

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

MARIJA SLAVIĆ  
dipl. molekularni biolog i fiziolog

**DIREKTNI FARMAKOLOŠKI EFEKTI FULERENOLA  
 $C_{60}(OH)_{24}$  NA MODELU IZOLOVANOG GLATKOG  
MIŠIĆA PACOVA I ULOGA ANTIOKSIDATIVNOG  
SISTEMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**Beograd  
2011**

*Mojoj porodici*

# ZAHVALNICA

*Doktorska disertacija realizovana je na Odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu.*

*Zahvaljujem se svom mentoru Dr Ratku Radojičiću, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na podršci i značajnim sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije.*

*Srdačno se zahvaljujem Dr Slobodanu Milovanoviću, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta Istočno Sarajevo, koji je predložio temu ove doktorske disertacije, protokol eksperimentalnog rada i rukovodio njegovom izradom, na pomoći i korisnim stručnim savetima.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem Dr Mihajlu Spasiću, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu, na njegovoj posvećenosti, dragocenim savetima i neprestanoj podršci i pomoći u tumačenju rezultata, pisanju teze i publikacijama.*

*Posebno se zahvaljujem Dr Dušku Blagojeviću naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu, na pomoći u statističkoj obradi podataka, kao i savetima i podršci tokom rada.*

*Zahvaljujem se Dr Zorani Oreščanin-Dušić, naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu, na kolegijalnosti i pomoći prilikom eksperimentalnog rada.*

*Takođe se zahvaljujem Dr Aleksandri Nikolić-Kokić, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu, na nesebičnoj stručnoj pomoći prilikom eksperimentalnog rada.*

*Najtoplije se zahvaljujem Dr Aleksandru Đorđeviću, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta, Departman za Hemiju, Univerziteta u Novom Sadu, na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, tumačenju rezultata iz oblasti mikroskopije i izradi disertacije.*

*Zahvaljujem se Dr Dijani Krstić-Milošević, naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu i Dr Jeleni Vranković, naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu na kolegijalnosti i podršci tokom eksperimentalnog rada.*

*Veliku zahvalnost dugujem kolegincama iz Odeljenja za citologiju Dr Nataši Nestorović, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu i Mr Nataši Ristić, istraživaču saradniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu, koje su me uvele u metode citoloških analiza i pružale podršku prilikom eksperimentalnog rada.*

*Zahvaljujem se svojoj porodici i prijateljima na podršci i razumevanju tokom svih ovih godina.*

*Marija Slavić*

# SADRŽAJ

<b>IZVOD</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>UVOD</b> .....	5
1. POLIHIDROKSILOVANI FULEREN-FULERENOL $C_{60}(OH)_{24}$ .....	5
1.1 Otkriće i osobine fulerena.....	5
1.2 Fulerenoli-osobine i uloga u biomedicini .....	6
2. DIMETIL SULFOKSID (DMSO).....	8
2.1 DMSO i oboljenja srca .....	10
2.2 DMSO i inflamacija .....	11
2.3 Kolagen i skleroderma.....	11
2.4 DMSO i intersticijalni cistitis .....	12
2.5 DMSO i CNS .....	12
2.6 Mehanizam dejstva i toksičnost DMSO .....	13
3. GLATKA MUSKULATURA .....	14
3.1 Struktura glatkih mišića .....	15
3.2 Inervacija i stimulacija glatke muskulature .....	18
3.3 Tipovi aktivnosti glatkih mišićnih ćelija .....	23
3.4 Ileum .....	23
3.4.1 Struktura i funkcija ileuma.....	24
3.4.2 Enterički nervni sistem i tipovi neurotransmitera koje luče enterički neuroni.....	27
3.5 Uterus.....	29
3.5.1 Reproductivni sistem ženke pacova .....	31
3.5.2 Specifičnosti kontraktilnog mehanizma uterusa .....	33
4. OKSIDACIONI STRES I REAKTIVNE VRSTE KISEONIKA (ROS).....	35
4.1 Superoksid anjon radikal ( $O_2^-$ ) .....	38
4.2 Vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ).....	39
4.3 Hidroksil radikal ( $\cdot OH$ ) .....	40
4.4 Singlet kiseonik ( $^1O_2$ ) .....	40
5. ANTIOKSIDACIONI SISTEM ZAŠTITE (AOS).....	41
5.1 <i>NENENZIMSKA ANTIOKSIDACIONA ZAŠTITA</i> .....	42
5.1.1 Glutation (GSH).....	42
5.2 <i>ENZIMI ANTIOKSIDACIONOG SISTEMA ZAŠTITE (AOS)</i> .....	45
5.2.1 Superoksid dismutaza (SOD).....	45
5.2.2 Katalaza (CAT) .....	49
5.2.3 Glutation-peroksidaza (GSH-Px).....	50
5.2.4 Glutation-S-transferaza (GST).....	52
5.2.5 Glutation-reduktaza (GR) .....	53
<b>CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	55
<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	56
6.1 <i>AFM (Atomic Force Microscopy)</i> .....	56
6.2 <i>TEM (Transmission Electron Microscope), SEM (Scanning</i>	

<i>Electron Microscope</i> ).....	56
7. FARMAKOLOŠKA ISPITIVANJA .....	57
7.1 Izolovanje i priprema tkiva .....	57
8. BIOHEMIJSKA ISPITIVANJA .....	59
8.1 Priprema tkiva .....	59
8.2 Određivanje koncentracije proteina .....	59
8.3 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).....	60
8.4 Određivanje aktivnosti mangan superoksid dismutaze(MnSOD) .....	62
8.5 Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) .....	62
8.6 Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px).....	63
8.7 Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR).....	65
8.8 Određivanje aktivnosti ukupnog glutationa (GSH) .....	67
Statistička analiza.....	68
9. Rezultati merenja metodama mikroskopije: AFM, TEM, SEM.....	69
9.1 AFM (mikroskopija atomskih sila).....	69
9.2 TEM (prenosna elektron mikroskopija EDXS JEM-2100) .....	74
9.3 SEM (skenirajuća elektron mikroskopija) .....	77
10. Rezultati farmakoloških i biohemijskih eksperimenata na modelu uterusa .....	79
10.1 Efekat fulerenola na spontano aktivne uteruse .....	79
10.1.1 Aktivnost antioksidativnih enzima u spontano aktivnim uterusima.....	81
10.2 Efekat fulerenola na Ca <sup>+2</sup> -indukovanu aktivnost uterusa .....	85
10.2.1. Aktivnost antioksidativnih enzima u Ca <sup>+2</sup> -indukovanim uterusima .....	87
10.3 Efekat fulerenola na toničnu (KCl-indukovanu) aktivnost uterusa .....	91
10.3.1 Aktivnost antioksidacionih enzima u KCl-indukovanim uterusima .....	93
10.4 Dvofaktorska analiza varijanse aktivnosti antioksidativnih enzima u uterusu .....	98
11. Rezultati farmakoloških i biohemijskih eksperimenata na modelu ileuma .....	101
11.1 Efekat fulerenola na spontanu aktivnost ileuma .....	101
11.1.1 Aktivnost antioksidativnih enzima u spontano aktivnim ileumima.....	101
11.2 Efekat fulerenola na toničnu (KCl-indukovanu)aktivnost ileuma .....	105
11.2.1 Aktivnost antioksidacionih enzima u KCl-indukovanim Ileumima.....	107
11.3 Dvofaktorska analiza varijanse aktivnosti antioksidativnih enzima u ileumu.....	111
<b>DISKUSIJA</b> .....	114
12.1 AFM, TEM, SEM analize .....	114
12.2 Uticaj fulerenola C <sub>60</sub> (OH) <sub>24</sub> i DMSO na kontraktilnost glatke muskulature	115
12.3 Enzimi antioksidacionog sistema zaštite u tkivu uterusa.....	116
12.4 Enzimi antioksidacionog sistema zaštite u tkivu ileuma .....	118
<b>ZAKLJUČCI</b> .....	120
<b>REFERENCE</b> .....	122
<b>BIOGRAFIJA</b> .....	140
<b>PRILOZI</b> .....	141

## SPISAK SKRAĆENICA

Å – angstrom  
AFM – mikroskopija atomskih sila (Atomic Force Microscopy)  
ATP – adenzin trifosfat  
BHT – butil hidroksi toluen  
BK – kalcijum- zavisni kalijumovi kanali  
CAT – katalaza  
CCK – holecistokinin  
CGRP – kalcitonin gen-vezujući peptid (Calcitonin Gene-Related Peptid)  
CNS – centralni nervni sistem  
CPI-17 – fosfoprotein inhib  
DAG – diacilglicerol  
DMSO – dimetil sulfoksid  
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrihidrazil  
dsDNK – dvolančana (double strand) dezoksiribonukleinska kiselina  
ESR – elektron spin rezonantna spektroskopija  
FSH – folikulostimulirajući hormon  
GIT – gastrointestinalni trakt  
GnRH – gonadotropin- oslobađajući hormon  
GR – glutation reduktaza  
GSH – ukupni glutation  
GSH-Px – glutation peroksidaza  
GSNO – nitrozoglutation  
GSSG – oksidovani glutation  
GST – glutation-s-transferaza  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vodonik peroksid  
HIF – inducibilni faktor hipoksije (Hypoxia-Inducible Factor)  
HOPG – visoko orjentisani pirolitički grafit  
HT – hidroksi triptofan  
IC – intersticijalni cistitis  
IFN- $\gamma$  - interferon gama  
IL-6 – interleukin 6  
IP3 – inozitol-3-fosfat  
KCl – kalijum hlorid  
kD – kilodalton  
LH – luteinizirajući hormon  
MCP-1 – monocit hemotaksični protein-1  
MLCK – kinaza lakog lanca miozina  
MLCP – fosfataza lakog lanca miozina  
MN – mikronukleus  
mRNK – informaciona (messenger) ribonukleinska kiselina  
NADH – redukovani nikotinamid adenin dinukleotid  
NADPH - redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat  
NGF – nervni faktor rasta  
NMDA – glutamatski receptor  
NM-MHC – non muscle- myosine heavy chain

NMR – nuklearna magnetna rezonanca  
NO – azot oksid  
 $O^{2-}$  – superoksid anjon  
 $\cdot OH$  – hidroksil radikal  
 $^1O_2$  – singlet kiseonik  
PCR – polimerazna lančana reakcija  
PG – prostaglandin  
PS – fosfatidil serin  
ROS – reaktivne vrste kiseonika  
RyRs – rijanodin receptori  
SCE – razmena sestrinskih hromatida (sister chromatide exchange)  
SEM - skenirajući elektronski mikroskop (Scanning Electron Microscope)  
SM-MHC – teški miozinski lanac glatkih mišića (smooth muscle-myosine heavy chain)  
SOD – superoksid dismutaza  
SP – supstanca P  
SR – sarkoplazmatični retikulum  
TBARS – ThioBarbituric Acid Reactive Substances  
TEM – prenosna elektron mikroskopija (Transmission Electron Microscope)  
TF – tkivni faktor  
 $TNF\alpha$  – tumor nekroznii faktor  
VIP – vazoaktivni intestinalni polipeptid

## IZVOD

Fuleren  $C_{60}$  je alotropska modifikacija ugljenika i on, kao i njegovi derivati, već imaju značajan uticaj na razvoj biomedicinske nanotehnologije. Potencijal nanočestica je veliki, a u slučaju fulerena najveći je njegova primena kao finog biomarkera u molekularnoj dijagnostici. Ispitivanja polihidroksilovanih derivata fulerena pokazali su da oni imaju širok spektar bioloških efekata. Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$ , vodorastvorni derivat fulerena  $C_{60}$ , privlači veliku pažnju istraživača. Najviše je ispitivana njegova sposobnost fotosenzitivnosti, kao i sposobnost uklanjanja slobodnih radikala (free radical “sponge” ili free radical scavenger). Takođe, u žiži interesovanja su i anitproliferativna i antikancerogena dejstva ove supstance. Zbog specifične strukture koja podseća na fudbalsku loptu, kandidat je za ulogu nosača supstanci i lekova. Ovakva primena lekova omogućila bi njihovo specifično delovanje na ciljne ćelije ili tkivo. Pokazano je, takođe, da fulerenol ima sposobnost interakcije sa dsDNK, što je veoma značajno sa aspekta razumevanja penetracije ove nanočestice kroz membranu ćelije i njegove intraćelijske aktivnosti.

Potencijalna široka primena fulerenola u medicini zahteva i obimna farmakološka i toksikološka ispitivanja. Do sada ima malo rezultata farmakoloških ispitivanja fulerenola a direktni farmakološki efekti dobijeni aplikacijom fulerenola na izolovane organe koji poseduju glatku muskulaturu su sporadično ispitivani.

S druge strane, supstanca koja se već dugo istražuje ali je, po nekima, i dalje nedovoljno prisutna u farmakologiji je dimetil sulfoksid (DMSO). Osim što je odličan rastvarač, topikalni analgetik i nosač supstanci, DMSO-u se pripisuje sposobnost uklanjanja slobodnih radikala i smatra se da ima pozitivne efekte na oštećenja kardiovaskularnog sistema, centralnog nervnog sistema, bubrežna oboljenja, defekte u strukturi vezivnog tkiva itd.

Promene koje fulerenol i DMSO mogu izazvati na kontraktilnost glatke muskulature su izuzetno važne za mogućnost njihove šire primene u medicini i farmakologiji.



Ileum je kao deo digestivnog trakta, veoma značajan model sistem za izučavanje dejstva supstance koja bi se potencijalno mogla koristiti u farmakologiji.

Uterus pokazuje promene tokom mesečnog ciklusa, kako u kontraktilnosti, tako i u sastavu mikroflore i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite.

Ispitivane supstance mogu uticati na promene parametara kao što su: frekvenca, amplituda, trajanje i smer propagacije kontrakcija.

## ABSTRACT

Fullerene ( $C_{60}$ ) is the carbon allotrope and as its derivatives already has a significant impact on biomedical nanotechnology. The potential of nanoparticles is large but one of the most relevant biological features of fullerene is its application as a biomarker in molecular diagnostics. Polyhydroxylated fullerene derivatives have been shown to display a wide range of biological effects. Fullerenol  $C_{60}(OH)_{24}$ , as a soluble derivative of fullerene  $C_{60}$ , attracts the attention of a number of researchers. The most studied features of fullerenol are photosensitization and the ability to quench various free radicals, behaving as a free radical “sponge” or free radical scavenger. Anitproliferative and anti-cancer properties of this substance are also in the spotlight. Due to its specific structure that resembles a soccer ball, fullerenol is a candidate for a drug carrier. This could enable specific action on target cells or tissue. Ability of fullerenol to interact with dsDNK has also been demonstrated, which is very important in understanding the penetration of nanoparticles through the cell membrane and their intracellular activities.

Potentially wide application of fullerenol in biomedicine requires extensive pharmacological and toxicological investigations. Pharmacological tests and direct pharmacological effects obtained from application of fullerenol on isolated organs that possess smooth musculature were investigated only sporadically.

On the other hand, dimethyl sulfoxide (DMSO) has long been investigated but is, according to some, still insufficiently represented in the pharmacology. Besides being an excellent solvent, topical analgetic and drug carrier, DMSO has the ability to remove free radicals and is considered to have positive effects on the damage of cardiovascular system, central nervous system, renal disease, defects in the structure of connective tissue etc.

Both fullerenol and DMSO can cause changes in the contractility of smooth muscles, which is extremely important for their potentially wider application in pharmacology.

Ileum, as a part of the digestive tract is an important model system for the investigation of a substance that could potentially be used in pharmacology. Uterus contractility, microflora

and the activity of antioxidative enzymes change during menstrual cycle. Investigated substances can change parameters of contraction, such as: frequency, amplitude, duration and direction.

---

## UVOD

### 1. POLIHIDROKSILOVANI FULEREN-FULERENOL $C_{60}(OH)_{24}$

#### *1.1 Otkriće i osobine fulerena*

Fuleren ( $C_{60}$ ) je, pored grafita, grafena i dijamanta, još jedna alotropska modifikacija ugljenika, za čije otkriće su naučnici H.W. Kroto (Sussex University, Engleska), R.E. Smalley (Rice University, SAD), i R.E. Curl (Rice University, SAD) dobili Nobelovu nagradu iz hemije 1996.godine (Kroto HW et al. 1985). Radeći eksperiment u vidu simulacije uslova u atmosferi oko ugljeničnih zvezda (tzv. crveni džinovi), slučajno su kao produkt dejstva laserskih zraka na grafit, u inertnoj atmosferi, zapazili molekule ugljenika veće mase od očekivanih.

Ispitivanjem strukture, pokazalo se da se radi o molekulu od 60 ugljenikovih atoma neobično velike stabilnosti. Trebalo je povezati atome u strukturu u kojoj će svaki atom biti vezan sa istim brojem susednih atoma tako da cela struktura bude simetrična.  $^{13}C$  NMR spektrometrijom pokazalo se da signal ima jedan pik na 143ppm što ukazuje na savršenu simetričnost. Model fudbalske lopte i model kupole arhitekta Buckminster Fuller, prikazan na EXPO 1967.god, potpuno su odgovarali ovim zahtevima (Slika 1.) (Kroto et al. 1985). Prvobitno ime je bilo fudbalen, ali je kasnije molekul, ipak, dobio ime po arhitekti-buckminsterfuleren ili samo fuleren.

Od otkrića fulerena naučnici su istraživali njegovo eventualno prisustvo u prirodi. Pronađen je u sastavu jednog prirodnog minerala u Rusiji, kao i u jednoj vrsti visoko kvalitetnog mastila koji se proizvodi u Kini. U vasioni ga ima najviše oko ugljeničnih zvezda (0.3-0.9%).

Dalja ispitivanja fizičko-hemijskih svojstava fulerena uvrstili su ga u molekul budućnosti u oblasti nanotehnologije i nanomedicine.

Dijametar  $C_{60}$  molekula je 0.72nm (7.2Å)(Kadish et al. 2000 chapter 10, p.439). Čist fuleren je crni ili tamno smeđi prah u zavisnosti od amorfno kristalnog sastava. Molekul čini

12 pentagona i 20 heksagona, u kojima je svaki atom vezan za tri susedna ugljenika sa  $sp^2$  hibridizacijom. Ugljenikovi atomi između pentagona i heksagona vezani su jednostrukom vezom, dok su između dva heksagona vezani nešto kraćom dvostrukom vezom (Slika 1). Struktura pokazuje slabu delokalizovanost elektrona, pa se ponaša kao elektron deficijentni alken i reaguje sa molekulima koji imaju višak elektrona. Praktično je nerastvoran u vodi i proton-akceptujućim rastvaračima, što je ograničavajući faktor u ispitivanjima potencijalnih efekata ovako organizovanih atoma ugljenika u biomedicini.

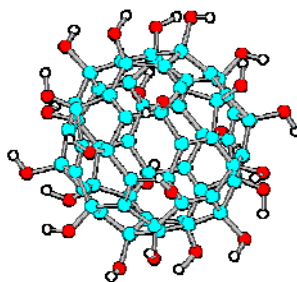


Slika 1. Struktura fulerena C<sub>60</sub>

S druge strane, elektrohemijske osobine fulerena čine ga pogodnim za najrazličitije hemijske modifikacije (Chen et al, 2001; Mikawa et al. 2001; Chiang et al. 1996; Jian et al. 2004; Schnaider et al. 1994; Chaing et al. 1994). Reakcijama nukleofilne i elektrofine adicije, kao i adicijama cikličnih molekula, moguće je kovalentno vezati različita organska jedinjenja za fuleren i dobiti biološki aktivna i vodorastvorna jedinjenja (Kadish et al. 2000; Hirsch et al. 2004; Prassides et al. 2004).

## ***1.2 Fulerenoli - osobine i uloga u biomedicini***

Adicijom hidroksilnih grupa za fuleren, dobijaju se fulerenol ili fuleroli (C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>) (Bosi et al. 2004; Xing et al, 2004; Gohei et al. 2003; Huang et al. 2006; Okubo et al. 2008). Fulerenol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> ima simetrično vezane 24 hidroksilne grupe za sferu fulerena (Slika 2). Dijametar ovog derivata je 1.1nm (11Å)(Hirsch et al. 2004). Fulerenol se rastvara u vodi i DMSO, a ne rastvara se u metanolu. U vodi, u širokom spektru pH, stvara agregate veličine od 20-100nm i neznatne količine agregata od 400nm (Vileno et al. 2006; Brant et al. 2007). Fulerenol može brzo i ireverzibilno reagovati sa različitim solima metala u vodenoj sredini i stvarati nerastvorne metal-hidroksifulerenske polimere (M-fulerenol) (Anderson et al. 2005; Ičević et al. 2006).

Slika 2. Struktura fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$ 

Svojstvo fulerenola koje je najviše ispitivano je njegova fotosenzitivnost (Pickering et al. 2005, Badireddy et al. 2007, Hotze et al. 2009). Naime, kada se izloži vidljivoj svetlosti, laserskoj i UV svetlosti prelazi u dugo-živeće ekscitirano stanje i tada, u aerisanim uslovima, lako vezuje kiseonik i prenosi energiju na njega, pri čemu nastaje radikal-singlet kiseonik ( $^1O_2$ ). Ovo je njegovo prooksidativno svojstvo. Međutim, kada nije pobuđen svetlošću može imati i sasvim suprotne karakteristike-uklanja slobodne radikale kiseonika, posebno superoksid anjon ( $O^{2-}$ ), hidroksil radikal ( $\bullet OH$ ) i singlet kiseonik ( $^1O_2$ ) (Lu et al. 1998). Različite vrste vodorastvornih derivata fulerena pokazuju izrazitu sposobnost uklanjanja reaktivnih vrsta kiseonika (Jun-Jie et al. 2008) Zanimljivo je da se za neke derivate fulerena smatra da imaju superoksid dimutaza (SOD)-mimetička svojstva (Ali et al. 2004). Puno naučnih radova govori o potentnosti fulerenola da uklanja slobodne radikale kiseonika. Rezultati pokazuju da fulerenol u zavisnosti od koncentracije može biti prooksidant ili da uklanja slobodne radikale (Bogdanović V. et al. 2008, 2009; Yamawaki et al. 2006).

Citogenetičke analize SCE (sister chromatide exchange) i MN (analiza broja mikronukleusa) koje ukazuju na promene hromozoma tzv. hromozomske aberacije, pokazale su da fulerenol ne utiče značajno na incidencu međusobne razmene sestrinskih hromatida (SCE) kao ni incidencu povećanja broja mikronukleusa (Barch et al. 199; Verma et al. 1995; Fenech, 2002; Mrđanović et al. 2009). Dodatno, pokazano je da ne povećava ni druge vidove hromozomskih aberacija kao što su translokacije, inverzije, endoduplikacije i sl.

Pinteala et al (Pinteala et al. 2009) su prvi dokazali da se fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  vezuje za molekul DNK u vodenoj sredini bez pufera, u fiziološkom opsegu pH vrednosti. Oni su, naime, dokazali da se nano čestice fulerenol vezuje vodoničnim vezama za fosfat sa spoljne strane DNK, ali se i inkorporira u veće brazde, čiji je dijametar  $12\text{Å}$ . Manje brazde imaju dijametar  $6\text{Å}$ , što nije dovoljno za vezivanje fulerenola ( $11\text{Å}$ ). Osim toga, pokazano je da fulerenoli  $C_{60}(OH)_x$  vezivanjem za DNK dozno-zavisno povećavaju stabilnost DNK na visokim temperaturama ( $70-85^{\circ}C$ ) i tako štite DNK od degradacije (An et al. 2011).

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidazil) testom se mogu pokazati antioksidativna svojstva nekog molekula u odnosu na hidroksil radikal. Stepem inhibicije stvaranja ovih radikala meri se elektron spin rezonantnomom (ESR) spektroskopijom.  $C_{60}(OH)_{24}$  dozno-zavisno smanjuje produkciju hidroksil radikala. Predložena su dva mehanizma mogućeg načina na koji fulerenol ostvaruje efekat. Po jednom modelu, dolazi do adicije hidroksil radikala na preostala moguća mesta vezivanja za jezgra fulerenola (tamo gde su dvostruke veze). Drugi način je preuzimanje atoma vodonika iz fulerenola od strane hidroksil radikala pri čemu nastaju voda i relativno stabilan radikal fulerenola  $C_{60}(OH)_{23}O^{\cdot}$  (Đorđević et al. 2004). Predložen je i treći mehanizam po kom hidroksil radikal preuzima jedan elektron od fulerenola, pri čemu nastaje katjon  $C_{60}(OH)_{24}^{+}$ .

Ispitivanje mogućnosti fulerenola da ukloni superoksid anjone rađena je u sistemu ksantin/ksantin oksidaza. Poznato je da ovaj sistem generiše superoksid anjon koji redukuje citohrom c. Uklanjanjem superoksid anjona iz sistema bila bi smanjena redukcija citohroma c (McCord and Fridovich, 1968). Aplikacija fulerenola u rasponu od nanomolskih do mikromolskih koncentracija smanjila je redukciju citohroma c za oko 5-20%, dok je fulerenol koncentracije 1mM smanjio za 40%(Mirkov et al. 2004).

Kada se lipozomi tretiraju  $FeSO_4$ /askorbinska kiselina sistemom i inkubiraju na sobnoj temperaturi, dolazi do lipidne peroksidacije, oksidacije polinezasićenih masnih kiselina, pri čemu nastaju vrlo štetne supstance, TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances), koji su indikatori oštećenja lipidnog dvosloja membrana. Rađeni su eksperimenti u kojima su upoređivani efekti fulerenola i komercijalnog antioksidanta BHT (butil hidroksi toluen) u pomenutom sistemu. Rezultati su pokazali da fulerenol dozno-zavisno smanjuje formiranje TBARS, kao i da ima sličnu efikasnost u ovom procesu kao BHT (Mirkov et al. 2004).

## 2. DIMETIL SULFOKSID (DMSO)

Dimetil sulfoksid je organsko jedinjenje čija je formula  $(CH_3)_2SO$ . DMSO je sporedni proizvod u drvnjoj industriji koji se od 1953.godine koristi kao rastvarač. Supstanca je u tečnom stanju, bez boje dok miris podseća na miris belog luka. Vrlo lako prodire kroz kožu.

DMSO pripada grupi polarnih aprotičnih rastvarača, ali je značajno manje toksičan od drugih rastvarača iz grupe (dimetilacetamid, dimetilformamid i sl.). Uz to, odlično rastvara kako polarna tako i nepolarana jedinjenja, i može se mešati sa drugim rastvaračima,

uključujući i vodu. U širokoj upotrebi je kao ekstraktant u biohemiji i biljnoj fiziologiji. DMSO se koristi kao krioprotektant koji se dodaje u medijum da spreči ćelijsku smrt tokom procesa zamrzavanja ćelija (Pegg et al. 2007). Veoma važna uloga DMSO je njegova upotreba u bioprezervaciji banaka matičnih ćelija. DMSO je našao primenu i u molekularnoj biologiji- koristi se u PCR metodi za sprečavanje stvaranja sekundarnih struktura DNK uzorka ili prajmera (Chakrabarti et al. 2001).

DMSO ima brojne biološke efekte i zbog toga je predmet mnogih farmakoloških istraživanja. U proteklih 40 godina objavljeno je više od 11 000 radova koji govore o biološkim efektima DMSO i oko 40 000 radova o hemiji dimetil sulfoksida (Santos et al. 2003). Interesovanje za ovu supstancu je počelo 1961. godine kad je Dr Jacob, rukovodilac programa za transplataciju organa na Univerzitetu u Oregonu, počeo istraživanje potencijalne uloge dimetil sulfoksida u očuvanju organa. Tokom ispitivanja uočio da DMSO lako prodire kroz kožu i pritom je ne oštećuje. Isti rezultat su dobili istraživači iz drugih laboratorija. Efikasnost je proporcionalna koncentraciji, s tim da je najefikasniji kad je u koncentraciji od 70-90%. Kad je procenat veći od 90%, paradoksalno, dolazi do tzv. „performance drop“, odnosno, do pada efikasnosti supstance. U malim koncentracijama lako prolazi kroz membranu- npr. 15%-ni DMSO lako prolazi kroz bešiku (Herschler et al. 1980). Pretpostavka je, shodno tome, da DMSO može biti nosač za supstance kao što su: morfin sulfat, penicilin, steroidi, kortizon, insulin itd. Prodiranje i delovanje leka bi bilo brže i lakše, a ne bi bilo infekcije kože pri aplikaciji. Šta će nositi, zavisi od molekulske težine, oblika i elektrohemijskih svojstava molekula.

Dalja istraživanja su pokazala pozitivan efekat DMSO u topikalnoj analgeziji. Primena 70% dimetil sulfoksida u slučaju opekotina, rana, uganuća i sl., dovelo je do skoro trenutnog olakšanja bola (efekat traje do 6 sati) i bržeg zarastanja rana (Lawrence et al. 1983; Lubredo et al. 1992; Alberts et al. 1991; Cruse et al. 1989). Pretpostavlja se da se smanjenje bola ostvaruje blokiranjem C vlakana perifernih nerava (Evans et al. 1993).

Studije su pokazale veoma korisna farmakološka svojstva DMSO koja se odnose na pozitivno dejstvo ove supstance u slučaju poremećaja u protoku krvi, redukovanje citotoksičnog dejstva prekomerne ekscitacije ćelija glutatomom-preko NMDA-AMPA receptora, zatim smanjenje prekomernog ulaska jona natrijuma i kalcijuma u oštećenu ćeliju, blokiranje tkivnog faktora (TF) koji je ključni protein u procesu tromboze, smanjenje intrakranijalnog pritiska, antiinflamatorno dejstvo, sprečavanje proliferacije i migracije ćelija



---

glatkih mišića u krvnim sudovima-procesa koji mogu dovesti do ateroskleroze u koronarnoj, perifernoj i cerebralnoj cirkulaciji (Jacob et al. 2009; Camici et al. 2006).

## **2.1 DMSO i oboljenja srca**

Na animalnom modelu infarkta miokarda (Levett et al. 1987) ispitivan je efekat DMSO. 3h nakon injeciranja DMSO zabeleženo je značajno smanjenje sistemskog vaskularnog otpora kao i povećanje protoka u cerebralnoj cirkulaciji. Promene u ritmu srca, arterijskom krvnom pritisku, pritisku u pulmonarnoj arteriji, kao i promene otpora u pulmonarnim i cerebralnim krvnim sudovima nisu zabeležene. Autori, međutim, nisu špekulisali o mogućem mehanizmu koji bi objasnio ove rezultate.

Novija istraživanja pokazala su (Camici et al. 2006) da DMSO dozno-zavisno inhibira ekspresiju tkivnog faktora (TF) kada je indukovana trombinom ili tumor nekroznim faktorom (TNF $\alpha$ ). Ovo je veoma značajan rezultat jer je TF prihvaćen kao ključni protein u procesu koagulacije i stvaranja tromba što dovodi do akutnih oboljenja srca i infarkta miokarda (Mackman, 2004; Steffel et al. 2006). U ovim slučajevima primećen je visok nivo TNF $\alpha$ , nivo koji dovodi do povećanja ekspresije TF. Isti rezultat je dobijen ispitivanjem DMSO u kombinaciji sa lekovima koji su efikasni u redukciji restenoze, ali je njihovo dejstvo praćeno povećanjem TF. DMSO je uticao na smanjenje nivoa TF (Jacob et al. 2009).

Rezultati koji se nadovezuju na predhodno pomenute pokazuju da DMSO sprečava migraciju i proliferaciju ćelija vaskularnih glatkih mišića humane aorte, što bi moglo imati kliničku primenu u tretiranju koronarnog tromba i infarkta miokarda.

DMSO je moćan inhibitor agregacije trombocita, verovatno putem inhibicije prostaglandina koji učestvuju u agregaciji trombocita (Duyovny et al. 1983; Repine et al. 1981; Panganamala et al. 1976). Značajno je da prilikom DMSO-zavisne deagregacije trombocita nisu primećene neke negativne posledice, čak i pri primeni visokih doza dimetil sulfoksida, kako na animalnom, tako i na humanom modelu (de la Torre et al. 1995; Farkas et al. 2004).

Homeostaza srčanog mišića zavisi od optimalnog fluksa jona natrijuma i kalcijuma u miocite. Kada se poremeti ekvilibrijum influksa i efluksa dolazi do poremećaja ritma srčanih kontrakcija. Lekovi koji blokiraju jonske kanale i smanjuju ulazak ovih jona u ćelije

sprečavaju abnormalne depolarizacije i tako vraćaju normalnu ritmičnu aktivnost muskulature srca (Carter et al. 1998; Okuyama et al. 1999).

S tim u vezi, izvođeni su eksperimenti koji su testirali uticaj DMSO na pomenute procese. Dobijeni su vrlo ohrabrujući rezultati koji ukazuju na to da DMSO sprečava ulazak jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{+2}$  u miocite, ali ne utiče pritom na normalan efluks jona kalijuma iz ćelija. Mehanizam kojim DMSO deluje na fluks ovih jona bi trebalo još proučiti jer se potencijalna primena DMSO može pokazati kao veoma siguran i efikasan način lečenja srčanih aritmija (Camici et al. 2006; Hulsmann et al. 1999).

## ***2.2 DMSO i inflamacija***

DMSO je prva nesteroidna supstanca sa antiinflamatornim dejstvom, posle otkrića aspirina. Primenjuje se kod svih oblika inflamacije, od reumatidnog artritisa, bolova u leđima do autoimunih oboljenja. Antiinflamatorno dejstvo ostvaruje na nekoliko načina. On je antioksidant i uklanja slobodne radikale na mestu zapaljenja. Osim toga, pokazano je da utiče na povećano oslobađanje azotmonoksida iz aferentnih neurona mokraćne bešike, kao i na desenzitizaciju nociceptivnih puteva u urinarnom traktu (Birder et al. 1997). URO-OVA transgeni miševi imaju autoimuni cistitis i povećani nivo tzv. faktora inflamacije, kao što su  $\text{IFN-}\gamma$ , MCP-1, NGF,  $\text{TNF-}\alpha$  i IL-6. Intravenska primena DMSO rezultirala je smanjenjem mRNA za pomenute faktore inflamacije (Kim et al. 2011).

DMSO se daje intravenski i lokalno i može se dati u visokim dozama kada je to potrebno.

## ***2.3 Kolagen i skleroderma***

Skleroderma je retko oboljenje koje nastaje usled nepravilnog grupisanja kolagena u organizmu. Telo otiče, koža (naročito na rukama i licu) postaje gusta i tvrda, dok kalcijum koji se nagomilava u zglobovima otežava kretanje. Čest je osećaj zamora i otežanog disanja. Ishod može biti fatalan. Do primene DMSO, nijedan drugi tretman nije dao rezultate. Primećeno je znatno poboljšanje stanja kod dve trećine ispitivanih pacijenata u smislu značajnog smanjenja bola i ukočenosti, dok histopatološki nalazi takođe pokazuju smanjenje oštećenosti tkiva (Engel et al. 1972).

## ***2.4 DMSO i intersticijalni cistitis***

Intersticijalni cistitis (IC) je stanje koje se manifestuje nelagodnom ili bolom u bešici i okolnom tkivu. Simptomi bolesti jako variraju od slučaja do slučaja, ali variraju i kod pojedinca. Povremeno se oseća blaga nelagoda, pritisak, a ponekad jak bol. Žene češće podležu intersticijalnom cistitisu i bol se pojačava u vreme mesečnog ciklusa (Metts et al. 2001; El Khoudary et al. 2009).

Nije poznat uzrok ovog stanja i teško se razlikuje od sličnih bolesti. Uočeno je da stanje nije uslovljeno virusnom ili bakterijskom infekcijom i jako je mali procenat genetske predispozicije za IC.

Jedina supstanca koja je odobrena od strane U.S Food and Drug Administration (FDA) za lečenje IC je dimetil sulfoksid. Koristi se za ispiranje bešike koje traje 10-15 minuta, tokom 6-8 nedelja. Smanjenje bola i poboljšanje opšteg stanja pacijenti počnu da osećaju posle 3 nedelje.

Lekari smatraju da DMSO deluje na nekoliko načina. S obzirom na to da već u malim koncentracijama lako prolazi kroz zid bešike, lakše dolazi do zapaljenog tkiva i efikasno smanjuje inflamaciju i smanjuje bol. Za DMSO je poznato da opušta muskulaturu što, takođe, dovodi do smanjenja bola, ali i frekvencije urgentnog pražnjenja bešike (Melchior et al. 2003). Takođe, pokazano je da lečenje DMSO-om smanjuje nivo faktora inflamacije (Kim et al. 2011).

Sporedni efekat tretmana dimetil sulfoksidom je neprijatan miris DMSO-a koji traje i do sedam sati.

## ***2.5 DMSO i CNS***

Višegodišnja ispitivanja efekata DMSO na centralni nervni sistem animalnih modela pokazala su da primena ove supstance dovodi do smanjenja intrakranijalnog pritiska i to brže i efikasnije od bilo kog drugog leka koji se koristi u te svrhe. DMSO je, takođe, stabilizovao krvni pritisak, poboljšao disanje pacijenata i povećao izlučivanje urina (Karaca et al. 1991; Kulah et al. 1990). Tretman DMSO-om povećao je protok krvi kroz kičmenu moždinu do mesta povrede nervnog sistema. Isti efekti DMSO-a primećeni su i pri aplikaciji na ljude.

Podaci koji su dobijeni bili su osnova za širu primenu DMSO, pre svega kod pacijenata sa ozbiljnim povredama glave čiji je intrakranijalan pritisak ostao visok uprkos primeni manitola, steroida, barbiturata (Brown et al. 1980; Bardutzky et al. 2005).

Danas se u Kanadi, Velikoj Britaniji, Nemačkoj, Japanu prepisuje za umirivanje bola, lečenje zapaljenja, skleroderme, intersticijalnog cistitisa, artritisa i u slučaju povećanja intrakranijalnog pritiska.

## **2.6 Mehanizam dejstva i toksičnost DMSO**

Korišćenjem  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NMR spektroskopije kod zamorca pokazano je da ekstremno niske doze DMSO (0.000025%) utiču na metabolizam 3- $^{13}\text{C}$  piruvata tako što povećavaju fluks piruvata u Krebs-ov ciklus (Nasrallah et al. 2008). Usled toga dolazi do povećanja gradijenta protona u mitohondrijama što rezultuje povećanjem produkcije ATP-a (Tarasenko et al. 2006). U mozgu, prilikom stvaranja lezije, dolazi do ishemije okolnog tkiva i hipometabolizma, oštećenja cerebralne autoregulacije kao i pada cerebralnog perfuzionog pritiska (Nortje et al. 2004). Smatra se da pozitivan efekat na oštećenja mozga sisara DMSO ostvaruje upravo preko ovog mehanizma jer u mozgu značajno pada nivo ATP nakon produžene ishemije.

