



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

**Милош М. Матић**

***IN VITRO* ЕФЕКТИ НЕУРОПЕПТИДА У НА МИГРАТОРНИ  
ПОТЕНЦИЈАЛ И ОКСИДАТИВНИ СТАТУС ЋЕЛИЈА  
ХУМАНОГ ХОРИОКАРЦИНОМА**

**Докторска дисертација**

**Проф. др Бранка Огњановић, ментор**

**Крагујевац, 2017. година**

<b>I. Аутор</b>
Име и презиме: <b>Милош М. Матић</b>
Датум и место рођења: <b>21.04.1984.године, Крагујевац, Србија</b>
Садашње запослење: <b>асистент, Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</b>
<b>II. Докторска дисертација</b>
Наслов: <b><i>In vitro</i> ефекти неуропептида Y на миграторни потенцијал и оксидативни статус ћелија хуманог хориокарцинома</b>
Број страница: <b>158</b>
Број слика: <b>слика-15, табела-17, графика-28</b>
Број библиографских података: <b>397</b>
Установа и место где је рад израђен: <b>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</b>
Научна област (УДК): <b>Биологија / Физиологија животиња и молекуларна биологија (57 / 591.1 / 577.2)</b>
Ментор: <b>Др Бранка Огњановић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу</b>
<b>III. Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: <b>09.12.2015. године</b>
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: <b>IV-01-777/5 13.01.2016. године</b>
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"> <li><b>Др Бранка Огњановић, редовни професор</b> Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;</li> <li><b>Др Андраш Штајн, редовни професор</b> Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња;</li> <li><b>Др Зорица Саичић, научни саветник</b> Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, ужа научна област: Физиологија.</li> </ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none"> <li><b>Др Андраш Штајн, редовни професор, (председник комисије)</b> Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња;  _____</li> <li><b>Др Зорица Саичић, научни саветник</b> Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, ужа научна област: Физиологија;  _____</li> <li><b>Др Светлана Ивановић-Матић, научни саветник</b> Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, ужа научна област: Молекуларна биологија.  _____</li> </ol>
Датум одбране докторске дисертације:

## Захвалница

*Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у Лабораторијама Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду и Биолошког факултета у Београду.*

*Дубоку захвалност дугујем свом ментору проф. др Бранки Огњановић, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, на стимулативним условима рада које ми је обезбедила, знању које ми је преносила током израде докторске дисертације, несебичној и безрезервној помоћи коју ми је пружила и корисним сугестијама током свих фаза израде ове дисертације. Њено искуство, пријатељство, подршка и разумевање били су ми од пресудног значаја да истрајем у напорном раду.*

*Захваљујем се свом професору, др Андрашу Штајну, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за све знање, вештине и умеће које ми је пренео, за велику подршку, разумевање и драгоцене савете који су омогућили да ова дисертација буде успешно финализована.*

*Посебну захвалност дугујем др Зорици Саичић, научном саветнику Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, на несебичној помоћи, сарадњи, идејама и драгоценим сугестијама током целокупне реализације ове докторске дисертације.*

*Захваљујем се др Светлани Ивановић-Матић, научном саветнику Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, за корисне сугестије, драгоцене савете и усмерења током рада, који су веома допринели подизању квалитета ове докторске дисертације.*

*Захваљујем се својим колегама у Лабораторији за експерименталну физиологију, посебно Ани и Милицы, за велику помоћ током експерименталног рада. Овим путем захваљујем се свима који су на било који начин допринели реализацији ове докторске дисертације.*

*На крају, посебну захвалност дугујем својој породици и пријатељима на љубави, бескрајном стрпљењу, разумевању и подршци без којих бих тешко успео да се носим са изазовима са којима сам се сусретао током израде овог рада.*

Милош Матић

## **IN VITRO ЕФЕКТИ НЕУРОПЕПТИДА Y НА МИГРАТОРНИ ПОТЕНЦИЈАЛ И ОКСИДАТИВНИ СТАТУС ЋЕЛИЈА ХУМАНОГ ХОРИОКАРЦИНОМА**

### **РЕЗИМЕ**

Трофобласти су ћелије плаценте и карактеришу се високом способношћу пролиферације, миграције и инвазије. Њихова контролисана миграција и инвазија у ендометријум, кључни су процеси у имплантацији, као и у формирању и развоју плаценте. Способност трофобласта да изврши миграцију и инвазију на матернално ткиво лежи у основи правилног одвијања трудноће и правилног развоја фетуса. Редукциони поремећаји трофобластне миграције узрокују аберантну имлантацију и плитку плацентацију, што често води различитим компликацијама трудноће које су у вези са недовољном плацентацијом, као што су прееклампсија и интраутерини застој у расту. У неколико патолошких форми трудноће показано је присуство значајно повишене концентрације неуропептида Y у поређењу са концентрацијама у здравој трудноћи, па је највећи део студије фокусиран на испитивање потенцијалних патолошких ефеката на трофобласте. Имајући у виду да је неуропептид Y присутан у одређеној концентрацији и у плазми здравих трудница, узети су у разматрање и ефекти ове концентрације, путем које је могуће да неуропептид Y оствари значајан физиолошки допринос у оптималном метаболизму трофобласта током здраве трудноће.

Циљеви ове студије представљају *in vitro* испитивања ефеката неуропептида Y на различите аспекте функционисања хуманих трофобласта. Током студије коришћена је ћелијска линија JEG-3 хуманих трофобласта изолованих из карцинома плаценте, која је погодан модел систем за проучавања процеса миграције и инвазије. У експериментима су испитивани ефекти неуропептида Y аплицираног у две концентрације (физиолошкој и патолошкој) у два временска третмана (24 сата и 72 сата) са циљем упоређивања његових физиолошких ефеката и ефеката које остварује у концентрацијама које се јављају у неким патолошким стањима трудноће. Посебан фокус студије је био на утврђивању потенцијалног доприноса овог молекула на промене миграторне и инвазивне способности трофобласта у његовим концентрацијама вишим од физиолошких.

Концентрације NPY од 0,1 nmol/L и 1 nmol/L коришћене су за тестирање ефекатана апоптотски индекс (преживљавање ћелија), вијабилност, миграциони капацитет, оксидативни / антиоксидативни статус, продукцију металопротеиназа (MMP-9), као и за мерење експресије гена (iNOS, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, COX-2 и MMP-9) и дистрибуције неких протеина у ћелији (iNOS, E-кадхерин). Контролне ћелије су гајене у чистом медијуму за култивацију да би се добиле базалне вредности испитиваних параметара.

Експериментални подаци добијени током ове студије показали су да неуропептид Y аплициран у физиолошкој (0,1 nmol/L) и патолошкој (1 nmol/L) концентрацији остварује различите ефекте на параметре оксидативног / антиоксидативног метаболизма, миграције, као и на вијабилност, апоптотски индекс и пролиферативну способност хуманих трофобласта линије JEG-3. Најзначајнији ефекат физиолошке концентрације неуропептида Y је повећавање вијабилности трофобласта, што указује на значајан допринос одржавању нивоа оксидативног метаболизма у трофобласима који природно функционишу у стању хипоксије. Физиолошка концентрација неуропептида Y не индукује значајан оксидативни стрес, указујући да трофобласти при овој концентрацији ефикасно могу неутралисати продукте повишене активности митохондријалног ланца респирације. Неуропептид Y аплициран у концентрацији од 0,1 nmol/L показује протективан ефекат на преживљавање трофобласта, као и значајан пролиферативан ефекат. Ови подаци указују да NPY у физиолошким концентрацијама може имати допринос у остваривању функција трофобласта неопходних за оптималну имплантацију и плацентацију.

Патолошке концентрације неуропептида Y доводе до индукције снажног оксидативног стреса, као и до значајног смањења миграционих способности трофобласта. Смањење миграционог индекса трофобласта корелира са сниженом биодоступношћу азот монооксида, што је последица његове интеракције са продуктима оксидативног стреса, као и са снижењем експресије и количинске заступљености iNOS ензима. Неуропептид Y такође индукује повишење количине E-кадхерина и снижење експресије гена потенцијално укључених у стимулацију трофобластне миграције. Количина металопротеиназе 9, параметра инвазионог потенцијала ћелија, као и ниво њене генске експресије значајно је снижен у односу на контролне ћелије након третмана патолошком концентрацијом NPY. Наведени резултати имплицирају да повишена концентрација NPY која се региструје у неким патолошким формама трудноће повезаних са смањеном или недовољно

интензивном миграцијом и инвазијом трофобласта, може да буде један од значајних фактора који доприносе редукцији трофобластне миграције.

Ова докторска дисертација представља допринос дубљем разумевању механизма регулације миграције трофобластних ћелија, која је есенцијална за оптимално формирање плаценте, исхрану ембриона и успешан порођај.

---

**IN VITRO EFFECTS OF NEUROPEPTIDE Y ON MIGRATORY POTENTIAL AND  
OXIDATIVE STATUS OF HUMAN CHORIOCARCINOMA CELLS**

**SUMMARY**

Trophoblasts cells are placental cell type characterized by high proliferation capacity, migration and invasion. Highly regulated trophoblast migration and invasion of the endometrium, are the essential process in the implantation and development of the placenta. The migration and invasion of trophoblast cells of maternal tissues are basis of a proper progress of pregnancy and optimal fetal development. Reduced trophoblast migration and invasion cause aberrant implantation and shallow placentation, often leading to a various complications of pregnancy that are related with inadequate placentation, such as preeclampsia and intrauterine growth restriction. In several pathological forms of pregnancy the presence of significantly elevated concentration of neuropeptide Y in comparison with its concentrations in healthy pregnancy was recorded, so the largest part of the study were focused on the examination of potential pathological effects of NPY on trophoblast cells. Since neuropeptide Y is also present in a particular concentration in plasma of women with healthy pregnancy, the effects of this physiological concentration by which neuropeptide Y is possible to significantly contribute to the optimal physiological metabolism of trophoblasts during a healthy pregnancy were taken into consideration.

The objectives of this study were to investigate *in vitro* effects of neuropeptide Y on different aspects of the functioning of the human trophoblast. During the study we used the cell line JEG-3 of human trophoblast, isolated from placental cancer, which represents a suitable model system for examining of the processes of cell migration and invasion. In the experiments we have investigated the effects of neuropeptide Y applied in two concentrations (physiological and pathological) in two different time treatment (24 and 72 hours) with the aim of comparing its physiological effects and the effects achieved by its pathological concentrations present in some pregnancy disorders. A particular focus of the study was to determine the potential contribution of this molecule on changes of the migratory and invasive ability of trophoblast cells induced by concentrations higher than physiological. NPY concentration of 0,1 nmol/L and 1 nmol/L were used to examine the effects on apoptotic index (survival rate of the cells), cell viability, migration capacity, the oxidative / antioxidative status, the production of metalloproteinase (MMP-9), gene

expression (iNOS, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, COX-2 and MMP-9) and the distribution of some proteins in cell (iNOS, E-cadherin). Control cells were grown in pure culture medium to obtain basal values of the examined parameters.

Experimental data obtained in this study showed that neuropeptide Y administered in physiological (0,1 nmol/L) and pathological (1 nmol/L) concentration achieves various effects on the parameters of the oxidative / antioxidative metabolism, migration and the viability index apoptotic index and proliferative rate of human trophoblast cell line JEG -3. The most significant effect of physiological concentrations of neuropeptide Y is increasing trophoblast viability, which indicates a significant contribution to maintaining the levels of oxidative metabolism trophoblasts, naturally operating in a state of hypoxia. Physiological concentrations of neuropeptide Y does not induce significant oxidative stress, indicating that trophoblasts at this concentration can effectively neutralize the products of elevated activity of mitochondrial respiratory chain. Neuropeptide Y administered in a concentration of 0,1 nmol/L also showed protective effect on the survival of the trophoblast, as well as a significant proliferative effect. These data suggest that NPY in physiological concentrations may have a contribution in achieving the function of a trophoblast necessary for optimal implantation and placentation.

Pathological concentrations of neuropeptide Y leads to a strong oxidative stress, as well as to a significant reduction of migration ability of the trophoblast. Reduced migration index of trophoblast cells correlates with the reduced bioavailability of nitric oxide, which is due to its interaction with the products of oxidative stress, as well as due to decrease in the expression of iNOS and content of the enzyme. Neuropeptide Y also induces the increasing of the amount of E-cadherin and reduction of the expression of genes potentially involved in the stimulation of trophoblastic migration. The amount of metalloproteinase 9, the parameter cell invasive potential, as well as the levels of its gene expression are significantly decreased as compared to control cells after treatment with NPY pathological concentrations. These results imply that increased concentrations of NPY registered in some pathological forms of pregnancy associated with insufficient migration and invasion of trophoblast, may be one of the significant factors that could contribute to the reduction trophoblast migration.

This research is a contribution to a deeper understanding of the mechanisms of regulation of trophoblast cell migration, which is essential for optimal formation of the placenta, embryo nutrition and successful delivery.



## САДРЖАЈ

<b>1. Увод</b> .....	1
1.1. Имплантација и плацентација .....	2
1.1.1. Трофобласти - опште карактеристике .....	4
1.1.2. Диференцијација трофобласта (типови и функције) .....	6
1.1.2.1. Регулација пролиферације и диференцијације екстравилозних цитотрофобласта .....	11
1.1.2.2. Принципи ћелијске покретљивости .....	13
1.1.2.3. Регулација миграције и инвазије екстравилозних цитотрофобласта .....	15
1.1.3. Молекули ћелијске адхезије као регулатори покретљивости трофобласта - улога интергрин и кадхерина у трофобластској миграцији .....	16
1.2. Металопроотеиназе - структура, активација и улога у ћелијској миграцији .	20
1.3. Улога циклооксигеназа и простагландина у покретљивости и диференцијацији трофобласта .....	24
1.4. Морфолошке промене цитоскелета трофобласта током миграције / инвазије .....	25
1.4.1. Трофобласти vs канцерне ћелије .....	26
1.5. Неуропетид Y - структура, биосинтеза и рецептори и функције. ....	27
1.5.1. Физиолошке функције неуропетида Y .....	30
1.6. Механизми редокс равнотеже. ....	33
1.6.1. Реактивне врсте кисеоника и азота .....	33
1.6.1.1. Супероксид анион радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	34
1.6.1.2. Водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) .....	35
1.6.1.3. Хидроксил радикал ( $\cdot OH$ ) .....	36
1.6.1.4. Пероксинитрити ( $ONOO^-$ ) .....	37
1.6.2. Физиолошки ефекти реактивних врста .....	38
1.6.3. Оксидативна оштећења биомолекула .....	39
1.6.4. Систем заштите од оксидативних оштећења .....	41
1.6.4.1. Глутатион (GSH) - главна неензимска компонента система антиоксидативне заштите .....	42
1.6.5. Азот моноксид (NO) .....	44
<b>2. Циљеви истраживања</b> .....	46

<b>3. Материјал и методе истраживања</b> . . . . .	49
3.1. Ћелијске линије као модел систем . . . . .	50
3.1.1. Ћелијске линије коришћене у експериментима. . . . .	50
3.2. Експериментални третман . . . . .	50
3.2.1. Поступак одмрзавања ћелија . . . . .	52
3.2.2. Поступак пресађивања ћелија . . . . .	52
3.2.3. Поступак одређивања броја и вијабилности ћелија . . . . .	53
3.2.4. Испитивање апоптотских, пролиферативних ефеката и ефеката на вијабилност ћелија . . . . .	54
3.2.4.1. Испитивање вијабилности трофобласта МТТ тестом . . . . .	54
3.2.4.2. Испитивање типа ћелијске смрти проточном цитометријом Annexin V/7-AAD бојењем . . . . .	54
3.2.5. Испитивање параметара редокс статуса . . . . .	55
3.2.5.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) NBT тестом . . . . .	55
3.2.5.2. Одређивање концентрације нитрита ( $NO_2^-$ ) . . . . .	56
3.2.5.3. Одређивање концентрације водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) . . . . .	57
3.2.5.4. Одређивање концентрације редукованог (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG) . . . . .	57
3.2.6. Испитивање генске експресије гена за iNOS, HIF-1 $\alpha$ , MMP-9, COX-2 и VEGF . . . . .	58
3.2.6.1. Изоловање РНК из ћелија . . . . .	58
3.2.6.2. Реверзна транскрипција информационе РНК (RT PCR) . . . . .	59
3.2.6.3. Квантитативни PCR (qPCR) . . . . .	59
3.2.7. Одређивање протеинске експресије индуцибилне синтазе азот монооксида (iNOS). . . . .	60
3.2.8. Одређивање концентрације металопротеиназе 9 (MMP-9). . . . .	61
3.2.9. Миграциони ћелијски есеј 2D ( <i>Boyden chamber</i> ) . . . . .	62
3.3. Статистичка обрада резултата . . . . .	63
<b>4. Резултати</b> . . . . .	64
4.1. Испитивање ћелијске вијабилности (МТТ есеј) . . . . .	65
4.2. Индекс пролиферације хуманих цитотрофобласта JEG-3 . . . . .	68
4.3. Индикатори апоптозе . . . . .	69
4.4. Параметри оксидативног / антиоксидативног статуса . . . . .	74

4.4.1. Концентрација параметара оксидативног стреса ( $O_2^{\bullet-}$ , $H_2O_2$ и $NO_2^-$ ) . . .	74
4.4.2. Концентрација неензимских параметара система антиоксидативне заштите (GSH и GSSG) . . . . .	79
4.5. Миграциони ћелијски есеј ( <i>Boyden chamber</i> ) . . . . .	83
4.6. Активност металопротеиназе 9 (MMP-9) . . . . .	88
4.7. Анализа релативне експресије гена . . . . .	90
4.7.1. Експресија гена за металопротеиназу 9 (MMP-9) . . . . .	90
4.7.2. Експресија гена за индуцибилну синтазу азот монооксида (iNOS) . . . . .	91
4.7.3. Експресија гена за индуцибилни фактор хипоксије (HIF-1 $\alpha$ ) . . . . .	92
4.7.4. Експресија гена за васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF) . . .	93
4.7.5. Експресија гена за циклооксигеназу 2 (COX-2) . . . . .	94
4.8. Имуноцитохемијске анализе . . . . .	95
4.8.1. Протеинска експресија iNOS . . . . .	95
4.8.2. Протеинска експресија HIF-1 $\alpha$ . . . . .	97
4.8.3. Протеинска експресија E-кадхерина . . . . .	98
4.8.4. Протеинска експресија Y <sub>2</sub> рецептора за NPY (NPYR2) . . . . .	99
<b>5. Дискусија</b> . . . . .	<b>100</b>
<b>6. Закључци</b> . . . . .	<b>125</b>
<b>7. Литература</b> . . . . .	<b>131</b>
Биографија . . . . .	159
Библиографија . . . . .	161
Библиотечка документација . . . . .	165

**Списак слика, табела и графика**

- Слика 1.** Приказ сукцесивних процеса овулације, фертилизације, бластулације и имплантације
- Слика 2.** Сигнална комуникација хуманог ембриона у стадијуму бластоциста и микроокружења матерналног ендометријалног ткива
- Слика 3.** Формирање трофобластног синцицијалног слоја и иницијално инвазија ембрионских структура на ендометријум
- Слика 4.** Пролиферација цитотрофобласта и формирање ћелијских колона у оквиру укотвљавајућих плаценталних ресица
- Слика 5.** Миграција екстравилозних цитотрофобласта у децидуу и ремоделовање матерналних спиралних артерија
- Слика 6.** Ступњеви промене ћелијске морфологије и цитоскелета током процеса миграције
- Слика 7.** Аминокиселинска секвенца неексцизованог нативног неуропептида Y
- Слика 8.** Генерализована структура хуманог рецептора за неуропептид Y GPCR типа
- Слика 9.** NPY рецептори и сигнална трансдукција
- Слика 10.** Ћелијски механизми продукције реактивних врста и антиоксидативне заштите
- Слика 11.** Морфологија JEG-3/ НТВ-36 ћелија
- Слика 12.** Протеинска експресија iNOS у JEG-3 трофобластима у контроли и третману неуропептидом Y.
- Слика 13.** Протеинска експресија HIF-1 $\alpha$  у JEG-3 трофобластима у контроли и третману неуропептидом Y.
- Слика 14.** Протеинска експресија E-кадхерина у JEG-3 трофобластима у контроли и третману неуропептидом Y.
- Слика 15.** Протеинска експресија рецептора Y<sub>2</sub> за NPY (NPYR2) у JEG-3 трофобластима у контроли и третману са неуропептидом Y.
- Табела 1.** Ефекат растућих концентрација неуропептида Y (NPY) на вијабилност ћелија линије JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана
- Табела 2.** Промене индекса пролиферације хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана неуропептидом Y (NPY) у концентрацијама 0,1 nM и 1 nM
- Табела 3.** Процент ћелија у фази ране апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY
- Табела 4.** Процент ћелија у фази касне апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY
- Табела 5.** Процент ћелија у фази ране апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY
- Табела 6.** Процент ћелија у фази касне апоптозе након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY и у контроли
- Табела 7.** Вредности концентрација O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY у JEG-3 ћелијама

- Табела 8.** Вредности концентрација  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  и  $NO_2^-$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1nM NPY у JEG-3 ћелијама
- Табела 9.** Ефекат краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY на промене концентрације редукованог глутатиона (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG) у JEG-3 ћелијама
- Табела 10.** Ефекат краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY на промене концентрације редукованог глутатиона (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG) у JEG-3 ћелијама
- Табела 11.** Промене миграционог индекса хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана неуропептидом Y (NPY) концентрацијама 0,1 nM и 1 nM, и након третмана L-NAME
- Табела 12.** Ефекат краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY на активност MMP-9 ензима ослобођеног из JEG-3 хуманих трофобласта
- Табела 13.** Релативни нивои експресије MMP-9 иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима
- Табела 14.** Релативни нивои експресије iNOS иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима
- Табела 15.** Ефекат неуропептида Y (NPY) на промену степена експресије гена за индуцибилни фактор хипоксије (HIF-1 $\alpha$ ) у JEG-3 хуманим трофобластима након дуготрајног третману (72 сата) у концентрацијама од 0,1 nM и 1 nM
- Табела 16.** Релативни нивои експресије гена за васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF) иРНК након третмана 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима
- Табела 17.** Релативни нивои експресије гена за циклооксигеназу 2 (COX-2) иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима
- График 1.** Ефекти неуропептида Y (NPY) на вијабилност ћелија линије JEG-3 након краткотрајног (24 сата) третмана
- График 2.** Ефекти неуропептида Y (NPY) на вијабилност ћелија линије JEG-3 након дуготрајног (72 сата) третмана
- График 3.** Промене индекса пролиферације хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана неуропептидом Y (NPY) у концентрацијама 0,1 nM и 1 nM
- График 4.** Процент ћелија у фази ране апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY
- График 5.** Процент ћелија у фази касне апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY
- График 6.** Процент ћелија у фази ране апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY
- График 7.** Процент ћелија у фази касне апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY
- График 8.** Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY у JEG-3 ћелијама
- График 9.** Концентрација  $H_2O_2$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY у JEG-3 ћелијама
- График 10.** Концентрација  $NO_2^-$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY у JEG-3 ћелијама

- График 11.** Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY у JEG-3 ћелијама
- График 12.** Концентрација  $H_2O_2$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY у JEG-3 ћелијама
- График 13.** Концентрација  $NO_2^-$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY у JEG-3 ћелијама
- График 14.** Промене концентрације редукованог глутатиона (GSH) након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) излагања 0,1 nM NPY у JEG-3 ћелијама
- График 15.** Промене концентрације оксидованог глутатиона (GSSG) након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) излагања 0,1 nM NPY у JEG-3 ћелијама
- График 16.** Промене концентрације редукованог глутатиона (GSH) након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) излагања 1 nM NPY у JEG-3 ћелијама
- График 17.** Промене концентрације оксидованог глутатиона (GSSG) након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) излагања 1 nM NPY у JEG-3 ћелијама
- График 18.** Промене миграционог индекса хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY
- График 19.** Промене миграционог индекса хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY
- График 20.** Промене миграционог индекса хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 mM L-NAME
- График 21.** Компаративне вредности промена миграционог индекса након краткотрајног (24 сата) третмана 1 nM NPY и 1 mM L-NAME
- График 22.** Компаративне вредности промена миграционог индекса након дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY и 1 mM L-NAME
- График 23.** Ефекат краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY на активност MMP-9 ензима ослобођеног из JEG-3 хуманих трофобласта
- График 24.** Релативни нивои експресије MMP-9 иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима
- График 25.** Релативни нивои експресије iNOS иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима
- График 26.** Релативни нивои експресије гена за индуцибилни фактор хипоксије (HIF-1 $\alpha$ ) иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима
- График 27.** Релативни нивои експресије гена за васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF) иРНК након третмана 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима
- График 28.** Релативни нивои експресије гена за циклоксигеназу 2 (COX-2) иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима

**СКРАЋЕНИЦЕ**

5-*aza*-CdR – 5'-аза-2'-деоксицитидин

7-AAD (7 *aminoactinomycin D*) – 7 - аминоактиномицин D

ACTH – адренкортикотропни хормон

AJ – *adherent junction*

Annexin-V-FITC (Annexin-V-fluorescein isothiocyanate)

AOS (*Antioxidative Defense System*) – антиоксидативни заштитни систем

AP-2 $\alpha$  – *activating enhancer binding Protein 2 alpha*

APP (*aminopeptidase P*) – аминокептидаза P

ARC - *nucleus arcuatus*

ATCC - *American Type Culture Collection*

cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) – циклични аденозин монофосфат

CAT – каталаза

CCl<sub>3</sub><sup>•</sup> – трихлорметил радикал

cDNA (*Complementary DNA*) – комплементарна ДНК

CDNB – 1-хлоро-2,4-динитробензен

COX-1 и 2 – циклооксигеназа 1 и 2

CRF – кортикотропин-ослобађајући фактор

CSF1 – фактор стимулације колонија 1

CTB (*cytotrophoblasts*) – цитотрофобласти

CYP450 – цитохром P450

DAPI – *Diamidino-2-Phenylindole*

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) – хранљиви медијум

DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) – диметил сулфоксид

ДНК-метилтрансфераза (DNMT 3a и DNMT 3b)

DPP-IV – дипептидил пептидаза IV

DTNB – 5,5'-*Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)*

ECM (*extracellular matrix*) – екстрацелуларни матрикс

eCT (*endovascular cytotrophoblast*) – ендоваскуларни цитотрофобласти

EDTA – етилендиаминотетра сирћетна киселина

EGF (*epidermal growth factor*) – епидермални фактор раста

eNOS – ендотелна синтаза азот монооксида

ERK1/ ERK2 – (*extracellular signal-regulated kinase 1/ 2*)

*evCTB/EVT (extravillous cytotrophoblasts)* – екстравилозни цитотрофобласти  
FAK – фосфорилисане киназе фокалних адхезија  
FBS (*Fetal Bovine Serum*) – фетални серум говечета  
GCM1 (*glial cell missing 1*)  
GCS (*γ-glutamyl Cysteine Synthase*) – γ- глутамил цистеин синтетаза  
GnRH – гонадотропин ослобађајући фактор  
GPCR – родопсин-сличних рецептора куплованих са G протеином  
GR – глутатион-редуктаза  
GS – глутатион синтаза  
GSH – редуковани глутатион  
GSH-Px – глутатион-пероксидаза  
GSSG – глутатион дисулфид  
GST – глутатион-S-трансфераза  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник пероксид  
hCG (*human chorionic gonadotropin*) – хорионски гонадотропин  
HIF-1α (*Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*) – индуцибилни фактор хипоксије 1 алфа  
HLA C – патернални хумани леукоцитни антиген C  
HLA G – хумани леукоцитни антиген класе I  
•OH – хидроксил радикал  
HO<sub>2</sub><sup>•</sup> – хидропероксил  
HOCl – хипохлорна киселина  
HPL – хумани плацентални лактоген  
HRPO (*horseradish peroxidase*) – пероксидаза рена  
iCTB (*interstitial cytotrophoblast*) – интерстицијални цитотрофобласти  
ID2-a – *inhibitor of DNA binding 2*  
IGF-I – *Insulin-like growth factor 1*  
IL-1 – интерлеукин-1  
IL-11 – интерлеукина 11  
iNOS – индуцибилна синтаза азот монооксида  
iRNA – информациона РНК  
JNK – *Jun N-terminal Kinase*  
KOH – калијум хидроксид  
L<sup>•</sup> – липидни радикал



- LH – незасићене масне киселине липида  
L-NAME – *NG-nitro-L-argininemethylester*  
LO<sup>•</sup> – липидни алкоксил радикал  
LOH – липидни алдехид  
LOO<sup>•</sup> – пероксил радикал  
MAO – моноамино-оксидазе  
MDA – малондиалдехид  
MES пуфер – 2-(*N-morpholino*) етан сулфонска киселина  
MMP – матриксна металопроотеиназа  
MT-MMP – мембрански тип металопроотеиназа  
MTOC – организациони центар микротубула  
MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – натријум хидроген фосфат  
NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) – никотинамид аденин динуклеоти фосфат  
NaHCO<sub>3</sub> – натријум хидроген карбонат  
NaNO<sub>3</sub> – натријум нитрат  
NaOH – натријум хидроксид  
NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) – нитроблу тетразолиума  
NK cells – natural killer cells  
NO (*Nitric Oxide*) – азот моноксид  
NO<sup>-</sup> – нитроксил анјон  
NO<sup>+</sup> – нитрозил катјон  
NO<sup>•</sup> – слободни радикал  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – нитрити  
NO<sub>2</sub><sup>+</sup> – нитрил јон  
NOS (*Nitric Oxide Synthase*) – синтаза азот моноксида  
NPY – неуропептид Y  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – синглет кисеоник  
O<sub>2</sub><sup>-•</sup> – супероксид анјон радикал  
O<sub>3</sub> – озон  
ONOOH – пероксинитритна киселина

ONOO<sup>-</sup> – пероксинитрит  
PAIs – инхибитор активатора плазминогена  
PBS – *Phosphate Buffer Saline*  
PCR (*Polymerase Chain Reaction*) – ланчана реакција полимеразе  
PFA – параформалдехидом  
PGE<sub>2</sub> – Простагландин E<sub>2</sub>  
P-gp – P-гликопротеин  
PIGF – плацентални фактор раста  
PKC – протеин киназа C  
PLC/PKC – *phospholipase C/protein kinase C*  
PRL – пролактин  
PUFA (*polyunsaturated fatty acids*) – полинезасићене масне киселине  
PVH – паравентрикуларно једро  
qPCR (*Quantitative PCR*) – количински PCR  
RNS (*Reactive Nitrogen Species*) – реактивне врсте азота  
RO<sup>•</sup> – алкоксил радикал  
RO<sub>2</sub><sup>•</sup> – пероксил радикал  
ROOH – органски хидропероксид  
ROS (*Reactive Oxygen Species*) – реактивне врсте кисеоника  
R-S<sup>•</sup> – тиол радикал  
RT – реверзна транскриптаза  
SAPK/JNK – *Stress Activated Protein Kinases/Jun amino-terminal Kinases*  
sFLT-1 – *FMS like tyrosine kinase 1*  
SOD – супероксид-дисмутаза  
STAT3 – сигнални трансдуцер и активатор транскрипције 3  
Stox1 – *storkhead box 1*  
TCE – TNF-α-конвертујући ензим  
TGF β – Трансформишући фактор раста бета  
TGN – транс Голџи мрежа  
TIMPs – ткивни инхибитор металопротеиназа  
TNF-α – фактор некрозе тумора α  
TRH – тиреотропин-ослобађајући хормон  
uPA – урокиназни активатор плазминогена

VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) – васкуларни молекул ћелијске адхезије 1

vCTB (*villous cytotrophoblasts*) – вилозни цитотрофобласти

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) – васкуларни ендотелијални фактор раста

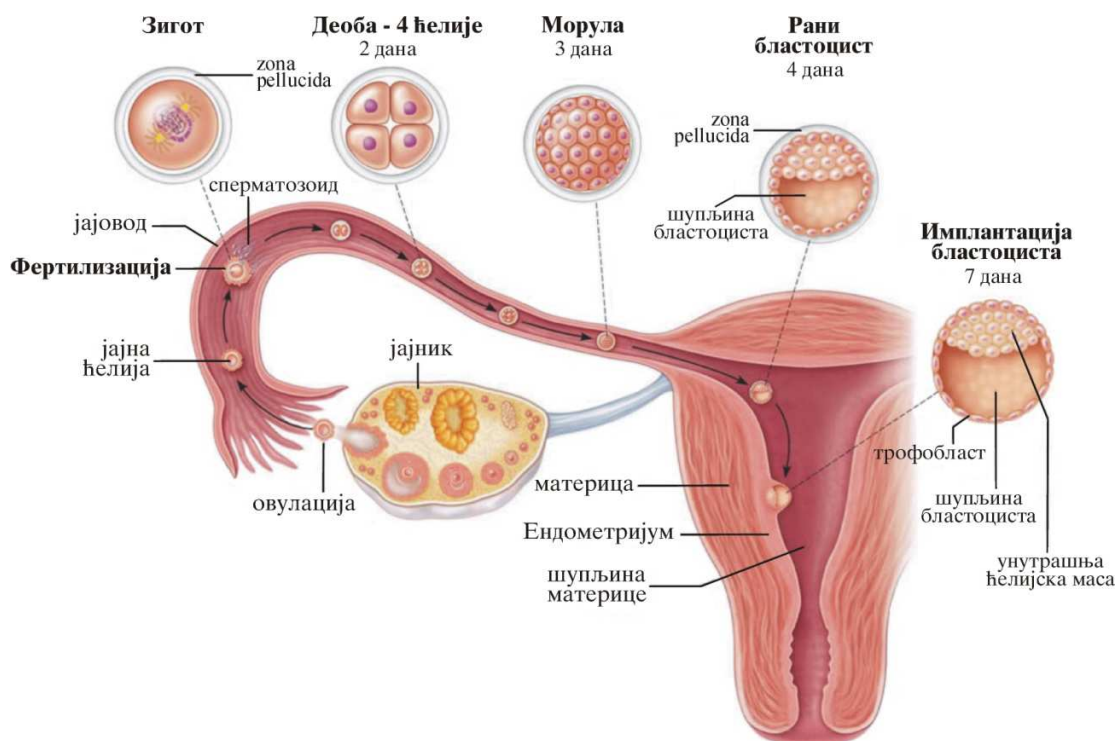
VLA4 (*very late antigen 4*) – касни антиген 4

---

# 1. УВОД

## 1.1. Имплантација и плацентација

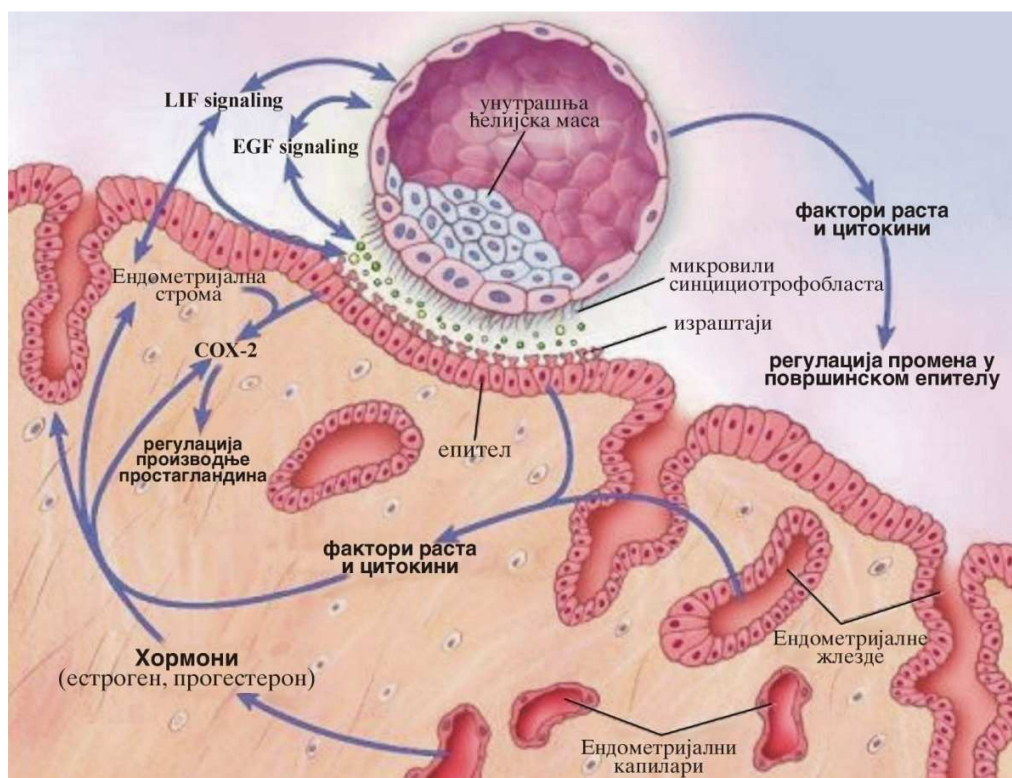
Формирање ембриона започиње спајањем јајне ћелије и сперматозоида у процесу фертилизације у каналу јајовода (Wassarman, 1999.) Непосредно након фертилизације, зигот подлеже серији циклуса ћелијских деоба и морфогенетских диференцијација формирајући бластоцист, ембрионски ступањ који се карактерише присуством двају ћелијских врста: а) ћелије спољашњег трофоектодермалног епитела и б) унутрашња ћелијска маса (Слика 1) (Wang и Dey, 2006; Cockburn и Rossant, 2010). Током прве физичке интеракције бластоциста са матерналним ендометријумом долази до иницирања имплантације при чему започињу интензивне физиолошке и морфогенетске промене у обе поменуте структуре (Red-Horse и сар., 2004; Wang и Dey, 2006). Двосмерна биохемијска комуникација између њих кључна је за правилно одвијање процеса саме имплантације, али и за правилан развој плаценте и прогресију трудноће, будући да одступања од оптималне сигналне размене могу довести до бројних поремећаја у процесима плацентације и децидуализације, што може резултирати губитком фетуса (Ye и сар., 2005; Chen и сар., 2011).



