

Uloga neurotransmitera GABA u regulaciji lučenja endocervikalne sluzi

Bursać, Danijel

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:401626>

Rights / Prava: [In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Danijel Bursać

**Uloga neurotransmitera GABA
u regulaciji lučenja endocervikalne sluzi**

DISERTACIJA



Zagreb, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Danijel Bursać

**Uloga neurotransmitera GABA
u regulaciji lučenja endocervikalne sluzi**

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

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

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Marija Ćurlin

ZAHVALA:

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Mariji Ćurlin na pruženoj prilici za sudjelovanje u izvedbi ovog projekta te na svesrdnoj pomoći i podršci, kako intelektualnoj tako moralnoj i fizičkoj. Zahvaljujem laboratorijskom osoblju na beskonačnom strpljenju pri izradi preparata, prof. dr. sc. Slavku Gašparovu na ustupljenim materijalima, te doc. dr. sc. Željku Duiću i dr. sc. Jasenki Zmijanac Partl na moralnoj potpori u najtežim trenucima. Na kraju, zahvaljujem obitelji na beskrajnom razumijevanju i strpljenju tijekom svih ovih godina izrade doktorata.

Disertaciju posvećujem svojoj učiteljici i vječnoj inspiraciji, liječnici ogromnog znanja i beskrajne želje za pomaganjem, Dubravki Bosnić, koja me uvela u svijet kliničke medicine, otvorila mi vrata znanosti i koja me naučila biti liječnikom otvorena uma i srca.

Sadržaj

1.	UVOD I SVRHA RADA	1
1.1	NEPLODNOST I ŽENSKI SPOLNI SUSTAV	1
1.1.1	Neplodnost.....	1
1.1.2	Ženski spolni sustav - građa spolnog sustava	2
1.1.2.1	Vanjski spolni organi	2
1.1.2.2	Unutarnji spolni organi	3
1.2	CIKLIČKE PROMJENE U ŽENSKOM SPOLNOM SUSTAVU	5
1.2.1	Ovarijski ciklus	5
1.3	VRAT MATERNICE, ENDOCERVIKALNE ŽLIJEZDE I CERVICALNA SLUZ	10
1.3.1	Vrat maternice i endocervikalne žlijezde	10
1.3.2	Cervikalna sluz	11
1.4	STRUKTURA CERVICALNE SLUZI	13
1.4.1	Biokemijska struktura cervikalne sluzi	13
1.4.2	Ciklička promjenjivost strukture cervikalne sluzi	13
1.5	ULOGA I VAŽNOST CERVICALNE SLUZI ZA ZDRAVLJE I PLODNOST ŽENA	14
1.5.1	Uloga cervikalne sluzi u plodnosti	14
1.5.2	Zaštitna uloga sluzi	14
1.5.3	Cervikalna sluz kao znak ovulacije	14
1.6	REGULACIJA IZLUČIVANJA SLUZI	16
1.6.1	Sekrecijski epitel	16
1.6.2	Mehanizam izlučivanja cervikalne sluzi	16
1.6.3	Regulacija izlučivanja cervikalne sluzi – uloga cikličkih hormona	17
1.7	GAMA AMINOMASLAČNA KISELINA (GABA).....	19
1.7.1	GABA i GABA-ergički sustav	19
1.7.2	GABA _A receptor	20
1.7.3	Glutamat dekarboksilaza	21
1.7.4	GABA-ergički sustav u perifernim organima	22
1.7.5	Potencijalna uloga GABA-ergičkog sustava u endocerviksu	23
1.7.6	Estrogeni potiču izlučivanje GABA-e u mozgu	23
1.7.7	Pretpostavljeni mehanizam regulacije izlučivanja sluzi u endocerviksu	23
1.8	POKUSNI MODELI U ISTRAŽIVANJIMA LUČENJA CERVICALNE SLUZI	25
1.8.1	Glodavci	25
1.8.2	Veliki sisavci	25
1.8.3	Čovjek	26
2.	HIPOTEZA	28
3.	CILJEVI	29
3.1	OPĆI CILJ	29
3.2	SPECIFIČNI CILJEVI	29
4.	UZORCI I POSTUPCI	30
4.1	UZORAK	30
4.2	UZORKOVANJE	30
4.3	HISTOLOŠKI, HISTOKEMIJSKI I IMUNOHISTOKEMIJSKI POSTUPCI	31
4.4	STEREOLOGIJA I STATISTIKA	34
5.	REZULTATI	36
5.1	GRAĐA I SEKRECIJSKA AKTIVNOST ENDOCERVIKALNIH ŽLIJEZDA	36
5.2	AKTIVNOST SEKRECIJSKOG EPITELA U TKIVIMA ENDOCERVIKSA MIJENJA SE S OBZIROM NA FAZU MENSTRUACIJSKOG CIKLUSA	37
5.2.1	Određivanje faze menstruacijskog ciklusa	37
5.2.2	Tkivo endocerviksa u proliferacijskoj fazi menstruacijskog ciklusa ima veći udio aktivnog žljezanog epitela od tkiva endocerviksa u sekrecijskoj fazi	38
5.2.3	Nema razlike u udjelu aktivnog žljezanog epitela između gornjeg i donjeg dijela endocerviksa	40
5.3	MOLEKULE SIGNALNOG PUTA GABA-E U TKIVU ENDOCERVIKSA	42
5.3.1	Prisutnost molekula GABA _A R, GAD i VGAT u endocerviksu	42
5.3.2	Unutarstanični smještaj molekula signalnog puta GABA-e	43
5.3.3	Udio uzoraka s izraženim GABA _A R ne mijenja se ovisno o fazi menstruacijskog ciklusa	43
5.3.4	Udio uzoraka s izraženim GABA _A R veći je u gornjem dijelu vrata maternice	45

5.3.5	GABA _A R je izražen u epitelu sa slabom sekrecijskom aktivnošću	47
6.	RASPRAVA	49
6.1	UZORCI TKIVA VRATA MATERNICE UKLOPLJENI U PARAFIN ODGOVARAJUĆI SU MODEL ZA PROVJERU HIPOTEZE O ULOZI SIGNALNOG PUTA GABA-E U REGULACIJI IZLUČIVANJA SLUZI.....	49
6.2	MOLEKULE SIGNALNOG PUTA GABA-E PRISUTNE SU U ŽLJEZDANOM EPITELU VRATA MATERNICE, ALI NE POSTOJI KORELACIJA NJIHOVA IZRAŽAJA S FAZOM MENSTRUACIJSKOG CIKLUSA NITI SA SEKRECIJSKOM AKTIVNOŠĆU TOG EPITELA	50
6.3	MOGUĆA ULOGA GABA-ERGIČKOG SUSTAVA U ŽLJEZDANOM TKIVU VRATA MATERNICE	52
7.	ZAKLJUČCI	54
8.	SAŽETAK.....	Error! Bookmark not defined.
9.	SUMMARY	56
10.	LITERATURA	57
11.	BIOGRAFIJA	65

Popis kratica:

AB	Astra modrilo, engl. <i>Astra Blue</i>
cAMP	ciklički adenzin-monofosfat
CF	cistična fibroza
CFTR	transmembranski regulator cistične fibroze, engl. <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CIN	cervikalna intraepitelna neoplazija (intraepitelni predstadij karcinoma cerviksa)
CIS	karcinom in situ, engl. <i>cervical carcinoma in situ</i>
DAB	3',3' diaminobenzidintetraklorid
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
E ₂	estradiol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ER	endoplazmatski retikulum
FSH	folikul stimulirajući hormon
GABA	γ-aminomaslačna kiselina, engl. <i>γ Amino-Butyric Acid</i>
GABA _A R	receptor A za γ-aminomaslačnu kiselinu
GAD	dekarboksilaza glutaminske kiseline, engl. <i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>
gDNA	genomska deoksiribonukleinska kiselina
GnRH	gonadotropin-oslobađajući hormon, engl. <i>gonadotropin-releasing hormone</i>
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
hCG	humani korionski gonadotropin
HCl	vodikov klorid
HPV	humani papiloma virus
LH	luteinizirajući hormon
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina
MUC5B	mucin koji oblikuje gel, engl. <i>gel-forming mucin</i>
MUC4	transmembranski mucin, engl. <i>membrane-spanning mucin</i>
NaIO ₃	natrijev jodat
P ₄	progesteron
PAS	Schiffov perijodni reagens, engl. <i>Periodic acid – Schiff</i>
PB	fosfatni pufer, engl. <i>Phosphate Buffered</i>
PBS	fosfatni pufer sa soli, engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>

PCR	lančana reakcija polimerazom, engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHD	patohistološka dijagnoza
pH	mjera kiselosti, odnosno lužnatosti vodenih otopina, lat. <i>potentia hydrogenii</i>
PKA	protein kinaza A
RNA	ribonukleinska kiselina
VGAT	vezikularni prijenosnik GABA-e, engl. <i>vesicular GABA transporter</i>
WHO	World health organisation

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1 NEPLODNOST I ŽENSKI SPOLNI SUSTAV

1.1.1 Neplodnost

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) neplodnost definira kao bolest spolnog sustava karakteriziranu izostankom trudnoće nakon 12 ili više mjeseci redovnih nezaštićenih spolnih odnosa. Neplodnost parova sve je prisutniji problem današnjeg društva. Spolni sustav žene i muškarca vrlo je osjetljiv te mnogobrojni čimbenici utječu na smanjenje njegove funkcionalnosti. Razne preboljene bolesti, infekcije, lijekovi, nezdrav način života, neadekvatna prehrana, zagađenje zraka, vode i hrane, namjerni i spontani pobačaji, mijenjaju i smanjuju funkcionalnost spolnog sustava. Suvremeni način života koji uključuje odgađanje majčinstva i očinstva također pridonosi tom negativnom trendu porasta neplodnosti iz jednostavnog razloga što ono daje vremena navedenim čimbenicima da produljeno djeluju kako na zdravlje tako i na plodnost žena i muškaraca. Prema studijama provedenima od strane Svjetske zdravstvene organizacije koje su obuhvatile razdoblje od 1990. do 2010. god., 1,9 % žena spada u grupu primarne neplodnosti (nisu uspjele nijednom zanijeti), dok 1,5 % žena spada u grupu sekundarne neplodnosti (nisu uspijevale ostvariti ponovnu trudnoću). (1). Ukoliko se podaci promatraju točno prema definiciji u strogom vremenskom periodu od 12 mjeseci, nailazimo na vrlo visok postotak (10 – 15 %) parova koji zbog nemogućnosti začeća traže liječničku pomoć (1). Uzrok neplodnosti obično se traži u anatomskim i funkcionalnim poremećajima pojedinih organa spolnog sustava. Dok jajovodi i maternica najčešće pokazuju anatomske poremećaje (stečene ili razvojne), poremećaji jajnika često su endokrinološke prirode i mogu biti posljedica poremećaja rada hipotalamo-hipofiznog sustava. Upravo zbog navedenog, neplodnost se u mnogim slučajevima može uspješno liječiti kirurškim intervencijama i/ili hormonskim terapijama. Značajan, ali u istraživanju i liječenju neplodnosti vrlo zanemaren čimbenik plodnosti žene, je vrat maternice koji uz brojne funkcije, proizvodi i cervikalnu sluz. Ispitivanje funkcionalnosti vrata maternice često se zaobilazi, vjerojatno zbog činjenice da se problem nedostatka odgovarajuće cervikalne sluzi može premostiti jednostavnim postupkom asistiranе inseminacije, te bilo kojim drugim postupkom *in vitro* oplodnje. Upravo zbog navedenog, nije

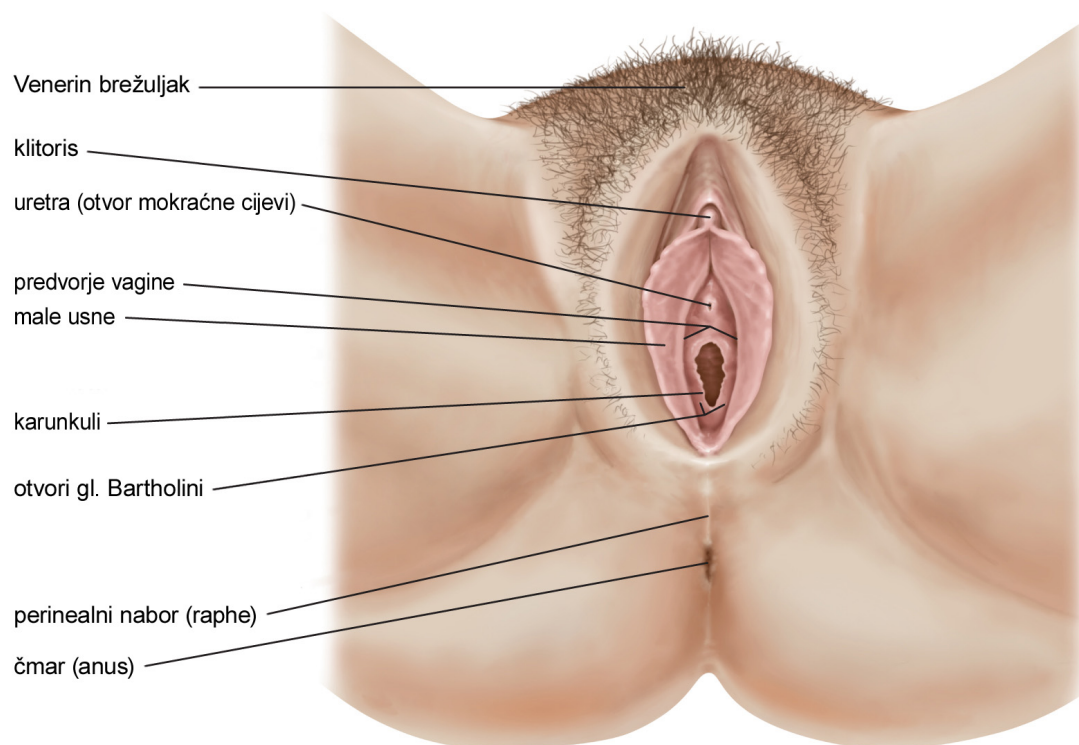
rijetkost da se ženama s poremećajem funkcionalnosti vrata maternice dijagnosticira idiopatska neplodnost.

1.1.2 Ženski spolni sustav - građa spolnog sustava

Ženski spolni sustav građen je od vanjskih i unutarnjih organa. Vanjski spolni organi nalaze se izvan male zdjelice i čine ih *predvorje rodnice sa žlijezdama, Venerin brežuljak, velike i male usne te erektivni organi*. Unutarnji spolni organi smješteni su unutar zdjelice, zaštićeni njenim kostima i čine ih *rodnica, maternica (cerviks i korpus), jajovodi i jajnici*. (2)

1.1.2.1 Vanjski spolni organi

Stidnica je početni dio vanjskih spolnih organa, prekrivena stidnim dlakama. Na prednjem dijelu nalazi se otvor mokraćne cijevi (lat. *urethra*), straga otvor debelog crijeva (lat. *anus*), a sa spolnim organima ga povezuje međica (lat. *perineum*). Velike (*vanjske*) i male (*unutrašnje*) usne su kožni nabori koji prekrivaju i štite otvor rodnice. Male usne smještene su unutar velikih, a spajaju se u području brežuljka koji nazivamo Venerin brežuljak (lat. *mons pubis*), nalazi se ispred stidne kosti i građen je od nakupine masnog tkiva. Klitoris ili dražica (erektalni organ) nalazi se u neposrednoj blizini vrha malih usana. Građen je od spužvastog tkiva kao i glavić penisa, te je vrlo osjetljiv i prokrvljen. Klitoris povezujemo s pružanjem seksualnog užitka. Kod žena koje nisu stupile u spolni odnos na ulazu u rodnicu nalazi se tkivni nabor - himen ili djevičnjak. Oblik mu je najčešće prstenast ili polumjesečast, a u sredini himenalnog prstena obično se nalazi otvor kroz koji iscjedak i menstruacijska krv izlaze iz rodnice. (2)



Slika 1: prikaz vanjskih spolnih organa žene

(preuzeto: <https://www.britannica.com/science/vulva>)

1.1.2.2 Unutarnji spolni organi

Jajnici

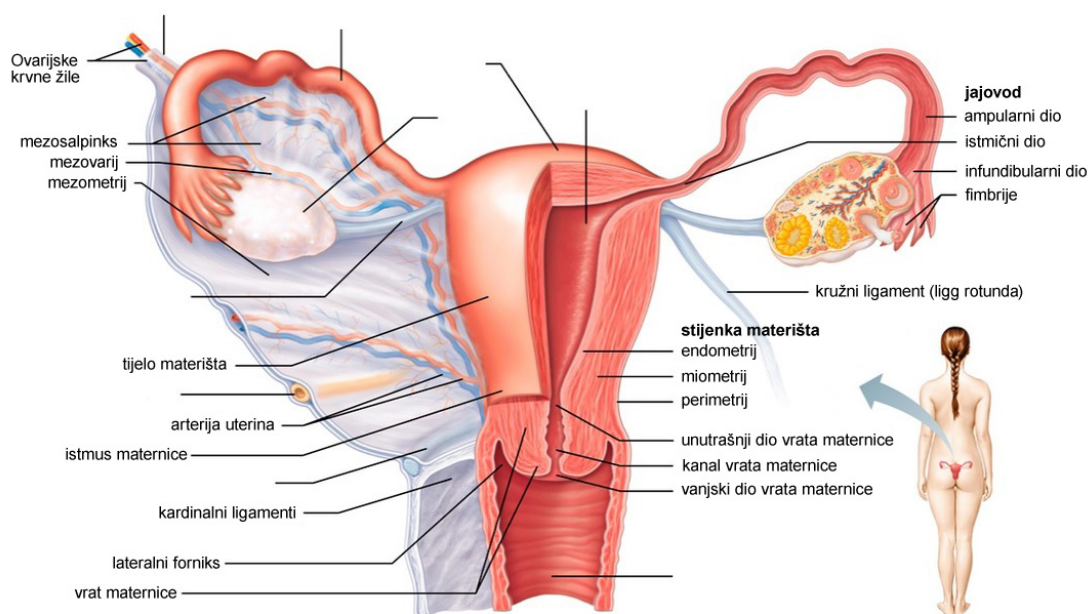
Jajnik (*lat. ovarium*) je parna spolna žlijezda smještena u maloj zdjelici u dijelu koji se naziva *lat. fossa ovarica*, lateralno od maternice prema zidu zdjelice. Uloga jajnika je periodično otpuštanje jajne stanice i stvaranje steroidnih hormona (*estrogena i progesterona*). U reproduktivno zrele žene ima oblik badema, dug oko 3 cm i širok oko 1,5 cm. Građen je od tri neoštro ograničena dijela: vanjska zona ili kora, središnja moždina ili srž te hilus. Jajnici su s maternicom spojeni širokom materničnom svezom (*lat. ligamentum latum uteri*), dok su s jajovodom u jako bliskom doticaju.

