocerviksa. Ovaj pronalazak u skladu je s očekivanom proizvodnjom sluzi pojačane viskoznosti koja sporije otječe pod utjecajem progesterona u drugoj
7. Dokazana korelacija izražaja CFTR-a i VAMP8 ukazuje na moguću ulogu VAMP8 u regulaciji lokalizacije, a time i djelovanja CFTR-a. VAMP8 bi zadržavanjem CFTR-a u apikalnoj membrani djelovao na pojačavanje, odnosno produživanje njegovog djelovanja.
8. Prvi put protein CFTR pokazan je na membranama fibroblasta endocervikalnog vezivnog tkiva.

## 8. SAŽETAK

Žljezdani epitel ljudskog endocerviksa izlučuje sluz koja se tijekom ženskog mjesečnog spolnog ciklusa mijenja te u vrijeme ovulacije poprima svojstva koja omogućuju spermijima preživljavanje i oplodnju. Mehanizam hormonske regulacije tih promjena još je nepoznat. Na temelju naših prijašnjih rezultata koji su pokazali prisutnost GABA-ergičkih molekula  $GABA_A$ R i GAD u žljezdanim stanicama endocerviksa te sličnosti sa žljezdanim epitelom dišnog sustava predložena je uloga GABA-ergičkog sustava u hormonskoj regulaciji izlučivanja i oblikovanja sluzi. Cilj istraživanja, provedenog na osamnaest postoperativnih uzoraka ljudskog endocerviksa, bio je ispitati povezanost intenziteta izražaja GABA-ergičkih molekula i CFTR-a s koncentracijom estradiola u krvi, a izražaj GABA-ergičkih molekula i s intenzitetom izlučivanja mucina. Rezultati istraživanja pokazuju da izražaji GABA-ergičkih molekula nisu povezani s razinom estradiola u krvi, a nije pokazana ni povezanost s intenzitetom izlučivanja sluzi. Ispitivanje povezanosti izražaja CFTR-a s koncentracijom estradiola pokazalo je porast izražaja CFTR-a u apikalnom dijelu epitela uz porast estradiola, kao i da porast progesterona poništava ovaj učinak. Ovi rezultati potvrdili su pretpostavku da CFTR može imati ulogu u hormonskoj regulaciji formiranja sluzi, te da važnu ulogu ima njegova lokalizacija u stanici. Pozitivna korelacija CFTR-a i VAMP8 ukazuje na moguću ulogu VAMP8 u regulaciji lokalizacije, a time i djelovanja CFTR u endocervikalnom epitelu.



## 9. SUMMARY

Estradiol and signaling pathways in the regulation of human endocervix secretory activity

Marta Skelin

Zagreb, 2018.

The secretory epithelium of the human endocervix secretes mucus that changes during the menstrual cycle and, at the time of ovulation, gains properties that allow sperm survival and fertilization. The mechanism modifying the hormonal regulation of these changes is still unknown. Our previous research has shown the expression of GABA-ergic molecules GABA<sub>A</sub>R and GAD in glandular endocervical cells. Based on the similarity to the respiratory system glandular epithelium, we suggested a role of the GABA-ergic system and CFTR in the hormone regulation of mucus secretion and formation. The aim of the study, performed on eighteen postoperatively obtained samples of human endocervical tissue was to investigate the correlation of CFTR and GABA—ergic molecules expression with blood estradiol concentration, and the correlation of GABA<sub>A</sub>R and GAD with the intensity of mucin secretion. The results of the study show that the expressions of GAD and GABA<sub>A</sub>R are neither related to the serum estradiol level, nor to the intensity of mucus secretion. Positive correlation of estradiol and CFTR expression in the apical part of the epithelium, which is attenuated by rising progesterone, confirmed the hypothesis that CFTR may play a role in hormonal regulation of mucus formation.