Слика 1. Приказ сукцесивних процеса овулације, фертилизације, бластулације и имплантације.

Успешно одвијање имплантације зависи од синхронизоване комуникације између бластоциста који је постигао стање имплантативне компетенције и материнског ендометријума који се налази у рецептивном статусу, стању способном да прими ембрион (Deу и сар., 2004; Tranguch и сар., 2005; Wang и Deу, 2006). Ова два стања прецизно су регулисана највећим делом хормонима мајке, пре свега оваријалним естрогеном и прогестероном (Conneely и сар., 2002; Curtis Hewitt и сар., 2002). Оваријални хормони остварују своје деловање у аутокриним, паракриним, ендокриним и јукстакриним интеракцијама и заједно са локално продукованим сигналним молекулима који обухватају цитокине и факторе раста обезбеђују прецизност процеса имплантације (Deу и сар., 2004). Хијерархијска организованост и временска координација сигналах путева који управљају интеракцијама између ембриона и ендометријума током имплантације и раних фаза трудноће није до краја разјашњена. Комуникација и контакт између бластоциста и материце могући су само током кратког периода који се назива “прозором имплантације” (Ma и сар., 2003). Као последица одговора на сигнале ембриона који се имплантира, ткиво испод епителног слоја ендометријума (стромално ткиво) подлеже ћелијским трансформацијама у процесу познатом као децидуализација, са циљем подржавања опстанка и раста ембриона и инвазије његових ћелија (Lim и Wang, 2010). Преглед општих сигналних путева који леже у основи оптималне имплантације дат је на **Слици 2**. Сматра се да локално ткиво децидуе представља снажну баријеру реакцији матерналног имунолошког одговора на семи-алогено ткиво ембриона. Са напретком експерименталних технологија спроводи се све већи број студија којима се покушава утврдити комплексна шема генске експресије и интеракција између протеина који су у основи молекуларних путева који регулишу имлантацију ембриона у ткиво утеруса. Пошто је имплантација динамичан развојни процес који укључује велики број строго координисаних и хијерархијски организованих молекуларних интеракција, покушаји њиховог расветљавања представљају велики научни изазов. Ипак, услед техничких потешкоћа и етичких ограничења, сазнања о овим процесима се базирају пре свега на подацима из анималних модела, нарочито мишијих, као и на апроксимативним закључцима добијеним из студија на различитим типовима хуманих ћелијских линија трофобласта (Yoshioka и сар., 2000; Reese и сар., 2001; Као и сар., 2002; Riesewijk и сар., 2003; Hamatani и сар., 2004; Yoon и сар., 2004; Ну и сар., 2008; Naouzi и сар., 2011; Chen и сар., 2017). За утврђивање улоге

различитих гена у процесу имплантације нарочито су погодни модели *knock-out* мишева, а разумевање сигналних каскада имплантације и децидуализације од пресудног је значаја у креирању нових стратегија дијагностификовања и лечења аберентних форми ових процеса и подизању нивоа успешности трудноћа.



Слика 2. Сигнална комуникација хуманог ембриона у стадијуму бластоциста и микроокружења матерналног ендометријалног ткива (модификовано из Norwitz и сар., 2001).

### 1.1.1. Трофобласти - опште карактеристике

Ћелије које израђују трофоектодермални слој бластоциста након браздања ембриона означавају се као трофобласти. Трофобласти (старогрчки *threphain* - хранити) обезбеђује хранљиве материје ембриону и играју кључну улогу у процесу имплантације, формирању фето-матерналног интерфејса и формирању плаценте, где сачињавају њен ембрионски слој (Roberts и Fisher, 2011). Карактеришу се високим степеном пролиферације, огромном метаболичком и транспортном активношћу, као и великим миграторним и инвазивним капацитетом.

Функционалне специфичности трофобласта и њихове морфолошке карактеристике чине их кључном целуларном компонентом у процесима одржавања и прогресије трудноће. Трофичка функција трофобласта је од пресудног значаја у исхрани и расту ембриона. Трофобласти се карактеришу изванредно великим капацитетом за трансцелуларни транспорт нутријената, елиминаторних продуката метаболизма ембриона и респираторних гасова, што омогућава успостављање и одржавање високог нивоа метаболичке размене између фетуса и организма мајке (Roberts и Fisher, 2011; Enders и Blankenship, 2012).

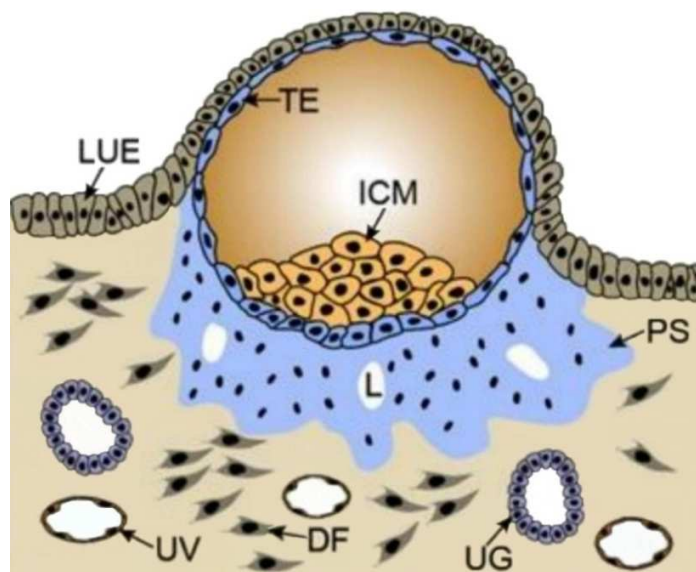
Током имплантације и плацентације, трофобласти врше инвазију у матернално ткиво децидуе где ремоделирају спиралне артерије утеруса, модификујући им зид и претварајући их у кесасте структуре повећаног дијаметра које губе особину контрактилности. Оваква васкуларна трансформација је од пресудног значаја у успостављању адекватног нивоа протока крви кроз фето-плаценталну јединицу (Red-Horse и сар., 2005). Инвазивни капацитет трофобласта у великој мери подсећа на инвазивни капацитет канцерних ћелија у метастази, са том разликом што се код трофобласта успоставља присуство регулаторних механизма којима матернално ткиво ограничава њихову инвазију само на функционални слој децидуе и на онај део миометријума где су смештене спиралне артерије (Soundararajan и Rao, 2004). Током ових процеса трофобласти подлежу низу промена обрасца генске експресије, интеракције са окружењем, цитоскелетног уређења и ћелијске морфологије. Инвазија трофобласта је изузетно сложен процес са великим бројем сигналних путева и ефекторских молекула, чија регулација зависи како од молекула које продукују сами трофобласти, тако и од бројних фактора ткивног окружења.

Поред снажних метаболичких и инвазивних перформанси, трофобласти испољавају и значајну ендокрину активност, собзиром да неке субпопулације трофобласта имају способност продукције различитих хормона и паракриних фактора који играју важну улогу у процесу одржавања трудноће, омогућавајући организму мајке да се адаптира на повишен ниво метаболизма (Staun-Ram и Shalev, 2005).



### 1.1.2. Диференцијација трофобласта (типови и функције)

Непосредно након имплантације, трофоектодермални слој који формира површину бластоциста диференцира хетерогене типове трофобласта (Cross и сар., 1994). Прве трофобластне ћелије које се развијају након иницијалног везивања бластоциста означавају се као цитотрофобласти (енг. *CTB* – *cytotrophoblasts*). Мононуклеарни цитотрофобласти фузијом генеришу примитивни синцицијални слој који се најпре позиционира у региону фето-матерналног интерфејса и вероватно представља најранију форму инвазије трофобласта у матернални ендометријум (Слика 3). Након формирања система лакуна, од којег касније настаје интервилозни простор, цитотрофобласти који се континуирано стварају у трофоектодермалном слоју генеришу примарне плаценталне ресице (плацентални вили) пролиферацијом и инвазијом кроз синцицијум (Knöfler и Pollheimer, 2013). Примарне плаценталне ресице, током прогресије трудноће се трансформишу у секундарне и терцијарне ресице које се карактеришу инвазијом ванембрионских мезенхимских ћелија, великом морфолошком разубењеношћу и снажном васкуларизацијом.



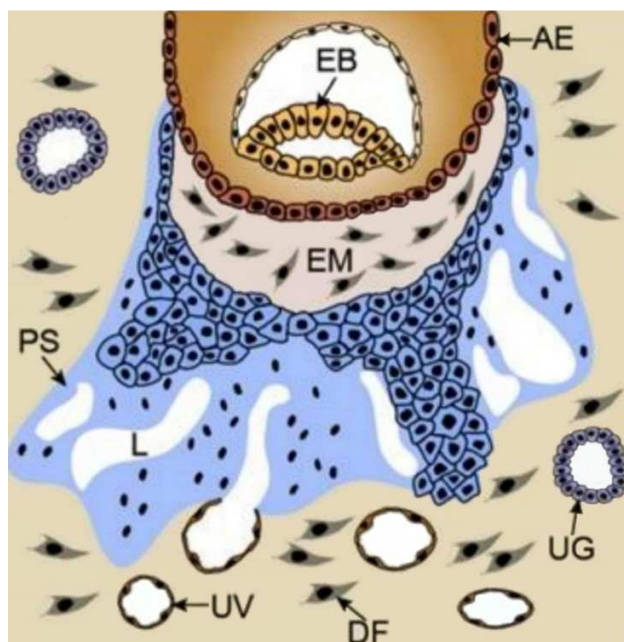
**Слика 3. Формирање трофобластног синцицијалног слоја и иницијално инвазија ембрионских структура на ендометријум (модификовано из Knöfler и Pollheimer, 2013).**

DF–децидуални фибробласт; ICM–унутрашња ћелијска маса; L–лакуна; LUE–епител лумена; PS–примитивни синцицијум; TE–трофоектодерм; UG–утерусна жлезда; UV– крвни суд материце.

Током првог триместра гестације могу се разликовати два типа плаценталних ресица: укотвљавајуће ресице (енг. *anchoring villi*) и плутајуће ресице (енг. *floating villi*).

Плутајуће плаценталне ресице, које затварају интервилозни простор представљају главне транспортне јединице хумане плаценте. Након успостављања протока крви у интервилозном простору, респираторни гасови, нутријенти и отпадни метаболички продукти пролазе ове ћелијске слојеве обезбеђујући адекватан фетални развој и раст. Синциотиотрофобласт, који прекрива површину плутајућих ресица, континуирано се ствара асиметричним деобама, диференцијацијом и фузијом цитотрофобласта (Aplin, 2010). Синциотиотрофобласт такође секретује многе хормоне у циркулацију мајке, од којих је најзначајнији хорионски гонадотропин (енг. *hCG* – *human chorionic gonadotropin*), неопходан за одржавање трудноће и имунолошку адаптацију (Bansal и сар., 2012).

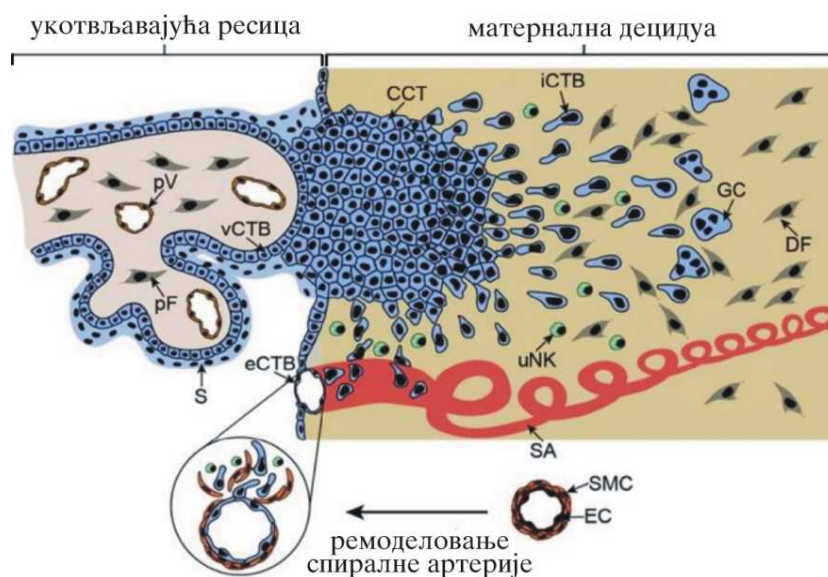
Након формирања плаценталних ресица, неки СТВ у оквиру укотвљавајућих плаценталних ресица пролиферацијом граде ћелијске колоне (стубиће) (Слика 4), у чијим дисталним регионима цитотрофобласти задобијају прелазни фенотип и диференцирају екстравилозне типове трофобласта који имају способност инвазије децидуализованог ендометријума, док цитотрофобласти у оквиру плутајућих плаценталних ресица остају везани за њихову базалну мембрану (Prakobphol и сар., 2006).



**Слика 4. Пролиферација цитотрофобласта и формирање ћелијских колона у оквиру укотвљавајућих плаценталних ресица (модификовано из Knöfler и Pollheimer, 2013).**

AE–амнионски епител; DF–децидуални фибробласт; EB–ембриобласт; EM–екстраембрионски мезодерм; L– лакуна; PS–примитивни синцицијум; UG–утерусна жлезда; UV– крвни суд матереце.

Цитотрофобласти плаценталних ресица прате један од два могућа пута диференцијације: 1) вилозни цитотрофобласти (енг. *vCTB – villous cytotrophoblasts*) који формирају једнослојни епител поларизованих стем ћелија, који перманентно пролиферишући, фузијом стварају синциотиотрофобласт који прекрива читаву површину плаценталних ресица или 2) екстравилозни цитотрофобласти (енг. *evCTB/EVT – extravillous cytotrophoblasts*) који се пробијају на одређеним местима кроз слој синциотиотрофобласта и пролиферацијом формирају вишеслојне колоне неполаризованих ћелија (Pijnenborg и сар., 2006). Један од типова екстравилозних трофобласта, ендоваскуларни цитотрофобласти (енг. *eCTB – endovascular cytotrophoblast*) врше инвазију матерналне спиралне артерије/артериоле (Pijnenborg и сар., 2006.) Спиралне артерије се развијају током друге половине менструалног циклуса под деловањем прогестерона, а диференцирају се од радијалних артерија које су локализоване на граници ендометријума и миометријума (Ferenczy и сар., 1979). Код жена код којих није дошло до концепције, спиралне артерије имају мускулозне зидове и добро развијену еластичну ламину која се смањује како се артерија пружа према ендометријуму. У одсуству имплантираног бластоциста, ови судови деградирају и елиминишу се у потпуности током менструалног крварења, док у случају присуства бластоциста започињу њихови постепени структурни реаранжмани који трају све до краја 22. недеље гестације (Robertson и Warner, 1974). У најранијим фазама ендоваскуларне инвазије ови трофобласти облажу њихове зидове како би спречили нагли удар крви у интервилозне просторе (Pijnenborg и сар., 2006). Дерегулација овог процеса често коинцидира са компликацијама трудноће, најчешће абортусима, због превременог и наглог пораста нивоа кисеоника који доводи до генерисања реактивних радикала кисеоника и оштећења плаценталних ресица (Burton и сар, 2010). У каснијим фазама, ендоваскуларни цитотрофобласти врше екстензивно ремоделирање структуре зида спиралних артерија. Ендоваскуларни трофобласти тада задобијају функцију ендотелских ћелија, експримирајући типичне васкуларне молекуле адхезије (Zhou и сар., 1997). Ова модификација резултује у проширењу дијаметра ових судова, чиме се иницира и одржава појачан проток крви кроз интервилозне просторе плаценте и тако омогућава одвијање повишене метаболичке активности и размене током трудноће (Слика 5).



**Слика 5. Миграција екстравилозних цитотрофобласта у децидуу и ремоделовање матерналних спиралних артерија** (модификовано из Knöfler и Pollheimer, 2013).

CCT–трофобласт у колони плаценталне ресице; DF–децидуални фибробласт; EC–ендотелска ћелија; eCTB–ендоваскуларни цитотрофобласт; GC–ћелија цин; iCTB–интерстицијални цитотрофобласт; pF–плацентални фибробласт; pV–плацентални крвни суд; SA–спирална артерија; S–синцицијум; SMC–глатка мишићна ћелија; uNK–утерусна NK ћелија; vCTB–вилозни цитотрофобласт.

Поред ендоваскуларне инвазије, мигрирају/инвазија другог типа екстравилозних трофобласта, интерстицијалних цитотрофобласта (енг. *iCTB* – *interstitial cytotrophoblast*) усмерена је ка децидуи где ове ћелије остварују комуникацију са различитим типовима ћелија утеруса, као што су ћелије природне убице (NK cells), макрофаги и стромалне ћелије децидуе (Bulmer и сар., 2010; Oreshkova и сар., 2012). Ове интеракције се сматају кључним за имунолошку адаптацију и прихватање феталних алогених антигена, као и за временско и просторно регулисање саме трофобластне инвазије (Redman и Sargent, 2010). Молекуларни механизми њихове миграције и инвазије су предмет бројних студија. Посебно значајном за плацентацију и репродуктиван успех чини се интеракција патерналног хуманог леукоцитног антигена C (HLA C) који је експримиран на површини интерстицијалних СТВ-а са матерналним имуноглобулин сличним рецептором ћелија убица (KIR) (Hiby и сар., 2004). Производња хормона трудноће, као што су плацентални лактоген и хорионски гонадотропин, полиплоидност и способност трансформације у тзв. дивовске ћелије (енг. *GC* – *giant cells*) плаценте, неке су од изузетних карактеристика екстравилозних инвазивних трофобласта (Zybina и сар., 2002; Handschuh и сар., 2007).

Поред ендоваскуларних цитотрофобласта, значајну улогу у васкуларном ремоделовању имају и интерстицијални цитотрофобласти који се приближавају судовима са спољашње стране и доприносе разградњи еластина и деградацији васкуларног зида артерија. Најупечатљивији аспект овог процеса је трофобластима индукована апоптоза васкуларних глатких мишићних ћелија (Harris, 2011; Robson и сар., 2012).

Трансформација материнских спиралних артерија у судове великог дијаметра обезбеђује обилан прилив нуртријената, смањује и елиминише контрактилност судова и обезбеђује перманентно висок и стабилан ниво кисеоника фетусу (Burton и сар., 2010). Изостанак трансформације спиралних артерија и генерална плетка инвазија екстравилозних цитотрофобласта региструје се у плаценти трудница са прееклампсијом и интраутериним застојем раста што указује да су програми трофобластне диференцијације и инвазивности значајно нарушени у овим типовима трудноћа (Pijnenborg и сар., 2006; Zhou и сар., 2013). Као последица слабе прокрвљености плаценталног ткива долази до ослобађања цитокина и продуката оксидативног стреса у циркулацију мајке што даље индукује ендотелијалне дисфункције (Manu и сар., 2000; Hung и сар., 2002). Абнормална контрактилност судова и повишен притисак могу да изазову циклусе хипоксије и реоксигенације плутајућих плаценталних ресица индукујући секрецију штетних цитокина и антиангиогених молекула као што је sFLT-1 (енг. *FMS like tyrosine kinase 1*), што води пропадању синциотиотрофобластних микропартикула (Redman и сар., 2012; Tal, 2012).

Вилозни и екстравилозни трофобласти се разликују како у функционалном, тако и у морфолошком аспекту. Обе групе показују присуство цитокератина што указује на њихову иницијално епителијалну природу, али се разликују у томе што еvСТВ експримирају хумани леукоцитни антиген класе I (HLA G), док vСТВ експримирају рецепторе за епидермални фактор раста (EGF) у много већој мери од еvСТВ. Ендоваскуларни цитотрофобласти поред експримирања цитокератина, ексклузивно експримирају и N-CAM. Сва три наведена типа ћелија обитавају у различитим ткивним микроокружењима због чега су окружени различитим типовима протеина ванћелијског матрикса, што се рефлектује на њихове експресионе профиле.

### 1.1.2.1. Регулација пролиферације и диференцијације екстравилозних цитотрофобласта

Диференцијација пролиферативних цитотрофобласта из колона плаценталних ресица у екстравилозне трофобласте који мигрирају у децидуално ткиво и артеријске судове укључује серију строго контролисаних молекуларних етапа које су још увек слабо расветљене. Узрок оваквог стања на пољу истраживања највећим делом лежи у чињеници да се процеси диференцијације екстравилозних цитотрофобласта релевантно могу проучавати само коришћењем плаценталних узорака првог триместра трудноће (*ex vivo* експланти), што је врло лимитирано услед постојања низа етичких ограничења. Највећи број података којима данас располажемо добијен је из експеримената на глодарским анималним моделима и на различитим хуманим ћелијским линијама трофобласта, што отвара могућност да наше тренутно разумевање ових процеса значајно одсупа у односу на механизме у хуманим *in vivo* системима.

Све више експерименталних података указује да је за правилно формирање и ток трудноће неопходно не само правилно регулисана инвазија, већ и адекватна диференцијација екстравилозних цитотрофобласта. Док се не успостави проток крви, формирање плаценте и диференцијација трофобласта контролисана је факторима секретованим из жлезда утеруса, као што је епидермални фактор раста (енг. *EGF* – *epidermal growth factor*) и васкуларни ендотелијални фактор раста (енг. *VEGF* – *vascular endothelial growth factor*), који се сматрају кључним у току ране плацентације и развоја ембриона и изгледа да промовишу трофобластну пролиферацију (Burton и сар., 2007). Раст трофобластних колона одакле се диференцирају екстравилозни цитотрофобласти, иницирање њиховог изласка и даља диференцијација највероватније су дириговани растућим концентрацијама кисеоника током трудноће, контактима са компонентама екстрацелуларног матрикса и солубилним факторима ендометријума, који делују у паракрином маниру. Један од најбоље проучених молекула из плаценталног мезенхима је инсулину сличан фактор раста 1 (енг. *IGF-I* – *Insulin-like growth factor 1*) који промовише пролиферацију и излазак трофобласта из плаценталних колона (Aplin и сар., 2000; Forbes и сар., 2008). Механизми који контролишу интегритет и стабилност ових колона допуштајући балансиран раст и диференцијацију, још увек нису расветљени, иако значајан број студија указује да би интеракције L-селектина експресованих на трофобластима колона и њихових угљенохидратних лиганата могли да имају одлучујућу улогу у овом

процесу (Prakobphol и сар., 2006). Концентрација кисеоника је још један потенцијално пресудан фактор у пролиферацији, миграцији и диференцијацији цитотрофобласта, имајући у виду да хипоксија промовише пролиферацију, док нормоксија стимулише њихову миграцију (Genbasev и сар., 1997). Различити транскрипциони фактори као што су кисеоник-зависни индуцибилни фактор хипоксије 1 $\alpha$  (енг. *HIF-1 $\alpha$  – oxygen-dependent hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ) и Stox1 (енг. *storkhead box 1*) имају критичну улогу у пролиферацији и инхибирају диференцијацију екстравилозних трофобласта (van Dijk и Oudejans, 2011). Временски зависно снижавање експресије ID2-а (енг. *inhibitor of DNA binding 2*) који спречава диференцијацију екстравилозних цитотрофобласта региструје се у нормалним трудноћама, док остаје повишен у прееклампсији (Janatpour и сар., 2000). Насупрот томе, AP-2 $\alpha$  (енг. *activating enhancer binding Protein 2 alpha*), сигнални трансдуцер и активатор транскрипције 3 (STAT3) и GCM1 (енг. *glial cell missing 1*) фактор промовишу инвазију и инхибирају пролиферацију цитотрофобласта у плаценталним колонама (Waszyk и сар., 2009; Biadasiewicz и сар., 2011). Сматра се да читав корпус регулаторних транскрипционих фактора контролише прелазак између трофобластне пролиферације и диференцијације екстравилозних цитотрофобласта који добијају миграциони потенцијал (Knöfler и Pollheimer, 2012). Ипак, случајеви ектопичних трудноћа указују на постојање снажног унутрашњег програма пролиферације и диференцијације (Wells, 2007).

Издазак екстравилозних цитотрофобласта из ћелијских колона праћен је и променом обрасца експресије различитих интегрина и кадхерина који се мења у режиму удаљавања од места њиховог формирања и у *in vivo* и у *in vitro* студијама, иако је прецизна молекуларна база ових промена и даље нејасна (Damsky и сар., 1994; Taga, 1998; Arlin и сар., 1999). У зависности од врсте комбинације својих субјединица интегрини се везују за различите врсте протеина ЕСМ-а нпр.  $\alpha 5\beta 1$  за фибронектин,  $\alpha 6\beta 1$  за ламинин итд. Више студија је показало да vСТВ и evСТВ експримирају различите врсте интегрини. Вилозни превасходно експримирају интегрин  $\alpha 6\beta 4$ , претежно локализован уз базалну мембрану плаценталних ресица. За разлику од њих evСТВ имају способност промене типа интегрини на својој мембрани током и након задобијања инвазивног фенотипа.

Још неки фактори раста и њихови рецептори играју одређену улогу у пролиферацији цитотрофобласта. Већина ових фактора раста и њихових рецептора се

експримира у и трофобластима и у канцерним ћелијама, што је још једна индикација сличних механизма миграције између ових ћелија. Међу овим молекулима су: фактор стимулације колонија 1 (CSF1), трансформишући фактор раста и његов рецептор (TGF), плацентални фактор раста (PIGF) и еритропоетин (Ferretti и сар., 2007).

### 1.1.2.2. Принципи ћелијске покретљивости

Механизам који лежи у основи ћелијске покретљивости састоји се из четири сукцесивна корака: 1) настанак протрузија на водећем крају ћелије, 2) адхезија ћелије за супстрат, 3) деадхезија (одвајање) и ретракција дисталних евагинација и 4) транслокација ћелијског тела (Ridley и сар., 2003; Vicente-Manzanares и сар., 2005) (Слика 6).

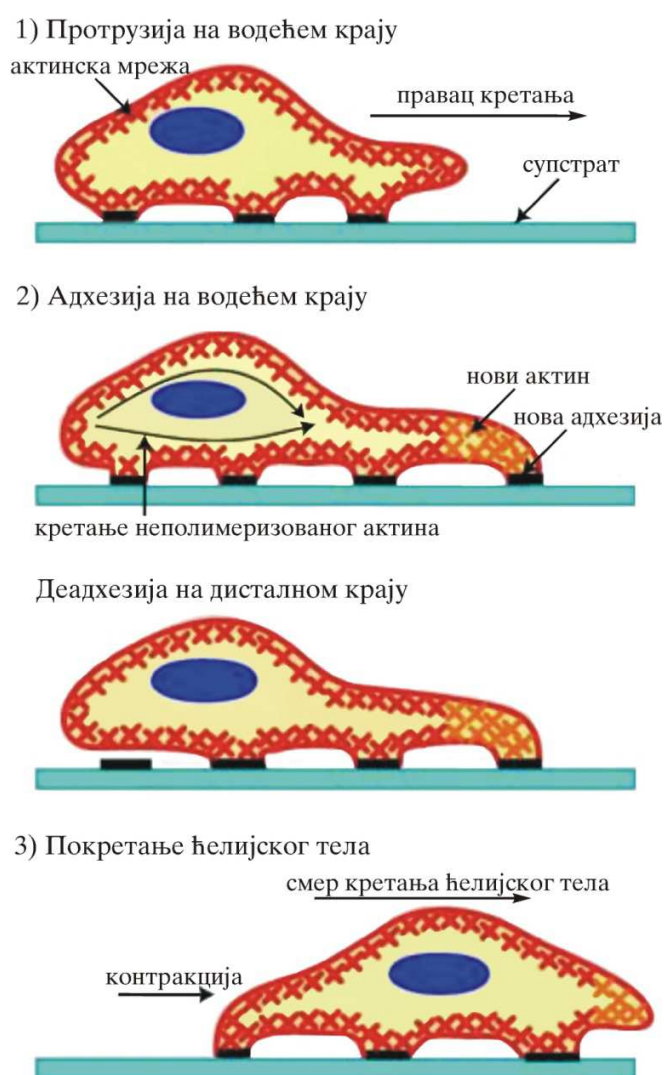
Стварање ћелијских протрузија дириговано је полимеризацијом актина у ламелиподијама и филоподијама (Pollard и Borisy, 2003). Филоподије су прстолике структуре дијаметра 0,1 до 0,3  $\mu\text{m}$  и достижу дужину до неколико микрона у зависности од ћелијског типа. Састоје се од 15-20 паралелних, чврсто везаних актинских филамената (Svitkina и сар., 2003; Gupton и Gertler, 2007; Mattila и Lappalainen, 2008). Филоподије су у великом броју заступљене код миграторних ћелија, као што су фибробласти, трофобласти, неурони, меланоцити или мезенхимске ћелије током ембрионалног развића. Актомиозинска контракција је контролисана малим Rho GTP-азама - Cdc42, Rac и RhoA (Jaffe и Hall, 2005).

Фокалне адхезије су места молекулских интеракција између ћелија и супстрата. Током ћелијског кретања фокалне адхезије се непрестано стварају и разграђују у одговору на екстрацелуларне контакте, омогућујући ћелијама динамичан однос са подлогом неопходном за кретање. Фокалне адхезије се стварају на водећем крају ћелије која мигрира и растављају на дисталном крају ћелије. Адхезије се такође растављају и у регионима водећег краја ћелије како би се створиле нове у процесу званом “адхезиони обрт” или како би задебљавале већ постојеће (Webb и сар., 2004). Најпокретљивији типови ћелија, нарочито у *in vivo* условима, немају велике фокалне адхезије које су обично карактеристичне за мање покретне ћелије у 2D (планарним) културама. Молекуларна структура стабилних адхезија и адхезија у настајању је слична. Талин директно повезује интегрине за актин и такође их активира (Nayal и сар., 2004). Многи актин везујући



протеини и сигнални молекули су такође везани са интегринима регулишући њихову активност (Zaidel-Bar и сар., 2004).

Ћелијска поларизованост која је есенцијална за усмерену (дирекциону) миграцију дефинисана је не само ћелијским протрузијама већ и позицијом једра и реоријентацијом Голџи апарата и организационог центра микротубула (МТОС) према водећем крају ћелије. Различите групе молекула регулишу ове процесе. Мала Rho GTP-аза (Cdc42) регулише позиционирање овог центра преко Rac протеина и РКС $\zeta$  која регулише динеин-динаткин комплекс, највероватније фосфорилацијом (Jaffe и Hall, 2005).



Слика 6. Ступњеви промене ћелијске морфологије и цитоскелета током процеса миграције (модификовано из Ananthakrishnan и Ehrlicher, 2007).

### 1.1.2.3. Регулација миграције и инвазије екстравилозних цитотрофобласта

Док разумевање хијерархијских интеракција критичних молекула који контролишу диференцијацију екстравилозних цитотрофобласта чека нове експерименталне податке, регулација трофобластне инвазије је испитивана у већем броју студија коришћењем примарних ћелијских култура, хориокарциномских и нетуморигених ћелијских линија. EVT представљају ћелије које велики број својих физиолошких улога у трудноћи остварују захваљујући свом високом миграционом и инвазионом потенцијалу, па је прецизна регулација ових процеса неопходан фактор правилне прогресије трудноће.

Различити инвазивни типови трофобласта продукују спектар протеаза, као што су металопротеиназе, активатор уринарног плазминогена и катепсина, који заједно деградују протеинске компоненте екстрацелуларног матрикса, омогућавају тиме ћелијску инвазију. Са друге стране, и екстравилозни трофобласти и ћелије децидуалног ткива производе ткивни инхибитор металопротеиназа (енг. TIMPs) и инхибитор активатора плазминогена (PAIs) како би се ограничио домет трофобластне инвазије. Солубилни молекули који су експримирани на интерфејсу фетуса и материце, а који стимулишу покретљивост трофобласта аутокриним и паракриним интеракцијама укључују хемокине, цитокине и факторе ангиогенезе (Lala и Chakraborty, 2003; Knöfler, 2010). Ови солубилни протеини нарочито стимулишу експресију и секрецију гелатиназа (металопротеиназа 2 и металопротиназа 9). Инхибиторни протеини као што су TNF- $\alpha$ , Nodal или TGF- $\beta$  могу да смање покретљивост трофобласта стимулацијом експресије TIMPs и PAIs (Haider и Knöfler, 2009; Nadeem и сар., 2011). Иако сви ови фактори и/или њихове комплексне интеракције контролишу миграцију и инвазију трофобластних ћелија, нејасно је да ли и у којој мери играју улогу у *in vivo* условима. Постоји могућност да модели ћелијских линија не рефлектују у потпуности поуздано понашање трофобласта у условима живог организма. У поређењу са примарним ћелијским културама, обрасци се разликују код ћелијских линија трофобласта. Профили генске експресије се разликују и међу различитим ћелијским линијама трофобласта (Bilban и сар., 2010). Ћелијска линија JEG-3 показује сличне обрасце експресије HLA C и HLA G детерминанти, који недостају вилозним (немигранторним) цитотрофобластима што је чини једним од најповољнијих модела за проучавање трофобластне миграције (Apps и сар., 2009).