Rodnica, maternica i jajovodi

Rodnica (*lat. vagina*) je mišićna cijev smještena u zdjelici. Čine ju prednja i stražnja stijenka te se proteže od himena do maternice. Prosječno je duga 11 cm i ima oblik sagitalno spljoštene cijevi koja u presjeku daje oblik slova «H». Histološki je građena od vezivnog i mišićnog sloja, lamine proprije i epitela. Tri osnovne funkcije rodnice su: odvodnja menstruacijske krvi iz organizma, seksualna funkcija te kao dio porođajnog kanala.

Vrat maternice (grlić ili cerviks) donji je dio maternice koji se nastavlja na tijelo. Sastoji se od rodničkog dijela (egzocerviks, porcija ili *lat. portio vaginalis uteri*) koji prominira u rodnicu i supravaginalnog dijela (endocerviks ili *lat. portio supravaginalis cervicis uteri*) koji je preko istmusa spojen s tijelom maternice. Površina egzocerviksa je okrugla i blago izbočena (konveksna), a u centru se nalazi vanjsko ušće (*lat. orificium uteri externum*) cervikalnog kanala (*lat. canalis cervicalis*). Cervikalni kanal pruža se kroz cijelu dužinu vrata maternice u dužini 2 - 3 cm do unutarnjeg ušća (*lat. orificium uteri internum*) gdje se nastavlja na šupljinu maternice. U žena koje nisu rađale porcija je konična, a vanjsko ušće okruglo, dok je u žena koje su rađale cilindrično i poprečno rascijepljeno. Maternica (*lat. uterus*) je šuplji, neparni kruškoliki organ koji je spljošten sagitalno, s vrhom okrenutim prema dolje. Građena je od dijela koji se naziva trup (*lat. corpus*), na koji se nastavlja suženi dio (*lat. isthmus*) i najdonji dio (ranije opisani), vrat maternice (*lat. cervix*). U odrasle žene ukupna dužina maternice s cerviksom je oko 7,5 cm. Debljina stijenke varira od 2,5 cm u predjelu trupa do 1 cm u predjelu vrata. Smještena je u maloj zdjelici između mokraćnog mjehura i završnog dijela debelog crijeva. Histološki je građena od triju slojeva: potrbušnice (*perimetrij*), mišićnog sloja (*miometrij*) i sluznice (*endometrij*) koja se svaki ciklus mijenja pod utjecajem hormona. U materničnoj šupljini se smješta zametak, a ukoliko tijekom menstruacijskog ciklusa ne dođe do oplodnje, endometrij se odljušti te izlazi kroz rodnicu. Jajovod (*lat. tuba uterina*) je parna i pokretljiva mišićna cijev koja omogućava komunikaciju jajnika i maternice. Jajovodi su prosječno dugi 10 - 12 cm. Građeni su od četiri dijela: proksimalni (*intramuralni*), suženi (*istmični*), prošireni (*ampularni*) i završni dio (*infundibulum*) koji završava otvorom (*lat. ostium abdominale tubae uterine*). Završni dio obrubljen je naborima na koje se nastavljaju trepetljike (*lat. fimbriae*) koje imaju funkciju prihvaćanja jajne

stanice nakon ovulacije i prosljeđivanja iste u jajovod. Histološki razlikujemo također četiri sloja stijenke jajovoda: seroznu ovojnicu, subserozni sloj, mišićni sloj i sluznicu. Fiziološka uloga jajovoda je višestruka: od prihvaćanja jajne stanice, kapacitacije spermija, oplodnje te prijenosa zametka do maternične šupljine gdje se nastavlja daljnji razvoj ploda (2).



Slika 2: prikaz unutarnjih spolnih organa žene

(preuzeto:<https://quizlet.com/290892577/female-internal-reproductive-organs-diagram/>)

1.2 CIKLIČKE PROMJENE U ŽENSKOM SPOLNOM SUSTAVU

1.2.1 Ovarijski ciklus

U jajniku se događaju dvije vrlo značajne funkcije cjelokupnog menstruacijskog ciklusa, stvaranje spolnih hormona te razvoj folikula i gametogeneza. Upravo tim procesima tj. njihovom usklađenošću definiran je jedan od najvažnijih procesa u ljudskoj biologiji. Prema promjenama koje se događaju u jajniku za vrijeme menstruacijskog ciklusa razlikujemo tri faze, folikularnu i luteinsku fazu, između kojih se smjestila ovulacija.

U folikularnoj fazi zbiva se rast i sazrijevanje folikula. Ona počinje prvim danom krvarenja, u trenutku kada je razina FSH-a u krvi dovoljno visoka da potakne folikule na aktivnost, a završava sazrijevanjem jajne stanice i ovulacijom. Trajanje folikularne faze je varijabilno, a obično traje 14 dana. U ovoj fazi FSH stimulira rast grupe folikula u jajniku potičući proizvodnju estrogena. Produkcija estrogena dovodi i do zadebljanja endometrija, a samo će jedan od 20 do 30 folikula, koji su započeli sa rastom prvog dana menstruacijskog ciklusa sazrijeti i stvoriti jajnu stanicu. Neposredno prije ovulacije dolazi do skokovitog porasta vrijednosti LH-a, što dovodi do rupture folikula i ovulacije tj. izbacivanja zrele jajne stanice u jajovod.

Ovulacijska faza traje 1 do 2 dana pri čemu se jajna stanica oslobađa iz vodećeg folikula u procesu koji se zove ovulacija. Ovulacija nastupa 36 do 38 sati nakon skoka vrijednosti LH-a, a događa se između 10 i 16 dana prije sljedeće menstruacije. Nakon ovulacije jajna stanica započinje svoj put kroz jajovod prema materničnoj šupljini. Na svom putu može biti oplodena. Luteinska ili faza žutog tijela traje 11 – 16 dana. Nakon ovulacije, pod utjecajem LH-a od prsnutog folikula nastaje žuto tijelo (*lat. corpus luteum*) koje proizvodi progesteron i estrogene. Djelovanje progesterona i estrogena potiče ranije proliferativno promijenjeni endometrij na pripremu za implantaciju oplodnog jajašca. Ukoliko nastupi oplodnja, zametak (embrij) započinje s produkcijom humanog korionskog gonadotropina (hCG) koji djeluje na žuto tijelo produžavajući njegovu funkciju koja će osigurati nesmetani razvoj trudnoće i izostanak menstruacijskog krvarenja.

Ukoliko ne dođe do oplodnje, žuto tijelo propada i prelazi u tzv. bijelo tijelo (*lat. corpus albicans*), a koncentracija estrogena i progesterona pada što predstavlja signal hipotalamusu da započne s novim menstruacijskim ciklusom. Zbog pada razine hormona, sloj endometrija se ljušti i gubi s menstruacijskim krvarenjem. Uz sve nabrojene i opisane promjene u menstruacijskom ciklusu dolazi i do promjene količine i konzistencije cervikalne sluzi. (3)

Menstruacijski ciklus

Menstruacija je periodičko krvarenje iz maternice koje normalno traje 3 - 5 dana, a razdoblje između dva krvarenja nazivamo menstruacijskim ciklusom. Prvim danom krvarenja (*menstruacije*) započinje menstruacijski ciklus, dok je kraj ciklusa dan prije početka sljedećeg menstruacijskog krvarenja. Uobičajeni normalni razmak između menstruacijskih ciklusa je između 21 - 35 dana. Cikličko krvarenje iz maternice nastaje kao fiziološka posljedica odljuštenja funkcionalnog dijela sluznice maternice (*endometrija*) ukoliko nije došlo do oplodnje. Kod izostanka oplodnje razina spolnih hormona pada što pokreće kaskadu reakcija s konačnim produktom ljuštenja sluznice (*endometrija*) maternice. Krv i odljušteno tkivo izlaze kroz rodnicu (vaginu). To se uobičajeno događa svakih 28 do 29 dana, ali taj razmak može biti različit i kretati se unutar fizioloških vrijednosti od 21 do 35 dana.

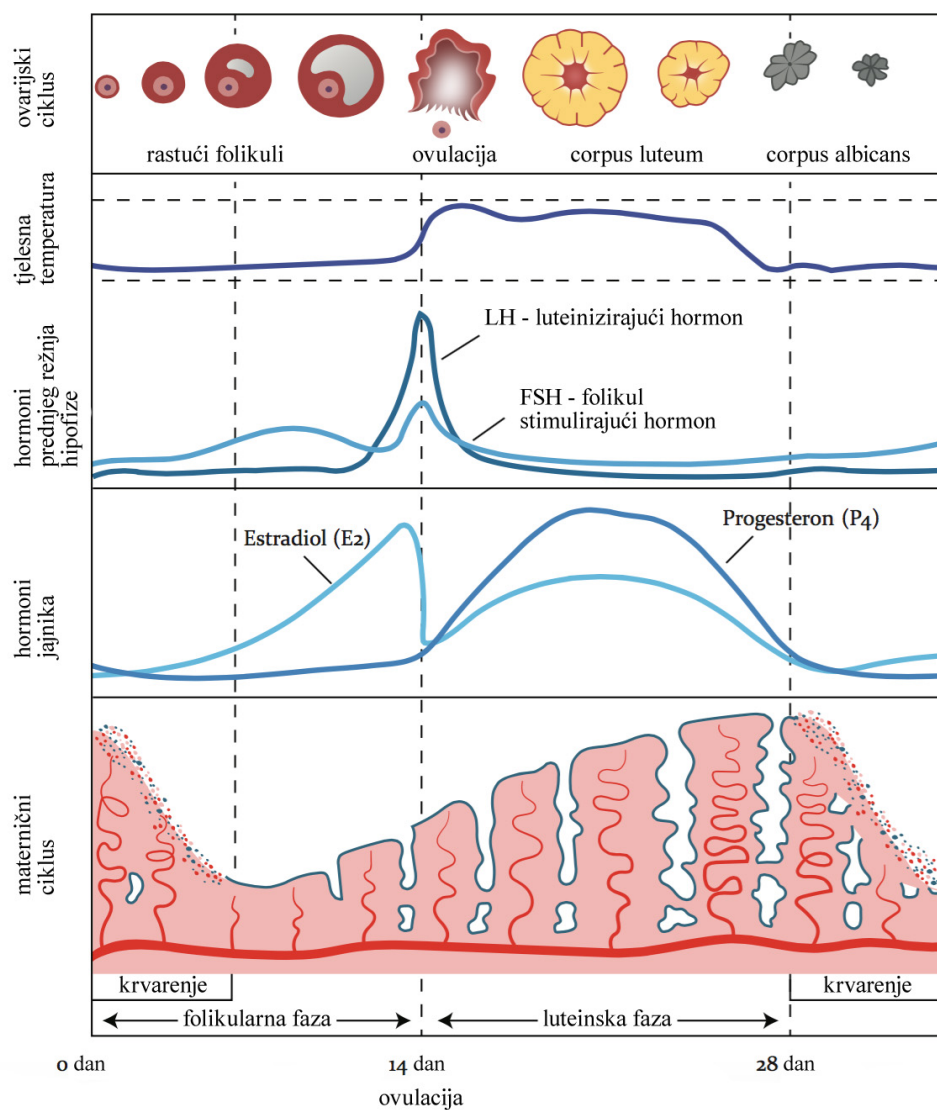
Reproduktivno razdoblje u životu žene je razdoblje u kojem dolazi do periodičkog sazrijevanja i otpuštanja jajnih stanica sposobnih za oplodnju. Ono započinje prvim menstruacijskim ciklusom koji se pojavljuje u pubertetu. Prva menstruacija naziva se *menarha* i obično nastupa u dobi između 12 i 13 godina. Menarhom započinje (*plodno*) fertilno životno razdoblje žene koje završava menopauzom. Predmenopauza je razdoblje koje prethodi menopauzi i karakteriziraju ga nepravilni i sve duži intervali između dva krvarenja. Prosječna životna dob žene kada nastupa menopauza je 50 godina.

Upravljanje menstruacijskim ciklusom odvija se na tri razine: hipotalamus-hipofiza, jajnici i maternica. Hipotalamus i hipofiza reguliraju razinu spolnih hormona. Najvažniji hormoni menstruacijskog ciklusa su hormon koji oslobađa gonadotropin (*gonadotrophin-releasing hormon* (GnRH)), folikulostimulirajući hormon (FSH) i luteinizirajući hormon (LH). GnRH je hormon hipotalamusa koji djeluje stimulirajuće na hipofizu te je potiče na stvaranje i otpuštanje u krvotok FSH-a i LH-a. Povišena razina FSH-a u krvi potiče u svakom ciklusu sazrijevanje oko 20 - 30 jajnih stanica u jajniku, tako što ih potiče da izlučuju hormon estradiol (E_2). Estradiol stimulira rast endometrija, čime se obnavlja sloj koji je odljušten tijekom menstruacijskog krvarenja. Napredovanjem ciklusa, raste i razina E_2 , koja zajedno s nekoliko ostalih čimbenika potiče lučenje visokih vrijednosti LH-a iz hipofize. Nagli skok vrijednosti

LH-a dovodi do sazrijevanja jajne stanice i *ovulacije (otpuštanje jajne stanice sposobne za oplodnju)*. Uobičajeno se otpušta samo jedna jajna stanica, ali se može otpustiti i više njih odjednom.

Nakon ovulacije, od folikula u kojem se nalazila jajna stanica nastaje privremeni organ - žuto tijelo (*lat. corpus luteum*) – koje izlučuje hormon progesteron (P_4). Progesteron djeluje na endometrij, priprema ga da prihvati oplođeno jajašce i stvara uvjete za daljnji razvoj maternice i dojki ukoliko dođe do začeća. Ukoliko ne dođe do začeća, žuto tijelo propada i nestaje, a zbog nedostatka progesterona dolazi do ljuštenja endometrija koji odlazi sa menstruacijskom krvlju, označavajući kraj ciklusa.

(3)



Slika 3: prikaz ovarijskog i menstruacijskog ciklusa žene

(preuzeto: <https://viosfertility.com/blog/the-menstrual-cycle/>)

1.3 VRAT MATERNICE, ENDOCERVICALNE ŽLIJEZDE I CERVICALNA SLUZ

1.3.1 Vrat maternice i endocervikalne žlijezde

Vrat maternice, (lat. *cervix uteri*) distalni je dio maternice građen od vezivnog tkiva. Nastavlja se na mišićni dio maternice (lat. *corpus*) s kojim je povezan mišićno-vezivnim spojem (lat. *isthmus*). Cerviks je valjkastog izgleda, a može biti različite dužine ovisno o anatomskim varijacijama. U prosjeku je kod nerotkinja dug oko 3 - 4 cm, a širok 2 - 3 cm. Svojim distalnim dijelom cerviks se nalazi u rodnici i taj vaginalni dio naziva se egzocerviks. Proksimalni dio cerviksa koji se nastavlja na egzocerviks i povezuje ga s istmičnim dijelom maternice naziva se još i supravaginalni dio, odnosno endocerviks. Cijelom dužinom cerviksa od vanjskog do unutrašnjeg ušća prolazi cervicalni kanal kojim je rodница povezana kavumom materišta. Egzocerviks je prekriven mnogoslojnim pločastim epitelom koji se nastavlja na pločasti epitel rodnice. Endocervikalni dio kanala prekriven je jednoslojnim cilindričnim epitelom koji se nastavlja na epitel endometrija maternice. Stijenka cerviksa građena je od elastičnih i kolagenih vlakana uz malo glatkih mišićnih stanica (4). Mehanička funkcija cerviksa iz tog razloga je potporna, a ne kontraktilna. Osim mehaničke uloge, cerviks ima ulogu u proizvodnji sluzi koja ima brojne funkcije u reproduktivnom zdravlju i prokreaciji. Sluznica u vratu maternice (lat. *endocervix*) sastoji se od uzdužnih nabora nalik listovima palme (lat. *plicae palmatae*). Nabori se dodatno granaju pri čemu se stvaraju sekundarni nabori s udubljenjima (endocervikalne kripte, lat. *cryptae*). Na presjeku nabori nalikuju ribljoj kosti ili prerezanu drvetu. Udubljenja i nabori imaju fiziološku ulogu skladištenja i konzerviranja spermija. Oblaže ih jednoslojni cilindrični epitel koji proizvodi cervicalnu sluz. S obzirom na žljezdanu funkciju, endocervikalne kripte nazivamo i endocervikalnim žljezdama (5). U zdrave žene reproduktivne dobi cervicalne žlijezde dnevno proizvode oko 20 do 60 mg sluzi, dok za vrijeme ovulacijskog djela ciklusa proizvodnja može narasti i do 700 mg na dan (6).



Slika 4:histeroskopski prikaz cervikalnog kanala (kripte)

(s dopuštanjem doc. dr. sc. B. Žegura, dr. med., UKC Maribor, Slovenija)

1.3.2 Cervikalna sluz

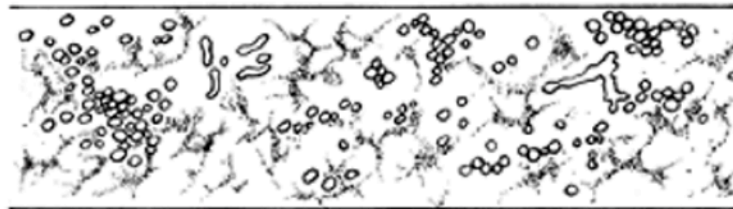
Cervikalna sluz je glikoproteinski gel čija se biokemijska i biofizička svojstva razlikuju ovisno o hormonskoj regulaciji njegove proizvodnje i području unutar endocerviksa u kojem je proizveden. Pri ovulaciji, estrogene povećavaju hidrataciju sluzi, što rezultira vodenastim sekretom s niskim viskoelastičnim. Takva sluz omogućuje prolaz spermija kroz cervikalni kanal. (7, 8). Tijekom luteinske faze sluz je oskudna, sadrži manje vode i osigurava učinkovitu barijeru za spermije. Cervikalna sluz ima važnu ulogu u plodnosti jer prihvaća, hrani i čuva spermije te im pomaže u prijenosu do jajne stanice kako bi došlo do oplodnje (9, 10). Ona predstavlja barijeru za ulazak patogena u maternicu, a služi i kao zaštitni sloj na epitelu vrata maternice i rodnice. Mehanizam stanične regulacije proizvodnje sluzi različitih svojstava, te njihova otpuštanja u lumen vrata maternice tek je djelomično poznat. Ciklička varijabilnost cervikalne sluzi ima presudan utjecaj na plodnost i reproduktivno zdravlje no njezin utjecaj još uvijek nije do kraja razumljiv. Klinički značaj sluzi u istraživanju neplodnosti ili borbi protiv raznih infekcija ukazuje na potrebu dodatnog

istraživanja cervikalne sluzi. Zbog vrlo složene kemijske i biofizičke strukture cervikalne sluzi, dostupni podaci često su nepotpuni, a ponekad i proturječni.