## 10. LITERATURA

1. Joseph A. Jordan, Albert Singer, ur. *The cervix and fertility and infertility*. U: *The cervix*. 2nd izd. Blackwell Publishing Ltd; 2006. str. 155–80. Leppert PC, Yu SY.
2. Three-dimensional structures of uterine elastic fibers: scanning electron microscopic studies. *Connect Tissue Res*. 1991;27(1):15–31.
3. Fluhmann CF. Focal Hyperplasia (Tunnel Clusters) of the Cervix Uteri. *Obstet Gynecol. veljača* 1961;17(2):206
4. Moghissi KS. The Function of the Cervix in Fertility. *Fertil Steril*. 1972;23(4):295–306.
5. Lipshultz, LBR. Sperm Transport and Capacitation. *Glob Libr Womens Med* [Internet]. 2008. [citirano 23. srpanj 2018.]; Dostupno na: [http://www.glowm.com/section\\_view/heading/SpermTransportandCapacitation/item/315](http://www.glowm.com/section_view/heading/SpermTransportandCapacitation/item/315)
6. Insler V, Lunenfeld B. *Diagnosis and Treatment of Functional Infertility*. Berlin: Grosse; 1978. Str. 90–104.
7. Kase L, Glass RH, Speroff, NG. Sperm and Egg Transport, Fertilization, and Implantation. U: *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. Str. 437–87.
8. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLOS Med*. 2012;9(12):e1001356.
9. Katz DF. Human cervical mucus: research update. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165(6), (2):1984–6.
10. Fehring RJ. Accuracy of the peak day of cervical mucus as a biological marker of fertility. *Contraception*. 2002;66(4):231–5.
11. Bigelow JL, Dunson DB, Stanford JB, Ecochard R, Gnoth C, Colombo B. Mucus observations in the fertile window: a better predictor of conception than timing of intercourse. *Hum Reprod*. 2004;19(4):889–92.
12. Ulcova-Gallova Z. Immunological and physicochemical properties of cervical ovulatory mucus. *J Reprod Immunol*. 2010;86(2):115–21.
13. Gibbons RA, Boyd LJ, Dixon SN, Parker J, Sellwood R, Tasker JB. Chemical and physical characteristics of the macromolecular components of the cervical mucus from cows after synchronization of oestrus with melengestrol actate. *J Reprod Fertil*. 1973;35(3):469–76.
14. Schumacher GF, Kim MH, Hosseinian AH, Dupon C. Immunoglobulins, proteinase inhibitors, albumin, and lysozyme in human cervical mucus. I. Communication: hormonal profiles and cervical mucus changes--methods and results. *Am J Obstet Gynecol*. 1977;129(6):629–36.

15. Katz DF, Slade DA, Nakajima ST. Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Adv Contracept.* 1997;13(2–3):143–51.
16. WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [Internet]. WHO. [citirano 22. kolovoz 2018.]. Dostupno na: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>
17. Gipson IK, Moccia R, Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gargiulo AR, Hill JA, i sur. The Amount of MUC5B Mucin in Cervical Mucus Peaks at Midcycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(2):594–600.
18. Forstner G. Signal Transduction Packaging and Secretion of Mucins. *Annu Rev Physiol.* 1995;57(1):585–605.
19. Ilene K. Gipson. Mucins of the human endocervix. *Front Biosci.* 2001;(6):1245-1255.
20. Andersch-Björkman Y, Thomsson KA, Larsson JMH, Ekerhovd E, Hansson GC. Large Scale Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus during the Menstrual Cycle. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6(4):708–16.
21. Fleetwood L, Landgren BM, Eneroth P. Quantitation of human cervical mucin during consecutive days and hourly during one day at midcycle. *Gynecol Obstet Invest.* 1986;22(3):145–52.
22. Brunelli R, Papi M, Arcovito G, Bompiani A, Castagnola M, Parasassi T, i sur. Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2007;21(14):3872–6.
23. Everhardt E, Dony JM, Jansen H, Lemmens WA, Doesburg WH. Improvement of cervical mucus viscoelasticity and sperm penetration with sodium bicarbonate douching. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1990;5(2):133–7.
24. Moghissi KS, Syner FN, Evans TN. A composite picture of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;114(3):405–18.
25. Pluta K, McGettigan PA, Reid CJ, Browne JA, Irwin JA, Tharmalingam T, i sur. Molecular aspects of mucin biosynthesis and mucus formation in the bovine cervix during the periostrous period. *Physiol Genomics.* 2012;44(24):1165–78.
26. Perez-Vilar J, Hill RL. William Lennarz, Lane M ur. Mucin Family of Glycoproteins. U: *Encyclopedia of Biological Chemistry – 2.izd.* [Internet]. Oxford: Academic Press/Elsevier; [citirano 05. kolovoz 2018.]. str. 758–64. Dostupno na: <https://www.elsevier.com/books/encyclopedia-of-biological-chemistry/lennarz/978-0-12-378630-2>
27. Mucikehu RW, Quinton PM. A new role for bicarbonate secretion in cervico-uterine mucus release. *J Physiol.* 2010;588(13):2329–42.
28. Verdugo P. Goblet Cells Secretion and Mucogenesis. *Annu Rev Physiol.* 1990;52(1):157–76.