Nakon traumatskih povreda mozga često dolazi do edema mozga. Pokazalo se da DMSO ima antiedemska svojstva koja se mogu objasniti njegovim potentnim diuretičkim efektom, antiinflamatornim dejstvom ili mogućnošću da blokira preterani ulazak jona natrijuma i kalcijuma u ćeliju. Međutim, ima autora koji se ne slažu sa tim da DMSO ima pozitivan efekat na edem mozga. Po njima, 1%DMSO kada se koristi kao nosač može „otvoriti“ krvno-moždanu barijeru i povećati nivo tečnosti u ekstracelularnom prostoru što stvara predispoziciju za razvoj edema krvnih sudova (Kleindienst et al. 2006).

Notman i sar. (Notman et al. 2006) su prvi pokazali da DMSO pravi pore na ćelijskoj membrane i smanjuje njenu rigidnost, što bi mogao biti mehanizam kojim DMSO ostvaruje ulogu nosača molekula. Drugi autori (Gurtovenko et al. 2007) su pokazali da DMSO menja propustljivost membrane na različite načine, u zavisnosti od njegove koncentracije.

Sporedni efekti DMSO su relativno blagi i njihova ekspresija zavisi od primenjene doze i načina aplikacije. Najbolje objašnjeni sporedni efekat DMSO je efekat koji nastaje nakon

intravenske infuzije 40% rastvora. Pokazalo se da dolazi do hemoglobinurije, do urinarne ekskrecije hemoglobina (Waller et al. 1983). Hemoglobinurija nije bila praćena nikakvim promenama renalne funkcije (Muther et al. 1980). Pretpostavlja se da je hemoliza vezana za osmotske promene u eritrocitima prilikom davanja DMSO.

Dovoljno je da se primeni malo manje koncentrovani rastvor, 25-35%DMSO i da se izbegne hemoglobinurija (Karaca et al. 1991, 2002; Kulah et al. 1990).

DMSO se koristi kao 10% rastvor za krioprezervaciju stem ćelija. Prilikom infuzije matičnih ćelija kod nekih pacijenata je dolazilo do akutne encefalopatije, kao i srčanih i gastrointestinalnih poremećaja. Kada su ispitivani efekti drugih supstanci, izgleda da su retko ovakvi slučajevi izazvani baš DMSO-om. S druge strane, prilikom infuzije perifernih krvnih matičnih ćelija čuvanih takođe u DMSO nije bilo nijednog prijavljenog slučaja sporednog efekta, čak ni kod pacijenata koji su imali neko oboljenje mozga (Mueller et al. 2007).

Drugi sporedni efekti primećeni u kliničkoj praksi su glavobolja (nakon primene visokih doza DMSO) i mučnina.

### **3. GLATKA MUSKULATURA**

Kontraktilna funkcija glatkih mišića u velikoj meri određuje funkciju organa u kojima se nalazi. Tako je npr. kontrakcija glatkih mišića arteriola ključna za određivanje njihovog dijametra što značajno utiče na nivo krvnog pritiska, dok je u arterijama odgovorna za elastična svojstva zida, pri čemu minimalno menja njihov dijametar. Glatko mišićno tkivo ima ulogu i u peristaltici gastrointestinalnog trakta, kao i u aktivnosti i funkciji urogenitalnog trakta, tako da bitno utiče na transport hrane, urina, polnih ćelija itd. U koži su odgovorni za piloerekciju, a u irisu kontrolišu dotok svetla u retinu.

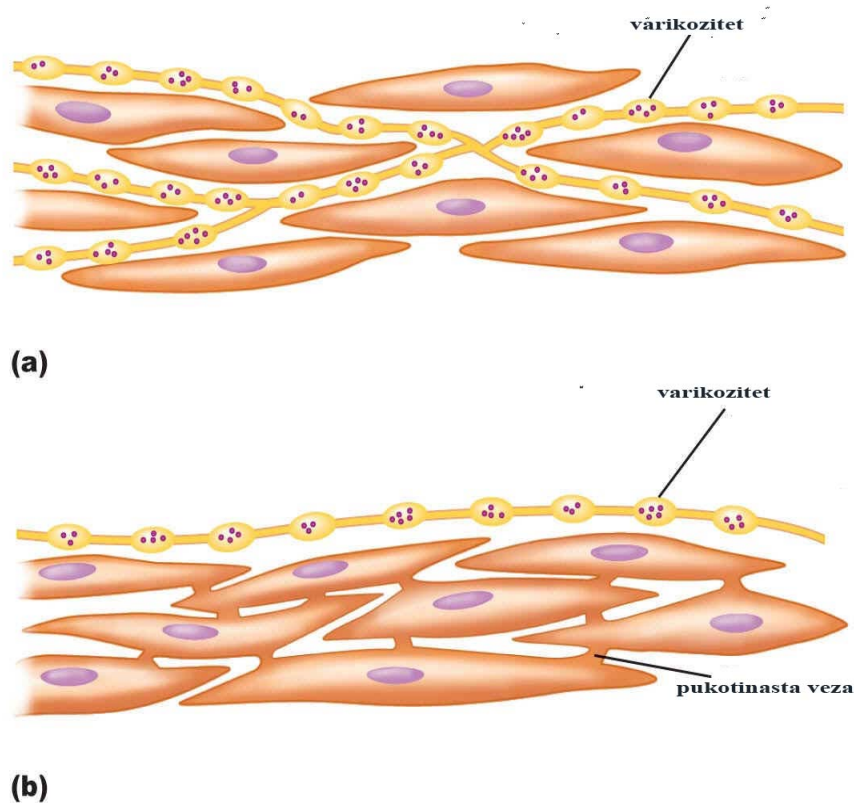
Glatki mišići se razlikuju od skeletnih po histološkoj građi i po funkciji. Nemaju strukturu poprečne ispruganosti poput skeletnih i otud naziv "glatki" mišići. Tokom embriogeneze, glatka muskulatura nastaje uglavnom od mezoderma. Međutim, mišići aorte i plućnih arterija potiču od ektomezenhima nervne kreste, dok glatki mišići koronarne arterije vode poreklo od mezoderma.

### 3.1 *Struktura glatkih mišića*

Glatka muskulatura se klasifikuje u *jednojedinične (single-unit)* i *multijedinične (multi-unit)*. Klasifikacija je napravljena na osnovu različite organizacije vlakana.

Naime, mišićna vlakna koja grade ***jednojedinične mišiće*** grupisana su u guste trake, nepravilno, ali uglavnom tako da uža strana jednog vlakna naleže na širu stranu susednog vlakna. Međusobno komuniciraju preko pukotinastih veza (gap junction) koje su malog otpora tako da omogućavaju brzo širenje električnog signala kroz tkivo (Slika 3b). Ovaj tip glatke muskulature se nalazi u uterusu, gastrointestinalnom traktu i mokraćnoj bešici (Sherwood, 2010).

***Višejedinične glatke*** mišiće čine vlakna čije plazma membrane nisu u komunikaciji preko pukotinastih veza jer se između njih nalazi vezivno tkivo. Svako vlakno radi nezavisno od ostalih i često je inervisano pojedinačnim nervnim završetkom kao skeletna mišićna vlakna. Spoljašnja površina ovih vlakana pokrivena je membranom koju čine kolagen i glikoproteinski fibrili koji pomažu izolaciju pojedinačnih vlakana. Nalaze se u traheji, velikim elastičnim arterijama i u irisu oka (Guyton&Hall, pogl.8, 2003).



Slika 3. Višejedinični (a) i jednojedinični (b) glatki mišići

U odnosu na skeletne mišiće, količina proteina u glatkim mišićima je znatno manja i to naročito kada se porede proteini miozina (svega 20-30% od količine miozina u skeletnim mišićima). Bez obzira na to, razvijaju skoro istu silu pri kontrahovanju, ali je vreme potrebno da se dostigne ta sila znatno duže kod glatke muskulature (Obladen et al. 2005). Odnos aktina i miozina je 15:1, dok je kod skeletnih mišića ovaj odnos 6:1. U zastupljenosti aktina i tropomiozina nema razlike, a poznato je da troponina nema u ćelijama glatkih mišića, kao ni T-tubula, invaginacija sarkoleme. Sekvenca amino kiselina, kao i trodimenzionalna struktura aktina, veoma je slična u obe vrste mišića.

Glatka mišićna ćelija je duga 25-50  $\mu\text{m}$  i široka 2-10  $\mu\text{m}$ , dok su poprečno-prugasti mišići širine od 10-100  $\mu\text{m}$ . Sadrži samo jedno jedro. Ćelije su povezane pukotinastim vezama. Različiti međusobni spojevi glatkih mišićnih ćelija omogućuju međućelijsku električnu i hemijsku komunikaciju (Slika 3,4,5). Membrana glatkog mišića sadrži specifične mikrodomene poznate pod nazivom *lipidni raftovi*. Ovo su regioni bogati holesterolom i sfingolipidima. Veća zastupljenost holesterola u membrani smanjuje njenu fluidnost i obrnuto, što ima veliki značaj u signalizaciji ćelije. Raftovi su u vezi sa citoskeletom, a kada imaju u sebi i protein kaveolin-1, formiraju specifične invaginacije-*kaveole*, specijalizovane

za ćelijsku signalizaciju. Ove invaginacije u sarkoplazmi sadrže mnoštvo receptora (prostaciklin, endotelin, serotonin, muskarinske receptore, adrenergičke receptore), generatore sekundarnih glasnika (adenilat ciklaza, fosolipaza C), G proteine, kinaze (protein kinaza C, protein kinaza A), jonske kanale (L tip kalcijumskih kanala, ATP-zavisne kalijumove kanale, kalcijum zavisne kalijumove kanale) raspoređenih blizu jedan drugom. Kaveole su često u blizini sarkoplazmatičnog retikuluma ili mitohondrija što ukazuje na njihovu metaboličku ulogu (Bergdahl et al. 2004).

Filamenti su slične građe kao u poprečno-prugastim mišićima ali drugačije raspoređeni. Ne formiraju sarkomere, a tanki i debeli miofilamenti su raspoređeni po celoj ćeliji. Tanki miofilamenti su spojeni sa gustim telima (ekvivalente Z diskova), od kojih su neka pripojena za sarkolemu, dok većina pliva po citoplazmi (Slika 4 i 5). Čine ih aktin i tropomiozin. Debeli miofilamenti su sagrađeni od miozina. Miozinske glavice su izgrađene od teških i lakih proteinskih lanaca. Postoji četiri laka lanca-2 imaju molekulska težinu od 17kD, a preostala dva imaju po 20kD. Laki lanci od 20kD podležu fosforilaciji pri povećanju nivoa jona kalcijuma i tako počinje kontrakcija mišića. Kada se laki lanci fosforilišu glavica postaje aktivirana. Enzim koji fosforiliše laki lanac je miozin kinaza lakog lanca – MLCK (myosin light chain kinase).

Postoji tri vrste teških lanaca miozina: **SM-MHC** (smooth muscle myosine heavy chain), koji se nalazi isključivo u glatkim mišićima ćelijama, **NM-MHCA** i **NM-MHCB** (non muscle myosine heavy chain). NM-MHCB se nalazi u embrionskim glatkim mišićima (SMemb) i u ćelijama glatkih mišića koje proliferišu. NM-MHCA se nalazi u miometriju materice, glatkim mišićima krvnih sudova, uključujući aortu i ductus arteriosus (Phillips et al. 1995; Packer et al. 1997; Deng et al. 1993; Saez et al. 1990; Simons et al. 1991). Transkript SM-MHC gena podleže alternativnoj obradi (splicing) kako sa 3' (karboksi terminus ili "rep") tako i 5'-kraja (amino terminus ili "glava"), što je vid regulacije njihove uloge u mišiću, a time i funkcije organa u kom se nalaze (Obladen et al. 2005).

Glatki mišići nemaju troponin ali sadrže tropomiozin, i druge proteine tankog filameta kao što su kalponin i kaldezmon. Veruje se da se i fosforilacija kalponina i kaldezmona dešava za vreme kontrakcije glatkog mišića. Ovi tanki filamenti su uglavnom inhibitorni pri fosforilaciji kalcijumom aktivirane miozina ATP-aze. Postoje dokazi da se fosforilacijom različitim kinazama kalponin i kaldezmon odvajaju od aktina ili im se menja njihova inhibitorna aktivnost.



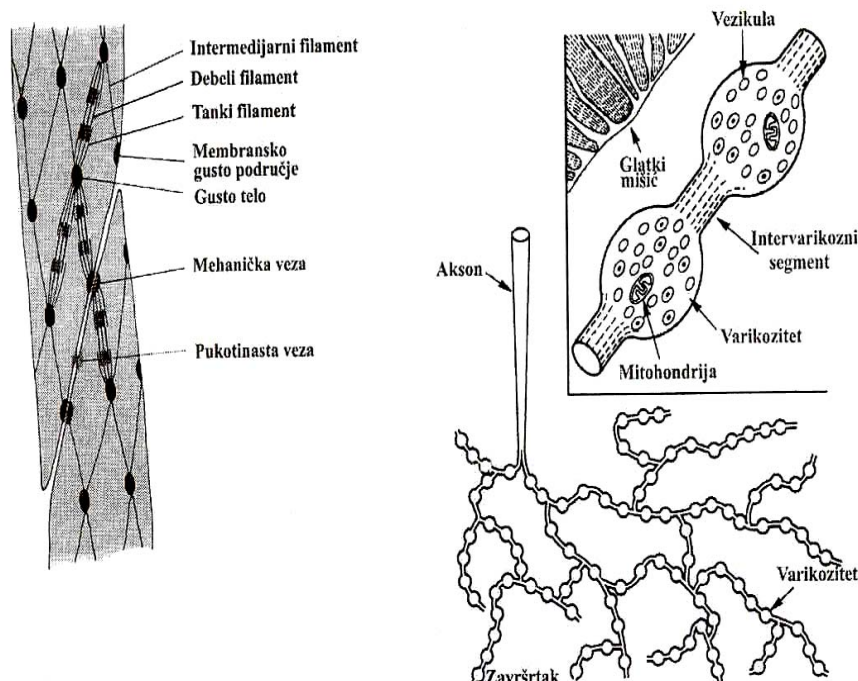
### 3.2 Inervacija i stimulacija glatke muskulature

Glatki mišići su primarno pod kontrolom autonomnog nervnog sistema, za razliku od skeletne muskulature koja je pod kontrolom somatskog nervnog sistema. Jednojedinični glatki mišići imaju pejsmejkerske regione u kojima se kontrakcije generišu spontano i ritmički. Vlakna se kontrahuju potpuno usaglašeno jer je jednojedinični glatki mišić po formi sincicijum.

S druge strane, višejedinične glatke mišićne ćelije su inervisane simpatičkim i parasimpatičkim nervnim vlaknima pri čemu na stimulse odgovaraju nezavisno jedan od drugog.

Pored nervne stimulacije, kontrakcija glatkih mišića može, takođe, biti inicirana opterećenjem - istezanjem, strujom pukotinastih veza i humoralnim agensima. Glatki mišići, za razliku od skeletnih, ne poseduju prave nervno-mišićne spojnice. Akson se završava mnogobrojnim granama koje imaju proširenja, *varikozitete* (Slika 4.).

U ovim varikozitetima se nalazi neurotransmitterska supstanca koja, posle oslobađanja, difunduje i dolazi do većeg broja glatkih mišićnih ćelija.

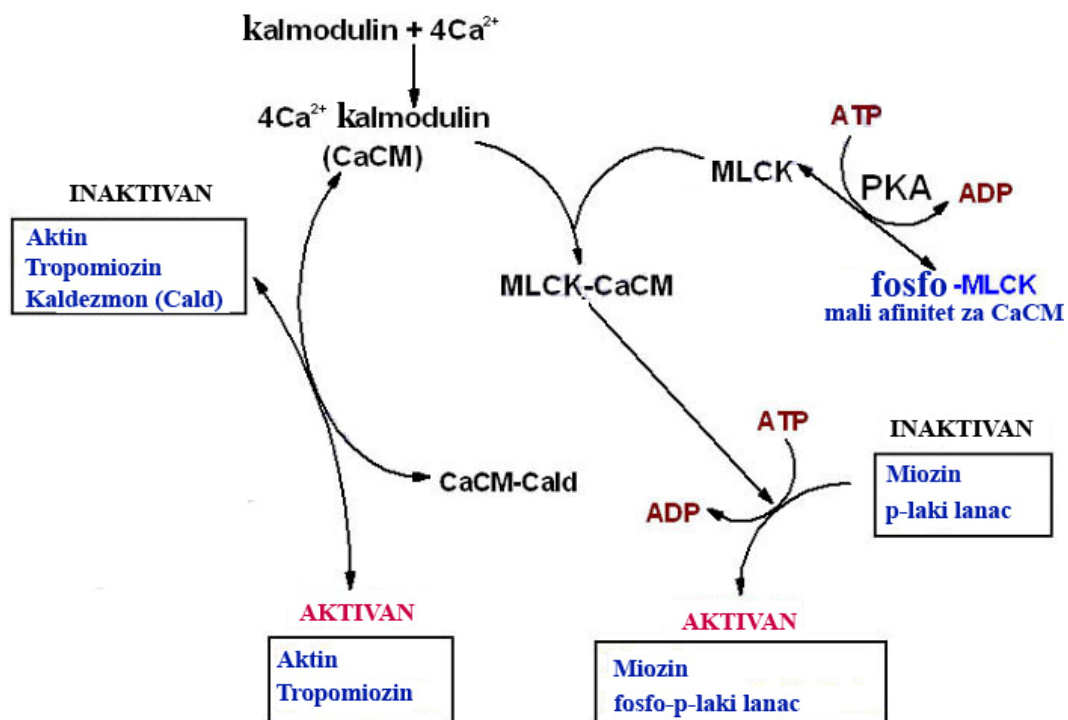


Slika 4. Struktura glatkih mišića (levo) i aksona koji ih inerviše (desno)

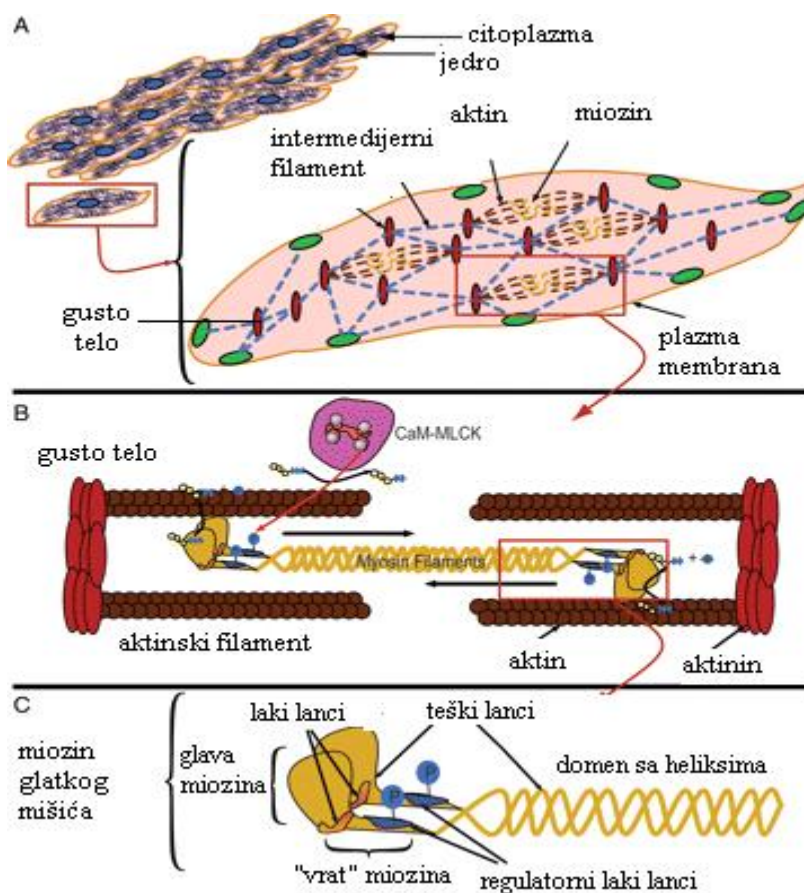
Stimulacija mišićne ćelije dovodi do povećanja ulaska jona kalcijuma u ćeliju kroz L-tip kalcijumskih kanala. Promene na membrani uslovljavaju i aktivaciju inozitol-bifosfata koji se cepa na inozitol-3-fosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). IP3 deluje na receptore na sarkoplazmatičnom retikulumu i kroz Rijanodin receptorske kanale se oslobađa kalcijum. Joni kalcijuma se vezuju za kalmodulin, mali protein koji se nalazi u citoplazmi i zapravo je senzor za  $\text{Ca}^{2+}$ . Za jedan molekul kalmodulina vezuje se sukcesivno 4 jona kalcijuma. Kompleks  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin se vezuje za MLCK i tako je aktivira. Kalcijum-kalmodulin-MLCK kompleks fosforiliše laki lanac miozina od 20kD što aktivira miozin ATP-azu (Šema 1.). Dominantno se fosforiliše serin19 u MLC (myosin light chain), i tada dolazi do konformacionih promena koje aktiviraju ATP-aznu funkciju i afinitet miozina za aktin. Fosforilacija treonina na mestu 18 ima veoma mali uticaj na miozin ATP-aznu aktivnost i brzinu pomeranja aktina (Obladen et al. 2005). Miozin se veže za aktin i uz utrošak energije povlači se duž aktinskog filameta. Jedan korak je oko 10nm, ciklus se ponavlja i naziva se crossbridge cycling, što dovodi do kontrakcije mišića. DAG, zajedno sa jonima kalcijuma, aktivira protein kinazu C (PKC) i ona dalje vrši fosforilaciju serinskih i treoninskih ostataka proteina koji podstiču kontrakcije mišića (npr. kalcijumske kanale za ulazak kalcijuma, MLC ali na ser1, ser2 i tre9 poziciji) (Slika 5). Visok nivo kalcijuma aktivira i rho-kinazu koja fosforiliše enzim miozin fosfatazu lakog lanca (MLCP) i na taj način inhibira njenu aktivnost, odnosno sprečava defosforilaciju MLC. CPI-17 je protein koji takođe učestvuje u inhibiciji MLCP lanca od 17kDa. Smatralo se da je CPI-17 protein kinaza C zavisan protein, ali noviji podaci pokazuju da se aktivira rho-kinazama.

Kada se koncentracija intraćelijskog kalcijuma smanji, pada nivo fosforilacije MLC, smanjuje se potrošnja ATP-a, odnosno energije. Preostali joni kalcijuma se preko ATP-zavisnih  $\text{Ca}^{2+}$  kanala izbacuje iz ćelije, odnosno, vraćaju u sarkoplazmatički retikulum (Slika 6.). Dodatno regulisanje izlaska jona kalcijuma iz ćelije odvija se uz pomoć  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  izmenjivača (Na/Ca exchanger).

## Kontrakcija glatkog mišića

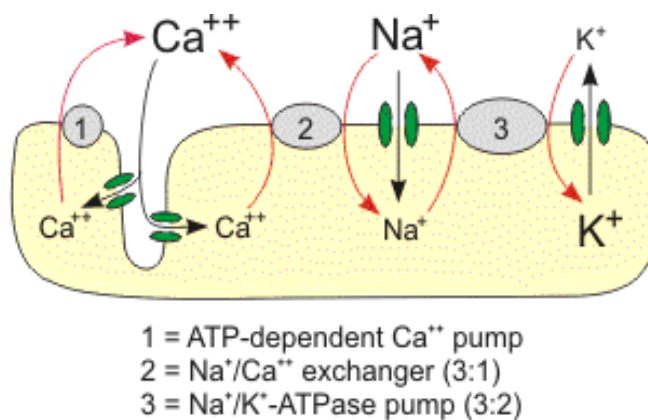


Shema 1 . Kontrakcija glatkih mišića



Slika 5. Struktura kontraktilnog aparata glatkih mišića

(A) Komponente kontraktilnog aparata glatke musculature: miozinski (debeli) i aktinski (tanki) filament, “usidreni” gustim telima (B) CaM-MLCK kompleks aktivira miozin i on se vezuje za aktin (C) Struktura miozina



Slika 6. Načini regulisanja smanjenja jona kalcijuma u ćeliji

1. ATP-zavisni Ca<sup>2+</sup>-kanali
2. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmenjivač
3. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazna pumpa

Relaksacija glatkog mišića može biti inicirana azot-monoksidom (NO), vodonik peroksidom (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), prostaciklinom (PGI<sub>2</sub>), itd. Azot-monoksid aktivira guanilat ciklazu, a PGI<sub>2</sub> stimuliše adenilat ciklazu koji potom povećavaju nivo cGMP, odnosno, cAMP. Dalje, dolazi do aktivacije protein kinaze G i protein kinaze A. Kinaze fosforilišu proteine koji učestvuju u transportu jona kalcijuma, kao npr. L-tip kalcijumovih kanala, IP3 receptorske kanale, ATP-zavisnih Ca<sup>2+</sup> kanala. Takođe, fosforilacijom aktiviraju fosfatazu koja defosforiliše laki lanac miozina (MLC20). Aktiviraju kalcijum osetljive kalijumove kanale koji dovode do hiperpolarizacije ćelije i njene relaksacije.

### **3.3 Tipovi aktivnosti glatkih mišićnih ćelija**

Glatki mišići mogu ispoljiti fazni i tonični tip kontrakcije, što oslikava njihov odgovor na depolarizujuće kalijumove rastvore.

Fazični se kontrahuju i opuštaju brzo. Fazični glatki mišići u gastrointestinalnom i urogenitalnom traktu su regulisani crevnim nervnim sistemom i peristaltičkim pejsmejker ćelijama a to su intersticijalne "Cajal" ćelije.

Tonični se kontrahuju i opuštaju polako i čuvaju energiju. Aktivacija mišićnih ćelija kalijum hloridom (KCl) dovodi do jako brze, prolazne kontrakcije velike sile, a zatim sledi tonični tip kontrakcije-značajno manje sile (1/3 početne sile) i male brzine, koja zapravo predstavlja brzinu pomeranja miozina duž aktina. Takođe, manja je potrošnja energije. Eksperimenti koji su rađeni na glatkoj muskulaturi miševa bez gena za SM-MHC, dakle samo sa genom za NM-MHC, pokazali su da se tonična kontrakcija odvija na uobičajni način. Pritom, nivo kalcijuma je u ovoj fazi aktivnosti mišića blizu bazalnog nivoa (Morano et al. 2000; Löfgren et al. 2003). Ovo biohemijsko i funkcionalno stanje glatkih mišića produžene aktivacije sa minimumom potrošnje energije, male brzine i niskim nivoom kalcijuma naziva se "latch state". Bazalni nivo kalcijuma i nizak nivo fosforilacije MLC20, dovoljni su za aktivnost NM-MHC. Za održavanje takvog nivoa fosforilacije odgovorni su enzimi Rho-kinaza sistema koji se aktiviraju prilikom depolarizacije membrane KCl-om (Mita et al. 2002; Kupittayanant et al. 2001)

### **3.4 ILEUM**

Duodenum, jejunum i ileum zajedno čine tanko crevo kod većine kičmenjaka. Kod riba, ileum nije jasno odvojen pa je pravilnije taj deo creva u ovom slučaju nazvati distalno crevo. Tanko crevo se nalazi u abdominalnoj šupljini i na tom mestu ga drži mezentera, deo peritoneuma specijalizovan za intenzivnu kontrakciju. Mezentera daje potporu crevima, odvaja ih od ostalog dela abdomena i pelvisa te smanjuje mogućnost trenja sa drugim unutrašnjim organima, omogućujući, pak, njihovo pokretanje i peristaltiku. Osim fizičke podrške, mezentera "nosi" nervna vlakna, krvne i limfne sudove bitne za funkciju creva.

Iako ne postoji sasvim jasna granica, ileum se od jejunuma može razlikovati po svetlijoj boji i manjem dijametru, većoj zastupljenosti masnoća u tom delu mezentera i jedinstvenoj zastupljenosti nekapsuliranih limfnih čvorića (tzv. Peyer's patches) bogatih limfocitima i drugim ćelijama imunog sistema.

Od cekuma, koji je početak debelog creva, ileum je odvojen ilocekalnim spojem (ileocecal valve).

Dužina humanog ileuma je 2-4m, kod pacova oko 10cm, a pH je neutralna ili blago alkalna, između 7 i 8.

### 3.4.1 Struktura i funkcija ileuma

Na poprečnom preseku ileuma, počevši od lumena creva ka mezenteri, uočava se više slojeva. U lumenu se nalaze mnoga ispuččenja zida creva, koja liče na prstiće i nazivaju se *resice* ili *vili*. Epitelne ćelije koje čine obod ovih ispuččenja imaju još veći broj *mikroresica* (*mikrovila*). Sve ovo značajno povećava površinu adsorpcije enzima i apsorpcije produkata digestije (slika 7). Između resica nalaze se jamice, Liberkinijeve kripte (nije obeleženo na slici). Epitel creva čine dve vrste ćelija: peharaste ćelije koje luče sluz koja oblaže i štite površinu creva i veliki broj enterocita koje kada su u kriptama sekretuju veliku količinu vode i elektrolita, a one koje su lokalizovane na površini resica reapsorbuju vodu i elektrolite, zajedno sa produktima digestije. Dnevno se u kriptama stvara sekret koji je, zapravo, čista ekstracelularna tečnost, čija je pH od 7.5- 8.0. Tečnost se brzo reapsorbuje u resicama, a ovaj protok je bitan kako bi se obezbedila vodena sredina za apsorpciju supstanci iz himusa koji dolazi u kontakt sa resicama. Dublje u Liberkinovim kriptama se nalaze epitelne ćelije koje se stalno dele i nove ćelije postepeno migriraju duž bazalne membrane kripte prema vrhu resica, gde zamenjuju epitel resica. Životni ciklus jedne epitelne ćelije je približno pet dana. Stare ćelije deskvamacijom odlaze u crevni sok (Guyton & Hall, pogl.64, 2003).

Vili ileuma sadrže veliki broj kapilara i manji broj lakteala, limfnih sudova (slika 8). Ispod resica je sloj mukoze, zatim sloj submukoze i muscularis externa-mišićni sloj koga čine cirkularni i longitudinalni glatki mišići. Oko creva je mezentera građena od dva sloja seroze između kojih je serozna tečnost.

Najvažnija funkcija ileuma je apsorpcija vitamina B<sub>12</sub> (kobalamin), kao i žučnih soli i ostalih produkata digestije koji nisu apsorbovani u duodenumu. Vitamin B<sub>12</sub> ima bitnu ulogu

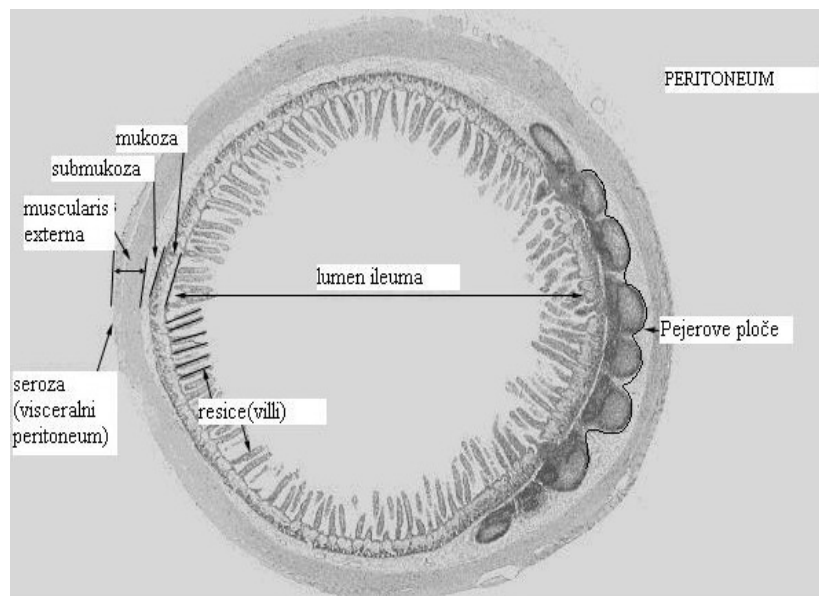
u obnavljanju folata (folna kiselina je bitna za sintezu timina koji ulazi u sastav DNK, za pravilno sazrevanje eritrocita), sintezi masnih kiselina, izvor je enegije, poboljšava koncentraciju, pamćenje, ravnotežu i ima antitumorska svojstva.

Žučne soli se stvaraju u hepatocitama jetre i imaju važnu ulogu u razbijanju masnih partikula unešenih hranom na manje kapljice i smanjenje njihovog površinskog naboja (emulgacija). S druge strane, pomažu u apsorpciji holesterola, monoglicerida, masnih kiselina i drugih lipida tako što sa njima formiraju specifičnu strukturu-micele, koje zbog električnog naboja žučnih soli postaju rastvorljive u himusu. Na taj način lipidi se transportuju do mesta gde će biti apsorbirani (Guyton&Hall, pogl.64, 2003).

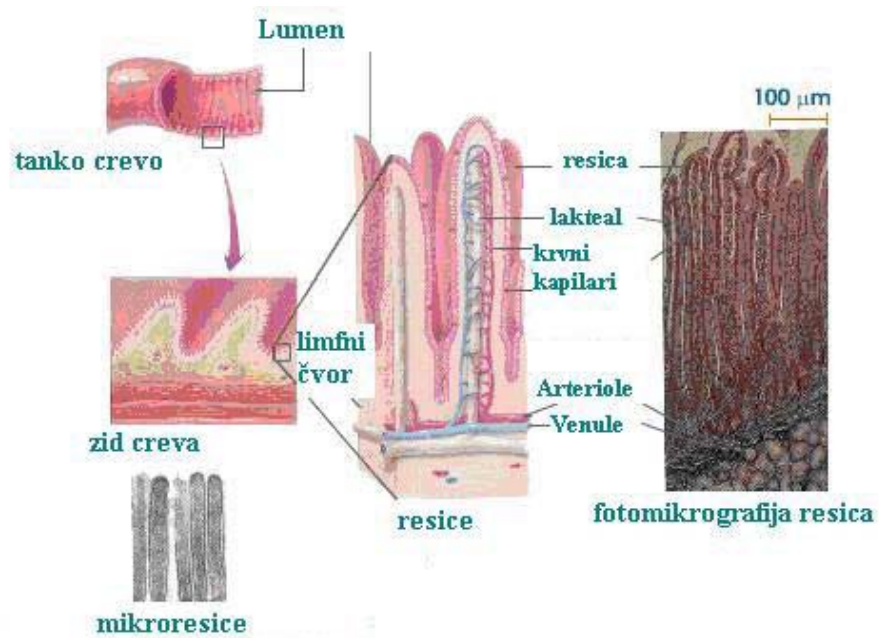
Enterociti, posebno one na resicama, poseduju digestivne enzime koji vare hranljive supstance dok se one apsorbuju kroz epitel. To su: peptidaze (cepaju manje peptide u aminokiseline), sukraze, maltaze, izomaltaze i laktaze koje raskidaju veze u disaharidima i oslobađaju monosaharide i malo lipaza koje razlažu neutralne masti u glicerol i masne kiseline (Guyton &Hall, pogl.64, 2003).

Aminokiseline i glukoza se, zatim, kapilarima u resicama transportuju do hepaticne portalne vene, tj do jetre. Lakteali apsorbuju masne kiseline i glicerol. Uzdužni i kružni mišići svojim specifičnim kontrakcijama i "talasanjem", tzv peristaltikom, omogućuju kretanje produkata varenja hrane duž ileuma. Peristaltika je urođena osobina creva zahvaljujući posedovanju sincicijumske glatke muskulature. Stimulus je obično rastezanje creva, ali i hemijski i fizički nadražaji epitela creva. Osim toga, mnogi impulsi iz parasimpatičkog pleksusa izazivaju peristaltiku. Pokreti su uvek u smeru ka anusu, najverovatnije jer je tako "polarizovan" mienterički pleksus bez kog nema peristaltike (Guyton &Hall, pogl.62, 2003).





Slika 7. Poprečni presek ileuma



Slika 8. Struktura ileuma

### 3.4.2 Enterički nervni sistem i tipovi neurotransmitera koje luče enterički neuroni

Gastrointestinalni trakt (GIT) ima sopstveni nervni sistem koji se naziva enterički nervni sistem. Prostire se od jednjaka do anusa i u potpunosti leži u zidu creva. Kontrolise pokrete i sekreciju u GIT-u, a njegovu veličinu i kompleksnost pokazuje činjenica da je broj neurona približan broju neurona u celoj kičmenoj moždini.

Enterički nervni sistem se sastoji prevashodno iz dva pleksusa:

1. **Mienterički ili Auerbahov pleksus** se prostire između longitudinalnih i cirkularnih mišića i odgovoran je za motoriku GIT-a. Kad je stimulisan, dolazi do povećanja tonusa i toničkih kontrakcija, porasta intenziteta i frekvence ritmičkih kontrakcija i povećanja brzine širenja talasa ekscitacije duž zida creva što dovodi do bržeg prostiranja pristaltičkih talasa.

Impulsi mienteričkog pleksusa mogu biti i inhibitorni, verovatno preko vazoaktivnog intestinalnog polipeptids (VIP). Inhibicija je posebno značajna kada se radi o mišićima sfinkterima koji sprečavaju kretanje hrane između susednih segmenata GIT-a, kao što je npr. pilorusni sfinkter koji kontrolise pražnjenje želuca u duodenum ili ilocekalni sfinkter koji se nalazi na prelazu ileuma u cekum (Costa et al. 1996; Guyton & Hall, pogl.62, 2003).

2. **Submukozni ili Meisnerov pleksus**, unutrašnji pleksus koji leži u submukozi. Kontrolise sekreciju i lokalni krvotok GIT-a (Costa et al. 1996). Mnogi senzorni signali koji su nastali u epitelnim ćelijama zida creva, integrišu se u submukoznom pleksusu i na taj način utiču na lokalnu intestinalnu sekreciju, apsorpciju ili lokalnu kontrakciju submukoznog mišića što uslovljava različit stepen nabiranja mukoze.

Ova dva pleksusa su u međusobnoj vezi i komunikaciji, a isto tako su u vezi sa parasimpatikusom (preko acetilholina) i simpatikusom (dominantno preko noradrenalina), iako enterički nervni sistem može funkcionisati i potpuno samostalno. Veza sa autonomnim nervnim sistemom predstavlja dodatno moduliranje aktivnosti intenzinuma.

Od epitelnih ćelija polaze i senzorni neuroni ka centralnom nervnom sistemu (Guyton & Hall, pogl.64, 2003).

Od neurotransmitera koji utiču na rad creva najbolje proučeni su acetilholin, koji uglavnom pobuđuje aktivnost creva i noradrenalin, koji najčešće ima suprotno dejstvo. Druge supstance koje utiču na rad creva su: adenzin trifosfat-ATP, serotonin (5-hidroksi triptofan, 5-HT), dopamin, holecistokinin (CCK), supstanca P (SP), vazoaktivni inestinalni polipeptid (VIP), somatostatin, leu-enkefalin, met-enkefalin. Njihov uticaj na rad intenzinuma, međutim, nije u potpunosti determinisan i razjašnjen.