Normal cycle, 14th day



Midluteal phase, normal cycle



Source: Maxine A. Papadakis, Stephen J. McPhee,
Michael W. Rabow: Current Medical Diagnosis & Treatment 2018
Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

Slika 5: cervikalna sluz

(preuzeto: <https://accessmedicine.mhmedical.com>)

1.4 STRUKTURA CERVİKALNE SLUZI

1.4.1 Biokemijska struktura cervikalne sluzi

Biokemijski sastav cervikalne sluzi je vrlo složen i mnogo čimbenika utječe na njena biofizikalna svojstva ključna za plodnost. Najvažniji čimbenici su endokrini status koji regulira karakteristične cikličke promjene, te pH. Cervikalna sluz sadrži vodu (90 – 98 %) i složenu smjesu anorganskih iona, aminokiselina, kolesterola, lipida, glukoze, askorbinske kiseline, polisaharida, mucina, plazma proteina, enzima i baktericidnih proteina (11). Osnovni sastojak sluzi su mucini, složene glikoproteinske molekule. Viskoelastična svojstva sluzi ovise o mucinima, glavnim strukturnim proteinima sluzi, koji su velike glikolizirane polimerne molekule povezane disulfidnim vezama (12 - 14).

1.4.2 Ciklička promjenjivost strukture cervikalne sluzi

Ranije studije pokazale su da je količina sluzi (mjereno u mokroj masi) povećana u vratu maternice u sredini ciklusa (15). Fizikalna (reološka) svojstva i biokemijska struktura cervikalne sluzi također se mijenjaju tijekom menstruacijskog ciklusa. Cikličke promjene fizikalno-kemijskih svojstava također su posljedica hormonskih promjena (16).

Maksimalna proizvodnja sluzi odgovara najvišoj razini estrogena (17, 18). MUC5B (sekrecijski mucin) i MUC4 (transmembranski mucin) su glavni mucini u endocerviksu (19). Razina glasničke RNA gena MUC4 i MUC5B obrnuto je proporcionalna razini progesterona u serumu, pa se u luteinskoj fazi njihova razina smanjuje (19). Količina mucina MUC5B poraste 3 - 7 puta u sredini menstruacijskog ciklusa, a naglo se smanjuje u luteinskoj fazi ciklusa (20). Ciklička promjenjivost strukture sluzi uključuje, osim količine sluzi i proizvodnje mucina, i promjene u sadržaju vode, glikozilacije sluzi i pH (21, 22). Promijenjena biokemijska struktura pridonosi promjeni fizikalnih svojstava sluzi (19).

1.5 ULOGA I VAŽNOST CERVICALNE SLUZI ZA ZDRAVLJE I PLODNOST ŽENA

1.5.1 Uloga cervikalne sluzi u plodnosti

Cervikalna sluz važna je za plodnost jer prihvaća, filtrira, priprema, skladišti i otpušta spermije za prijenos do jajovoda u svrhu oplodnje (16). Spermiji su nesposobni za preživljavanje i transport prema jajnoj stanici u nedostatku dovoljne količine sluzi estrogenskog tipa (16, 24, 25). Cervikalna sluz ima inicijalni utjecaj na kapacitaciju spermija (26). Ona djeluje kao "pasivni filter" koji odabire i isključuje spermije s neispravnim mehanizmima pokretanja (27). Migracija kroz cervikalnu sluz povećava sposobnost spermija za akrosomsku reakciju (28). Posljednje desetljeće donijelo nam je značajan napredak u dijagnostici i liječenju problema začeća. Ukupna učestalost neplodnosti ostala je nepromijenjena (29), ali stope uspjeha znatno su se poboljšale mogućnošću uporabe raznih metoda potpomognutih reproduktivnih tehnologija. Mogućnosti liječenja i uspjeh variraju ovisno o uzroku neplodnosti. Usprkos svim dostupnim dijagnostičkim i terapijskim metodama otprilike 15 % - 30 % parova i dalje će spadati u grupu neobjašnjive (idiopatske) nemogućnosti začeća (30). Upravo u tu grupu spadaju i problemi začeća uzrokovani poremećajima lučenja cervikalne sluzi.

1.5.2 Zaštitna uloga sluzi

Osim svoje uloge u plodnosti, sluz vrata maternice ima značajnu zaštitnu ulogu. Ona predstavlja kemijsku i fizičku barijeru za infekciju, kao i za spermije. Za vrijeme ovulacije, zbog strukturnih promjena, postaje propusna za spermije, a njeni zaštitni kapaciteti postaju još aktivniji i jači. Zahvaljujući stanicama za proizvodnju imunoglobulina u vratu maternice, sluz sadrži protutijela koja povećavaju zaštitu od specifičnih patogena (31, 32).

1.5.3 Cervikalna sluz kao znak ovulacije

Sluz je također važan element za procjenu vremena ovulacije (18, 33 - 35). Na temelju sluzi, žene iz mnogih naroda i kultura prepoznaju plodne faze menstruacijskog ciklusa u svrhu svijesti o plodnosti (36). Svijest o plodnosti

omogućuje razumijevanje i donošenje odluka o reproduktivnom i seksualnom zdravlju. To može pomoći parovima u planiranju trudnoće. Poznavanje vlastite sluzi pomaže ženama da otkriju ginekološke poremećaje i pravodobno konzultiraju liječnika (37). Budući da takvi ginekološki poremećaji mogu biti i uzrok neplodnosti, praćenje karakteristika sluzi može biti korisno i u otkrivanju i terapiji neplodnosti (38).

1.6 REGULACIJA IZLUČIVANJA SLUZI

1.6.1 Sekrecijski epitel

Površinu maternice i endocervikalnih žlijezda oblaže jednoslojni cilindrični epitel koji izlučuje sluz u vrat maternice. Ultrastrukturnom analizom endocervikalnih žlijezda definirana su tri tipa stanica u tom epitelu: bazalne stanice, sekrecijske mukozne stanice i cilindrične stanice s trepetljikama (39). Stanice s trepetljikama pridonose stvaranju sluzi, izmjenom vode i iona čime reguliraju hidrataciju mucina (40).

Histokemijske, imunohistokemijske i molekularne studije su pokazale da endocervikalni epitel prolazi cikličke promjene koje su ovisne o estrogenu i progesteronu. (19, 21, 41). Osim toga, pretpostavlja se da endocervikalne žlijezde s različitim prostornim rasporedom proizvode različite vrste sluzi, ovisno o stimulaciji estrogenom (42 - 44). Prema toj hipotezi, žlijezde smještene u gornjem dijelu cervikalnog kanala izlučuju manje viskoznu sluz, a žlijezde iz nižih dijelova će proizvesti viskoziju sluz.

1.6.2 Mehanizam izlučivanja cervikalne sluzi

Biosinteza i sastavljanje, sekretornih gel formiranih mucina, odvija se u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom kompleksu. U potpunosti obrađeni, namotani, glikozilirani, sulfatirani i polimerizirani mucini pohranjuju se u velikim količinama u velikim sekrecijskim zrnima koja zauzimaju većinu citoplazme mukoznih stanica (45). Mjehurići (zrnca) ispunjeni sluzi također su pronađeni izvan stanica koje izlučuju sluz, te su prozване mjehurićima sličnim egzosomima (engl. *exosome-like vesicles*) (46 - 48). Njihova uloga još nije u potpunosti poznata. Premda je poznato da mucin može biti izlučen konstitutivno egzocitozom sekrecijskih zrnaca ili putem regulirane egzocitoze, točan mehanizam kako su mucini organizirani u sekrecijskim stanicama i kako se izlučuju je nejasan. Egzocitoza tih zrnaca počinje naglim bubrenjem kondenziranih mucinskih makromolekula u sekrecijskim zrnima (49). Takvo bubrenje objašnjeno je teorijom elektrostatskog odbijanja poliolonskih ostataka na površini mucina. (46).

1.6.3 Regulacija izlučivanja cervikalne sluzi – uloga cikličkih hormona

Postoje mnogi pokazatelji povezanosti između proizvodnje sluzi i razine cikličkih hormona. Ekspresija gena MUC odgovara razinama progesterona (19). Također, porastom razine estrogena dolazi do pojačanog protoka vode prema cervikalnom lumen (50, 51), povećanja koncentracije K^+ i pada koncentracije Ca^{2+} u cervikalnom kanalu (52), promjene pH (53) i promjene u antibakterijskom učinku sluzi (32). Međutim, izravni dokazi i mehanizmi hormonske regulacije proizvodnje sluzi još nisu otkriveni.

Ciklička hormonska regulacija proizvodnje sluzi nije jednostavna, jer proizvodnja sluzi obuhvaća razne unutarstanične i izvanstanične događaje. Stoga bi učinak estrogena na otpuštanje sluzi i viskoznost sluzi trebao biti kumulativni rezultat promjena izražaja mucinskih gena, protoka vode, ionske izmjene, pH, opskrbe HCO_3^- , glikozilacije, aktivnosti mucinaza i brzine izlučivanja sluzi i dekondezacije.

Događaji koji sudjeluju u proizvodnji sluzi mogu se podijeliti na "spore" i "brze" događaje. Spori događaji su ekspresija mucinskih gena, sinteza i glikozilacija mucina, bubrenje okolnog vezivnog tkiva itd. Razina MUC5B proteina doseže svoj vrhunac barem jedan dan nakon što njegova mRNA dosegne svoj vrhunac (20). S druge strane, bubrenje mucinskih zrnaca i ekspanzija mucina događa se unutar samo nekoliko sekundi (46). Ako oba događaja regulira estrogen, moraju postojati dva različita mehanizma regulacije.

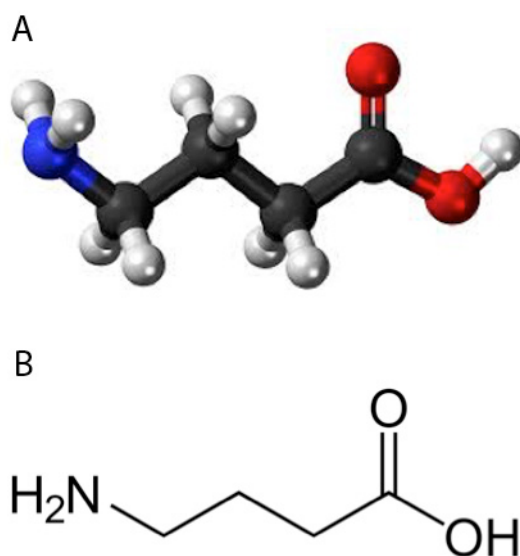
Receptori za estrogene (ER), kao i ostali steroidni receptori, uglavnom se nalaze u citosolu. Vezanjem hormona na te receptore dolazi do njihove migracije u jezgru, dimerizacije i vezanja na DNA. Kao posljedica toga, dolazi do transkripcije gena, npr. gena za MUC5B. Pored ovakvog sporog, genomskog djelovanja, poznato je i brzo, nengenomsko djelovanje estrogenskih receptora, gdje receptori ostaju na staničnoj membrani i pokreću brzi stanični odgovor unutar nekoliko minuta (38). Premda su estrogenski receptori smješteni na staničnim membranama mogu stvarati komplekse s G proteinima, striatinom, receptorskim i nerekceptorskim tirozin kinazama (54, 55). Primjerice, vezanje estrogenskog receptora α (ER α) sa striatinom dovodi do naglog porasta razine Ca^{2+} i razine dušikovih oksida, a ne do ekspresije gena (56). Takva

negenomska aktivnost estrogena može biti uključena u reguliranje "brzih" događaja u proizvodnji sluzi, osobito onih koji reguliraju unutarstaničnu i izvanstaničnu koncentraciju iona i pH.

1.7 GAMA AMINOMASLAČNA KISELINA (GABA)

1.7.1 GABA i GABA-ergički sustav

γ -aminomaslačna kiselina (GABA, engl. *γ Amino-Butyric Acid*) glavni je inhibicijski neurotransmiter u mozgu odraslih sisavaca. Molekula GABA-e pronađena je u brojnim organima i tkivima. Dokazano je da djeluje u središnjem i perifernom živčanom sustavu te nekim ne-neuronskim tkivima. Glavna uloga mu je smanjenje neuronske podražljivosti u živčanom sustavu. Kod čovjeka GABA izravno regulira i tonus mišića. U literaturi je opisano da djeluje na dvije vrste receptora: GABA_A receptore (GABA_AR) i GABA_B receptore (GABA_BR). GABA_AR su ionski kloridni kanali koji posreduju i brzu inhibicijsku aktivnost GABA-e (57). GABA_BR pripadaju velikoj obitelji receptora vezanih uz glutamat-trifostat-vezujuće proteine, a reguliraju K⁺ i Ca²⁺ kanale koji posreduju u dugoročnim inhibicijskim djelovanjima GABA-e. GABA se sintetizira iz glutamata djelovanjem enzima dekarboksilaze glutaminske kiseline (GAD, prema engl. *Glutamic Acid Decarboxylase*). Nakon sinteze pohranjuje se u sinaptičke mjehuriće uz pomoć vezikularnog prijenosnika GABA-e (VGAT, prema engl. *vesicular GABA transporter*). U određenim specifičnim situacijama mogu se aktivirati alternativni putevi sinteze GABA-e.(58).

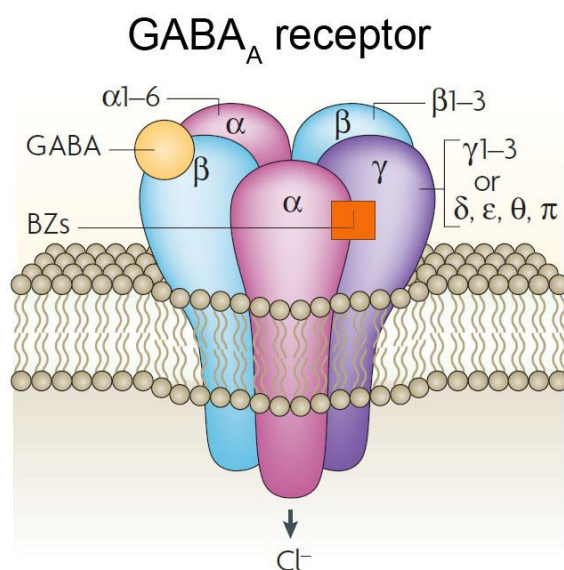


Slika 6: Gama aminomaslačna kiselina (GABA); **A:** modularni oblik; **B:** strukturni oblik

(preuzeto: https://en.wikipedia.org/wiki/Gamma-Aminobutyric_acid)

1.7.2 GABA_A receptor

GABA_A receptor je selektivni ionski kanal za kloridne ione. Središnji kanal, pora kroz koju selektivno prolaze ioni Cl⁻ reguliran je pomoću GABA-e. Okružuje ga pet podjedinica (57). Svaka izoforma ovih receptora sastoji se od pet homolognih ili istovjetnih podjedinica. Nije do kraja istraženo koliko izoformi receptora postoji i na koji se način kombiniraju njihove podjedinice. GABA_A receptori koji se nalaze na postsinaptičkoj membrani posreduju neuronsku inhibiciju koja se javlja u milisekundnom vremenskom rasponu, a oni smješteni na ekstrasinaptičkoj membrani reagiraju na okolišnu GABA-u i prenose dugotrajnu inhibiciju. GABA_A receptori reagiraju na široki spektar lijekova, zbog različitih veznih mjesta koja im omogućavaju različita stanja aktivnosti. Neki od spojeva za koje GABA_AR ima vezna mjesta su benzodiazepini, barbiturati, neurosteroidi i etanol (59).



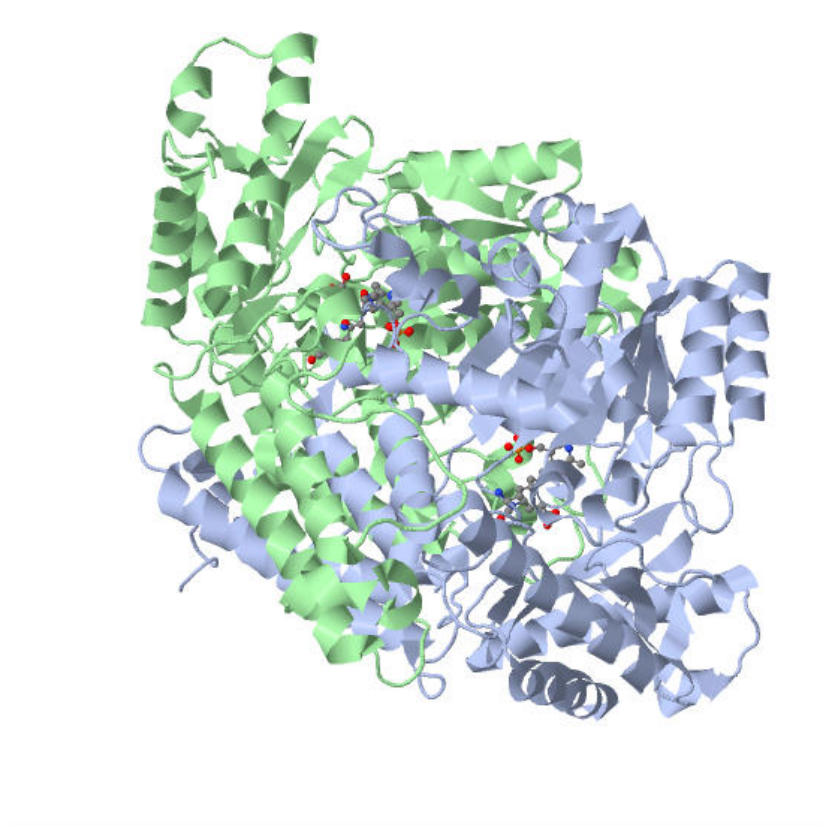
Jacob et al., Nature Reviews Neuroscience, 2008

Slika 7: GABA_A receptor - model

(preuzeto: <https://accessmedicine.mhmedical.com>)

1.7.3 Glutamat dekarboksilaza

Glutamat dekarboksilaza (GAD) je enzim koji katalizira dekarboksilaciju glutamata u GABA-u i CO_2 . Ovaj se enzim pojavljuje u dvije izoforme, GAD67 i GAD65. Zbog njihove različite funkcije GABA-u sintetiziraju na različitim staničnim lokalizacijama. GAD65 nalazimo u živčanim završecima u kojima njegova funkcija omogućuje neurotransmisiju, dok je GAD67 ravnomjerno raspoređen po stanici i sintetizira GABA-u za neuronsku aktivnost koja nije povezana s neurotransmisijom, već kao što je sinaptogeneza i zaštita od ozljede živaca (60). Mnogi autori GABA-u i njenu aktivnost istražuju posredno, ispitujući aktivnost GAD-a. U biosintezi neurotransmitera, kao i u ostalim biosintetskim putovima, jedan enzimski korak regulira opći tijek sinteze. Upravo dokazivanjem prisutnosti glavnog nadzornog enzima (što katalizira taj ključni korak sinteze) često dokazujemo i neurotransmittersku narav stanice, najčešće neurona (61). Jasno, to je uvjet *sine qua non*, ali nije dovoljan sam po sebi, zbog mnogih staničnih procesa koji mogu interferirati od sinteze do egzocitoze neurotransmitera.