29. Kreda SM, Davis CW, Rose MC. CFTR, Mucins, and Mucus Obstruction in Cystic Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(9):a009589.
30. Espinosa M, Noé G, Troncoso C, Ho SB, Villalón M. Acidic pH and increasing [Ca<sup>2+</sup>] reduce the swelling of mucins in primary cultures of human cervical cells. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2002;17(8):1964–72.
31. Barclay JW, Morgan A, Burgoyne RD. Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium.* 2005;38(3–4):343–53.
32. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med.* 2010;363(23):2233–47.
33. Wong SH, Zhang T, Xu Y, Subramaniam VN, Griffiths G, Hong W. Endobrevin, a Novel Synaptobrevin/VAMP-Like Protein Preferentially Associated with the Early Endosome. *Mol Biol Cell.* 1998;9(6):1549–63.
34. Okayama M, Arakawa T, Tanimura A, Mizoguchi I, Tajima Y, Takuma T. Role of VAMP8/endobrevin in constitutive exocytotic pathway in HeLa cells. *Cell Struct Funct.* 2009;34(2):115–25.
35. Jones LC, Moussa L, Fulcher ML, Zhu Y, Hudson EJ, O’Neal WK, i sur. VAMP8 is a vesicle SNARE that regulates mucin secretion in airway goblet cells. *J Physiol.* 2012.;590(3):545–62.
36. Flori F, Secciani F, Capone A, Paccagnini E, Caruso S, Ricci MG, i sur. Menstrual cycle–related sialidase activity of the female cervical mucus is associated with exosome-like vesicles. *Fertil Steril.* 2007;88(4):1212–9.
37. Quinton PM. Role of epithelial HCO<sub>3</sub><sup>–</sup> transport in mucin secretion: lessons from cystic fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(6):C1222–1233.
38. Garcia MAS, Yang N, Quinton PM. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2613–22.
39. Yang N, Garcia MAS, Quinton PM. Normal mucus formation requires cAMP-dependent HCO<sub>3</sub><sup>–</sup> secretion and Ca<sup>2+</sup>-mediated mucin exocytosis. *J Physiol.* 2013;591(18):4581–93.
40. Chen EYT, Yang N, Quinton PM, Chin WC. A new role for bicarbonate in mucus formation. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299(4):L542–9.
41. Schoyer KD, Gilbert F, Rosenwaks Z. Infertility and abnormal cervical mucus in two sisters who are compound heterozygotes for the cystic fibrosis (CF) DeltaF508 and R117H/7T mutations. *Fertil Steril.* 2008;90(4):1201.e19–22.
42. Brown JB, Harrisson P, Smith MA. A study of returning fertility after childbirth and during lactation by measurement of urinary oestrogen and pregnanediol excretion and cervical mucus production. *J Biosoc Sci.* 1985;17(S9):5–23.

43. Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW. Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*. 2008;16(2–3):140–53.
44. Romanò N, Lee K, Abrahám IM, Jasoni CL, Herbison AE. Nonclassical estrogen modulation of presynaptic GABA terminals modulates calcium dynamics in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2008;149(11):5335–44.
45. Sigel E, Steinmann ME. Structure, Function, and Modulation of GABA<sub>A</sub> Receptors. *J Biol Chem*. 2012;287(48):40224–31.
46. Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H, Jeon KW, ur. GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs. *Int Rev Cytol*. 2002;213:1-47.
47. Bormann J. The „ABC“ of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(1):16–9.
48. Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ. Two Forms of the  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Synthetic Enzyme Glutamate Decarboxylase Have Distinct Intraneuronal Distributions and Cofactor Interactions. *J Neurochem*. 1991;56(2):720–3.
49. Miloš Judaš, Ivica Kostović. Neurotransmiteri, neuropeptidi i njihovi receptori. U: *Temelji Neuroznanosti*. 1 izd. Zagreb, Hrvatska. MD; 2007.
50. Gladkevich A, Korf J, Hakobyan VP, Melkonyan KV. The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders. *Auton Neurosci Basic Clin*. 2006;124(1–2):1–8.
51. Dionisio L, José De Rosa M, Bouzat C, Esandi MDC. An intrinsic GABAergic system in human lymphocytes. *Neuropharmacology*. 2011.;60(2–3):513–9.
52. Mancinelli R, Franchitto A, Glaser S, Meng F, Onori P, Demorrow S, i ostali. GABA induces the differentiation of small into large cholangiocytes by activation of Ca(2+) /CaMK I-dependent adenylyl cyclase 8. *HepatoL Baltim Md*. 2013.;58(1):251–63.
53. Wu C, Qin X, Du H, Li N, Ren W, Peng Y. The immunological function of GABAergic system. *Front Biosci Landmark*. 2017;22:1162–72.
54. Wendt A, Birnir B, Buschard K, Gromada J, Salehi A, Sewing S, i sur. Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighboring beta-cells. *Diabetes*. 2004;53(4):1038–45.
55. Chen H, Ruan YC, Xu WM, Chen J, Chan HC. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2012;18(6):703–13.
56. Louzan P, Gallardo MG, Tramezzani JH. Gamma-aminobutyric acid in the genital tract of the rat during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil*. 1986;77(2):499–504.
57. Erdö SL, Villányi P, László A. Gestational changes of GABA levels and GABA binding in the human uterus. *Life Sci*. 1989;44(26):2009–14.

58. Zhou Z, Sun H, Li X, Li Y, Zhao S, Zhang D, et al. A local GABAergic system is functionally expressed in human fallopian tube. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(2):237–41.
59. Skelin M, Bursać D, Kozina V, Winters T, Macan M, Čurlin M. Key molecules in the GABA signalling pathway are present in mouse and human cervical tissue. *Reprod Fertil Dev.* 2018. doi: 10.1071/RD17333
60. Xiang Y-Y, Wang S, Liu M, Hirota JA, Li J, Ju W, et al. A GABAergic system in airway epithelium is essential for mucus overproduction in asthma. *Nat Med.* 2007;13(7):862–7.
61. Davis CW, Dickey BF. Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:487–512.
62. Patrick AE, Thomas PJ. Development of CFTR Structure. *Front Pharmacol. Front Pharmacol.* 2012; 3: 162.
63. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 1999.;79(1):23-45.
64. Reddy MM, Quinton PM. Control of dynamic CFTR selectivity by glutamate and ATP in epithelial cells. *Nature.* 2003.;423(6941):756–60.
65. Bradbury NA. Intracellular CFTR: localization and function. *Physiol Rev.* 1999.;79(1):175-191.
66. Bertrand CA, Frizzell RA. The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2003.;285(1):C1–18.
67. Tang BL, Gee HY, Lee MG. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator's Expanding SNARE Interactome. *Traffic.* 2011;12(4):364–71.
68. Trezise AE, Chambers JA, Wardle CJ, Gould S, Harris A. Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. *Hum Mol Genet.* 1993;2(3):213–8.
69. Tizzano EF, Chitayat D, Buchwald M. Cell-specific localization of CFTR mRNA shows developmentally regulated expression in human fetal tissues. *Hum Mol Genet.* 1993;2(3):219–24.
70. Mall MA, Hartl D. CFTR: cystic fibrosis and beyond. *Eur Respir J.* 2014;44(4):1042–54.
71. Zheng XY, Chen GA, Wang HY. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human endometrium. *Hum Reprod.* 2004;19(12):2933–41.
72. Hodges CA, Palmert MR, Drumm ML. Infertility in Females with Cystic Fibrosis Is Multifactorial: Evidence from Mouse Models. *Endocrinology.* 2008;149(6):2790–7.
73. Jin P-Y, Lu Y-C, Li L, Han Q-F. Co action of CFTR and AQP1 increases permeability of peritoneal epithelial cells on estrogen-induced ovarian hyper stimulation syndrome. *BMC Cell Biol.* 2012;13:23.