**Dopamin** je prekursor sinteze adrenalina i noradrenalina. Oslobađa se na nekoliko mesta u CNS. Oslobođen iz mezolimbickog dela deluje, između ostalog, na receptore u GIT-u izazivajući osećaj sitosti. Takođe, deluje na D2 receptore u intenzinumu koji su kuplovani sa Gs proteinima i aktiviraju adenilat ciklazu. Ovako dopamin ispoljava antiemetički efekat.

**Serotonin (5-HT)** se najvećim delom sintetiše u enterohromafinim ćelijama GIT-a, neuroendokrinim ćelijama koje se nalaze na resicama zida creva. 90% ukupnog depoa serotonina organizma je u ovim ćelijama. Oslobađa se kao odgovor na hemijske, mehaničke i patološke stimuluse i deluje na 5-HT<sub>3</sub> receptore izazivajući osećaj mučnine i povraćanje, što je odbrambeni mehanizam organizma.

**Holecistokinin (CCK)** se sintetiše u I ćelijama tankog creva. Stimulus za njegovo oslobađanje je kad u duodenum stigne himus bogat masnim kiselinama, peptidima i aromatičnim aminokiselinama. Glukoza je isto stimulus za oslobađanje CCK. S druge strane, povećan nivo tripsina u duodenumu inhibira oslobađanje holecistokinina. Na efektorne ćelije deluje tako što aktivira fosfolipazu C (PLC). Ovo je takođe značajno za njegovo dejstvo na sfinkter Oddi koji se nalazi između zajedničkog žučnog kanala i duodenuma i njegovim kontrakcijama žuč dospeva u tanko crevo.

**Vazoaktivni inestinalni polipeptid (VIP)** luče endokrine ćelije duž celog GIT-a. Deluje relaksantno na glatke mišiće creva, povećava protok žuči.

**Supstanca P** povećava motilitet creva, stimuliše kontrakcije žučne kese.

**Leu- i Met-enkefalin** su varijante enkefalina, peptida koji ima 5 aminokiselina, s tim da se u slučaju Leu-enkefalina leucin nalazi na poslednjem mestu, a kod drugog tipa je metionin na kraju lanca. Oni su endogeni ligandi, deluju na delta opioidne receptore tako da smanjuju osećaj bola. Ovi receptori su G protein kuplovani receptori, a imaju oko 40% sličnosti sa receptorima za serotonin.

### 3.5 UTERUS

Reproduktivni sistem žene čine sledeći organi: jajnici (*ovariumi*), jajovod (*tuba uterina Falopi*), materica (*uterus*) i vagina. Reproductivna funkcija žene započinje sazrevanjem jajne ćelije u jajnicima. Jajne ćelije su formirane još u fetalnom periodu, ali ne potpuno zrele. Sredinom mesečnog ciklusa obično jedna jajna ćelija potpuno sazri i biva izbačena u jajovod i kreće ka materici. Ukoliko bude oplodena spermatozoidom usađuje se u matericu gde se razvija embrion, zatim fetus. Materica se nalazi u delu abdomena koji se naziva pelvis, dorzalno od mokraćne bešike.

Paralelno sa razvojem jajne ćelije u jajnicima, materica zadebljava pod uticajem hormona estrogena koga luče jajnici i tako se priprema za usađivanje i ishranu potencijalno oplodene jajne ćelije, tj za embrion. Ako oplodjenje izostane dolazi do deskvamacije (ljuštenja) zida materice što se manifestuje krvarenjem iz uterusa.

Hormonski sistem žene ima tri hijerarhijska nivoa:

1. iz hipotalamusa se luči *gonadotropin-oslobađajući hormon (GnRH)* koji utiče na oslobađanje
2. *folikulostimulirajućeg (FSH)* i *luteinizirajućeg hormona (LH)* iz adenohipofize. Pod dejstvom ovih hormona luče se
3. hormoni jajnika-*estrogen i progesteron*

Izlučivanje ovih hormona odvija se ritmički tokom meseca i praćeno je odgovarajućim promenama u jajnicima i materici. Ritmičnost ovakvih promena naziva se mesečni polni ciklus žene ili period. Obično traje 28 dana. Takođe, pomenuti hormoni, ali i oksitocin i CGRP imaju značajnu ulogu tokom trudnoće:

-*estrogen* iz jajnika i placente (u trudnoći) utiče na zadebljavanje zida materice;

-*progesteron* iz jajnika i placente je bitan za održavanje trudnoće i smanjenje kontrakcija kako ne bi došlo do prevremenog porođaja.

-*CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide)* se oslobađa iz presinaptičkog pupoljka i takođe učestvuje u smanjenju kontrakcija tokom trudnoće, sve do porođaja. Tokom mesečnog ciklusa njegova aktivnost je najslabija tokom ovulacije, jer je tada neophodno da se uterus kontrahuje kako bi spermatozoidi lakše dospeli do zrele jajne ćelije.

-*oksitocin* je peptid iz neurohipofize koji snažno stimulise kontrakcije gravidnog uterusa u vreme porođaja, što je stimulirano dilatacijom grlića materice. Kontrakcije postaju sinhronizovane zahvaljujući vezama između mišićnih ćelija koje se zovu pukotinaste veze (gap junction).

Uterus čine tri sloja:

1. **Endometrijum** (unutrašnji sloj-mukoza) uterusa podleže najvećim promenama tokom mesečnog ciklusa žene, odnosno, zadebljava paralelno sa sazrevanjem jajne ćelije i ovulacijom, a ljušti se ukoliko do oplodjenja ne dođe.

Ćelije epitela endometrijuma su pravougaonog oblika a ispod njih je široka lamina propria, tzv. endometrijalna stroma u kojoj se nalaze tzv. materične ćelije koje sintetišu prostaglandine i koje se otvaraju prema miometrijumu.

2. **Miometrijum** (srednji, mišićni sloj) se sastoji od tri sloja koja se razlikuju po pravcu pružanja glatkih mišića: spoljne slojeve čine mišići sa longitudinalnim pravcem pružanja, dok su mišići između ova dva sloja kružno postavljeni u odnosu na pravac pružanja materice. Ovaj sloj ima puno velikih krvnih i limfnih sudova.

Tokom trudnoće, povećava se broj i dužina glatkih mišićnih ćelija (i do 20 puta). Nove glatke mišićne ćelije se diferenciraju od nediferenciranih ćelija vezivnog tkiva, kao i od već postojećih glatkih mišića.

Takođe se uvećava i elastično tkivo u perifernom miometrijumu (Guyton & Hall, pogl.81, 2003).

U endometrijumu i miometrijumu se sintetišu prostaglandini:  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (deluje preko FP receptora),  $\text{PGE}_2$  (deluje preko EP receptora),  $\text{PGI}_2$  (deluje preko IP receptora). Prostaglandini utiču na kontraktilnost glatke muskulature materice i grlića materice.

$\text{PGI}_2$ -prostaciklin je vazodilatator i inhibitor agregacije trombocita, dok prva dva kontrahuju matericu.  $\text{PGE}_2$  se koristi za olakšavanje početka porođaja jer omekšava grlić a kontrahuje uterus.

$\text{PGF}_{2\alpha}$  i  $\text{PGE}_2$  učestvuju u ishemičnoj nekrozi endometrijuma pred menstruaciju i pomažu tom prilikom izbacivanje sadržaja u lumen materice.

3. **Perimetrijum** (spoljni sloj-seroza) je pelvicni peritoneum oko materice u kom se nalaze ligamenti koji održavaju uterus na tom mestu u organizmu. Kroz ovaj sloj do materice dopiru

mnogi krvni i limfni sudovi, kao i nervi. Simpatički deo autonomnog nervnog sistema dolazi do materice preko hipogastričnog plexusa, a parasimpatički deo polazi od 2., 3. i 4. para sakralnih nerava. Nervni putevi do uterusa dolaze preko grlića.

### 3.5.1 Reproductivni sistem ženke pacova

Ženka pacova ima dva jajnika koja se nalaze ispod bubrega, na krajnjoj levoj, odnosno desnoj strani abdomena. Jajne ćelije koje se proizvode u jajnicima oslobađaju se u jajovode (ili Falopijeve tube), koji su kod pacova veoma kratki i teško uočljivi kao zasebne celine.

Uterus pacova čine dva roga koji daju uterusu oblik slova V. Svaki rog polazi od jajovoda i približavaju se jedan drugom blizu bešike, ali imaju zasebne otvore u cerviks. Grlić uterusa je svetlije boje i ima čvršće vezivno tkivo od rogova uterusa. Oblik uterusa pacova predstavlja morfološku adaptaciju koja omogućava simultani razvoj nekoliko embriona i višestruke, uzastopne porođaje. Grlić se nastavlja u vaginu koja se otvara u spoljašnji deo u koji ulazi sperma tokom kopulacije. Inače, zrele jajne ćelije prolaze od jajnika kroz jajovode i oploduju se u uterusu. Zigoti, budući embrioni, sukcesivno se potom smeštaju u zid uterusa. Period gestacije traje 21 dan, a rađa se u proseku 6-8 mladunaca (Slika 9).

Polni ciklus ženke pacova- estrusni ciklus deli se u 4 faze (proestrus, estrus, postestrus ili metestrus i diestrus) i traje 4-5dana.

Može doći do odstupanja, tj do produžetka ciklusa za dan ili dva, i to je obično dan više u estrusu ili diestrusu. (Westwood, 2008). Faze ciklusa mogu se pratiti pregledom vaginalnog brisa i morfologije reproduktivnih organa ženke, jer svaka faza se odlikuje prisustvom specifičnih ćelija u brisu, a takođe se menja izgled epitelnih ćelija materice, nivo vaskularizacije, kao i mikroflora.

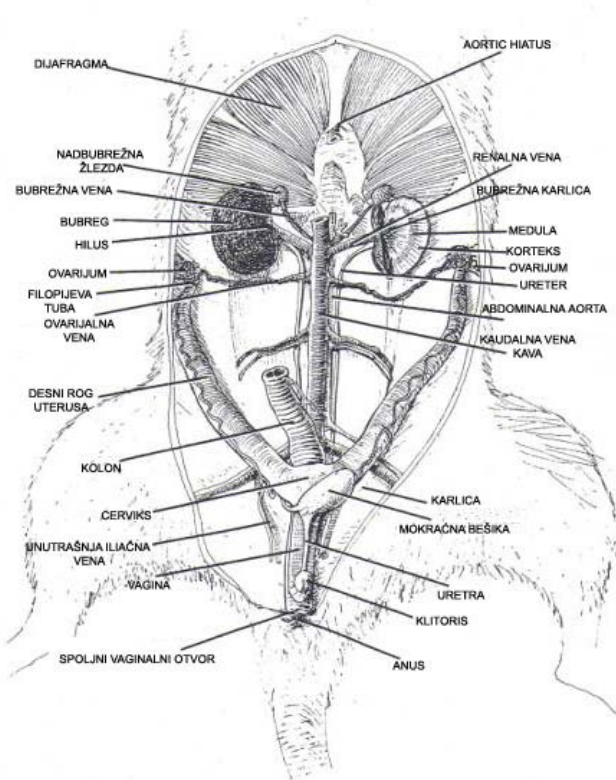
Sazrevanje žutog tela (corpus luteum) u jajnicima počinje u postestrusu i traje do proestrusa, ali morfološki se održava 12-14 dana, tako da "živi" 2-3 ciklusa (Westwood, 2008).

Nivo hormona se takođe menja tokom faza estrusnog ciklusa.

Nakon ovulacije, u postestrusu i diestrusu počinje da raste nivo estrogena a maksimum dostiže u proestrusu. Krajem postestrusa raste nivo progesterona poreklom iz žutog tela. Nivo progesterona se polako smanjuje do kraja proestrusa kada ponovo raste, lučenjem iz folikula koji je sazreo i koji će potom ovulirati.

Posle vrhunca estrogena, dolazi do naglog povećanja nivoa prolaktina, LH, FSH.

Tokom ciklusa, progesteron utiče na zadebljanje endometrijuma i priprema matericu za trudnoću, dok je u trudnoći bitan za mirovanje uterusu dok se ne približi termin porođaja. Kod ženke pacova nivo ovog hormona opada između 18. i 20. dana trudnoće, kada raste nivo estrogena što znači da se povećava aktivnost uterusu, neophodna za porođaj.



Slika 9. Uterus ženke pacova

### 3.5.2 Specifičnosti kontraktilnog mehanizma uterusa

Uterus je "miogeno" tkivo, sposobno da se kontrahuje kako *in vivo*, tako i *in vitro*, bez spoljašnje stimulacije. Međutim, dosadašnja istraživanja nisu detektovala ćelije koje imaju takva histološka i elektrofiziološka svojstva da mogu funkcionisati kao pejsmejkeri (Popescu et al. 2007; Hinescu et al. 2008).

Kontraktilnost glatke muskulature zavisi od ulaska jona kalcijuma iz ekstracelularnog prostora i njegovog oslobađanja iz intracelularnih depoa-prevažodno iz sarkoplazmatičnog retikuluma.

Osim L-tipa  $\text{Ca}^{+2}$  kanala, miometrijum poseduje više izoformi i splajs varijanti T-tipa  $\text{Ca}^{+2}$  kanala (Ohkubo et al. 2005). Ovi kanali imaju bržu kinetiku od L-tipa i veliki kapacitet. Takođe, aktiviraju se pri nižim koncentracijama  $\text{Ca}^{+2}$  (Sperelakis et al. 1992b). Smatra se da im je uloga da podignu potencijal membrane do -40mV, tako da se aktivira L-tip kanala koji, zatim, može duže održavati nivo ekscitiranosti glatkog mišića.

Blokiranjem T-tipa  $\text{Ca}^{+2}$  kanala bitno se usporavaju spontane kontrakcije uterusa (Blanks et al. 2007).

Na modelu humanog i animalnog uterusa dokazano je oslobađanje jona kalcijuma iz SR i identifikovani su IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) i Rijanodin receptori (RyRs) na membrani SR (Taggart&Wray 1998a; Luckas et al. 1999). Međutim, kada je uterus u pitanju, za razliku od glatkih mišića drugih organa, izgleda da oslobađanje  $\text{Ca}^{+2}$  kroz ove receptore neznatno doprinosi kontrakcijama miometrijuma. Blokiranjem SR  $\text{Ca}^{+2}$ -ATP-aze (SERCA) ciklopijazičnom kiselinom onemogućava se transport jona kalcijuma u SR i stvaranje depoa kalcijuma. Ipak, rezultati nekih istraživača pokazuju da blokadom SERCA nije smanjena tzv. prolazna (transient  $\text{Ca}^{+2}$ ) struja  $\text{Ca}^{+2}$ , kao ni jačina kontrakcija (Taggart&Wray, 1998a; Kupittayamant et al. 2002; Noble&Wray, 2002). Bazirano na eksperimentima na glatkim mišićima uretera i krvnih sudova smatra se da je uloga tzv. iskri jona kalcijuma (sparks) iz SR da, s jedne strane doprinose tonusu, ali da im je još važnija uloga u aktivaciji  $\text{Ca}^{+2}$ -zavisnih  $\text{K}^{+}$  kanala (BK kanali)(Nelson et al. 1995; Miriel et al. 1999). SR je lokalizovana u blizini plazma membrane mišićne ćelije, tako da je lokalna struja jona kalcijuma u blizini BK kanala dovoljna da izazove aktivaciju kanala, a time malu hiperpolarizaciju membrane koja je potrebna za postepeno smanjivanje otvorenosti L-tipa  $\text{Ca}^{+2}$ -kanala i relaksiranje mišića (Burdyga&Wray, 2005).



Distribucije i ekspresija BK kanala u uterusu regulisana u zavisnosti od perioda gestacije (Khan et al. 2001) jer oni imaju ulogu u održavanju uterusa u mirnom stanju kada je to potrebno. Međutim, veza između SR, RyRs i BK-kanala u uterusu nije nađena: kafein, agonist RyR, ne povećava nivo jona kalcijuma kao u srčanom mišiću i u intaktnom tkivu dovodi do relaksacije; antagonizam RyRs ili ne utiče uopšte ili čak veoma malo povećava nivo  $Ca^{+2}$ ; inhibicija BK kanala nema uticaja na jačinu kontrakcija (Mironneau et al. 2002). Isto tako, rijanodin, koji u srčanom mišiću dovodi do oslobađanja kalcijuma iz SR i u malim koncentracijama, u mišićnim ćelijama miometrijuma ima mali ili nikakav efekat na nivo  $Ca^{+2}$ . Sve ovo može biti posledica alternativne obrade (splicing) mRNK za RyRs u uterusu čime je smanjena njihova sposobnost da "proizvode" iskre  $Ca^{+2}$  ili su, pak, iskre kratkoživuće pa ih je teško detektovati (Dabertrand et al. 2006).

Agonisti koji podstiču  $Ca^{+2}$ -senzitivizaciju uglavnom deluju tako što održavaju enzim MLCP u neaktivnom stanju. Dok je u većini tkiva sa glatkim mišićima MLCP inaktivacija posredovana rho-kinazama, u uterusu to nije slučaj. Korišćenjem supstance Y-27632, koja inhibira sve rho, pokazano je da u uterusu rho-kinaze imaju mali uticaj na održavanje kontrakcija (Kupittayanant et al. 2001). Smatra se da veći uticaj na  $Ca^{+2}$ -senzitivizaciju ima protein CPI-17, koji takođe inhibira MLCP.

Tokom relaksacije glatkih mišića uterusa dolazi do efluksa jona kalcijuma iz ćelije preko  $Ca^{+2}$ -zavisne ATP-aze (PMCA) i  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  izmenjivača. Postoji nekoliko izoformi PMCA, ali u uterusu su zastupljene izoforme 1, 4 i 2. Imaju visok afinitet za jone kalcijuma i dominantno (70%) učestvuju u izbacivanju jona iz ćelije.  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  izmenjivač ima manji afinitet ali veliki kapacitet- u efluksu  $Ca^{+2}$  učestvuje manjim delom (Shmigol et al. 1998, 1999).

Važan uticaj na signalizaciju tkiva uterusa imaju *lipidni raftovi*. Modifikovanjem nivoa holesterola u membrani mišićnih ćelija menja se fluidnost membrane i aktivnost tkiva. Smanjenjem zastupljenosti holesterola značajno se povećava i spontana i agonist-indukovana kontraktilnost uterusa. Jedno objašnjenje je da su uz raftove smešteni BK kanali i da što ih je više, uterus je "mirniji" (Smith et al. 2005; Noble et al. 2006). Međutim, i uticaj estrogena i oksitocina zavisi od zastupljenosti lipidnih raftova i gustine kaveola, ali o tome još nema dovoljno preciznih podataka.

## 4. OKSIDACIONI STRES I REAKTIVNE VRSTE KISEONIKA (ROS)

Kod svih aerobnih organizama kiseonik je primarni oksidant u reakcijama oksidacije različitih organskih jedinjenja u kojima se dobija energija. Molekulski kiseonik nije toksičan. U osnovnom stanju je bi-radikal jer poseduje dva nesparena elektrona, ali su oni paralelni tj. istog spina. Zbog toga kiseonik može reagovati samo sa po jednim elektronom, što ga čini slabo reaktivnim molekulom. S druge strane, ukoliko se jedan od elektrona eksitira i promeni spin, tada nastaje veoma moćan oksidant-singlet kiseonik, čiji antiparalelni elektroni brzo reaguju sa drugim parovima elektrona, naročito u dvostrukoj vezi (Žikić i sar. 2000; Turrens, 2003).

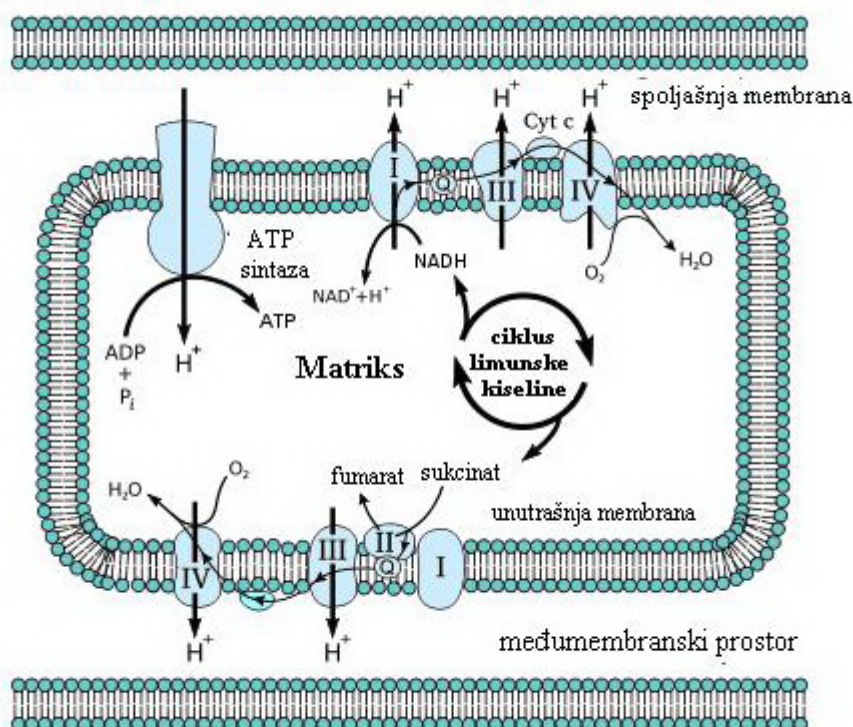
U respiratornom lancu mitohondrija molekularni kiseonik se u nekoliko koraka, svaki put sa po jednim elektronom, redukuje do vode. Faze ove redukcije odvijaju se u kompleksima (I-IV) koji čine respiratorni lanac lokalizovan na unutrašnjoj membrani mitohondrija (slika 10). Redukcioni potencijali kompleksa u mitohondrijama su različiti, ali takvi da se favorizuje monovalentna redukcija (Turrens, 2003). Samo kompleks IV (citohrom c oksidaza) čuva delimično redukovane molekule kiseonika sve do njihove potpune redukcije u vodu. U ostalim redoks centrima elektron transportnog lanca dolazi do "curenja" delimično redukovanih molekula kiseonika, kako u matriks, tako i u citoplazmu mitohondrija (Turrens, 2003). Najviše je zastupljen superoksid anjon koji dalje može biti supstrat za formiranje drugih reaktivnih vrsta. Relativan doprinos "curenju" superoksid anjona svakog od kompleksa (I-III), u normalnim uslovima, varira od organa do organa. Smatra se da u mitohondrijama srca i pluća najviše anjona potiče iz kompleksa III (Turrens & Boveris, 1980; Turrens et al. 1982), dok u mozgu kompleks I predstavlja glavni izvor superoksid anjona (Barja & Herrero, 1998; Barja, 1999).

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) čine slobodni radikali kiseonika (vrste sa nesparenim brojem elektrona, kao što su superoksid anjon i hidroksil radikal), ali i vodonik peroksid i singlet kiseonik koji su veoma reaktivni iako nemaju nesparene elektrone (Tabela 1). Osim u mitohondrijama, reaktivne vrste kiseonika mogu nastati i u peroksidomima, ćelijskim membranama i oksidacijom membranski vezanih i drugih enzima.

U homeostatskim uslovima, ROS učestvuje u intraćelijskoj signalizaciji (Droge, 2002), mobilizaciji ćelija imunog odgovora u inflamaciji, u procesu fotosinteze (Kawano, 2003).

Aerobni organizmi su razvili i antioksidativni sistem zaštite u vidu enzima koji regulišu nivo reaktivnih vrsta kiseonika.

Ukoliko se naruši balans između produkcije i uklanjanja reaktivnih vrsta, narušava se homeostaza i dolazi do oksidacionog stresa u organizmu. Reaktivne vrste nastaju i delovanjem ksenobiotika koji mogu blokirati neku komponentu elektron transportnog lanca ili pak, mogu preuzeti elektron od nekog donora i "predati" molekulu kiseonika, ne remeteći procese u respiratornom lancu, ali ipak, produkujući tako superoksid anjon (Turrens, 2003). Povišen nivo reaktivnih vrsta dovodi do niza ROS posredovanih reakcija kojima se narušavaju strukture, time i funkcije niza proteina (Stadtman & Levine, 2000), lipida (Rubbo et al. 1994) i DNK (Richter et al. 1988; Ledoux et al. 1999), što daje širok spektar mogućih ozbiljnih oštećenja tkiva i organa.



Slika 10. Respiratorni lanac u mitohondrijama

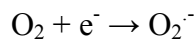
Kompleks I (NADH dehidrogenaza); kompleks II (sukcinat dehidrogenaza); kompleks III (ubikinol-citohrom c reduktaza ili citohrom  $bc_1$  kompleks) i kompleks IV (citohrom c oksidaza)

Reakcije	Produkti
$O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$	Superoksid anjon radikal
$O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksil radikal
$O_2 + 2e^- \rightarrow H_2O_2$ $2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	Vodonik peroksid
$O_2 + 3e^- \rightarrow \cdot OH$ $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ $H_2O_2 + Cu^+ \rightarrow Cu^{2+} + \cdot OH + OH^-$ $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$	Hidroksil radikal
$\cdot OH + RH \text{ ili } LH \rightarrow H_2O + R^{\cdot} \text{ ili } L^{\cdot}$	Oksidacija masnih kiselina ili drugih organskih molekula
$R^{\cdot} \text{ ili } L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LO_2^{\cdot} \text{ ili } RO_2^{\cdot}$	Peroksil radikal
$LO_2^{\cdot} + LH \rightarrow L^{\cdot} + LOOH$	Organski hidroperoksid
$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow {}^1O_2 + H_2O_2$ $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow {}^1O_2 + H_2O + OH^-$	Singlet kiseonik
$O_3$	Ozon

Tabela 1. Reaktivne vrste kiseonika (Halliwell I Gutteridge, 1999)

## 4.1 Superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ )

Kada se molekularni kiseonik redukuje jednim elektronom nastaje superoksid anjon radikal.



Ova reakcija se dešava tokom transporta elektrona u respiratornom lancu na unutrašnjoj membrani mitohondrija, kao i u hloroplastima i endoplazmatičnom retikulumu.

Superoksid anjon nastaje delovanjem enzima kao što su NADPH oksidaze, lokalizovanih na ćelijskoj membrani makrofaga, endotelnih ćelija i neutrofila (Babior, 2000; Vignais, 2002; Babior et al. 2002; Paravicini et al. 2008), citohrom P450-zavisne oksigenaze (Coon et al. 1992), ksantin oksidaze (Yokoyama et al. 1990). Kada nastaju delovanjem NADPH oksidaza u ćelijama imunog odgovora, učestvuju u borbi protiv patogena. Superoksid anjon učestvuje i u produkciji eritropoetina, u uslovima hipoksije kada je aktiviran od strane HIF-1 (hypoxia-inducible factor), glavni regulator homeostaze kiseonika (Droge, 2002; Smith, 2008). Izvor superoksid anjona je i oksidacija hemoglobina i mioglobina (Droge, 2002) i autooksidacija adrenalina, cisteina, gliceraldehida, flavina.

Superoksid anjon je kratkoživi slobodni radikal jer brzo biva redukovan (spontano ili enzimom superoksid dismutaza) do vodonik peroksida. Ovo je dominantna reakcija, ali može doći i do reakcije sa azot-monoksid radikalom pri čemu nastaje veoma štetan i jak oksidant-peroksinitrit (Radi et al. 2002b) (Šema 2). Kroz membrane superoksid anjon može proći samo preko jonskih kanala (Paravicini et al. 2008).

Dobijen delovanjem ksantin oksidaze, superoksid anjon učestvuje u razvijanju hipertenzije i vaskularnih disfunkcija (Paravicini et al. 2008). Takođe, deluje tako što depolimerizuje polisaharide, deaktivira enzime, oštećuje ćelijske membrane, remeti sintezu i transkripciju DNK i RNK. Posledice ovih procesa mogu dovesti do kancerogeneze, ali i inaktiviranja virusa i bakterija (Droge, 2002).

## 4.2 Vodonik peroksid ( $H_2O_2$ )

Vodonik peroksid nastaje spontanom ili superoksid dismutaza posredovanom dismutacijom superoksid anjona. Spontana dismutacija je olakšana u intermembranskom prostoru mitohondrija jer ova sredina ima nisku pH vrednost s obzirom na to da se gradijent protona koristi za sintezu ATP-a.



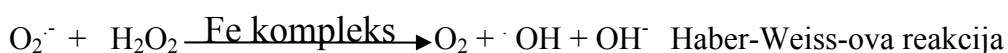
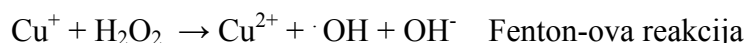
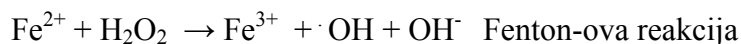
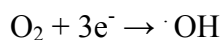
Može nastati i direktnom redukcijom molekuskog kiseonika sa dva elektrona.

Produkcija vodonik peroksida odvija se najviše u peroksizomima, mitohondrijama, ali i u endoplazmatičnom retikulumu. Može nastati i na membranama organela ili ćelije (Halliwell, 2000; Turrens, 2003). Za razliku od superoksid anjona čije oslobađanje iz elektron transportnog lanaca linearno raste u zavisnosti od povećanja koncentracije kiseonika, vodonik peroksid se oslobađa bifazno. Pri većoj koncentraciji se oslobađa jako brzo, dok pri manjim koncentracijama se oslobađa nesrazmerno sporije (Turrens et al. 1982). Toksičnost vodonik peroksida ogleda se u tome što u reakciji sa superoksid anjonom (Haber-Weiss-ova reakcija) i jonima metala ( $Fe^{2+}$  i  $Cu^+$  u Fentonovoj reakciji) produkuje hidroksil radikal, izrazito reaktivan i štetan radikal (Haber, Weiss, 1934; Fenton, 1894; Liochev&Fridovich, 1999).

S druge strane, poznato je da vodonik peroksid ima antivirusno, antibakterijsko i antifugalno dejstvo (Mentel et al. 1977; Thomas et al. 1994; Szymańska, 2006). Smatra se da ima bitnu ulogu u imunom odgovoru-oslobađa se iz oštećenih tkiva i predstavlja signal za leukocite, koji se tada skupljaju oko mesta povrede. Endogeni vodonik peroksid, oslobođen iz mitohondrija, zajedno sa superoksid anjonom i kompleksom III u mitohondrijama, ima bitnu ulogu u sistemskim i intracelularnim promenama u uslovima umerene hipoksije. Tada, naime, stabilizuju HIF-1 transkripcioni faktor koji utiče na čitav niz procesa bitnih za minimalizaciju štetnih efekata niske koncentracije kiseonika (povećava se sinteza enzima glikolize, tj. produkcija ATP-a, stimuliše sinteza eritrocita, angiogeneza itd) (Smith et al. 2008). Vodonik peroksid verovatno ima i ulogu u produžavnju poluživota semikinona koji je, inače, odgovoran za dostupnost kiseonika elektronima u elektron transportnom lancu (Muller et al. 2004).

### 4.3 Hidroksil radikal ( $\cdot\text{OH}$ )

Hidroksil radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) nastaje troelektronskom redukcijom kiseonika i u reakcijama vodonik peroksida sa fero i kupro jonima (Fentonova reakcija)



Nastaje i iz reakcije vodonik peroksida sa superoksid anjonom u Haber-Vajsovoj reakciji. Poluživot ovog najtoksičnijeg radikala je veoma kratak ( $\sim 10^{-9}\text{s}$ ) jer reaguje brzo sa drugim molekulima dajući sekundarne radikale koji su takođe reaktivni. Ne može biti uklonjen nijednim enzimom. Reaguje sa svim makromolekulima: ugljenim hidratima, proteinima (konvertuje fenilalanin u tirozin), nukleinskim kiselinama (izaziva mutacije), lipidima (izaziva lipidnu peroksidaciju). Neke od oštećenja mogu "popraviti" glutation i sistem za reparaciju nukleinskih kiselina.

### 4.4 Singlet kiseonik ( $^1\text{O}_2$ )

Singlet kiseonik, poput vodonik peroksida, spada u reaktivne vrste kiseonika, ali ne i slobodne radikale jer nema nesparenih elektrona. Nastaje ekscitacijom (dovođenjem energije) u molekularni kiseonik pri čemu dolazi do promene spina jednog od dva elektrona koji su inače paralelni (istog spina, tzv triplet osnovno stanje kiseonika)(Turrens, 2003). Delovanje svetlosti određene talasne dužine na velike molekule (hlorofil, flavin, retinol, porfirin) dovodi do njihove ekscitacije, odnosno, prelaska u pobuđeno stanje. S obzirom na to da je molekularni kiseonik mali molekul koji lako difunduje u sve ćelije i potrebna mu je mala energija pobuđivanja, lako biva ekscitiran prenosom energije sa većih molekula (Halliwell et al. 1999; Marković i Trajković 2008)

## 5. ANTIOKSIDACIONI SISTEM ZAŠTITE (AOS)

Prisustvo reaktivnih vrsta u aerobnim organizmima je korisno u homeostatskim uslovima jer oni imaju ulogu signalnih molekula u mnogim biohemijskim procesima. Međutim, njihova produkcija i aktivnost mora biti kontrolisana kako ne bi bila poremećena homeostaza organizma što bi dovelo do ćelijskih, tkivnih ili sistemskih oštećenja. Aktivnost reaktivnih vrsta kontrolisana je i ograničena antioksidacionim sistemom zaštite (AOS). Prema Halliwell-u (1990), AOS-u pripadaju sve supstance koje, prisutne u relativno malim koncentracijama u odnosu na oksidabilni supstrat, sprečavaju ili odlažu njegovu oksidaciju. Razlikuju se primarni i sekundarni antioksidacioni sistem zaštite.

Primarnu antioksidacionu zaštitu čine:

### 1. enzimske komponente

- superoksid-dismutaza (SOD)
- katalaza (CAT)
- glutation-peroksidaza (GSH-Px)
- glutation-S-transferaza (GST) i
- glutation-reduktaza (GR)

### 2. neenzimske komponente, koje se dele na

#### 1) liposolubilne supstance, kao što su:

- vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol),
- vitamin A (retinol),
- provitamin A ( $\beta$ -karoten),
- koenzim Q (ubihinon)

#### 2) hidrosolubilne supstance:

- vitamin C (askorbinska kiselina),
- glutation (GSH),



- mokraćna kiselina,
- cistein,
  
- bilirubin,
- albumin,
- histidin,
- laktoferin.

Sekundarnu antioksidacionu zaštitu čine protein-specifične oksidoreduktaze (tiol-transferaze), ATP i  $\text{Ca}^{+2}$ - nezavisne proteaze.

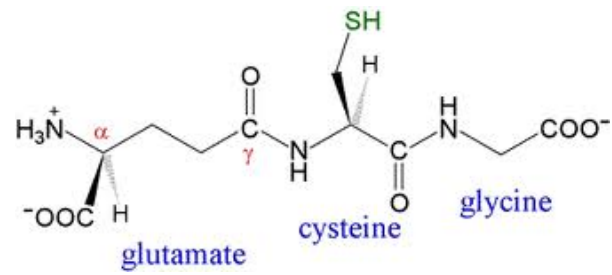
## **5.1 NEENZIMSKA ANTIOKSIDACIONA ZAŠTITA**

### 5.1.1 Glutation (GSH)

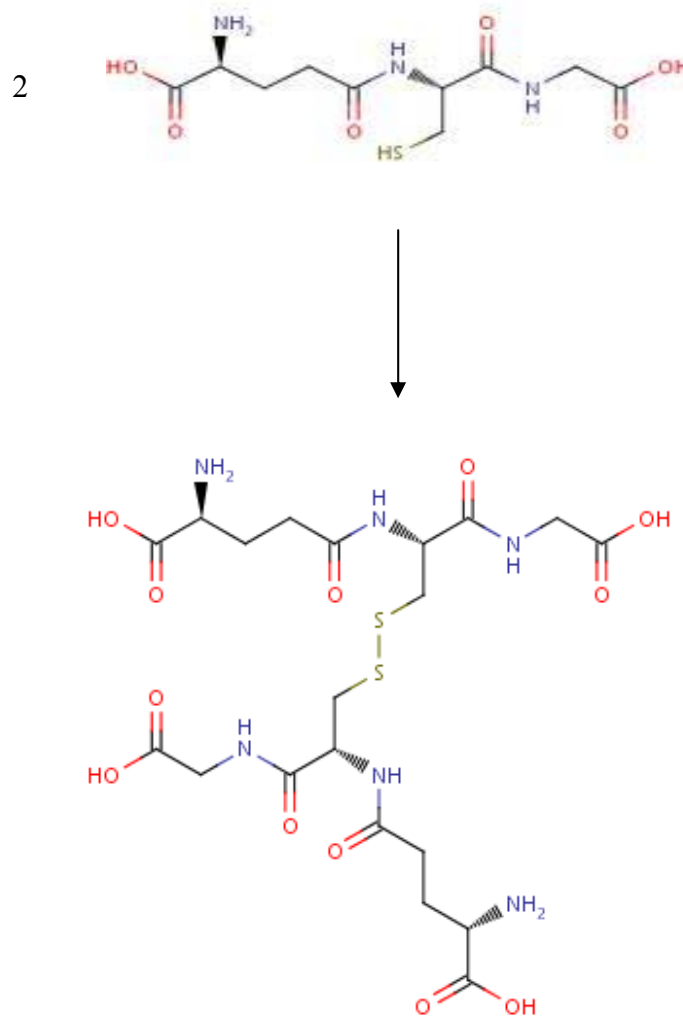
Glutation ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin) je tripeptid koga čine aminokiseline L-glutamat, glicin i L-cistein (Slika 11a). GSH je neenzimska komponenta primarne antioksidacione zaštite i nalazi se u svim ćelijama sisara kao slobodan ili vezan u citosolu, jedru, mitohondrijama i mikrozmima (Sen et al. 1992). U ćelijama se nalazi u milimolarnim koncentracijama, dominantno u redukovanom obliku, kao tiol (GSH) i u manjoj količini (~5%) kao disulfid oksidovani oblik (GSSG) (Anderson, 1996; Kretschmar, 1996). Oksidovani oblik nastaje oksidacijom dva molekula GSH i formiranjem disulfidne veze (Slika 11b).