Поред улоге у пролиферацији и диференцијацији екстравилозних цитотрофобласта, концентрација кисеоника и фактори који су њом регулисани изгледа да имају значајан допринос у регулацији покретљивости EVT-а. Експериментална блокада TGF- $\beta$ 3 (енг. *transforming growth factor beta 3*) зависног од HIF-1 $\alpha$  који промовише инхибицију трофобластне инвазије, доводи до значајног пораста њихове миграционе способности што указује на кључну улогу кисеоника у процесима миграције/инвазије екстравилозних цитотрофобласта (Caniggia и сар., 1999; 2000a).

До данас су детектовани бројни сигнални путеви који могу да допринесу регулацији покретљивости трофобласта. Фактори раста као што су hCG, EGF, HGF и IGF2 делују преко MAPK киназа и фосфоинозитид 3 киназа (PI3K) активирајући АКТ/mTOR (mammalian target of rapamycin) сигнални пут, док простагландини, производи активности циклооксигеназа делују преко Rho-Rock сигналног пута (Pollheimer и Knöfler, 2005; Knöfler, 2010). Поред експресије TIMPs и PAIs, снижена активност сигналних киназа може да представља механизам ограничавања трофобластне инвазије. Нпр. ендостатин, производ деградација децидуалног колагена XVIII снижава активност АКТ/mTOR сигналног пута који промовише ћелијску миграцију (Pollheimer и сар., 2011).

Међу хормонима, пептидима и њиховим рецепторима који учествују у миграцији и инвазији трофобласта су: варијанта хормона раста (hGH-V), хумани плацентални лактоген (HPL), пролактин (PRL), метенкефалин, ендорфин, урокортин, динорфини, соматостатин, тиреотропин-ослобађајући хормон (TRH), гонадотропин ослобађајући фактор (GnRH), инхибин, активин, фолистатин, неуропептид Y (NPY), ренин, окситоцин, релаксин, лептин, фактор некрозе тумора  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), адренкортикотропни хормон (ACTH), кортикотропин-ослобађајући фактор (CRF) и његови рецептори (CRF-R1 и CRF-R2) и рецептор за инхибиторни фактор леукемије (Ferretti и сар., 2007).

### **1.1.3. Молекули ћелијске адхезије као регулатори покретљивости трофобласта - улога интергрин и кадхерина у трофобластској миграцији**

Компоненте екстрацелуларног матрикса (енг. *ECM – extracellular matrix*) индукују адхезију, ширење, миграцију и диференцијацију ћелија преко својих специфичних рецептора, површинских протеина ћелијске адхезије – интегрин и кадхерина.

Интегрини су хетеродимерни трансмембрански гликопротеини који се састоје од различитих типова  $\alpha$  и  $\beta$  субјединица. У бројним студијама испитивана је експресија интегрин на трофобластима коришћењем имуноцитохемијских метода на исечцима ткива са имплантационог места (Korhonen и сар., 1991; Damsky и сар., 1992a;b; Arlin, 1993; Burrows и сар., 1993). Хумани цитотрофобласти првог триместра експримирају  $\alpha\beta_4$  ламинински рецептор. Како трофобласти мигрирају из плаценталних ресица, репримирају  $\alpha\beta_4$  рецептор, а експримирају  $\alpha_5\beta_1$  фибронектински рецептор и  $\alpha_1\beta_1$  колаген/ ламинински рецептор. Анализе показују да  $\alpha\beta$  интегринска субјединица наставља да се експримира у екстравилозним трофобластима и у оним регионима где је  $\beta_4$  субјединица већ репримирана (Burrows и сар., 1993), па се због тога  $\alpha\beta$  субјединица може наћи у комплексу са  $\beta_1$  градећи ламинински  $\alpha\beta_1$  рецептор (Damsky и сар., 1994). Ово указује да вилозни трофобласти ексклузивно експримирају интегринске рецепторе за ламинин, док код екстравилозних трофобласта долази до реаранжмана интегрин на ћелијској мембрани у смеру експресије интегрин за фибронектин као и за различите ламининске рецепторе. Адхезија за различите протеине матрикса је важна за трансформацију трофобластног фенотипа из сесилног у миграторни фенотип (Damsky и сар., 1994). Промена у интегринској експресији се не дешава када трофобласти показују аберантну миграцију, што је случај у неким патолошким стањима као што је прееклампсија и интраутерини застој раста. Инвазивни интерстицијални трофобласти нпр. у преекламптичној трудноћи не репримирају  $\beta_4$  интегринску субјединицу, нити појачавају експресију  $\alpha_1$  субјединице као што је случај у здравој трудноћи (Zhou и сар., 1993). Ови резултати указују да су неадекватне промене интегринске експресије током трудноће један од могућих механизма патогенезе наведених поремећаја.

У сваком случају, дистрибуција  $\alpha\beta_4$  ламининског рецептора на површини ћелије мења се како се трофобласти мигрирањем удаљавају од базалне ламине (Bischof, 1994). Експресија  $\alpha\beta_4$  интегрин је ограничена на базолатералну површину цитотрофобласта (Arlin, 1993), али док цитотрофобласти се одвајају од базалне ламине и мигрирају у колумне, експресија постаје униформна на читавој ћелији (Bischof, 1994). Овакав постепен губитак  $\alpha\beta_4$  рецептора за ламинин може да утиче на миграцију цитотрофобласта кроз колумне. Интерстицијални трофобласти експримирају најмање два типа рецептора за

ламнин,  $\alpha\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 1$ . Адхезија изолованих трофобласта за ламинин је инхибирана моноклонским антителом на  $\alpha 6$  и  $\beta 4$  субјединицу, док скоро да нема ефекта на  $\alpha 1$  и  $\beta 4$  (Burrows и сар., 1995).

Квантитативна и квалитативна експресија одговарајућих интегрина од стране екстрацелуларних трофобласта неопходна је за остваривање адекватне миграције трофобласта у децидуу. Детерминација фактора укључених у регулацију експресије интегрина могла би да доведе до разумевања процеса који леже у основи трофобластне инвазије. За сада је познато да неки цитокини утичу на степен експресије неких молекула ћелијске адхезије (Male и сар., 1995). Трансформишући фактор раста бета (TGF  $\beta$ ) појачава експресију низа интегринских хетеродимера у трофобластима ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  и  $\alpha 5\beta 1$ ) (Heino и сар., 1989). Други цитокини као што су IL-3, гранулоцитни фактор стимулације колонија (GM-CSF) и кит лиганд такође су се показали као физиолошки активатори експресије  $\alpha 4\beta 1$  и  $\alpha 5\beta 1$  интегрина у хематопоезским ћелијама (Lévesque и сар., 1995). Цитокини играју важну улогу и у експресији других молекула ћелијске адхезије у трофобластима. У време имплантације бројни цитокини се секретују и од стране трофобласта и леукоцита децидуе (Loke и King, 1995). Трофобласти експримирају велики број рецептора за цитокине и због тога могу да одговоре и на аутокрине и на паракрине медијаторе.

Молекулски сигнали преносе се у унутрашњост ћелије са екстрацелуларног матрикса преко интегрина (Hynes, 1994; Richardson и Parsons, 1995; Schwartz и сар., 1995). Бројни сигнални путеви, укључујући тирозин киназе и чланове Rho фамилије активирају се као резултат везивања интегрина за екстрацелуларни матрикс (Parsons, 1996). Интегринска сигнализација након адхезије трофобласта за ламинин, фибронектин и колаген, преко ових сигналних путева утиче на генску експресију. Активација тирозин киназе, (претежно pp125FAK) изгледа да има централну улогу у интегринској сигнализацији. FAK се фосфорилише након комплексовања интегрина са лигандима матрикса (Schaller и Parsons, 1994), а потом се на овим местима куплују сигнални протеини са src хомологим доменима (Parsons, 1996). На овај начин FAK могу интегрисати мултипле сигнале са различитих интегринских рецептора (Clark и Brugge, 1995).

Поред интегрина који учествују у остваривању контакта са компонентама екстрацелуларног матрикса, важну улогу у регулацији миграције трофобласта припада

једној другој групи протеин ћелијске адхезије. Молекули адхерентних веза трофобласта (Е-кадхерини,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, и  $\gamma$ -катенини) играју важну улогу у диференцијацији трофобласта, као и у инвазији и ремоделирању артерија утеруса (Coutifaris и сар., 1991; Babawale и сар., 1996; Zhov и сар., 1997; Тага, 1998; Arlin, 1999). Е-кадхерини су чланови фамилије  $\text{Ca}^{2+}$  зависних протеина међућелијске адхезије. Интрацелуларни домен Е-кадхерина интерагује са актинским цитоскелетом преко бројних протеина, укључујући  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  катенин (Nakamura и сар., 2005). Плакоглобин и  $\beta$ -катенин имају висок степен хомологије и везују се директно за цитоплазматски реп Е-кадхерина, док  $\alpha$ -катенин посредује њиховом везивању за актински цитоскелет. Ова структура се у литератури често означава као АЈ (adherent junction) комплекс. Ремећење експресије компоненти овог комплекса, нарочито Е-кадхерина доводи се у везу са инвазијом и метастазама великог броја хуманих канцера (Berg и сар., 1998; Nakamura и сар., 2005). Снижавање нивоа експресије Е-кадхерина је детектован у трофобластима који задобијају инвазивни фенотип (Floridon и сар., 2000). Поред великог броја фактора раста, цитокина и компоненте ванћелијског матрикса на сличан начин утичу на експресију кадхерина и интегрина. Механизми којима се остварује репримирање експресије Е-кадхерина укључују соматске мутације, транскрипциону репресију и метилацију промотора (Strathdee, 2002). Инвазија трофобласта је бар делимично, епигенетски регулисан механизам, с обзиром да је посредована репресијом гена за Е-кадхерин и плакоглобин процесом метилације. Репресија промотора гена се одржава симултаном активношћу ДНК-метилтрансфераза (DNMT 3а и DNMT 3b). Регулација активности ова два ензима може да буде кључна за успешну плацентацију и развој фетуса (Rahnama и сар., 2006).

У епителијалним ћелијама, АЈ комплекс игра значајну улогу у одржавању интерцелуларних адхезионих веза и нарушавање овог комплекса доводи до губљења међућелијских контаката (Savanger, 2001) и снажно је повезан са прогресијом тумора епитела (Behrens и сар., 1989; Hirohaski, 1998). У неопластично трансформисаним ткивима репресија плакоглобина и Е-кадхерина је јако важан корак у инвазији туморских ћелија у околно ткиво (Takeichi, 1993; Birchmeier, 1994; Verx и сар., 1995; Christofori и Semb, 1999; Mukhina и сар., 2004). Хиперметилација Е-кадхерина и плакоглобинског промотора, која је показана у великом броју канцера укључујући канцер плућа, јајника, простате и бубрега (Winn и сар., 2002; Breault и сар., 2005; Prakash и сар., 2005; Shiina и сар., 2005),

карактерише се смањеном експресијом гена за плакоглобин и Е-кадхерин (Christofori и Semb, 1999; Cheng и сар., 2001; Shiina и сар., 2005). Сличан принцип индукције ћелијске покретљивости кадхеринима може се применити и на трофобластне ћелије, имајући у виду да миграција и инвазија цитотрофобласта током имплантације у великој мери подсећа на инвазију малигно трансформисаних ћелија (Yagel и сар., 1998). Репримирање експресије плакоглобина и Е-кадхерина широко је повезано са морфолошким променама током диференцијације трофобласта (Vicovac и Aplin, 1996; Thiery, 2003). Експерименти показују да 5'-aza-2'-deoxycytidine, који се користи као блокатор метилтрансферазе (Jones и Taylor, 1980), стимулише експресију плакоглобина и Е-кадхерина у трофобластима. Ово је праћено повишеном количином плакоглобина и Е-кадхерина на местима интерцелуларних интеракција, што има за последицу драстично смањење покретљивости ћелија линије JEG-3. Сходно томе, репресија гена за плакоглобин и Е-кадхерин метилацијом може представљати један од механизма који трофобласти користе за инвазију на зид спиралних артерија, а ДНК метилација је можда главни механизам регулације миграције у плацентацији. Једна студија је показала да интерлеукин-1 (IL-1) снижава ниво експресије Е-кадхерина и доводи до пораста инвазивности трофобластних ћелија линије JEG-3 хуманог хориокарцинома, док је TGF- $\beta$ 1 посредована експресија Е-кадхерина повезана са смањеном инвазивношћу (Karmakar и Das, 2004).

## **1.2. Металопроотеиназе - структура, активација и улога у ћелијској миграцији**

Да би остварили своје физиолошке функције, трофобласти поред миграторног потенцијала, поседују и са њим нераскидиво повезану инвазиону способност. Раније смо наводили постојање велике сличности између цитотрофобласта који врше инвазију на миометријум и канцерних ћелија у фазама метастазе, са том разликом да је миграција/инвазија трофобласта много јаче регулисан и ограничен процес. Једна од најзначајних компоненти инвазивности ових типова ћелија је присуство протеиназа. Многе протеазе, рецептори протеаза и инхибитори протеаза имају сличан образац експресије код трофобласта и код малигнућ ћелија. Ове протеазе укључују неколико чланова фамилије металопроотеиназа (Bischof и сар., 2000). Металопроотеиназе (ММП), које се називају матриксини, су породица од бар 24 цинк-зависне ендопептидазе које су способне да

деградују све компоненте екстрацелуларног матрикса. Трофобласти и канцерне ћелије експримирају MMP-2 (гелатиназа А) и MMP-9 (гелатиназа Б) (Isaka и сар., 2003) које деградују колаген тип IV (главну компоненту базалне ламине) и денатурисан колаген (гелтинин), MMP-11 (позната и као стромелизин-3), која деградује нативни колаген, и мембранску металопротеиназу MMP-1, за коју се сматра да активира прогелатиназу А. Улога матриксних металопротеиназа у процесима ћелијске покретљивости и инвазије добро је позната и у процесима ремоделовања здравих ткива (нпр. расту, хематопоези, плацентацији), као и у различитим патолошким стањима. Металопротеиназе своју улогу остварују деградујући протеине строме ванћелијског матрикса и интеракцијом са рецепторима на ћелијској површини (Deryugina и Quigley, 2006; Malemud, 2006). Дерегулација биосинтезе, секреције и активности металопротеиназа индикована је у ангиогенези тумора, канцерној инвазији и метастазама, запаљенској упали бешике, артритису, атеросклерози, као и у респираторним и срчаним обољењима (Bjorklund и Koivunen, 2005).

Матриксне металопротеиназе или матриксини су група ендопептидаза која спада у велику фамилије метцинцин протеаза. У свом активном центру садрже јон цинка и захтевају јон калцијума за своју каталитичку активност. MMP врше деградацију свих компоненти екстрацелуларног матрикса и базалне ламине, због чега имају одлучујућу улогу у ремоделовању ткива и ћелијској миграцији (Verma и Hansch, 2007). У последње време све више је података да ови ензими регулишу ослобађање или активацију хемокина, цитокина, фактора раста, антибиотских пептида и других биоактивних молекула учествујући тако у физиолошким процесима као што су урођена и адаптивна имуност, ангиогенеза, ремоделовање костију и раст аксона.

У готово свим групама организама, нађена је велика сличност у каталитичким доменима металопротеиназа. Најмање 25 различитих металопротеиназа је пронађено код кичмењака, од којих су 24 присутне код људи. Еволуциони биолози предпостављају да је генска фамилија која кодира ове ензиме настала дупликацијом. Група гена који кодирају један број металопротеиназа је локализован на хромозому 11q22, док гени осталих металопротеиназа показују дисперговану локализованост на бар 10 различитих хромозома (Fanjul-Fernandez и сар., 2010). Иако је активност металопротеиназа показана кључном у биолошким феноменима на нивоу ћелије и у бројним фундаменталним физиолошким



просецима који укључују ремоделовање ткива, као што су ангиогенеза, развој костију, зарастање рана, имплантацију, плацентацију и у развоју ткива дојке (Page-McCaw и сар., 2007), појачан интерес за разумевање регулације активности ових ензима проистиче из чињенице да су укључени у неколико патолошких стања, као што су канцер и поремећаји хроничне инфламације (Lopez-Otin и Matrisian, 2007).

Имајући у виду њихову широку супстратну специфичност, металопроотеиназе су важан регулаторни фактор ткивне хомеостазе и имунитета у мрежи мултифункционалне комуникације у оквиру ткива. Пошто неконтролисана активност ових протеаза лако може да доведе до нарушавања хомеостазе, активност мора бити строго регулисана.

Каталитичка активност металопроотеиназа снажно је контролисана на четири различита нивоа: 1) експресија гена уз транскрипционе и пост-транскрипционе регулације; 2) екстрацелуларна локализација, као и ткивна или ћелијска специфичност типа MMP који се ослобађа; 3) активација про-ензима уклањањем про-домена; и 4) инхибиција специфичних ензимских инхибитора, односно ткивних инхибитора металопроотеиназа (TIMPs) и не-специфични инхибитори протеиназе (нпр.  $\alpha$ 2-макроглобулин). Једном активне, MMP могу да модулишу глобални протеолитички потенцијал екстрацелуларног миљеа путем активације зимогена (MMP про-форма) и деградације инхибитора или инактивацијом других протеаза (Overall и Lopez-Otin, 2002; Ra и Parks, 2007).

Иако је експресија MMP гена првенствено регулисана на транскрипционом нивоу, пост-транскрипциона регулација стабилности иРНК цитокинима, азот моноксидом или микро-РНК (miRNA) сматра се значајним механизмом који модулише активности ових ензима. Модулацији активности ових ензима доприноси већи број сигналах молекула, мада ниједан појединачан цитокин, хемокин, онкоген или фактор раста није окарактерисан као ексклузивни индуктор њихове експресије и активности, мада се често наводе фактор некрозе тумора-алфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлеукин-1 (IL-1) као главни потенцијални кандидати (Vincenti и Brinckerhoff, 2007).

Металопроотеиназе се синтетишу као неактивне про-форме (зимогени) са про-доменом који треба да се уклони како би се извршила активација. Про-домен садржи висококонзервисану цистеинску "прекидач" секвенцу у непосредној близини каталитичког домена и њена интеракција са каталитичким центром који садржи јон цинка одржава ензим у неактивном стању, спречавајући протеолитичку деградацију интрацелуларних

супстрата (Ra и Parks, 2007). Сматра се да је активација зимогена вероватно иницирана механизмима у којима учествује више од једног молекула. Активација про-ММП-а је постепен процес који започиње у перичелуларном простору, непосредно по егзоцитози везикула са проензимом. Први корак обухвата промену конформације у оквиру пропептида, што доводи до слабљења цистеин-цинк интеракције, а затим се про-домен уклања интра- или интермолекуларном обрадом делимично активираних ММП-а интермедијара или већ активних металопротеиназа (Van Wart и Birkedal-Hansen, 1990). Додатно, екстрацелуларна активација већине ММП-а укључује и урокиназни активатор плазминогена (uPA), плазминоген, тромбин и еластазу (Strongin и сар., 1995). Добро проучен пример активације од стране већег броја молекула је активација про-ММП-2, реализоване кооперативном акцијом TIMP-2 и MMP-14 који граде комплекс за активирање заједно са проензимом на површини ћелијске мембране (Itoh и сар., 2001). Алтернативни механизам активације зимогена је вероватно иницирао унутрашњом алостерном променом самог ММП молекула (Sela и сар., 2010). Још један значајан механизам активације у *in vitro* условима је третман тиол-модификујућим агенсима, као што су једињења живе, SDS, оксидовани глутатион и реактивне врсте кисеоника (ROS), који води активацији неколико металопротеиназа. Код човека, активација ових ензима реактивним врстама се нарочито запажа током имунске реакције у макрофагама и неутрофилима. Активација ММП реактивним врстама кисеоника спроводи се вероватно оксидацијом тиол-цинка што води аутокаталитичком исецању, али се јавља одложена инактивацији ензима како се продужава време инкубације, вероватно због оксидационих оштећења аминокиселина кључних за аутокаталитичку активност ензима, како је показано у *in vitro* експериментима за MMP-7 (Fu и сар., 2004). Зато продукција ROS-а од стране фагоцита може да регулише и инактивацију металопротеиназа током процеса инфламације, што је показано на макрофагама које задржавају или чак смањују ниво активности MMP-12 током процеса зарастања повреде ткива (Kassim и сар., 2005). У сваком случају, није потпуно расветљено да ли реактивне врсте кисеоника могу да делују као активатори/инактиватори ММП ензима *in vivo*.

Металопротеиназе, нарочито MMP-2 секретују се из ембриона већ на ступњу бластоциста (Wang и сар., 2003). Новије студије показују да се MMP-2 и MMP-9 различито експримирају током првог триместра, при чему је MMP-2 преобладајуће заступљена

током раног првог триместра (6. – 8. недеље), док MMP-9 постаје доминантно присутна током касног првог триместра трудноће (9. – 12. недеље) (Staun-Ram и сар., 2004). Успешна имплантација и инвазија трофобласта уско су повезани са експресијом металопротеиназа, које имају способност деградације базалне ламине и ванћелијског матрикса. MMP-2 и MMP-9, које деградују колаген IV, главну компоненту базалне ламине експримирају се у трофобластима и због тога се сматрају кључним ензимима у инвазионом процесу ових ћелија (Librach и сар., 1991). Металопротеиназе поред деградације екстрацелуларног матрикса вероватно остварују још нека важна деловања у процесу имплантације, што укључује регулације биоактивности фактора раста, цитокина и фактора ангиогенезе (Salamonsen и сар., 2001). Са друге стране, експресија металопротеиназа у трофобластима је регулисана великим бројем екстрацелуларних сигнала од којих су најпознатији епидермални фактор раста (EGF), фактор некрозе тумора- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), фактори ангиогенезе, трансформишући фактор раста- $\beta$  и интерлеукини (Staun-Ram и Shalev, 2005).

### **1.3. Улога циклооксигеназа и простагландина у покретљивости и диференцијацији трофобласта**

Циклооксигеназа (COX) је кључан ензим који катализује конверзију арахидонске киселине у простагландине, који су есенцијални за процесе репродукције сисара. Простагландин E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) је физиолошки најважнији простагландин који делује у аутокрином и паракрином маниру и регулише већи број физиолошких функција (Nakanishi и Rosenberg, 2013). PGE<sub>2</sub> је укључен у регулацију децидуализације (Frank и сар., 1994), вероватно стимулацијом интерлеукина 11 (IL-11), јер блокада овог интерлеукина редукује децидуализацију, а инхибиција циклооксигеназе редукује продукцију у неким ћелијама плаценте (Dimitriadis и сар., 2005). Код пацова је експресија рецептора за простагландин 2 повишена у ендометријуму на месту имплантације, достижући врхунац 6. дана трудноће (Shi и сар., 2005). Фосфолипаза A<sub>2</sub> и PGE<sub>2</sub> су повишени у хуманом ендометријуму током прозора имплантације (Као и сар., 2002). Експерименти на мишевима су показали да су простагландини есенцијални за исправну имплантацију, а редуковани нивои COX-2 одлажу имплантацију и доводе до рађања потомака са мањом масом (Deu и сар., 2004).

Експресија COX-1 и COX-2 су повишене код мишева и у фази бластоциста (Tan и сар., 2005).

Описане су две форме циклооксигеназа: COX-1 и COX-2. Експресија COX-1, која генерише простагландин 1 (PTGS1), је конститутивна у већини ткива и укључена је у одржавање ткивне хомеостазе, док је експресија COX-2 (синтетише PTGS2) индукована различитим стимулусима, укључујући цитокине, митогене и хипоксију (Kniss, 1999). Велики број студија показује да је експресија COX-2 повишена у неколико типова хуманих канцера, укључујући канцер коже, јетре, дојке, плућа, јајника (Bae и сар., 2001; Shirahama и Sakakura, 2001; Li и сар., 2004; Lee и сар., 2013), док инхибитори овог ензима значајно редукују прогресију неких тумора (Howe и Dannenberg, 2003). Улога циклооксигеназа 2 индикована је у инвазији и епителско мезенхимској транзицији трофобласта, што указује да овај ензим може бити значајан фактор у регулацији миграције и диференцијације трофобласта (Zuo и сар., 2016).

#### **1.4. Морфолошке промене цитоскелета трофобласта током миграције/инвазије**

Покретљивост трофобласта се реализује пратећи велике цитоскелетне реаранжмане које доводе до крупних морфолошких промена трофобласта, неопходних да би се извршили процеси кључни за имплантацију и плацентацију, а који укључују везивање за ендометријум, дисеминацију трофобластних ћелија из плаценталних ресица и њихову инвазију у матерналну децидуу (Norwitz, 2001; Dey, 2004). Велики број лиганда индукује миграцију трофобласта, а понашање ових ћелија не одступа од генерализоване слике покретних ћелија у миграцији. Третман трофобласта овим лигандима доводи до низа морфолошких промена што је последица редистрибуције цитоскелетних компоненти, у првом реду актина. Формирају се ламелиподије, трофобласти задобијају мезенхимски (вретенаст) облик, особину свих покретних ћелија и јављају се промене у локализацији и структури фокалних адхезија (Iwashita, 2002). Фокалне адхезије поред интегрина, садрже широк спектар протеина, укључујући друге протеине цитоскелета, протеин-киназе, фосфатазе и низ сигналних молекула локализованих са винкулином у региону самих фокалних адхезија (Zamir и Geiger, 2001). Везивањем интегрина за компоненте екстрацелуларног матрикса индукују се процеси фосфорилације и долази до усложњавања

структуре фокалне адхезије додатном акумулацијом цитоскелетних протеина на местима интеракције (Schwartz и сар., 1995; Yamada и Miyamoto, 1995). Имуноцитохемијска бојења показују да редистрибуција актинског цитоскелета на инвазивном крају води формирању ламелиподија. Стимулисане ћелије показују већу количину винкулина и његову већу структуралну уређеност, док у контролним ћелијама винкулин није повезан са актинским филаментима. Фосфорилисане киназе фокалних адхезија (ФАК) које се активирају фосфорилацијом тирозинских резидуа, локализоване су у оквиру фокалних адхезија, док се у нетретираним ћелијама трофобласта ове киназе уопште не детектују на периферији ћелије (Iwashita, 2002).

#### 1.4.1. Трофобласти vs канцерне ћелије

Пролиферативно понашање вилозних и екстравилозних цитотрофобласта у великој мери подсећа на понашање неопластично трансформисаних ћелије које испољавају туморигени фенотип, при чему ова трансформација започиње да се одиграва у локализованим туморима пре присуства метастаза (Gupta и сар., 2005). Цитотрофобласти, као и канцерне ћелије, показују висок пролиферативни потенцијал и одсуство контактне инхибиције, две главне особине коју испољавају сви типови канцерних ћелија. Међутим, за разлику од канцерних ћелија, раст и пролиферација цитотрофобласта у плаценталним колонама је строго регулисана и оне престају да се деле када крену у процес инвазивне трансформације (Pollheimer и Knofler, 2005). Међутим, након диференцијације пролиферативних еVСТВ у миграторне/инвазивне еVСТВ њихово понашање поново блиско подсећа на канцерне ћелије које испољавају метастатски фенотип, будући да инвазивни цитотрофобласти деле са овим ћелијама врло сличну способност активне инвазије (Poste и Fidler, 1980). Код инвазивних цитотрофобласта, као и код канцерних ћелија у метастази, инвазија није производ физичког увећавања ткива и последичног пасивног померања ћелија, већ активан процес који укључује сигналну интеракцију ћелије са базалном мембраном паренхима, крупне морфолошке реаранжмане ћелије, ретракцију (повлачење) ћелијског тела и секрецију протеаза које доводе до деградације базалне мембране и трасирају кретање кроз околно везивно ткиво (Bischof и сар., 2000; Staff, 2001). Ипак, за разлику од канцерних ћелија, миграторни и инвазивни дOMET екстравилозних цитотрофобласта је просторно и временски строго регулисан. Захваљујући високо

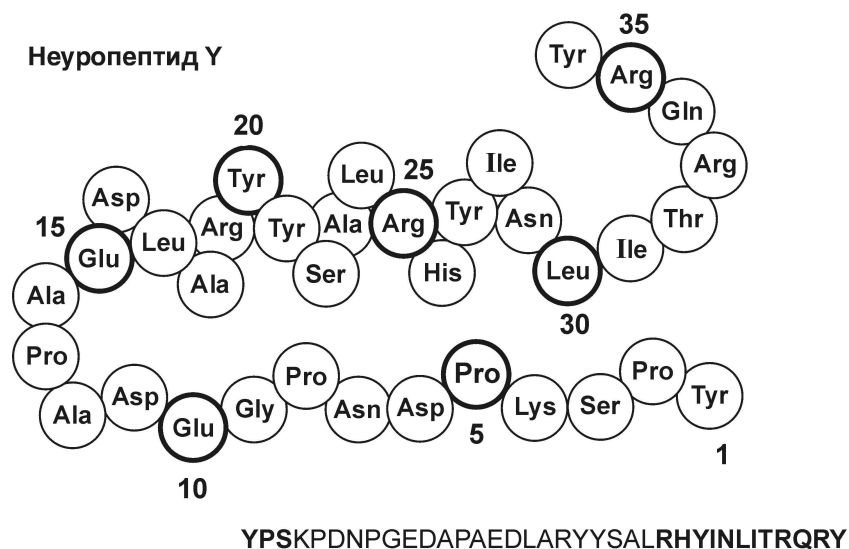
контролисаном процесу миграције/инвазије, инвазивни цитотрофобласти успешно остварују своје физиолошке функције омогућавајући ефикасно имплантирање ембриона, формирање плаценте и адекватну прогресију трудноће, док канцерне ћелије индукују настанак неопластичних трансформација и метастаза будући да су ови регулаторни механизми изгубљени.

Аналогно понашање цитотрофобласта и канцерних ћелија потичу већим делом из њихових сродних генетичких програма, односно образаца њихове протеинске експресије. Међу овим регулаторним генима/протеинима су протоонкогени, фактори раста, адхезивни површински протеини, ензими, рецептори за ензиме и ензимски инхибитори, као и бројни хормони и регулаторни пептиди. Важну улогу у остваривању миграторног и инвазивног капацитета ових ћелија имају гени и протеини укључени у избегавање имунског одговора организма домаћина (Ferretti и сар., 2007). Због великих сличности у миграционим механизмима и инвазионом понашању, расветљавање принципа регулације трофобластне миграције може значајно допринети бољем разумевању механизма метастаза тумора.

## 1.5. Неуропептид Y - структура, биосинтеза и рецептори и функције

Неуропептид Y (NPY) припада фамилији биолошки активних пептида и заједно са друга два сродна протеина, пептидом YY (PYY) и панкреасним полипептидом (PP) чини такозвану фамилију неуропептид Y. Овај биоактивни молекул састоји се од 36 аминокиселинских резидуа, а преглед његове пуне аминокиселинске секвенце дат је на **Слици 7**. Неуропептид Y је еволутивно високо конзервисан протеин, са преко 90% хомологије између различитих група кичмењака (Larsson и сар., 2008), што имплицира да је остао готово потпуно непромењен током више од 400 милиона година. Овако висок степен еволутивне конзервираности указује на важну улогу коју NPY има у организму (Cohen и сар., 2009). NPY се синтетише у ендоплазматичком ретикулуму као прекурсорни протеин релативно велике молекулске масе, након чега се транслоцира у Голџи комплекс. Када се јави потреба за секрецијом NPY-а, прекурсорни пептид пролази неколико пост-транслационих модификација и неколико ступњева протеолитичког исецања, пре него се егзоцитозом ослободи у екстрацелуларни простор. У ванћелијском простору NPY може да подлегне даљој протеолизи, којом се добијају пептиди различите дужине. Аминопептидаза P (енг. *APP – aminopeptidase P*) и дипептидил пептидаза IV (DPP-IV) су два главна

протеолитичка ензима задужена за исечање NPY до форме NPY<sub>2-36</sub>, односно NPY<sub>3-36</sub> (Hörsten и сар., 2004).

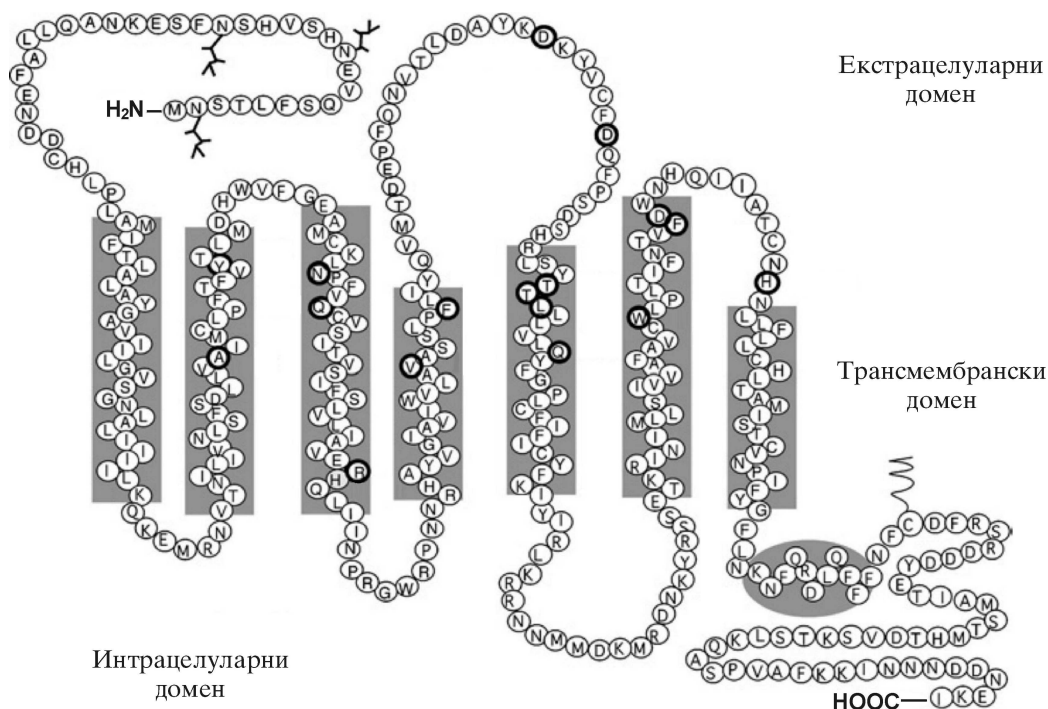


Слика 7. Аминокиселинска секвенца неексцизованог нативног неуропептида Y (модификовано из Robertson и сар., 2011).

Све своје функције NPY регулише везивањем за G-купловане рецепторе који су дистрибуирани у већем броју органа (Pedrazzini и сар., 2003). До данас је описано 7 различитих рецептора неуропептида Y (Y<sub>1</sub>-Y<sub>8</sub>) код кичмењака, од којих су пет присутни код сисара (Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub>, Y<sub>5</sub>, Y<sub>6</sub>). Наведених 5 врста рецептора за NPY припадају класи А родопсин-сличних рецептора куплованих са G протеином (GPCR) (Pedragosa-Badia и сар., 2013) (Слика 8). Док су Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> и Y<sub>5</sub> рецептори функционални код свих сисара, Y<sub>6</sub> рецептор није функционалан у већем броју сисарских врста укључујући људе, а у потпуности изостаје код пацова. (Bromee и сар., 2006). Рецептор који је означава као Y<sub>3</sub>, окарактерисан је као хемокински рецептор тип 4 због чега се сврстава у хемокинску фамилију рецептора, али његово клонирање до данас није успешно обављено (Alexander и сар., 2013).