74. Ajonuma LC, Ng EHY, Chow PH, Hung CY, Tsang LL, Cheung ANY, i ostali. Increased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in the human hydrosalpinx. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2005;20(5):1228–34.
75. Paccola CC, Resende CG, Stumpp T, Miraglia SM, Cipriano I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. 2013;7.
76. Ismail N, Giribabu N, Muniandy S, Salleh N. Estrogen and progesterone differentially regulate the levels of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR), adenylate cyclase (AC), and cyclic adenosine mono-phosphate (cAMP) in the rat cervix. *Mol Reprod Dev.* 2015;82(6):463–74.
77. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update.* 2006;12(1):23–37.
78. Lorenzen E, Follmann F, Jungersen G, Agerholm JS. A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection. *Vet Res.* 2015;46(1):116.
79. El-Banna AA, Hafez ESE. The uterine cervix in mammals. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;112(1):145–64.
80. Bane A, Rajakoski E. The bovine estrous cycle. *Cornell Vet.* 1961;51:77–95.
81. Häggström M. Reference ranges for estradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the menstrual cycle. *WikiJournal Med.* 2014.;1(1):1.
82. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, i sur. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611–22.
83. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif. prosinac* 2001;25(4):402–8.
84. Shen Y, Li Y, Ye F, Wang F, Lu W, Xie X. Identification of suitable reference genes for measurement of gene expression in human cervical tissues. *Anal Biochem.* 2010;405(2):224–9.
85. Cheung JLK, Cheung TH, Yu MY, Yeung ACM, Chan PKS. Selection of Referent Transcript for Normalization of Gene Expression in Cervical Cytology Samples. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22(2):153.
86. Gatton E, Zejdel L, Bernstein D, Glezerman M, Czernobilsky B, Insler V. The effect of estrogen and gestagen on the mucus production of human endocervical cells: a histochemical study. *Fertil Steril.* 1982;38(5):580–5.
87. Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem.* 2002.;2(8):795–816.

88. Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man S-FP, Sin DD. Estradiol Increases Mucus Synthesis in Bronchial Epithelial Cells. *PLOS ONE*. 2014.;9(6):e100633.
89. Fu XW, Wood K, Spindel ER. Prenatal nicotine exposure increases GABA signaling and mucin expression in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):222–9.
90. Ma X, Sun Q, Sun X, Chen D, Wei C, Yu X, i sur. Activation of GABAA Receptors in Colon Epithelium Exacerbates Acute Colitis. *Front Immunol* [Internet]. 07. svibanj 2018. [citirano 29. kolovoz 2018.];9. Dostupno na: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00987/full>
91. Gorodeski GI, Pal D. Involvement of estrogen receptors alpha and beta in the regulation of cervical permeability. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278(4):C689-696.
92. Buckner LR, Amedee AM, Albritton HL, Kozlowski PA, Lacour N, McGowin CL, i sur. Chlamydia trachomatis Infection of Endocervical Epithelial Cells Enhances Early HIV Transmission Events. *PLoS ONE* [Internet]. 05. siječanj 2016. [citirano 29. kolovoz 2018.];11(1). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4701475/>
93. Hayslip CC, Hao E, Usala SJ. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene is expressed in the human endocervix throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 1997;67(4):636–40.
94. Salleh N, Ismail N, Muniandy S, Korla PK, Giribabu N. Combinatorial effects of genistein and sex-steroids on the level of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR), adenylate cyclase (AC) and cAMP in the cervix of ovariectomised rats. *Reprod Toxicol*. 2015;58:194–202.
95. Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *Genome Res*. 1992;2(1):1–9.
96. Gholami K, Muniandy S, Salleh N. Progesterone downregulates oestrogen-induced expression of CFTR and SLC26A6 proteins and mRNA in rats' uteri. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:596084.
97. Zeitlin PL. Cystic fibrosis and estrogens: a perfect storm. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3841–4.
98. Chan Hsiao Chang, Ruan Ye Chun, He Qiong, Chen Min Hui, Chen Hui, Xu Wen Ming, i ostali. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in reproductive health and disease. *J Physiol*. 2009;587(10):2187–95.
99. Fosang AJ, Handley CJ. Connective tissue remodelling in the bovine cervix during pregnancy and at term. *Connect Tissue Res*. 1988;17(4):277–85.
100. Anderson J, Brown N, Mahendroo MS, Reese J. Utilization of different aquaporin water channels in the mouse cervix during pregnancy and parturition and in models of preterm and delayed cervical ripening. *Endocrinology*. 2006;147(1):130–40.



101. Jourdain P, Becq F, Lengacher S, Boinot C, Magistretti PJ, Marquet P. The human CFTR protein expressed in CHO cells activates aquaporin-3 in a cAMP-dependent pathway: study by digital holographic microscopy. *J Cell Sci.* 2014;127(3):546–56.

## 11. BIOGRAFIJA

Marta Skelin rođena je 16. lipnja 1990. u Zagrebu. Osnovnu školu i XV. gimnaziju završila je u Zagrebu, a 2008. upisala je na Sveučilištu u Zagrebu Medicinski fakultet na kojem je diplomirala 2014. s prosječkom ocjena 4,78. Tijekom studija dobila je Dekanovu nagradu za najbolju studenticu druge godine, Rektorovu nagradu za rad „*Epitel cerviksa miša tijekom spolnog ciklusa i ekspresija GABA receptora u cervikalnom epitelu*“ (mentorica: doc. dr. sc. Marija Čurlin), Posebnu Dekanovu nagradu Uredništvu časopisa *Medicinar* te Stipendiju Grada Zagreba. Postdiplomski doktorski studij „*Neuroznanost*“ upisala je u rujnu 2014. godine. Od siječnja 2015. zaposlena je kao znanstveni novak Hrvatske Zaklade za Znanost na Katedri za histologiju i embriologiju, pod mentorstvom doc. dr. sc. Marije Čurlin. Stručni ispit za doktore medicine nakon odrađenog pripravničkog staža položila je u rujnu 2017. godine. U sklopu doktorske izobrazbe boravi tri mjeseca u istraživačkom posjetu *3B's Research Group* Sveučilišta u Minhu, Portugal pod mentorstvom dr.sc. Miguela Oliviere. Tijekom dokorskog studija izlagala je radove na međunarodnim konferencijama, te bila nagrađena za najbolju prezentaciju mladih istraživača na *Bridges in Life Sciences, RECOOP* u Pragu 2016. godine. Prvi je autor na je na radu indeksiranom u bazi *Current Contents*, u drugoj kvartili, uz *impact factor* 2.656.

Publikacije vezane uz temu dokorskog rada:

1. Skelin M, Bursać D, Kozina V, Winters T, Macan M, Čurlin M. Key molecules in the GABA signalling pathway are present in mouse and human cervical tissue. *Reprod Fertil Dev.* 2018. doi: 10.1071/RD17333 (IF = 2.656, Q2)