Slobodni cistein je toksičan, ali glutacion nema to svojstvo i upravo su sulfhidrilne (tiol) grupe cisteina odgovorne za ulogu glutaciona kao ćelijskog „redoks pufera“ koji održava tiol/disulfid redoks potencijal u ravnoteži.  $\gamma$ - veza između amino grupe cisteina i karboksilne grupe glutamata verovatno ima funkciju zaštite ovog tripeptida od aminopeptidaza koje bi degradirale GSH (Vina et al. 1983; Sies, 1999).

a)



b)



Slika 11. a) GSH (tiol, redukovani oblik glutationa); b) GSSG (disulfid, oksidovani oblik glutationa)

Sinteza glutaciona se odvija u dva koraka. Prvo nastaje  $\gamma$ -glutamilcistein delovanjem enzima  $\gamma$ -glutamilcistein sintetaza, a potom se za C-kraj  $\gamma$ -glutamilcisteina vezuje glicin, uz pomoć enzima glutacion-sintetaze. Aktivnost pomenutih enzima zavisi od prisustva adenozin trifosfata (ATP). Najviše se sintetiše u jetri. Degradacija GSH na konstituentne aminokiseline odvija se uz pomoć enzima  $\gamma$ -glutamil-transpeptidaza i cisteinil-glicin dipeptidaza (Griffit, 1999).

Glutation ima mnogobrojne funkcije: važan je kao antioksidant koji učestvuje u neutralizaciji slobodnih radikala, ali i egzogene antioksidante, kao što su vitamin C i vitamin E održava u redukovanom (aktivnom) obliku (Scholz et al. 1989; Sies, 1999). Važan je u zaštiti ćelija od vodonik peroksida, hidroksil radikala, organskih radikala, organskih hidroperoksida. U reakcijama redukcije vodonik peroksida i organskih peroksida katalizovanim enzimom GSH-Px, dolazi do prelaska glutaciona u oksidovani oblik (disulfid), koji, dalje, može reagovati sa sulfhidrilnim grupama proteina i tada nastaju mešani disulfidi. Da bi se ovo sprečilo, u ćelijama se održava visok nivo redukovanog (tiol) oblika glutaciona u čemu glavnu ulogu ima enzim glutacion-reduktaza. Takođe, neophodan je za sintezu ili degradaciju proteina, učestvuje u sintezi i „popravljkama“ dezoksiribonukleotida, transportu aminokiselina, regulaciji metabolizma leukotrijena i prostaglandina (Meister, 1991; Anderson, 1996). GSH ima ulogu u signalnoj transdukciji, ekspresiji gena i apoptozi (Arigo et al. 1999; Sen et al. 1999; Voehringer, 1999). S-nitrozoglutation (GSNO) predstavlja depo i prelazni oblik azot-oksida (Ji et al. 1996, 1999). Ima ulogu u detoksifikaciji organizma kao kofaktor enzima glutacion-S-transferaze.

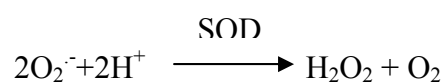
Glutation je kofaktor sledećim enzimima: glutacion-S-transferaza (GST), glutacion-peroksidaza (GSH-Px), glioksilaza, dehidroklorinaza, prostaglandin-endoperokso-izomeraza (Bray i Taylor, 1993).

---

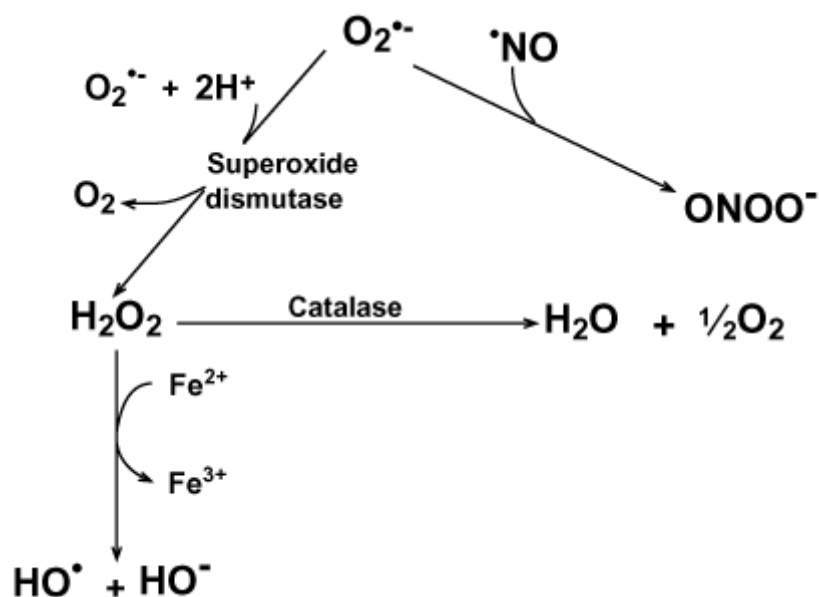
## 5.2 ENZIMI ANTIOKSIDACIONOG SISTEMA ZAŠTITE

### 5.2.1 Superoksid dismutaza (SOD)

McCord i Fridovich su 1968. godine iz humanih eritrocita izolovali metaloprotein koji su nazvali eritrokuprein. Ustanovljeno je da ima enzimatsku ulogu u uklanjanju superoksid anjona i nazvali ga superoksid dismutaza (McCord, Fridovich, 1969).



Dismutacija superoksid anjona se u ćelijama odvija spontano, ali je zadatak ovog enzima da poveća učestalost reakcije dismutacije kako bi se izbegle Haber-Weiss-ova reakcija, kao i reakcija superoksid anjona sa azot monoksidom i stvaranje vrlo reaktivnog peroksinitrita (Šema 2) (Turrens, 2003). Spontana dismutacija superoksid ajona je  $10^4$  puta sporija od reakcije katalizovane SOD-om ( $2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ), pri neutralnom pH (Fridovich, 1995).



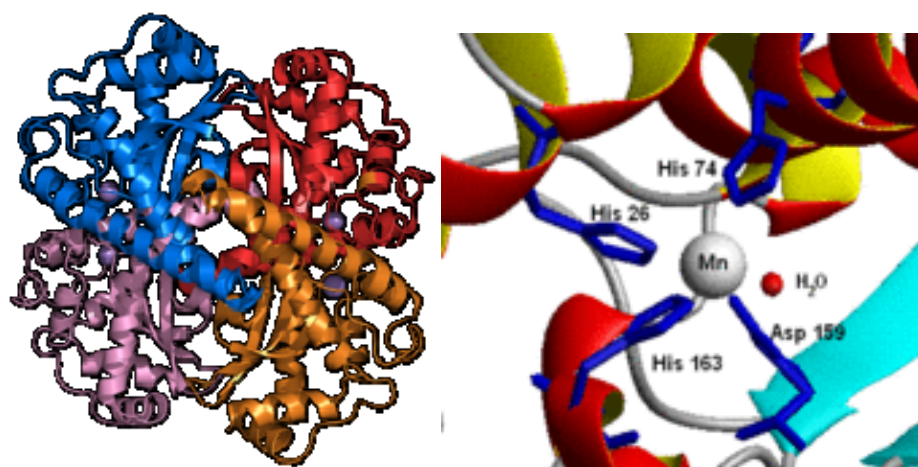
Šema 2. Kompetitivnost azot monoksida i superoksid dismutaze za superoksid anjon

Postoji četiri vrste superoksid dismutaze:

1. **FeSOD**, u aktivnom centru ima gvožđe ( $Fe^{+3}$ ), ima dve subjedinice od po 39kDa i karakteristična je za prokariotske organizme. Nađena je kod nekih eukariotskih algi i u hloroplastima lišća nekih viših biljaka (žuti lokvanj i ptičja repa).

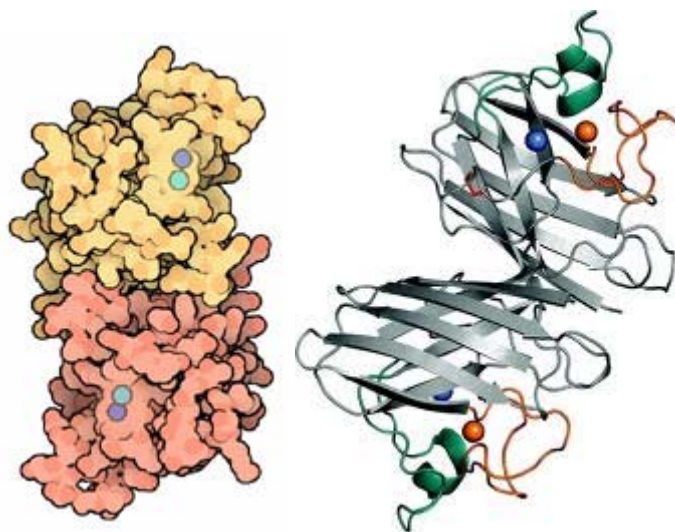
2. **MnSOD**, mangan superoksid dismutaza, ima  $Mn^{+3}$  u aktivnom centru.

Prvi put je izolovana iz bakterija *Escherichia coli* i *Streptococcus mutans*, potom i iz gljive *Pleoritus olearis*. Kod prokariota se sastoji iz dve subjedinice od po 40kDa, dok kod eukariotskih organizama MnSOD se sastoji od 4 subjedinice od po 88kDa i nalazi se u matriksu mitohondrija. Samo se kod gljive *Dactylium dendroides* nalazi u citosolu (Fridovich, 1995) Karakteristično za eukariotsku MnSOD je da nije osetljiva na cijanid (Halliwell, Gutteridge, 1999). Kod čoveka, gen za MnSOD je na hromozomu 6 (q21) (Creagen et al. 1973), dok je kod miša na hromozomu 17 (Szymura et al. 1981).



Slika 12. Trodimenzionalna struktura MnSOD i prikaz aktivnog centra enzima

3. **CuZnSOD** (bakar cink superoksid dismutaza) je homodimer, ima bakar ( $\text{Cu}^{+2}$ ) i cink ( $\text{Zn}^{+2}$ ) u obe subjedinice čije su molekulske mase 32kDa. Katalitička funkcija enzima vezana je za bakar u aktivnom centru, dok cink ima ulogu u stabilizaciji konformacije enzima. Najviše je zastupljena u citosolu, endoplazmatičnom retikulumu, ali i u međumembranskom prostoru mitohondrija eukariota. CuZnSOD je osetljiva na cijanid (Halliwell i Gutteridge, 1999). Podaci govore da se ovaj enzim može naći kod mnogih gram-pozitivnih bakterija, kao i da je prisutan kod E.coli, ali kao monomer (Fridovich, 1997). Kod čoveka, gen za ovu SOD je na hromozomu 21 (q21.1), kod majmuna na hromozomu 9, dok je kod miša na hromozomu 16. Inaktivacija CuZnSOD vodonik peroksidom podrazumeva oksidaciju histidina koji se nalazi na mestu vezivanja subjedinica, ali je pokazano da fumarat, imidazol, NADH i urat, pri pH od 8.0-9.5 mogu zaštititi enzim od inaktivacije (Goldstone et al. 2006).



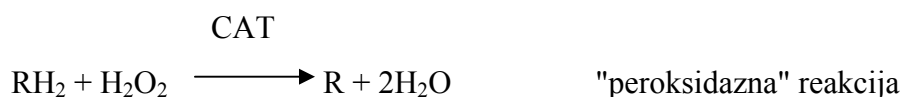
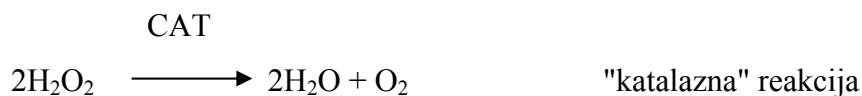
Slika 13. Trodimenzionalna struktura bakar cink superoksid dismutase (CuZnSOD)

4. **EcSOD**, ekstracelularna SOD je homotetramer koji sadrži jedan atom bakra ( $\text{Cu}^{+2}$ ) i jedan atom cinka ( $\text{Zn}^{+2}$ ).

Molekulska masa enzima je 135kDa. Pokazuje dosta homologije sa CuZnSOD, ali je glikozilovan i kao takav dominantno je lokalizovan u ekstraćelijskom prostoru. Tu ga sekretuju ćelije koje ga proizvode. Ima veliki afinitet za sulfate polisaharida, prevashodno za heparin i heparin-sulfat. Iako se može naći u plazmi krvi, glavna uloga mu je da u ekstraćelijskom matriksu uklanja superoksid anjone oslobođene iz fagocita i drugih ćelija imunog sistema (Fridovich, 1997).

### 5.2.2 Katalaza (CAT)

Katalaza katalizuje reakciju kojom se vodonik peroksid razgrađuje do vode i molekularnog kiseonika. Osim toga, katalizuje reakciju oksidacije donora vodonika, uz utrošak molekula vodonik peroksida



Konstanta brzine "katalazne" reakcije je  $4 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$ , što je znatno brže od "peroksidazne" reakcije čija je konstanta brzine  $10^2\text{-}10^3 \text{ mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$ . Koju reakciju će katalizovati zavisi od koncentracije vodonik peroksida i donora vodonika. "Katalazna" reakcija se odvija pri višim koncentracijama vodonik peroksida, dok se "peroksidazna" odvija u uslovima niske koncentracije vodonik peroksida, u prisustvu donora vodonika. Pritom, aktivnost enzima određena je difuzijom supstrata do aktivnog centra.

Katalaza je homotetramer molekulske mase od 240kDa, koji u aktivnom centru svake subjedinice ima hem grupu (protoporfirin sa feri jonom u centru)(Halliwell i Gutteridge, 1999). Lokalizovana je u peroksizomima ćelija (čini 40% svih proteina u organeli) jer tu nastaje vodonik peroksid kao produkt aktivnosti peroksizomalnih enzima (glikolat-oksidaza, urat-oksidaza, oksidaze D-aminokiselina itd). Najviše katalaze ima u jetri i eritrocitima, dok je manje zastupljena u mozgu, srcu, skeletnim mišićima, plućima, pankreasu. Peroksizomi mozga su manji od peroksizoma u drugim tkivima pa se zovu mikroperoksizomi (Halliwell i Gutteridge, 1985).

Vodonik peroksid se može generisati u mitohondrijama, endoplazmatičnom retikulumu i citosolu (aktivnošću ksantin-oksidaze), tako da se i katalaza može naći izvan peroksizoma, odnosno, u citosolu (retikulociti, eritrociti).



Gen za katalazu kod čoveka je na hromozomu 11 (p13)( Quan et al. 1986).

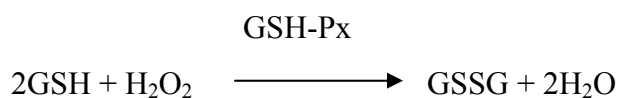
Za razliku od životinja, biljke imaju više izoenzima koji su tkivno i stimulus specifični i menjaju se tokom rasta biljke. Aktivira se u uslovima stresa, kao što su niska ili visoka temperatura, izloženost patogenima i sl.

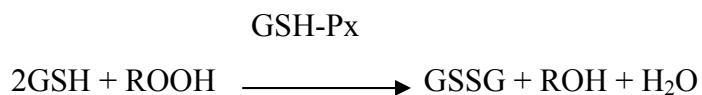


Slika 14. Trodimenzionalna struktura katalaze (CAT)

### 5.2.3 Glutation-peroksidaza (GSH-Px)

Glutation peroksidaza je enzim koji uklanja vodonik peroksid kada je on zastupljen u niskim koncentracijama, ali i organske hidroperokside, koje prevodi u odgovarajuće alkohole. Kofaktor aktivnosti ovog enzima je glutation, koji u reakciji prelazi u svoj oksidovani oblik.



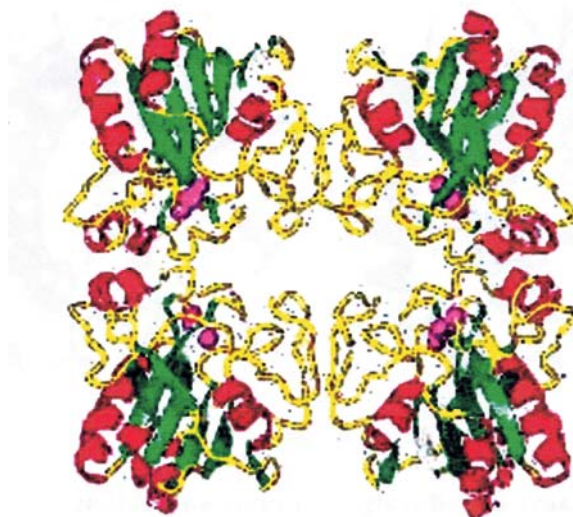


Izolovan je prvi put iz goveđih eritrocita i pokazano je da štiti hemoglobin od oksidacionog oštećenja vodonik peroksidom.

Nije pronađen kod viših biljaka i bakterija (Halliwell i Gutteridge, 1999). Gen koji kodira enzim GSH-Px kod čoveka se nalazi na hromozomu 3 (p13-q12). Dominantno je prisutan u citosolu i mitohondrijama i njena Kb je značajno niža od Kb katalaze (Gey, 1994)

Postoje tri vrste ovog enzima:

- 1) **Selen-zavisna glutation peroksidaza (Se GSH-Px)** je tetramer, molekulske težine 84kDa, koji u aktivnom centru svake subjedinice se nalazi selencistein. Nalazi se u citosolu i mitohondrijama ćelija.
- 2) **Selen-nezavisna glutation-peroksidaza**, katalizuje redukciju organskih hidroperoksida i pretpostavlja se da može pripadati porodici izoenzima sa glutation-S-transferaznom aktivnošću.
- 3) **Fosfolipid hidroperoksid GSH-Px (PH GSH-Px)** je monomer od 20 kDa koji redukuje fosfolipide. Jedini sprečava lipidnu peroksidaciju u ćelijskim membranama, ali uz prisustvo vitamina E (Marinho et al. 1997; Sciamana i Lee, 1993).



Slika 15. Trodimenzionalna struktura glutation peroksidaze (GSH-Px)

### 5.2.4 Glutation-S-transferaza (GST)

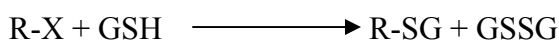
GST je enzim prisutan kod svih vrsta kičmenjaka, biljaka, insekata, kvasaca i aerobnih bakterija. Sa izuzetkom glodara kod kojih je trimer, inače je dimer molekulske mase od 50 kDa. Nalazi se prevashodno u citosolu, ali kod glodara se nalazi u mikrozomoma, endoplazmatičnom retikulumu i mitohondrijama. Kod sisara ga ima u svim tkivima, ali najviše u jetri gde čini 10% svih proteina citosola. Postoji nekoliko klasa ovog enzima koje se međusobno razlikuju po afinitetu ka specifičnim supstratima. Označavaju se kao Alfa, Mu, Pi, Sigma, Kapa, Teta (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Enzim ispoljava tri različite funkcije:

1. katalizuje konjugaciju redukovanog glutationa sa različitim elektrofilnim ksenobioticima (kancerogene supstance, pesticidi, herbicidi, lekovi i njihovi metaboliti), tako i endogenim reaktivnim molekulima koji su uglavnom produkt oksidacionog stresa (Bolt, 1994,1996) .
2. vezuje supstance kao što su steroidi, razni metaboliti i lekove, čime olakšava njihov transport (Listowski, 1993),
3. učestvuje u sintezi leukotriena C4 i prostaglandina.

Reakcija GST sa supstratom se odvija u dve faze:

Prvo dolazi do konjugacije redukovanog glutationa i supstrata, pri čemu nastaje nestabilni konjugat (R-SG) i oksidovani glutation.

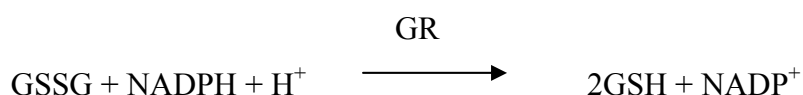


Zatim, nestabilni konjugat reaguje sa redukovanim glutationom, pri čemu nastaje stabilni i netoksični produkt:

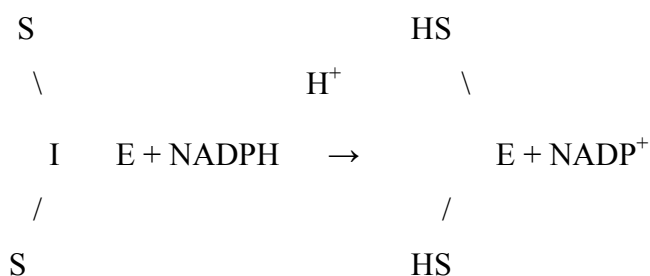


### 5.2.5 Glutation-reduktaza (GR)

GR je dimer u kom svaka subjedinica, molekulske mase od 120kDa, ima molekul FAD (flavin-adenin dinukleotid) i redoks aktivnu disulfidnu vezu koja se cepa kada primi elektrone i prelazi u tiol. Glavna uloga ovog enzima je da održava glutacion u redukovanom obliku (Tamura et al. 1996):



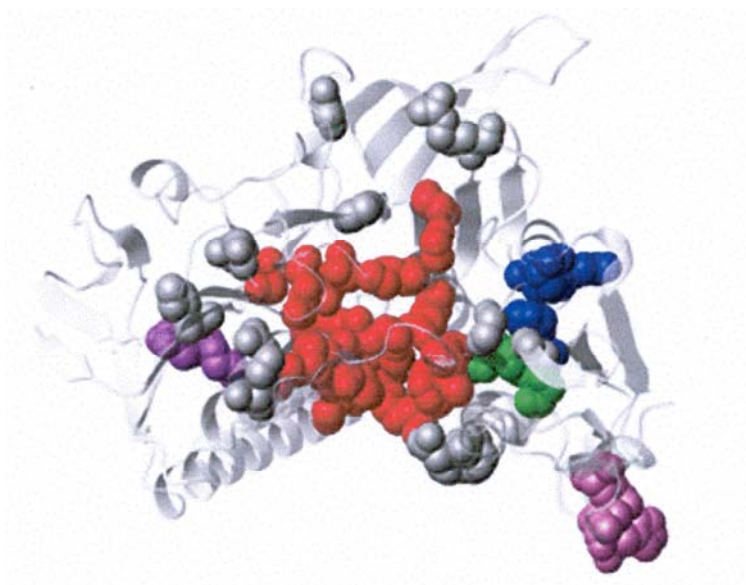
Aktivnost GR-a zavisi od NADPH, kao redukujućeg kofaktora, pri čemu se prvo redukuje flavin, a zatim se kida disulfidna veza i redukcijom stvaraju tioli.



U sledećoj fazi se redukuje GSSG, dok se u enzimu ponovo uspostavlja disulfidna veza.



Veća zastupljenost GSSG u tkivu, znak je da je došlo do oksidacionog stresa. Tako je primećena veća aktivnost ovog enzima u tumorskim ćelijama i ćelijama kod kojih je veštački izazvan oksidacioni stres (Lopez-Tores, 1993) Aktivnost GR-a vezana je za aktivnost GSH-Px, kome je, kao što je već pomenuto, redukovani glutation kofaktor. Enzim se nalazi u citosolu i mitohondrijama, a gen koji ga kodira se kod čoveka nalazi na hromozomu 8 (p21.1)(McAlpine i sar, 1988).



Slika 16. Trodimenzionalna slika glutation reduktaze (GR)

## CILJ ISTRAŽIVANJA

U ovom istraživanju želeli smo da proučimo i uporedimo efekte fulerenola i DMSO na izolovanim organima- uterusu i ileumu, zdravih jedinki pacova. Oba organa poseduju glatku muskulaturu, ali i specifične osobine kontraktilnih elemenata. Uniformnost model sistema obezbeđena je korišćenjem ženki iste starosti a uniformnost kod uterusu i izborom ženki pacova koje su u fazi estrusa i *virgo intacta*.

Kako se mehanizmi aktivnosti razlikuju zavisno od tipa kontrakcija, efekte na uterusu smo pratili na spontanim,  $Ca^{+2}$ -indukovanim fazičnim i KCl-indukovanim toničnim kontrakcijama.

Kod ileuma smo pratili promene na spontano aktivnoj i KCl-indukovanoj toničnoj aktivnosti glatke muskulature.

Efekte fulerenola i DMSO poređeni su sa kontrolama, ali i međusobno, jer se, po literaturi, njihovi efekti prepliću u nekim segmentima.

Kako bismo što preciznije utvrdili i objasnili farmakološke efekte fulerenola, metodama mikroskopije pratili smo ponašanje fulerenola rastvorenog u vodi i DMSO-u, kao i ponašanje ovako rastvorenog fulerenola u fiziološkim rastvorima u kojima se nalaze izolovana tkiva tokom farmakološkog eksperimenta.

U biohemijskom delu istraživanja obuhvaćeno je merenje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite: bakar cink superoksid dismutaze (CuZnSOD), mangan superoksid dismutaze (MnSOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSH-Px) i glutation reduktaze (GR) koji čine endogeni sistem antioksidativne zaštite. Dobijeni rezultati treba da pokažu u kojoj meri fulerenol i DMSO utiču na aktivnost ovih enzima, da li interaguju sa njima i time da li potencijalno imaju prooksidativno svojstvo ili je dominantna njihova sposobnost uklanjanja reaktivnih vrsta kiseonika.

## MATERIJAL I METODE

### **6.1 AFM (Atomic Force Microscopy)**

AFM metodom (mikroskopija atomskih sila) analizirani su vodeni i DMSO rastvori fulerenola u De Jalon-ovom i Tyrod-ovom rastvoru. Merenje AFM-om (Multimode quadrex SPM sa Nanoscope IIIe kontrolorom (Veeco Instruments, Inc.)) rađeno je u uslovima pod kojim je rađen i farmakološki eksperiment: odgovarajuća temperatura, aerisanje rastvora, trajanje eksperimenta, doze i razmaci između aplikacije doza. Vrh konzole ima radijus manji od 10nm i "lupka" po ispitivanoj površini. Podloga na kojoj se nalazi uzorak je grafen tj. visoko orjentisani pirolitički grafit (HOPG). Merenjem se dobija topografija površine i fazne slike uzorka.

### **6.2 TEM (transmission electron microscope), SEM (scanning electron microscope)**

Elektronski mikroskop stvara sliku pomoću visoko voltažnog snopa elektrona koji se emituju sa katode. Ubrzava ih anoda, dok ih elektrostatičko polje fokusira. Talasna dužina elektrona je znatno manja od talasne dužine fotona vidljive svetlosti, tako da je moć razlučivanja daleko veća od svetlosnog mikroskopa i nanočestice su „vidljivije“.

Prenosni elektronski mikroskop (TEM) i skenirajući elektronski mikroskop (SEM) su slični po tome što oba koriste snop elektrona, ali imaju različite mehanizme stvaranja slike. Kod TEM snop elektrona prolazi kroz preparat, dok SEM skenira površinu preparata te se slika dobija odbijanjem elektrona od površine preparata i dobija se 3D slika uzorka. SEM-om se mogu videti procesi na površini preparata i agregati.

## 7. FARMAKOLOŠKA ISPITIVANJA

Farmakološki deo ispitivanja efekata DMSO-a i fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  rađen je na izolovanim uterusima i ileumima ženki pacova soja Wistar koje su *virgo intacta*.

Telesna masa ženki je u proseku 250g, poreklom su sa farme za eksperimentalne životinje Biološkog instituta "Siniša Stanković". Sve ženke su u estrusu, što je utvrđivano svakodnevnim posmatranjem vaginalnog brisa. Razmaz se boji hematoksilinom i pregleda pod mikroskopom:

- *proestrus*, traje 12-14 sati. U brisu se vide ovalne epitelne ćelije sa jedrom i nema leukocita. U ovoj fazi počinje sazrevanje jajnih ćelija

- *estrus (ovulacija - "heat")*, traje 24-27 sati. Bris se odlikuje vrlo upečatljivim kornifikovanim ćelijama, bez jedra. Takođe, leukocita nema.

- *metestrus ili postestrus*, traje 7-8 sati. Kornifikovane ćelije se gube, pojavljuju se ćelije sa jedrom, kao i leukociti.

- *diestrus*, koji traje 55-57 sati. Kornifikovane ćelije su iščezle, ima puno leukocita i sluzi u vidu trakica. (Montes GS, Luque EH 1988).

### 7.1 Izolovanje i priprema tkiva:

Uterus i ileum se izoluju, dobro očiste od okolnog tkiva i potom se inkubiraju u kupatilu za izolovane organe u kom se nalazi de Jalon-ov rastvor za uteruse (mmol: NaCl 154.0, KCl 5.6,  $CaCl_2$  0.5,  $NaHCO_3$  6.0 i glukoza 2.8) (Gebrie, 2005), odnosno Tyrod-ov rastvor za ileum: 8gNaCl, 0.2gKCl, 0.2g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.1g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.05g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , 1g  $NaHCO_3$ , 1g glukoze. Rastvor se dopuni do 1litre destilovanom vodom.

Inkubacija traje 30min na 37°C. Opterećenje preparata je 1g i konstantno su aerisani sa 95%  $O_2$  i 5%  $CO_2$ . Eksperiment traje 2h, uključujući i period inkubacije.



U eksperimentu postoje sledeće grupe:

- kontrola za spontanu aktivnost (uterusi/ileumi koji su netretirani, odnosno, inkubirani 2h u De Jalon-ovom/Tyrodovom rastvoru i potom zamrznuti)  $K_{sp}$
- kontrola za kalcijum-indukovanu aktivnost (uterusi kojima je dodat  $Ca^{+2}$  u rastvor i tako su inkubirani 2h i potom su zamrznuti)  $K_{Ca}$
- kontrola za kalijum-hlorid indukovane kontrakcije (uterusi/ileumi kojima je dodat KCl u rastvor, tako su inkubirani 2h i potom zamrznuti)  $K_{KCl}$
- spontano aktivni uterusi/ileumi tretirani sa DMSO
- spontano aktivni uterusi/ileumi tretirani sa fulerenolom rastvorenim u DMSO-u
- kalcijum-indukovani uterusi tretirani sa DMSO
- kalcijum-indukovani uterusi tretirani sa fulerenolom rastvorenim u DMSO-u
- kalijum hlorid-indukovani uterusi/ileumi tretirani sa DMSO
- kalijum hlorid-indukovani uterusi/ileumi tretirani sa fulerenolom rastvorenim u DMSO-u

*Postupak:*

Doze ful/DMSO su dodavane kumulativno u razmacima od otprilike 10 minuta tako da finalne doze u kupatilcima budu ( $\mu\text{g/ml}$ ): 2.5, 2.5, 10, 20, 40, 80, 100, 100, 100. U kupatilce sa kontrolnim preparatom dodavan je DMSO ( $\text{mg/ml} \times 10^{-2}$ ): 3.7, 3.7, 7.5, 30, 60, 120, 150, 150, 150. Zapremina kupatilca je 10ml.

Na kraju eksperimenta, dakle, finalna kumulativna doza ful/DMSO je 450  $\mu\text{g/ml}$  ili približno 400 $\mu\text{M}$ . Odmah po završetku eksperimenta preparati se zamrzavaju u tečnom azotu, a zatim čuvaju na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Mehaničke kontrakcije izolovanog uterusa su registrovane, zabeležene i potom obrađene korišćenjem aparata za izolovane organe "Experimetria" (Hungary).

## 8. BIOHEMIJSKA ISPITIVANJA

Biohemijska analiza podrazumeva određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite.

### 8.1 Priprema tkiva

Uterusi i ileumi se odmrznu, izmere, maceriraju i potom im se doda saharozni pufer (0.25 M saharoza, 0.05M Tris, 1mM EDTA, pH=7.4) u odnosu 1(gram tkiva):5(ml pufera).

Tkiva se zatim homogenizuju 3x10 sekundi, sa pauzama od po 10 sekundi, a potom i sonifikuju 3x15 sekundi, sa pauzama od po 10 sekundi, na frekvenci od 10KHz.

Sonifikati se centrifugiraju 90min na 37500 rpm, na 4°C.

Nakon centrifugiranja se odvaja supernatant i čuva na -20 °C.

### 8.2 Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina je rađeno po metodi Lowry-ja i saradnika (1951). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji kupri ( $\text{Cu}^{2+}$ ) jona i peptidnih veza ispitivanih proteina u alkalnoj sredini, kao i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframovskog reagensa (Folin-Ciocalteu reagens) sa aromatičnim aminokiselinama (tirozinom i triptofanom) iz uzorka. U reakciji nastaje plavo obojeni kompleks čiji je maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 500nm. Apsorpcija se očitava spektrofotometrijski.

*Rastvori:*

1. 0.1N NaOH
2. 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  rastvorena u 0.1N NaOH
3. 1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
4. 2%  $\text{K}_2\text{Na}$  tartarat
5. reagens IV: 1ml  $\text{CuSO}_4$ ; 1ml  $\text{K}_2\text{Na}$  tartarata i 98ml rastvora (2)
6. Folin-Ciocalteu reagens, razblažen sa destilovanom vodom u odnosu 1:2

*Postupak:*

Za merenje proteina pripremaju se duple probe za svaki uzorak i blank.

U epruvetu se sipa 20 $\mu$ l uzorka (za blank se sipa toliko destilovane vode), 0.2ml 0.1N NaOH i 3ml reagensa IV, promućka se na vorteksu i ostavi 15min. Nakon toga se doda 0.6ml Folin-Ciocalteu reagensa, vorteksuje se i ostavi da stoji u mraku 35min.

Apsorbanca se meri na talasnoj dužini od 500nm, u odnosu na blank kao nulu.

*Izračunavanje:*

Srednja vrednost apsorbanci duplih proba se koristi u jednačini standardne krive i tako se dobije koncentracija proteina koja se zatim množi sa razblaženjem homogenata (R):

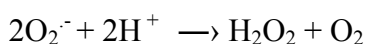
Proteini (mg/ml)= koncentracija x R, (R=6, za tkiva uterusa i ileuma)

### **8.3 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)**

Aktivnost enzima superoksid dismutaza je određivana adrenalinskom metodom koju su postavili Misra i Fridovich, 1972.godine.

U baznoj sredini adrenalina podleže autooksidaciji pri čemu nastaje adrenohrom svetlo roze boje i generiše se superoksid anjon ( $O_2^-$ ). Brzina autooksidacije se meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 480nm i predstavlja linearni deo, odnosno, plato promene apsorbance tokom pet minuta merenja rasta apsorbance (apsorbanca raste usled akumulacije adrenohroma).

SOD iz uzorka uklanja superoksid anjon i tako smanjuje plato promene apsorbance u kontroli. Količina adrenalina koja se stavlja u kontrolnu smešu se podešava tako da plato promene apsorbance iznosi 0.020-0.022. Količina uzorka koja se stavlja u reakcionu smešu se podešava tako da snizi plato kontrole za 30-40%.



*Rastvori:*

1. Adrenalin,  $3 \times 10^{-4}$  M u 0.1M HCl; rastvor se priprema neposredno pre merenja
2. Karbonatni pufer, pH=10.2:
  - 0.05M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
  - $1 \times 10^{-4}$ M EDTA

*Merenje:*

Reakcionu smešu kontrole čini 3ml karbonatnog pufera i rastvor adrenalina u količini takvoj da promena apsorbance tokom autooksidacije u linearnom delu bude 0.02-0.022.

Kad se meri uzorak, u reakcionu smešu se pre adrenalina sipa ona količina uzorka koja će smanjiti plato kontrole za 30-40%.

*Izračunavanje:*

$$\text{SOD} = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R}{V \times \text{Low} \times \Delta K}$$

$\Delta K$  - promena apsorbance kontrole u minuti

$\Delta A$  – promena apsorbance reakcije sa uzorkom u minuti

V – zapremina uzorka koja se sipa u reakcionu smešu (ml)

Low – koncentracija proteina dobijena po metodi Lowry-ja (mg/ml)

R - razblaženje

Količina SOD izražava se u jedinicama SOD aktivnosti po miligramu proteina (U/mg proteina), pri čemu jedinicu aktivnosti SOD predstavlja količina (zapremina) proteina koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorbance.

#### 8.4 Određivanje aktivnosti mangan superoksid dismutaze (MnSOD):

Da bi se izmerila aktivnost MnSOD potrebno je prvo inhibirati CuZnSOD u uzorku. Ovo se postiže dodavanjem 8mM KCN određenoj količini uzorka, u odnosu 1:1 i sačeka se 30 min. Za merenje je potrebna veća količina uzorka nego za merenje ukupne SOD, jer MnSOD čini svega 5-10% ukupne SOD.

Aktivnost **CuZnSOD** izračunava se oduzimanjem vrednosti MnSOD od vrednosti ukupne SOD.

#### 8.5 Određivanje aktivnosti katalaze (CAT):

Katalaza katalizuje razgradnju vodonik peroksida do vode i molekuskog kiseonika, prema sledećoj jednačini:



Metoda Beutler-a predstavlja spektrofotometrijsko praćenje brzine razgradnje vodonik-peroksida u prisustvu katalaze iz uzorka. Merenje se vrši na 240nm, jer je to talasna dužina na kojoj vodonik-peroksid apsorbuje svetlost.

##### *Rastvori:*

1. Pufer, pH=8.0:

- 1M Tris HCl
- 5mM EDTA

2. 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

##### *Merenje:*

Prvo se podešava vodonik-peroksid-rastvara se u destilovanoj vodi dok se ne podesi da je apsorbanca tog rastvora na talasnoj dužini od 240nm jednaka 0.860.

Kad se podesi ta apsorbanaca, slede merenja uzoraka. Tada se u kivetu stavi 50 $\mu$ l pufera, količina uzorka takva da promene apsorbanace u minuti budu u opsegu 0.03-0.06 i 1ml rastvora vodonik-peroksida. Kiveta se ne mućka pre stavljanja u aparat. ApSORBANCA se očitava na 30 sekundi tokom 3 minuta merenja.

*Izračunavanje:*

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \times R}{V \times \text{Low} \times 0.071}$$

$\Delta A$  – promena apsorbanace uzorka u minuti

R – razblaženje

V – zapremina uzorka (ml)

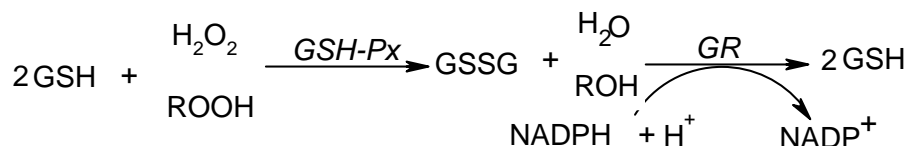
Low – koncentracija proteina (mg/ml)

Aktivnost katalaze se izražava kao količina redukovano $\mu$ g vodonik-peroksida (izražena u  $\mu$ M) u minuti po mg proteina.

### 8.6 Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px):

Aktivnost glutation-peroksidaze određuje se po modifikovanoj metodi Paglia i Valentina (1967).

Metoda se zasniva na sledećoj reakciji:



Glutation-peroksidaza katalizuje oksidaciju redukovano $\mu$ g glutationa (GSH) i nastaje oksidovani glutation (GSSG). Pri tom se redukuje veliki broj molekula hidroperoksida. Oksidovani glutation se ponovo redukuje do GSH u reakciji koju katalizuje enzim glutation reduktaza (GR). Za reakciju je neophodan NADPH kao donor vodonika.

Aktivnost GSH-Px se meri preko potrošnje NADPH i zato se apsorbance meri na 340nm, jer na toj talasnoj dužini NADPH apsorbuje svetlost.