NPY показује снажан афинитет према Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> и Y<sub>5</sub> рецепторима, док је PP снажан агонист Y<sub>4</sub> рецептора (Alexander и сар., 2013). Као и сам неуропептид Y, његови рецептори (доминантно Y<sub>1</sub> и Y<sub>2</sub>, а у мањој мери и Y<sub>5</sub>) су широко заступљени у можданом ткиву и испољавају специфични образац дистрибуције у ЦНС-у (Харели и сар., 2006), посредујући на тај начин широким спектром физиолошких функција NPY (Pedrazzini и сар., 2003).

Подручја мозга која експримирају ова два типа рецептора су фронтални кортекс, латерални септум, ARC (*nucleus arcuatus*), лежеће једро *stria terminalis*, PVH (паравентрикуларно једро), латерални хипоталамус, амигдала и хипокампус (Корр и сар., 2002; Ева и сар., 2006). Насупрот томе, рецептор се експримира у само неколико можданих региона као што су медијално преоптичко подручје, PVH, NTS и ареа постерма (Kask и сар., 2002).



**Слика 8. Генерализована структура хуманог рецептора за неuropeпид Y GPCR типа (пример Y<sub>1</sub> рецептора) (модификовано из Sjödín и сар., 2006).**

Експресија Y<sub>5</sub> рецептора се региструје у неколико лимбичких партиција мозга, али у мањој мери у односу на Y<sub>1</sub> и Y<sub>2</sub> рецепторе (Dumont и сар., 1998; Morales-Medina и сар., 2010). У зависности од дужине, ови пептиди делују преко G-куплованих рецептора: Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub>, Y<sub>5</sub>, и Y<sub>6</sub> који није функционалан код људи (Michel, 2004; Merten и Beck-Sickinger, 2006; Brothers и Wahlestedt, 2010; Yulyaningsih и сар., 2011). Протеолитичко исецање не инактивира неuropeпид Y, већ му блокира афинитет за Y<sub>1</sub> рецептор, при чему пептид задржава афинитет Y<sub>2</sub> и Y<sub>5</sub> рецептор. На овај начин ове пептидазе, нарочито DPP-IV, која је обилно присутна у ендотелијалним, епителијалним и имунским ћелијама, делују као конвертујући ензим, одређујући врсту активности коју NPY локално остварује.



### 1.5.1. Физиолошке функције неуропептида Y

Неуропептид Y један је од највише заступљених неуропептида у централном нервном систему, а чињеница да му се мењају концентрација и профил експресије у зависности од различитих стимулуса и у физиолошким и у патофизиолошким условима, указује на његову битну улогу у многим функцијама, и у оквиру ЦНС-а и ван њега (Zhang и сар., 2014). У самом ЦНС-у неуропептид Y се ослобађа локално на ГАВА-ергичким интернеуронима (Karagiannis и сар., 2009), али се може допремити кроз крвно-мождану баријеру и са других места његове продукције (Kastin и Akerstrom, 1999). У ЦНС-у NPY је главни регулатор апетита, енергетске хомеостазе (Lin и сар., 2004), учествује у механизмима стреса (Hirsch и Zukowska, 2012), као и у регулацији анксиозности, формирању меморије и когнитивним процесима, а у последње време све више се показује његова улога у регулацији механизма ноцицепције (Decressac и Barker, 2012). Неуропептид Y модулира ексцитаторну неуротрансмисију и регулише хиперексцитабилност, нарочито у региону хипокампуса (Baraban и сар., 1997). Његова улога потврђена је у патогенези неколико неуролошких обољења укључујући неуродегенеративне болести, као што су Алцхајмерова и Хантингтонова болест (Decressac и Barker, 2012) и епилепсији темпоралног режња (Marksteiner и сар., 1989; 1990; Vezzani и Sperk, 2004), код које је чак примећен антиконвулзивни и неуропротективни ефекат (Decressac и Barker, 2012; Malva и сар., 2012). Изван ЦНС-а се може наћи на крајевима симпатикусних нерава, где посредује вазоконстриктивним ефектима, у надбубрежној жлезди, плаценти и тромбоцитима (Hirsch и Zukowska, 2012). Ћелије које имају NPY рецепторе у ЦНС-у нису само неурони, већ и астроцити (Santos-Carvalho и сар., 2013; Pazos и сар., 2014), прекурсори олигодендроцита (Howell и сар., 2007), микроглија (Ferreira и сар., 2010; 2011) и ендотелске ћелије судова мозга (Zukowska-Grojec и сар., 1998), које су есенцијалне компоненте у неурогенези.

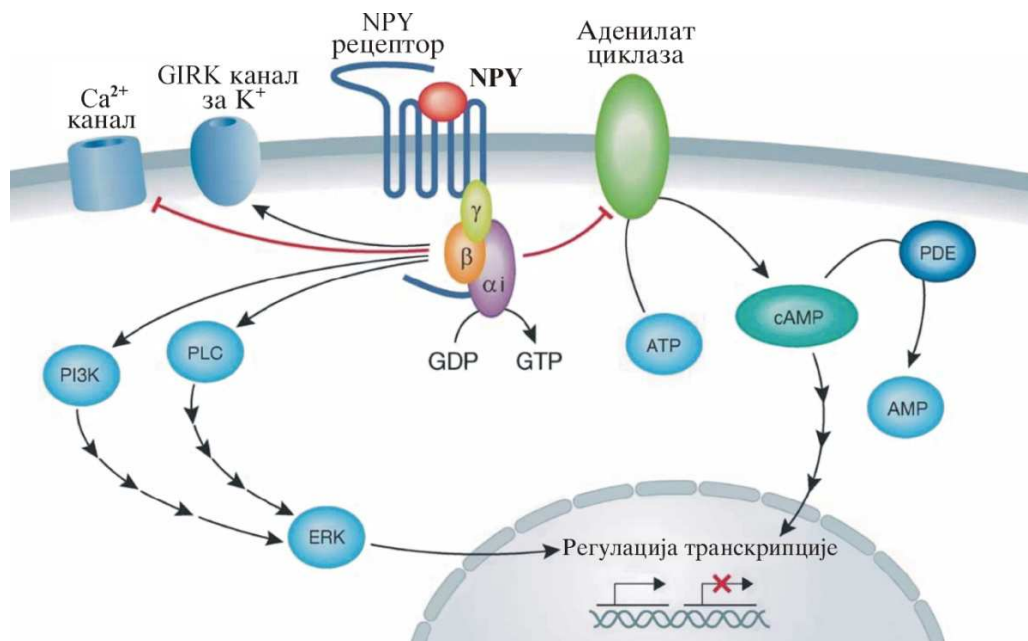
NPY има улогу у кардиоваскуларним и метаболичким одговорима на стрес (Hirsch и Zukowska, 2012), у коронарној болести срца и хипертензији (Zukowska-Grojec и сар., 1993). Директна улога у адипогенези се све више расветљује (Park и сар., 2014; Zhang и сар., 2014), као и његове ангиогенетске особине, које су описане у разним ткивима (Zukowska и сар., 2003). NPY има критичну улогу и у регулацији остеогенезе и хомеостазе костију (Franquinho и сар., 2010; Lee и сар., 2010; 2011).

Изван нервног система, NPY се углавном може наћи у три фракције: симпатичким нервима, надбубрежној жлезди и тромбоцитима (Rosmaninho-Salgado и сар., 2007). NPY се експримира и магационира у тромбоцитима и њиховим прекурсорима, мегакариоцитима у косној сржи (Myers и сар., 1988). У сваком случају, количина NPY у тромбоцитима се у великом степену разликује између различитих врста, при чему је код пацова и људи присутан у релативно високој концентрацији у односу на друге испитиване врсте (Ericsson и сар., 1987; Myers и сар., 1988). Под физиолошким околностима NPY или није присутан у тромбоцитима и мегакариоцитима или је присутан у јако малим концентрацијама, али се његова експресија повећава у неким патолошким стањима и вероватно током пролонгираног стреса. Потврда за ову предпоставку се може наћи код пацијената са периферном васкуларном болешћу (Li и сар., 2011) и депресијом (Nilsson и сар., 1996), који имају значајно повишену тромбоцитну фракцију неуропептида Y. Пошто се NPY много брже елиминише из циркулације него у тромбоцитима, где се задржава до 2 недеље, тромбоцитна фракција NPY-а може можда бити погоднији маркер хроничног стреса него његови циркулишући нивои у плазми, или неки други медијатори стреса. Ипак, постоји корелација повишених серумских нивоа овог неуропептида и једног броја клиничких стања као што су хипертензија (Wocial и сар., 1995), хронична срчана слабост (Callanan и сар., 2007; McDermott и Bell, 2007), застој у раду бубрега (Bald и сар., 1997) и прееклампсији (Khatun и сар., 2000; Paiva и сар., 2016), где постоји и појачан симпатикусни тонус.

Поред његових бројних функција везаних за енергетску хомеостазу, нервни и дигестивни систем, извесно је да неуропептид Y има улогу и у репродуктивним процесима. Потпун значај и важност овог неуропептида још увек није јасно расветљена, али његова синтеза у плаценти од стране цитотрофобласта, амниона, хориона и децидуе, као и присуство његових рецептора у овим структурама, указује на значајну физиолошку улогу коју неуропептид Y има у процесима у вези са репродукцијом (Petraglia и сар., 1989; 1993; Beloosesky и сар., 2006; Pazos и сар., 2014; Paiva и сар., 2016).

Сигнална трансдукција која полази од NPY рецептора укључује ативацију и/или инхибицију различитих интрацелуларних путева. Најбоље проучени ефекти које неуропептид Y остварује у ћелијама посредством својих рецептора огледају се у снижењу концентрације цикличног аденозин монофосфата (енг. *cAMP* – *cyclic adenosine*

*monophosphate*), деактивације (или ређе активације) калцијумових канала, као и активације ЕРК киназа које регулишу транскрипцију већег броја гена (Brothers и Wahlestedt, 2010). Неуропептид Y има ефекта и на специфичне канале за калијум (Acuna-Goycolea и сар., 2005) (Слика 9).



**Слика 9. NPY рецептор и сигнална трансдукција**  
(модификовано из Brothers и Wahlestedt, 2010).

NPY рецептори су купловани са  $G_i$  сигналном каскадом, где алфа субјединица врши инактивацију аденилат циклазе, док  $\beta$ - $\gamma$  субјединица активира низ различитих киназних каскада. Активација комплекса G протеина такође може довести до ефекта на активност канала за калцијум ( $Ca^{2+}$ ) и калијум ( $K^+$ ). Иницијација ових интрацелуларних путева има многоструке ефекте на образац генске транскрипције, регулацију ослобађања хормона и неуротрансмитера и предстаља базу за све физиолошке ефекте неуропептида Y.

## 1.6. Механизми редокс равнотеже

### 1.6.1. Реактивне врсте кисеоника и азота

Молекулски кисеоник ( $O_2$ ) неопходан је свим аеробним организмима за продукцију енергије у респираторном ланцу митохондрија. Молекуларни кисеоник је слабо реактиван због присуства два неспарена електрона паралелних спинова, па је способност интеракције присутна код атома или молекула који имају електроне са антипаралелним спином (Hancock и сар., 2001).

У метаболичким процесима ћелија аеробних организама молекулски кисеоник се највећим делом редукује до воде, у процесу који се одвија на унутрашњој мембрани митохондрија. Комплекс цитохром-оксидазе катализује сукцесивно везивање 4 електрона за молекул кисеоника при чему долази до формирања 2 молекула воде:



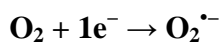
Преко 95% молекулског кисеоника у ћелији се потпуно редукује до воде, а услед делимичне редукције око 1-5% се трансформише у ROS. Услед редукције мањим бројем електрона или трансфером енергије настају делимично редуковани, високо реактивни интермедијери – реактивне врсте кисеоника (енг. *ROS – reactive oxygen species*) (Halliwell и Gutteridge, 2007). ROS обухватају атоме, јоне или молекуле са једним или више неспарених електрона у свом електронском омотачу, због чега су јако реактивни, па могу да интерагују међусобно или са другим мање реактивним врстама и доведу до низа слободнорадикалских реакција. У реактивне врсте кисеоника спадају слободни радикали и нерадикалске врсте који сами делују као оксидујући агенси, или се лако могу претворити у слободне радикале. У реакцијама са ћелијским компонентама долази до стварања секундарних и терцијарних слободних радикала из бројних ћелијских биомолекула. У интеракцији реактивних врста кисеоника и/или слободних радикала који настају под њиховим утицајем са ћелијским биомолекулима (липиди, протеини, нуклеинске киселине) стварају се нове реактивне структуре које воде даљем оштећењу виталних ћелијских конституената, што резултује различитим дисфункцијама ћелије (Halliwell и Gutteridge, 2007). Једноелектронском редукцијом настаје супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), двоелектронском водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), а троелектронском хидроксил радикал ( $OH^{\bullet}$ ).

Интеракцијом са другим молекулима и структурама ћелије продукују се секундарни слободни радикали кисеоника (хидропероксил –  $\text{HO}_2^\bullet$ , пероксил –  $\text{RO}_2^\bullet$ , алкоксил –  $\text{RO}^\bullet$ ), и нерадикалске реактивне врсте (синглет кисеоник –  $^1\text{O}_2$ , пероксинитрит –  $\text{ONOO}^-$ , органски хидропероксиди –  $\text{ROOH}$ , пероксинитритна киселина –  $\text{ONOOH}$ ) (Hoffman и Brookes, 2009).

Поред слободних радикала кисеоника који су доминантне радикалске врсте у ћелијама, продукују се и реактивне врсте угљеника (трихлорметил радикал –  $\text{CCl}_3^\bullet$ ), реактивне врсте азота (енг. *RNS* – *reactive nitrogen species*) и реактивне врсте сумпора (тиол радикал –  $\text{R-S}^\bullet$ ) (Halliwell и Gutteridge, 2007).

#### 1.6.1.1. Супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

Једноелектронском редукцијом молекулског кисеоника настаје супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) што је приказано реакцијом:



Супероксид анјон радикал се продукује у респираторном ланцу митохондрија и хлоропласта у ћелијама свих аеробних организама, деловањем  $\text{NADH}$  дехидрогеназе и убихинон- $\text{Q}$ -цитохром- $\text{b}$ -комплекса. Прокудују се и на мембранама ендоплазматичног ретикулума, а значајан извор  $\text{O}_2^{\bullet-}$  је и „респираторна експлозија“ (*respiratory burst*) у фагоцитима (макрофаги, неутрофили) која настаје у одговору при контакту на стране антигене или имунске комплексе (Chen и Junger, 2012). Значајна количина  $\text{O}_2^{\bullet-}$  продукује се у реакцијама оксидаза, као што су ксантин оксидаза, алдехидна оксидаза,  $\text{NAD(P)H}$  оксидаза, цитохром  $\text{P-450}$  оксидаза. Супероксид анјон радикал може да настане и у реакцијама ензима хидролаза у процесу аутооксидације хинона, катехоламина, флавина, хромопротеина, тиола и у присуству прелазних метала, а продукује се и у процесу биотрансформације ендогених и егзогених супстрата (метаболизма етанола и липидна пероксидација незасићених масних киселина) (Halliwell и Gutteridge, 2007).  $\text{O}_2^{\bullet-}$  је доминантно продукована врста слободних радикала у ћелијама, због чега се најчешће налази на почетку каскаде унутар ћелијског оксидативног стреса. Супероксид анјон радикал подлеже реакцији дисмутације у воденој средини, реакцији између два молекула супероксид анјон радикала, производећи водоник пероксид. Реакција дисмутације се

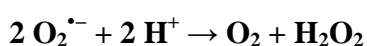
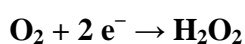
одиграва спонтано или уз катализу ензимом супероксид-дисмутазом (SOD).  $O_2^{\bullet-}$  показује умерену реактивност, али у реакцији са другим структурама генерише много реактивније секундарне агенсе. У присуству метала са променљивом валенцом,  $O_2^{\bullet-}$  се преводи у екстремно реактиван хидроксил радикал ( $OH^{\bullet}$ ), а у интеракцији са азот моноксидом (NO) продукује изразито реактиван пероксинитрит ( $ONOO^-$ ) (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Супероксид анјон радикал доводи до деградације полисахарида, оштећења ћелијских мембрана и инактивације ензима, ремети репликацију и транскрипцију нуклеинских киселина ДНК и један је од посредника у процесу канцерогенезе (Štajn и сар., 2007).

#### 1.6.1.2. Водоник пероксид ( $H_2O_2$ )

Водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) настаје у реакцији спонтане или катализоване дисмутације  $O_2^{\bullet-}$ . Показује релативно ниску реактивност с'обзиром да нема неспарених електрона, па се не може ни сматрати слободно-радикалском врстом у најужем смислу (Ding и сар., 2008). И поред своје релативно ниске реактивности, има велики значај у процесима оксидације различитих ћелијских компоненти јер лако дифундује кроз мембране.

$H_2O_2$  у ћелијама може настати и директно од молекулског кисеоника, двоелектронском редукцијом у реакцији:



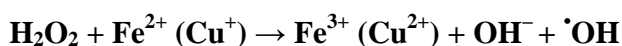
Водоник пероксид се генерише у митохондријама, пероксизомима, микрозомима и ендоплазматичном ретикулуму, али и на самој мембрани ћелије. Елиминација  $H_2O_2$  из ћелија одиграва се деловањем ензима каталазе и/или глутатион-пероксидазе (Day, 2009). Највећа количина водоник пероксида се ствара у пероксизомима, где постоји висока активност каталазе, која штити овај ћелијски компартмент од оксидативног оштећења.  $H_2O_2$  настаје у ћелији директно ензимском активношћу урат-оксидаза, оксидаза L-хидрокси киселина, уриказа, оксидаза D-амино киселина, ксантин-оксидаза, глюкозо-оксидазе, као и у процесима аутооксидације оксисемоглобина, глутатиона, аскорбата, катехоламина и тиола (Halliwell и Gutteridge, 2007). Водоник пероксид настаје и

активношћу моноамино-оксидазе (МАО), ензима који врши оксидативну деаминацију допамина, а локализован је углавном на спољашњој мембрани митохондрија (Edmondson, 2014). Водоник пероксид се продукује такође и од стране активираних фагоцитних ћелија као што су моноцити, макрофаги и неутрофили.

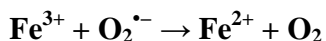
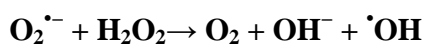
$\text{H}_2\text{O}_2$  може деловати директно и индиректно испољавајући у оба случаја штетне ефекте на различитим биомолекулима. Директни ефекти су последица његових оксидујућих особина, а укључују деградацију хем протеина, ослобађање гвожђа, оксидацију сулфхидрилних група протеина и инактивацију ензима, оксидацију нуклеинских киселина, кетокиселина и липида. Индиректан ефекат водоник пероксид остварује генерисањем високо реактивног хидроксил радикала ( $\cdot\text{OH}$ ) у присуству метала са променљивом валенцом ( $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Cu}^+$ ), у *Fenton*-овој реакцији или у *Haber-Weiss*-овој реакцији, где улази у интеракцију са супероксид анјон радикалом (Halliwell и Gutteridge, 2007).

### 1.6.1.3. Хидроксил радикал ( $\cdot\text{OH}$ )

Хидроксил радикал ( $\cdot\text{OH}$ ) настаје троелектронском редукцијом молекулског кисеоника. Најагресивнији је продукт метаболизма кисеоника и најодговорнији за оксидативна оштећења биомакромолекула. Хидроксил радикал такође настаје и у реакцији водоник пероксида са јонима прелазних метала ( $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Cu}^+$ ) у *Fenton*-овој реакцији:



Хидроксил радикал настаје и у *Haber-Weiss*-овој реакцији, интеракцијом између водоник пероксида и супероксид анјон радикала у присуству јона метала:



Хидроксил радикал може да се генерише и из молекула воде при високим дозама јонизујућег зрачења, током аутооксидације б-хидроксидопамина и б-аминодопамина.

Због своје високе реактивности, ова радикалска врста у ћелији је присутна јако кратко ( $10^{-9}$  секунди), јер брзо интерагује са другим биомолекулима, шећерима, аминок

киселинама, пуринским и пиримидинским базама, органским киселинама, стварајући различите секундарне радикале варијабилне реактивности. Оксидацијом полинезасићених масних киселина у биомембранама  $\cdot\text{OH}$  иницира процес липидне пероксидације, који се даље наставља секундарно створеним реактивним врстама. Хидроксил радикал доводи до озбиљних оштећења ћелија и ткива и укључен је у процесе инфламације, канцерогенезу и ћелијску смрт (Lipinski, 2011). Имајући у виду да не постоји ниједан специфични антиоксидативни механизам који ефикасно уклања већ настали  $\cdot\text{OH}$ , антиоксидативно деловање у ћелији је доминантно усмерено на превенцију његове продукције. Ове активности укључују неутрализацију већ формираних реактивних врста кисеоника, дисмутацију супероксид анјон радикала, разлагање водоник пероксида до воде, као и везивање јона гвожђа и бакра (Halliwell и Gutteridge, 2007).

#### 1.6.1.4. Пероксинитрити ( $\text{ONOO}^-$ )

Пероксинитрити ( $\text{ONOO}^-$ ) се формирају у неензимској реакцији азот монооксида и  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Реакција је веома брза, превазилази брзину реакције дисмутације  $\text{O}_2^{\cdot-}$  посредоване ензимом SOD, а за њено одвијање није потребан прелазни метал.

Пероксинитрит је високо реактиван молекул, значајно реактивнији од супероксид анјон радикала и азот монооксида од којих се формира. На физиолошким рН, пероксинитрит у највећој мери постоји у стабилној анјонској форми ( $\text{ONOO}^-$ ), а малим делом у облику нестабилне пероксинитритне киселине ( $\text{ONOOH}$ ), која се разлаже до нитрата при чему се формирају интермедијери. Пероксинитрит се може разложити до  $\text{OH}^-$  и нитрил јона ( $\text{NO}_2^+$ ), у присуству прелазних метала и ензима супероксид-дисмутазе (Pryor и Squadrito, 1995). Полуживот  $\text{ONOO}^-$  је кратак и износи око 10–20 ms, што је ипак довољно да му обезбеди пролаз кроз биомембране и интеракцију са биомолекулима удаљеним од места његовог настанка (Radi и сар., 2001). Оксидацијом тиола, липида, протеина и дезоксирибоза,  $\text{ONOO}^-$  доводи до структурних и функционалних модификација ових биомолекула. Директном реакцијом са металним центрима протеина модификује хемоглобин, миоглобин или цитохром *c*, и инактивира ензиме који учествују у есенцијалним метаболичким процесима (Radi и сар., 2001). Пероксинитрит има значајну способност липидне пероксидације што је у основи његове снажне цитотоксичности (Ledbetter и сар., 2001).



### 1.6.2. Физиолошки ефекти реактивних врста

Током нормалних физиолошких процеса у ћелијама реактивне врсте кисеоника и азота континуирано се стварају у лимитираним количинама. Ове реактивне структуре се формирају у процесу оксидативне фосфорилације у митохондријама, током фагоцитозе, биотрансформације различитих супстрата у ендоплазматичном ретикулуму, током процеса метаболизма алкохола, као и у реакцијама оксидоредукције у присуству метала са променљивом валенцом, у каталитичкој активности оксидаза и током продукције еикосаноида. Екстремне температуре, радијација, тешки метали, лекови, биотоксини, ксенобиотици и низ других егзогених фактора доводе до формирања реактивних врста (Halliwell и Gutteridge, 2007; Štajn и сар., 2007).

Реактивне врсте имају бројне корисне улоге под физиолошким условима, у умереним концентрацијама и посредују у великом броју физиолошких процеса. Представљају једне од главних медијатора у интрацелуларним сигналним каскадама и у регулацији генске експресије, учествују у процесима диференцијације неурона, а регулишу и ћелијски циклус и апоптозу. Поред ових процеса, реактивне врсте такође контролишу степен респираторне вентилације, контракцију мишићних ћелија, активацију имуног система и учествују у одбрани од инфективних агенаса (Sena и Chandel, 2012).

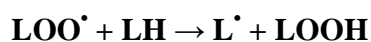
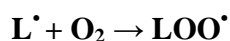
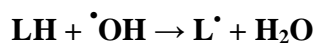
Током еволуције, аеробни организми су развили снажне одбрамбене механизме захваљујући којима су у стању да користе кисеоник као крајњи акцептор електрона у респираторном ланцу, а да се заштите од штетних ефеката његових реактивних метаболита. Ипак, услед смањене антиоксидативне активности ћелије или због повећане производње реактивних врста долази до појаве оксидативног и нитрозативног стреса. Поремећена равнотежа између продукције реактивних врста (ROS и RNS) и активности система антиоксидативне заштите доводи до настанка различитих оштећења ћелије, убрзава процес старења, индукује низ патолошких стања, укључујући канцерогенезу, а у крајњем случају доводи и до смрти организма. Реактивне врсте су због тога, поред значајних физиолошких улога које остварују, такође и узрочници различитих дисфункција ћелије и представљају основу патогенезе великог броја поремећаја (Halliwell и Gutteridge, 2007). Током реакције са ћелијским биомолекулима ROS и RNS индукују продукцију секундарних и терцијарних реактивних врста способних да наруше хемијске везе и доведу до оштећења готово огромног броја биомолекула ћелије који спадају у групу липида,

протеина, угљених хидрата и нуклеинских киселина (Halliwell и Gutteridge, 2007; Liou и Storz, 2007). Сматра се да реактивне врсте кисеоника и азота имају значајну улогу у етиопатогенези преко 200 врста хуманих обољења (Štajn и сар., 2007).

### 1.6.3. Оксидативна оштећења биомолекула

Липидна пероксидација је најзаступљенија и најбоље проучена штетна последица деловања реактивних врста кисеоника на ћелије. Липидна пероксидација је серија ланчаних слободнорадикалских реакција које индукују деградацију молекула липида и липопротеина, што доводи до нарушавања пропустљивости и флуидности ћелијских мембрана, њиховог разарања и смрти ћелије (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Најчешћа мета деловања реактивних врста кисеоника су полинезасићене масне киселине (енг. *PUFA – polyunsaturated fatty acids*) фосфолипидног двослоја ћелијске мембране. Процес липидне пероксидације започиње хидроксил радикалом ( $\cdot\text{OH}$ ), а пропагира се низом ланчаних реакција до формирања липидних хидропероксида и алдехида. Преузимањем водониковог атома незасићене масне киселине липида (LH) од стране хидроксил радикала, долази до формирања липидног радикала ( $\text{L}\cdot$ ), који се у реакцији са молекулским кисеоником претвара у високо реактиван липидни пероксил радикал ( $\text{LOO}\cdot$ ). Липидни пероксил радикал преузима водоников атом са суседног молекула липида и формира липидни хидропероксид ( $\text{LOOH}$ ). Новонастали липидни радикал у ланчаној реакцији интерагује са другим суседним молекулом липида што резултује нагомилавањем оштећених липида. Серија реакција липидне пероксидације је илустрована следећим формулама (Min и Ahn, 2005):



Липидни хидропероксид у присуству јона прелазних метала, гвожђа ( $\text{Fe}^{2+}$ ) или бакра ( $\text{Cu}^+$ ), разлаже се до  $\cdot\text{OH}$  и липидног алкоксил радикала ( $\text{LO}\cdot$ ), који може да реагује са другим молекулима липида формирајући  $\text{L}\cdot$  и липидни алдехид ( $\text{LOH}$ ). У реакцији са  $\text{Fe}^{3+}$  или  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{LOOH}$  дисосује до пероксил радикала ( $\text{LOO}\cdot$ ). Ова два радикала, настала

разлагањем LOOH, индукују даљу пропагацију процеса липидне пероксидације (Halliwell и Gutteridge, 2007). LOOH су нестабилне структуре и деградују се до реактивних алдехидних једињења која лако дифундују у цитоплазму. Најтоксичнији алдехидни продукти липидне пероксидације су 4-хидрокси-2,3-трансноренал и малондиалдехид (MDA), који често служи као биомаркер липидне пероксидације. MDA представља главни извор липофусцина чија концентрација у организму расте током процеса старења. MDA је способан да интерагује са слободним атомским групама протеина и нуклеинских киселина, индукујући још већа оштећења ћелије (Halliwell и Gutteridge, 2007, Valko и сар., 2007).

Највећа оштећења услед липидне пероксидације трпе мембрански системи ћелије, што води њиховим великим структурно-функционалним променама, које се највећим делом огледају у смањењу хидрофобности липидног двослоја и промени у интеракцијама липида са протеинима. Нарушене липопротеинске интеракције ремете ћелијску хомеостазу, што за последицу има бројне дисфункције ћелија као што су процеси деобе, диференцијације, ендоцитозе, егзоцитозе, фагоцитозе, транспорта јона, интерцелуларног контакта и трансдукције сигнала. Продукти процеса липидне пероксидације имају велику улогу у патогенези бројних обољења међу којима су атеросклероза, коронарне болести, реуматоидни артритис, системска склероза, инфаркт миокарда и канцер (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Поред липида ћелијских мембрана, протеини такође чине значајне мете различитих реактивних врста. Оксидативни процеси доводе до модификације појединих аминокиселина у протеинском ланцу или до њиховог потпуног губитка, што доводи до значајних промена у примарној, секундарној и терцијарној структури протеина. Најосетљивији на оксидацију проузроковану ROS/RNS су бочни остаци цистеина и метионина, а реакција је посредована прелазним металима. Хидроксил радикал, као једна од најреактивнијих врста кисеоника, најчешћи је иницијатор оксидативних оштећења протеина, а производи ове оксидације су углавном хидроксилне и карбонилне групе. Оксидативна модификација протеина резултира губитком или смањењем њихове функције, што може довести до нарушавања ензимских активности, структурне протеинке потпоре у ћелији, као и до ремећења трансмембранског транспорта различитих јона и молекула, што води и поремећајима ћелијске сигнализације. Секундарни ефекти оксидације протеина укључују настанак алкил, алкоксил и алкил-пероксил радикала,

деградацију полипептидног ланца, промене у протеин-протеин интеракцијама, као и измене у наелектрисувању протеина (Hensley и Floyd, 2002).

Оксидативна оштећења угљених хидрата доводе до значајних промена у њиховој функцији. Реактивне врсте кисеоника и азота ступају у интеракцију са моносахаридима, (глукоза или фруктоза), али највећи физиолошки значај имају оштећења на сложенијим молекулима који садрже угљенохидратну компоненту, као што су протеини са разгранатим олигосахаридним ланцима или нуклеинске киселине, чији су пентозе интегрални део (Štajn и сар., 2007).

Нуклеинске киселине такође могу бити погођене оксидативним оштећењима које индукују реактивне врсте. Као последица ових оштећења долази до прекида у једном или оба ланца ДНК, модификације база (хидроксилација прстена и отварање прстена), ковалентног прекривања у оквиру једног или оба ланца ДНК, и/или до јаких интеракција између нуклеинских киселина и протеина. Оксидативна оштећења ДНК доводе до блокаде транскрипције, нарушавања процеса репликације, и уопште до значајне геномске нестабилности, што представља први корак у настанку мутација која води канцерогенези и убрзавају процес старења (Halliwell и Gutteridge, 2007).

#### 1.6.4. Систем заштите од оксидативних оштећења

Антиоксидативни услови у ћелијама одређују интензитет оксидативних оштећења и могућност њиховог репарирања. Током еволуције је развијен систем заштите од оксидативних оштећења (енг. *AOS – antioxidant defence system*) код свих аеробних организама како би се спречили прекомерни штетни ефекти изазвани метаболички генерисаним реактивним врстама. Ћелије се штите од токсичног деловања реактивних врста бројним ендогеним структурама који хватају слободне радикале међу које спадају непротеински биомолекули, протеини, као и ензими са својом каталитичком активношћу.

На основу природе и начина деловања *AOS* се може поделити на примарне и секундарне компоненте заштите. Примарна антиоксидативна заштита обухвата ензимске и неензимске компоненте, које су активне у условима нормалне и повећане продукције *ROS*. У секундарну антиоксидативну заштиту спадају протеин-специфичне оксидоредуктазе (протеин-ADP-рибозил-трансфераза, тиол-трансфераза и АТР и  $\text{Ca}^{2+}$  независна протеаза) које ефикасно репарирају оштећења ћелијских биомолекула (Štajn и сар., 2007).

У неензимске компоненте антиоксидативне заштите спадају супстанце мале молекулске масе, растворљиве у води: аскорбинска киселина, глутатион, албумин, метионин, цистеин, билирубин, биливердин, мокраћна киселина, трансферин, феритин и церулоплазмин, као и супстанце растворљиве у мастима: коензим Q,  $\beta$ -каротен и витамини А, Ц и Е. У ензимске компоненте система антиоксидативне заштите спадају супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион-пероксидаза (GSH-Px), глутатион-редуктаза (GR), а ензим глутатион-S-трансфераза (GST) се данас класификује као ензим II фазе биотрансформације, иако је раније био сврставан у AOS (Halliwell и Gutteridge, 2007).

#### **1.6.4.1. Глутатион (GSH) - главна неензимска компонента система антиоксидативне заштите**

Глутатион (GSH) је трипептид (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinyl-glycine) и најзаступљенији је нискомолекулски тиол у ћелијама. Заступљен је у великој мери у микроорганизмима, биљкама и животињама, а у ћелији се налази у цитоплазми, једру, митохондријама и микрозомима слободан или у везаној фракцији (Lu, 2009). Присутан је у две форме, као редуковани (GSH, тиолна форма) и као оксидовани (GSSG, дисулфидна форма). Више од 98% интрацелуларног глутатиона се налази у редукованом стању при физиолошким условима, а остатак је у форми дисулфида – GSSG, мешаних дисулфида (углавном GSS-протеин) и тиоестара. У здравим ћелијама заступљеност дисулфидне форме ретко достиже 10%, а унутарћелијски однос његове редуковане (GSH) и оксидоване форме (GSSG) зависи од баланса између његовог коришћења и синтезе (Lu, 2009).

Глутатион има већи број значајних улога у ћелији: учествује у антиоксидативној заштити и врши детоксификацију различитих ксенобиотика, одржава структуру и функционалност протеина, контролише њихову синтезу и деградацију, учествује у метаболизму леукотриена и простагландина, редукцији рибонуклеотида до дезоксирибонуклеотида, у регулацији ћелијског циклуса и генској експресији (Aquilano и сар., 2014).