Slika 8: Glutamat dekarboksilaza (GAD)

(preuzeto: https://sh.wikipedia.org/wiki/Glutamatna_dekarboksilaza#/media/)

1.7.4 GABA-ergički sustav u perifernim organima

Osim u središnjem živčanom sustavu, aktivnost GABA-e i GABA_AR pronađena je i u perifernim tkivima. Uz ulogu u neuromuskularnim vezama u glatkom mišićju koje djeluju slično kao neuronske sinapse, uloga GABA_AR postoji i u hipertrofiji i hiperplaziji stanica, embrionalnom razvoju, posredovanju imunološkog odgovora, izlučivanju inzulina te stvaranju sluzi (62 - 65). Štakorska i ljudska gušterača izražavaju na svojim stanicama GABA receptor. Tako je u štakorskoj gušterači pokazano kako je GABA_AR prisutan u α , ali ne i u β i γ stanicama. β stanice Langerhansovih otočića izlučuju GABA-u koja djeluje na GABA_AR prisutan u α stanicama i na taj način inhibira izlučivanje glukagona iz tih stanica (66). U nadbubrežnoj žlijezdi GABA putem GABA_AR utječe na steroidogenezu u kori nadbubrežne žlijezde, ali i regulira otpuštanje kateholamina iz srži, a smatra se da pritom GABA može imati autokrino i parakrino djelovanje (62). GABA je rasprostranjena i u ženskom i muškom reproduktivnom sustavu. GABA-u i GABA_A i GABA_B receptore nalazimo u intersticiju testisa, sjemenskim mjehurićima i prostati. Dokazana je i uloga GABA-e u akrosomskoj reakciji spermija (67). U ženskom spolnom sustavu, hormoni jajnika kontroliraju motilitet maternice modificirajući konformaciju GABA_AR. U štakorskom jajniku i uterusu pokazana je i povezanost koncentracije GABA-e i razine estrogena (68). Nalaz funkcionalnog GABA-ergičkog sustava potvrđen je i u ljudskom spolnom sustavu, u maternici, jajovodu, jajniku i cerviksu (69 - 71). Zanimljivo je istraživanje uloge GABA-ergičkog sustava u dišnom sustavu kojim je pokazano kako GABA proizvedena u epitelu dišnih putova autokrino i parakrino preko GABA_AR potiče pojačano izlučivanje sluzi u epitelnim stanicama (72). Djelovanje GABA-e uzrokovalo je depolarizaciju stanica i porast koncentracije kalcijevih iona koji zajedno s diacilglicerolom (DAG) djeluju kao drugi glasnici u aktivaciji egzocitoze sekrecijskih zrnaca u Clara stanicama (73). Djelovanje GABA-e rezultiralo je i jačim unutarstaničnim i izvanstaničnim obojenjem alcijanskim modrilom, ukazujući na veću proizvodnju mucina u epitelu dišnih putova. Pokusi na miševima senzibiliziranim antigenom bjelanjka pokazali su kako je izlaganje tom antigenu povećalo izražaj molekula GABA-ergičkog sustava, a izlaganje GABA-i proizvodnju sluzi i hiperplaziju stanica koje proizvode sluz (72). Ovakav primjer zanimljiv je u proučavanju izlučivanja sluzi u reproduktivnom sustavu zbog velike sličnosti građe epitela dišnog i reproduktivnog sustava te načina izlučivanja i sastava

izlučene sluzi. Žljezdane stanice endocerviksa slične su Clarinim stanicama i vrčastim stanicama građom, sintetskom funkcijom i glikoproteinskim sastavom izlučene sluzi.

1.7.5 Potencijalna uloga GABA-ergičkog sustava u endocerviksu

Na modelu astme pokazano je da pojačano izlučivanje sluzi u dišnom epitelu potiče GABA koja se stvara u epitelnim stanicama, te autokrino i parakrino djeluje na njih (31,74). Slično mehanizmu otpuštanja prisutnom u GnRH neuronima, i stanice dišnog epitela otpuštaju GABA-u neovisno o akcijskom potencijalu (72). Rezultati našeg prethodnog istraživanja pokazali su da je receptor za GABA ($GABA_A$ R) prisutan u tkivu mišjeg i humanog endocerviksa (71), te smo na temelju primjera GnRH neurona i izlučivanja sluzi u dišnom epitelu predložili model po kojem GABA-ergički sustav sudjeluje u brznoj regulaciji izlučivanja sluzi u endocerviksu, pri čemu bi otpuštanje GABA-e bilo neovisno o akcijskom potencijalu, i regulirano negenomskim djelovanjem receptora za estrogene (71).

1.7.6 Estrogeni potiču izlučivanje GABA-e u mozgu

Mogućnost utjecaja estrogena na stvaranje i aktivnost GABA-e pokazan je na primjeru gonadotropnih hormona u mozgu. Estrogen se veže na $ER\alpha$ na presinaptičkim završecima te putem negenomskog mehanizma potiče otpuštanje neurotransmitera GABA (46). Otpuštanje GABA-e neovisno je o akcijskom potencijalu (51) GABA uzrokuje privremeni porast iona kalcija u susjednim GnRH neuronima (46).

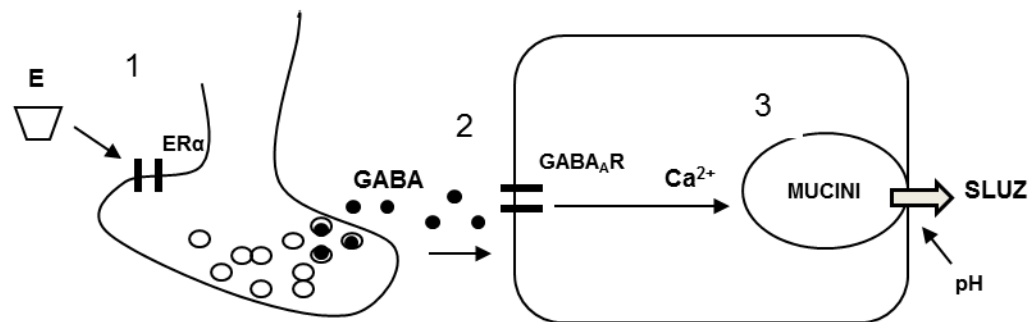
Otpuštanje GABA-e neovisno o akcijskom potencijalu vidljivo je i na prethodno opisanom primjeru stanica dišnog epitela, gdje GABA-u nisu izlučivale živčane stanice već same epitelne stanice. Poticaj za otpuštanje GABA-e u ovom slučaju nisu stvarali estrogeni, već najvjerojatnije interelukin-13 (66).

1.7.7 Pretpostavljeni mehanizam regulacije izlučivanja sluzi u endocerviksu

Na temelju poznatih činjenica o izlučivanju sluzi u endocerviksu, njegovoj ovisnosti o razini hormona, te navedenih primjera mehanizama sekrecije i djelovanju neurotransmitera GABA-e u drugim organima, pretpostavili smo mehanizam

regulacije izlučivanja sluzi u endocerviksu koji uključuje neurotransmiter GABA. Ovaj prijedlog mehanizma zasniva se na opisanom mehanizmu estrogenske regulacije izlučivanja GABA-e u mozgu neovisno o akcijskom potencijalu (75) te činjenici da GABA potiče porast koncentracije kalcijevih iona u dišnom epitelu (72).

Pretpostavljeni model regulacije lučenja sluzi u endocerviksu je:



1. estrogen potakne lučenje GABA-e neovisno o akcijskom potencijalu (iz samih epitelnih stanica ili susjednih živčanih završetaka)
2. GABA aktivira GABA receptore na epitelnim stanicama i poraste razina kalcija u stanicama
3. kalcij pokreće egzocitozu sluzi

1.8 POKUSNI MODELI U ISTRAŽIVANJIMA LUČENJA CERVİKALNE SLUZI

U studijama koje su se bavile proučavanjima funkcije cerviksa, najčešće upotrebljavani modeli za izučavanje bili su stanice i tkivo cerviksa glodavaca, velikih sisavaca te humanog cerviksa.

1.8.1 Glodavci

Miš kao mala, za uzgoj relativno jeftina životinja, najčešće je korišten model za istraživanje. Ima dobro proučenu biologiju, sekvencioniran i pručen genom, a sa čovjekom dijeli 95 % gena. Miš je životinja prilagođena životu u laboratorijskim uvjetima, jednostavno se njome rukuje, brzo se razmnožava i stvara velik broj potomaka. Relativno kratak reproduktivni ciklus koji traje 4 – 5 dana dodatna je prednost, specifična u istraživanju cervikalne sluzi. Reproductivni ciklus u glodavaca sastoji se od 4 faze: proestrus, estrus, metaestrus i diestrus. Faze ciklusa mogu se jednostavno pratiti svakodnevnim uzimanjem uzoraka stanica iz rodnice. Iako su glodavci (miš, štakor) već korišteni kao pokusni modeli u istraživanju funkcije endocerviksa i izlučivanja sluzi, ne mogu poslužiti kao odgovarajući model za proučavanje funkcije sekrecijskog epitela kakav se nalazi u humanom endocerviksu (76, 77). Postoji razlika u histološkoj građi između mišjeg i štakorskog endocerviksa i ljudskog: epitelne stanice koje izlučuju sluz prisutne su samo u proestrusu (kod štakora u diestrusu i odljušte se već u proestrusu) i to kao jedan sloj cilindričnih stanica na površini mnogoslojnog epitela cervikovaginalne sluznice koja ne tvori kripte. Zbog anatomske građe mišjeg i štakorskog cerviksa, odnosno puno kraćih udaljenosti od rodnice do maternice, sjemenska tekućina se u cerviksu ovih glodavaca zadržava mnogo kraće nego kod čovjeka. Zbog toga nema bitnu ulogu u transportu i pohrani spermija (78). Iz svega navedenog vidljivo je da nema potrebe niti za strogom regulacijom proizvodnje i izlučivanja cervikalne sluzi u miša i štakora, pa oni ne mogu poslužiti kao vjerodostojni modeli u istraživanju te regulacije kod ljudi.

1.8.2 Veliki sisavci

Reproduktivni ciklus u svinja (estrus) klasificira se prema spolnom ponašanju: estrus, gdje je svinja seksualno receptivna ili ne-estrus. Kod svinja se kao i kod žena spolni

ciklus može podijeliti u luteinsku i folikularnu fazu koje su odvojene ovulacijom. Dok menstruacijski ciklus žena počinje i završava početkom menstruacije, s ovulacijom usred ciklusa, u svinja ciklus započinje i završava ovulacijom. Duljina ciklusa i hormonska fluktuacija u svinja su vrlo slične ljudskim. U svinja se pojavljuje značajan rast folikula tijekom luteinske faze (folikularna faza djelomično se preklapa s luteinskom fazom), što rezultira kraćim ciklusom (19 – 21 dan) nego kod žena, gdje su dvije faze strože odijeljene i ciklus stoga traje 28 dana. I kod žena i kod svinja do ovulacije dolazi spontano u kontinuiranim ciklusima koji su pod kontrolom osi hipotalamus – hipofiza – jajnik. Cerviks ženke svinje dijeli zajedničke karakteristike s ljudskim cerviksom. U obje vrste nalazimo jednoslojni cilindrični epitel s vrčastim stanicama koje izlučuju sluz. Količina izlučene sluzi ovisi o fazi ciklusa s povećanom količinom tijekom estrusa kod svinja i sredinom ciklusa u žena (oko ovulacije) (79). U krava se, reproduktivni ciklus, estrus, dijeli, također, u proestrus, estrus, metaestrus i diestrus. Cerviks je građen slično ljudskom, s epitelom koji se uvlači i tvori kripe. Epitel endocerviksa je kubičan u diestrusu, a prema estrusu raste do cilindričnog. Izlučivanje sluzi najobilnije je u estrusu, razdoblju kada nastupa ovulacija, a sluz je, kao i ljudska, bistra i smanjene viskoznosti (80). Najbolji način prikaza estrusne cervikalne sluzi pod djelovanjem steroidnih hormona, ponajviše estrogena opisan je arborizacijom (grananjem sluzi na stakalcu). Detaljno je opisana u krava, te je prihvaćena kao kriterij estrogenskog djelovanja na sluz (81). Dokazano je da promjene u biokemijskim i biofizikalnim svojstvima sluzi ovise o razinama steroidnih hormona (82).

1.8.3 Čovjek

Uzorci tkiva endocerviksa žena dobar su eksperimentalni model za ispitivanje izražaja proteina i gena, promjena u strukturi u različitim fazama menstruacijskog ciklusa i trudnoći, kao i za imunološka i mikrobiološka ispitivanja. Fiziološke i dinamičke procese koji se događaju u endocerviksu teže je proučavati. Životinjama se mogu davati različiti agonisti, antagonisti i tvari kojima istraživač može prilagoditi uvjete organizma, dok kod ljudi to nije moguće i materijal kojim se barata je najčešće postoperativni. Upravo stoga razvojem znanstvene metodologije teži se sve većoj primjeni staničnih modela. Prva imortalizirana kultura ljudskih endocervikalnih stanica razvijena je 70-ih godina. Nedavno su razvijeni i 3D modeli koji vjernije

dočaravaju epitelnu funkciju zbog interakcije s vezivnom podlogom i apikalno-bazalnog usmjerenja stanice. U staničnim modelima može se izlaganjem kombinacijama hormonskih koncentracija simulirati menstruacijski ciklus i promatrati ispitivane funkcije u dinamičkom sustavu. Postoje prigovori kako dobiveni rezultati nisu uvijek pouzdani, a navodi se nekoliko razloga za to. Smatra se da se tijekom održavanja kulture stanica njihov genetski materijal mijenja diobama i da je nemoguće pratiti do kojih je sve promjena došlo. Stanična kultura korisna je metoda za proučavanje specifičnih funkcija pojedinih stanica. Ona prikazuje izoliranu sliku određenog biološkog procesa, a ne odražava stvarnu ukupnost fizioloških ili patoloških interakcija. Zbog prednosti i nedostataka svakog pojedinog eksperimentalnog modela potrebno je izabrati model prilagođen fazi istraživanja.

2. HIPOTEZA

Neurotransmitter GABA sudjeluje u regulaciji lučenja cervikalne sluzi.

3. CILJEVI

3.1 OPĆI CILJ

- razjasniti dio mehanizma sekrecije cervikalne sluzi vodeći se predloženim modelom sudjelovanja neurotransmitera GABA u toj regulaciji

3.2 SPECIFIČNI CILJEVI

- analizirati građu endocervikalnih žlijezda i njihovu sekrecijsku aktivnost
- odrediti prisutnost i stanični smještaj molekula koje sudjeluju u procesu stvaranja, sekrecije i djelovanja GABA ($GABA_A$ R, GAD, VGAT, ER α , itd.) u tkivu vrata maternice
- istražiti obzirom na dan menstruacijskog ciklusa i na položaj unutar endocerviksa :
 - razlike u morfologiji i aktivnosti žlijezda
 - prisutnost ispitivanih molekula
- pokušati razlučiti ulogu GABA u regulaciji lučenja cervikalne sluzi

4. UZORCI I POSTUPCI

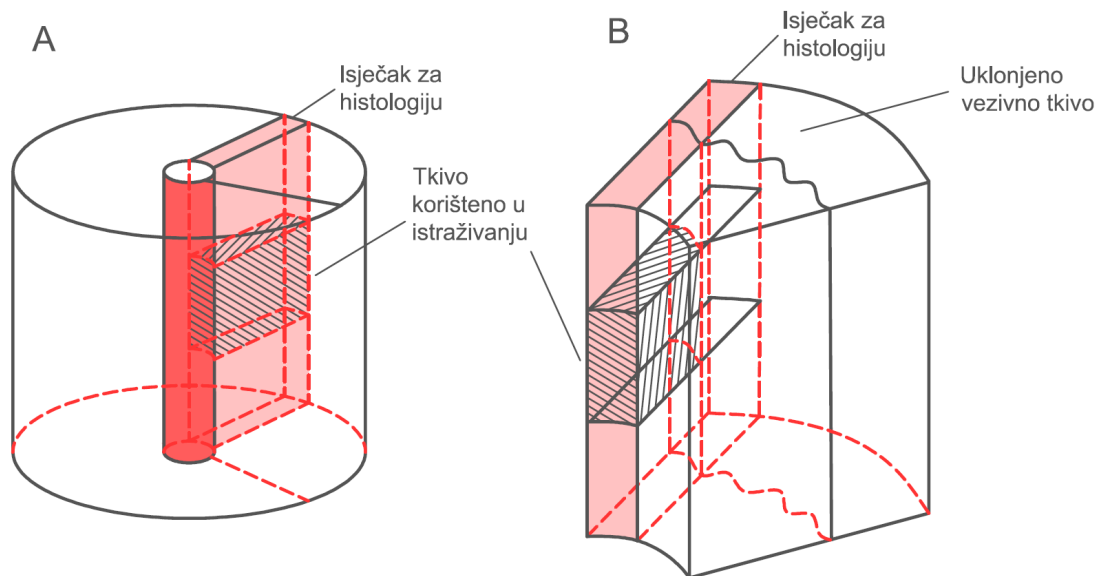
4.1 UZORAK

Kao uzorak za istraživanje koristili smo humano tkivo vrata maternice (*lat. cervix uteri*) žena u reproduktivnoj dobi 37 - 52 godine. Uzorci su dobiveni nakon operativnog odstranjenja (histerektomija) maternice (*lat. uterus*) zbog benignih razloga (najčešće miomi). Kriteriji za uključivanje u ispitivanu skupinu bili su: redoviti menstrualni ciklusi, operacijski zahvati zbog nemalignih uzroka (*miomi, defekti dna zdjelice itd.*), uredan PAPA test te potpisan informirani pristanak. Dok su isključujući kriteriji bili: raniji operacijski zahvati ili bilo koji terapijski postupci na vratu maternice, akutna upala, infekcija HPV-om, polipi, premaligne i maligne promjene vrata maternice (CIN-CIS), ostale maligne promjene radi kojih je učinjen operativni zahvat (*npr. karcinom jajnika, karcinom endometrija*), primjena hormonskih lijekova, menopauza i postmenopauza. Uzorci su skupljeni uz odobrenje etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Merkur i Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

U razdoblju od 2011. do 2014. godine skupili smo stotinjak uzoraka vrata maternice koji su odgovarali uključujućim kriterijima. Strogom primjenom isključivih kriterija odabrano je 25 uzoraka za postupak istraživanja.