*Rastvori:*

1. 1mM GSH
2. 0.2 mM NADPH u 1% NaHCO<sub>3</sub>
3. 1mM NaN<sub>3</sub>
4. 1 mM EDTA
5. 0.5M fosfatni pufer pH=7.0
6. 0.03M t-butilhidroperoksid
7. glutation-reduktaza (172 IU/mg proteina)

*Merenje:*

Reakcionu smešu čini: 1.5ml destilovane vode, 0.3ml GSH, 0.6ml NADPH, 0.1ml NaN<sub>3</sub>, 0.1ml EDTA, 0.3ml fosfatnog pufera, uzorak, 0.1ml t-butilhidroperoksida i

0.011ml GR. Reakcija počinje dodavanjem GR. Meri se u kvarcnim kivetama na talasnoj dužini od 340nm, pri temperaturi od 37<sup>0</sup>C. Aparat se podesi tako da očitava apsorbance na svakih 30 sekundi tokom 150sekundi merenja. Prvo se meri blank (svi rastvori ali bez uzorka) samo se tada sipa 1.6ml destilovane vode.

*Izračunavanje:*

$$\text{GSH-Px} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl})}{6.22 \times V \times \text{Low}} \times 3000$$

Aktivnost enzima se izražava u nM NADPH/min/mg proteina.

$\Delta A_{uz}$  – promena apsorbance uzorka u minuti

$\Delta A_{bl}$  – promena apsorbance blanka u minuti

V – zapremina uzorka (ml)

Low – koncentracija proteina dobijena po Lowry-ju (mg/ml)

6.22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH

### 8.7 Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR):

Aktivnost glutation-reduktaze određivana je metodom koju su postavili Glatzle i saradnici (1974).

GR katalizuje sledeću reakciju:



Aktivnost enzima se meri posredno, preko potrošnje NADPH, čiji je maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 340nm.

#### Rastvori:

1. 0.5M fosfatni pufer pH=7.4
2. 2mM GSSG
3. 0.5mM EDTA
4. 0.1mM NADPH

#### Merenje:

U kvarcnu kivetu se sipa 0.6ml fosfatnog pufera, 0.1ml GSSG, 0.1ml EDTA, 2ml destilovane vode, uzorak i 0.1ml NADPH. Reakcija počinje kad se doda NADPH. Prvo se meri blank (u reakcionoj smeši su svi rastvori osim uzorka). Merenja se vrše na 340nm i temperaturi od 37°C. Aporbance se beleže na svakih 30 sekundi tokom 150 sekundi merenja.

#### Izračunavanje:

$$\text{GR} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{bl}})}{6.22 \times V \times \text{Low}} \times 3000$$



Aktivnost enzima se izražava u nM NADPH/min/mg proteina.

$\Delta A_{uz}$  – promena apsorbance uzorka u minuti

$\Delta A_{bl}$  – promena apsorbance blanka u minuti

V – zapremina uzorka (ml)

Low – koncentracija proteina dobijena po Lowry-ju (mg/ml)

6.22- molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH

### 8.8 Određivanje aktivnosti ukupnog glutationa (GSH):

Aktivnost ukupnog glutation (GSH) se određuje metodom koju je postavio Tietze (Tietze F, 1969).

*Rastvori:*

1. 10% sulfosalicilna kiselina
2. 125mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6mM EDTA pufer pH=7.5
3. 0.3mM NADPH
4. 6mM DTNB
5. standard glutationa (GSH)
6. glutation reduktaza (GR), 5IU

Iz homogenata tkiva uzme se 75µl i doda 150 µl sulfosalicilne kiseline i centrifugira se 10min na 5000rpm. Iz supernatanta se meri ukupni glutation.

*Merenje:*

U kvarcnu kivetu od 1ml doda se 0.7ml NADPH, 0.1ml DTNB, uzorak (ili standard od 5 µl i 10µl), redestilovane vode do 1ml, 0.005ml GR.

Meri se apsorbance blanka, standarda od 5 µl, standarda od 10 µl i uzorci. Očitavanje se vrši na 150sec, 30°C i 412nm. Apsorbance blanka bi trebalo da bude oko 0.02, standarda GSH od 5 µl od 0.06-0.08, i standarda GSH od 10 µl bi trebalo da bude od 0.12-0.18. Kada se izmere apsorbance oba standarda od tih vrednosti se oduzme vrednost apsorbance blanka i tako dobijene vrednosti predstavljaju donju i gornju granicu apsorbanci. Apsorbance uzoraka treba da budu između ovih vrednosti.

*Izračunavanje:*

$$\text{GSH} = \frac{\text{Konc. St.} \times A_{\text{uz}} \times R}{A_{\text{st}} \times V_{\text{uz}}}$$

Aktivnost enzima se izražava u  $\mu\text{M GSH/ g tkiva}$ . Računaju se vrednosti za oba standarda i potom se računa njihova aritmetička sredina.

Koncentracije standarda GSH:

za  $5\mu\text{l} - 0.782 \times 10^{-3} \mu\text{M GSH}$

za  $10 \mu\text{l} - 1.564 \times 10^{-3} \mu\text{M GSH}$

$A_{uz}$  –apsorbanca uzorka

$A_{st}$  – apsorbanca standarda

$V_{uz}$  - zapremina uzorka

R - razblaženje

### ***Statistička analiza:***

Statistička analiza (deskriptivna statistika, analiza varijanse – ANOVA, F-test) rađena je prema protokolu koji je ustanovio Manley (1986) korišćenjem Statistical Analyse Software (SAS verzija 9.1.3). Kontraksije tretiranih uterusu i ileuma računati su kao procenat kontrakcija kontrolnih, netretiranih uterusu i ileuma. Svi podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Razlike među grupama testirane su two-way ANOVA testom, uzimajući tretman i dozu kao faktore, a statistički značajnim su se smatrale one razlike gde je  $P < 0.05$ . Krive dozne zavisnosti su fitovane u sigmoidne primenom Bolcmanovih funkcija (osa koja predstavlja koncentracije podešena je da bude linearna) i određivana je vrednost  $ED_{50}$ -koncentracija supstance potrebna za postizanje 50% maksimalnog efekta. Sigmoidne krive su međusobno poređene korišćenjem F-testa.  $ED_{50}$  su međusobno poređene one-way ANOVA testom i potom post hoc Newman-Keuls testom za višestruka poređenja (značajnost  $p < 0.05$ ).

---

## REZULTATI

### 9. Rezultati merenja metodama mikroskopije: AFM, TEM, SEM

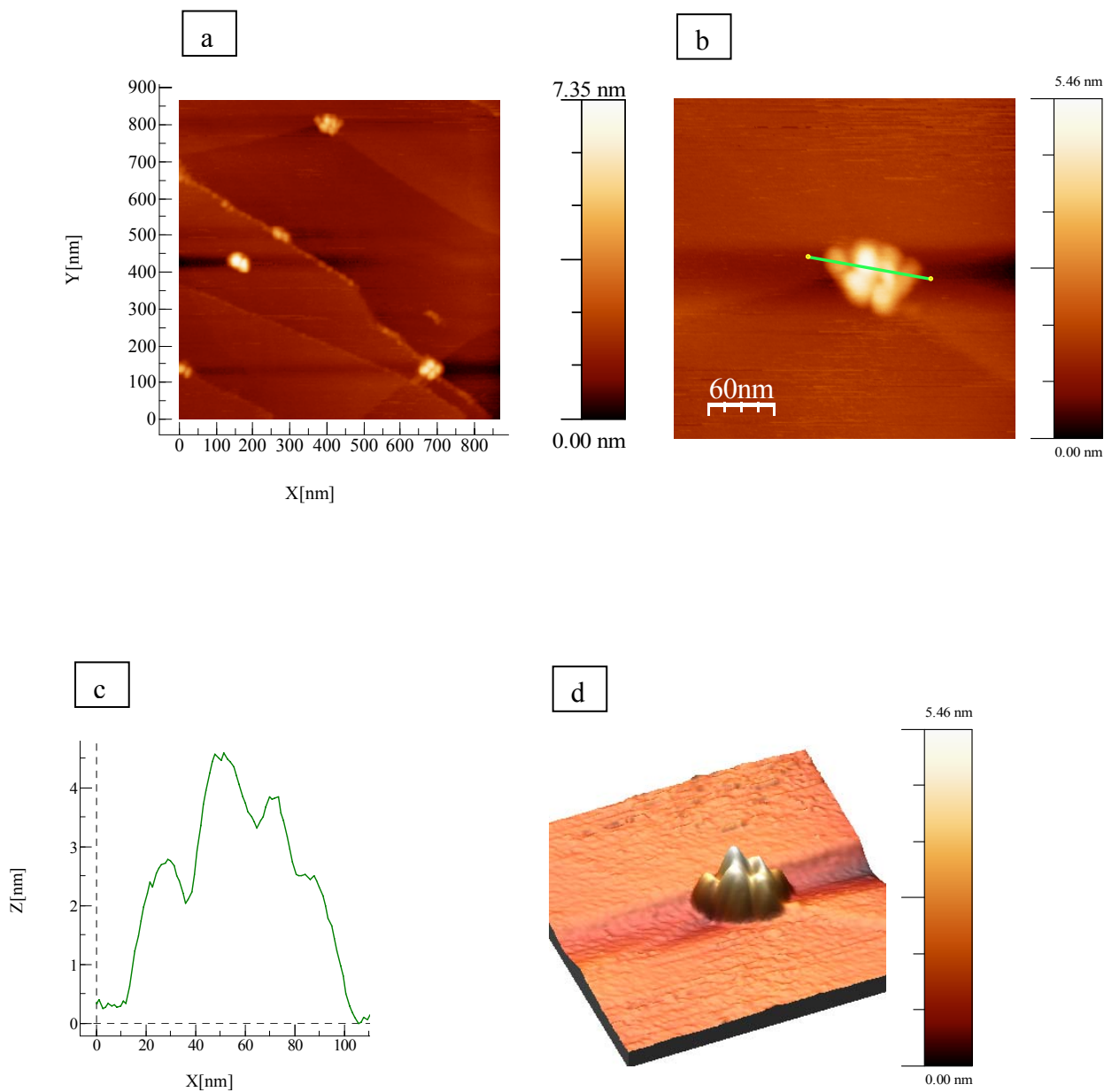
Primenom metode mikroskopije atomskih sila, kao i skenirajuće i prenosne elektronske mikroskopije, ispitivana su fizičko-hemijska svojstva fulerenola rastvorenog u vodi i DMSO, kao i osobine ovih rastvora kada su u Tyrod-ovom odnosno De Jalon-ovom rastvoru, shodno protokolu farmakoloških eksperimenata.

Fulerenol rastvoren u vodi veoma se brzo taloži i stvara agregate.

U DMSO rastvoru fulerenola, molekuli DMSO prave film oko osnovnog motiva agregata i najverovatnije pospešuju prolaz fulerenola u tkivo ili pak odlažu taloženje fulerenola. Ovo je naročito izraženo u De Jalon-ovom rastvoru, dok je u Tyrod-ovom rastvoru usled veće zastupljenosti zemnoalkalnih metala, taloženje fulerenola brže. Verovatno se u ovom slučaju brže eliminiše film DMSO-a oko molekula fulerenola. Pokazano je da fulerenol gradi agregate sa zemnoalkalnim metalima iz De Jalon-ovog i Tyrod-ovog rastvora ( $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ). Osnovni motiv agregata je između 25 i 30nm, a oni se dalje mogu grupisati u agregate od 60nm, ređe od 100nm.

#### 9.1 AFM (mikroskopija atomskih sila)

AFM merenje omogućava karakterizaciju morfologije i konformacije molekula i agregata, kao i homogenost strukture koja se ispituje.



**Slika 1.** Prikaz fulerenola rastvorenog u vodi dobijen AFM metodom:

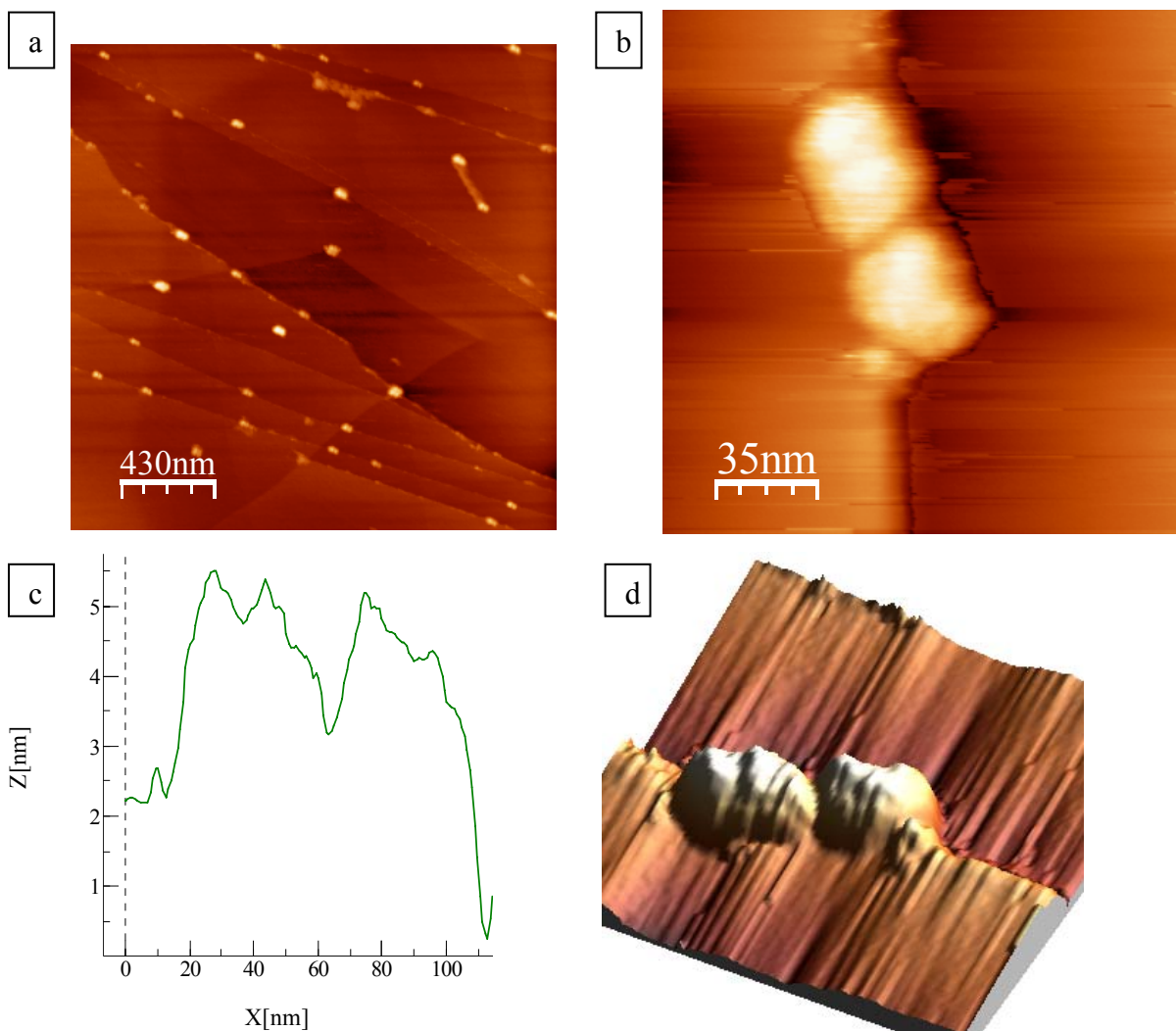
a) čestice fulerenola na HOPG (Highly Oriented Pyrolytic Graphite) podlozi; skala desno pokazuje visinu agregata fulerenola. Na slici se vidi homogenost sistema-čestice su veličine 60 i 90nm. Čestice od 200nm nisu detektovane

b) slika (300x300)nm<sup>2</sup> velike partikule od 90nm na HOPG podlozi. Partikulu čine manje čestice veličine 20-30nm, koje su sferičnog oblika

c) odgovarajući presek partikule od 90nm. Pikovi pokazuju maksimalne visine od 4.5nm i manje pikove od 3.8, 3.2 i 2.5nm

d) 3D slika fulerenola na HOPG podlozi.

Na slici se vidi prisustvo fulerenola na „terasama“ HOPG. Adsorpcija čestica fulerenola na HOPG površinu govori o polarnosti čestice.



**Slika 2.** AFM slika rastvora fulerenola u DMSO

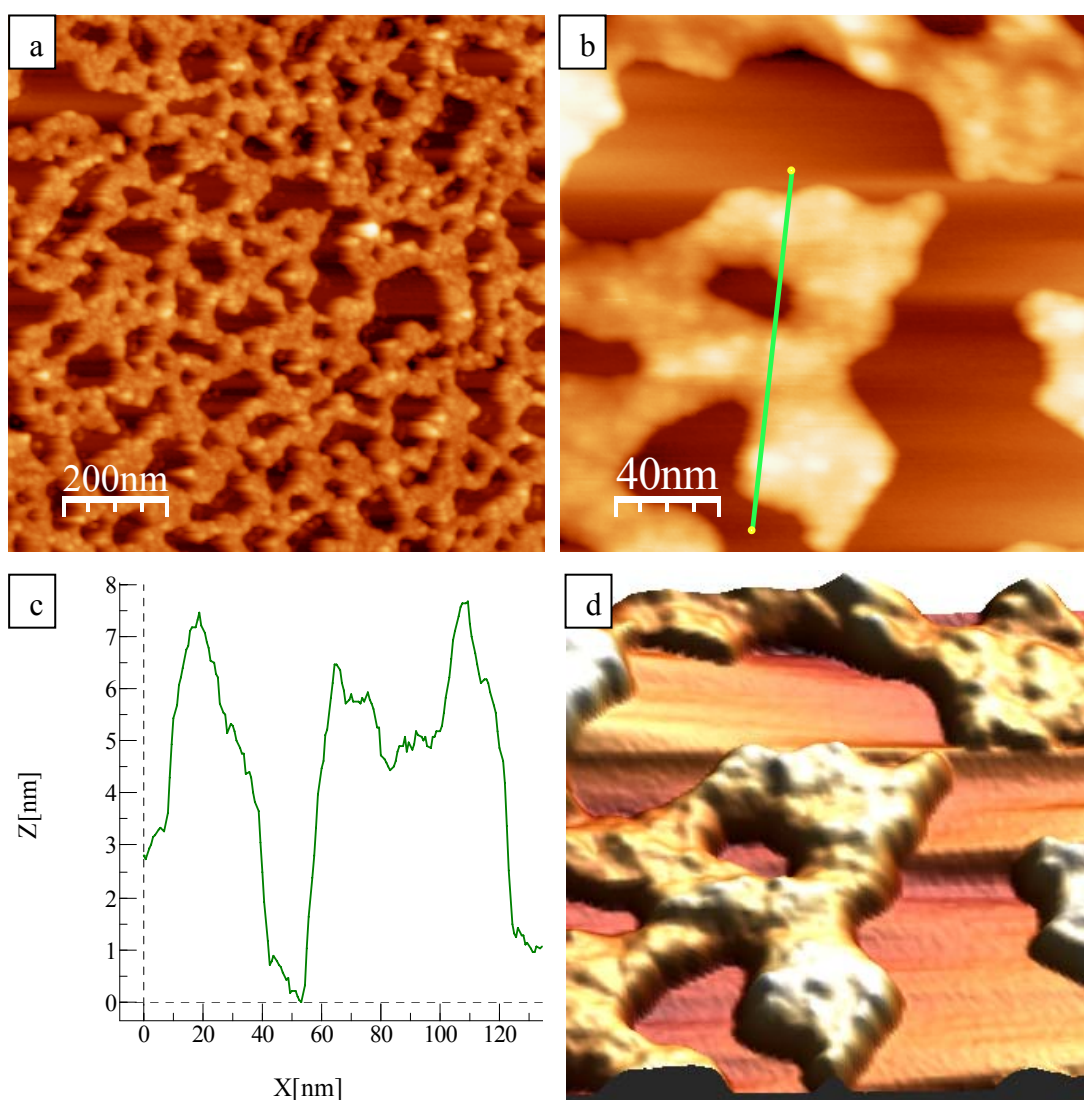
a) slika na površini od  $2000 \times 2000 \text{ nm}^2$ . Može se videti homogena raspodela molekula fulerenola po površini HOPG sa dominantno prisutnim dimernim česticama od oko 100 nm. Najveći broj molekula fulerenola se nalazi na terasama HOPG što ukazuje na polarnost čestice. Ovo je u korelaciji sa merenjem naelektrisanja čestica  $\zeta = -41 \text{ mV}$  u vodi na  $\text{pH}=5$ .

b) dimer fulerenola oko 100 nm na površini od  $170 \times 170 \text{ nm}^2$ . Na slici se može videti dimer fulerenola na terasi HOPG. Dimerna čestica sadrži dve čestice od 50 nm i 40 nm koje su sačinjene iz manjih čestica od 20 i 30 nm.

c) odgovarajući presek dimera fulerenola. Maksimalna visina čestice je 5.5 nm a najmanja visina čestice je 4.5 nm

d) 3D slika dimera fulerenola – jasno se može videti struktura čestica sačinjena od manjih čestica dimenzija 20 i 30 nm.

U toku dodavanja DMSO rastvora fulerenola u De Jalon-ov rastvor došlo je do formiranja smeđeg precipitata. Rastvor je nestabilan i vremenom se količina precipitata povećava. Na slikama 2 i 3 su predstavljeni rezultati AFM merenja fulerenola u DMSO i DMSO rastvora fulerenola u De Jalon-ovom rastvoru



**Slika 3.** AFM slika umreženih čestica fulerenola u DMSO u De Jalon-ovom rastvoru

a) slika na površini  $1000 \times 1000 \text{ nm}^2$  Može se videti struktura umreženog kompozita fulerenola u De Jalon-ovom rastvoru. Na osnovu poznatih hemijskih osobina polianjonskog



polidentatnog liganda molekula fulerenola, za očekivati je da će fulerenol sa  $\text{Ca}^{2+}$  graditi kompleksni umreženi kompozit. Formiranje precipitata između fulerenola i  $\text{Ca}^{2+}$  u koncentracionom intervalu je od  $10^{-3}$  -  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>

b) slika na površini  $200 \times 200$  nm<sup>2</sup> umreženih čestica fulerenola u De Jalon-ovom rastvoru. Na slici se vidi deo umreženog kompozita fulerenola- $\text{Ca}^{2+}$  gde se jasno mogu uočiti čestice od oko 20 nm koje su međusobno povezane u neuređenu strukturu kompozita.

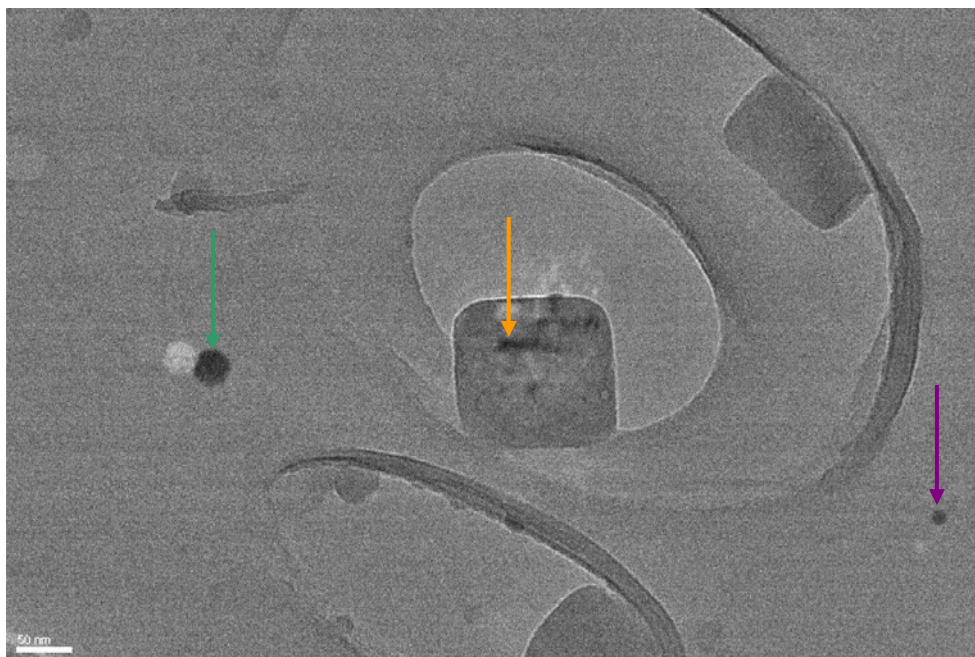
c) odgovarajući presek umreženih čestica FNP u De Jalon-ovom rastvoru. Maksimalna visina umreženog kompozita iznosi 8.0 nm a naj manja visina 6.5 nm

d) 3D slika umreženih čestica fulerenola u De Jalon-ovom rastvoru.

Poređenjem rezultata AFM merenja rastvora fulerenola u DMSO (*slika 2*) i rastvora fulerenola u DMSO u De Jalon-ovom rastvoru (*slika 3*) se mogu uočiti jasne razlike u raspodeli i obliku čestica. U DMSO čestice fulerenola su homogeno raspoređene dok se u De Jalon-ovom formira neuređena umrežena strukturu kompozita fulerenola- $\text{Ca}^{2+}$ .

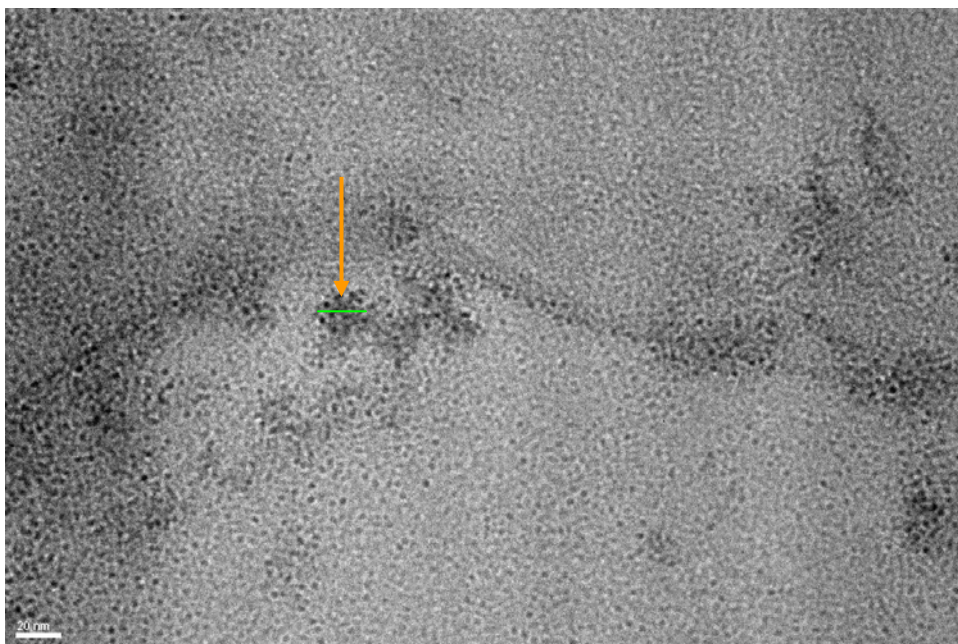
## 9.2 TEM (prenosna elektronska mikroskopija EDXS JEM-2100)

Prenosnom elektronskom mikroskopijom može se snimiti objekat i do 10 000 puta manji i od najmanjeg objekta koji se može snimiti svetlosnim mikroskopom. U ovom slučaju, mogu se videti i pojedinačni molekuli fulerenola, kao i agregati i kompoziti koje fulerenol gradi umrežavanjem i vezivanjem zemnoalkalnih metala.



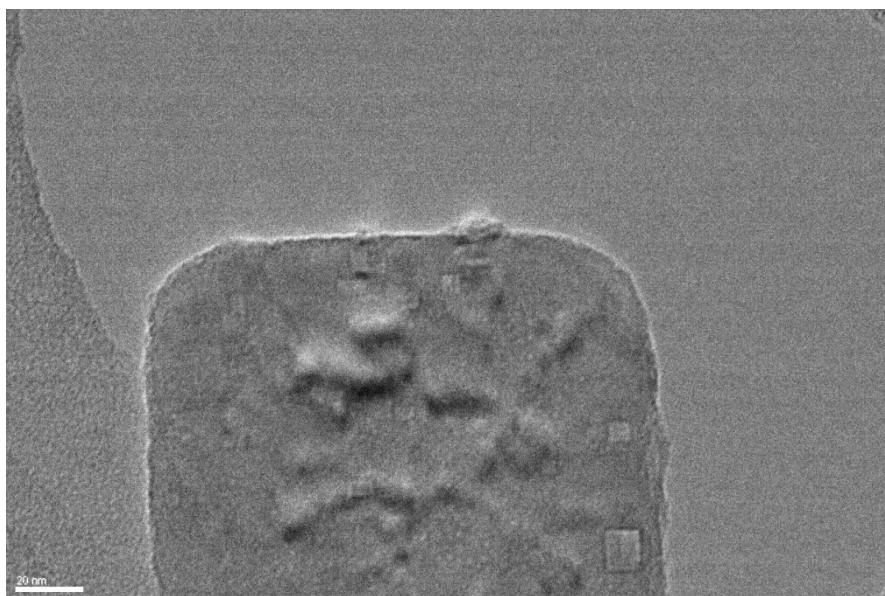
**Slika 4.** DMSO rastvor fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  u De Jalon-u

Na slici se može uočiti osnovni motiv agregata fulerenola, prečnika oko 25nm, bez kristala soli oko agregata (↓). Takođe, vidi se reljefasta struktura koju čini nehomogen kompozit fulerenol-joni kalcijuma(↓). Oko kompozita se vidi formiranje kristala soli. Mogu se uočiti i male strukture koje su prečnika 2-3nm, koje predstavljaju agregat od 2-3 molekula fulerenola(↓).



*Slika 5.* Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  rastvoren u vodi.

Na slici se vidi formiranje agregata fulerenola od 20-60nm(—) od čestica dijametra između 1 i 2 nm(↓). Bela polja na slici ukazuju na mrežastu strukturu kompozita, što je u saglasnosti sa AFM merenjima.

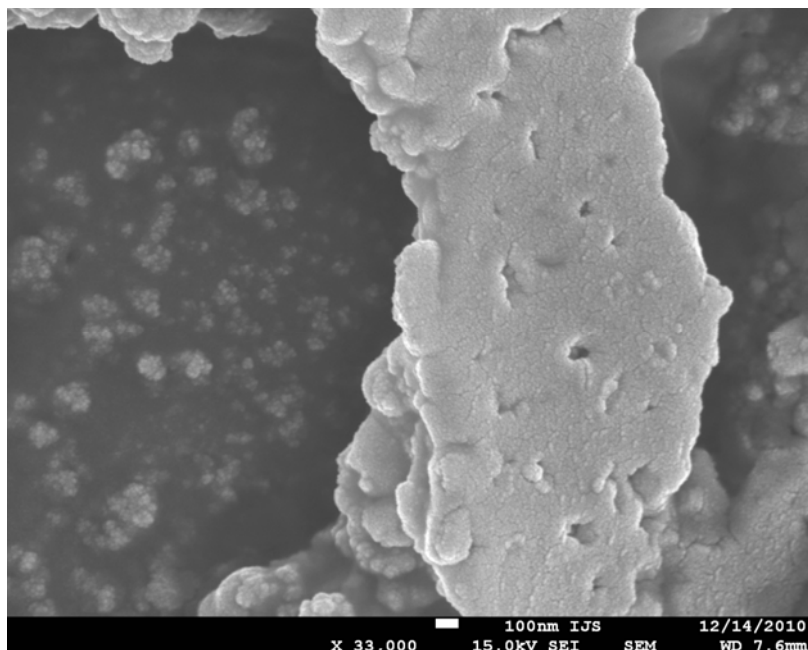


**Slika 6.** DMSO rastvor fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  u De Jalon-u

Reljefasta struktura na slici predstavlja aglomeracije čestica fulerenola od oko 20nm oko kojih se vidi formiranje kristala soli. Mogu se uočiti i čestice promera 1-2nm. Reljefasta struktura kompozita ukazuje na disbalans jona. Bele rupice ukazuju na mrežastu strukturu kompozita, što je u skladu sa AFM merenjima.

### **9.3 SEM (skenirajuća elektronska mikroskopija)**

Skenirajućom elektronskom mikroskopijom dobijaju se slike površine preparata i na taj način se može videti morfologija i tekstura kompozita.



*Slika 7.* DMSO rastvor fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  u De Jalon-u

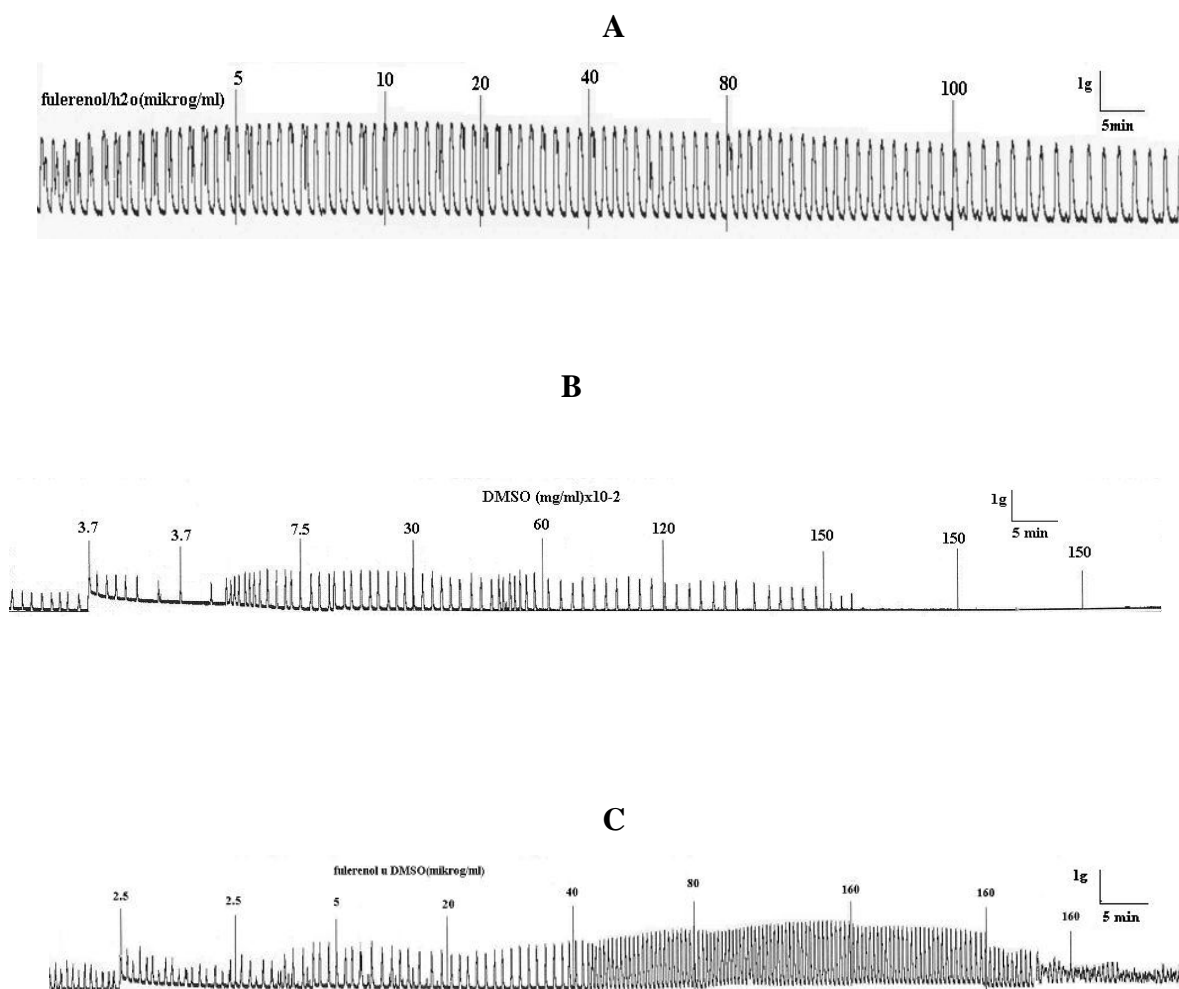
Na slici se jasno može uočiti umrežena struktura kompozita fulerenol- $Ca^{+}$ . Površina kompozita je pukotinasta i ukazuje na postojanje mrežaste strukture, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim AFM merenjima.

Za dalja ispitivanja direktnih farmakoloških efekata fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  rezultati dobijeni primenom metode mikroskopije atomskih sila, kao i skenirajuće i prenosne elektronske mikroskopije, od izuzetnog su značaja jer pružaju egzaktnu osnovu za tumačenje dobijenih rezultata farmakoloških i biohemijskih ispitivanja na molekulskom nivou.

## 10. Rezultati farmakoloških i biohemijskih eksperimenata na modelu uterusa

### 10.1 Efekat fulerenola na spontano aktivne uteruse

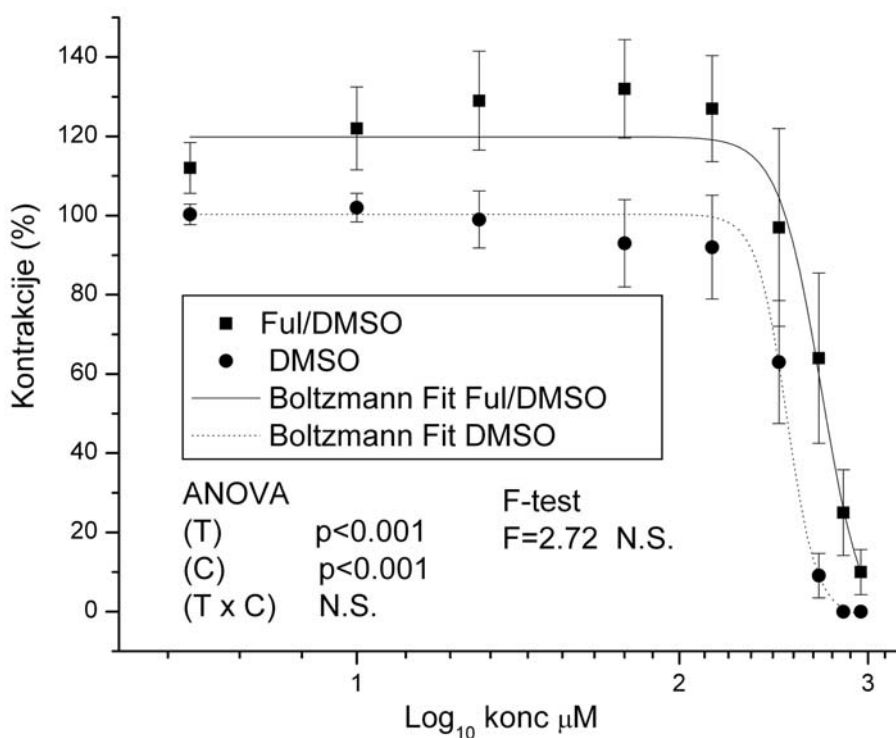
Eksperimenti su rađeni u osam ponavljanja. Prikazani su reprezentativni zapisi farmakoloških eksperimenata.