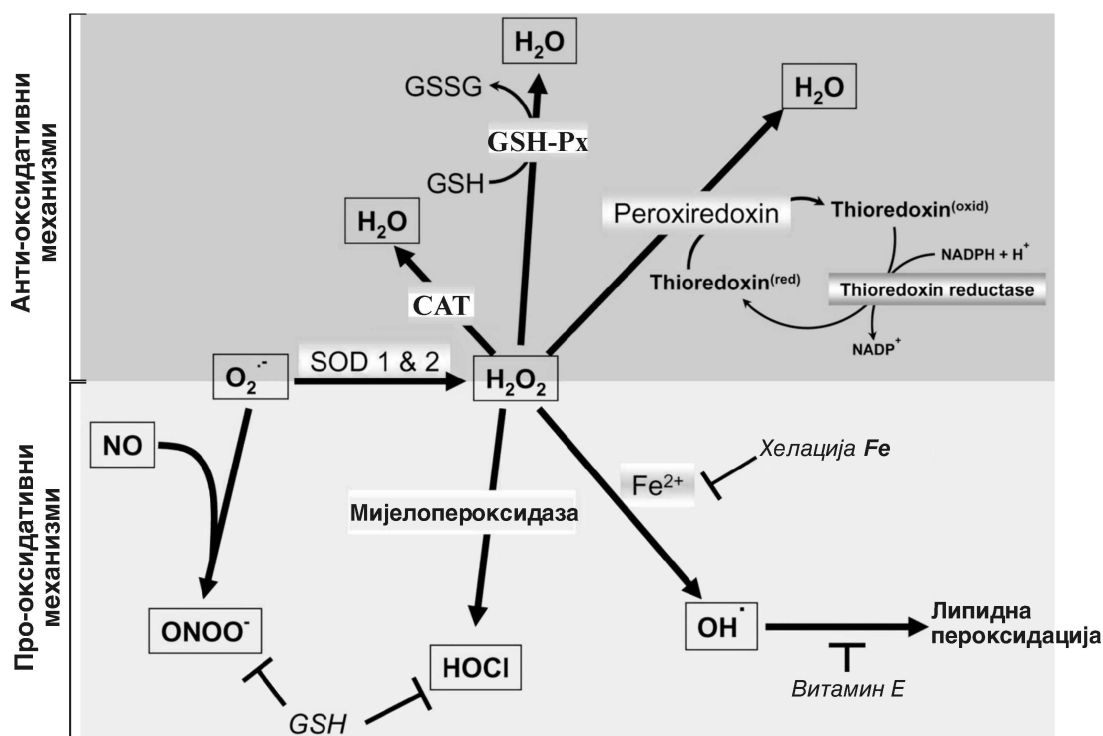
Антиоксидативни ефекат глутатиона базиран је на способности сулфхидрилне групе цистеина да се реверзибилно оксидује, при чему врши директну неутрализацију реактивних врста,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\cdot OH$  и  $ONOO^-$ , као и органских радикала ( $R^{\bullet}$ ). Ензим GSH-Px користи глутатион као супстрат редукујући водоник пероксид и хидропероксид, а са ензимом GST глутатион као коњугујући молекул учествује у детоксификацији и

екскрецији ксенобиотика. Глутатион регенерише аскорбинску киселину и  $\alpha$ -токоферол који представљају важне неензимске антиоксиданте (Aquilano и сар., 2014). Глутатион може неензимски да ствара комплексе са металима, због чега се сматра важном компонентом у процесима транспорта, депоновања и метаболизма метала, а може да функционише и као редуктант или кофактор у различитим редокс реакцијама које захтевају јоне метала. Сулфхидрилна група цистеина у молекулу глутатиона везује метале са високим афинитетом, а са неколико метала у које спадају жива, кадмијум, бакар, селен, хром, олово и цинк може да формира меркаптиде (Ballatori, 1994).

Након антиоксидативних реакција у којима учествује, глутатион се оксидује до GSSG, који није биолошки активан. Једна фракција GSSG се елиминише из ћелије, док се значајан део редукује у ћелији, деловањем ензима глутатион-редуктазе (GR). Конверзија GSSG у GSH обавља се уз присуство редукованог NADPH, молекула неопходног за функционисање многих антиоксидативних ензима, а који се генерише у великим количинама деловањем ензима глукозо-6-фосфат дехидрогеназе (G6PDH) (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Поред регенерације глутатиона деловањем GR ензима, његова концентрација у ћелији регулисана је и *de novo* синтезом, која се одиграва у цитосолу свих ћелија, а ћелије паренхима јетре представљају главно место његове биосинтезе. GSH се синтетише из аминокиселина које га сачињавају (L-глутамат, L-цистеин и глицин), активношћу два АТФ зависна ензима: глутатион-синтетазе (GS) и  $\gamma$ -глутамилцистеин-синтетазе ( $\gamma$ -GCS) (Ray и сар, 2002). Уколико постоји јак оксидативни стрес, глутатион из хепатоцита се интензивно трансферује у крв, којом се дистрибуира у различита ткива (Lu, 2009).

На **Слици 10** схематски су приказани путеви продукције реактивних врста кисеоника и азота, као и механизми деловања система антиоксидативне заштите који омогућавају да ћелијски ситеми функционишу под константном продукцијом реактивних врста током физиолошких процеса, као и да неутралишу прекомерну продукцију ROS или да изврше репарацију већ насталих оштећења.



Слика 10. Ћелијски механизми продукције реактивних врста и антиоксидативне заштите (модификовано из Jaeschke и сар., 2012).

Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) углавном се продукује у респираторном ланцу митохондрија, након чега може интераговати са азот моноксидом (NO) формирајући пероксинитрит ( $ONOO^-$ ) или се деловањем супероксид-дисмутазе (SOD) може конвертовати до водоник пероксида ( $H_2O_2$ ). Водоник пероксид потом може да покрене липидну пероксидацију конверзијом до хидроксил радикала ( $OH^\bullet$ ) или да формира хипохлорну киселину (HOCl) деловањем мијелопероксидазе. Неутрализација  $H_2O_2$  до молекула  $H_2O$  може се постићи деловањем каталазе (CAT) и глутатион-пероксидазе (GSH-Px), као и пероксиредоксина који користи тиоредоксин за своје деловање. Глутатион (GSH) делује као антиоксидант и директно неутрализује реактивне врсте или функционише заједно са GSH-Px. Витамин E ефикасно неутралише  $OH^\bullet$  радикал који иницира липидну пероксидацију.

### 1.6.5. Азот моноксид (NO)

Азот моноксид (енг. *NO – nitric oxide*) је мали хидрофобни молекул у гасовитом стању, без боје, укуса и мириса. Постоји у ћелијама свих врста кичмењака где као сигнални молекул посредује у великом броју ћелијских процеса. NO се синтетише у ћелијама деловањем ензима азот моноксид синтазе (енг. *NOS – nitric oxide synthase*) од аминокиселине L-аргинина, а синтеза се одвија у присуству молекуларног кисеоника и NADPH као косупстрата. Азот моноксид се синтетише у васкуларним ендотелним ћелијама, неутрофилима, макрофагима, неуронима, епителним ћелијама, трофобластима и

у било ком ткиву које се налази у стању инфламације и исхемије (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Азот моноксид има способност брзе дифузије кроз ћелијске мембране због своје липофилности и малих димензија, што му омогућава да учествује у бројним физиолошким функцијама у организму. Има важну улогу у неуротрансмисији, у регулацији васкуларног тонуса, инхибицији агрегације тромбоцита, као и у регулацији активности имуног система. NO садржи један неспарени електрон, који му омогућава везивање за гвожђе у протеинима са хемом, али и у протеинима са гвожђе-сулфидним центрима. Азот моноксид остварује реакције са молекуларним кисеоником,  $O_2^{\bullet-}$  радикалом и са тиолима, а у интеракцији са редокс активним металима може да инхибира *Fenton*-ову реакцију и тако спречи настанак агресивног  $OH^{\bullet}$  радикала (Liao, 1999; Lu и Korpenol, 2005).

Цитотоксични ефекти NO посредовани су пре оксидативним продуктима које генерише него његовим директним деловањем, јер са молекулским кисеоником и реактивним врстама кисеоника реагује доста брзо. У биолошким системима могу да се нађу три сродне редокс форме азот монооксида, слободни радикал ( $NO^{\bullet}$ ), нитрозил катјон ( $NO^+$ ), који настаје једноелектронском оксидацијом  $NO^{\bullet}$ , и нитроксил анјон ( $NO^-$ ), који настаје једноелектронском редукцијом  $NO^{\bullet}$ . Све три редокс форме NO могу да реагују са ROS, редокс активним металима и тиолима. Азот моноксид може да се оксидује до нитрита ( $NO_2^-$ ) који се користе и као његови биоиндикатори. У реакцији са супероксид анјон радикалом ( $O_2^{\bullet-}$ ) азот моноксид формира веома агресивни пероксинитрит ( $ONOO^-$ ) (Pacher и сар., 2007).

Реактивне врсте азота могу да оксидују, нитрирају и нитролизују већи број биомолекула и тиме доведу до њихове дисфункције. Повећана продукција азот монооксида може да резултира у његовом цитотоксичном деловању, што представља основу за патогенезу читавог низа поремећаја као што су неуродегенеративне болести, болести кардиоваскуларног система, хронична запаљења и канцерогенеза (Štajn и сар., 2007). Смањена биодоступност азот монооксида која се јавља услед прекомерне продукције реактивних врста или услед његове снижене *de novo* синтезе ремети огроман број сигналних путева у којима овај молекул учествује, па су импликације његове снижене концентрације у ћелијама врло разноврсне и значајне (Calabrese и сар., 2007; Pandey и Rizvi, 2010).



---

## **2. Циљеви истраживања**

Неуропептид Y је симпатички биоактивни пептид присутан у значајној концентрацији у плазми и амнионској течности жене током трудноће, због чега постоје индикације да неуропептид Y има значајну улогу у репродуктивним процесима. Контролисана миграција и инвазија трофобластних ћелија у ендометријум, кључни су процеси у имплантацији, као и у формирању и развоју плаценте. Редукциони поремећаји трофобластне миграције узрокују аберантну имлантацију и плитку плацентацију, што често води различитим компликацијама трудноће које су у вези са недовољном плацентацијом, као што су прееклампсија и интраутерини застој у расту. У неколико патолошких форми трудноће показано је присуство значајно повишене концентрације неуропептида Y у поређењу са концентрацијама у здравој трудноћи, па је највећи део студије фокусиран на испитивање потенцијалних патолошких ефеката на трофобласте. Имајући у виду да је неуропептид Y присутан у одређеној концентрацији и у плазми здравих трудница, узети су у разматрање и ефекти ове концентрације, путем које је могуће да неуропептид Y оствари значајан физиолошки допринос у оптималном метаболизму трофобласта током здраве трудноће.

Циљеви ове докторске дисертације представљају *in vitro* испитивања ефеката неуропептида Y на различите аспекте функционисања хуманих трофобласта линије JEG-3. У експериментима су испитивани ефекти неуропептида Y аплицираног у две концентрације (физиолошкој и патолошкој) у два временска третмана (24 сата и 72 сата) са циљем упоређивања његових физиолошких ефеката и ефеката које остварује у концентрацијама које се јављају у патолошким стањима трудноће. Посебан фокус студије је био на утврђивању потенцијалног доприноса овог молекула на промене миграторне и инвазивне способности трофобласта у његовим концентрацијама вишим од физиолошких. Аспекти деловања неуропептида Y на пролиферативно понашање, оксидативни метаболизам, и миграциони / инвазиони капацитет хуманих трофобласта испитивани у студији обухватају:

- испитивање потенцијалних ефеката неуропептида Y на промену вијабилности хуманих трофобласта током краткотрајног (24 сата) и дуготрајног третмана (72 сата), у обе концентрације (0,1 nM и 1 nM);

- испитивање пролиферативних / антипролиферативних и проапоптотских / антиапоптотских ефеката неуропептида Y након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног третмана (72 сата) у обе концентрације (0,1 nM и 1 nM);
- испитивање краткотрајних и дуготрајних прооксидативних ефеката (24 сата и 72 сата) и њихову везу са модификацијама у миграторном потенцијалу хуманих трофобласта;
- испитивање антиоксидативних способности трофобласта мерењем неензимских компоненти антиоксидативне заштите;
- испитивање миграторних способности хумних трофобласта након пролонгираног третмана неуропептидом Y у обе концентрације (0,1 nM и 1nM) коришћењем миграционих 2D есеја;
- испитивање доприноса неуропептида Y на регулацију миграције праћењем обрасца експресије гена за индуцибилну синтазу азот монооксида (iNOS) након пролонгираног третмана (72 сата) у обе концентрације (0,1 nM и 1 nM);
- испитивање ефеката неуропептида Y на покретљивост хуманих трофобласта путем анализе промена обрасца експресије гена за индуцибилну синтазу азот монооксида (iNOS) након пролонгираног третмана (72 сата) у обе концентрације (0,1 nM и 1 nM), као и мерењем количинске заступљености ензима iNOS;
- испитивање присуства Y<sub>2</sub> рецептора за неуропептид Y на мембрани трофобласта коришћењем специфичног антитела;
- протеинска квантификација металопротеиназе 9 у медијуму за култивацију ћелија, након пролонгираног третмана неуропептидом Y (72 сата) у концентрацији од 1 nM;
- испитивање ефеката неуропептида Y на потенцијал адаптације трофобласта на хипоксију праћењем промене обрасца експресије гена за индуцибилни фактор хипоксије (HIF-1α) након пролонгираног третмана (72 сата) у обе концентрације (0,1 nM и 1 nM), као и мерењем количинске заступљености транскрипционог фактора (HIF-1α);
- испитивање дугорочних ефеката (72 сата) неуропептида Y на миграцију хуманих трофобласта анализом промене дистрибуције и квантитативне заступљености протеина ћелијских веза (E-кадхерин).

У свим истраживањима коришћена је ћелијска линија хуманих трофобласта JEG-3 (хориокарциномска ћелијска линија) која се показала као погодан модел за проучавање регулације миграционог и инвазионог капацитета хуманих трофобласта.

---

### **3. Материјал и методе истраживања**

### 3.1. Ћелијске линије као модел систем

Гајење ћелија у култури спроводи се под строго контролисаним условима, који би требало да симулирају услове у којима ћелије постоје у живом организму. Како би ћелије могле да расту и деле се неопходна је одговарајућа концентрација  $\text{CO}_2$ , температура, влажност ваздуха, оптималан рН и стерилна средина. Стерилност рада је неопходна да би се спречила контаминација ћелија микроорганизмима, пре свега бактеријама и гљивама. Како би се обезбедила стерилност у раду са ћелијама у култури, сав рад се обавља у ламинарној комори са вертикалним струјањем ваздуха кроз „HEPA“ филтер који врши пречишћавање ваздуха. Комора садржи UV лампу која служи за стерилизацију радне површине. За рад се користи се аутоклавирано и/или стерилисано посуђе и прибор. Ћелије су гајене у стерилним флашковима, површине  $25 \text{ cm}^2$  и  $75 \text{ cm}^2$  у хранљивом медијуму (енгл. DMEM Duplecco's Modified Eagle's Medium - DMEM, Gibco) (висок садржај глукозе –  $4,5 \text{ g/L}$ ) са додатком 10% феталног говеђег серума и  $100 \text{ IU/ml}$  пеницилина и  $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$  стрептомицина. Ћелије се гаје у инкубатору у којем су програмирани одговарајући услови који подразумевају влажну атмосферу са концентрацијом 5%  $\text{CO}_2$  и температуром од  $37^\circ\text{C}$ .

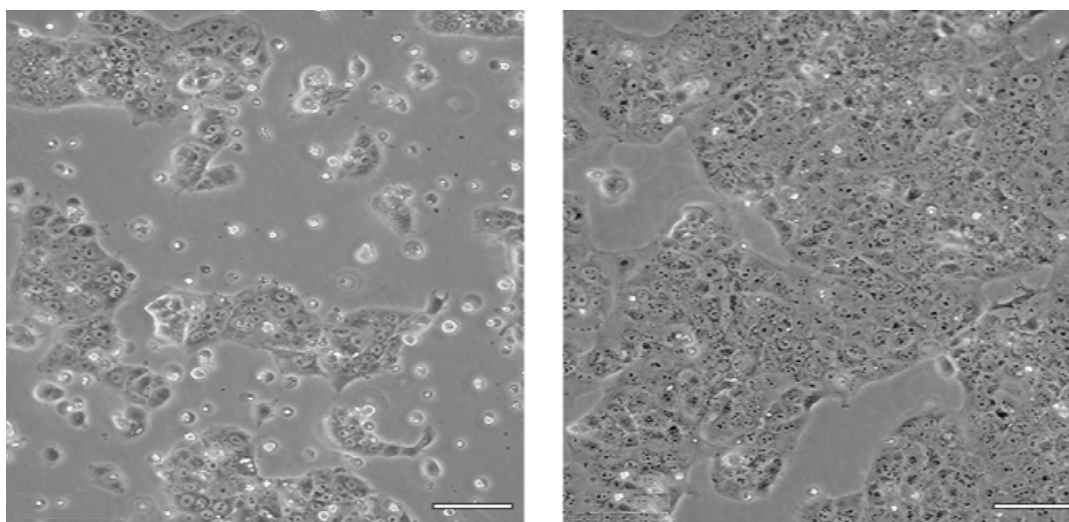
#### 3.1.1. Ћелијске линије коришћене у експериментима

У експериментима је коришћена ћелијска линија хуманог хориокарцинома, (трофобласти карцинома плаценте) - JEG-3/(НТВ-36). Ћелијска линија је набављена од ATCC (American Type Culture Collection). JEG-3 имортализована ћелијска линија је адхерентна ћелијска линија, има епителну морфологију и погодан је домаћин за трансфекцију. Пгодан је модел за проучавање ћелијске миграције. Просечан однос при пресађивању је 1:5, а замену медијума је потребно вршити на свака 3 дана (Слика 11).

### 3.2. Експериментални третман

Ћелијска линија хуманих цитотрофобласта (JEG-3) гајена је у медијуму за *in vitro* култивацију (DMEM) са додатком 10% феталног серума говечета (енг. *FBS – fetal bovine serum*), који је температурно инактивиран, као и пеницилина и стрептомицина (Gibco). Ћелије су гајене до 80% конфлуентности у  $75 \text{ cm}^2$  флашковима на  $37^\circ\text{C}$ , у влажној,

стандардној ваздушној атмосфери са 5% CO<sub>2</sub>. Ову ћелијску линију је лако одржавати у култури и као и већина адхерентних ћелијских линија представља погодан модел систем за проучавање апоптотских, пролиферативних, миграторних карактеристика ћелија, као и за испитивање оксидативних / антиоксидативних ефеката и ефеката на транскрипционе профиле гена. Ефекти неуропептида Y су тестирани у концентрацијама од 1 nM (1 nmol/L), 10 nM (10 nmol/L) и 100 nM (100 nmol/L) на вијабилност JEG-3 ћелија у краткотрајном (24 сата) и дуготрајном третману (72 сата). Даље су у свим експериментима испитиване две концентрације неуропептида Y: 1) физиолошка концентрација од 0,1 nM (0,1 nmol/L) NPY која се јавља у плазми током здраве трудноће и 2) “патолошка” концентрација од 1 nM (1 nmol/L) NPY која одговара повишеним нивоима овог биоактивног пептида у неким патолошким формама трудноће. Ове две концентрације су коришћене за тестирање ефеката NPY на апоптотски индекс (преживљавање ћелија), вијабилност, миграциони капацитет, оксидативни статус, продукцију металопротеиназа, као и за мерење експресије гена и дистрибуције неких протеина у ћелији. Током читаве студије коришћен је иницијални раствор неуропептида Y у физиолошком фосфатном пуферу (енг. PBS), а затим је извршена серија декадних разблажења у DMEM-у до експерименталних концентрација. Контролне ћелије су гајене у чистом медијуму за култивацију да би се добиле базалне вредности испитиваних параметара.



**Слика 11. Морфологија JEG-3/ HTB-36 ћелија.**

(Извор: <http://www.atcc.org/products/all/HTB-36.aspx#characteristics>)

### 3.2.1. Поступак одмрзавања ћелија

JEG-3 ћелијска линија је замрзнута у медијуму за криопрезервацију који садржи 20% FBS и 5% DMSO (диметил-сулфоксид). Ћелије се чувају у криовајлицама (микротубама за замрзавање) у посебним контејнерима испуњеним течним азотом на  $-196^{\circ}\text{C}$ . Циљ криопрезервације је да се ћелија чувају како се не би гајиле све расположиве ћелијске линије у истом тренутку. Током криопрезервације је смањен ризик од микробиолошке контаминације као и од унакрсне контаминације са другим ћелијским линијама, а смањен је и ризик од морфолошких промена и омогућен рад са ћелијама тачно одређеног пасажа.

Ћелије се одмрзавају у запремини од 1 ml и одмах бивају ресуспендоване у 5 ml медијума, пошто је криопрезерванс врло токсичан за ћелије. Затим је суспензија ћелија центрифугирана 10 минута на  $1.000 \times g$ . Медијум (супернатант) је аспириран вакуум пумпом, а талог ћелија је ресуспендован у 5 ml чистог хранљивог медијума и пребачен у фласк површине  $25 \text{ cm}^2$ . Наредног дана је медијум замењен свежим како би се елиминисао евентуални вишак криопрезерванса (DMSO) (Mazur, 1970).

### 3.2.2. Поступак пресађивања ћелија

JEG-3 ћелијска линија је адхерентна, што значи да се ћелије везују за површину флашка, која је најчешће модификовани полистирен који делује као супстрат/лиганд за разне адхезионе протеине на површини ћелије. Након одређеног броја деоба, односно услед намножавања ћелија долази до искоришћавања велике количине хранљивих супстанци из медијума, па ћелије почињу да умиру због чега је потребно ћелије пасажирати. Пренос ћелија у нов фласк (нови пасаж) најчешће се спроводи када ћелије достигну конfluентност од 80–90% (Freshney, 1983). Приликом пасажирања, раскидају се везе ћелија са површином флашка, као и међусобне везе, и то се постиже коришћењем трипсина са додатком EDTA. Трипсин раскида пептидне везе, али је потребан и EDTA који везује јоне магнезијума и калцијума који су неопходни за формирање веза између ћелија, омогућава тако трипсину да раскине и међућелијске везе. Поступак трипсинизације подразумева испирање ћелија са 1 ml 0,25% трипсин / EDTA, затим се додаје 1 ml за фласк површине  $25 \text{ cm}^2$  или 2 ml за фласк површине  $75 \text{ cm}^2$ . Ћелије су одлепљене од површине након 3–5 минута, након чега су у суспензији као слободне појединачне ћелије или

ћелијски кластери, које је неопходно разбити енергичним пипетирањем суспензије. Након тога потребно је неутралисати активност трипсина што се постиже додавањем свежег хранљивог медијума.

### 3.2.3. Поступак одређивања броја ћелија

Пре самог почетка експеримента, неопходно је одредити број ћелија и њихову вијабилност, односно проценат ћелија које су живе, јер се у експериментима приликом прерачуна броја ћелија узимају у обзир само живе ћелије. Принцип се базира на селективности ћелијских мембрана за боју трипан плаво (Trypan blue), где су живе ћелије непропустљиве за ову боју, због чега је нема у цитоплазми живих ћелија. Међутим, уколико је ћелијска мембрана нарушена услед ћелијске смрти, боја трипан плаво може да прође кроз овакву мембрану, па се под микроскопом уочава плава боја у цитоплазми.

Ћелијска суспензија се меша са бојом у односу 1:1 (по 10  $\mu$ l), након чега се смеша наливена у коморицу за бројање ћелија на хемотометру (Improved Neubauer cell counting chamber). Ћелије се броје у 3 велика дијагонална квадрата, површине 0.0003 mm<sup>2</sup> под светлосним инвертним микроскопом. Средња вредноста броја ћелија из три квадрата узима се у обзир при прерачуну за одређивање броја ћелија по милилитру суспензије, узимајући у обзир разблажење и димензије коморе.

Број и вијабилност ћелија су прерачунати према следећим формулама:

Број ћелија/ml = средња вредност броја ћелија из три квадрата x разблажење бојом (2) x 10<sup>4</sup> (корекциони фактор – дубина коморе и запремина у 1 ml)

% Живих ћелија = број живих ћелија/укупан број ћелија (живе и неживе) x 100.

Током третмана коришћен је NPY који је набављен од *Sigma Aldrich*. Коришћена су разблажења од 1 nM, 10 nM и 100 nM за тестирање његовог ефекта на способност преживљавања трофобласта, евентуалну цитотоксичност, као и ефеката на апоптотски индекс, а након тога је за даље анализе коришћена само концентрације од од 0,1 nM и 1 nM. Концентрације NPY коришћене током експерименталног поступка финално су биле растворене у хранљивом медијуму за гајење ћелија.



### **3.2.4. Испитивање апоптотских, пролиферативних ефеката и ефеката на вијабилност ћелија**

#### **3.2.4.1. Испитивање вијабилности трофобласта МТТ тестом**

МТТ тест је колориметријска метода за процену вијабилности (Mosmann, 1983). Тест се заснива на способности живих ћелија да преузму МТТ (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)) и митохондријалном редуктазом редукују овај молекул до формазана који је нерастворљив у води. Ћелије се након инкубација са третманом броје и засејавају у микротитар плоче са 96 бунарића ( $1 \times 10^5$  ћелија по бунарићу), након чега се ћелије лепе за подлогу у трајању од 24 сата, а потом се аплицира МТТ. Количина редукованог формазана директно је пропорционална вијабилности ћелија. Након реакције боја се мења из жуте ка љубичастој коју даје редуковани формазан. Ефикасно растварање формазана постиже се додавањем DMSO-а. У сваки бунарић микротитар плоче, у којима су засејане ћелије, дода се по 25  $\mu$ l МТТ-а раствореног у PBS-у, финалне концентрације 5 mg/ml. Плоче су затим, инкубиране 3 сата у CO<sub>2</sub> инкубатору. Након тога се раствара формазан додавањем 150  $\mu$ l DMSO-а у сваки бунарић микротитар плоче. Интензитет боје је директно сразмеран количини активних ензима, односно вијабилности ћелија. Апсорбанца је мерена на ELISA спектрофотометру (ELISA reader Optic System RT2100-C) на таласној дужини од 550 nm.

Да би се одредио проценат ћелијске вијабилности трофобласта (%), апсорбанца (A) ћелија третираних различитим концентрацијама испитиваних екстраката се подели са апсорбанцом контролних (нетретираних трофобласта) и помножи са 100.

#### **3.2.4.2. Испитивање типа ћелијске смрти проточном цитометријом Annexin V/7-AAD бојењем**

Ћелије у којима је започео процес програмиране ћелијске смрти, односно апоптоза, су детектоване коришћењем Annexin-V-FITC (енг. *Annexin-V-fluorescein isothiocyanate*) кита проточном цитометријом (Apoptosis Detection Kit, Beckman Coulter, САД). Annexin-V-FITC је специфична флуоресцентна боја која се везује за фосфатидилсерине ћелијске мембране. На самом почетку процеса апоптозе, фосфатидилсерин, који се у живим ћелијама обично налази на унутрашњем слоју мембране ћелије, транслоцира се на спољни слој

мембране, постајући тиме доступан за везивање annexin-V-FITC. Друга боја, 7-амино-актиномицин D (енг. *7 actinomycin*, 7-AAD) се везује за ћелијску ДНК у ћелијама где је ћелијска мембрана потпуно оштећена (Shounan и сар., 1998). Након одређеног времена инкубације са третманима (24 сата и 72 сата), ћелије су трипсинизирани, испране PBS-ом и ресуспендоване у ледено-хладном пуферу за везивање. На основу везивања ове две боје разликујемо четири типа ћелија: (а) ћелије које су annexin-V-FITC (-) и 7-AAD (-) су потпуно вијабилне; (б) ћелије у раним фазама апоптозе су annexin-V-FITC (+) и 7-AAD (-); (в) ћелије у касним стадијумима апоптозе су annexin-V-FITC (+) и 7-AAD (+) и (г) некротичне ћелије су annexin-V-FITC (-) и 7-AAD (+). Annexin-V-FITC и 7-AAD су додати сваком узорку, који се након тога инкубира у мраку током 15 минута.  $2 \times 10^4$  догађаја анализирано је на проточном цитометру (FC 500 Beckman Coulter Flow Cytometer).

### 3.2.5. Испитивање параметара редокс статуса

Након третмана неуропептидом Y у трајању од 24 сата и 72 сата у фласковима ( $75 \text{ cm}^2$ ), ћелије су трипсинизирани и припремане за даљу манипулацију. За испитивање параметара редокс статуса коришћен је ћелијски лизат. Након трипсинизације ћелије су из сваког флашка пребачене у епрувете и центрифугиране 10 мин/ $1.000 \times g$  на  $4^\circ\text{C}$ . Након тога је одстрањен супернатант, а ћелије су испране у хладном PBS-у и након поновног центрифугирања (10 мин/ $1.000 \times g$  на  $4^\circ\text{C}$ ), растворене у оној запремини PBS-а у којој је број ћелија  $10^6 / \text{ml}$ . Ова ћелијска суспензија је коришћена за даље анализе.

#### 3.2.5.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) NBT тестом

Концентрација супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) у узорку је одређена колориметријском методом и заснива се на редукцији нитроблу тетразолиума (енг. *NBT – nitro blue tetrazolium*) до нитроблу формазана у присуству  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Auclair и Voisin, 1985). Током редукције NBT-а, у присуству  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , боја NBT-а се из жуте мења у тамно сиво- црну. Ћелијска суспензија након третмана неуропептидом Y инкубира се у епруветама са 0.1% NBT-а. Након тога су ћелије инкубирани 45 минута у  $\text{CO}_2$  инкубатору. За квантификацију бојене реакције, формазан из ћелија је растоврен током ноћи у 2M калијум хидроксиду, а добијена боја је колориметријски мерена на читачу микротитар плоча на таласној дужини од 570 nm (ELISA reader Optic System RT2100-C, Rayto). Количина редукованог NBT-а је

одређена променом апсорпције на 570 nm, на основу моларног коефицијента екстинкције за моноформаза који износи  $15.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Коришћена је следећа формула за прерачун концентрације редукованог NBT-а:

$$\text{nmol NBT/L} = A/0,015 \times V_{\text{tot}}/V_{\text{ex}},$$

где је  $A$  – апсорбанца;  $V_{\text{tot}}$  – укупна запремина раствора у бунарићу (210  $\mu\text{l}$ ) и  $V_{\text{ex}}$  – запремина ћелија са третманом (100  $\mu\text{l}$ ). Концентрација је изражена као  $\text{nmol/L}$  у  $10^6$  ћелија/ml.

Како би се измериле концентрације  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  мембране су разбијене сонификацијом ћелијске суспензије на леду серијом од 10 сукцесивних звучних удара (ултразвучне фреквенције сонификатора фрагментишу липидну мембрану ћелија). Узорци су потом центрифугирани 20 мин на 10.000 обртаја, како би се наталожили остаци ћелијских мембрана. Концентрације нитрита и водоник пероксида одређиване су у супернатанту. За одређивање концентрације GSH и GSSG суспензија трофобласта је центрифугирана у трајању од 10 мин на 3000 обртаја. Након центрифугирања уклоњен је супернатант и додат је 1 ml 2,25% сулфосалицилне киселине (+4°C) на сваких  $10^6$  ћелија суспензије. Лизирање ћелијских мембрана вршено је у 3 циклуса наизменичног замрзавања и одмрзавања (комора -80°C, и водено купатило на 37°C, у трајању од 15 мин). Након тога узорци су центрифугирани 30 мин на 3000 обртаја, како би се наталожили протеини и остаци ћелијских мембрана. Концентрације GSH и GSSG одређиване су у добијеном супернатанту.

### 3.2.5.2. Одређивање концентрације нитрита ( $\text{NO}_2^-$ )

Колориметријско одређивање концентрације нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) је изведено методом коју је првобитно установио Griess (1879). Принцип методе се базира на диазотизационој реакцији у којој сулфаниламидна киселина и N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид, реагују са нитритима ( $\text{NO}_2$ ), дајући стабилно пурпурно обојено азотно једињење. Концентрација нитрита је стога, директно пропорционална интензитету пурпурне боје. Експерименти су вршени на собној температури. Концентрација се мери у супернатанту након центрифугирања ћелијског лизата добијеног сонификацијом суспензије ћелија током 10 циклуса на леду. По 50  $\mu\text{l}$  супернатанта узорака и стандарда је пренето у микротитар

плоче, а затим је додато по 50  $\mu\text{l}$  сулфаниламидног реагенса у све бунариће, као и у бунариће са нитритним стандардом за стандардну криву. Плоче су инкубиране 10 минута на собној температури, заштићене од светла. Након тога је додато по 50  $\mu\text{l}$  N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид реагенса у све бунариће. Стандардни раствор нитрита (100 mM) је серијски разблажен у концентрацијама од 1.56  $\mu\text{M}$ , 3.13  $\mu\text{M}$ , 6.25  $\mu\text{M}$ , 12.5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  и прошао је кроз исту процедуру. Интензитет формиране пурпурне боје се мери колориметријски на таласној дужини од 550 nm (ELISA reader Optic System RT2100-C, Rayto). Концентрација нитрита се прерачунава преко одговарајуће стандардне криве за нитрите:

$$\text{nmol NO}_2^-/\text{ml} = A/F \times R$$

где је А – апсорбанца; F – нагиб стандардне криве и R – разблажење.

Концентрација нитрита се изражава као  $\mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија/ml.

### 3.2.5.3. Одређивање концентрације водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Концентрација водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) је мерена у супернатанту добијеном сонификацијом суспензије трофобласта. Колориметријско одређивање концентрације  $\text{H}_2\text{O}_2$  заснива се на оксидацији фенол црвеног (*PhenolRed*) водоник пероксидом у присуству пероксидазе рена (енг. *HRPO* – *horseradish peroxidase*) као катализатора (Pick и Keisari, 1980). У 50  $\mu\text{l}$  супернатанта додаје 50  $\mu\text{l}$  реакционе смеше, коју сачињава 0,28 mM *PhenolRed* + пероксидаза рена – HRPO тип II ензим (1 U/ml). Реакциона смеша се инкубира сат времена на 37°C. Серија стандардних раствора водоник пероксида прошла је кроз исти поступак. Интензитет формиране боје се мери колориметријски на таласној дужини од 550 nm (ELISA reader Optic System RT2100-C). Концентрација  $\text{H}_2\text{O}_2$  се изражава као nmol /L у  $10^6$  ћелија/ml. Узимајући у обзир очитане апсорбанце узорка, екстинкциони коефицијент F и фактор разблажења R, израчунате су концентрације  $\text{H}_2\text{O}_2$  према следећем обрасцу и изражене у nmol/L у  $10^6$  ћелија:

$$\text{nmol/L H}_2\text{O}_2 \text{ у } 10^6 \text{ ћелија} = \text{Abs}/F \times R$$

где је А – апсорбанца; F – нагиб стандардне криве и R – разблажење.

#### 3.2.5.4. Одређивање концентрације редукованог и оксидованог глутатиона (GSH и GSSG)

Колориметријско одређивање редукованог глутатиона (GSH) се заснива на оксидацији GSH користећи сулфидни реагенс 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоева киселина) (DTNB) при чему се формира жути продукт, 5'-тио-2-нитробензоева киселина (TNB) (Baker и сар., 1990). У 50  $\mu$ l супернатанта додато је 100  $\mu$ l реакционе смеше која је припремљена непосредно пре почетка рада и садржи 1 mM DTNB, растворен у DMSO-у и допуњен фосфатним пуфером до потребне запремине. Након тога је микротитар плоча инкубирана 5 минута на собној температури и мерене су апсорбанце на 405 nm на ELISA читачу за микротитар плоче (ELISA reader Optic System RT2100-C, Rayto). Концентрација GSH се прерачунава преко одговарајуће стандардне криве конструисане на основу познатих концентрација GSH, а изражава се у nmol/ml ( $\mu$ mol/L) у  $10^6$  ћелија/ml. Концентрација оксидованог глутатиона (GSSG) је измерена есејем који се базира на мерењу концентрације глутатиона коришћењем ензима глутатионредуктазе (GR) (Beutler, 1975) и предходним додавањем 4-винилпиридина који спречава спонтану оксидацију глутатиона до форме GSSG. Концентрација оксидованог глутатиона се изражава као  $\mu$ mol/L у  $10^6$  ћелија/ml.