4.2 UZORKOVANJE

Po učinjenom operativnom zahvatu u Klinici za ženske bolesti i porode u KB-u Merkur, na Zavodu za patologiju uzimao se dio tkiva vrata maternice veličine 20 x 20 mm. Dijelovi tkiva izrezivali su se u obliku isječka valjka debljine 2 - 3 mm i stavljali u fiksativ (4 % formalin). Izolirano tkivo cerviksa proteže se duž cijelog cervikalnog kanala, prepolovljeno na dva dijela – bliže istmusu i bliže egzocerviksu. Dobiveni uzorci tkiva nakon istraživanja pohranjeni su na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.



Slika 9:

Shematski prikaz prikupljanja tkiva ljudskog endocerviksa. *A. Valjak shematski prikazuje vrat maternice. B. Uvećani prikaz isječka tkiva. Crveno je obojan isječak tkiva cijelom duljinom, a naznačeni iscrtani dio tamnim linijama, prikupljen za histološke metode. Valovita linija označava granicu žljezdanog i vezivnog tkiva cerviksa.*

4.3 HISTOLOŠKI, HISTOKEMIJSKI I IMUNOHISTOKEMIJSKI POSTUPCI

Fiksacija i priprema parafinskih rezova tkiva

Tkivo vrata maternice namijenjeno za histološku i histokemijsku analizu uronjeno je, neposredno nakon izolacije, u otopinu fiksativa (4 % paraformaldehid u 0,1M fosfatnom puferu). Nakon 24 sata uzorci su stavljeni na ispiranje pod tekućom vodom preko noći. Slijedila je dehidracija u uzlaznom nizu etanola (20 %, 50 %, 70 %, 96 %, 99 %, 100 %) u svakoj otopini 2 x 15 - 30 minuta. Potom su uzorci stavljeni u 100% ksilol na 5 – 15 minuta, zatim mješavinu ksilola i parafina (1:1) 5 - 15 minuta na 58 – 60 °C, te u 100 % parafin nekoliko sati na 56 °C uz tri izmjene parafina. Uzorci su zatim pomoću kalupa uklopljeni u parafinske blokove. Blokovi su rezani na rezove debljine 7 µm i stavljeni na predmetna stakalca. Takvi rezovi pohranjeni su na sobnu temperaturu.

Histološko bojanje hemalaunom i eozinom

Bojanje hemalaunom i eozinom upotrebljeno je radi prikazivanja i analize građe tkiva. Parafinski rezovi su se prije bojanja deparafinirali i rehidrirali uranjanjem u ksilol (2 x 5 minuta), silazni niz alkohola (2 x 100 %, 96 %, 70 %) i destiliranu vodu po 5 minuta. Zatim su uronjeni u otopinu hemalauna (1 g hematoksilina, $C_{16}H_{14}O_6$, 0,2 g natrij jodata, $NaIO_3$, 50 g kalij alauna, $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ i 50 g kloralhidrata $CCl_3CH(OH)_2$ ukuha se redom u 1 l destilirane vode, ohladi i profiltrira) 5 minuta, te isprani u destiliranoj vodi, običnoj vodi 10 minuta i opet u destiliranoj vodi. Nakon toga su stakalca s rezovima uronjena u 1 % vodenu otopinu eozina 1 minutu, te isprana destiliranom vodom i dehidrirana uzlaznim nizom alkohola (70 %, 96 %, 100 %). Nakon uranjanja po 5 minuta u mješavinu ksilola i alkohola (1:1), te dva puta u ksilol, rezovi su poklopljeni sredstvom za poklapanje Histomount (National diagnostic).

Histokemijska reakcija Astra modrilom

Histokemijskom reakcijom Astra modrilom plavom su bojom prikazani kiseli mukopolisaharidi koji se nalaze u vezivu i sluzi.

Parafinski rezovi su se prije bojanja deparafinirali i rehidrirali uranjanjem u ksilol (2 x 5 minuta), silazni niz alkohola (100 %, 96 %, 70 %) i destiliranu vodu po 5 minuta. Zatim su uronjeni u 1 – 2 % vodenu otopinu Astra modrila na 3 minute, te isprani u destiliranoj vodi. Nakon 10 minuta uranjanja u običnoj vodi, stakalca s rezovima su uronjena u otopinu boje Kernechtrot (0.5 g boje Kernechtrot umiješa se su 100 ml 5 % vodene otopine aluminijskoga sulfata $Al_2(SO_4)_3$, prokuha, ohladi i filtrira) na 5 - 10 minuta, te isprana destiliranom vodom i dehidrirana uzlaznim nizom alkohola (70 %, 96 %, 100 %). Nakon uranjanja po 5 minuta u mješavinu ksilola i alkohola (1:1), te dva puta u ksilol, rezovi su poklopljena sredstvom za poklapanje Histomount (National diagnostic)

Histokemijska reakcija PAS

Histokemijskom reakcijom PAS (Periodic acid Schiff) crvenom su bojom prikazani neutralni mukopolisaharidi, mono i polisaharidi, zatim amino-, N-acetilamino- i deoksi-saharidi, te sijalične kiseline.

Postupak bojanja bio je isti kao kod Astra modrila, samo što je umjesto otopine Astra modrila stavljen Schiffov reagens (1 g bazičnog fuksina ukuhati u 200 ml vode, ohladiti na 50 °C, dodati 20 ml 1M HCl, ohladiti na 25 °C, dodati 1 g Na metabisulfita, ostaviti na + 4 °C preko noći i dodati 2 g aktivnog ugljena). Stanične jezgre obojane su hemalaunom.

Imunohistokemija

Za određivanje prisutnosti i smještaja bjelančevina u tkivu upotrijebljena je metoda svjetlosne i fluorescentne imunohistokemije. Metoda se temelji na uporabi ciljno usmjerenih protutijela koristeći osnovni princip u imunologiji da određeno protutijelo veže i prepozna samo ciljni antigen. Parafinski rezovi su se prije bojanja deparafinirali i rehidrirali uranjanjem u ksilol (2 x 5 minuta), silazni niz alkohola (2 x 100 %, 96 %, 70 %) i destiliranu vodu po 5 minuta. Slijedio je postupak demaskiranja antigena koji se sastojao od zagrijavanja uzoraka 30 minuta na 95 °C u citratnom puferu (vodena otopina trinatrij citrat dihidrata s 0,05% Tween 20 (Sigma), pH6.0). Za svjetlosnu imunohistokemiju, rezovi su nakon ispiranja fosfatnim puferom sa soli (PBS), stavljeni na 15 minuta u 0,6%-tnu otopinu vodikovog peroksida (H_2O_2) u PBS-u kako bi se neutralizirale endogene peroksidaze koje i inače mogle davati lažnu pozitivnu reakciju. Rezovi su zatim permeabilizirani 5 minuta u otopini 0,2 % Triton X-100 (Sigma) u puferu PBS, te potom na 1 sat uronjeni u otopinu za blokiranje (7 % serum konja u puferu PBS s 0,25 % Triton X-100), kako bi se spriječilo nespecifično vezanje sekundarnog protutijela. Uslijedila je inkubacija s primarnim mišjim protutijelom protiv GABA_A receptora β (MAB341, Millipore), protiv GAD (ABN904, Millipore) i protiv VGAT (ab42939, Abcam) u otopini koja je sadržavala 2 % serum konja u puferu PBS sa 0,5 % Triton X-100. Inkubacija primarnim protutijelima odvijala se preko noći na 4 °C. Sljedeće jutro, nakon ispiranja puferom PBS uslijedila je inkubacija sa sekundarnim protutijelom (biotinilirano protutijelo

protiv mišjih protutijela, Vector Laboratories) u puferu PBS, 2 sata na sobnoj temperaturi. U nastavku, rezovi su se isprali puferom PBS, inkubirali 60 minuta u ABC kompleksu (Vector Laboratories), isprali ponovno puferom PBS, te razvili tijekom nekoliko minuta pomoću 3,3'-diamino benzidin tetrakloridom (SIGMAFAST™ DAB with Metal Enhancer, Sigma). Rezovi su se potom isprali vodom, dehidrirali uzlaznim nizom alkohola, proželi otopinom za prosvijetljivanje (Histoclear, National diagnostic) i pokrili sredstvom za poklapanje (Histomount, National diagnostic). Nakon sušenja, stakla s obojanim rezovima su se promatrala i analizirala svjetlosnim mikroskopom. Postupak za fluorescentnu imunohistokemiju razlikovao se od postupka za svjetlosnu imunohistokemiju na način da je preskočeno uranjanje u vodikov peroksid, sekundarno protutijelo nije bilo biotinilirano, već označeno fluorescentnim obilježivačem (Alexa Fluor 488, Thermo Fischer Scientific), te je u skladu s time umjesto seruma konja, korišten serum magarca, a i izostao je postupak inkubacije s ABC kompleksom i razvijanja boje s DAB-om. Umjesto toga, nakon ispiranja sekundarnog protutijela, stanične jezgre u tkivu su obojane fluorescentnom plavom bojom pomoću DAPI (4',6-diamidino-2-feilindol). Rezovi su potom dobro isprani destiliranom vodom i poklopljeni odgovarajućim sredstvom za poklapanje Fluoromount (DAKO).

4.4 STEREOLOGIJA I STATISTIKA

Stereološki postupak

Stereološki postupak primijenjen je za određivanje udjela površine neaktivnog žljezdanog epitela u ukupnoj površini žljezdanog epitela na rezovima tkiva vrata maternice. Aktivnom površinom smatrala se površina presjeka onih stanica u kojima je bila prisutna plava boja, Astra modrilom obojena sekretna zrnca s mucinima. Za taj postupak korišten je sustav koji se sastoji od MBFDV-46 digitalne kamere koja se nalazi na Olympus BX61 mikroskopu motoriziranom za kretanje u dubinu te motoriziranog stolića za pokretanje u x-y smjeru i koji je kontroliran MAC 5000 elektroničkim upravljačem (Ludl Electronic Products Ltd.). Za svaki uzorak tkiva odabrano je pet rezova tkiva histokemijski obojanih Astra modrilom. Na njima je pomoću računalnog programa Stereo Investigator (MicroBrightfield, Baltimore, MD) oko žljezdanog epitela ocrtana granica polja unutar kojeg je vršeno mjerenje. Program

je automatski to polje podijelio na kvadratna polja veličine 500 x 500 μm koja su poslužila kao „uzorci“ (engl. *sampling grid area*) na koje je program automatski postavljao „okvire za brojanje“ (engl. *counting frame*) veličine 250 x 250 μm . Ovisno o veličini površine ukupnog žljezdanog epitela na rezovima, broj polja „uzoraka“, odnosno broj „okvira za brojanje“ bio je između 46 i 224. Svaki okvir za brojanje bio je ispunjen pravilno raspoređenim točkama na međusobnoj udaljenosti od 35 μm . Točke koje su se nalazile na području aktivnog žljezdanog epitela označene su jednom bojom, a točke koje su se nalazile na području neaktivnog žljezdanog epitela označene su drugom bojom. Program je izračunao ukupan broj jednih i drugih točaka na svih pet izmjerenih preparata, te je konačan rezultat izražen kao udio neaktivnih točaka u ukupnom broju označenih točaka na svih pet preparata.

Statistička analiza

Brojčani podaci dobiveni stereološkim mjerenjem su statistički analizirani neparametrijskim Mann Whitney U testom i Hi kvadrat testom. Analizirani su sljedeći parametri: 1. Razlika u izmjerenoj aktivnosti žljezdanog epitela između skupina uzoraka P (proliferacija) i S (sekrecija). 2. Razlika u izmjerenoj aktivnosti žljezdanog epitela između gornjeg (bliže istmusu) i donjeg (bliže egzocerviksu) dijela endocerviksa svih ispitivanih uzoraka. 3. Razlika u izmjerenoj aktivnosti žljezdanog epitela između gornjeg i donjeg dijela endocerviksa unutar skupine P. 4. Razlika u izmjerenoj aktivnosti žljezdanog epitela između gornjeg i donjeg dijela endocerviksa unutar skupine S. 5. Razlika u izmjerenoj aktivnosti žljezdanog epitela između uzoraka s pozitivnom imunoreakcijom na GABA_AR i s negativnom reakcijom na GABA_AR . 6. Razlika u imunoreakciji na GABA_AR (pozitivna ili negativna) između skupina uzoraka P i S. 7. Razlika u imunoreakciji na GABA_AR (pozitivna ili negativna) između skupine uzoraka iz gornjeg i skupine uzoraka iz donjeg dijela endocerviksa. U svim analizama postavljena je nul-hipoteza da se dvije skupine ne razlikuju po ispitivanom parametru. Kritične vrijednosti za 5 % značajnosti preuzete su s internetske stranice <http://www.real-statistics.com/statistics-tables/>.

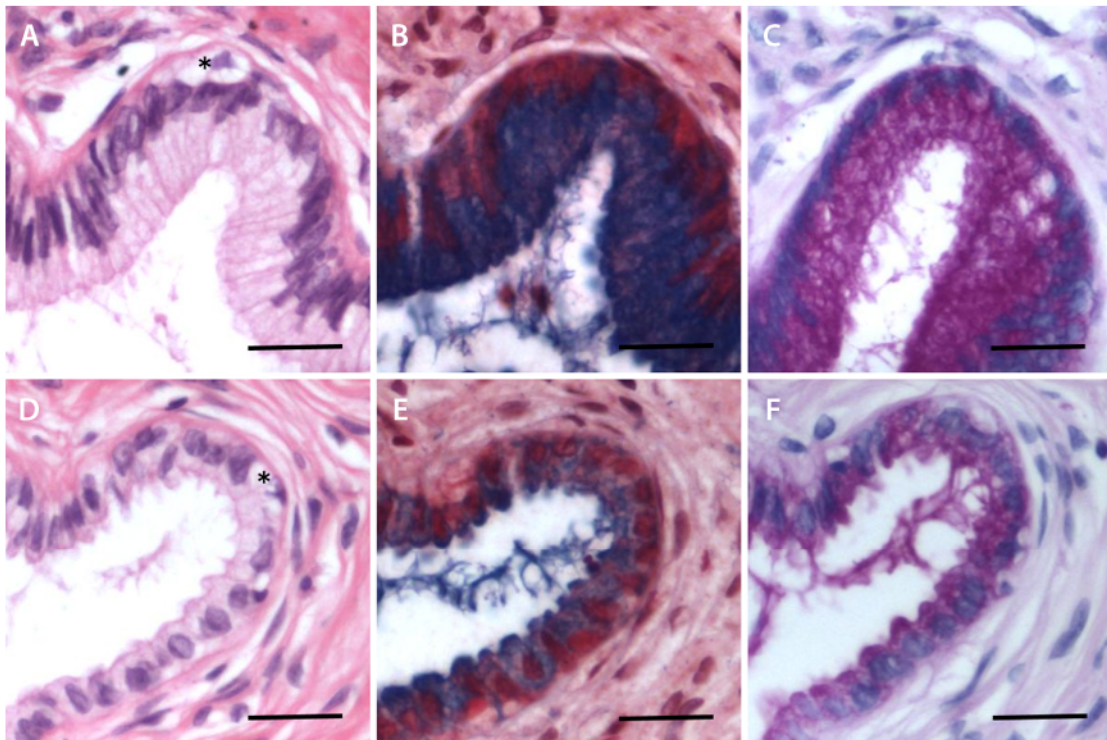
5. REZULTATI

5.1 GRAĐA I SEKRECIJSKA AKTIVNOST ENDOCERVICALNIH ŽLIJEZDA

Građa i sekrecijska aktivnost endocervikalnih žlijezda analizirana je na 27 uzoraka tkiva humanog endocerviksa uzetih od ukupno 25 pacijentica. Tkiva dvije pacijentice bila su podijeljena na gornji dio cerviksa (bliže istmusu) i donji dio cerviksa (bliže egzocerviksu). Tkiva ostalih pacijentica odnosila su se ili na područje bliže istmusu ili na područje bliže egzocerviksu.

Histološka građa endocervikalnih žlijezda prikazana je i analizirana na parafinskim rezovima debljine 5 μ m, obojanim histološkim bojama hemalaun i eozin. Budući da je istraživanje provedeno na uzorcima uklopljenima u parafin, sekrecijska aktivnost žlijezda nije se mogla procjenjivati na temelju mjerenja količine izlučene sluzi, već je kao kriterij aktivnosti sekrecijskog epitela bila količina mucina unutar stanica. Stoga je sekrecijska aktivnost žlijezda prikazana histokemijskim postupcima koji specifično prikazuju mucine unutar sekrecijskih stanica. Kako bi se histokemijskim bojanjem prikazali i neutralni i kiseli mukopolisaharidi (glikozaminoglikani), upotrebljena su dva postupka - bojanje Astra modrilom (AB) i prikazivanje šećernih komponenti Schiffovim reagensom s perjodatnom kiselinom (PAS).

Mikroskopijska analiza histokemijskim postupcima pripremljenih preparata tkiva endocerviksa i usporedba građe sekrecijskih stanica i površine obojane bojama specifičnim za mucine (PAS i AB) pokazala je da stanice koje sadrže više mucina imaju drugačiju građu od stanica s manje mucina (Slika 10). Stanice s više mucina bile su cilindričnog oblika s relativno velikim prostorom apikalno od jezgre, u kojem su se nalazila sekrecijska zrnca ispunjena mucinima. Jezgre tih stanica bile su izduljenog oblika i smještene bazalno. Stanice s malo ili ništa mucina bile su kubičnog oblika s okruglom jezgrom u sredini. I u aktivnom i manje aktivnom epitelu mogle su se uočiti male stanice kubičnog oblika smještene uz samu bazalnu laminu, koje nisu dosezale do lumena žlijezde. To su nediferencirane, matične stanice.



Slika 10. Mikrofotografije histoloških preparata endocervikalnih žlijezda obojanih hemalaunom i eozinom (A i D), Astra modrilom (B i E) i reakcijom PAS i hemalaunom (C i F). A - C. Presjeci kroz žljezdani epitel s jačom sekrecijskom aktivnošću. Unutar žljezdanih stanica cilindričnog oblika, apikalno od jezgre vidljiva su obilna sekrecijska zrnca ispunjena mucinima, obojena plavo Astra modrilom (B) i crveno PAS reakcijom (C). D - F. Presjeci kroz žljezdani epitel sa slabijom sekrecijskom aktivnošću. Stanice su niže (kubičnog oblika) i siromašnije sekrecijskim zrcima i mucinima. Na preparatima obojenim hemalaunom i eozinom vidljive su nediferencirane stanice uz bazalnu membranu žljezdanog epitela (označene su zvjezdicom). Crta mjerila: 20 μ m.