**Slika 8.** Originalni zapis farmakološkog eksperimenta na spontano aktivnom uterusu

- A) Efekat fulerenola rastvorenog u vodi
- B) Efekat DMSO na spontanu aktivnost uterusa
- C) Efekat fulerenola rastvorenog u DMSO na spontano aktivnom uterusu

Slika pokazuje da fulerenol rastvoren u vodi nema uticaja na kontraktilnost spontano aktivnog uterusa, dok DMSO ima relaksantni efekat na glatku muskulaturu uterusa. Fulerenol rastvoren u DMSO delimično antagonizuje relaksantni efekat DMSO, ali ne sprečava potpunu relaksaciju nakon poslednje doze.

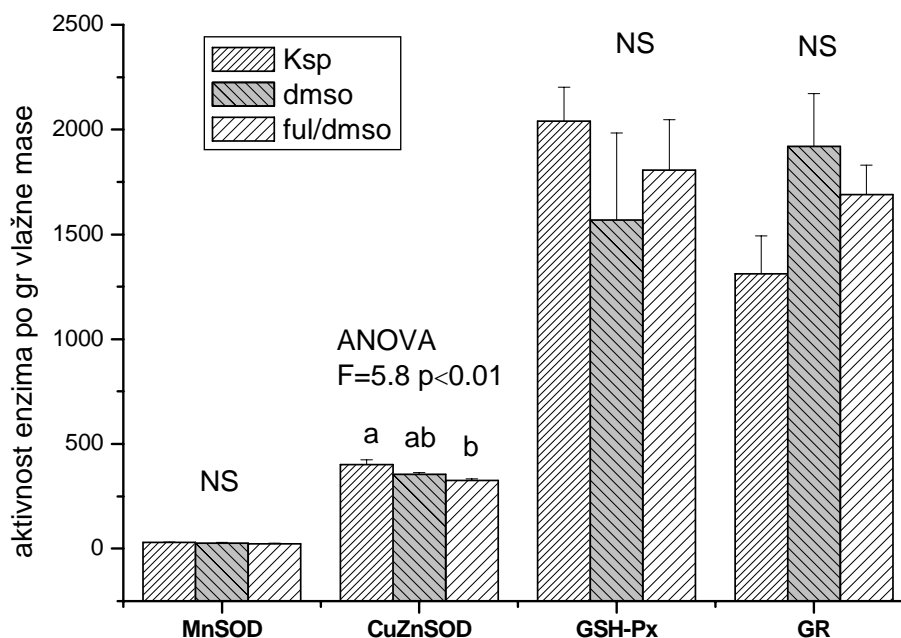


**Slika 9.** Efekat fulerenola na spontanu aktivnost uterusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=8$ ). Značajnost efekata je testirana dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa tretmanom (T) i koncentracijom (C) kao faktorima (prag nivoa značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno). Krive su poređene F testom posle fitovanja korišćenjem Bolcmanove jednačine (prikazana F vrednost, prag nivoa značajnosti je  $p<0.05$ ). Statistička obrada rezultata eksperimenata pokazuje da i DMSO i fulerenol u DMSO imaju statistički značajne efekte na relaksaciju uterusa. Tok fitovanih krivih dobijenih primenom Bolcmanove jednačine ne razlikuje se značajno (F test N.S.).

Fulerenol redukuje relaksantni efekat DMSO, ali na spontano aktivnim uterusima oba tretmana (fulerenol rastvoren u DMSO i sam DMSO) u većim dozama uzrokuju potpunu relaksaciju uterusa.

Aktivnost svih merenih enzima je izražavana dvojako: na gram vlažne mase (ukupna aktivnost) i na miligram proteina (specifična aktivnost).

### 10.1.1 Aktivnost antioksidativnih enzima u spontano aktivnim uterusima



**Slika 10.** Aktivnost antioksidativnih enzima u jedinicama po gramu vlažne mase u spontano aktivnim uterusima tretiranim fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=8$ ). Značajnost je izračunata jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) (prikazane su F vrednosti, prag statističke značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno) i post hoc Tukijevim HSD testom (različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa).

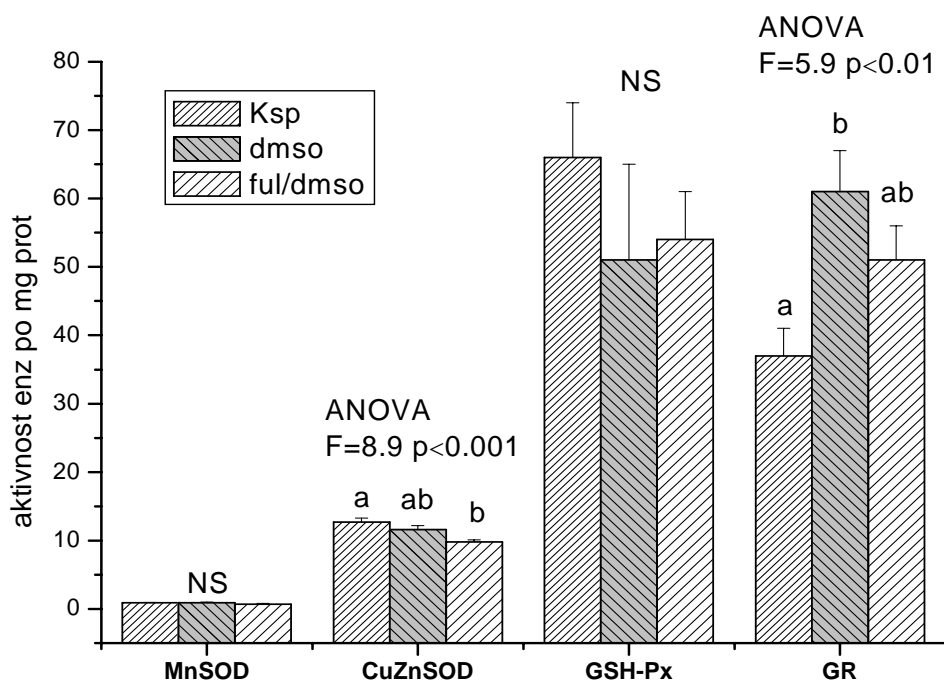


		MnSOD	CuZnSOD	GSH-Px	GR
Spontane	K <sub>sp</sub>	29 ± 2	402 ± 22 <sup>a</sup>	2041 ± 161	1311 ± 181
	DMSO	27 ± 2	355 ± 7 <sup>ab</sup>	1569 ± 416	1920 ± 252
	Fulerenol u DMSO	24 ± 3	325 ± 9 <sup>b</sup>	1807 ± 240	1690 ± 140

**Tabela 1.** Aktivnost antioksidativnih enzima (po gramu vlažne mase) u uterusu jedinki tretiranih fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±standardna greška.

Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

Rezultati aktivnosti enzima izražene po gramu vlažne mase pokazuju da kod spontano aktivnih uterusa tretiranih fulerenolom rastvorenim u DMSO dolazi do smanjenja aktivnosti CuZnSOD, dok se aktivnost ostalih enzima ne menja značajno.



**Slika 11.** Aktivnost antioksidativnih enzima u jedinicama po miligramu proteina u spontano aktivnim uterusima tretiranim fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=8). Značajnost je izračunata jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) (prikazane su F vrednosti, prag statističke značajnosti je  $p < 0.05$ ; N.S. – nije značajno) i post hoc Tukijevim HSD testom (različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa).

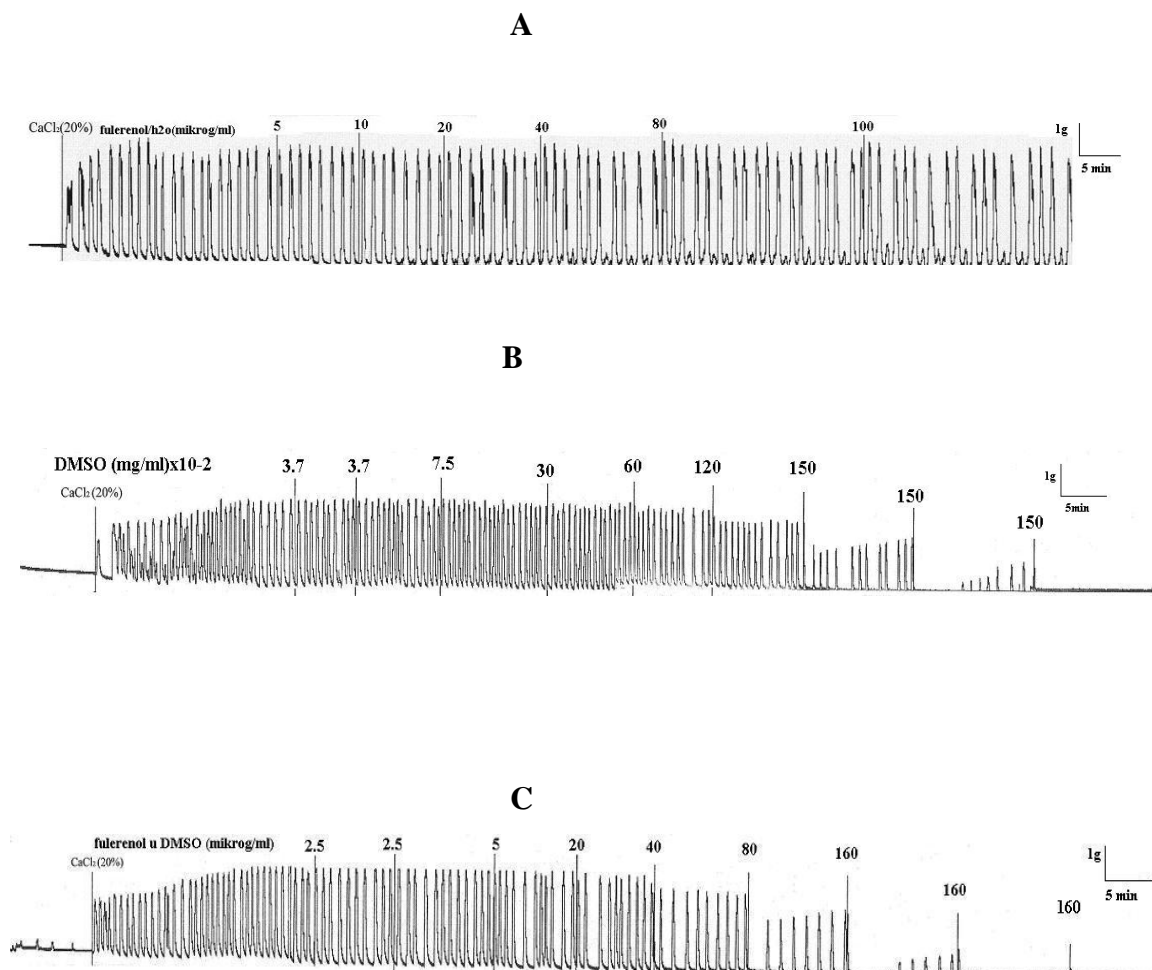
		MnSOD	CuZnSOD	GSH-Px	GR
Spontane	K <sub>sp</sub> (n=13)	0.9 ± 0.03	12.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	66 ± 8	37 ± 4 <sup>a</sup>
	DMSO (n=8)	0.9 ± 0.08	11.6 ± 0.6 <sup>ab</sup>	51 ± 14	61 ± 6 <sup>b</sup>
	Fulerenol u DMSO (n=10)	0.7 ± 0.08	9.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	54 ± 7	51 ± 5 <sup>ab</sup>

**Tabela 2.** Aktivnost enzima (po miligramu proteina) u spontano aktivnom uterusu jedinki tretiranih fulerenolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška, n je broj ponavljanja. Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

Rezultati prikazani na slici 11 i u tabeli 2 pokazuju da fulerenol u DMSO izaziva smanjenje aktivnosti CuZnSOD. Aktivnost CuZnSOD u prisustvu fulerenola u DMSO smanjuje se i kada je izražena kao ukupna i kada je izražena kao specifična što ukazuje ili na direktne inhibitorne efekte fulerenola na SOD ili na interakciju fulerenola sa supstratom SOD što je predhodno pokazano u literaturi. Povećanje aktivnosti GR koje izaziva DMSO, nakon tretmana fulerenolom u DMSO se vraća ka nivou kontrole.

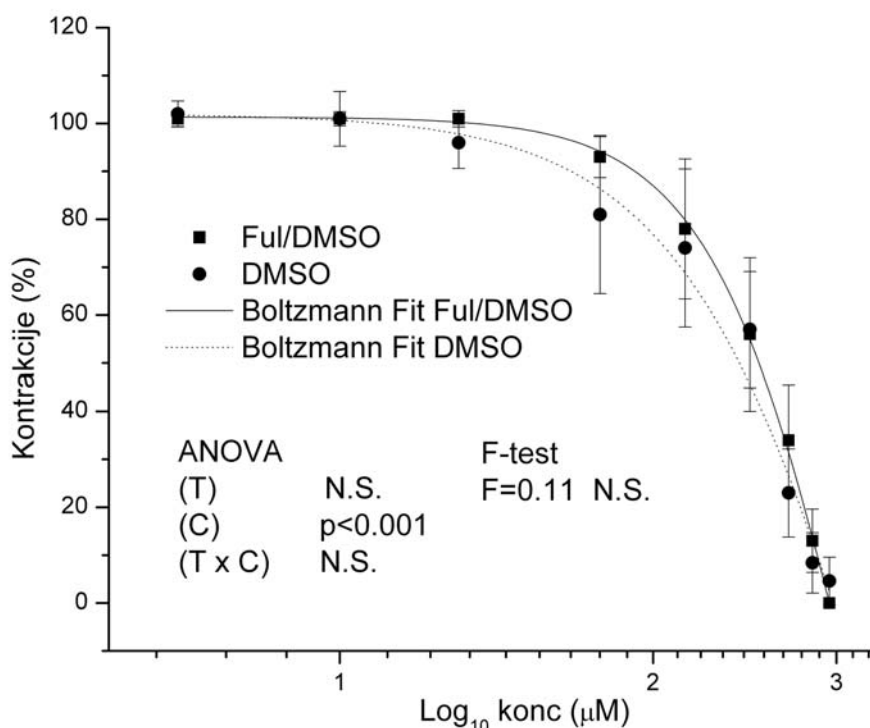
### 10.2 Efekat fulerenola na $Ca^{+2}$ -indukovanu aktivnost uterusa.

Eksperimenti su rađeni u sedam ponavljanja. Prikazani su reprezentativni zapisi farmakoloških eksperimenata.



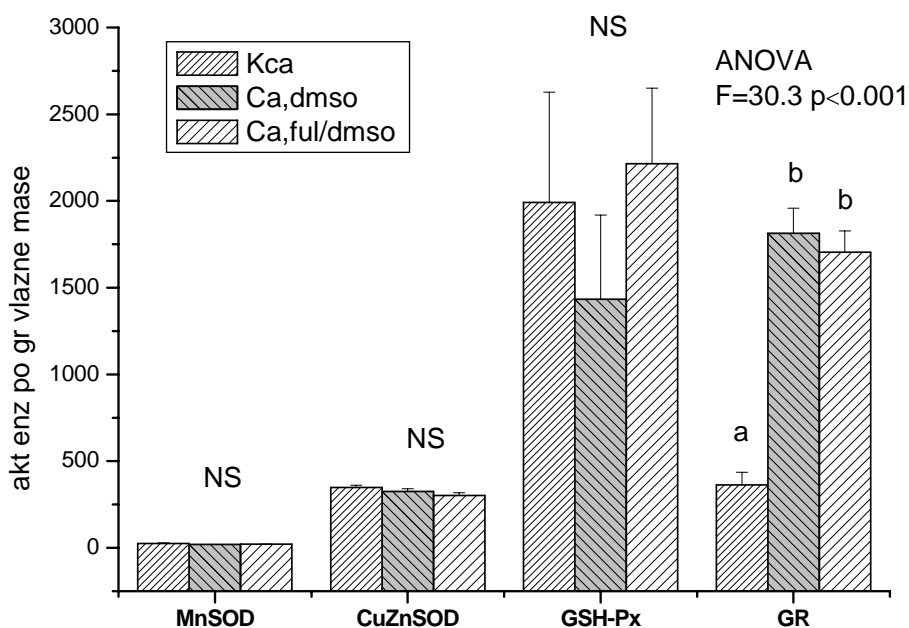
**Slika 12.** Originalni zapis farmakološkog eksperimenta na  $Ca^{+2}$ -indukovanim kontrakcijama uterusa

- A) Efekat fulerenola rastvorenog u vodi na  $Ca^{+2}$ -indukovane kontrakcije uterusa
- B) Efekat DMSO na  $Ca^{+2}$ -indukovane kontrakcije uterusa
- C) Efekat fulerenola rastvorenog u DMSO na  $Ca^{+2}$ -indukovane kontrakcije uterusa



**Slika 13.** Efekat fulerenola na  $\text{Ca}^{+2}$ -indukovanu aktivnost uterusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=7$ ). Značajnost efekata je testirana dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa tretmanom (T) i koncentracijom (C) kao faktorima (prag nivoa značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno). Krive su poređene F testom posle fitovanja korišćenjem Bolcmanove jednačine (prikazana F vrednost, prag nivoa značajnosti je  $p<0.05$ ).

Farmakološki eksperimenti na  $\text{Ca}^{+2}$ -indukovanim uterusima pokazuju da fulerenol rastvoren u vodi nema uticaj na kontraktilnost (slika 12. A). Efekti fulerenola i DMSO se ne mogu razdvojiti, odnosno, fulerenol ne menja uticaj DMSO na  $\text{Ca}^{+2}$ -indukovane uteruse. Statistička obrada rezultata ukazuje da je efekat koncentracije supstanci statistički značajan.

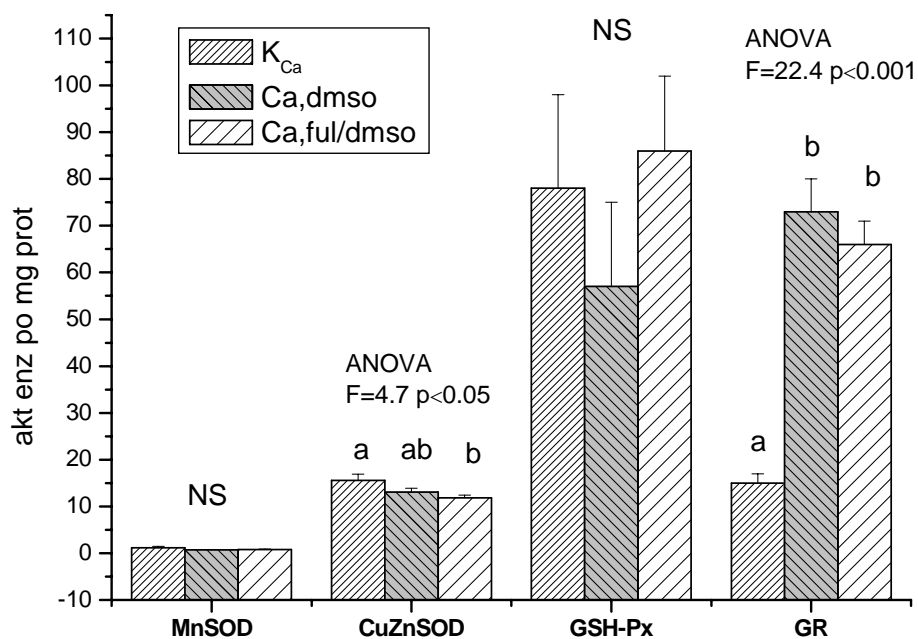
10.2.1 Aktivnost antioksidativnih enzima u  $\text{Ca}^{+2}$ -indukovanim uterusima

**Slika 14.** Aktivnost antioksidativnih enzima u jedinicama po gramu vlažne mase u  $\text{Ca}^{+2}$ -indukovanim uterusima tretiranim fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=7$ ). Značajnost je izračunata jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) (prikazane su F vrednosti, prag statističke značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno) i post hoc Tukijevim HSD testom (različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa).

		MnSOD	CuZnSOD	GSH-Px	GR
Ca	K <sub>Ca</sub>	26 ± 3	348 ± 14	1991 ± 636	364 ± 72 <sup>a</sup>
	DMSO	19 ± 1	326 ± 15	1434 ± 484	1814 ± 144 <sup>b</sup>
	Fulerenol u DMSO	21 ± 1	303 ± 15	2215 ± 436	1704 ± 123 <sup>b</sup>

**Tabela 3.** Aktivnost enzima (po gramu vlažne mase) u Ca<sup>+2</sup>-indukovanim uterusima jedinki tretiranih fulerenolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška. Kod Ca<sup>+2</sup>-aktivnih uterusu, DMSO izaziva povećanje aktivnosti GR, koja i posle tretmana sa fulerenolom ostaje povišena. Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

Rezultati prikazani na slici 14 i tabeli 3 pokazuju da kod Ca<sup>+2</sup>-indukovanih uterusu, DMSO izaziva povećanje aktivnosti GR koja i posle tretmana sa fulerenolom ostaje povišena u odnosu na kontrolni uterus.



**Slika 15.** Aktivnost antioksidativnih enzima u jedinicama po miligramu proteina u  $Ca^{+2}$ -indukovanim uterusima tretiranim fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=7$ ). Značajnost je izračunata jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) (prikazane su F vrednosti, prag statističke značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno) i post hoc Tukijevim HSD testom (različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa).



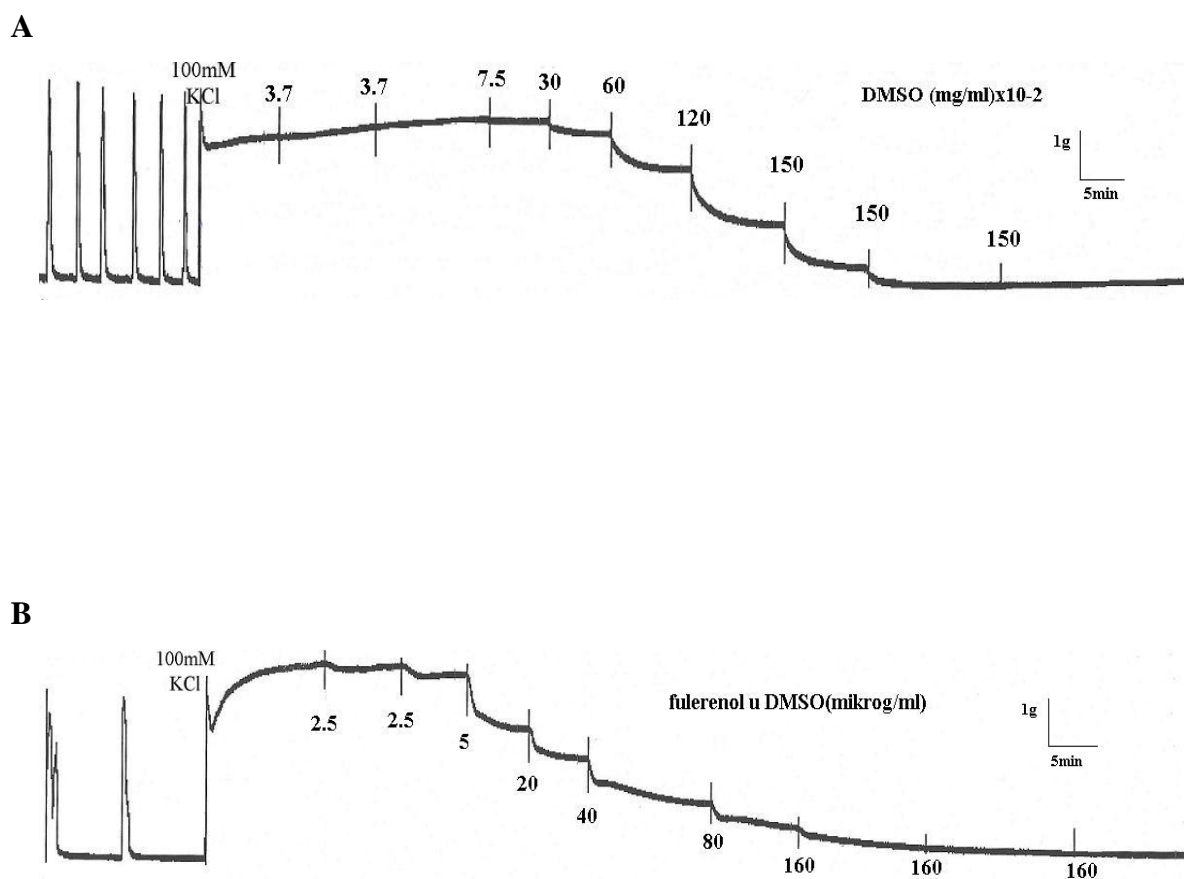
		MnSOD	CuZnSOD	GSH-Px	GR
Ca	K <sub>Ca</sub> (n=5)	1.2 ± 0.3	15.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	78 ± 20	15 ± 2 <sup>a</sup>
	DMSO (n=8)	0.76 ± 0.06	13.1 ± 0.8 <sup>ab</sup>	57 ± 18	73 ± 7 <sup>b</sup>
	Fulerenol u DMSO (n=9)	0.82 ± 0.04	11.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	86 ± 16	66 ± 5 <sup>b</sup>

**Tabela 4.** Aktivnost enzima (po miligramu proteina) u Ca<sup>+2</sup>-indukovanim uterusima jedinki tretiranih fulerenolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška, n je broj ponavljanja. Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

Kod u Ca<sup>+2</sup>-indukovanih uterusa, fulerenol u DMSO izaziva smanjenje aktivnosti CuZnSOD što ukazuje na verovatnu interakciju fulerenola sa supstratom SOD. Tretman fulerenolom u DMSO ne utiče na povećanje aktivnosti GR koje izaziva DMSO.

### 10.3 Efekat fulerenola na toničnu (KCl-indukovanu) aktivnost uterusa. Eksperimenti su rađeni u šest ponavljanja

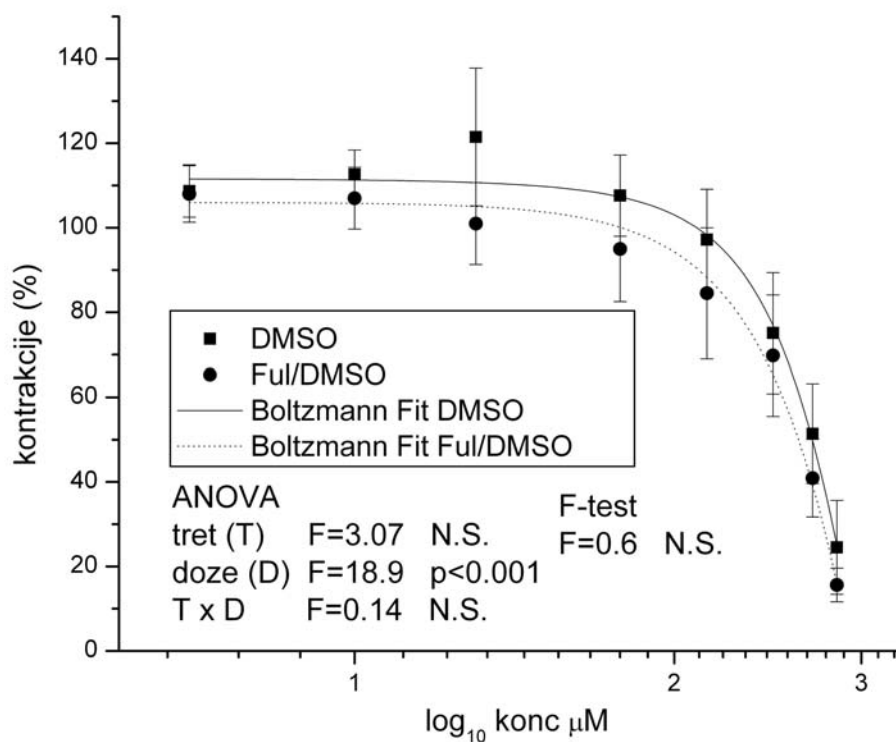
Prikazani su reprezentativni zapisi farmakoloških eksperimenata.



**Slika 16.** Originalni zapis farmakološkog eksperimenta na tonično (KCl-indukovanim) aktivnim uterusima

**A)** Efekat DMSO na KCl-indukovanu aktivnost uterusa

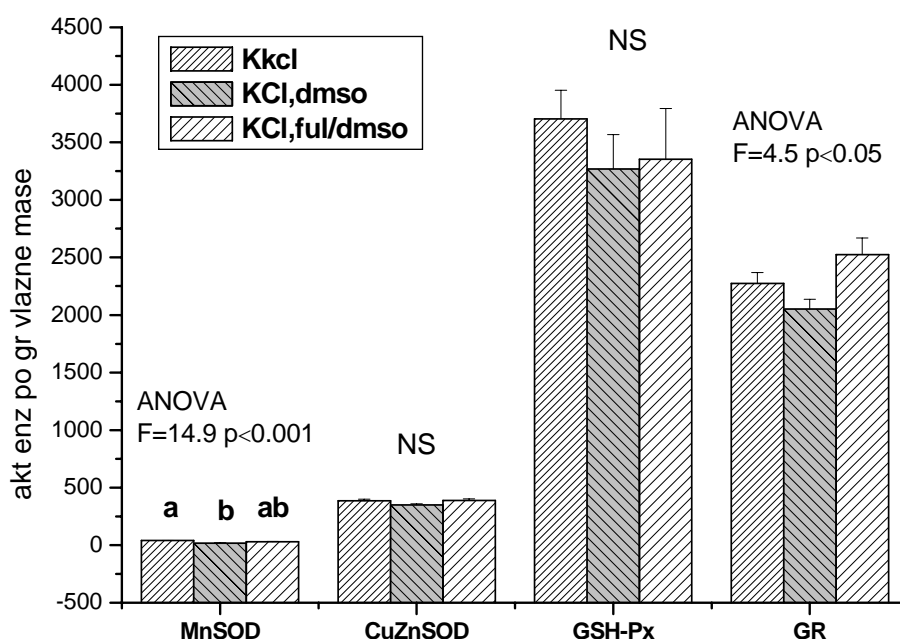
**B)** Efekat fulerenola rastvorenog u DMSO na KCl-indukovanu aktivnost uterusa



**Slika 17.** Efekat fulerenola na KCl-indukovanu toničnu aktivnost uterusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n= 6). Značajnost efekata je testirana dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa tretmanom (T) i dozom (D) kao faktorima (prag nivoa značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno). Krive su poredene F testom posle fitovanja korišćenjem Bolcmanove jednačine (prikazana F vrednost, prag nivoa značajnosti je  $p<0.05$ ).

Fulerenol rastvoren u vodi nema efekat na na KCl-indukovanu toničnu aktivnost uterusa (rezultati nisu prikazani). F test pokazuje da se kod tonično aktivnih uterusa farmakološki efekat fulerenola ne razlikuje značajno od efekta DMSO. U oba tretmana značajni su efekti koncentracija, odnosno, fulerenol, kao i DMSO postepeno relaksiraju tonično aktivne uteruse.

### 10.3.1 Aktivnost antioksidativnih enzima u KCl-indukovanim uterusima

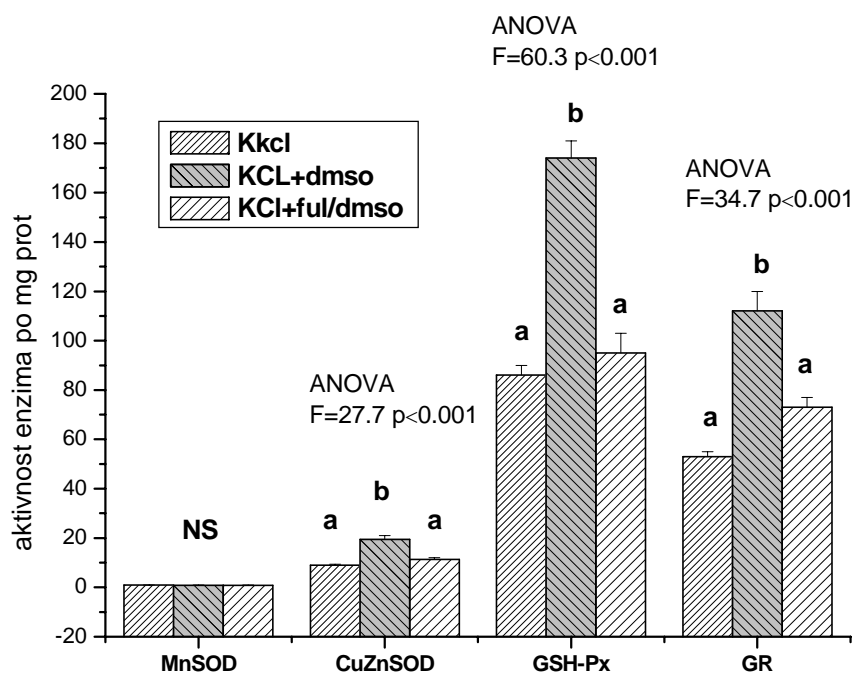


**Slika 18.** Aktivnost antioksidativnih enzima u jedinicama po gramu vlažne mase u KCl-indukovanim uterusima tretiranim fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=6$ ). Značajnost je izračunata jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) (prikazane su F vrednosti, prag statističke značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno) i post hoc Tukijevim HSD testom (različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa).

		MnSOD	CuZnSOD	GSH-Px	GR
KCl	K <sub>KCl</sub>	40 ± 2 <sup>a</sup>	384 ± 15	3704 ± 248	2274 ± 94
	DMSO	16 ± 3 <sup>b</sup>	350 ± 8	3268 ± 301	2051 ± 86
	Fulerenol u DMSO	28 ± 5 <sup>ab</sup>	387 ± 14	3353 ± 442	2524 ± 146

**Tabela 5.** Aktivnost enzima (po gramu vlažne mase) u tonično aktivnim (KCl-indukovanim) uterusima jedinki tretiranih fulerenolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška. Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

DMSO izaziva značajno smanjenje aktivnosti MnSOD, dok tretman fulerenolom u DMSO sprečava inhibiciju i nivo je blizu kontrolnih vrednosti. Kod tonično aktivnih uterusa fulerenol povećava aktivnost GR.



**Slika 19.** Aktivnost antioksidativnih enzima u jedinicama po miligramu proteina u KCl-indukovanim uterusima tretiranim fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=6). Značajnost je izračunata jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) (prikazane su F vrednosti, prag statističke značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno) i post hoc Tukijevim HSD testom (različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa).

		MnSOD	CuZnSOD	GSH-Px	GR
KCl	K <sub>KCl</sub> (n=8)	0.95 ± 0.05	9 ± 0.4 <sup>a</sup>	86 ± 4 <sup>a</sup>	53 ± 2 <sup>a</sup>
	DMSO (n=7)	0.79 ± 0.16	19.4 ± 1.6 <sup>b</sup>	174 ± 7 <sup>b</sup>	112 ± 8 <sup>b</sup>
	Fulerenol u DMSO (n=6)	0.8 ± 0.2	11.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	95 ± 8 <sup>a</sup>	73 ± 4 <sup>a</sup>

**Tabela 6.** Aktivnost enzima (po miligramu proteina) u tonično aktivnim (KCl-indukovanim) uterusima jedinki tretiranih fulerenolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška, n je broj ponavljanja. Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

DMSO značajno povećava nivo aktivnosti enzima CuZnSOD, GSH-Px i GR. Tretman fulerenolom u DMSO ne dovodi do statistički značajnih promena aktivnosti u odnosu na kontrolni nivo.

Efektivna doza (ED50)

	Fulerenol/DMSO	DMSO	T-test
Spontane	516 ± 13	330 ± 11	P<0.001
Ca <sup>+2</sup> - indukovana	340 ± 126	338 ± 40	N.S.
toničke	478 ± 85	398 ± 71	N.S.

**Tabela 7.** ED<sub>50</sub> za fulerenol u DMSO-u i sam DMSO relaksaciju uterusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE.

Poređenje ED<sub>50</sub> vrednosti za fulerenol/DMSO i sam DMSO na relaksaciju spontano aktivnih uterusa je pokazalo statistički značajnu razliku (p<0.001) (tabela 1). ED<sub>50</sub> vrednosti za fulerenol rastvoren u DMSO se kod Ca<sup>+2</sup>-indukovanih uterusa i kod toničnih kontrakcija ne razlikuju u odnosu na sam nosač DMSO. ED<sub>50</sub> za DMSO kod različitih tipova kontrakcija se ne razlikuje značajno.



### 10.4 Dvofaktorska analiza varijanse aktivnosti antioksidativnih enzima u uterusu

Izraženo po gramu vlažne mase

		Tip (T)	Tretman (Tr)	T x Tr
	Df	2	2	4
MnSOD	MS	193	765	281
	F	<b>3.36*</b>	<b>13.3***</b>	<b>4.88**</b>
	Df	2	2	4
CuZnSOD	MS	12.9 x 10 <sup>3</sup>	10.6 x 10 <sup>3</sup>	4110
	F	<b>6.1**</b>	<b>5**</b>	1.9
	Df	2	2	4
GSH-Px	MS	19 x 10 <sup>6</sup>	1.5 x 10 <sup>6</sup>	0.3 x 10 <sup>6</sup>
	F	<b>18.85***</b>	1.47	0.29
	Df	2	2	4
GR	MS	5.2 x 10 <sup>6</sup>	3.1 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>6</sup>
	F	<b>21.1***</b>	<b>12.6***</b>	<b>5.33***</b>

**Tabela 8.** Dvofaktorska analiza varijanse aktivnosti antioksidativnih enzima (jed/gr vlažne mase) u uterusu: efekat tipa kontrakcije i tretmana na aktivnost enzima antioksidativne zaštite. Df-stepeni slobode, MS-prosečna vrednost kvadrata, F-faktor. \*\*\* p<0.001; \*\* p<0.01; \* p<0.05

Kada se aktivnost enzima izrazi po gramu vlažne mase, opsta slika da efekti zavise od tipa kontrakcije uterusa je potvrđena. Kod spontano aktivnih uterusa, tretman fulerenolom dovodi do smanjivanja aktivnosti CuZnSOD, dok nema promena aktivnosti ostalih merenih enzima (tabela 1.). Kod Ca<sup>+2</sup>-indukovanih, DMSO izaziva povećanje aktivnosti GR, koja i posle tretmana sa fulerenolom ostaje povišena u odnosu na kontrolni uterus (tabela 3.). Kod KCl indukovanih kontrakcija, DMSO izaziva smanjenje aktivnosti MnSOD, koje tretman fulerenolom vraća na nivo kontrola. Tretman fulerenolom u DMSO povećava aktivnost GR (tabela 5).