#### 3.2.6. Испитивање генске еспресије гена за iNOS, HIF-1 $\alpha$ , MMP-9, COX-2 и VEGF

##### 3.2.6.1. Изоловање РНК из ћелија

Принцип за екстракцију РНК се заснива на фенол/хлороформ реакцији коју су први описали Chomczynski и Sacchi (1987). Сав рад се врши на леду, сем корака где је наглашено другачије. Ћелије су трипсинизирани, центрифугиране на  $1.000 \times g$  током 10 минута. Затим су избројане и ресуспендоване у *Trizol* реагенсу у концентрацији од  $10^6$  ћелија/1 ml *Trizol*-а. Након тога је додато 200  $\mu$ l хлороформа/1ml *Trizol*-а. Узорци су затим центрифугирани на  $12.000 \times g$  током 15 минута на 2-8°C. Након центрифугирања, водена фаза (која се издваја на врху) је пребачена у нову микротубу. Затим је додат изопропанол, 500  $\mu$ l/1 ml *Trizol*-а смеша је инкубирана на собној температури током 10 минута. Узорци су затим центрифугирани на  $12.000 \times g$  током 10 минута на 2-8°C. Након центрифугирања, супернатант је уклоњен и РНК талог испран са 80% етанола/1 ml *Trizol*-а. Узорци су затим

центрифугирани на  $7.500 \times g$  током 5 минута на  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Преостали етанол је остављен да се осуши на ваздуху 2-3 минута, а затим је талог, односно изолована РНК растворена у  $20 \mu\text{l}$  воде PCR степена чистоће и инкубирана на  $55^{\circ}\text{C}$  на термоблоку 2-3 минута. Сваки узорак је квантификован коришћењем биофотометра (Eppendorf Bio Photometer plus, Немачка). За процену чистоће изоловане РНК коришћен је параметар који је представљен односом апсорбанци на  $280 \text{ nm}$  и  $260 \text{ nm}$  ( $A_{280/260}$ ) и који треба да буде око 2 да би се изолована РНК сматрала довољно чистом за даљу употребу у квантификацији генске експресије. Након изолације РНК, због лоше стабилности овог молекула, одмах је вршена наредна метода, односно реверзна транскрипција, док се вишак РНК може чувати на  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.6.2. Реверзна транскрипција информационе РНК (RT PCR)

Реверзна транскрипција информационе РНК је изведена према спецификацији произвођача (Super Script First Strand Synthesis Kit, Invitrogen). РНК ланац се прво реверзно преписује у своју комплементарну ДНК (сDNA) коришћењем ензима реверзне транскриптазе. Затим је припремљена реакциона смеша која садржи инхибитор РНКазе и прајмере (Oligo dT). Након тога је изолованој РНК (концентрације  $1 \mu\text{g/ml}$ ) додата реакциона смеша, након чега је ова смеша са иРНК инкубирана на  $65^{\circ}\text{C}$  током 5 минута. Затим се припрема друга реакциона смеша која садржи инхибитор РНКазе, дезоксирибонуклеотид трифосфате у концентрацији  $10 \text{ mM}$ ,  $5\times$  концентровани пуфер и ензим реверзну транскриптазу (SuperScript II). Апарат за PCR је програмиран за RT PCR протокол: 90 минута на  $42^{\circ}\text{C}$ ; током 5 минута на  $95^{\circ}\text{C}$  и на  $4^{\circ}\text{C}$  “заувек”, односно док се не заустави машина. Узорци комплементарне ДНК се могу чувати на  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.6.3. Квантитативни PCR (qPCR)

Синтетисана сDNA (комплементарна ДНК, *Complementary DNA*) умножена је у qPCR (*Quantitative PCR*, количински PCR) реакцији машином 7500 Real Time System (Applied Biosystems) користећи парове прајмера:  $\beta\text{-actin}_{\text{fw}}/\beta\text{-actin}_{\text{rev}}$ ,  $\text{iNOS}_{\text{fw}}/\text{iNOS}_{\text{rev}}$ ,  $\text{HIF-1}\alpha_{\text{fw}}/\text{HIF-1}\alpha_{\text{rev}}$ ,  $\text{MMP-9}_{\text{fw}}/\text{MMP-9}_{\text{rev}}$ ,  $\text{COX-2}_{\text{fw}}/\text{COX-2}_{\text{rev}}$  и  $\text{VEGF}_{\text{fw}}/\text{VEGF}_{\text{rev}}$ . Прајмери су специфични за кодирајуће регионе секвенци  $\beta\text{-aktin}$ , iNOS, HIF-1 $\alpha$ , MMP-9, COX-2 и VEGF гена врсте *Homo sapiens*. Програм qPCR реакције постављен је у складу са упутствима произвођача полимеразе (Applied Biosystems): активација ензима 3

мин на 95°C, 40 циклуса од по 15 секунди на 95°C и од по 60 секунди на 55°C. Коначна запремина износила је 20  $\mu$ l и садржала је 5 pmol прајмера, 1 x *SYBR FAST Universal Master Mix* који садржи *ROX* референту боју (*Applied Biosystems*) и 2  $\mu$ l cDNA матрице. Релативна експресија израчуната је по формули  $2^{-\Delta\Delta CT}$  где се  $\Delta CT$  односи на разлику између празне вредности циклуса (CT) добијене за циљни ген и CT добијене за конститутивно експримирани ген за  $\beta$ -актин (ендогена контрола). Вредност  $\Delta\Delta CT$  за сваки узорак мери разлику између сопствене  $\Delta CT$  и  $\Delta CT$  вредности калибратора (Livak и Schnittgen, 2001). Контролни узорци (негативна контрола) без cDNA су такође умножени у qPCR реакцији како би се потврдило да је контаминација геномском ДНК у узорцима изолованих иРНК у прихватљивом опсегу (Cheeseman и сар., 2012).

### 3.2.7. Одређивање протеинске експресије индуцибилне синтазе азот монооксида

Протеинска експресија индуцибилне синтазе азот монооксида (iNOS) се одређује методом имунофлуоресценце. Ова техника се користи како би одређене ћелијске делове маркирали флуоресцентним бојама и то по принципу антиген-антитело. С обзиром на специфичност реакције антиген-антитело овом методом је могуће прецизно пратити присуство, локализацију и дистрибуцију одређеног g/ml протеина како у ћелији тако и у ткиву. Антитело које служи као индикаторни протеин се маркира флуоресцентном бојом, које се карактеришу различитим таласним дужинама екстинције и емисије, а њихово детектовање се врши на флуоресцентном микроскопу.

За одређивање iNOS имунофлуоресценцом ћелије JEG-3 су засејане на покровно стакло у микротитар плочи са шест отвора ( $5 \times 10^4$  ћелија по бунарићу). Након постизања 80% конfluентности ћелије су третиране са по 2 ml одговарајућег раствора а контроли је замењен медијум. Ћелије су третиране инакон истека 24 сата, периода инкубације са третманима, ћелије су испране PBS-ом. Након тога су ћелије фиксирани 4% параформалдехидом који је растворен у PBS-у и то у трајању од 20 минута на собној температури. После фиксације ћелије су три пута испране PBS-ом и пермеабелизоване 2 минута хладним метанолом (20°C). Након пермеабелизације ћелије су опет испране три пута PBS-ом и блокиране 1% BSA у трајању од 20 минута. Када су ћелије фиксирани оставили смо да се инкубирају два сата заједно са специфичним антителом. Једно парче парафилма је стављено у петри кутију и дезинфиковано са 75% алкохолом, након чега је

стављена једна кап од 60  $\mu$ l примарног антитела (*RD Systems*) у PBS-у у концентрацији од 20  $\mu$ g/ml. На кап је постављена покривна плочица тако да је страна на којој су ћелије окренута ка парафилму. Након периода инкубације са примарним антителом, покривне плочице се враћају у бунариће и испирају три пута са PBS-ом по 15 минута и након тога је поновљен поступак за инкубацију са секундарним антителима (*ThermoScientific*). Секундарно антитело је разблажено са PBS-ом и то у односу 1:200. За визуелизацију једара који су обојени плавом бојом коришћена је DAPI боја у разблажењу 1:1.000. По истеку времена инкубације са секундарним антителом покривна плочица са ћелијама се лепи на предметно стакло уз помоћ медијума са поливинил-алкохолем. Након тога су препарати остављени преко ноћи да се осуше након чега су посматрани на флуоресцентном микроскопу (*Ti-Eclipse*) на филтерима одређене таласне дужине и на увећању 600 $\times$  (*Higuchi и сар., 2001*).

### 3.2.8. Одређивање концентрације металопротеиназе 9 (MMP-9)

Укупна концентрација MMP-9 се детектује ензимском, имунолошким методом. Квантификација се врши спектрофотометријски, а интензитет боје обрнуто је пропорционалан концентрацији MMP-9 у почетном узорку. Метода се заснива на мерењу укупне количине MMP-9, ензима који учествује у разградњи екстрацелуларног матрикса, а који може бити у активној или проформи (*Корке и сар., 2015*). Стандардна крива мора бити конструисана за сваки тест, да би се прецизно квантификовала концентрација MMP-9. Циљ ове методе је да се на основу концентрација MMP-9 процени инвазивни потенцијал испитиваних ћелија, односно потенцијални антиинвазивни ефекат третмана.

Ћелије JEG-3 су гајене у флашковима T-25  $\text{cm}^2$  са комплетним медијумом (5 ml) у  $\text{CO}_2$  инкубатору (5%  $\text{CO}_2$  и 37°C). Након достизања конфлуентности од 80%, ћелије су третиране, док је у флашковима са контролним (нетретиранима) ћелијама замењен комплетан медијум. Након истека инкубације у трајању од 24 сата, медијум са третманима, као и медијум из контролних ћелија је извучен из фласкова и даље коришћен као узорак за есеј MMP-9, или чуван у комори на -80°C до извођења есеја.

На плочу са 96 бунарића наливено је примарно антитело за MMP-9 (*Capture Antibody*). Плоча је инкубирана 24 сата. Након истека периода инкубације, примарно антитело (*Capture Antibody*) је испирано 3 пута *Wash Buffer*-ом. Након испирања антитела у



сваки бунарић је додато 300  $\mu$ l 1% BSA (*Reagent Diluent*). Плоча је инкубирана 60 минута на 37°C. По завршеној инкубацији сви бунарићи су аспирирани и додато је по 100  $\mu$ l узорка (контролни и медијум са третанима). За конструисање стандардне криве, у бунариће је додато по 100  $\mu$ l раствора познате концентрације MMP-9 (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 и 2000 pg/ml). Плоча је инкубирана 2 сата на собној температури. Након истека инкубације сви бунарићи су аспирирани и у сваки је додато по 100  $\mu$ l секундарног антитела за MMP-9 (*Detection Antibody*). Плоча је поново инкубирана 2 сата на собној температури. Након истека инкубације вршена је аспирација секундарног антитела, а након тога је додато по 100  $\mu$ l *Streptavidin*-HRP-а. Овај протеин је створио комплекс стрептавидин-биотин који је отпоран на третирање органским растварачима. После истека инкубације од 20 минута на собној температури, у сваки бунарић је додато 100  $\mu$ l *Supstrat Solution*-а ( $H_2O_2$  : Тетраметилбензидин = 1 : 1), а плоча је поново инкубирана 20 минута у мраку. Након истека инкубације додато је по 50  $\mu$ l  $2NH_2SO_4$  (*Stop Solution*). Овај раствор је зауставио читав процес и фиксирао детектовану MMP-9. Апсорбанца је мерена на ELISA читачу на 450 nm, према упутствима *R&Dsystem (Human MMP-9 DuoSet ELISA)*.

### 3.2.9. Миграциони ћелијски есеј 2D (*Boyden chamber*)

Миграциони капацитет ћелија се одређује њиховом способношћу да пролазе кроз поре поликарбонатне мембране (8  $\mu$ m пречник поре; Greinerbio-one, Switzerland) смештених на дну миграционих коморица. Тестирање ћелијске покретљивости се базира на поступку који је описао Chen (2005). Ћелије су изложене деловању 1 nM NPY у трајању од 24 сата и 72 сата. У другој поставци екперимента, ћелије су инкубиране са 1 mM NG-nitro-L-argininemethylester (L-NAME), блокатором ензима синтезе азот монооксида у трајању 24 сата и 72 сата. Иницијални раствор L-NAMEу физиолошком фосфатном пуферу је коришћен за екперимент. Овај почетни раствор (шток) накнадно је растворен у медијуму за култивацију (DMEM, Gibco) у коме је подешена концентрација 1 mM. Сваки екперимент је изведен у трипликату (коморице за сваки појединачан третман и контролу). Након третмана у фласковима, све три групе ћелија су трипсинизирани и постављени на мембрану у броју  $1 \times 10^5$  /бунари у 500  $\mu$ l медијума са 10% FBS. Доњи бунарићи у контроли садрже 750  $\mu$ l DMEM-а са 10% FBS-а, док бунарићи са третанима садрже 1 nM NPY или 1 mM L-NAME растворене у 750  $\mu$ l DMEM-а са 10% FBS-ом. Након 6 сати

инкубације на 37°C, заостале ћелије са горње стране мембране се скидају памучним штапићима за гребанье. Преостале ћелије су мигрирале на доњу страну мембране и потом се фиксирају 4% параформалдехидом (PFA) у трајању од 20 мин. на собној температури, а потом се обоје 0,1% бојом кристал виолет (*crystal violet*) раствореној у 200 mM 2-(N-morpholino) етан сулфонска киселина (MES пуфер, pH = 6.0) у трајању од 10 минута. Након додавања 10% сирћетне киселине која раствара боју, читава се апсорбанца на ELISA микротитар. Индекс миграције се рачуна као однос апсорбанце третираних група и апсорбанце контроле помножен са 100 како би се добила процентуална вредност.

### 3.3. Статистичка обрада резултата

Сви резултати су приказани табеларно и графички. Сви појединачни експерименти рађени су у трипликату, а добијени резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка, коришћењем SPSS софтверског пакета за статистичку обраду податка (SPSS for Windows, version 17, 2008, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). За утврђивање постојања разлике између средњих вредности коришћени су *Student's T test* и *Independent test*. Разлике  $p < 0.05$  су сматране статистички значајним. Софтвер који је коришћен за анализу фотографија добијених на инвертном флуоресцентном микроскопу је NIS-Elements AR Microscope Imaging Software (Nikon, Japan). Процент вијабилних, рано и касно апоптотских, као и некротских ћелија је проточном цитометријом утврђен помоћу софтвера CXP Software for FC500 Flow Cytometry System, док су нивои генске експресије одређивани коришћењем софтвера Fast Real-Time PCR Instrument.

---

## **4. Результати**

Током ове студије анализирани су ефекти које неуропептид Y остварује на хуманим трофобластима ћелијске линије JEG-3. Добијени резултати могли би да допринесу бољем разумевању евентуалног доприноса који неуропептид Y има у регулацији ћелијске хомеостазе плаценталног ткива, нарочито на трофобласте који се сматрају кључним ћелијама за оптималну прогресију трудноће.

Део резултата добијених у овој докторској дисертацији приказан је табеларно и графички као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка, док су резултати у вези са протеинским експресијама приказани микрографијама добијеним на флуоресцентном микроскопу. У оквиру овог експерименталног рада испитивани су различити биолошки ефекти које остварује неуропептид Y (NPY) у концентрацијама 0,1 nM и 1 nM у ћелијама хуманих трофобласта (JEG-3) у култури.

#### **4.1. Испитивање ћелијске вијабилности (МТТ есеј)**

Најпре је одређиван потенцијални ефекат неуропептида Y на вијабилност трофобласта коришћењем МТТ теста, након инкубације трофобласта са различитим (растућим) концентрацијама у трајању од 24 сата (краткотрајни третман) и 72 сата (дуготрајни третман).

Да би се испитао ефекат неуропептида Y на различите аспекте функционисања трофобласта, у првом делу експерименталних студија испитиване су оне концентрације неуропептида Y које би могле бити адекватне за даља тестирања. Експериментални дизајн студије претпостављао је коришћење оне концентрације овог протеина које ће апроксимативно одговарати повишеним концентрацијама у организму, регистрованим у неким патолошким стањима трудноће. Испитиван је ефекат на вијабилност ћелија неуропептида Y у концентрацијама од 1 pmol/L (1 nM), 10 pmol/L (10 nM) и 100 pmol/L (100 nM). Није показана значајна статистичка разлика у вијабилности третираних ћелија у односу на контролне, како након третмана од 24 сата, тако и након третмана од 72 сата. Са друге стране, концентрација од 1 nM NPY-а апроксимативно одговара патолошким концентрацијама овог биоактивног пептида у прееклампсији (неколико стотина pmol/L), па

се њена апликација може сматрати значајно повишеном у односу на физиолошке вредности, а ефекти које остварује патолошким (акутним) ефектима. Због овога је у анализама других физиолошких параметара ћелија као што су апоптоза, пролиферативни потенцијал, параметри оксидативног стреса, миграциони потенцијал и инвазиона способност, ова концентрација NPY-а третирана као акутна (“патолошка”).

У Табели 1 и на Графику 1 и 2 приказани су ефекти неуропептида Y на вијабилност JEG-3 ћелија. Анализа је показала да NPY у концентрацији од 1 nM у краткотрајном третману (24 сата) не смањује значајно вијабилност ( $96,24 \pm 2,82$ ), док његове више концентрације (10 nM и 100 nM) доводе до значајног смањења вијабилности ових ћелија ( $93,27 \pm 1,21$  и  $89,35 \pm 1,33$ ) у поређењу са контролом ( $100 \pm 1,32$ ) (Табела 1 и График 1).

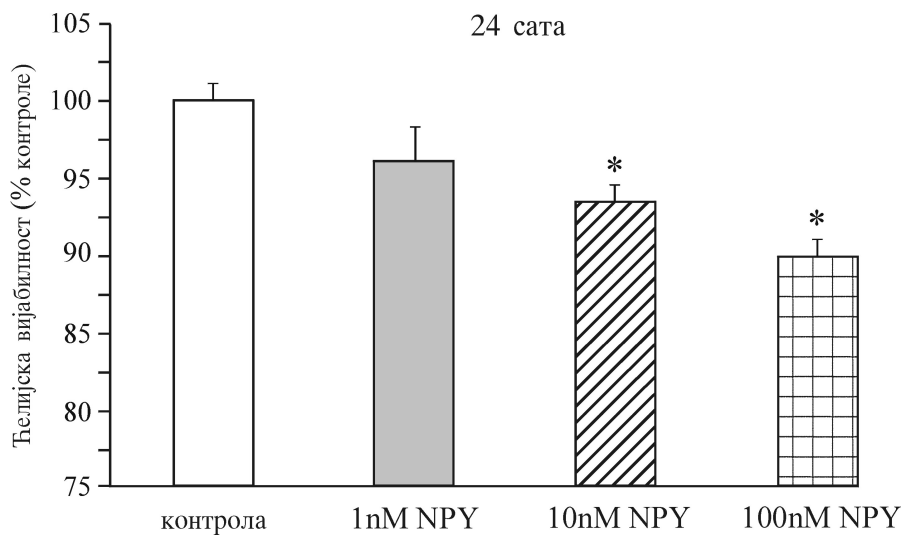
Резултати анализе вијабилности трофобласта након дуготрајног третмана (72 сата) неуропептидом Y показују дозно-зависно повећање вијабилности у свим тестираним концентрацијама (1 nM, 10 nM и 100 nM). Концентрација од 1 nM не доводи до статистички значајног повећања вијабилности ( $105,35 \pm 4,29$ ), док више концентрације (10 nM и 100 nM) значајно повећавају вијабилност ових ћелија ( $119,9 \pm 9,98$  и  $118,5 \pm 5,54$ ) у поређењу са контролом ( $100 \pm 8,93$ ) (Табела 1 и График 2). Ови резултати указују да неуропептид Y индукује промену у активности митохондријаних редуктаза у трофобластима.

**Табела 1.** Ефекат растућих концентрација неуропептида Y (NPY) на вијабилност ћелија линије JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана.

Вијабилност ћелија JEG-3 (%)				
	контрола	1 nM NPY	10 nM NPY	100 nM NPY
24 сата	$100 \pm 1,32$	$96,24 \pm 2,82$	$93,27 \pm 1,21^*$	$89,35 \pm 1,33^*$
72 сата	$100 \pm 8,93$	$105,35 \pm 4,29$	$119,9 \pm 9,98^*$	$118,5 \pm 5,54^*$

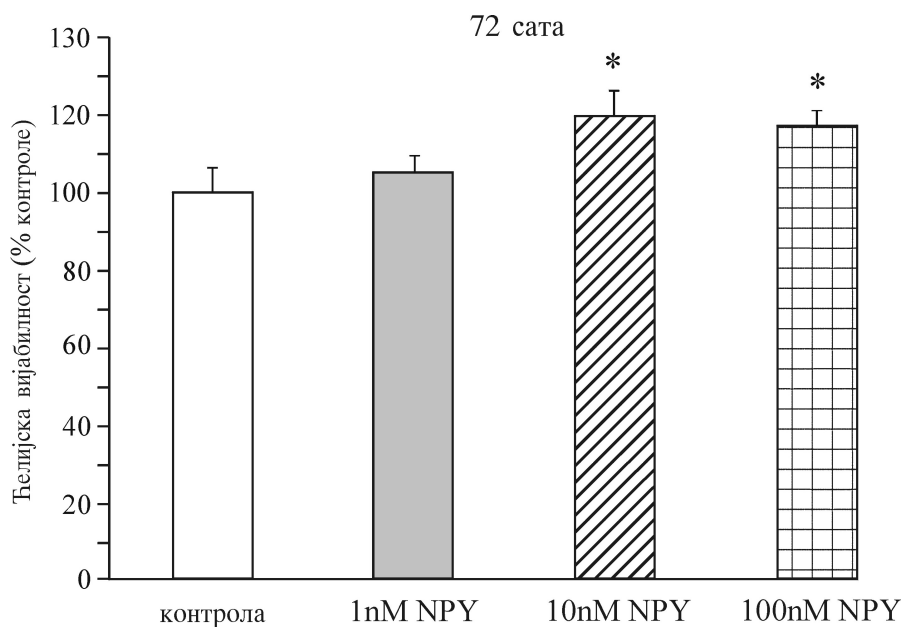
\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 1.** Ефекти неуропептида Y (NPY) на вијабилност ћелија линије JEG-3 након краткотрајног (24 сата) третмана.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 2.** Ефекти неуропептида Y (NPY) на вијабилност ћелија линије JEG-3 након дуготрајног (72 сата) третмана.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

## 4.2. Индекс пролиферације хуманих цитотрофобласта JEG-3

Промене индекса пролиферације ћелија линије JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM и 1 nM NPY приказане су у **Табели 2** и на **Графику 3**. Резултати показују статистички значајно повећање индекса пролиферације ћелија линије JEG-3 након краткотрајног (24 сата) ( $1,781 \pm 0,274$ ) и дуготрајног (72 сата) ( $3,431 \pm 0,451$ ) третмана 0,1 nM NPY у односу на контролу ( $1,0 \pm 0,137$ ). Слични резултати промене индекса пролиферације ћелија JEG-3 су добијени и након краткотрајног (24 сата) ( $1,561 \pm 0,241$ ) и дуготрајног (72 сата) ( $3,131 \pm 0,460$ ) третмана 1 nM NPY у односу на контролу ( $1,0 \pm 0,140$ ). Забележено је и  $\sim 2$  пута веће повећање индекса пролиферације ћелија у дуготрајном (72 сата) третману у поређењу са краткотрајним (24 сата) третманом неуропептидом Y у концентрацијама 0,1 nM и 1 nM.

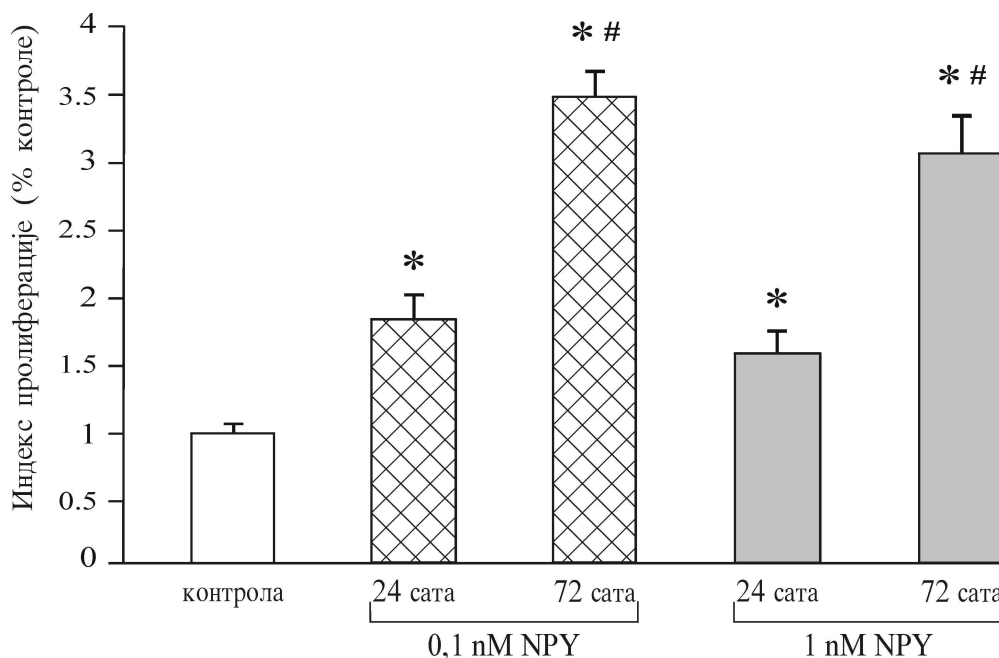
**Табела 2.** Промене индекса пролиферације хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана неуропептидом Y (NPY) у концентрацијама 0,1 nM и 1 nM.

Индекс пролиферације ћелија JEG-3 (% контроле)			
	контрола	24 сата	72 сата
0,1 nM NPY	$1,0 \pm 0,137$	$1,781 \pm 0,274^*$	$3,431 \pm 0,451^{* \#}$
1 nM NPY	$1,0 \pm 0,140$	$1,561 \pm 0,241^*$	$3,131 \pm 0,460^{* \#}$

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са краткотрајним (24 сата) третманом ( $p < 0.05$ ).

**График 3.** Промене индекса пролиферације хуманих цитотрофобласта ЈЕГ-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана неуропептидом Y (NPY) у концентрацијама 0,1 nM и 1 nM.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са краткотрајним (24 сата) третманом ( $p < 0.05$ ).

### 4.3. Индикатори апоптозе

Процент апоптозираних ћелија процењиван је проточном цитометријом коришћењем специфичних мембранских маркера, као што су анексин V-FITC (везује се за екстернализовани фосфатидилсерин апоптотичних ћелија) и пропидијум јодид (боји само ћелије са дезинтегрисаном мембраном). Подаци показују да третман ових ћелија неуропептидом Y не само да не индукује значајне проапоптотске промене у односу на контролне ћелије, већ показује и статистички значајан антиапоптотски ефекат, односно промовише преживљавање трофобластних ћелија. Ови резултати указују да неуропептид Y може имати значајне протективне физиолошке ефекте у нормалним процесима трофобластне инвазије (на физиолошким концентрацијама).



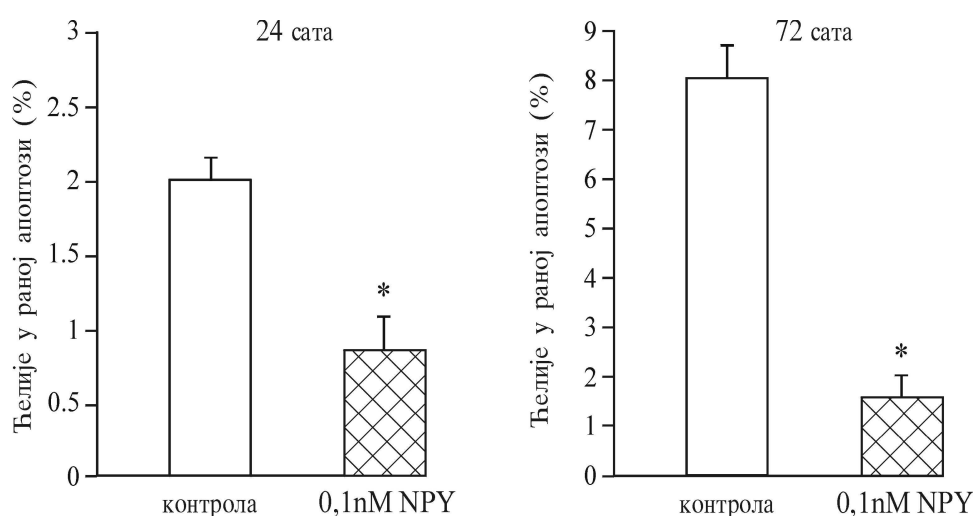
У Табели 3 и на Графику 4 приказан је проценат ћелија у раној апоптози након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана NPY-а у концентрацији од 0,1 nM. Након краткотрајног третмана (24 сата) забележено је статистички значајно смањење процента ћелија у фази ране апоптозе ( $0,90 \pm 0,28$ ) у односу на степен апоптозе у контроли ( $2,03 \pm 0,17$ ). Након дуготрајног третмана (72 сата) такође је забележено статистички значајно смањење процента ћелија у фази ране апоптозе ( $1,48 \pm 0,41$ ) у односу на контролне вредности ( $8,03 \pm 0,73$ ).

**Табела 3.** Процент ћелија у фази ране апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY.

<b>JEG-3 ћелије у раној апоптози (% од укупних ћелија)</b>		
	<b>контрола</b>	<b>0,1 nM NPY</b>
<b>24 сата</b>	<b><math>2,03 \pm 0,17</math></b>	<b><math>0,90 \pm 0,28^*</math></b>
<b>72 сата</b>	<b><math>8,03 \pm 0,73</math></b>	<b><math>1,48 \pm 0,41^*</math></b>

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 4.** Процент ћелија у фази ране апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

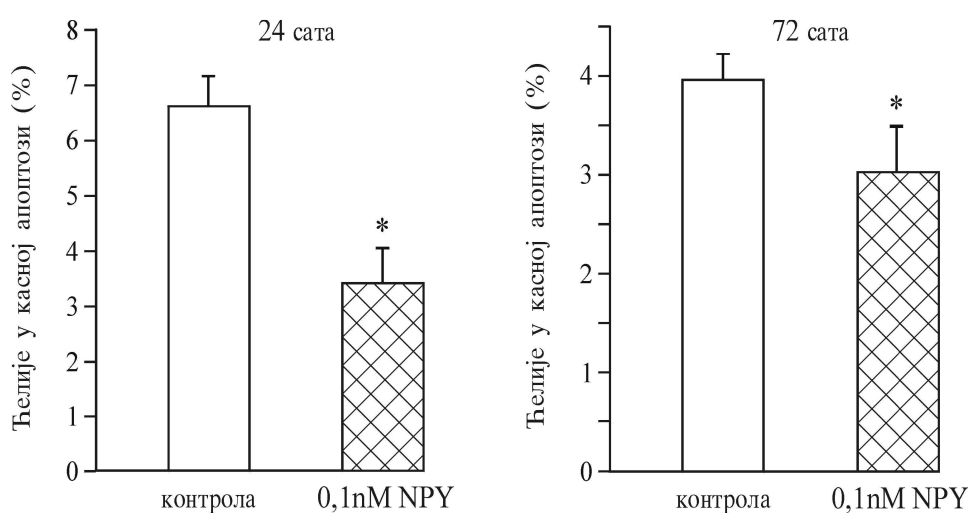
У Табели 4 и на Графику 5 је приказан проценат ћелија у фази касне апоптозе након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана NPY у концентрацији од 0,1 nM. Након краткотрајног третмана (24 сата) 0,1 nM NPY забележено је статистички значајно смањење процента ћелија у фази касне апоптозе ( $3,39 \pm 0,52$ ) у односу на контролу ( $6,63 \pm 0,45$ ). Након дуготрајног третмана (72 сата) 0,1 nM NPY забележено је статистички значајно смањење процента ћелија у фази касне апоптозе ( $3,02 \pm 0,47$ ) у односу на контролне вредности ( $3,96 \pm 0,38$ ).

**Табела 4.** Процент ћелија у фази касне апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY.

<b>JEG-3 ћелије у касној апоптози (% од укупних ћелија)</b>		
	<b>контрола</b>	<b>0,1 nM NPY</b>
<b>24 сата</b>	<b><math>6,63 \pm 0,45</math></b>	<b><math>3,39 \pm 0,52^*</math></b>
<b>72 сата</b>	<b><math>3,96 \pm 0,38</math></b>	<b><math>3,02 \pm 0,47^*</math></b>

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 5.** Процент ћелија у фази касне апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

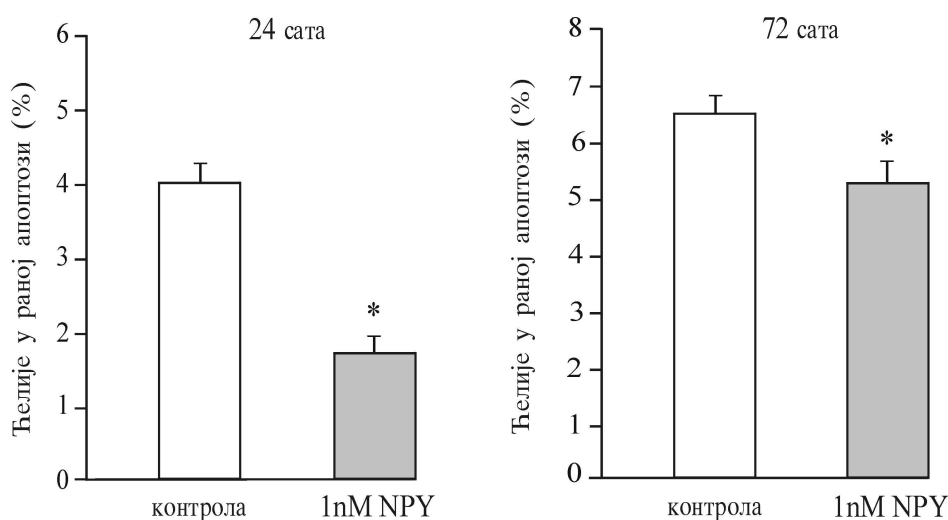
У Табели 5 и на Графику 6 приказан је проценат ћелија у раној апоптози након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) акутног третмана неуропептидом Y (1 nM). Након краткотрајног третмана (24 сата) 1 nM NPY забележено је статистички значајно смањење процента ћелија у фази ране апоптозе ( $1,74 \pm 0,37$ ) у односу на контролу ( $4,03 \pm 0,23$ ). Слични резултати добијени су и након дуготрајног третмана (72 сата) – 1 nM NPY смањује проценат ћелија у фази касне апоптозе ( $5,26 \pm 0,41$ ) у односу на контролне вредности ( $6,49 \pm 0,36$ ).