5.2 AKTIVNOST SEKRECIJSKOG EPITELA U TKIVIMA ENDOCERVIKSA MIJENJA SE S OBZIROM NA FAZU MENSTRUACIJSKOG CIKLUSA

5.2.1 Određivanje faze menstruacijskog ciklusa

Faza menstruacijskog ciklusa procijenjena je na temelju broja dana proteklih od datuma zadnje menstruacije do datuma operacijskog zahvata, te prosječne duljine menstruacijskog ciklusa navedene u anamnezi. Dobivena procjena potvrđena je ili korigirana uvidom u PHD nalaze pacijentica u kojima se navodi stanje endometrija i endocerviksa. Ova je korekcija bila posebno korisna u slučajevima starijih pacijentica s produženim menstruacijskim ciklusima, odnosno odgođenim ovulacijama.

Od 25 pacijentica čija su tkiva endocerviksa analizirana u ovom istraživanju, njih 15 bilo je u proliferacijskoj fazi, a preostalih 10 u sekrecijskoj fazi menstruacijskog ciklusa. Uzorci tkiva pacijentica u proliferacijskoj fazi označeni su oznakama P1 do P15, a uzorci pacijentica u sekrecijskoj fazi oznakama S1 do S10.

5.2.2 Tkivo endocerviksa u proliferacijskoj fazi menstruacijskog ciklusa ima veći udio aktivnog žljezdanog epitela od tkiva endocerviksa u sekrecijskoj fazi

Procjena udjela površine neaktivnih žlijezda u ukupnoj površini endocervikalnih žlijezda na histološkim preparatima provedena je stereološkom analizom parafinskih rezova obojanih histokemijskim bojanjem Astra modrilom, uz primjenu programa Stereo Investigator (Tablice 1 i 2). Dobiveni podaci statistički su obrađeni primjenom Mann Whitney U testa za neparametrijsku analizu malog broja uzoraka uz razinu značajnosti 95 %. Za navedenu analizu upotrijebljeno je po pet histoloških rezova debljine 5 μ za svaki uzorak tkiva. Rezultati ove analize odbacili su nul-hipotezu koja je glasila: između skupine P (proliferacijska faza) i S (sekrecijska faza) nema razlike u udjelu neaktivnog žljezdanog epitela u ukupnoj površini endocervikalnog sekrecijskog epitela (Tablica 3). Drugim riječima, ova je analiza pokazala da postoji razlika u sekrecijskoj aktivnosti endocervikalnog epitela s obzirom na fazu menstruacijskog ciklusa u kojem se nalazila pacijentica, te da tkivo endocerviksa u proliferacijskoj fazi menstruacijskog ciklusa ima veći udio aktivnog žljezdanog epitela od tkiva endocerviksa u sekrecijskoj fazi.

Tablica 1. Rezultati stereološke analize parafinskih rezova uzoraka iz skupine P obojanih Astra modrilom.

Uzorci skupine P	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11 e	P11i	P12	P13	P14	P15
Udio neaktivnih žlijezda u %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.62	0.11	1.06	0.00	0.45	0.00	2.16	0.59	0.65	0.00
Smještaj uzorka u endocerviksu	EX	IS	EX	EX	EX	EX	EX	EX	EX	IS	EX	IS	IS	EX	IS	EX

Tablica 2. Rezultati stereološke analize parafinskih rezova uzoraka iz skupine S obojanih Astra modrilom.

[illegible]

Tablica 3: Prikaz rezultata Mann Whitney U testa za ispitivanje razlike skupina P i S prema udjelu neaktivnih žlijezda.

Broj uzoraka u skupini P	Broj uzoraka u skupini S	Vrijednost U skupine P	Vrijednost U skupine S	Lijeva kritična vrijednost za 95 % značajnosti	Desna kritična vrijednost za 95 % značajnosti
16	11	137	39	47	129
Nul-hipoteza	Udio neaktivnih žlijezda ne razlikuje se u skupinama P i S.				
Rezultat:	Vrijednosti U skupina P i S su izvan kritičnih vrijednosti, pa se nul-hipoteza odbija, odnosno, skupine P i S razlikuju se prema udjelima neaktivnih žlijezda ($p=0,007804$).				

5.2.3 Nema razlike u udjelu aktivnog žljezdanog epitela između gornjeg i donjeg dijela endocerviksa

Od 27 uzoraka tkiva endocerviksa, 8 je bilo iz područja bliže istmusu (5 u skupini P i 3 u skupini S), a 19 iz područja bližem egzocerviksu (11 u skupini P i 8 u skupini S). Usporedbom aktivnosti žljezdanog epitela između skupine uzoraka tkiva bliže istmusu i skupine tkiva bliže egzocerviksu unutar svih ispitivanih skupina, kao i posebno unutar skupine P i skupine S Mann Whitney testom dobiveno je da se u bilo kojoj od navedenih ispitivanih skupina aktivnost žljezdanog epitela između gornjeg (bliže istmusu) i donjeg dijela endocerviksa (bliže egzocerviksu) ne razlikuje (Tablica 4). Dodatna mikroskopijska analiza dva para uzoraka dobivenih iz gornjeg i donjeg

dijela endocerviksa istih pacijentica (P11 i S1) potvrdila je da se ne može utvrditi postojanje razlike u aktivnosti žlijezda u gornjem i donjem dijelu endocervikalnog kanala.

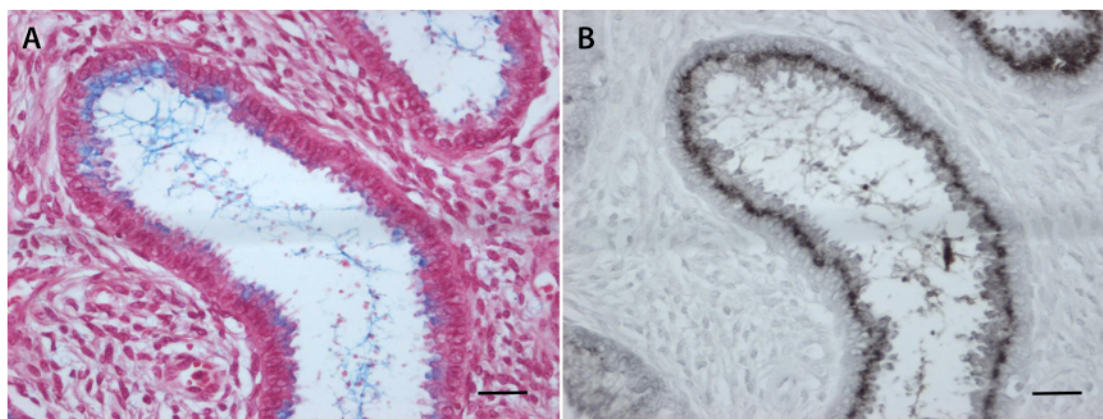
Tablica 4: Prikaz rezultata Mann Whitney U testa za ispitivanje razlike u udjelu neaktivnog žljezdanog epitela između gornjeg i donjeg dijela endocerviksa.

Skupina uzoraka	Broj uzoraka u gornjem dijelu endocerviksa	Broj uzoraka u donjem dijelu endocerviksa	Vrijednost U uzoraka u gornjem dijelu cerviksa	Vrijednost U uzoraka u donjem dijelu cerviksa	Lijeva kritična vrijednost za 95 % značajnosti	Desna kritična vrijednost za 95 % značajnosti
Svi uzorci (P+S)	8	19	74	78	38	114
Skupina P	5	11	26,5	28,5	9	46
Skupina S	3	8	9,5	14,5	2	22
Nul-hipoteza	Udio neaktivnih žlijezda ne razlikuje se u gornjem i donjem dijelu endocerviksa.					
Rezultat:	Za sve tri ispitivane skupine (P+S, P i S) vrijednosti U uzoraka u gornjem i donjem dijelu cerviksa su unutar kritičnih vrijednosti, pa se nul-hipoteza prihvaća, odnosno, gornji i donji dio endocerviksa ne razlikuju se prema udjelima neaktivnih žlijezda ($p_{(p+s)}=0,457712$, $p_{(p)}=0,454901$, $p_{(s)}=0,304917$)					

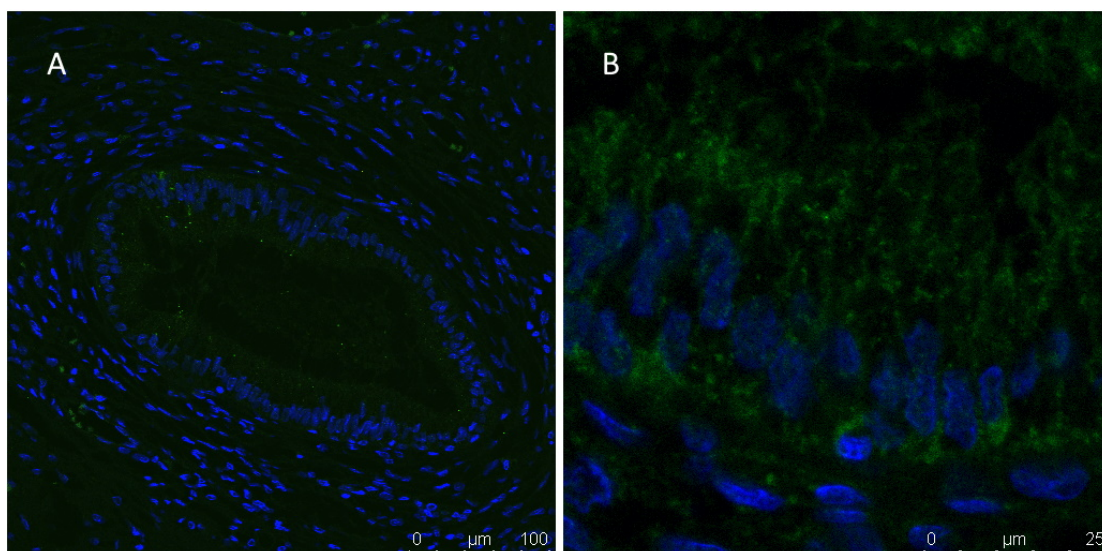
5.3 MOLEKULE SIGNALNOG PUTA GABA-E U TKIVU ENDOCERVIKSA

5.3.1 Prisutnost molekula GABA_AR, GAD i VGAT u endocerviksu

Kako bi se utvrdilo može li se pretpostaviti uloga signalnog puta GABA-e u regulaciji izlučivanja endocervikalne sluzi, u tkivima endocerviksa analizirana je prisutnost molekula tog signalnog puta. Kao reprezentativna molekula tog puta odabran je GABA_AR, te je imunohistokemijskim postupkom pokazana prisutnost te molekule u 10 od 23 analizirana uzorka endocerviksa (Slika 11; Tablica 5). Kako bi se pokazalo da izražaj GABA_AR prati izražaj ostalih molekula signalnog puta GABA-e, na dva uzorka pozitivna na GABA_AR provedena je svjetlosna imunohistokemijska reakcija s još dva protutijela: anti-GAD i anti-VGAT. Rezultat je bio vrlo slabo vidljiv, pa je postupak ponovljen s fluorescentno obilježenim sekundarnim porotutijelima. Promatrano konfokalnim mikroskopom rezultat ovih reakcija vidljiv je kao sitne fluorescentno zelene točkice unutar citoplazme žljezdanih stanica (Slika 12). Usporedba s kontrolnim uzorcima potvrdila je da se radi o pozitivnom rezultatu u obje reakcije.



Slika 11. Mikrofotografije histoloških preparata susjednih rezova endocervikalnog tkiva. **A.** Žljezdani epitel obojan Astra modrilom i bojom Kernechtrot. Astra modrilo obojalo je sekrecijska zrnca ispunjena mucinima u plavo. **B.** Rezultat svjetlosne imunohistokemije s anti-GABA_AR protutijelom. Prisutnost GABA_AR (talog crne boje) vidljiva je unutar stanica, apikalno od jegre, ispod sekrecijskih zrnaca s mucinima. Crta mjerila 20 µm.



Slika 12. Mikrofotografije histoloških preparata snimljene konfokalnim mikroskopom. A. Žljezdani epitel s fluorescentno zeleno obilježenim molekulama GAD (točkice u citoplazmi). Plavom bojom (DAPI) obojene su jezgre. Crta mjerila 100 μm . B. Žljezdani epitel s fluorescentno zeleno obilježenim molekulama VGAT (mrljice u citoplazmi ispod i iznad jezgre). Plavom bojom (DAPI) obojene su jezgre. Crta mjerila 100 μm .

5.3.2 Unutarstanični smještaj molekula signalnog puta GABA-e

Svjetlosnomikroskopska analiza preparata dobivenih imunohistokemijskim postupkom s diaminobenzidintetrakloridom (DAB; svjetlosna imunohistokemija) pokazala je smještaj GABA_AR unutar žljezdanih stanica apikalno od jezgre, neposredno uz jezgru. Usporedba s preparatima dobivenima histokemijskim bojanjem Astra modrilom upućuje na obilniji sadržaj GABA_AR u području ispod sekrecijskih mjehurića s mucinima (Slika 11). Lokalizacija molekula GAD i VGAT difuzno je raspršena po stanicama i nema tako specifičan smještaj (Slika 12).

5.3.3 Udio uzoraka s izraženim GABA_AR ne mijenja se ovisno o fazi menstrualnog ciklusa

Od ukupno 23 analizirana uzorka 10 ih je pokazalo pozitivnu reakciju na anti-GABA_AR protutijelo. 7 pozitivnih bilo je u skupini od 14 uzoraka od pacijentica u proliferacijskoj fazi ciklusa, a 3 pozitivna u skupini od 9 uzoraka u sekrecijskoj fazi ciklusa. Premda bi se moglo zaključiti da postoji trend češće pojave GABA_AR u

uzorcima iz skupine P, statistička analiza primjenom Hi-kvadrat testa uz 95%-tnu razinu značajnosti pokazala je da razlika u izražaju GABA_AR između P i S skupine ne postoji (Tablica 5).

Tablica 5: Prikaz rezultata Hi-kvadrat testa za ispitivanje razlike skupina P i S prema udjelu uzoraka s pozitivnom reakcijom na GABA_AR.

	Stvarni		Teorijski	
	Broj GABA _A R pozitivnih uzoraka	Broj GABA _A R negativnih uzoraka	Broj GABA _A R pozitivnih uzoraka	Broj GABA _A R negativnih uzoraka
Skupina P	7	7	6,09	7,91
Skupina S	3	6	3,91	5,09
Skupine P+S	10	13	10	13
Hi-kvadrat	0,62			
Kritična vrijednost (95 %)	3,84			
Nul-hipoteza:	Frekvencija pojavnosti GABA _A R pozitivnih uzoraka ne razlikuje se u skupinama P i S.			
Zaključak:	Vrijednost Hi-kvadrat ne prelazi 95%-tnu kritičnu vrijednost, pa se prihvaća nul-hipoteza, odnosno, u skupinama P i S ne razlikuje se frekvencija pojavnosti GABA_AR pozitivnih uzoraka ($p = 0.431047$).			

5.3.4 Udio uzoraka s izraženim GABA_AR veći je u gornjem dijelu vrata maternice

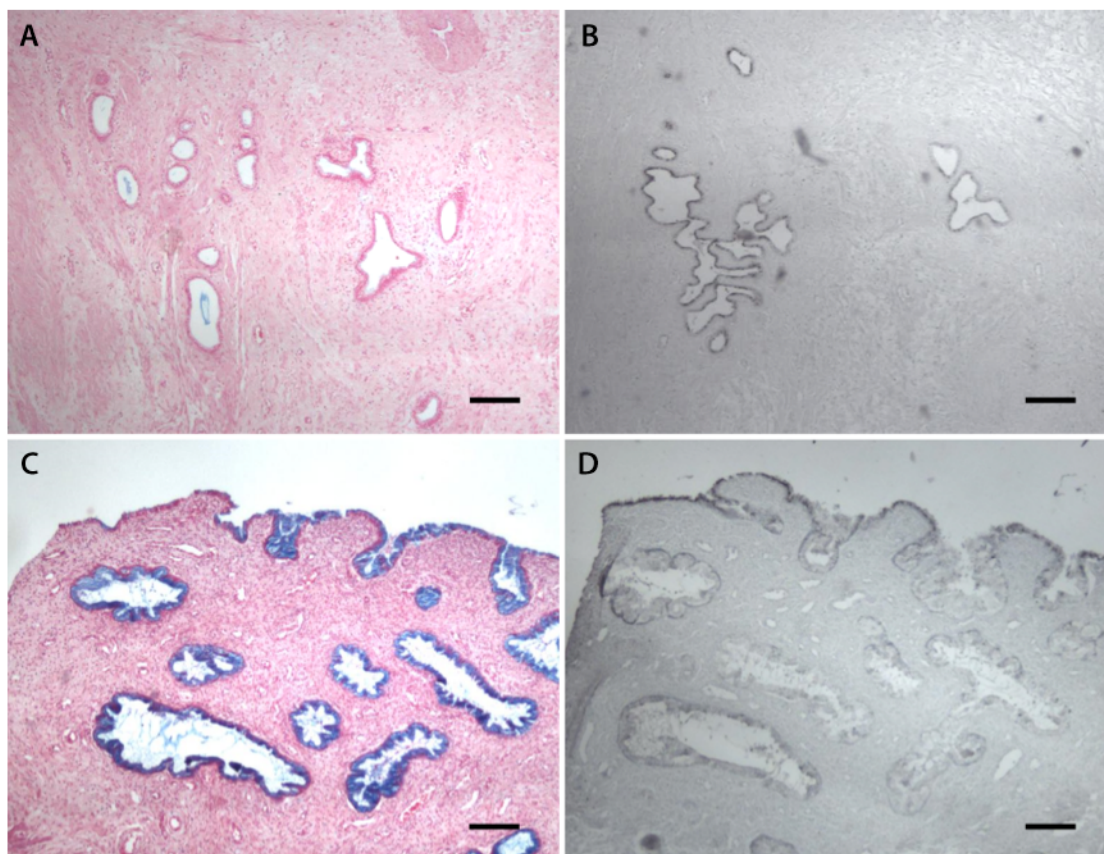
Statističkom analizom pojavnosti GABA_AR pozitivnih uzoraka u gornjem i donjem dijelu endocerviksa pokazano je, uz primjenu 95%-tne razine značajnosti, da je frekvencija pojavnosti uzoraka s pozitivnom imunoreakcijom na anti-GABA_AR protutijelo veća u gornjem nego donjem dijelu vrata maternice (bliže istmusu) (Tablica 6).

Tablica 6: Prikaz rezultata Hi-kvadrat testa za ispitivanje razlike gornjeg i donjeg dijela endocerviksa prema udjelu uzoraka s pozitivnom reakcijom na GABA_AR.

	Stvarni		Teorijski	
	Broj GABA _A R pozitivnih uzoraka	Broj GABA _A R negativnih uzoraka	Broj GABA _A R pozitivnih uzoraka	Broj GABA _A R negativnih uzoraka
Gornji dio	4	1	6,09	7,91
Donji dio	6	12	3,91	5,09
Gornji i donji dio	10	13	10	13
Hi-kvadrat	5,40			
Kritična vrijednost (95 %)	3,84			
Nul-hipoteza:	Frekvencija pojavnosti GABA _A R pozitivnih uzoraka ne razlikuje se u gornjem i donjem dijelu endocerviksa.			
Zaključak:	Vrijednost Hi-kvadrat prelazi 95%-tnu kritičnu vrijednost, pa se odbija nul-hipoteza, odnosno, frekvencija pojavnosti GABA_AR pozitivnih uzoraka veća je u gornjem dijelu cerviksa (p=0.020137).			