*Izraženo po miligramu proteina*

		Tip (T)	Tretman (Tr)	T x Tr
MnSOD	Df	2	2	4
	MS	0.086	0.416	0.114
	F	0.987	<b>4.81*</b>	1.31
CuZnSOD	Df	2	2	4
	MS	35.33	81.78	93.88
	F	<b>7.4***</b>	<b>17.1***</b>	<b>19.6***</b>
GSH-Px	Df	2	2	4
	MS	23 x 10 <sup>3</sup>	2099	8917
	F	<b>19.7***</b>	1.74	<b>7.4***</b>
GR	Df	2	2	4
	MS	6300	12.8 x 10 <sup>3</sup>	1503
	F	<b>25.5***</b>	<b>51.8***</b>	<b>6.1***</b>

**Tabela 9.** Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti antioksidativnih enzima (jed/mg proteina) u uterusu: faktori su tip kontrakcije i tretmana. Df-stepeni slobode, MS-prosečna vrednost kvardata, F-faktor. \*\*\* p<0.001; \*\* p<0.01; \* p<0.05

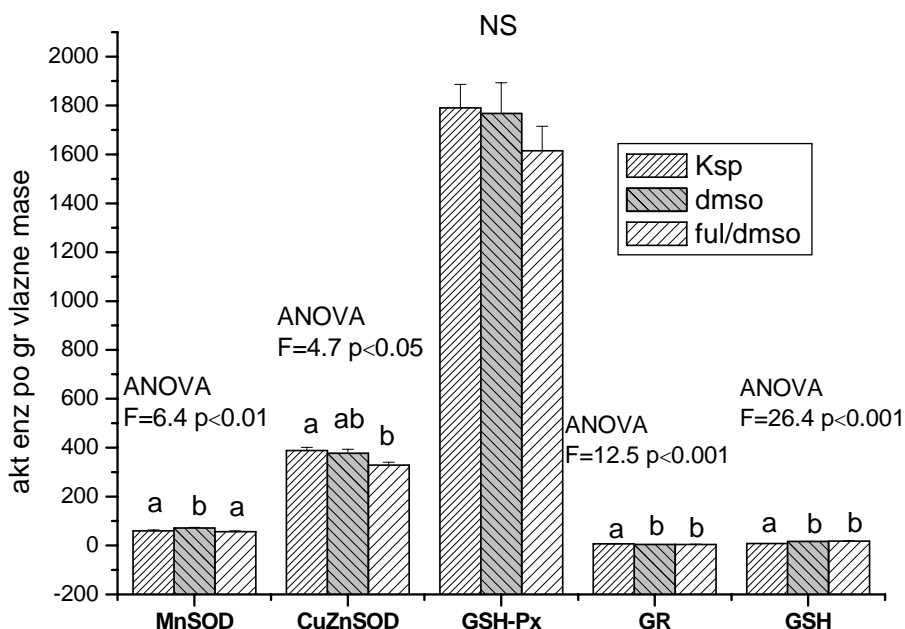
Rezultati aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (izraženi po miligramu proteina) su pokazali da odgovor merenih antioksidativnih enzima na tretman fulerenolom zavisi od tipa aktivacije uterusu. Kod spontanij, fulerenol izaziva smanjenje CuZnSOD aktivnosti, dok se povećanje aktivnosti GR koje izaziva DMSO, po tretmanu sa fulerenolom vraća na nivo kontrola (tabela 2.). Kod Ca<sup>+2</sup>-indukovanih, fulerenol izaziva takođe smanjenje CuZnSOD aktivnosti, dok povećanje aktivnosti GR koje izaziva DMSO, po tretmanu sa fulerenolom ostaje na istom nivou (tabela 4.). Za razliku od spontanij i Ca<sup>+2</sup>-indukovanih uterusu, kod KCl toničnij kontrakcija uterusu DMSO-om izazvano povećanje CuZnSOD, GSH-Px i GR posle dodavanja fulerenola se vraća na kontrolni nivo (tabela 6.).

## 11. Rezultati farmakoloških i biohemijskih eksperimenata na modelu ileuma

### 11.1 Efekat fulerenola na spontanu aktivnost ileuma

Eksperimenti su rađeni u osam ponavljanja.

11.1.1 Aktivnost merenih enzima je izražavana dvojako: na miligram proteina (specifična aktivnost) i na gram vlažne mase (ukupna aktivnost).

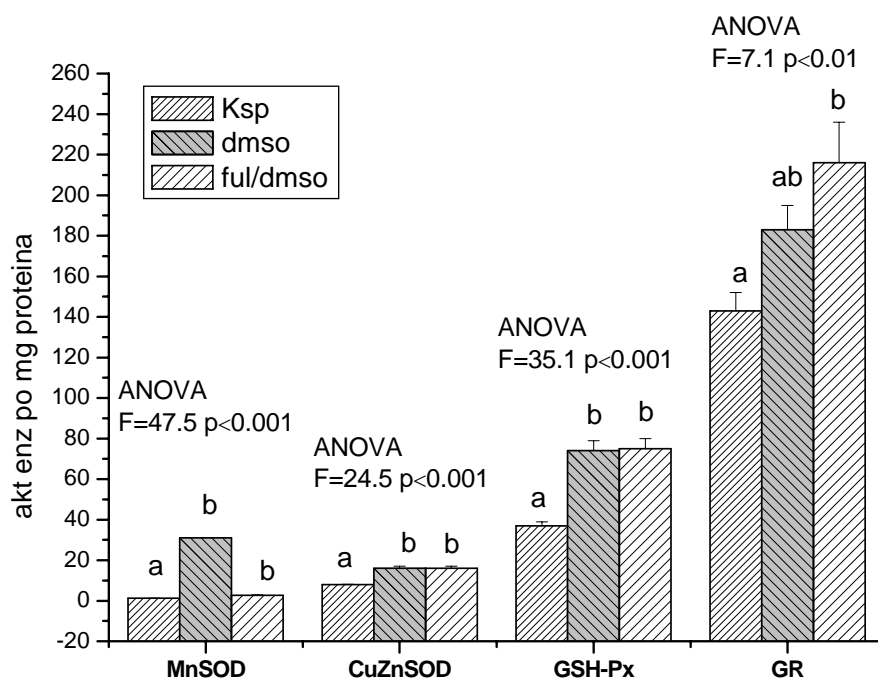


**Slika 20.** Aktivnost antioksidativnih enzima u jedinicama po gramu vlažne mase u spontano aktivnim ileumima tretiranim fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=8$ ). Značajnost je izračunata jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) (prikazane su F vrednosti, prag statističke značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno) i post hoc Tukijevim HSD testom (različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa).

		MnSOD	CuZnSOD	GSH-Px	GR (x 10 <sup>3</sup> )	GSH
spontana	K <sub>sp</sub> (n=10)	59 ± 4 <sup>a</sup>	388 ± 14 <sup>a</sup>	1791 ± 95	6.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	7.7 ± 1.1 <sup>a</sup> (n=5)
	DMSO (n=8)	72 ± 3 <sup>b</sup>	377 ± 17 <sup>ab</sup>	1767 ± 126	4.4 ± 0.4 <sup>b</sup>	16 ± 1 <sup>b</sup> (n=6)
	Fulerenol u DMSO (n=8)	57 ± 2 <sup>a</sup>	329 ± 12 <sup>b</sup>	1615 ± 100	4.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	18 ± 1 <sup>b</sup> (n=5)

**Tabela 10.** Aktivnost antioksidativnih enzima (po gramu vlažne mase) u ileumu jedinki tretiranih fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. n–broj ponavljanja. Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa. Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

U spontano aktivnim ileumima dolazi do smanjenja aktivnosti CuZnSOD nakon tretmana fulerenolom, dok aktivnost MnSOD raste primenom DMSO. Fulerenol snižava aktivnost MnSOD do kontrolnih vrednosti. Povećanje aktivnosti GR i ukupnog glutaciona nakon tretmana DMSO-om, ne smanjuje se primenom fulerenolom.



**Slika 21.** Aktivnost antioksidativnih enzima u jedinicama po miligramu proteina u spontano aktivnim ileumima tretiranim fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=8$ ). Značajnost je izračunata jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) (prikazane su F vrednosti, prag statističke značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno) i post hoc Tukijevim HSD testom (različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa).

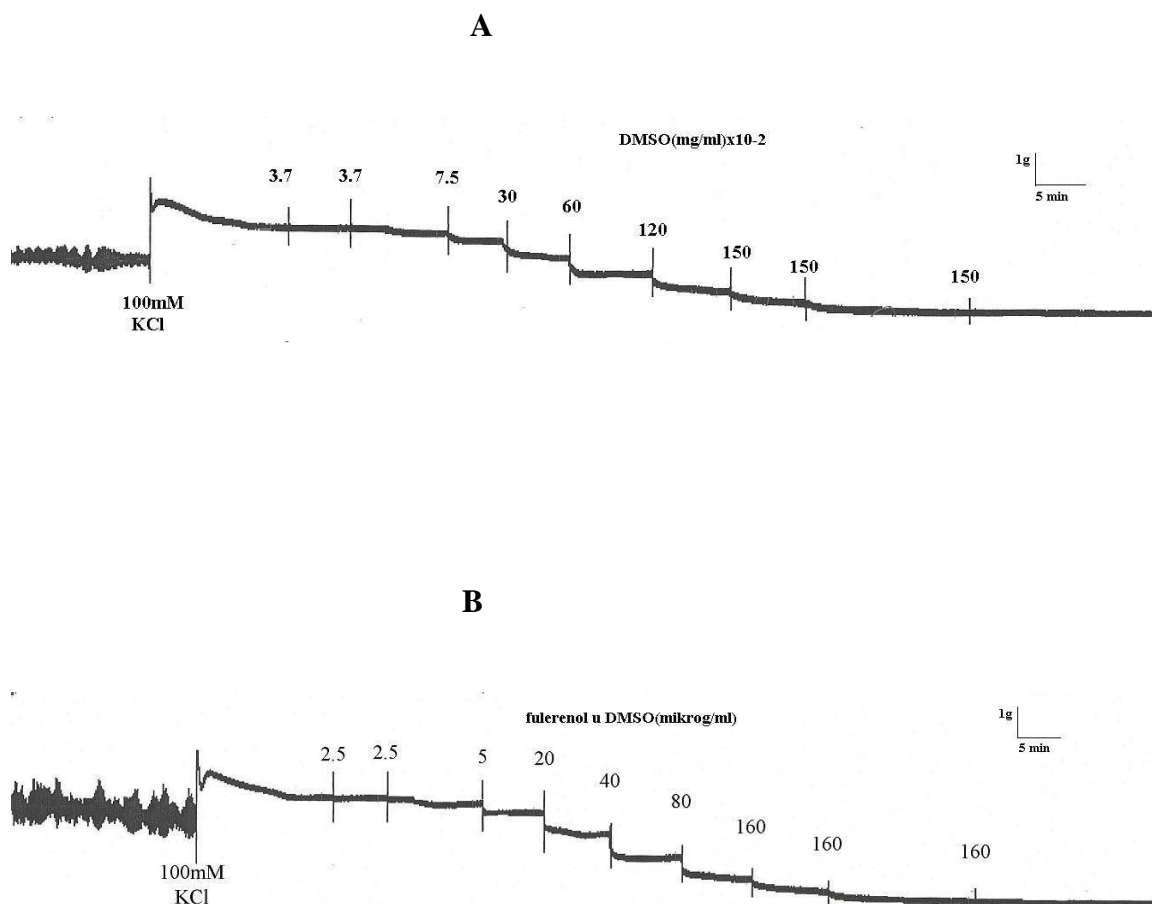
		MnSOD	CuZnSOD	GSH-Px	GR
spontana	K <sub>sp</sub> (n=10)	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	8 ± 0.2 <sup>a</sup>	37 ± 2 <sup>a</sup>	143 ± 9 <sup>a</sup>
	DMSO (n=8)	3.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	16 ± 1 <sup>b</sup>	74 ± 5 <sup>b</sup>	183 ± 12 <sup>ab</sup>
	Fulerenol u DMSO (n=8)	2.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	16 ± 1 <sup>b</sup>	75 ± 5 <sup>b</sup>	216 ± 20 <sup>b</sup>

**Tabela 11.** Aktivnost antioksidativnih enzima (po miligramu proteina) u spontano aktivnim ileumima jedinki tretiranih fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. n–broj ponavljanja. Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

U spontano aktivnim ileumima aktivnost enzima nakon tretmana DMSO-om se značajno povećava i prisustvo fulerenola u DMSO ne utiče na aktivnost enzima.

**11.2 Efekat fulerenola na toničnu (KCl-indukovanu) aktivnost ileuma. Eksperimenti su rađeni u šest ponavljanja**

Prikazani su reprezentativni zapisi farmakoloških eksperimenata.

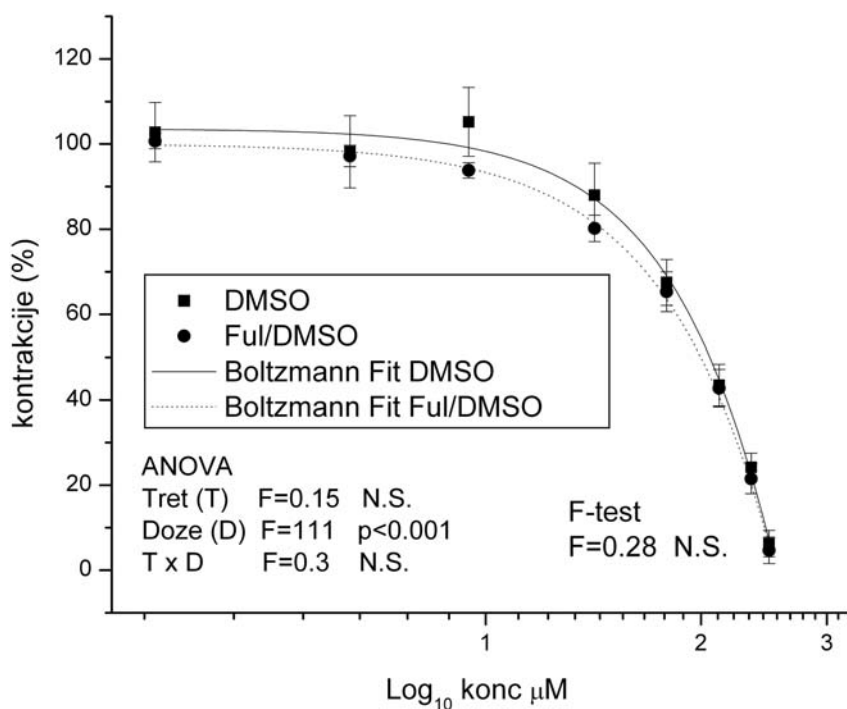


**Slika 22.** Originalni zapis farmakološkog eksperimenta na tonično aktivnom ileumu

**A)** efekat DMSO na KCl-indukovanu aktivnost ileuma

**B)** efekat fulerenola rastvorenog u DMSO na KCl-indukovanu aktivnost ileuma

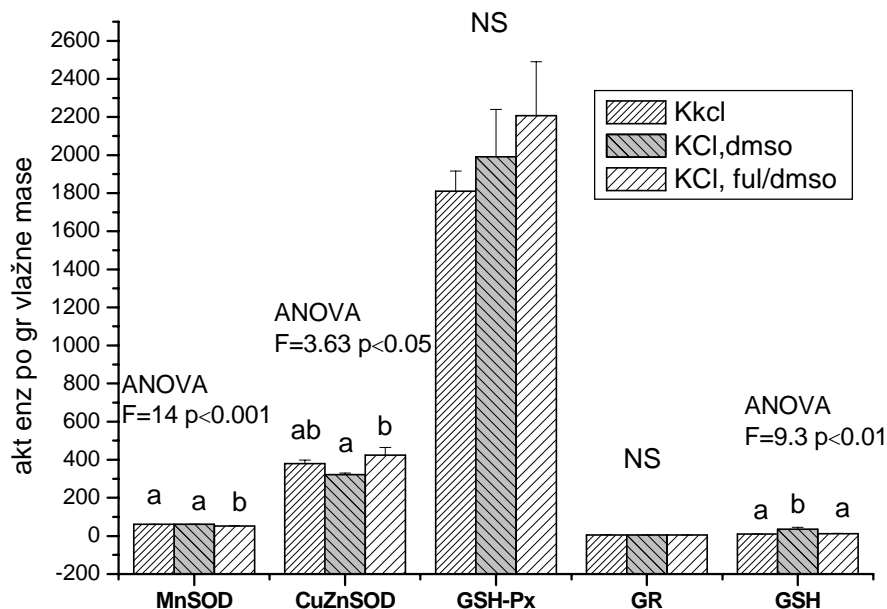




**Slika 23.** Efekat fulerenola na KCl-indukovanu toničnu aktivnost ileuma. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n= 6). Značajnost efekata je testirana dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa tretmanom (T) i koncentracijom (D) kao faktorima (prag nivoa značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno). Krive su poredene F testom posle fitovanja korišćenjem Bolcmanove jednačine (prikazana F vrednost, prag nivoa značajnosti je  $p<0.05$ ).

Fulerenol rastvoren u vodi nema efekat na toničnu aktivnost ileuma (rezultati nisu prikazani). Farmakološki zapisi i F test pokazuju da DMSO izaziva dozno-zavisno smanjenje tonične aktivnosti ileuma i da se efekat fulerenola ne može razdvojiti od efekta DMSO, tj. fulerenol rastvoren u DMSO takođe relaksira tonično aktivni ileum.

## 11.2.1 Aktivnost antioksidativnih enzima u KCl-indukovanim ileumima

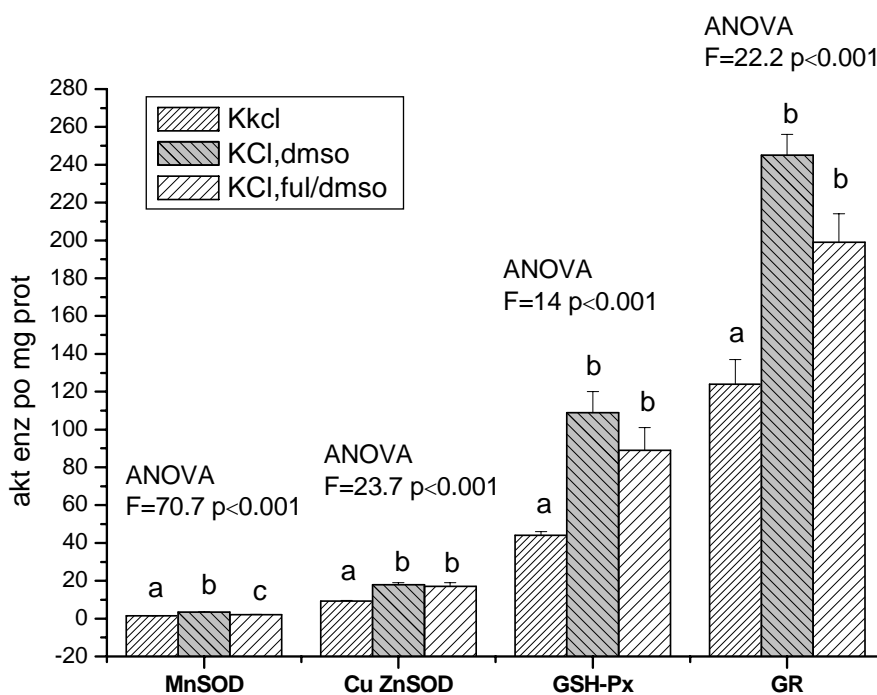


**Slika 24.** Aktivnost antioksidativnih enzima u jedinicama po gramu vlažne mase u KCl-indukovanim ileumima tretiranim fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=7$ ). Značajnost je izračunata jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) (prikazane su F vrednosti, prag statističke značajnosti je  $p<0.05$ ; N.S. – nije značajno) i post hoc Tukijevim HSD testom (različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa).

		MnSOD	CuZnSOD	GSH-Px	GR (x 10 <sup>3</sup> )	GSH
KCl	K <sub>KCl</sub> (n=8)	60 ± 1 <sup>a</sup>	379 ± 20 <sup>ab</sup>	1810 ± 105	5.1 ± 0.6	9 ± 1 <sup>a</sup> (n=6)
	DMSO (n=7)	60 ± 1 <sup>a</sup>	322 ± 9 <sup>a</sup>	1991 ± 249	4.4 ± 0.2	36 ± 9 <sup>b</sup> (n=5)
	Fulerenol u DMSO (n=7)	53 ± 1 <sup>b</sup>	424 ± 41 <sup>b</sup>	2208 ± 283	5 ± 0.2	12 ± 1 <sup>a</sup> (n=6)

**Tabela 12.** Aktivnost antioksidativnih enzima (po gramu vlažne mase) kod tonički aktivnih ileuma jedinki tretiranih fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. n – broj ponavljanja. Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

Fulerenol smanjuje aktivnost MnSOD. Fulerenol u DMSO sprečava smanjenje aktivnosti CuZnSOD koje nastaje primenom samog DMSO. Nivo ukupnog glutaciona se povećava primenom DMSO. Fulerenol u DMSO sprečava taj efekat.



**Slika 25.** Aktivnost antioksidativnih enzima u jedinicama po miligramu proteina kod tonički aktivnih (KCl-indukovanim) ileuma tretiranim fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=7). Značajnost je izračunata jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) (prikazane su F vrednosti, prag statističke značajnosti je  $p < 0.05$ ; N.S. – nije značajno) i post hoc Tukijevim HSD testom (različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa).

		MnSOD	CuZnSOD	GSH-Px	GR
KCl	K <sub>KCl</sub> (n=8)	1.5 ± 0.05 <sup>a</sup>	9.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	44 ± 2 <sup>a</sup>	124 ± 13 <sup>a</sup>
	DMSO (n=7)	3.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	18 ± 1 <sup>b</sup>	109 ± 11 <sup>b</sup>	245 ± 11 <sup>b</sup>
	Fulerenol u DMSO (n=7)	2.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	17 ± 2 <sup>b</sup>	89 ± 12 <sup>b</sup>	199 ± 15 <sup>b</sup>

**Tabela 13.** Aktivnost antioksidativnih enzima (po miligramu proteina) u tonično aktivnim ileumima jedinki tretiranih fulerenolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. n – broj ponavljanja. Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

Izraženo po miligramu proteina, efekat DMSO je značajno povećanje aktivnosti svih prikazanih enzima. Fulerenol u DMSO snižava DMSO-om izazvano povećanje aktivnosti MnSOD, GSH-Px i GR.

### 11.3 Dvofaktorska analiza varijanse aktivnosti antioksidativnih enzima u ileumu

Izraženo po gramu vlažne mase

		Tip (T)	Tretman (Tr)	T x Tr
MnSOD	Df	1	2	2
	MS	307	479	180
	F	<b>6.3*</b>	<b>9.8***</b>	<b>3.7*</b>
CuZnSOD	Df	1	2	2
	MS	1265	4720	21.4 x 10 <sup>3</sup>
	F	0.39	1.46	<b>6.62**</b>
GPx	Df	1	2	2
	MS	920 x 10 <sup>3</sup>	53.8 x 10 <sup>3</sup>	339 x 10 <sup>3</sup>
	F	<b>4.36*</b>	0.255	1.6
GR	Df	1	2	2
	MS	2.56 x 10 <sup>6</sup>	12 x 10 <sup>6</sup>	5.9 x 10 <sup>6</sup>
	F	1.74	<b>8.18***</b>	<b>4.03*</b>
GSH	Df	1	2	2
	MS	176	846	498
	F	2.63	<b>12.7***</b>	<b>7.48**</b>

**Tabela 14.** Dvofaktorska analiza varijanse aktivnosti antioksidativnih enzima (jed/gr vlažne mase)u ileumu: efekat tipa kontrakcije i tretmana na aktivnost enzima antioksidativne zaštite. Df-stepeni slobode, MS-prosečna vrednost kvardata, F-faktor. \*\*\* p<0.001; \*\* p<0.01; \* p<0.05

Rezultati aktivnosti antioksidativnih enzima izraženih gramu vlažne mase, pokazuju da u ileumima dolazi do smanjivanja aktivnosti CuZnSOD posle tretmana fulerenolom, ali i reverzije povećanja aktivnosti MnSOD izazvanih DMSO-om do nivoa kontrolnih vrednosti. Međutim, DMSO dovodi do povećanja aktivnosti GR i količine glutaciona, koji se zadržavaju i posle tretmana fulerenolom. Kada se posmatra ileum u toničnoj kontrakciji pokazuje se da tretman fulerenolom smanjuje aktivnost MnSOD, ali i povećava aktivnost CuZnSOD u

odnosu na DMSO-om izazvano smanjenje. Osim toga, tretman fulerenolom smanjuje količinu glutationa koja se posle dodavanja DMSO povećala u odnosu na kontrolni tonički aktivan ileum.

*Izraženo po miligramu proteina*

		Tip (T)	Tretman (Tr)	T x Tr
MnSOD	Df	1	2	2
	MS	0.01	14.09	0.83
	F	0.1	<b>100***</b>	<b>5.9**</b>
CuZnSOD	Df	2	2	4
	MS	22.5	348.2	0.6
	F	3.08	<b>47.7***</b>	0.08
GPx	Df	2	2	4
	MS	4259	12.2 x 10 <sup>3</sup>	870
	F	<b>12.5***</b>	<b>35.9***</b>	2.55
GR	Df	2	2	4
	MS	910	33.3 x 10 <sup>3</sup>	8369
	F	0.61	<b>22.25***</b>	<b>5.59**</b>

**Tabela 15.** Dvofaktorska analiza varijanse aktivnosti antioksidativnih enzima (jed/mg proteina) u ileumu: efekat tipa kontrakcije i tretmana na aktivnost enzima antioksidativne zaštite. Df-stepeni slobode, MS-prosečna vrednost kvardata, F-faktor. \*\*\* p<0.001; \*\* p<0.01; \* p<0.05

Kod kontrolnih ileuma, tretman fulerenolom nema efekta na već DMSO-om povećane aktivnosti MnSOD, CuZnSOD i GSH-Px. Dodavanje fulerenola dovodi do povećanja količine glutationa u ileumu. Kada se aktivnost enzima izrazi po jedinicama vlažne mase, efekat fulerenola u odnosu na DMSO je smanjenje MnSOD aktivnosti, pri čemu se pokazuje dalje da fulerenol ne menja DMSO-om posredovano povećanje aktivnosti CuZnSOD, GSH-Px i GR.



## DISKUSIJA

Ispitivanja hemijskih osobina fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  ukazala su da postoje značajne interakcije sa reaktivnim vrstama kiseonika i azot oksidom. S druge strane, intenzivna i/ili produžena aktivacija mišića dovodi do povećanja produkcije endogenih reaktivnih vrsta kiseonika. Relaksacija mišića je pod direktnim uticajem azot oksida pa je naš izbor da ispitamo efekte fulerenola na kontraktilnu aktivnost glatkih mišića i da pri tome pratimo promene u endogenoj zaštiti od oksidacionih oštećenja *ex vivo* sasvim opravdan.

### 12.1 AFM, TEM, SEM analize

Fulerenol smo testirali u obliku vodenog rastvora i rastvorenog u dimetil sulfoksidu (DMSO). Fulerenol rastvoren u vodi nema uticaja na kontraktilnost spontano aktivnog uterusu. U našim daljim eksperimentima primenjena doza fulerenola u vodenom rastvoru nije imala efekat ni na kontraktilnu aktivnost  $Ca^{+2}$ - kao ni KCl-indukovanih kontrakcija. Rezultati AFM, TEM i SEM analize pokazuju da fulerenol u vodenom rastvoru gradi agregate koji se brzo talože. Ovo, kao sama veličina agregata onemogućavaju direktno interagovanje sa mišićima ili ulazak u mišićno tkivo, te je naš rezultat sasvim logičan.

Eksperimenti u kojima su ispitivani efekti derivata fulerena ( $C_{60}$ -bis(dimetilpirolidijum jodid) i dimalonska kiselina- $C_{60}$ ) na glatku muskulaturu krvnih sudova pokazali su da ovi derivati inhibiraju endotel-zavisnu relaksaciju indukovanu acetilholinom (Sato et al. 2006). Dalja ispitivanja su potvrdila očuvanost endotela u tretmanu derivatima fulerenola, kao i da se osetljivost na acetilholin delimično vratila nakon dodavanja superoksid dismutaze u sistem. Pretpostavljeno je da ove supstance sprečavaju relaksantni efekat kako slobodnog NO-a, tako i agonist indukovane produkcije NO-a (Sato et al. 2006). Drugi istraživači su prateći kinetiku formiranja citrulina uočili da derivat trimalonska kiselina- $C_{60}$  reverzibilno inhibira izoforme NO-sintaza (Wolff et al. 2000). Eksperimenti u kojima su endotelne ćelije humane umbilikalne vene tretirane fulerenolom  $C_{60}(OH)_{24}$  tokom 24h, pokazali su da samo maksimalna doza od  $100\mu\text{g/ml}$  indukuje citotoksična oštećenja (formiranje vakuola i povećanu koncentraciju laktat dehidrogenaze), inhibiciju rasta ćelije ili smrt ćelije aktiviranjem ubikitin autofagnog puta. Međutim, hronična primena (8 dana) deset puta manje

doze samo je malo odložila rast endotelnih ćelija (Yamawaki et Iwai, 2006). Gelderman i sar. (Gelderman et al. 2008) su takođe radili sa ovim ćelijama u kulturi, prateći efekat fulerena  $C_{60}$  i fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  na ICAM-1 (intercelularni adhezioni molekul) CD142 ili TF (tkivni faktor), fosfatidil serin (PS) ćelije i koncentraciju jona kalcijuma. ICAM-1 je pokazatelj nivoa inflamacije, TF je prokoagulant, dok PS ukazuje na proapoptoska dešavanja. Inkubacija endotelnih ćelija sa fulerenolom u rastućim koncentracijama i fulerenom  $C_{60}$  u koncentraciji od  $4\mu\text{g/ml}$  pokazalo je da najveća doza  $C_{60}(OH)_{24}$  od  $100\mu\text{g/ml}$  značajno povećava nivo ekspresije ICAM-1 na površini ćelije, kao i nivo TF i PS. Manje doze fulerenola, kao i fulerena  $C_{60}$ , nisu pokazale povećanje vrednosti ovih parametara. Zaključak je da u koncentraciji  $100\mu\text{g/ml}$  fulerenol ima proinflamatorno, prokoagulantno i proapoptosko dejstvo. Trebalo bi pritom, imati u vidu da u velikim koncentracijama fulerenoli rastvoreni u vodi prave agregate, veličina im raste dok se odnos površina-zapremina smanjuje (Jeng et al. 2001) i da takvi agregati imaju male fiziološke efekte što se potvrdilo i u našim eksperimentima.

Takođe je pokazano da fuleren i fulerenol ( $10\text{-}100\mu\text{g/ml}$ ) zaustavljaju endotelne ćelije u kulturi i G1 fazi ćelijskog ciklusa. Razlike u direktnim efektima fulerena, fulerenola i njihovih derivata dominantno potiču od razlika u rasvorljivosti u vodenim rastvorima, tipu čestica koje pri tome formiraju i specifičnih interakcija sa drugim prisutnim katjonima i anjonima u svim vodenim rastvorima. O ovome smo i mi dobili podatke koristeći različite metode mikroskopije (AFM, TEM, SEM).

## 12.2 Uticaj fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ i DMSO na kontraktilnost glatke muskulature

Budući da sam DMSO ima relaksantni efekat na kontrakcije glatkih mišića, efekte fulerenola rastvorenog u DMSO na glatki mišić smo poredili sa efektima samog DMSO.

Pokazali smo da DMSO izaziva relaksantni efekat na svim tipovima kontrakcija glatkih mišića. Fulerenol rastvoren u DMSO delimično antagonizuje relaksantni efekat samog DMSO, ali ne sprečava potpunu relaksaciju čak i nakon poslednje primenjene doze.

S tim u vezi, neki istraživači (Mariano et al. 2001; Shiga et al. 2007) smatraju da relaksantni efekat na mišiće DMSO ostvaruje tako što interferira sa kretanjem miozina duž aktina jer sprečava oslobađanje fosforne grupe iz ATP-a. Takođe, on smanjuje senzitivnost kontraktilnog aparata na kalcijum, ne menjajući pritom intracelularnu koncentraciju  $\text{Ca}^{+2}$ .

Postoje i rezultati koji kažu da DMSO sprečava ulazak jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{+2}$  u miocite, ali ne utiče pritom na normalan efluks jona kalijuma iz ćelija.

$\text{ED}_{50}$  vrednosti za DMSO i fulerenol/DMSO kod releksacije spontano aktivnih uterusu pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ ). Pošto prisustvo fulerenola u DMSO redukuje relaksantni efekat samog DMSO (povećava  $\text{ED}_{50}$  vrednosti), postavlja se pitanje mehanizma kojim se taj efekat ostvaruje.

Odgovor na ovo mogu biti sledeća razmatranja. Na nivou čestica pokazano je da kada je fulerenol rastvoren u DMSO molekuli DMSO prave film oko osnovnog motiva agregata i najverovatnije pospešuju prolaz fulerenola u tkivo ili pak odlažu taloženje fulerenola. Pokazali smo da fulerenol gradi agregate sa zemnoalkalnim metalima iz De Jalon-ovog rastvora ( $\text{Ca}^{+2}$  i  $\text{Mg}^{+2}$ ). U De Jalon-u, rastvor fulerenola se taloži u toku 12h što ostavlja dovoljno vremena da u našem eksperimentu čestice ostvare najmanje dvostruki efekat. Prvi usled interakcije sa tkivom i drugi usled smanjenja aktuelne koncentracije jona  $\text{Ca}^{+2}$  i  $\text{Mg}^{+2}$  u rastvoru.  $\text{ED}_{50}$  vrednosti za fulerenol rastvoren u DMSO se kod  $\text{Ca}^{+2}$ -indukovanih aktivnih uterusu i kod toničnih kontrakcija ne razlikuju u odnosu na sam nosač DMSO.  $\text{ED}_{50}$  za DMSO se ne razlikuje značajno u odnosu na tip kontrakcije.

### 12.3 Enzimi antioksidacionog sistema zaštite u tkivu uterusu

Kada se aktivnost enzima izrazi po gramu vlažne mase (ukupna aktivnost), opšti zaključak je da efekti zavise od tipa kontrakcije. Kod spontano aktivnih uterusu, tretman fulerenolom rastvorenim u DMSO (ful/DMSO) dovodi do smanjivanja aktivnosti CuZnSOD, dok nema promena aktivnosti ostalih merenih enzima. Kod  $\text{Ca}^{+2}$ -indukovanih kontrakcija, DMSO izaziva povećanje aktivnosti GR, koja i posle tretmana sa fulerenolom rastvorenim u DMSO ostaje povišena u odnosu na kontrolni uterus. Kod KCl-indukovanih kontrakcija, DMSO izaziva smanjenje aktivnosti MnSOD, koje tretman fulerenolom rastvorenim u DMSO vraća na nivo kontrola. Sam tretman fulerenolom rastvorenim u DMSO povećava aktivnost GR.

Rezultati aktivnosti enzima antioksidativne zaštite izraženih po miligramu proteina (specifična aktivnost) su pokazali da odgovor merenih antioksidativnih enzima na tretman fulerenolom rastvorenim u DMSO zavisi od tipa aktivacije uterusu.

Kod spontano aktivnih, fulerenol u DMSO izaziva smanjenje CuZnSOD aktivnosti, dok se povećanje aktivnosti GR koje izaziva DMSO, po tretmanu fulerenolom rastvorenim u DMSO vraća na nivo kontrola. Pošto fulerenol smanjuje endogenu CuZnSOD aktivnost smanjuje se endogena produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji, kao što je poznato predstavlja proizvod reakcije dismutacije superoksid anjona katalizovane SOD-om. U jednom od naših radova (Appiah et al. 2009) pokazali smo da vodonik peroksid ima relaksantni efekat na uterus jer smanjuje njegovu spontanu kontraktilnu aktivnost.

Kod Ca<sup>+2</sup>-indukovanih uterusa, fulerenol rastvoren u DMSO takođe izaziva smanjenje CuZnSOD aktivnosti, dok povećanje aktivnosti GR koje izaziva DMSO, po tretmanu sa ful/DMSO ostaje na istom nivou. Za razliku od spontanih i Ca<sup>+2</sup>-indukovanih uterusa, kod KCl-indukovanih (toničnih) kontrakcija uterusa DMSO-om izazvano povećanje CuZnSOD, GSH-Px i GR posle dodavanja fulerenola rastvorenog u DMSO aktivnosti pomenutih enzima vraćaju se na kontrolni nivo.

Pri toničnim kontrakcijama, glatka muskulatura je aktivna u uslovima skoro bazalnog nivoa intracelularnog kalcijuma i minimuma potrošnje ATP-a (Obladen et al. 2005). S obzirom na to da se troši značajno manje ATP-a nego u fazičnim kontrakcijama, usporava se i proces oksidativne fosforilacije u mitohondrijama i sa njom spregnut elektron transportni lanac. Kada se uspori prenos elektrona, više superoksid anjona „curi“ iz elektron transportnog lanca (Turrens, 2003). Naši rezultati pokazuju da tom prilikom superoksid anjon odlazi dominantno u citosplazmu, gde aktivira CuZnSOD.

Primenom fulerenola nivoi aktivnosti GSH-Px i GR se takođe smanjuju i vraćaju na kontrolni nivo. Dodavanjem fulerenola rastvorenog u DMSO dolazi do smanjenja CuZnSOD (do vrednosti bliske onim u kontrolnim uzorcima), što pospešuje tvrdnje da fulerenol, kada nije fotoekscitiran, može uklanjati superoksid anjon (deluje kao "scavenger")(Mirkov et al. 2004). Isto tako, podaci u literaturi pokazuju da pojedini derivati fulerena mogu imati SOD-mimetička svojstva, tj. da dovode do dismutacije superoksid anjona pri čemu nastaje vodonik peroksid. (Ali et al. 2004).

Kod spontanih i Ca<sup>+2</sup>-indukovanih kontrakcija uterusa, DMSO izaziva povećanje aktivnosti GR. Povećana aktivnost ovog enzima ukazuje na povećan nivo oksidovanog glutationa. Porast aktivnosti GR u prisustvu DMSO ukazuje na njegove efekte u smanjenju oksidacionog stresa koji prati povećanu mišićnu aktivnost.

Eksperiment u kom je praćen efekat fulerena i fulerenola na nivo intracelularnog kalcijuma (Gelderman et al. 2008) pokazao je da oni povećavaju količinu intracelularnog kalcijuma (fuleren u tom smislu još potentniji od fulerenola). Primenom EGTA, blokatora ulaska Ca<sup>+2</sup> u

ćeliju, mogao se inhibirati efekat, što ukazuje na to da se radi o povećanju ulaska jona kalcijuma iz ekstracelularne sredine. Autori pretpostavljaju da fulerenol ili aktivira kalcijumske kanale ili povećava pore kroz koje joni kalcijuma mogu proći. Isto tako, moguće je da fulerenol u ekstracelularnoj sredini pravi agregate sa jonima kalcijuma i tako ih unosi u unutrašnjost ćelije.