**Табела 5.** Процент ћелија у фази ране апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY.

<b>JEG-3 ћелије у раној апоптози (% од укупних ћелија)</b>		
	<b>контрола</b>	<b>1 nM NPY</b>
<b>24 сата</b>	<b><math>4,03 \pm 0,23</math></b>	<b><math>1,74 \pm 0,37^*</math></b>
<b>72 сата</b>	<b><math>6,49 \pm 0,36</math></b>	<b><math>5,26 \pm 0,41^*</math></b>

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 6.** Процент ћелија у фази ране апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

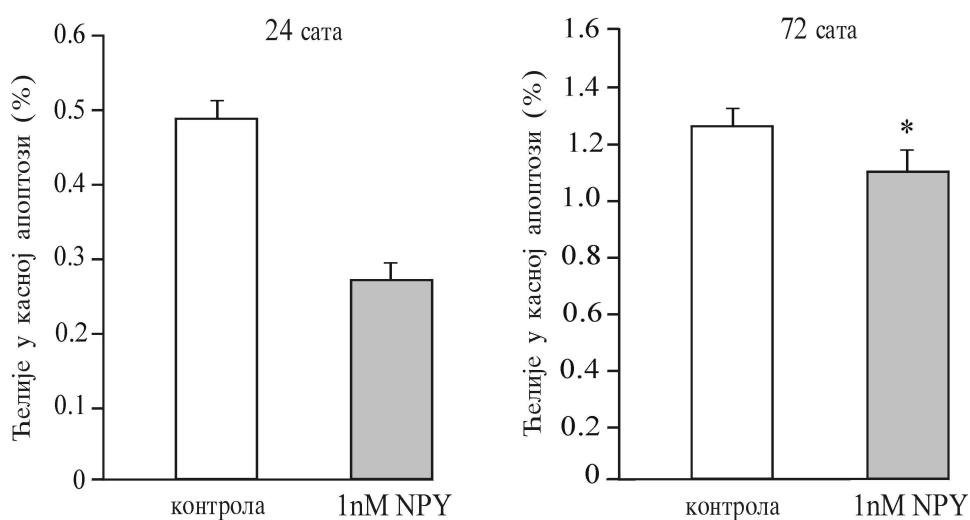
У Табели 6 и на Графику 7 је приказан проценат ћелија у фази касне апоптозе након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY. Само након дуготрајног третмана 1 nM NPY (72 сата) је забележено статистички значајно смањење процента ћелија у фази касне апоптозе ( $1,10 \pm 0,05$ ) у односу на контролну вредност ( $1,25 \pm 0,06$ ). Наведени резултати указују да акутни третман неуропептидом Y не доводи до промовисања програмиране ћелијске смрти, односно да смањена ефикасност инвазије трофобласта није узрокована њиховом сниженом способношћу преживљавања.

**Табела 6.** Процент ћелија у фази касне апоптозе након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY и у контроли.

<b>JEG-3 ћелије у касној апоптози (% од укупних ћелија)</b>		
	<b>контрола</b>	<b>1 nM NPY</b>
<b>24 сата</b>	<b><math>0,49 \pm 0,04</math></b>	<b><math>0,28 \pm 0,09</math></b>
<b>72 сата</b>	<b><math>1,25 \pm 0,06</math></b>	<b><math>1,10 \pm 0,05^*</math></b>

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 7.** Процент ћелија у фази касне апоптозе у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4. Параметри оксидативног / антиоксидативног статуса

##### 4.4.1. Концентрација параметара оксидативног стреса ( $O_2^{\bullet-}$ , $H_2O_2$ и $NO_2^-$ )

Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) и водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) представљају најзначајније параметре оксидативног стреса у ћелији, односно индикатори су поремећеног оксидативног/антиоксидативног баланса. Нитрити ( $NO_2^-$ ) представљају једну од главних показатеља нитрозитивног стреса у ћелијама, представљају индикатор концентрације азот монооксида (NO) који је кључан сигнални молекул у бројним физиолошким процесима у ћелији.

У Табели 7 и на Графицима 8-10 су приказане промене концентрација  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  и  $NO_2^-$  након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY у ћелијама линије JEG-3.

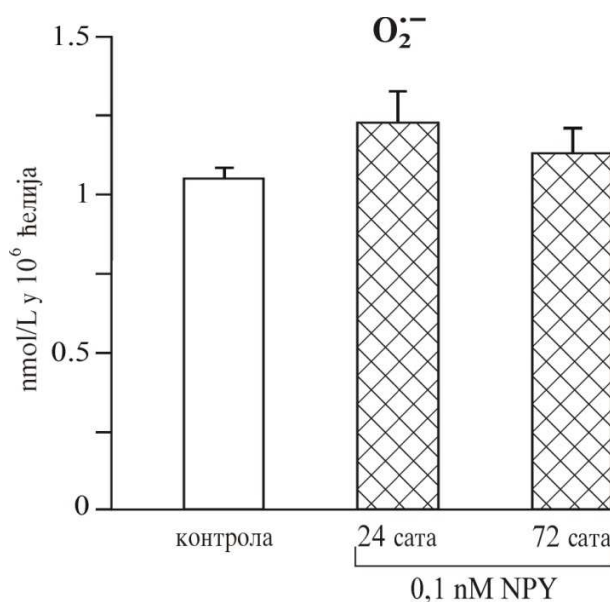
Табела 7. Вредности концентрација  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  и  $NO_2^-$  у контроли и након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY у JEG-3 ћелијама.

Концентрације параметара оксидативног стреса у JEG-3 ћелијама			
0,1 nM NPY	$O_2^{\bullet-}$ (nmol/L у $10^6$ ћелија)	$H_2O_2$ (nmol/L у $10^6$ ћелија)	$NO_2^-$ ( $\mu$ mol/L у $10^6$ ћелија)
контрола	1,07 ± 0,09	0,72 ± 0,14	62,37 ± 8,21
24 сата	1,21 ± 0,17	0,87 ± 0,08	58,12 ± 8,76
72 сата	1,15 ± 0,14	0,98 ± 0,09*	64,23 ± 5,41

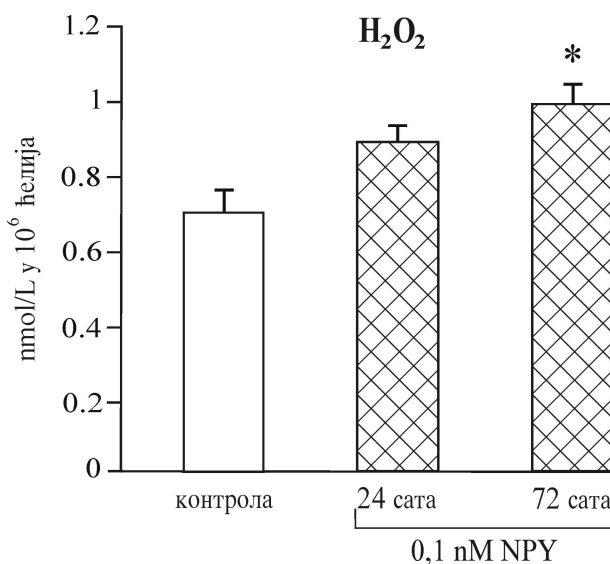
\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

Резултати показују да неуропептид Y у концентрацији 0,1 nM индукује повећање концентрације  $O_2^{\bullet-}$  за ~ 13,1 % ( $1,21 \pm 0,17$  nmol/L у  $10^6$  ћелија) након краткотрајног (24 сата) третмана и за ~ 7,5 % ( $1,15 \pm 0,14$  nmol/L у  $10^6$  ћелија) након дуготрајног (72 сата) третмана у JEG-3 ћелијама у поређењу са контролом ( $1,07 \pm 0,09$  nmol/L у  $10^6$  ћелија) (График 8).

**График 8.** Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPУ у JEG-3 ћелијама.



**График 9.** Концентрација  $H_2O_2$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPУ у JEG-3 ћелијама.

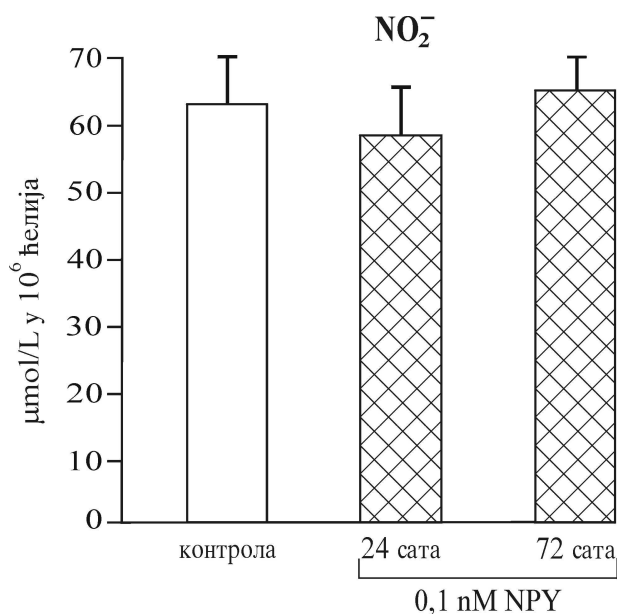


\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

Нису забележене статистички значајне промене концентрације  $\text{H}_2\text{O}_2$  након краткотрајног (24 сата) третмана  $0,1 \text{ nM NPY}$  ( $0,87 \pm 0,08 \text{ nmol/L}$  у  $10^6$  ћелија) у JEG-3 ћелијама у односу на контролну вредност ( $0,72 \pm 0,14 \text{ nmol}$  у  $10^6$  ћелија). Неуропептид Y ( $0,1 \text{ nM}$ ) је довео до статистички значајног повећања концентрације  $\text{H}_2\text{O}_2$  за  $\sim 36,1 \%$  ( $0,98 \pm 0,09 \text{ nmol/L}$  у  $10^6$  ћелија) само након дуготрајног (72 сата) третмана у JEG-3 ћелијама у односу на контролу ( $0,72 \pm 0,14 \text{ nmol}$  у  $10^6$  ћелија) (График 9).

Резултати наше студије показују смањење концентрације  $\text{NO}_2^-$  након краткотрајног (24 сата) третмана за  $\sim 6,8 \%$  ( $58,12 \pm 8,76 \text{ } \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија) и повећање концентрације  $\text{NO}_2^-$  након дуготрајног (72 сата) третмана  $0,1 \text{ nM NPY}$  за  $\sim 3 \%$  ( $64,23 \pm 5,41 \text{ } \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија) у JEG-3 ћелијама. Ове промене концентрације  $\text{NO}_2^-$  нису статистички значајне у односу на контролну вредност ( $62,37 \pm 8,21 \text{ } \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија) (График 10).

**График 10.** Концентрација  $\text{NO}_2^-$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана  $0,1 \text{ nM NPY}$  у JEG-3 ћелијама.



У Табели 8 и на Графицима 11-13 су приказани ефекти неуропептида Y на промене концентрација параметара оксидативног стреса  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{NO}_2^-$  након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана  $1 \text{ nM NPY}$  у JEG-3 ћелијама.

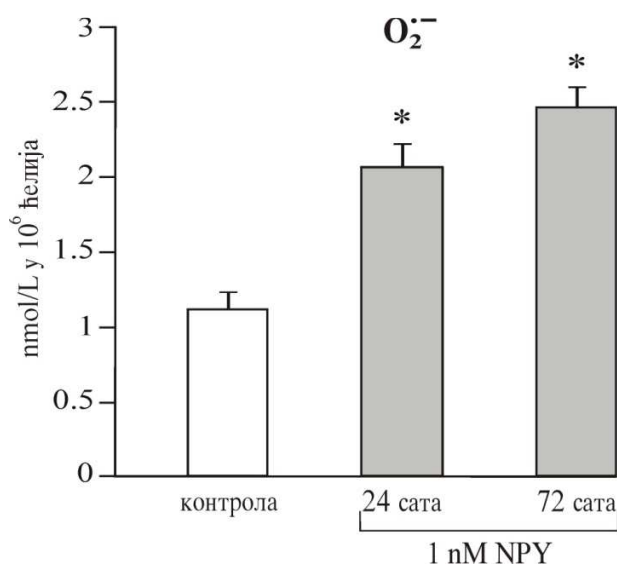
**Табела 8.** Вредности концентрација  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  и  $NO_2^-$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1nM NPY у JEG-3 ћелијама.

Концентрације параметара оксидативног стреса у JEG-3 ћелијама			
1nM NPY	$O_2^{\bullet-}$ (nmol/L у $10^6$ ћелија)	$H_2O_2$ (nmol/L у $10^6$ ћелија)	$NO_2^-$ ( $\mu$ mol/L у $10^6$ ћелија)
контрола	<b>1,15 ± 0,06</b>	<b>0,92 ± 0,04</b>	<b>62,37 ± 8,21</b>
24 сата	<b>2,05 ± 0,14*</b>	<b>1,113 ± 0,10*</b>	<b>44,32 ± 2,96*</b>
72 сата	<b>2,47 ± 0,13*</b>	<b>1,26 ± 0,06*</b>	<b>35,70 ± 5,47*</b>

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

Резултати показују да неуропептид Y у концентрацији 1 nM индукује статистички значајно повећање концентрације  $O_2^{\bullet-}$  за ~ 78,3 % ( $2,05 \pm 0,14$  nmol/L у  $10^6$  ћелија) након краткотрајног (24 сата) третмана и за ~ 114,8 % ( $2,47 \pm 0,13$  nmol/L у  $10^6$  ћелија) након дуготрајног (72 сата) третмана у поређењу са контролом ( $1,15 \pm 0,06$  nmol/L у  $10^6$  ћелија) (График 11).

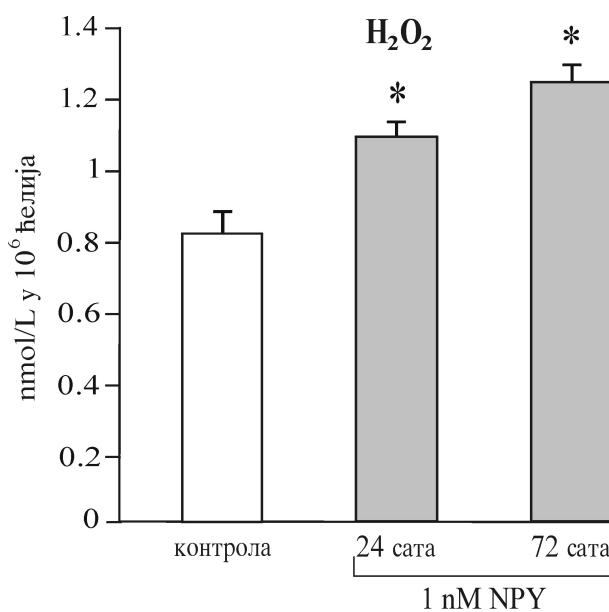
**График 11.** Концентрација  $O_2^{\bullet-}$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY у JEG-3 ћелијама.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

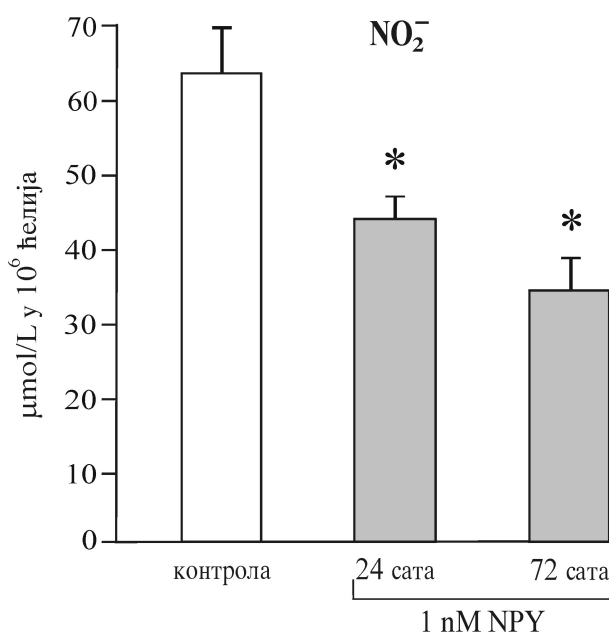


**График 12.** Концентрација  $\text{H}_2\text{O}_2$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY у JEG-3 ћелијама.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 13.** Концентрација  $\text{NO}_2^-$  у контроли, након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY у JEG-3 ћелијама.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

Неуропептид Y (1 nM NPY) је довео до статистички значајног повећања концентрације  $H_2O_2$  за ~ 21 % ( $1,113 \pm 0,10$  nmol/L у  $10^6$  ћелија) након краткотрајног (24 сата) третмана и за ~ 37 % ( $1,26 \pm 0,06$  nmol/L у  $10^6$  ћелија) након дуготрајног (72 сата) третмана у односу на контролну вредност ( $0,92 \pm 0,04$  nmol/L у  $10^6$  ћелија) (График 12).

Резултати наше студије показују статистички значајно смањење концентрације  $NO_2^-$  након краткотрајног (24 сата) третмана за ~ 29 % ( $44,32 \pm 2,96$   $\mu$ mol/L у  $10^6$  ћелија) и након дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY за ~ 42,8 % ( $35,70 \pm 5,47$   $\mu$ mol/L у  $10^6$  ћелија) у односу на контролну вредност ( $62,37 \pm 8,21$   $\mu$ mol/L у  $10^6$  ћелија) (График 13), сугеришући да овај неурохормон доводи до смањења количине доступног азот монооксида у трофоблатима.

#### 4.4.2. Концентрација неензимских параметара система антиоксидативне заштите (GSH и GSSG)

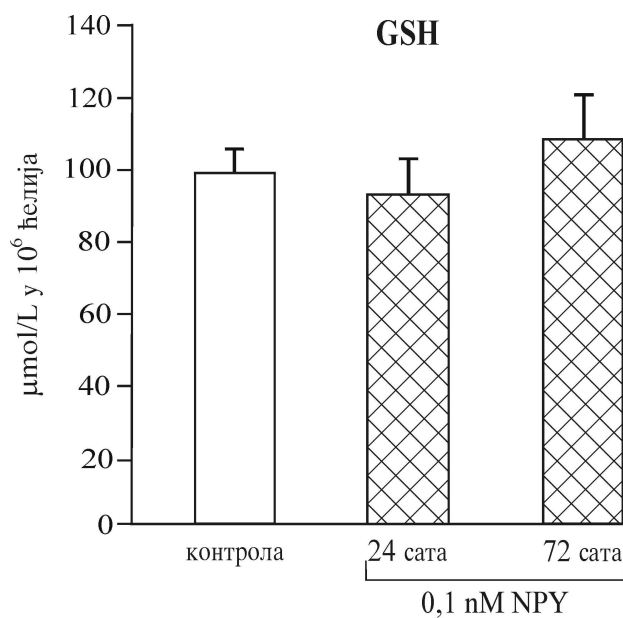
У Табели 9 и на Графицима 14 и 15 приказани су ефекти 0,1 nM неуропептида Y након краткотрајног (24 сата) третмана и дуготрајног (72 сата) третмана на промене концентрација редукованог глутатиона (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG) у JEG-3 ћелијама.

**Табела 9.** Ефекат краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY на промене концентрације редукованог глутатиона (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG) у JEG-3 ћелијама.

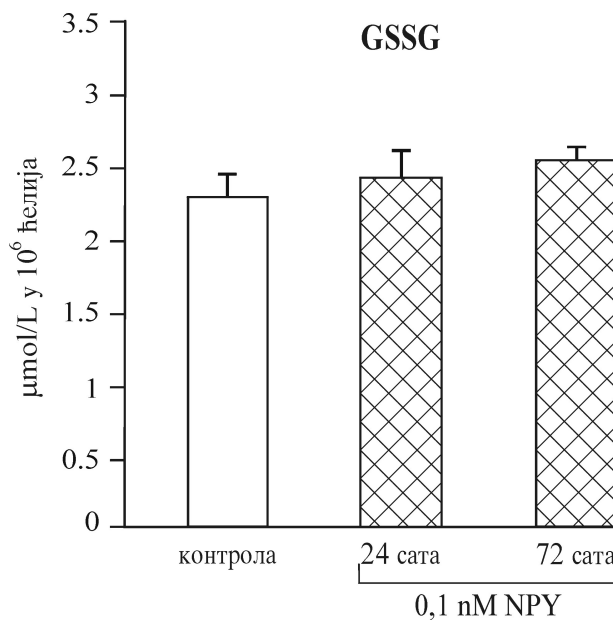
Концентрације GSH и GSSG у JEG-3 ћелијама			
0,1 nM NPY	контрола	24 сата	72 сата
<b>GSH</b> ( $\mu$ mol/L у $10^6$ ћелија)	<b>99,81 <math>\pm</math> 4,41</b>	<b>96,73 <math>\pm</math> 5,21</b>	<b>106,31 <math>\pm</math> 7,22</b>
<b>GSSG</b> ( $\mu$ mol/L у $10^6$ ћелија)	<b>2,31 <math>\pm</math> 0,70</b>	<b>2,43 <math>\pm</math> 0,85</b>	<b>2,53 <math>\pm</math> 0,42</b>

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0,05$ ).

**График 14.** Промене концентрације редукованог глутатиона (GSH) након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) излагања 0,1 nM NPY у JEG-3 ћелијама.



**График 15.** Промене концентрације оксидованог глутатиона (GSSG) након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) излагања 0,1 nM NPY у JEG-3 ћелијама.



Након краткотрајног (24 сата) третмана 0,1 nM NPY нема значајне промене концентрације GSH ( $96,73 \pm 5,21 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија). Слични резултати су добијени и након дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY ( $106,31 \pm 7,22 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија) у односу на контролну вредност ( $99,81 \pm 4,41 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија) (Табела 9 и График 14).

Резултати показују да нема значајне промене концентрације GSSG током краткотрајног (24 сата) третмана 0,1 nM NPY ( $2,43 \pm 0,85 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија). Слични резултати су добијени и након дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY ( $2,53 \pm 0,42 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија) у односу на контролну вредност ( $2,31 \pm 0,70 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија) (Табела 9 и График 15).

У Табели 10 и на Графикима 16 и 17 приказани су ефекти 1 nM неуропептида Y након краткотрајног (24 сата) третмана и након дуготрајног (72 сата) третмана на промене концентрација редукованог глутатиона (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG) у JEG-3 ћелијама.

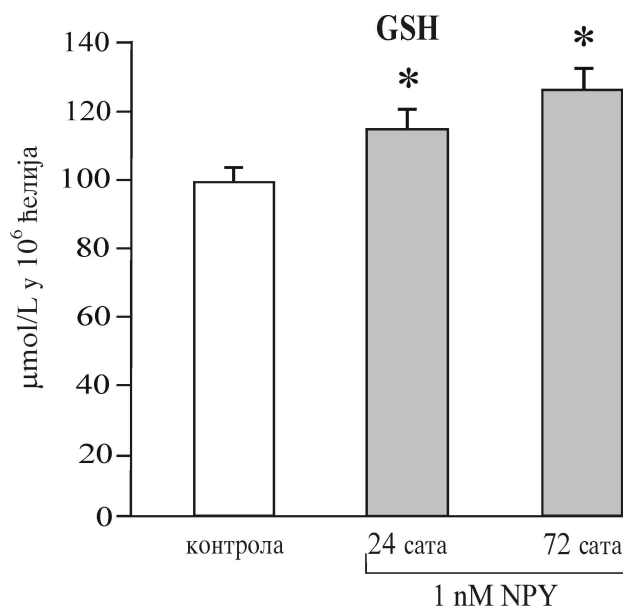
Након краткотрајног (24 сата) третмана 1 nM NPY забележено је статистички значајно повећање концентрације GSH ( $117,45 \pm 4,45 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија). Слични резултати су добијени и након дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY ( $124,82 \pm 5,50 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија) у односу на контролну вредност ( $99,81 \pm 4,41 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија) (Табела 10 и График 16). Глутатион је једна од најзначајних компоненти антиоксидативне заштите и његова појачана концентрација може да укаже на *de novo* синтезу коју индукује неуропептид Y (1 nM NPY).

**Табела 10.** Ефекат краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY на промене концентрације редукованог глутатиона (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG) у JEG-3 ћелијама.

Концентрације GSH и GSSG у JEG-3 ћелијама			
1nM NPY	контрола	24 сата	72 сата
GSH ( $\mu\text{mol/L}$ у $10^6$ ћелија)	<b>99,81 ± 4,41</b>	<b>117,45 ± 4,45*</b>	<b>124,82 ± 5,50*</b>
GSSG ( $\mu\text{mol/L}$ у $10^6$ ћелија)	<b>2,01 ± 0,70</b>	<b>2,59 ± 1,01</b>	<b>2,97 ± 0,26*</b>

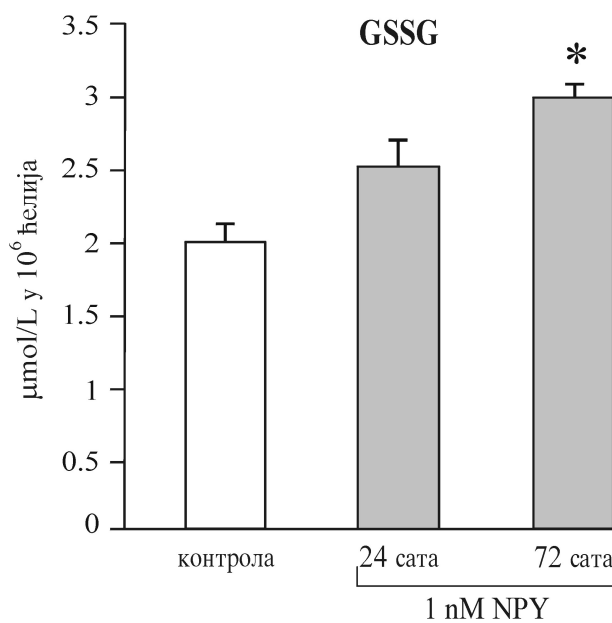
\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 16.** Промене концентрације редукованог глутатиона (GSH) након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) излагања 1 nM NPY у JEG-3 ћелијама.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 17.** Промене концентрације оксидованог глутатиона (GSSG) након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) излагања 1 nM NPY у JEG-3 ћелијама.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

Резултати добијени овим истраживањима показују да нису забележене значајне промене концентрације GSSG током краткотрајног (24 сата) третмана 1 nM NPY ( $2,59 \pm 1,01 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија). Само након дуготрајног третмана 1 nM NPY (72 сата) је забележено статистички значајно повећање концентрације GSSG ( $2,97 \pm 0,26 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија) у односу на контролне ћелије ( $2,01 \pm 0,70 \mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија), што недвосмислено представља индикатор оксидативног стреса (Табела 10 и График 17).

#### 4.5. Миграциони ћелијски есеј (*Boyden chamber*)

Како би се испитао ефекат NPY на миграционе способности хуманих трофобласта, спроведен је 2D есеј за ћелијску миграцију који се базира на способности адхерентних ћелија да пролазе поре (отворе) на поликарбонатној мембрани. У Табели 11 и на Графику 18 и 19 приказани су ефекти неуропептида Y у концентрацијама 0,1 nM NPY и 1 nM NPY на миграциону способност хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана овим неуропептидом.

Нема значајних промена миграционог индекса ( $108,78 \pm 8,77$ ) након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) ( $116,30 \pm 6,58$ ) третмана 0,1 nM NPY у односу на контролну вредност ( $100 \pm 11,20$ ) (Табела 11 и График 18).

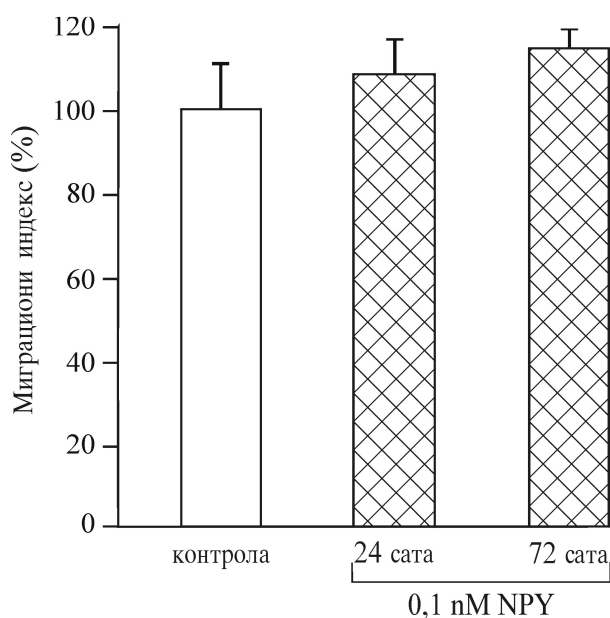
Резултати су показали да постоји статистички значајно смањење индекса миграције од 1,38 пута код ћелија које су изложене 1 nM NPY у трајању од 24 сата ( $72,22 \pm 2,44$ ), односно од 1,58 пута код оних у третману од 72 сата ( $63,42 \pm 8,76$ ), у односу на контролне ћелије ( $100 \pm 9,32$ ). Ови резултати несумњиво указују да третман 1 nM NPY доводи до значајног смањења миграционе способности ћелија JEG-3. Дуготрајни третман (72 сата) довео је до снажнијег снижења миграционог потенцијала у односу на краткотрајни третман (24 сата) (Табела 11 и График 19).

**Табела 11.** Промене миграционог индекса хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана неуропептидом Y (NPY) концентрацијама 0,1 nM и 1 nM, и након третмана L-NAME.

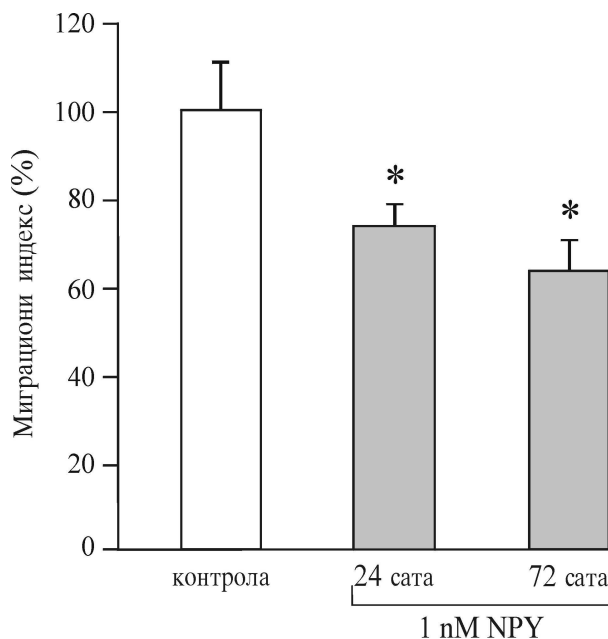
Миграциони индекс ћелија JEG-3 (% контроле)			
	контрола	24 сата	72 сата
0,1 nM NPY	100 ± 11,20	108,78 ± 8,77	116,30 ± 6,58
1 nM NPY	100 ± 9,32	72,22 ± 2,44*	63,42 ± 8,76*
1mM-NAME	100 ± 9,32	42,33 ± 8,97*	46,42 ± 7,56*

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 18.** Промене миграционог индекса хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY.



**График 19.** Промене миграционог индекса хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY.

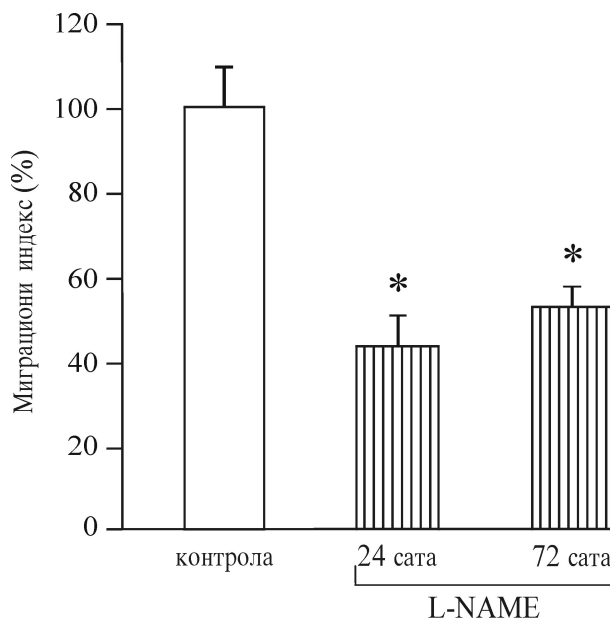


\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

Пошто је у студији претпостављено да је ово смањење миграционог потенцијала узроковано снижењем концентрације слободног азот монооксида (NO), што се у експерименту такође региструје, спроведен је третман у трајању од 24 сата и 72 сата са L-NAME, специфичним инхибитором ензима синтезе азот монооксида у концентрацији од 1 mmol/L (1 mM). Ефекат третмана инхибитором синтазе азот монооксида (L-NAME) након оба временска интервала приказани су у **Табели 11** и на **Графику 20**. Добијени резултати су показали да постоји снажан, статистички значајан пад миграције од 2,36 пута у краткотрајном (24 сата) третману ( $42,33 \pm 8,97$ ), односно 2,14 пута у дуготрајном (72 сата) третману ( $46,42 \pm 7,56$ ) овим инхибитором, у односу на контролну групу ћелија ( $100 \pm 9,32$ ), при чему између третираних ћелија нема статистички значајне разлике. Ови резултати потврђују претпоставку да је NO снажан регулатор миграционог потенцијала трофобласта, и да је смањена миграциона моћ ових ћелија под деловањем патолошких концентрација NPY (1 nM NPY) великим делом узрокована смањењем биодоступности азот монооксида.



**График 20.** Промене миграционог индекса хуманих цитотрофобласта JEG-3 након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 mM L-NAME.



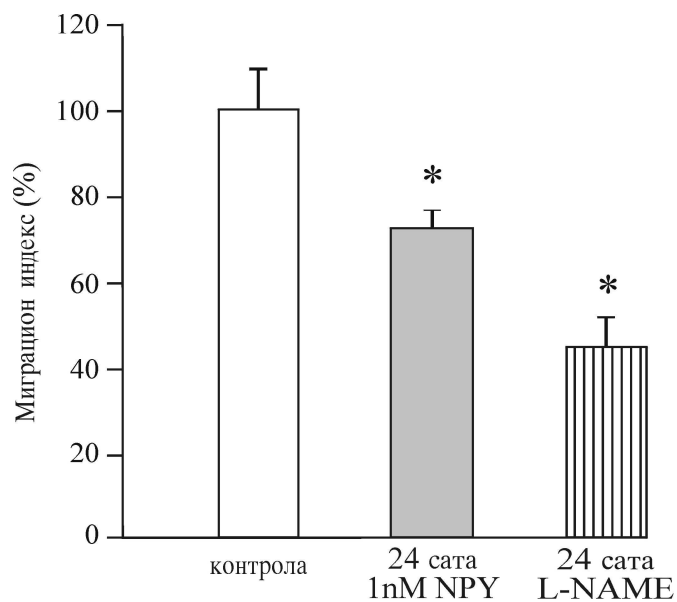
\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

На **Графику 21** приказано је поређење миграционог индекса трофобласта након краткотрајног (24 сата) третмана 1 nM NPY и 1 mM L-NAME у односу на контролне вредности, док је поређење ефеката дуготрајног третмана (72 сата) овим молекулима (1 nM NPY и 1 mM L-NAME) приказано на **Графику 22**.

Забележено је веће смањење миграционог индекса трофобласта након краткотрајног (24 сата) третмана 1 mM L-NAME (~ 61,1 %) у поређењу са третманом 1 nM NPY (~ 33,6 %) (График 21).