5.3.5 GABA_AR je izražen u epitelu sa slabom sekrecijskom aktivnošću

Mikroskopijska analiza tkiva na rezovima obojanim Astra modrilom i rezovima s imunohistokemijskom reakcijom na anti GABA_AR protutijelo pokazalo je da je GABA_AR izražen uglavnom u epitelu sa slabijom ili nikakvom sekrecijskom aktivnošću (Slika 13). Obrnuto, presjeci kroz područja endocervikalnih kripti s jačom proizvodnjom mucina, pokazuju slabu ili nikakvu prisutnost GABA_A receptora. Kako stereološkim mjerenjem nije obuhvaćeno stupnjevanje aktivnosti žljezdanog epitela, već samo razlikovanje aktivnog i neaktivnog epitela, ovaj nalaz nije bilo moguće potvrditi statističkom analizom.



Slika 13:

Slika 13. Mikrofotografije histoloških preparata susjednih rezova endocervikalnog tkiva. **A i C.** Žljezdani epitel obojan Astra modrilom (sekrecijska zrnca s mucinima) i bojom Kernechtrot (stanične jezgre). **B i D.** Rezultat svjetlosne imunohistokemije s anti-GABA_AR protutijelom. Žljezdani epitel sa slabijom sekrecijskom aktivnošću (manje plavo obojanih sekrecijskih zrnaca) pokazuje jaču imunohistokemijsku reakciju s anti-GABA_AR protutijelom (**A i B**), dok žljezdani epitel s jačom sekrecijskom aktivnošću (više plavo obojanih sekrecijskih zrnaca) pokazuje slabiju imunohistokemijsku reakciju s anti-GABA_AR protutijelom (**C i D**). Crta mjerila 100 μm.

6. RASPRAVA

Ovim istraživanjem je na uzorcima tkiva vrata maternice dobivenima nakon operacijskog zahvata uklanjanja maternice (histerektomija) pokazano da su u žljezdanom epitelu endocerviksa prisutne molekule GABA-ergičkog signalnog puta. Taj je nalaz značajan zato što ukazuje na moguću ulogu GABA-e u regulaciji izlučivanja endocervikalne sluzi. Ta je pretpostavka nastala na temelju rezultata istraživanja regulacije proizvodnje i izlučivanja sluzi u dišnim putevima koji su pokazali da postoji povezanost aktivnosti GABA-e i stvaranja sluzi (96). Istraživanja neurona koji otpuštaju gonadotropine otkrila su da estrogeni mogu mijenjati djelovanje GABA-e u tim neuronima (99), pa je na temelju toga postavljena hipoteza o mogućoj posredničkoj ulozi GABA-ergičkog signalnog puta u hormonskoj regulaciji izlučivanja sluzi. Cilj ovog istraživanja bio je provjeriti ovu hipotezu i time otvoriti put istraživanjima konkretne uloge GABA-ergičkog puta u hormonskoj regulaciji izlučivanja endocervikalne sluzi.

6.1 UZORCI TKIVA VRATA MATERNICE UKLOPLJENI U PARAFIN ODGOVARAJUĆI SU MODEL ZA PROVJERU HIPOTEZE O ULOZI SIGNALNOG PUTA GABA-E U REGULACIJI IZLUČIVANJA SLUZI

Istraživanje na uzorcima humanog tkiva uklopljenog u parafin ima ograničen doseg zbog nemogućnosti određivanja korelacije između razine hormona i izlučivanja sluzi, kao i nemogućnosti preciznog mjerenja aktivnosti žljezdanog epitela i njene dinamike unutar menstrualnog ciklusa. Takva su istraživanja moguća na drugačijim modelima, kao što su eksperimentalne životinje, kultura stanica ili pak svježi humani materijal uz prateću analizu hormonskog statusa pacijentica u trenutku uzorkovanja tkiva. Međutim, ta su istraživanja i materijalno i vremenski zahtjevnija, te je preporučljivo prije poduzimanja takvih istraživanja testirati hipotezu na što jednostavnijem i što dostupnijem modelu. Uzorci na kojima je provedeno ovo istraživanje dobiveni su tijekom redovitih zahvata histerektomije na Klinici za ženske bolesti i porode u Kliničkoj bolnici Merkur te su uklopljeni u parafin standardnim postupcima na Zavodu za patologiju iste bolnice, što je značajno utjecalo na smanjenje troškova i vremena potrebnog za istraživanje.

Prije nego što se pristupilo provjeravanju hipoteze o ulozi signalnog puta GABA-e u hormonskoj regulaciji izlučivanja endocervikalne sluzi, bilo je potrebno potvrditi da na ovaj način sakupljeni uzorci humanog tkiva vrata maternice mogu poslužiti za takvo istraživanje. Stoga je bilo potrebno provjeriti pokazuju li ti uzorci tipičnu građu žljezdanog epitela koji izlučuje sluz i mijenja li se njihova sekrecijska aktivnost s obzirom na fazu menstruacijskog ciklusa. Ovo istraživanje potvrdilo je da uzorci tkiva pacijentica u proliferacijskoj fazi menstruacijskog ciklusa pokazuju veću sekrecijsku aktivnost žljezdanog epitela od uzoraka tkiva pacijentica u sekrecijskoj fazi, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (15, 19, 20). Ta je razlika u aktivnosti žljezdanog epitela u različitim fazama ciklusa dokazana neparametrijskim Mann Whitney U testom, što dakako nije dovoljno jak statistički argument za nedvojbeno dokazivanje takvih ovisnosti, ali je dovoljno da bi se ovaj model prihvatio za nastavak ovog istraživanja.

Kako bi se utvrdilo koji je dio vrata maternice optimalan za nastavak istraživanja, analizirana je razlika u aktivnosti žljezdanog epitela u gornjem i donjem dijelu cervikalnog kanala. Statističkom analizom utvrđeno je da ta razlika ne postoji, pa je istraživanje nastavljeno na uzorcima tkiva iz oba područja vrata maternice.

6.2 MOLEKULE SIGNALNOG PUTA GABA-E PRISUTNE SU U ŽLJEZDANOM EPITELU VRATA MATERNICE, ALI NE POSTOJI KORELACIJA NJIHOVOG IZRAŽAJA S FAZOM MENSTRUACIJSKOG CIKLUSA NITI SA SEKRECIJSKOM AKTIVNOŠĆU TOG EPITELA

U nastavku istraživanja, primjenom ovog modela potraženi su odgovori na pitanja jesu li u žljezdanom epitelu prisutne molekule signalnog puta GABA-e, gdje su one točno smještene, te postoji li korelacija s fazom menstruacijskog ciklusa i aktivnošću žljezdanog epitela. Odgovori na ta pitanja mogli bi rasvijetliti dio mehanizma djelovanja GABA-ergičkog sustava na izlučivanje sluzi. Naime, ako bi postojala korelacija izražaja tih molekula s fazom menstruacijskog ciklusa, moglo bi se pretpostaviti da je djelovanje GABA-ergičkog sustava modulirano cikličkim hormonima, kao što je to slučaj s estrogenom i GABA-ergičkog sustava u neuronima koji izlučuju gonadotropne hormone (75). Također, ako bi se pokazala korelacija izražaja tih molekula s aktivnošću žljezdanog epitela, hipoteza o sudjelovanju GABA-

e u regulaciji izlučivanja sluzi bila bi opravdana i moglo bi se pristupiti nastavku istraživanja o toj regulaciji.

Imunohistokemijska analiza tkiva vrata maternice pokazala je da su molekule signalnog puta GABA-e prisutne u žljezdanom epitelu vrata maternice u više od polovice ispitivanih uzoraka. Ipak, statistička analiza nije pokazala postojanje korelacije njihova izražaja s fazom menstrualnog ciklusa niti sa sekrecijskom aktivnošću tog epitela. Prisutnost ovih molekula u tkivu vrata maternice može se smatrati vjerodostojnim rezultatom, jer je imunohistokemijska reakcija ponovljena više puta na različitim uzorcima uz sve odgovarajuće kontrole. Osim toga, kasnija istraživanja na drugim uzorcima primjenom fluorescentne imunohistokemije potvrdili su ovaj rezultat (71).

Rezultati stereološke i statističke korelacijske analize mogu se uzeti s odgovarajućom rezervom zbog niza čimbenika. Prije svega, relativno malen broj sakupljenih i analiziranih uzoraka onemogućio je ozbiljniju statističku analizu, te su jedine metode izbora bili neparametrijski statistički testovi za manji broj uzoraka. Također, način uzorkovanja koji je bio podređen standardnim postupcima Klinike bolnice Merkur, relativno malen dio ukupnog vrata maternice koji je bio dostupan za istraživanje, te izvanredna tvrdoća tkiva vrata maternice onemogućili su odabir rezova za stereološku analizu u skladu sa zadanim protokolom, pa su analizirani oni rezovi tkiva koji su uspješno narezani, sa sačuvanom morfologijom cijele rezane površine. Izbor postupka za određivanje aktivnosti žljezdanog epitela također je rezultat brojnih ograničenja, kao što je rad s fiksiranim materijalom uklopljenim u parafin u kojemu je sluz u lumenu žlijezda isprana, pa je bilo nemoguće pratiti količinu već izlučene sluzi, zatim nemogućnost praćenja izlučivanja sluzi u vremenu, jer je materijal uzet u jednom trenutku, te svođenje stvarnog volumena sekrecijskih mjehurića sa sluzi u stanicama na ono što se moglo promatrati i mjeriti - udio površine žljezdanog epitela koji je obojen alcijanskim modrilom, bojom specifičnom za mucine. Manjkavosti ovog modela istraživanja svakako je pridonijela i činjenica da je reproduktivna dob pacijentica bila relativno visoka, zbog jednostavne činjenice što se zahvat vađenja cijele maternice nastoji izbjegavati kod mlađih žena koje bi još mogle i htjele rađati.

Unatoč svim nedostacima odabranih uzoraka tkiva i postupaka stereološke i statističke analize, iz ovog istraživanja mogu se izvesti dva temeljna zaključka. Prvi je da molekule GABA-ergičkog sustava postoje u tkivu vrata maternice i da taj sustav vjerojatno ima neku ulogu u regulaciji aktivnosti žljezdanog epitela, ali ta uloga nije dovoljno snažno povezana s djelovanjem spolnih hormona, niti sa stvaranjem sekrecijskih zrnaca s mucinima u žljezdanom epitelu da bi to bilo očigledno već na ovom, jednostavnom modelu fiksiranog humanog tkiva uklopljenog u parafin. Drugi je zaključak da je za postizanje definitivnog zaključka o nepostojanju korelacije između GABA-ergičkog sustava i djelovanja hormona te između GABA-ergičkog sustava i aktivnosti žlijezda potreban „jači“ model koji bi uključivao veći broj uzoraka, mjerenje hormonskog statusa pacijentica u trenutku uzorkovanja tkiva i uzimanje svježeg materijala kako bi se, pored imunohistokemijske analize tkiva, izražaj molekula mogao provjeriti i na razini transkripcije, analizom mRNA tih molekula. Istraživanje humanog tkiva vrata maternice nastavljeno je na opisan način, no taj je dio istraživanja izvan opsega ove disertacije.

6.3 MOGUĆA ULOGA GABA-ERGIČKOG SUSTAVA U ŽLJEZDANOM TKIVU VRATA MATERNICE

Činjenica da je više od jedne molekule signalnog puta GABA-e prisutno u tkivu vrata maternice, štoviše, unutar žljezdanog epitela endocervikalnih kripti govori u prilog funkcionalne uloge tog sustava u aktivnosti endocervikalnog žljezdanog epitela. Premda rezultati ovog istraživanja ne govore u prilog utjecaja GABA-ergičkog sustava na stvaranje i izlučivanje sluzi, ta mogućnost nije isključena, tj. trebalo bi je dokazati ili opozvati sustavnom statističkom analizom ili funkcionalnim testovima na kulturi stanica. Na isti način nije u potpunosti isključena ni korelacija aktivnosti GABA-ergičkog sustava i razine spolnih hormona. Stoga, predloženi model sudjelovanja GABA-e u hormonskoj regulaciji otpuštanja sekrecijskih mjehurića sa sluzi još uvijek vrijedi dodatno provjeriti i istražiti.

Prisutnost GABA_AR u stanicama s manjom količinom mucina u sekrecijskim zrcima ukazuje na mogućnost da GABA sudjeluje tek u ranoj fazi stvaranja sluzi, kada je razina estrogena u krvi niska, pa je stoga teško i odrediti korelaciju s razinom estrogena, odnosno fazom menstruacijskog ciklusa. Ovaj model sudjelovanja GABA-e u aktivnosti žljezdanog epitela odnosio bi se na regulaciju same proizvodnje mucina

i njihova nakupljanja u sekrecijskim zrnima, kao što je opisano i u dišnom epitelu (72).

Mala količina mucina u žljezdanim stanicama može biti i rezultat netom završenog procesa izbacivanja sluzi, pri čemu bi $GABA_A$ receptor mogao imati ulogu u hidrataciji mucina (49). Naime, $GABA_A$ R je zapravo ionski kanal koji propušta ione klora iz stanica u lumen žlijezde čime mijenja ionski sastav na apikalnoj površini epitela i smanjuje kiselost okoline. Smanjena kiselost omogućila bi mucinima da se rašire, vežu na sebe više molekula vode i tako pridonesu nastanku manje viskozne sluzi. Moguće je da su upravo već spomenuta zrnca koja sliče egzosomima dio tog mehanizma širenja i hidratacije mucina (46 - 48).

Bilo koji predloženi model djelovanja GABA-ergičkog sustava u žljezdanom epitelu endocerviksa dovoljno je zanimljiv i nov, te možemo zaključiti da bi bilo vrijedno nastaviti istraživanje uloge GABA-e u vratu maternice.

7. ZAKLJUČCI

1. Žlijezde s aktivnom sekrecijom razlikuju se od neaktivnih žlijezda po visini epitela i sadržaju sluzi.
2. Tkivo endocerviksa u proliferacijskoj fazi menstrualnog ciklusa ima veći udio aktivnog žljezdanog epitela od tkiva endocerviksa u sekrecijskoj fazi.
3. Nema razlike u udjelu aktivnog žljezdanog epitela u području endocerviksa bliže istmusu i području bliže egzocerviksu.
4. Molekule GABA_AR, GAD i VGAT prisutne su u žljezdanom epitelu vrata maternice.
5. GABA_AR je smješten unutar apikalno od jezgre žljezdanih stanica, ispod nakupine sekrecijskih mjehurića, a GAD i VGAT su difuzno raspršeni po žljezdanim stanicama.
6. Udio uzoraka s izraženim GABA_AR ne mijenja se ovisno o fazi menstrualnog ciklusa.
7. Udio uzoraka s izraženim GABA_AR veći je u gornjem dijelu endocerviksa.
8. GABA_AR je izražen u epitelu sa slabom sekrecijskom aktivnošću.
9. Prisutnost molekula signalnog puta GABA-e upućuje na aktivnu ulogu GABA-e u regulaciji aktivnosti žljezdanog epitela.
10. Hipoteza o sudjelovanju GABA-e u hormonskoj regulaciji otpuštanja sekrecijskih mjehurića sa sluzi nije potvrđena, ali nije niti isključena.
11. Ostale pretpostavljene uloge GABA-e u žljezdanom epitelu endocerviksa su regulacija proizvodnje i nakupljanja mucina u sekrecijskim zrnima slično kao u dišnom epitelu, te regulacija ionskog sastava na apikalnoj površini žljezdanog epitela, čime se regulira hidratacija i oslobađanje sluzi različite viskoznosti.

8. SAŽETAK

Vrat maternice važan je čimbenik plodnosti i reproduktivnog zdravlja žene. Nabori u sluznici cervikalnog kanala, tzv. endocervikalne kripe ili endocervikalne žlijezde, proizvode cervikalnu sluz. Po svom biokemijskom sastavu cervikalna sluz je glikoproteinski gel. Njegova proizvodnja hormonski je regulirana, o čemu ovise njegova biokemijska i biofizička svojstva. Cervikalna sluz osim zaštitne funkcije ima važnu ulogu i u plodnosti jer prihvaća, hrani i čuva spermije te im pomaže u prijenosu do jajne stanice kako bi došlo do oplodnje. Mehanizam stanične regulacije proizvodnje sluzi različitih svojstava, te njihova otpuštanja u lumen vrata maternice tek je djelomično poznat.

Cilj ovog istraživanja bio je razjasniti dio mehanizma sekrecije cervikalne sluzi vodeći se predloženim modelom sudjelovanja neurotransmitera GABA u hormonskoj regulaciji izlučivanja sluzi. Istraživanje je provedeno na fiksiranim uzorcima tkiva vrata maternice dobivenih nakon histerektomije (operacijskog zahvata uklanjanja maternice).

Najvažniji rezultati ovog istraživanja pokazuju prisutnost molekula GABA-ergičkog signalnog puta u žljezdanom epitelu tkiva vrata maternice. Rezultatima je utvrđeno da prisutnost receptora A za neurotransmiter GABA ne korelira s fazom ciklusa u kojemu je bila pacijentica u trenutku uzorkovanja. Analizom rezultata istraživanja pokazalo se također da je prisutnost receptora A za neurotransmiter GABA češći u gornjem dijelu endocerviksa nego u donjem. Ovi rezultati svakako pridonose raspravi o ulozi signalnog puta GABA-e u izlučivanju sluzi. Fiksirani uzorci tkiva vrata maternice dobiveni nakon histerektomije pristupačan su i dobar model za preliminarno ispitivanje hipotetskih prijedloga o mehanizmu regulacije stvaranja i izlučivanja endocervikalne sluzi, ali ne i za donošenje definitivnog zaključka o predloženim hipotezama.

9. SUMMARY

The role of GABA neurotransmitter in the regulation of endocervical mucus secretion

The cervix is an important factor in a woman's fertility and reproductive health. The folds in the mucosa of the cervical canal, the so-called endocervical crypts or endocervical glands, produce cervical mucus. By its biochemical composition, cervical mucus is a glycoprotein gel. Its production is hormonally regulated, which depends on its biochemical and biophysical characteristics. Cervical mucus, in addition to its protective function, plays an important role in fertility as it accepts, nourishes and protects sperm and helps transfer it to the ovum for fertilization. The mechanism of cellular regulation of mucus production of different properties, and their release into the lumen of the cervix, is only partially known.