Slični efekti kod  $\text{Ca}^{+2}$ -indukovane aktivnosti uterusa nisu primećeni verovatno zbog toga što je egzogeno aplikovan kalcijum otvorio kalcijumske kanale i omogućio ulazak ovim jonima u ćeliju koji su, dalje, aktivirali ceo  $\text{Ca}^{+2}$ -senzitivni kontraktilni aparat.

#### 12.4 Enzimi antioksidacionog sistema zaštite u tkivu ileuma

Kod spontano aktivnih ileuma, tretman sa ful/DMSO nema efekta na već DMSO-om povećane aktivnosti MnSOD, CuZnSOD i GSH-Px. Dodavanje fulerenola rastvorenog u DMSO dovodi do povećanja količine glutaciona u ileumu. Kada se aktivnost enzima izrazi po jedinicama vlažne mase, efekat fulerenola u odnosu na DMSO je smanjenje MnSOD aktivnosti, pri čemu se pokazuje dalje da fulerenol ne menja DMSO-om posredovano povećanje aktivnosti CuZnSOD, GSH-Px i GR. Rezultati aktivnosti antioksidativnih enzima izraženih gramu vlažne mase, pokazuju da u kontrolnim ileumima dolazi do smanjivanja aktivnosti CuZnSOD posle tretmana fulerenolom, ali i reverzije povećanja aktivnosti MnSOD izazvanih DMSO-om do nivoa kontrolnih vrednosti. Međutim, DMSO dovodi do povećanja aktivnosti GR i količine glutaciona, koji se zadržavaju i posle tretmana sa ful/DMSO. Kada se posmatra ileum u toničnoj kontrakciji pokazuje se da tretman fulerenolom smanjuje aktivnost MnSOD, ali i povećava aktivnost CuZnSOD u odnosu na DMSO-om izazvano smanjenje. Osim toga, tretman fulerenolom rastvorenim u DMSO smanjuje količinu glutaciona koja se posle dodavanja DMSO povećala u odnosu na kontrolni tonično aktivan ileum.

Na kraju možemo reći da efekti fulerenola inicijalno zavise od tipa čestica koje formira u određenoj sredini. U vodenom rastvoru veliki agregati koji se brzo talože ne favorizuju direktne farmakološke efekte fulerenola. Rastvoren u DMSO, fulerenol ima efekte koji se moraju pažljivo razdvojiti od efekata samog nosača. Čestice koje fulerenol formira u DMSO po svojim karakteristikama omogućavaju i direktne farmakološke efekte fulerenola a posredne preko interakcije sa jonima prisutnim u De Jalon-ovom rastvoru. Rastuća primena DMSO kao efikasnog miorelaksanta u medicinskoj praksi potencira potrebu da se pronađu

efikasni modulatori njegovih efekata u slučaju pojave neželjenih efekata. Naši rezultati, izneti u ovom radu, ukazuju da fulerenol ima svojstva koja ga čine ozbiljnim kandidatom za takvu primenu. No, na tome se ne iscrpljuju rezultati kje smo dobili u ovom radu. Potvrdili smo da fulerenol preko smanjenja količine superoksida može uticati na aktivnost SOD, te od doze i načina primene može imati i antioksidaciona ali i prooksidaciona svojstva. Ova druga, na sreću, mogu doći do izražaja samo u slučajevima hronične primene visokih doza kada inhibicija endogene SOD može postati značajan faktor. Po prvi put smo, u ovom radu, pokazali i da fulerenol rastvoren u DMSO može modulirati aktivnost i drugih antioksidacionih enzima što otvara novo široko polje istraživanja u sveobuhvatnoj analizi efekata fulerenola kao potencijalnog nanomaterijala za primenu u medicini.

## ZAKLJUČCI

- fulerenol u vodenom rastvoru gradi agregate koji se talože;
- fulerenol gradi agregate sa zemnoalkalnim metalima ( $\text{Ca}^{+2}$  i  $\text{Mg}^{+2}$ ) iz De Jalon-ovog rastvora i taloži se u tokom 12h;
- DMSO izaziva relaksantni efekat na svim tipovima kontrakcije glatkih mišića;
- $\text{ED}_{50}$  vrednosti za DMSO i fulerenol/DMSO kod relaksacije spontano aktivnih uterusa pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ );
- $\text{ED}_{50}$  vrednosti za fulerenol rastvoren u DMSO se kod  $\text{Ca}^{+2}$ -indukovanih aktivnih uterusa i kod KCl-indukovanih (toničnih) kontrakcija ne razlikuju u odnosu na sam nosač DMSO;
- fulerenol u DMSO izaziva smanjenje CuZnSOD aktivnosti, dok se povećanje aktivnosti GR koje izaziva DMSO, po tretmanu sa fulerenolom vraća na nivo kontrola kod spontanih kontrakcija uterusa;
- kod  $\text{Ca}^{+2}$ -aktiviranih, fulerenol izaziva takođe smanjenje CuZnSOD aktivnosti, dok povećanje aktivnosti GR koje izaziva DMSO, po tretmanu sa fulerenolom ostaje na istom nivou;
- kod KCl-indukovanih toničnih kontrakcija uterusa DMSO-om izazvano povećanje CuZnSOD, GSH-Px i GR posle dodavanja fulerenola se vraća na kontrolni nivo.

- kod kontrolnih ileuma, tretman fulerenolom nema efekta na već DMSO-om povećane aktivnosti MnSOD, CuZnSOD i GSH-Px (izraženo po miligramu proteina)
- fulerenol povećava nivo glutaciona u ileumu
- fulerenol u odnosu na DMSO smanjuje MnSOD aktivnost, pri čemu se pokazuje dalje da fulerenol ne menja DMSO-om posredovano povećanje aktivnosti CuZnSOD, GSH-Px i GR  
(izraženo po gramu vlažne mase).
- u kontrolnim ileumima dolazi do smanjivanja aktivnosti CuZnSOD posle tretmana fulerenolom, ali i reverzije povećanja aktivnosti MnSOD izazvanih DMSO-om do nivoa kontrolnih vrednosti (izraženo po gramu vlažne mase).
- DMSO dovodi do povećanja aktivnosti GR i količine glutaciona, koji se zadržavaju i posle tretmana fulerenolom.
- kada su u pitanju tonične kontrakcije ileuma pokazano je da tretman fulerenolom smanjuje aktivnost MnSOD, ali i povećava aktivnost CuZnSOD u odnosu na DMSO-om izazvano smanjenje. Osim toga, tretman fulerenolom smanjuje količinu glutaciona koja se posle dodavanja DMSO povećala.

Naši rezultati pokazuju da se fulerenol može koristiti za modulaciju efekata DMSO koji se već primenjuje u medicini i da on sam pored interakcija sa SOD može uticati na aktivnost i drugih antioksidacionih enzima.



---

## REFERENCE

Alberts, D.S., Dorr, R.T. Case report: Topical DMSO for mitomycin-C-induced skin ulceration. *Oncol Nurs Forum*, 1991, 18: 693-695.

Ali SS, Hardt JI, Quich KL, Kim-Han JS, Erlanger BF, Huang TT, et al. A biologically effective fullerene (C<sub>60</sub>) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1191-202.

An H., Jin B., DNA exposure to Buckminsterfullerene (C<sub>60</sub>): toward DNA stability, reactivity, and replication. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45: 6608-6616.

Anderson M.E. *Free Radicals: A Practical Approach*, eds. (N.A. Punchad and F.J. Kelly), Oxford Press. 1996.

Anderson R., Barron A.R. Reaction of hydroxyfullerene with metal salts: a route to remediation and immobilization. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127 (30): 10458-10459.

Appiah I., Milovanovic S., Radojicic R., Nikolic-Kokic A., Orescanin-Dusic Z., Slavic M., Trbojevic S., Skrbic R., Spasic M.B., Blagojevic D. Hydrogen peroxide affects contractile activity and anti-oxidant enzymes in rat uterus. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(8): 1932-41.

Arrigo A.P. Gene expression and thiol redox state. *Free. Radic. Biol. Med.*, 1999, 27:936-944.

Babior B.M., Lambeth J.D. & Nauseef W.. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 397: 342–344.

Babior B.M.. The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life*, 2000, 50: 267–269.

Badireddy A.R., Hotze E.M., Chellam S., Alvarez P., Wiesner M.R. Inactivation of bacteriophages via photosensitization of fullerol nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41(18): 6627-32.

Barch M.J., Lawce H.J., Arsham M.S. The ACT cytogenetics laboratory manual. 2nd ed., 1991,, Barch, M.J.(Ed.), Raven Press, New York.

Bardutzky J., Meng X., Bouley J., Duong T.Q., Ratan R., Fisher M. Effects of intravenous dimethyl sulfoxide on ischemia evolution in a rat permanent occlusion model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25: 968-977.

Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr*, 1999, 31: 347–366.

Barja G., & Herrero A.J. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg Biomembr*, 1998, 30: 235–243.

Bergdahl A., Swärd K. Caveloae-associated signalling in smooth muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2004, 82: 289-299.

Beutler E. in: *Red Cell Metabolism*, E. Beutler, Ed., a Manual of Biochemical Methods, Grune and Stratton, New York 1982, 105.

Birder L.A., Kanai A.J., de Groat W.C. DMSO: Effect on bladder afferent neurons and nitric oxide release. *The Journal of Urology*, 1997, 158(5): 1989-1995.

Blanks A.M., Zhao Z.H., Shmygol A., Bru-Mercier G., Astle S., Thornton S. Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium. *J Physiol*, 2007, 581 (Pt3): 915-926.

Bogdanović V., Slavić M., Mrđanović J., Šolajić S., Đorđević A., Aktivnost superoksid-dismutaze u animalnoj ćelijskoj kulturi CHO-K<sub>1</sub> nakon tretmana fulerenolom i mitomicinom C, *Hem. ind.*, 2009, 63 (3):143-149.

Bogdanović V., Stankov K., Ičević I., Žikić D., Nikolić A., Šolajić S., Đorđević A., Bogdanović G., Fullerenol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> Effects on Antioxidative Enzymes Activity in Irradiated Human Erythroleukemia Cell Line, *J. Radiat. Res.*, 2008, 49:321-327.

Bolt H. M. Genetic and individual difference in the process of biotransformation and their relevance for occupational medicine. *Med. Lavoro*, 1994, 85:37-48.

Bolt H.M. Human GSH-transferase in risk assessment. In: „Biological Reactive Intermediates V“, eds. ( R.Snyder, I.G. Sipes, D.J. Jollow, T..J. Monks, J.J. Kocsis, G.F. Kalf, H. Greim and C.M. Witmer), Plenum Press, New York, 1996, 405-409

Bosi S., Feruglio L., Da Ros T., Spalluto G., Gregoretto B., Terdoslavich M., Decorti, G., Passamonti S., Moro S., Prato M. J. Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives. *Med. Chem.*, 2004, 47 (27): 6711-6715.

Brant JA, Robichaud CO, Wiesner M. Fullerol cluster formation in aqueous solutions: Implications for environmental release *J.Colloid and Interface Science.*, 2007, 314: 281-288.

Bray TM and Taylor CG Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1993, 71:746-751.

Brown F.D., Johns L., Mullan S. Dimethyl sulfoxide in experimental brain injury, with comparison to mannitol. *J. Neurosurg*, 1980, 53: 58-62.

Burdyga T. & Wray S. Action potential refractory period in ureter smooth muscle is set by Ca sparks and BK channels. *Nature*, 2005, 436: 559–562.

Camici, G.G., Steffel J., Akhmedov A., Schafer N., Baldinger J., Schulz U., Shojaati K., Christian M. Matter M.C., Yang Z., Lüscher T.F., Tanner F.C. Dimethyl Sulfoxide Inhibits Tissue Factor Expression, Thrombus Formation, and Vascular Smooth Muscle Cell Activation A Potential Treatment Strategy for Drug-Eluting Stents. *Circulation*, 2006, 114 :1512-1521.

Carter AJ: The importance of voltage-dependent sodium channels in cerebral ischaemia. *Amino Acids*, 1998, 14:159–169.

Chaing L.Y., Wang L.Y., Swirczewski J.W., Soled S., Camerot S. J. Efficient synthesis of polyhydroxylated fullerene derivatives via hydrolysis of polycyclosulfated precursors. *Org. Chem.*, 1994, 59: 3960-3968.

Chakrabarti R., Schutt C.E. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene*, 2001, 274 (issues 1-2):293-298.

Chen Y., Cai R.F., Chen S., Hong Z.E. J. Synthesis and characterization of fullerol derived from C<sub>60</sub>n- precursors *Phys. Chem. Solids*, 2001, 62: 999-1001.

Chiang, L.Y., Bhonsle, J.B., and Wang, L. Efficient one-flask synthesis of water-soluble [60]fullerenols. *Tetrahedron*, 1996, 52 (14): 4963-4972.

Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ & Vaz ADN. Cytochrome P450: Progress and predictions. *FASEB J*, 1992, 6, 669–673.

Costa M., Brookes S.J.H., Steele P.A., Gibbins I., Burcher E., Kandiah C.J. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience*, 1996, 75 No.3: 949-967.

Creagen R., Tischfield J., Ricciuti F., Ruddle F.H. Chromosome assignments of genes in man using mouse-human somatic cell hybrids: mitochondrial superoxide dismutase (indophenols oxidase-B tetrameric) to chromosome 6. *Humangenetik*, 1973, 20(3): 203-9.

Cruse, C.W., Daniels, S. Minor burns: Treatment using a new drug deliver system with silver sulfadiazine. *South Med J*, 1989, 82: 1135-1137.

Dabertrand F., Morel J-L, Sorrentino V., Mironneau J., Mironneau C. & Macrez N. Modulation of calcium signalling by dominant negative splice variant of ryanodine receptor subtype 3 in native smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 2006, 40: 11–21.

De la Torre J.C. Treatment of head injury in mice, using a fructose 1,6 diphosphate and dimethyl sulfoxide combination. *Neurosurgery*, 1995, 37: 273-279.

Deng Z., Liu P., Claxton D.F., Lane S., Callen D.F., Collins F.S., Siciliano M.J. *Genomics*, 1993, 18:156-159.

Djordjević, A., Canadanovic-Brunet, J., Vojinovic-Miloradov, M., Bogdanovic, G. Antioxidant properties and hypothetic radical mechanism of fullerol C-60(OH)(24) *Oxid. Commun.*, 2004, 4 (27): 806-812.

Droge W . Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82: 47–95

Duyovny M., Rozario R., Kossovsky N., Diaz FG, Segal R. Antiplatelet effect of dimethyl sulfoxide, barbiturates, and methylprednisolone. *Ann NY Acad Sci*, 1983, 411: 234-244.

El Khoudary S. R., Talbott E.O., Bromberger J.T., Chang C.C.H., Songer T. J., Davis E. L. Severity of Interstitial Cystitis Symptoms and Quality of Life in Female Patients. *Journal of Women's Health*, 2009, 18: 1361–8

Engel, M.F., Dimethyl sulfoxide in the treatment of scleroderma. *South Med J*, 1972, 65:71

Evans, M.S., Reid, K.H. and Sharp Jr., J.B., , Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. *Neurosci. Lett*, 1993, 150, 145–148.

Farkas E., Institoris A., Domoki F., Mihaly A., Luiten P.G., Bari F. Doazoxide and dimethyl sulfoxide prevent cerebral Hypoperfusion-related learning dysfunction and brain damage after carotid artery occlusion. *Brain Res*, 2004, 1008: 252-260.

Fenech M. Chromosomal Biomarkers of Genomic Instability Relevant to Cancer. *Drug Discovery Today*, 2002, 7(22): 1128-1137.

Fenton HJ.H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc.*, 1894, 65: 899-910.

Fridovich I. Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem*. 1997, 346(2): 263-8.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 97-112.

Gebrie E., Makonnen E., Zerihun L., Debella A., The possible mechanisms for the antifertility action of methanolic root extract of *Rumex steudelii*. *African Health Sciences*, 2005, 5: 119-128.

Gelderman M.P., Simakova O., Clogston J.D., Patri A.K., Siddiqui S.F., Vostal A.C., Simak J. Adverse effect of fullerenes on endothelial cells: Fulleranol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> induced tissue factor and ICAM-1 membrane expression and apoptosis in vitro. *International Journal of Nanomedicine*, 2008, 3(1): 59-68.

Gey K.F. The relationship of antioxidant status and the risk of cancer cardiovascular disease: A critical evaluation of observational data. In: *Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology*, eds. (H. Nohl, H. Esterbauer and C. Riceevans), Richelieu Press. London. 1994, 181-219.

Glatzle D., Vuilleumier J.P., Weber F., Decker K. Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experimetria*, 1974, 30: 665-8.

Gohei, Y., Kazutaka, I., and Fumio, C. AU patent 2003/296175 A1

Goldstone A.B., Liochev S.I., Fridovich I. Inactivation of copper zinc superoxide dismutase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: mechanism of protection. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41(12): 1860-3.

Griffith O.W. Biological and pharmacological regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 27: 922-925.

Gurtovenko A.A., Anwar J. Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111(35): 10453-10460.

Guyton A.C., Hall J.E , *Medical Physiology*, W.B. Saunders company (Savremena administracija), 2003.

Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society*, 1934, 147: 332-351.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine*, Third edition, Oxford University Press, Inc. New York, 1999.

Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Comms.* 1990, 9: 1-32.

Halliwell B., Clement M.V., Long L.H.. Hydrogen peroxide in th human body. *FEBS Lett.*, 2000, 486: 10-13.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Oxygen and the earth, in: “Free radicals in biology and medicine”, 1985, Clarendon Press, Oxford.

Herschler, R., Jacob, S.W. The case of dimethyl sulfoxide. In: Lasagna, L. (Ed.), *Controversies in Therapeutics*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1980.

Hinescu ME, Popescu LM, Gherghiceanu M, Faussonne-Pellegrini MS Interstitial Cajal-like cells in rat mesentery and ultrastructural and immunohistochemical approach. *J Cell Mol Med*, 2008, 1:260-270.

Hirsch, A., Brattreich, M. *Fullerenes, Chemistry and Reaction*, 2004, New York: Wiley-VCH.

Hotze E.M., Badireddy A.R., Chellam S., Wiesner M.R. Mechanisms of bacteriophage inactivation via singlet oxygen generetaion in UV illuminated fullerol suspensions. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43(17): 6639-45.

Huang S., Wang F., Gan L., Yuan G., Zhou J. Zhang, S. Preparation of fullerendione through oxidation of vicinal fullerendiol and intramolecular coupling of the dione to form hemiketal/ketal moieties. *Org. Lett.*, 2006, 8(2): 277-9.

Hulsmann S, Greiner C, Kohling R: Dimethyl sulfoxide increases latency of anoxic terminal negativity in hippocampal slices of guinea pig in vitro. *Neurosci Lett*, 1999, 261: 1–4.

Ičević I., Đorđević A., Štrbac D., Đorđević-Milić. Fulerenol-polidentatni ligand. *Tehnika-novi materijali*. 2006, 15 (2): 7-10.

Jacob S.W., de la Torre J.C. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacological Reports*, review, 2009, 61: 225-235

Jeng U.S., Lin T.L., Chang T.S., Lee H.Y., Hsu C.H., Hsieh Y.W., et al. Comparison of the aggregation behavior of water-soluble hexa(sulfobutyl) fullerenes and polyhydroxylated fullerenes for their free-radical scavenging activity. *Prog Collid Polym Sci*, 2001, 118: 232-7.

Ji Y., Akerboom T.P.M, Sies H. Microsomal formation of S-nitrosoglutathione from organic nitrites: possible role of membrane-bound glutathione transferase. *Biochem J.*, 1996, 313:377-380.

Ji Y., Akerboom T.P.M., Sies H., Thomas J..A. S-Nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryl by S-nitroso glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, 362:67-78.

Jian-Min Z., Wen Y., Ping H., Shi-Zheng Z. Chin. Efficient and convenient preparation of water soluble fullerene. *J. Chem.*, 2004, 22: 1008-1011.

Jun-Jie Y., Lao F., Fu P.P., Wamer W.G., Zhao Y., Wang P.C., Qiu Y., Sun B., Zing G., Dong J., Liang Z-J., Chen C. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials*, 2008, 1-11.

Kadish, K.M., and Ruoff, R.S. *Fullerenes, Chemistry, Physics and Technology*, 2000, Wiley-Interscience, New York.

Karaca M., Kilic E, Yazici B, Demir S, de la Torre J.C. Ischemic stroke in elderly patients treated with a free radical scavenger-glycolytic intermediate compound. *Neurol Res*, 2002, 24:73-80.

Karaca M., Bilgin U., Akar M., de la Torre J.C. Dimethyl sulfoxide lowers ICP after closedhead trauma. *Eur J Clin Pharmacol*, 1991, 40: 113-114.

Kawano T. Roles of the reactive oxygen speaces-generating peroxidase reactions in plant defense and growt induction. *Plant Cell Rep.*, 2003, 21: 829-837.

Khan R., Mathroo-Ball B, Arilkumaran S. & Ashford M.L.J. Potassium channels in the human myometrium. *Exp Physiol*, 2001, 86: 255–264.



Kim R., Liu W., Chen X., Kreder K., Luo Y. Intravesical Dimethyl Sulfoxide inhibits chronic bladder inflammation in transgenic experimental autoimmune cystitis models. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 9 pages. Doi: 10.1155/2011/937061.

Kleindienst A., Dunbar J.G., Glisson R., Okuno K., Marmarou A. Effect of dimethyl sulfoxide on blood-brain barrier integrity following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neurochir Suppl*, 2006, 96: 258-262.

Kretzschmar M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp. Toxic. Pathol.* 1996, 48: 439-446.

Kroto, H.W., Heath, J.R., O'Brien, R.F., Curl, R.F., and Smalley, R.E. 1985, C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene, *Nature.*, 318, 162-163.

Kulah A, Akar M., Baykut L. Dimethyl sulfoxide in the management of patients with brain swelling and increased intracranial pressure after severe closed head injury. *Neurochirurgia*, 1990, 33: 177-180.

Kupittayanant S, Luckas MJM & Wray S. Effects of inhibiting the sarcoplasmic reticulum on spontaneous and oxytocin-induced contractions of human myometrium.. *BJOG*, 2002, 109: 289–296.

Kupittayanant S., Burdyga R., Wray S. The effects of inhibiting Rho-associated kinase with Y27632 on force and intracellular calcium in human myometrium. *Pflügers Arch.*, 2001, 443:112-114.

Lawrence, H.H., Goodnight, S.H. Dimethyl sulfoxide and extravasion of anthracycline agents. *Ann Inter Med*, 1983, 98:1025.

Ledoux S.P., Driggers W.J., Hollensworth B.S. & Wilson G.L. Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutat Res*, 1999, 434: 149–159.

Levett JM, Johns LM, Grina NM, Mullan BF, Kramer JF, Mullan JF. Effects of dimethyl sulfoxide on systemic and cerebral hemodynamic variables in the ischemic canine myocardium. *Crit Care Med*, 1987, 15:656-660.

Liochev S.I. & Fridovich I. Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life*, 1999, 48: 157–161.

Listowski I. *Hepatic Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology*, eds. (Tavolini N. and Beck P.D.), Raven Press, New York, 1993.

Löfgren M., Eklbad E., Morano I., Arner A. Nonmuscle myosin motor of smooth muscle. *J. Gen. Physiol.*, 2003, 121(4): 301-310.

Lowry O.H., Rosenbroudh N.J, Ferr A.L, Randall R.J. Proteinmeasurments with Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.*, 1951, 193-265.

Lu CY, Yao SD, Lin WZ, Wang WF, Lin NY, Tong YP, et al. Studies on the fullerol of C<sub>60</sub> in aqueous solution with laser photolysis and pulse radiolysis. *Radiat Phzs Chem* 1998; 53: 137-43

Lubredo, L., Barrie, M.S., Woltering, E.A. DMSO protects against adriamycin-induced skin necrosis. *J. Surg Res*, 1992, 53:62-65.

Luckas MJM, Taggart MJ & Wray S. Intracellular calcium stores and agonist induced contractions in humans myometrium. *Am J Obstet Gynecol*, 1999, 181: 468-476.

Mackman N: Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24:1015–1022.

Mariano a.C., Alexandre G.M, Silva L.C, Romeiro A., Cameron L.C., Chen Y., Chase P.B, Sorenson M.M. Dimethyl sulphoxide enhances the effects of P(i) in myofibrils and inhibits the activity of rabbit skeletal muscle contractile proteins. *Biochem J.*, 2001, 358: 627-36.

Marinho HS, Antunes F, Pinto RE. Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. *Free Rad. Biol. Med.*, 1997, 22: 871-883.

Markovic Z, Trajkovic V. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C<sub>60</sub>). *Biomaterials* 29, 2008, 3561-3573.

McCord J.M.C., Fridovich I. Superoxide dismutase and enzymic function for erythrocyte (hemocupreine). *J. Biol. Chem.*, 1969, 244: 6049-6055.

Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal application in research and therapy. *Pharmacol. Ther.*, 1991, 51:155-194.

Melchior D., Packer C., Johnson T., Kaefer M. Dimethyl Sulfoxide: Does It Change the Functional Properties of the Bladder Wall. *The Journal of Urology*, 2003, 170 (1): 253–8.

Mentel R., Shirrmakher R., Kevich A., Drežin R.S., Shmidt I. Virus inactivation by hydrogen peroxide. *Vopr Virusol*, 1977, 6: 731-3.

Metts J.F. Interstitial Cystitis: Urgency and Frequency Syndrome. In *American Family Physician*, 2001 Oct 1, 64(7):1199-1207

Mikawa, M., Kato, H., Okumura, M., Narazaki, M., Kanazawa, Y., Miwa, N., and Shinohara, H. Paramagnetic water-soluble metallofullerenes having the highest relaxivity for MRI contrast agents *Bioconjugate Chem.*, 2001, 12 (4): 510-514.

Miriel V.A., Mauban J.R.H., Blaustein M.P. & Wier W.G. Local and cellular  $Ca^{2+}$  transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J Physiol*, 1999, 518: 815–824.

Mirkov SM, Đorđević AN, Andrić NL, Andrić SA, Kostić TS, Bogdanović GM, Vojinović-Miloradov MB, Kovačević RZ. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullereneol,  $C_{60}(OH)_{24}$ . *Nitric Oxide*, 2004, Sep; 11(2):201-7.

Mironneau J., Macrez N., Morel J.L., Sorrentino V. & Mironneau C. Identification and function of ryanodine receptor subtype 3 in non-pregnant mouse myometrial cells. *J Physiol*, 2002, 538: 707–716.

Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 1972, 247(10): 3170-5.

- Mita M., Yanagihara H., Hishinuma S., Saito M., Walsh M.P. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem J.*, 2002, 364:431-440.
- Montes G.S., Luque E.H. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)*, 1988, 133(3): 192-9.
- Morano I., Chai G.X., Baltas L.G., Lamounier-Zepter V., Lutsch G., Koff M., Haase H., Walther T., Bader M. Smooth muscle contraction without smooth muscle myosin. *Nature Cell Biol.*, 2000, 2: 371-375.
- Mrđanović J., Šolajić S., Bogdanović V., Stankov K., Bogdanovic G., Đorđević A. Effects of fullereneol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells. *Mutation Research*, 2009, 680: 25-30.
- Mueller L.P., Theurich S., Christopeit M., Grothe W., Muetherig A., Weber T., Guenther S., Behre G. Neurotoxicity upon infusion of dimethylsulfoxide-cryopreserved peripheral blood stem cells in patients with and without pre-existing cerebral disease. *Eur J Haematol*, 2007, 78: 527-531.
- Muller F.L., Yuhong L., Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 49064-49073.
- Muther R.S., Bennett W.M. Effects of dimethyl sulfoxide on renal function in man. *JAMA*, 1980, 244: 2081-1083.
- Nasrallah F.A., Garner B., Ball G.E., Rae C. Modulation of brain metabolism by very low concentration of the commonly used drug delivery vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO). *J Neurosci Res*, 2008, 86: 208-214.
- Nelson M.T., Cheng H., Rubart M., Santana L.F., Bonev A.D., Knot H.J. & Lederer W.J. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*, 1995, 270: 633-637.
- Noble K. & Wray S. The role of the sarcoplasmic reticulum in neonatal uterine smooth muscle: enhanced role compared to adult rat. *J Physiol*, 2002, 545: 557-566.

Noble K., Zhang J. & Wray S. Lipid rafts, the sarcoplasmic reticulum and uterine calcium signalling: an integrated approach. *J Physiol*, 2006, 570: 29–35.

Nortje J, Menon DK: Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. *Curr Opin Neurol*, 2004, 17: 711–718.

Notman R., Noro M., O'Malley B., Anwar J. Molecular Basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on Lipid Membrane. *J. AM. CHEM. SOC.*, 2006, 128:13982-13983.

Obladen M., Koehne P. Interventions for persisting ductus arteriosus in the preterm infants. Springer Medizin Verlag Heidelberg. 2005, chapter 2: 8-9.

Ohkubo T., Inoue Y., Kawarabayashi T., Kitamura K. Identification and electrophysiological characteristics of isoforms of T-type calcium channel Ca(v)3.2 expressed in pregnant human uterus. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 4-6: 245-254.

Okubo K., Matsubayashi K., Tategaki H., Takada H., and Oshima T. Facile synthesis of highly water-soluble fullerenes more than half-covered by hydroxyl groups. *ACS Nano*, 2008, 2: 327-333.

Okuyama K, Kiuchi S, Okamoto M, Narita H, Kudo Y. A novel Na<sup>+</sup> and Ca<sup>+</sup> channel blocker, T-477, prevents brain edema following microsphere-induced permanent occlusion of cerebral arterioles in rats. *Jpn J Pharmacol*, 1999, 81: 170–175.

Packer C.S. Arterial muscle myosin heavy chains and light chains in spontaneous hypertension. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, 117B:19-28.

Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 1967, 70: 74-77.

Panganamala R.V., Sharma H.M., Heikkula R.E., Geer J.C., Cornwell D.G. Role of hydroxyl radical scavengers dimethyl sulfoxide, alcohols, and methional in the inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins*, 1976, 11: 599-607.

Paravicini T.M., Touyz R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008, 31 Suppl 2: S170-8.

- Pegg D.E. Principles of Cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*, 2007, 368:39-57.
- Phillips C.L., Yamakawa K., Adelstein R.S., Cloning of the cDNA encoding nonmuscle myosin heavy chain-B and analysis of human tissues with isoform-specific antibodies. *J. Muscle Res. Cell Mot.*, 1995, 16: 390-400.
- Pickering K.D. and Weisner M.R. Fullerol-sensitized production of reactive oxygen species in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39(5): 1359-65.
- Pinteala M, Dascalu A, Ungurenasu C, Binding fullerol  $C_{60}(OH)_{24}$  to dsDNA, *Int J Nanomed* 2009; 4: 193-199
- Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D. Interstitial Cajal-like cells in human uterus and fallopian tube. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 139-165.
- Prassides, K. Fullerenes-based materials, 2004, Springer, Berlin.
- Quan F, Korneluk R.G., Tropak M.B., Gravel R.A. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids res*, 1986, 14(13): 5321-35.
- Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C & Castro L Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 2002*b*, 33: 1451–1464.
- Repine J.E., Pfenninger O., Berger E., Talmadge D.W., Pettijohn D.E. Dimethyl-sulfoxide prevents DNA nicking mediated by ionizing radiation or iron-hydrogen peroxide-generated hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 1001-1003.
- Richter C., Park J.W. & Ames B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85: 6465–6467.
- Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M. & Freeman B.A.. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 1994, 269: 26066–26075.

Saez C.G., Myers J.C., Shows T.B., Leinward L.A. Human nonmuscle myosin heavy chain mRNA: generation of diversity through alternative polyadenylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, 87:116.

Santos N.C., Figueira-Coelho J., Martins-Silva J., Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl-sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65: 1035-1041.

Satoh M., Takayanagi I. Pharmacological Studies on Fullerene (C<sub>60</sub>), a Novel Carbon Allotrope, and Its Derivatives. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100: 513-518.

Schnaider N., Derwish A., Kroto H., Taylor R., Waltan D. Formation of fullerols via hydroboration of fullerene-C<sub>60</sub>. *J.Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994, 463-464.

Scholz R.W., Graham K.S., Gumprich E., Reddy C.C. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the preprotection against membrane lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci*, 1989, 570: 514-7.

Sciamana MA, Lee CP. Ischemia/reperfusion-induced injury of forebrain mitochondria and protection by ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 305:215-224.

Sen C.K., Marin E., Kretzschmar M., Hanninen O. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise and immobilization. *J. Appl. Physiol.* 1992, 73: 1265-1272.

Sen C.K., Sies H., Baeuerle P.A., eds. Antioxidant and redox regulation of genes. San Diego: Academic Press, 1999.

Sherwood L. *Human Physiology: From Cells to Systems*. Cengage Learning, 2010, 293–296.

Shiga K.I., Hirano K., Nishimura J., Niuro N., Kanaide H. Dimethyl sulphoxide relaxes rabbit detrusor muscle by decreasing the Ca<sup>+2</sup> sensitivity of the contractile apparatus. *Br J Pharmacol*, 2007, 151(7): 1014-24.

- Shmigol A., Eisner D.A. & Wray S. Carboxyeosin decreases the rate of decay of the  $[Ca^{2+}]_i$  transient in uterine smooth muscle cells isolated from pregnant rats. *Pflugers Arch*, 1998, 437: 158–160.
- Shmigol A.V., Eisner D.A. & Wray S. The role of the sarcoplasmic reticulum as a  $Ca^{2+}$  sink in rat uterine smooth muscle cells. *J Physiol*, 1999, 520: 153–163.
- Sies H. Glutathione and its role in cellular function. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999, 27:916-921.
- Simons M., Wang M., McBride O.W., Kawamoto S., Yamakawa K., Gdula D., Adelstein R.S., Weir L. Human non-muscle myosin heavy chain are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ. Res.*, 1991, 69: 530-539.
- Smith R.D., Babiychuk E.B., Noble K., Draeger A. & Wray S. Increased cholesterol decreases uterine activity: functional effects of cholesterol in pregnant rat myometrium. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288: C982–C988.
- Smith T.G., Robbins P.A., Ratcliffe P.J. The human side of hypoxia-inducible factor. *British Journal of Haematology*, 2008, 141: 325-334.
- Sperelakis N., Inoue Y., Ohya Y. Fast  $Na^+$  channels and slow  $Ca^{2+}$  current in smooth muscle from pregnant rat uterus. *Jpn J Pharmacol* 1992b, 114: 96P-106P.
- Stadtman E.R., & Levine R.L. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 899: 191–208.
- Statistical Analyzer Set (SAS) SAS Version 9.1.3. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.
- Steffel J, Luscher TF, Tanner FC: Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 2006, 113: 722–731.
- Szymańska J. Antifungal efficacy of hydrogen peroxide in dental unit waterline disinfection. *Ann Agric Environ Med*, 2006, 13(2): 313-7.
- Szymura J.M., Wabl M.R., Klein J. Mouse mitochondrial superoxide dismutase locus is on chromosome 17. *Immunogenetics*, 1981, 14(3-4): 231-40.



Taggart MJ & Wray S. Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *J Physiol*, 1998a, 511:133-144.

Tamura T., McMicken H.W., Smith C.V., Hansen T.N. Mitochondrial targeting of glutathione reductase requires a leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1996, 222(3): 659-63.

Tarasenko A.S., Linetska M.V., Storchak L.G., Himmelreich N. H. Effectiveness of extracellular lactate/pyruvate for sustaining synaptic vesicle proton gradient generation and vesicular accumulation of GABA. *J Neurochem*, 2006, 99:787-796.

Thomas E. L. , Milligan T. W. , Joyne R.Er, Jefferson M.M. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infect Immun.*, 1994, 62(2): 529-535.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 1969, 27:502–522.

Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 2003, 552.2: 335-344.

Turrens J.F., & Boveris A.. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*, 1980, 191: 421–427.

Turrens J.F., Freeman B.A., Levitt J.G. & Crapo J.D. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*, 1982, 217: 401–410.

Verma R.S., Babu A. *Human chromosomes: Principles and techniques*, 2nd ed., 1995, McGraw-Hill, Health professions division, New York.

Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59: 1428–1459.

Vileno B., Marcox P.R., Lekka M., Sienkiewicz A., Fehre T., Forro L. Spectroscopic and physical properties of a highly derivatized C<sub>60</sub> fullerol. *Adv.Funct.Mater.*, 2006, 16: 120-128.

Vina J., Saez G.T., Wiggins D., Roberts A. F., Hems R., Krebs H.A. The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 1983, 212:39-44.

Voehringer D. BCL-2 and glutathione: alternations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic Biol. Med.*, 1999, 27:945-951.

Waller F.T., Tanabe C.T., Paxton H.D. Treatment of elevated intracranial pressure with dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci*, 1983, 411: 286-292.

Westwood F.R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicol. Pathol* 2008, 36 (3): 375-384.

Wolff D.J., Alexandr D.P.P., Mialkowski K., Richardson C.F., Schuster D.I., Wilson S.R. Inhibition of nitric oxide synthase isoforms by tris-malonyl-C<sub>60</sub>-fulleren adducts. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 378: 216-223.

Xing G., Zhang J., Zhao Y., Tang, J., Zhang B., Gao X., Yuan H., Qu L., Cao, W., Chai Z., Ibrahim K., Su R. Influences of structural properties on stability of fullerenols. *J. Phys. Chem. B.*, 2004, 108 (31): 11473-11479.

Yamawaki H., Iwai N. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290(6): C1495-502.

Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA & Parks DA. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol*, 1990, 258, G564-570.

Žikić V., Štajn A., Saičić Z., Spasić M., Milovanović S. Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. *PMF Kragujevac*, 2000.

## **BIOGRAFSKI PODACI KANDIDATA**

Marija Slavić rođena je 17.07.1974. u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, odsek molekularna biologija i fiziologija, završila je 2003. godine sa prosečnom ocenom 8.37. Diplomski rad iz oblasti farmakologije pod naslovom «Uticaj SOD-a i PTS-a na vazodilatatorni i hipotenzivni efekat NaNP-a kod pacova» radila je na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije i odbranila sa ocenom 10.

Poslediplomske studije, smer uporedna i sistemska fiziologija, upisala je školske 2004/2005 godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i položila sve programom predviđene ispite. Doktorske studije upisala je školske 2006/2007, smer animalna i humana fiziologija i položila sve ispite predviđene programom.

Od marta 2004. zaposlena je u Institutu za Biološka istraživanja «Siniša Stanković», odeljenje za fiziologiju na projektu Ministarstva za Nauku pod nazivom: «Uloga redoks aktivnih supstanci u održavanju homeostaze».