The aim of this study was to elucidate part of the mechanism of cervical mucus secretion, guided by the proposed model of the involvement of the neurotransmitter GABA in the hormonal regulation of mucus secretion. The study was performed on fixed samples of cervical tissue obtained after hysterectomy, (surgical removal of the uterus).

The most important results of this study show the presence of a GABA-ergic signaling pathway molecules in the glandular epithelium of cervical tissue. The results established that the presence of receptor A for the neurotransmitter GABA did not correlate with the phase of the patient's cycle at the time of sampling. Analysis of the results of the study also showed that the presence of receptor A for the neurotransmitter GABA is more common in the upper endocervix than in the lower one. These results certainly contribute to the debate about the role of the GABA signaling pathway in mucus secretion. Fixed cervical tissue samples obtained after hysterectomy are an affordable and good model for preliminary examination of hypothetical proposals for the mechanism of regulation of endocervical mucus formation and secretion, but not for reaching a definitive conclusion on the proposed hypotheses.

10. LITERATURA

1. Mascarenhas, M. N.; Flaxman, S. R.; Boerma, T.; Vanderpoel, S.; Stevens G. A. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLOS Med.* 2012;9(12):e1001356
2. Šimunić, V & sur. Ženski spolni organi. Ginekologija, Naklada Ljevak, Zagreb, 2001; str.1-10
3. Šimunić, V & sur. Menstruacijski ciklus. Ginekologija, Naklada Ljevak, Zagreb, 2001; str. 30-60
4. Leppert, P. C.; Yu, S. Y. Three-dimensional structures of uterine elastic fibers: scanning electron microscopic studies. *Connect Tissue Res.* 1991;27(1):15–31.
5. Fluhmann, C. F. Focal Hyperplasia (Tunnel Clusters) of the Cervix Uteri. *Obstet Gynecol.* veljača 1961;17(2):206.
6. Moghissi, K. S. The Function of the Cervix in Fertility. *Fertil Steril.* 1972;23(4):295–306.
7. Odeblad, E. The functional structure of human cervical mucus. *Acta Obstet Gynecol Scand* 47, 57-79 (1968)
8. Katz, D. F.; Slade, D. A.; Nakajima S. T. Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Adv Contracept* 13, 143-51 (1997)
9. Elstein, M.; Ferrer, K. The effect of a copper-releasing intrauterine device on sperm penetration in human cervical mucus *in vitro*. *J Reprod Fertil* 32, 109-11 (1973)
10. Odeblad, E. Undulations of macromolecules in cervical mucus. *Int J Fertil* 7, 313-9 (1962)
11. Gipson, I. K. Mucins of the human endocervix. *Front Biosci* 6, D1245-55 (2001)
12. Yurewicz, E. C. K.; Moghissi, K. S. Purification of human midcycle cervical mucin and characterization of its oligosaccharides with respect to

- size, composition, and microheterogeneity. *J Biol Chem* 256, 11895-904 (1981)
13. Carlstedt, I.; Lindgren, H.; Sheehan, J. K.; Ulmsten, U.; Wingerup, L. Isolation and characterization of human cervical-mucus glycoproteins. *Biochem J* 211, 13-22 (1983)
 14. Sheehan, J. K.; Carlstedt, I. Hydrodynamic properties of human cervical-mucus glycoproteins in 6M-guanidinium chloride. *Biochem J* 217, 93-101 (1984)
 15. Viergiver, E.; Pommerenke W. T. Cyclic variations in the viscosity of cervical mucus and its correlation with amount of secretion and basal temperature. *Am J Obstet Gynecol* 51, 192-200 (1946)
 16. Katz, D. F. Human cervical mucus: research update. *Am J Obstet Gynecol* 165, 1984-6 (1991)
 17. Brown, J. B.; Harrisson, P.; Smith, M. A. A study of returning fertility after childbirth and during lactation by measurement of urinary oestrogen and pregnanediol excretion and cervical mucus production. *J Biosoc Sci Suppl* 9, 5-23 (1985)
 18. Odeblad, E. Investigations on the physiological basis for fertility awareness. *Bulletin of the OMR RCA* (2002)
 19. Gipson, I. K.; Spurr-Michaud, S.; Moccia, R.; Zhan, Q; Toribara, N.; Ho, S. B.; Gargiulo, A. R.; Hill, J. A. 3rd: MUC4 and MUC5B transcripts are the prevalent mucin messenger ribonucleic acids of the human endocervix. *Biol Reprod* 60, 58-64 (1999)
 20. Gipson, I. K.; Moccia, R.; Spurr-Michaud, S.; Argueso, P.; Gargiulo, A. R.; Hill, J. A.; Offner, G. D.; Keutmann, H. T. The Amount of MUC5B mucin in cervical mucus peaks at midcycle. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 594-600 (2001)
 21. Gilks, C. B.; Reid, P. E.; Clement, P. B.; Owen, D. A. Histochemical changes in cervical mucus-secreting epithelium during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 51, 286-91 (1989)
 22. Kopito, L. E.; Kosasky, H. J.; Sturgis, S. H.; Lieberman, B. L.; Shwachman, H. Water and electrolytes in human cervical mucus. *Fertil Steril* 24, 499-506 (1973)

23. Andersch-Bjorkman, Y.; Thomsson, K. A.; Holmen Larsson, J. M.; Ekerhovd, E.; Hansson, G. C. Large scale identification of proteins, mucins, and their O-glycosylation in the endocervical mucus during the menstrual cycle. *Mol Cell Proteomics* 6, 708-16 (2007)
24. Yudin, A. I.; Hanson, F. W.; Katz, D. F. Human cervical mucus and its interaction with sperm: a fine-structural view. *Biol Reprod* 40, 661-71 (1989)
25. Moghissi, K. S.; Syner, F. N.; McBride, L. C. Contraceptive mechanism of microdose norethindrone. *Obstet Gynecol* 41, 585-94 (1973)
26. De Jonge, C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11, 205-14 (2005)
27. Ragni, G.; Di Pietro, R.; Bestetti, O.; De Lauretis, L.; Olivares, D.; Guercilena, S. Morphological selection of human spermatozoa in cervical mucus "in vivo". *Andrologia* 17, 508-12 (1985)
28. Zinaman, M.; Drobnis, E. Z.; Morales, P.; Brazil, C.; Kiel, M.; Cross, N. L.; Hanson, F. W.; Overstreet, J. W. The physiology of sperm recovered from the human cervix: acrosomal status and response to inducers of the acrosome reaction. *Biol Reprod* 41, 790-7 (1989)
29. Stephen, E. H.; Chandra, A. Updated projections of infertility in the United States: 1995–2025. *Fertil Steril.* 1998;70:30–34.
30. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, authors. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril.* 2006;86 (5 suppl):S111–S114.
31. Ulcova-Gallova, Z. Immunological and physicochemical properties of cervical ovulatory mucus. *J Reprod Immunol* 86 (2); 115-21 (2010)
32. Eggert-Kruse, W.; Botz, I.; Pohl, S.; Rohr, G.; Strowitzki, T. Antimicrobial activity of human cervical mucus. *Hum Reprod* 15, 778-84 (2000)
33. Fehring, R. J. Accuracy of the peak day of cervical mucus as a biological marker of fertility. *Contraception* 66, 231-5 (2002)
34. Bigelow, J. L.; Dunson, D. B.; Stanford, J. B.; Ecochard, R.; Gnoth, C.; Colombo, B. Mucus observations in the fertile window: a better predictor of conception than timing of intercourse. *Hum Reprod* 19, 889-92 (2004)

35. Scarpa, B.; Dunson, D. B.; Colombo, B. Cervical mucus secretions on the day of intercourse: an accurate marker of highly fertile days. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 125, 72-8 (2006)
36. Pyper, C. M. Fertility awareness and natural family planning. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2, 131-46 (1997)
37. Vigil, P.; Ceric, F.; Cortes, M. E.; Klaus, H. Usefulness of monitoring fertility from menarche. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 19, 173-9 (2006)
38. Vigil, P.; Cortes, M. E.; Zuniga, A.; Riquelme, J.; Ceric, F. Scanning electron and light microscopy study of the cervical mucus in women with polycystic ovary syndrome. *J Electron Microsc (Tokyo)* 58, 21-7 (2009)
39. Carmichael, R.; Jeaffreson, D.L. Basal cell in the epithelium of the human cervical canal. *J Pathol Bact* 49, 63 (1939)
40. Verdugo, P. Goblet cells secretion and mucogenesis. *Annu Rev Physiol* 52, 157-76 (1990)
41. Domino, S. E.; Hurd, E. A. LacZ expression in Fut2-LacZ reporter mice reveals estrogen-regulated endocervical glandular expression during estrous cycle, hormone replacement, and pregnancy. *Glycobiology* 14, 169-75 (2004)
42. Odeblad, E. The physics of the cervical mucus. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 38, 44-58 (1959)
43. Rudolfsson, C. Nuclear magnetic resonance and cytometric studies on mucus from single cervical glands. *Int J Fertil* 16, 147-50 (1971)
44. Menarguez, M.; Pastor, L. M.; Odeblad, E. Morphological characterization of different human cervical mucus types using light and scanning electron microscopy. *Hum Reprod* 18, 1782-9 (2003)
45. Perez-Vilar, J. H. Mucin Family of Glycoproteins. In: Encyclopedia of Biological Chemistry, Sect 2, 758-764. Eds: Lennarz, Lane Oxford (2004)
46. Flori, F.; Secciani, F.; Capone, A.; Paccagnini, E.; Caruso, S.; Ricci, M. G.; Focarelli, R. Menstrual cycle-related sialidase activity of the female cervical mucus is associated with exosome-like vesicles. *Fertil Steril* 88, 1212-9 (2007)
47. Espinosa, M.; Noe, G.; Troncoso, C.; Ho, S. B.; Villalon, M. Acidic pH and increasing [Ca(2+)] reduce the swelling of mucins in primary cultures of human cervical cells. *Hum Reprod* 17, 1964-72 (2002)

48. Kesimer, M.; Scull, M.; Brighton, B.; DeMaria, G.; Burns, K., O'Neal, W.; Pickles, R. J.; Sheehan, J. K. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J* 23, 1858-68 (2009)
49. Tam, P. Y.; Verdugo, P. Control of mucus hydration as a Donnan equilibrium process. *Nature* 292, 340-2 (1981)
50. Haas, G. G.Jr.; Nicosia, S. V.; Wolf, D. P. Influence of estrogens on vascular transudation and mucus production in the rabbit endocervix. *Fertil Steril* 48, 1036-42 (1987)
51. Gorodeski, G. I.; Hopfer, U.; Liu, C. C.; Margles, E. Estrogen acidifies vaginal pH by up-regulation of proton secretion via the apical membrane of vaginal-ectocervical epithelial cells. *Endocrinology* 146, 816-24 (2005)
52. Casslen, B; Nilsson, B. Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. *Am J Obstet Gynecol* 150, 877-81 (1984)
53. Hunter, R. H.; Nichol, R. Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res* 21, 255-66 (1988)
54. Levin, E. R. G protein-coupled receptor 30: estrogen receptor or collaborator? *Endocrinology* 150, 1563-5 (2009)
55. Zivadinovic, D.; Watson, C. S. Membrane estrogen receptor-alpha levels predict estrogen-induced ERK1/2 activation in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res* 7, R130-44 (2005)
56. Lu, Q.; Pallas, D. C.; Surks, H. K.; Baur, W. E.; Mendelsohn, M. E.; Karas, R. H. Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17126-31 (2004)
57. Sigel, E.; Steinmann, M. E. Structure, Function, and Modulation of GABAA Receptors. *J Biol Chem.* 2012;287(48):40224–31.
58. Watanabe, M.; Maemura, K.; Kanbara, K.; Tamayama, T.; Hayasaki, H.; Jeon, K. W. ur. GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs. *Int Rev Cytol.* 2002;213:1-47.
59. Bormann, J. The „ABC“ of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(1):16–9.

60. Kaufman, D. L.; Houser, C. R.; Tobin, A. J. Two Forms of the γ -Aminobutyric Acid Synthetic Enzyme Glutamate Decarboxylase Have Distinct Intraneuronal Distributions and Cofactor Interactions. *J Neurochem.* 1991;56(2):720–3.
61. Kostović, Ivica; Judaš, Miloš. Neurotransmiteri, neuropeptidi i njihovi receptori. U: Temelji Neuroznanosti. Zagreb: Hrvatski institut za istraživanje mozga [citirano 15. srpnja 2018.]. Dostupno na: <http://www.hiim.unizg.hr/index.php/udzbenik-temelji-neuroznanosti>
62. Gladkevich, A.; Korf, J.; Hakobyan, V. P.; Melkonyan, K. V. The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2006;124(1–2):1–8.
63. Dionisio, L.; José De Rosa, M.; Bouzat, C.; Esandi, M. D. C. An intrinsic GABAergic system in human lymphocytes. *Neuropharmacology.* 2011.;60(2–3):513–9.
64. Mancinelli, R.; Franchitto, A.; Glaser, S.; Meng, F.; Onori, P.; Demorrow, S. i ostali. GABA induces the differentiation of small into large cholangiocytes by activation of $\text{Ca}(2+)$ /CaMK I-dependent adenylyl cyclase 8. *HepatoI Baltim Md.* 2013.;58(1):251–63.
65. Wu, C.; Qin, X.; Du, H.; Li, N.; Ren, W.; Peng, Y. The immunological function of GABAergic system. *Front Biosci Landmark.* 2017;22:1162–72.
66. Wendt, A.; Birnir, B.; Buschard, K.; Gromada, J.; Salehi, A.; Sewing, S. i sur. Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighboring beta-cells. *Diabetes.* 2004;53(4):1038–45.
67. Chen, H.; Ruan, Y. C.; Xu, W. M.; Chen, J.; Chan, H. C. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2012;18(6):703–13.
68. Louzan, P.; Gallardo, M. G.; Tramezzani, J. H. Gamma-aminobutyric acid in the genital tract of the rat during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* 1986;77(2):499–504.
69. Erdő, S. L.; Villányi, P.; László, A. Gestational changes of GABA levels and GABA binding in the human uterus. *Life Sci.* 1989;44(26):2009–14.

70. Zhou, Z.; Sun, H.; Li, X.; Li, Y.; Zhao, S.; Zhang, D. i sur. A local GABAergic system is functionally expressed in human fallopian tube. *Biochem Biophys Res Commun.* 23. 2010;398(2):237–41.
71. Skelin, M.; Bursać, D.; Kozina, V.; Winters, T.; Macan, M.; Ćurlin, M. Key molecules in the GABA signalling pathway are present in mouse and human cervical tissue. *Reprod Fertil Dev.* 2018. doi: 10.1071/RD17333
72. Xiang, Y-Y; Wang, S.; Liu, M.; Hirota J. A.; Li, J.; Ju, W. i ostali. A GABAergic system in airway epithelium is essential for mucus overproduction in asthma. *Nat Med.* 2007;13(7):862–7.
73. Davis, C. W.; Dickey, B. F. Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:487–512.
74. Gibbons, R. A.; Boyd, L. J.; Dixon, S. N.; Parker, J.; Sellwood, R.; Tasker, J. B. Chemical and physical characteristics of the macromolecular components of the cervical mucus from cows after synchronization of oestrus with melengestrol acetate. *J Reprod Fertil.* 1973;35(3):469–76.
75. Romano, N.; Lee, K. et al. (2008). "Nonclassical estrogen modulation of presynaptic GABA terminals modulates calcium dynamics in gonadotropin-releasing hormone neurons." *Endocrinology* 149(11): 5335-44
76. Hodges, C. A.; Palmert, M. R.; Drumm, M. L. Infertility in Females with Cystic Fibrosis Is Multifactorial: Evidence from Mouse Models. *Endocrinology.* 2008;149(6):2790–7.
77. Ismail, N.; Giribabu, N.; Muniandy, S.; Salleh, N. Estrogen and progesterone differentially regulate the levels of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR), adenylate cyclase (AC), and cyclic adenosine mono-phosphate (cAMP) in the rat cervix. *Mol Reprod Dev.* 2015;82(6):463–74.
78. Suarez, S. S.; Pacey, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update.* 2006;12(1):23–37.

79. Lorenzen, E.; Follmann, F.; Jungersen, G.; Agerholm, J. S. A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection. *Vet Res.* 2015;46(1):116.
80. El-Banna A. A.; Hafez, E. S. E. The uterine cervix in mammals. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;112(1):145–64.
81. Bane, A.; Rajakoski, E. The bovine estrous cycle. *Cornell Vet.* 1961;51:77–95.
82. Pluta. K.; McGettigan, P.A.; Reid, C. J.; Browne J. A.; Irwin J. A.; Tharmalingam, T. i sur. Molecular aspects of mucin biosynthesis and mucus formation in the bovine cervix during the periestrous period. *Physiol Genomics.* 2012;44(24):1165–78.

11. BIOGRAFIJA

Danijel Bursać rođen je 25. listopada 1983. godine u Karlovcu. Osnovnu i srednju školu završio je u Dugoj Resi, a 2002. godine upisao je Medicinski fakultet na Sveučilištu u Zagrebu na kojemu je diplomirao 2008. godine. Tijekom studija dobio je Rektorovu nagradu na Fakultetu elektrotehnike i računarstva za rad „UPRAVLJANJE MJERNOM INSTRUMENTACIJOM PRIMJENOM .NET TEHNOLOGIJE: Razvoj aplikacije i demonstracija bioimpedancijskih mjerenja“ (mentor: prof. dr. sc. Igor Lacković). Za vrijeme studija bio je demonstrator na brojnim katedrama. Dobitnik je državne stipendije za najboljih sto studenata zagrebačkog sveučilišta. Stručni je ispit nakon odrađenog pripravničkog staža položio 2009. godine te se zaposlio u Zavodu za hitnu medicinsku pomoć Grada Zagreba. Od 2011. godine obavlja specijalizaciju iz ginekologije i opstetricije u KB-u Merkur, koju uspješno završava 2016. godine. Tijekom specijalizacije i doktorskog studija izlagao je radove na brojnim međunarodnim kongresima i konferencijama. Autor je niza znanstvenih radova. U slobodno vrijeme obnaša funkciju glavnog trenera u taekwondo klubu Čigra. Idejni je začetnik i provoditelj nekoliko društveno značajnih projekata u radu s djecom i odraslima s posebnim potrebama (Čigrin let, Na krilima Čigre, Čigra u zajednici, Čigra pre i postnatal). Sa svojim natjecateljima postiže značajne svjetske i europske rezultate (svjetski i europski prvaci). Međunarodni je taekwondo sudac i parataekwondo klasifikator. Trenutno obavlja subspecijalizaciju iz humane reprodukcije u KB-u Merkur. Za vrijeme specijalizacije i subspecijalizacije dio edukacije provodi na renomiranim klinikama diljem Europe (Liverpool, Maribor, Helsinki). Dobitnik je nagrade «Ponos Hrvatske» za 2018. godinu za rad s djecom s posebnim potrebama u sklopu projekta Čigrin let.