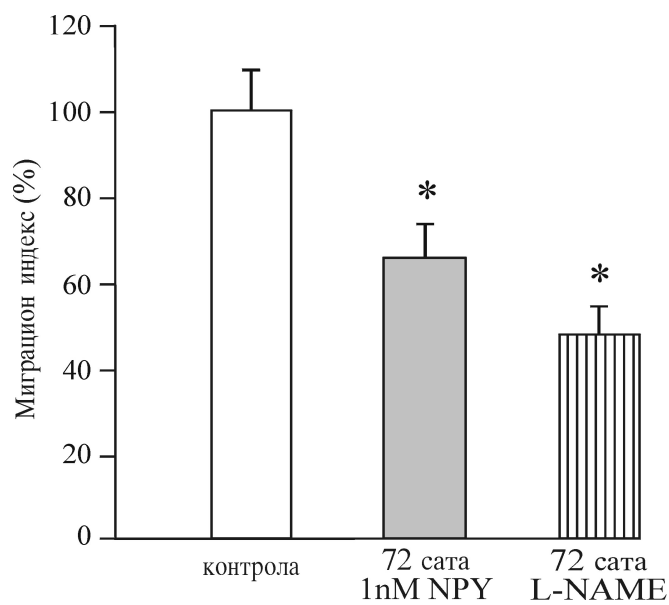
Слично смањење миграционог индекса трофобласта забележено је и након дуготрајног (72 сата) третмана 1 mM L-NAME (~ 60,1 %) у поређењу са третманом 1 nM NPY (~ 45,5 %) (График 22).

**График 21.** Компаративне вредности промена миграционог индекса након краткотрајног (24 сата) третмана 1 nM NPY и 1 mM L-NAME.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 22.** Компаративне вредности промена миграционог индекса након дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPY и 1 mM L-NAME.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

Упоредивањем миграционих ефеката ових третмана може се закључити да L-NAME интензивније ( $p < 0.05$ ) снижава миграциони индекс хуманих трофобласта у односу на снижење индуковано третманом NPΥ. Резултати указују да NPΥ може да поремети миграцију трофобласта смањењем биодоступности азот монооксида, било индукцијом оксидативног стреса, било смањењем активности и/или степена експресије синтазе азот монооксида. Ови подаци сугеришу да је азот моноксид кључан молекул у регулацији миграционих процеса у трофобластима *in vitro*. Такође се може закључити да је активност синтазе азот монооксида, чије је присуство потврђено у трофобластима, главни генератор биодоступног азот монооксида и да је регулација њене активности битан посредник у остваривању покретљивости трофобласта.

#### 4.6. Активност металопротеиназе 9 (ММР-9)

Поред испитивања миграционог потенцијала трофобласта, у нашој студији је спроведена и анализа једног параметра инвазионих способности хуманих трофобласта. Група матриксних металопротеиназа, којој припада металопротеиназа 9 (ММР-9), сматра се посебно значајном за инвазивност како трофобласта, тако свих покретних ћелија, укључујући у првом ћелије канцера током метастаза. Због овога је одређивана екстрацелуларна количина овог ензима (ММР-9) у медијуму за култивацију, након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана неуропептидом Υ у концентрацији од 1 pmol/L (1 nM), коју секретују ћелије JEG-3 (Табела 12 и График 23).

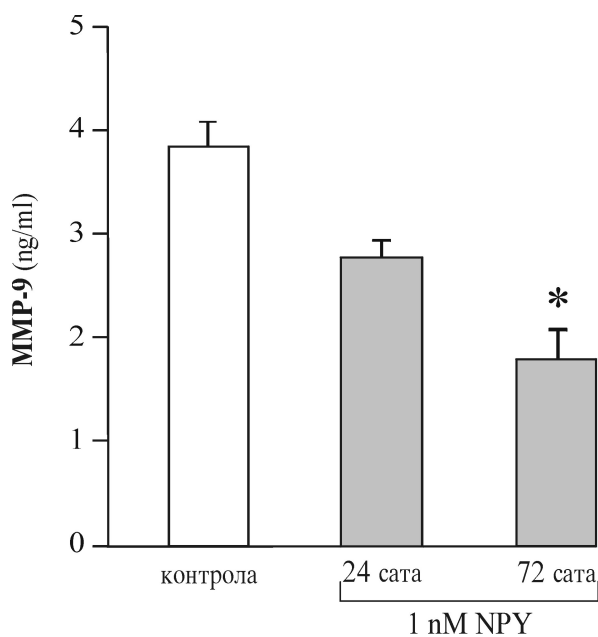
Резултати анализе показују да NPΥ индукује статистички значајно смањење активности ове металопротеиназе 9 ( $1,83 \pm 0,38$  ng/ml) након дуготрајног третмана (72 сата) у односу на контролну групу ћелија ( $3,91 \pm 0,49$  ng/ml). Ефекат краткотрајног излагања (24 сата) показује смањење активности ММР-9 ензима ( $2,83 \pm 0,36$  ng/ml), али без статистичке значајности. Ови резултати указују да NPΥ смањењем активности ММР-9 ензима може допринети смањеној способности инвазије трофобласта у децидуално ткиво.

**Табела 12.** Ефекат краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPУ на активност MMP-9 ензима ослобођеног из JEG-3 хумних трофобласта.

Количина металопротеиназе 9 (MMP-9) ћелија JEG-3			
	контрола	24 сата 1 nM NPУ	72 сата 1 nM NPУ
MMP-9 (ng/ml)	3,91 ± 0,49	2,83 ± 0,36	1,83 ± 0,38*

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 23.** Ефекат краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана 1 nM NPУ на активност MMP-9 ензима ослобођеног из JEG-3 хумних трофобласта.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

## 4.7. Анализа релативне експресије гена

У нашој студији испитивани су нивои експресије гена укључених у синтезу протеина значајних за регулацију миграције/инвазије трофобласта. Нивои експресије су одређивани qRT PCR методом уз коришћење флуоресцентно обележене боје ROX која генерише сигнал и даје податак о количини експримиране иРНК (iRNA). Експресија свих гена одређивана је само након дуготрајних третмана у трајању од 72 сата, пошто је краткотрајан третман од 24 сата прекратак за детектовање релевантних промена експресионих профила. Информациона РНК изолована из узорака је преведена у комплементарну ДНК (сDNA) деловањем ензима реверзне транскриптазе, а потом је извршено праћено умножавање сDNA секвенце мерењем сигнала у реалном времену на апарату за квантитативне анализе (qPCR) .

### 4.7.1. Експресија гена за металопроотеиназу 9 (MMP-9)

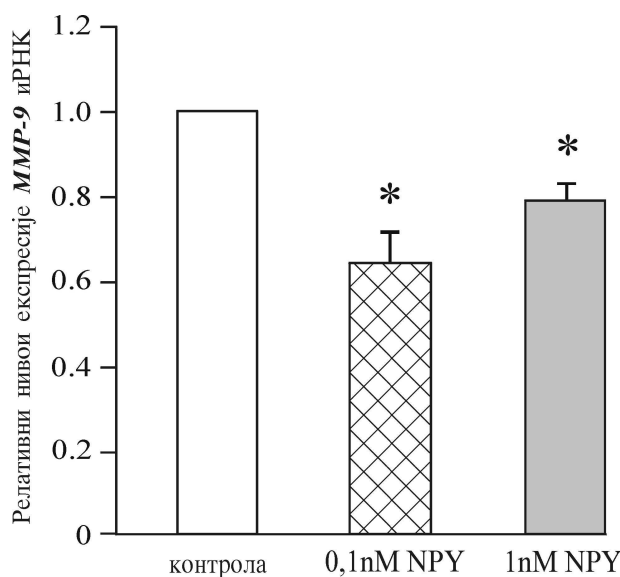
У Табели 13 и на Графику 24 приказане су промене које индукује NPY на релативни ниво експресије ензима MMP-9 иРНК. Резултати показују да дуготрајни третман у трајању од 72 сата неуропептидом Y у обе концентрације 0,1 nM ( $0,63 \pm 0,14$ ) и 1 nM ( $0,79 \pm 0,09$ ) доводи до статистички значајног смањења експресије гена за ензим MMP-9 у односу на контролу.

**Табела 13.** Релативни нивои експресије MMP-9 иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима.

Релативни нивои експресије MMP-9 иРНК		
контрола	0,1 nM NPY	1 nM NPY
1	$0,63 \pm 0,14^*$	$0,79 \pm 0,09^*$

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 24.** Релативни нивои експресије MMP-9 иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7.2. Експресија гена за индуцибилну синтазу азот монооксида (iNOS)

Један од кључних гена анализираних у нашој студији је индуцибилна синтаза азот монооксида (iNOS) која генерише овај молекул у значајним количинама у трофобластима. У Табели 14 и на Графику 25 приказане су промене које индукује NPY на експресиони профил ензима iNOS. Резултати показују да дуготрајни третман у трајању од 72 сата неуропептидом Y у обе концентрације (0,1 nM и 1 nM) изазива статистички значајно смањење експресије гена за iNOS ( $0,789 \pm 0,069$  и  $0,575 \pm 0,034$ ) у односу на контролу.

**Табела 14.** Релативни нивои експресије iNOS иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима.

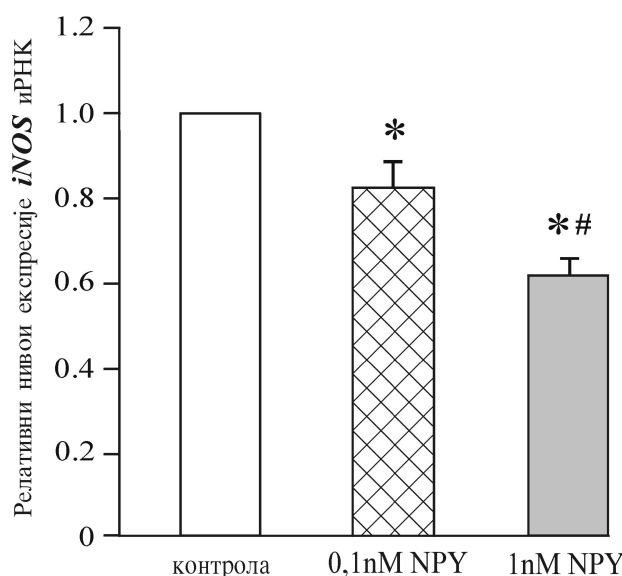
Релативни нивои експресије iNOS иРНК		
контрола	0,1 nM NPY	1 nM NPY
1	$0,789 \pm 0,069^*$	$0,575 \pm 0,034^{* \#}$

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са 0,1 nM NPY третманом ( $p < 0.05$ ).

Показана је статистички значајна разлика вредности експресије гена за ензим iNOS и између концентрације 0,1 nM NPY ( $0,789 \pm 0,069$ ) и 1 nM NPY ( $0,575 \pm 0,034$ ).

**График 25.** Релативни нивои експресије iNOS иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са 0,1 nM NPY третманом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7.3. Експресија гена за индуцибилни фактор хипоксије (HIF-1 $\alpha$ )

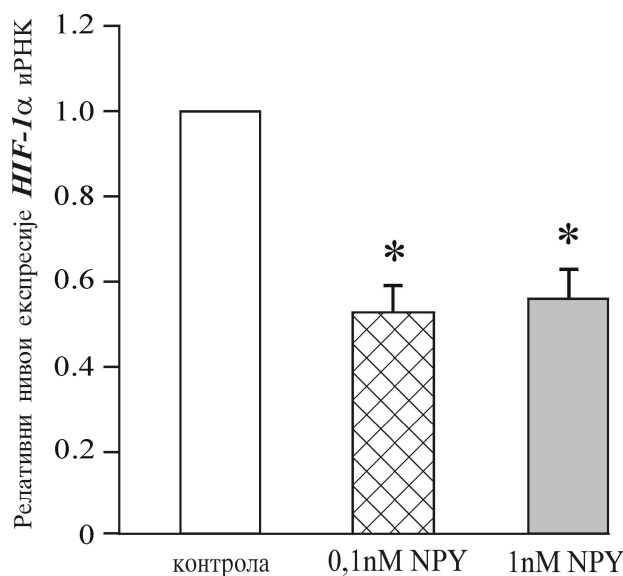
Индуцибилни фактор хипоксије (HIF-1 $\alpha$ ) посредује адаптацији трофобласта на снижене концентрације кисеоника какве владају у раним фазама трудноће, током плацентације. Овај молекул представља важан транскрипциони фактор који регулише експресију већег броја протеина који дефинишу функционисање трофобласта у хипоксији. У Табели 15 и на Графику 26 приказан је ефекат неуропептида Y (1 nM NPY) на промену степена експресије гена за индуцибилни фактор хипоксије (HIF-1 $\alpha$ ) у хуманим трофобластима након дуготрајног излагања (72 сата). Резултати нашег истраживања су показали да долази до снижавања експресије овог регулаторног молекула након дуготрајног (72 сата) третмана 0,1 nM NPY ( $0,526 \pm 0,11$ ) и 1 nM NPY ( $0,565 \pm 0,13$ ) у односу на контролну вредност, што може имати импликације на транскрипционе профиле неких других гена укључених у миграцију трофобласта.

**Табела 15.** Ефекат неуропептида Y на промену степена експресије гена за индуцибилни фактор хипоксије (HIF-1 $\alpha$ ) у JEG-3 хуманим трофобластима након дуготрајног третману (72 сата) у концентрацијама од 0,1 nM и 1 nM NPY.

Релативни нивои експресије HIF-1 $\alpha$ иРНК		
контрола	0,1 nM NPY	1 nM NPY
1	0,526 $\pm$ 0,11*	0,565 $\pm$ 0,13*

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 26.** Релативни нивои експресије гена за индуцибилни фактор хипоксије (HIF-1 $\alpha$ ) иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7.4. Експресија гена за васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF)

Васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF) битан је молекул за стимулацију ангиогенезе и стварање нових крвних судова, али и за процесе трофобластне миграције. Подаци из литературе показују његову значајну концентрацију у плаценти. У **Табели 16** и на **Графику 27** приказан је ефекат неуропептида Y (1 nM NPY) на промену степена експресије гена за VEGF у хуманим трофобластима након дуготрајног излагања (72 сата).



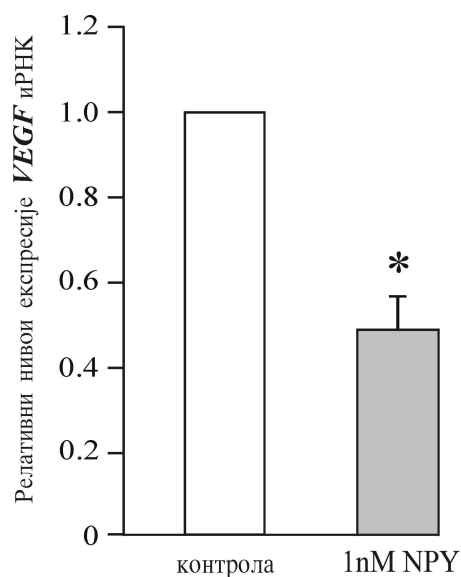
Резултати нашег истраживања су показали да долази до снижавања експресије гена за VEGF ( $0,476 \pm 0,19$ ) након третмана 1 nM NPY.

**Табела 16.** Релативни нивои експресије гена за васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF) иРНК након третмана 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима.

Релативни нивои експресије VEGF иРНК		
	контрола	1 nM NPY
VEGF	1	$0,476 \pm 0,19^*$

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 27.** Релативни нивои експресије гена за васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF) иРНК након третмана 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7.5. Експресија гена за циклооксигеназу 2 (COX-2)

У Табели 17 и на Графику 28 приказан је ефекат неуропептида Y на промену степена експресије гена за циклооксигеназу 2 (COX-2) након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима након дуготрајног излагања (72 сата). Резултати показују да третман неуропептидом Y у обе концентрације (0,1 nM и 1 nM) изазива статистички

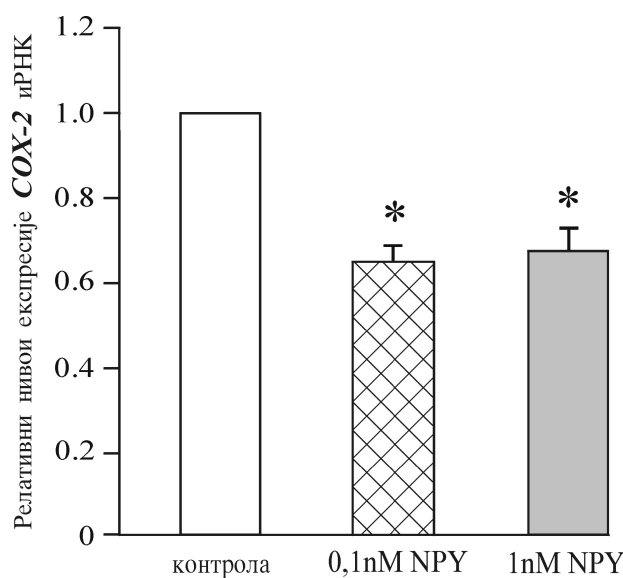
значајно смањење експресије гена за COX-2 ( $0,654 \pm 0,030$  и  $0,671 \pm 0,042$ ) у односу на контролне ћелије.

**Табела 17.** Релативни нивои експресије гена за циклооксигеназу 2 (COX-2) иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима.

Релативни нивои експресије COX-2 иРНК		
контрола	0,1 nM NPY	1 nM NPY
1	$0,654 \pm 0,030^*$	$0,671 \pm 0,042^*$

\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 28.** Релативни нивои експресије гена за циклооксигеназу 2 (COX-2) иРНК након третмана 0,1 nM и 1 nM NPY у JEG-3 хуманим трофобластима.



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

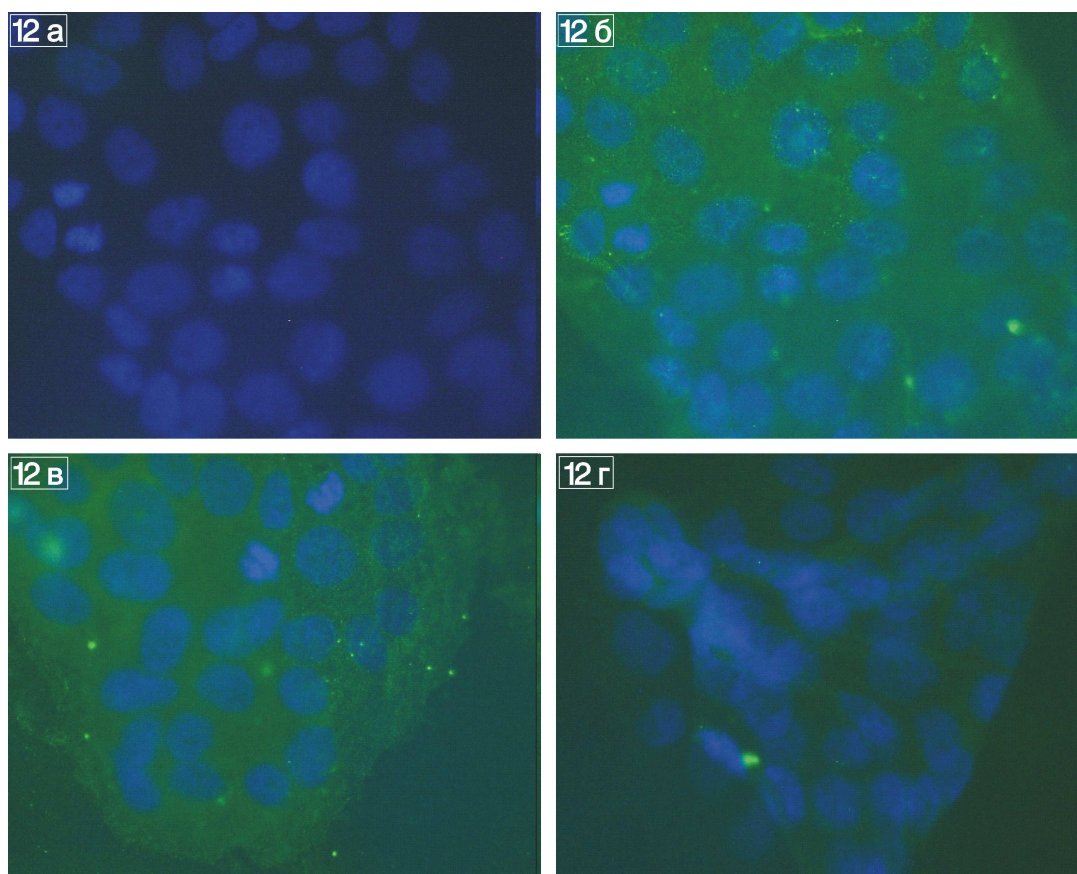
## 4.8. Имуноцитохемијске анализе

### 4.8.1. Протеинска експресија iNOS

Протеинска експресија индуцибилне синтазе азот монооксида (iNOS), ензима који ендогено синтетише NO, одређивана је имунофлуоресцентним бојењем и на сликама

12а–12г је приказана експресија iNOS на нетретираним ћелијама JEG-3 и након третмана неуропептидом Y у концентрацијама од 0,1 nM и 1 nM у трајању од 72 сата. Резултати показују смањену експресију након пролонгираног третмана концентрацијом од 1 nM, што је у корелацији са смањеном експресијом гена за индуцибилну синтазу азот монооксида добијену у студији, као и са смањеном концентрацијом азот монооксида. Ови подаци указују да је неуропептид Y у повишеним концентрацијама у односу на физиолошку, снажан модулатор биодоступности азот монооксида.

На сликама су приказана компаративна имуноцитохемијска бојења индуцибилне синтазе азот монооксида (iNOS) у контролним ћелијама (Слика 12б), третману са концентрацијом од 0,1 nM NPY (Слика 12в) и третману са концентрацијом од 1 nM NPY (Слика 12г). На Слици 12а представљена су једра ћелија бојена DAPI-ем.



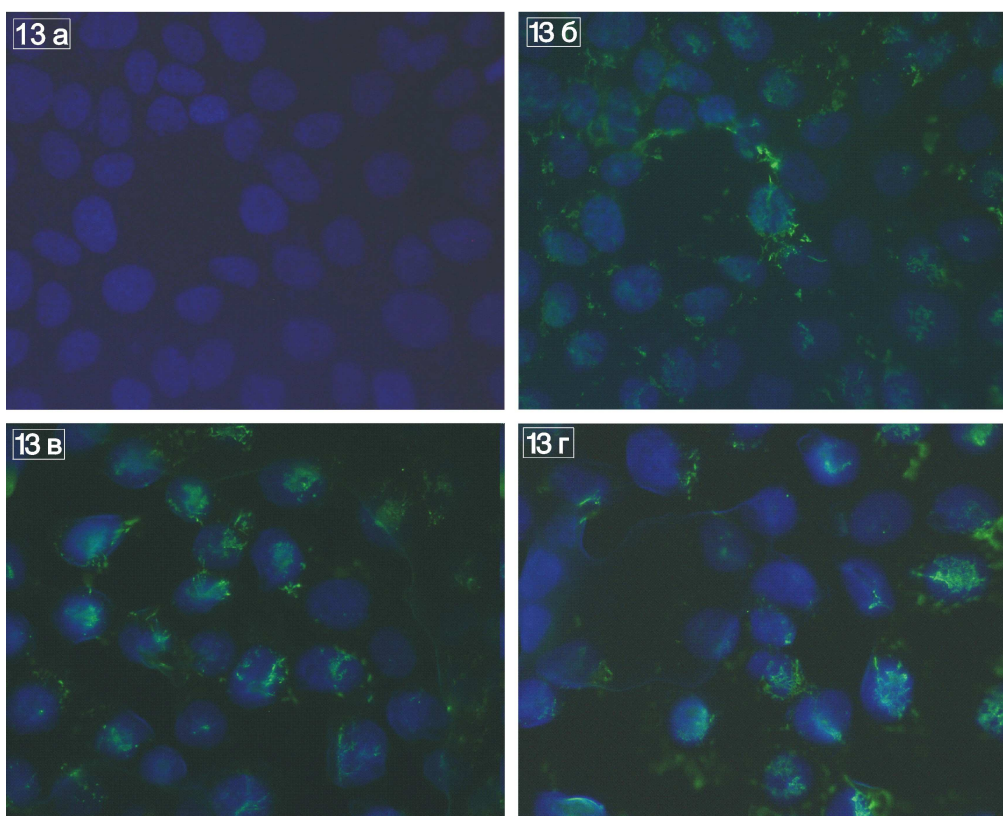
**Слике 12а-12г: Протеинска експресија iNOS у JEG-3 трофобластима у контроли и третману неуропептидом Y (0,1 nM и 1 nM).**

Слике су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 60×.  
Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS рецептори зелено (секундарно антитело Alexa 448).

#### 4.8.2. Протеинска експресија HIF-1 $\alpha$

Протеинска експресија индуцибилног фактора хипоксије 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) одређивана је имунофлуоресцентним бојењем моноклонским антителима. Анализирани су нетретирани ћелије JEG-3 и ћелије након третмана неуропептидом Y у трајању од 72 сата у концентрацијама од 0,1 nM и 1 nM. Резултати показују смањену експресију након пролонгираног третмана концентрацијом од 1 nM NPY, што је у корелацији са смањеном експресијом гена за индуцибилни фактор хипоксије. Ови подаци указују да неуропептид Y у повишеним концентрацијама у односу на физиолошку утиче на смањење количине присутног транскрипционог фактора у цитоплазми трофобласта.

На сликама 13а–13г приказана су компаративна имуноцитохемијска бојења индуцибилног фактора хипоксије 1 $\alpha$  у контролним ћелијама (Слика 13б), третману концентрацијом од 0,1 nM NPY (Слика 13в), и третману концентрацијом од 1 nM NPY у трајању од 72 сата (Слика 13г). Слика 13а представља једра ћелија бојена DAPI-ем.



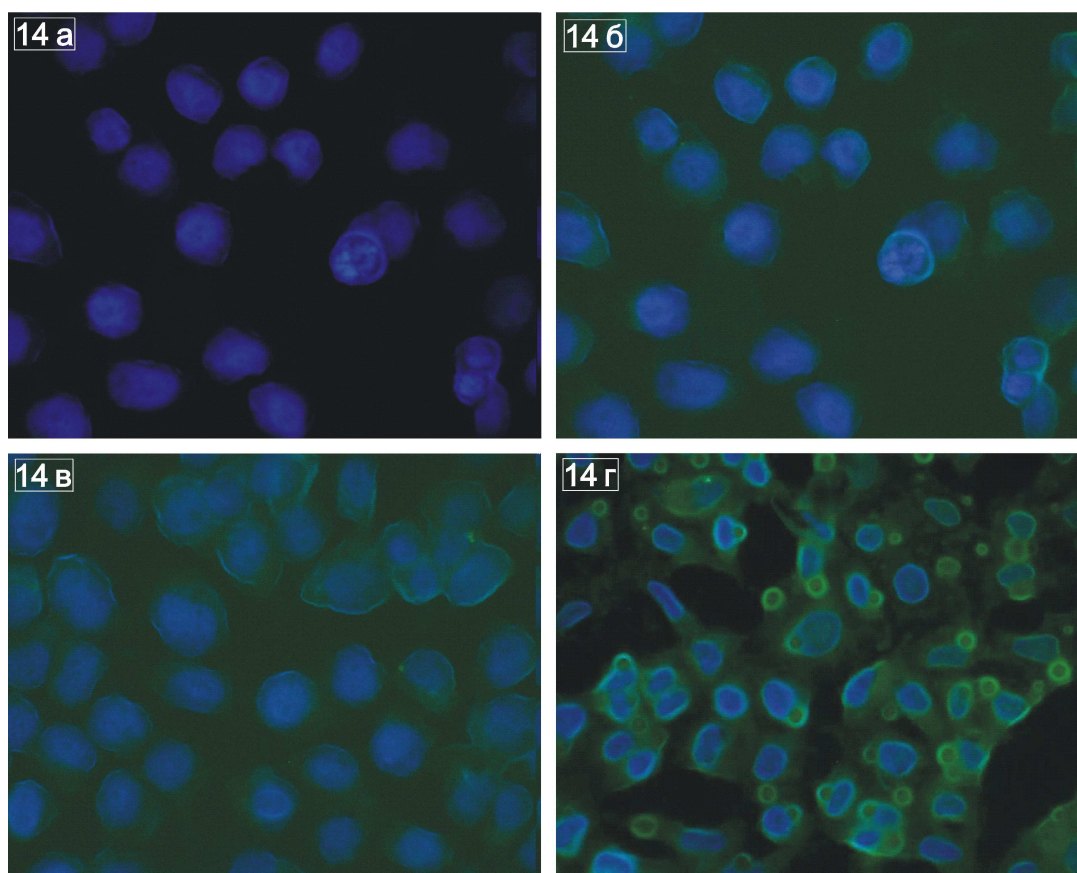
**Слике 13а-13г: Протеинска експресија HIF-1 $\alpha$  у JEG-3 трофобластима у контроли и третману неуропептидом Y (0,1 nM и 1 nM).**

Слике су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 60 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), а HIF-1 $\alpha$  рецептори зелено (секундарно антитело Alexa 448).

### 4.8.3. Протеинска експресија Е-кадхерина

Протеинска експресија Е-кадхерина, протеина ћелијске адхезије је испитивана у контролним ћелијама и у пролонгираном третману неуропептидом Y (0,1 nM и 1 nM). Резултати експеримента показују значајно повишену експресију након пролонгираног третмана (72 сата) концентрацијом од 1 nM, указујући на антимигрантни тренд који NPY постиже у аспекту количине овог протеина.

На сликама су приказана компаративна имуноцитохемијска бојења Е-кадхерина у контролним ћелијама (Слика 14б), третману са концентрацијом од 0,1 nM (Слика 14в) и третману са концентрацијом од 1 nM NPY (Слика 14г). На Сlici 14а представљена су једра ћелија бојена DAPI-ем.



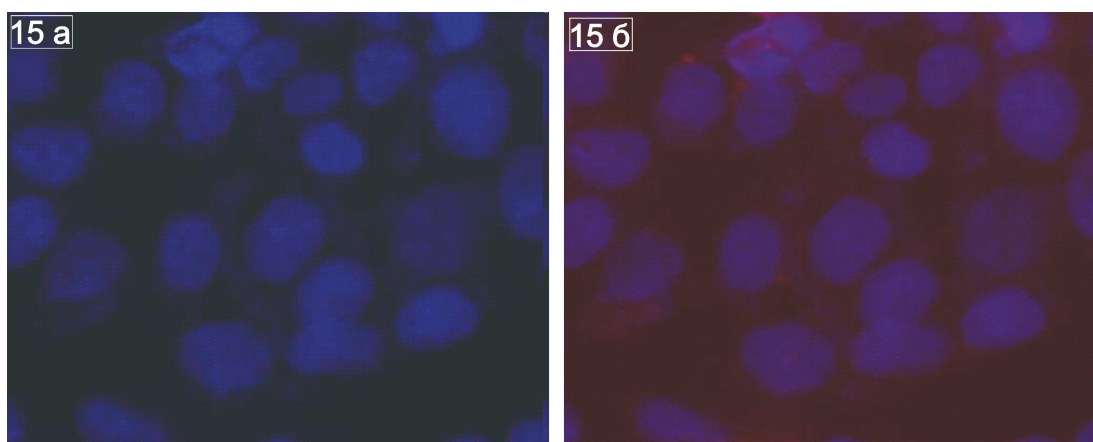
**Слике 14а-14г: Протеинска експресија Е-кадхерина у JEG-3 трофобластима у контроли и третману неуропептидом Y (0,1 nM и 1 nM).**

Слике су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 60×.  
Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Е-кадхерин зелено (секундарно антитело Alexa 448).

#### 4.8.4. Протеинска експресија $Y_2$ рецептора за NPY (NPYR2)

Неуропептид Y своје деловање испољава посредством својих рецептора, од којих полазе интрацелуларне сигналне каскаде. У нашој студији потврђено је присуство рецептора  $Y_2$ , коришћењем његовог моноклонског антитела. Ови резултати показују присуство још једног типа рецептора, поред већ познатог присуства  $Y_1$  и  $Y_3$  рецептора у трофобластним ћелијама.

На сликама је приказано имуноцитохемијско бојење рецептора  $Y_2$  за неуропептид Y (Слика 15б). На Слици 15а представљена су једра ћелија бојена DAPI-ем.



**Слике 15а и 15б: Протеинска експресија рецептора  $Y_2$  за NPY (NPYR2) у JEG-3 трофобластима.**

Слике су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 60 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), а NPYR2 црвено (секундарно антитело Cy3).

---

## **5. Дискусија**

Миграција трофобласта и њихова инвазија у ендометријум, кључни су процеси у имплантацији, формирању и развоју плаценте (Pennisi и сар., 2012; Knöfler и Pollheimer, 2013). Успешна имплантација базирана је синхронизитету који се успоставља између развојних ступњева самог ембриона и комплексне серије молекуларних и целуларних догађаја који су индуковани у утерусу многобројним паракриним и аутокриним регулаторима (Krüssel и сар., 2003.) Екстравилозни трофобласти врше дубинску инвазију везивног ткива утеруса деградујући компоненте екстрацелуларног матрикса (*ECM – extracellular matrix*) (интерстицијални пут инвазије), заузимају просторе између децидуалних и миометријалних ћелија да би потом извршили инвазију на зидове спиралних артерија утеруса (ендоваскуларни пут инвазије) (Loke и сар., 1995). Екстравилозни цитотрофобласти ендоваскуларног пута инвазије врше реструктурирање материнских спиралних артерија замењујући глатке мишићне и ендотелијалне ћелије њихових зидова, формирајући на тај начин судове проширеног дијаметра који се одликују повишеним индексом протока крви и смањеним васкуларним отпором, што их чини потпуно независним од вазоконстрикције осталих делова материнског циркулаторног система. Овакво артеријско ремоделовање је од пресудног значаја у успостављању и развоју плаценте, као и у одржавању нормалне трудноће, имајући у виду да метаболичке потребе фетуса расту током трудноће, достижући свој врхунац у њеним касним фазама (Zhou и сар., 1997). Формирање функционалне плаценте захтева екстензивну, иако строго контролисану миграцију и инвазију трофобласта у утерусно ткиво (van den Brule и сар., 2005). Поремећаји миграторне функције трофобласта могу резултовати широким опсегом озбиљних компликација трудноће као што су различите малформације плода, ретардација феталног раста, спонтани побачаји или мртворођеност. С’обзиром да процес у великој мери зависи од оптималне миграције и инвазије трофобласта на материнско ткиво, изостанак трофобласта да у потпуности изврше инвазију ткива утеруса воде до плитке плацентације и врло често је у вези са озбиљним компликацијама трудноће као што су прееклампсија, еклампсија и интраутерини застој у расту (Chaddha и сар., 2004). Са друге стране, прекомерна инвазија ових ћелија може довести до инвазивних мола, плаценте акрете (*placenta accreta*) и хориокарцинома.

И поред много литературних података у вези са патофизиолошким функцијама трофобласта, механизми који доводе до успешне трудноће још увек су слабо расветљени.



Савремен приступ анализи ове проблематике се одликује покушајем разумевања улоге регулаторних фактора који носе ризик од спонтаних побачаја, као што је анеуплоидија фетуса. Резултати добијени на овом пољу показују да су хромозомске алтерације ембриона у тесној вези са неадекватним концентрацијама фактора раста и проинфламаторних цитокина у амнионској течности и/или плазми мајке, што може индуковати одступања у способности диференцијације и преживљавања трофобласта, као и у њиховом миграторном потенцијалу (Bromage и сар., 2000; Vesce и сар., 2002). Ембриони са тризомијом 21. хромозома карактеришу се различитим дефектима диференцијације трофобласта који се огледају у промени експресије адхезионих молекула као што је интегрин  $\alpha 1$  и појачаној експресији металопроотеиназе 9 (ММР-9). Ово хромозомско одступање може да буде узрок високог степена апоптозе цитотрофобласта на фетално-материнском интерфејсу који се детектује код ембриона са овом тризомијом (Wright и сар., 2004).

Хумана плацента, феталне мембране (амнион и хорион) и матернално ткиво децидуе играју важну улогу у одржавању трудноће због њихове способности да продукују велики број биоактивних пептида (Petraglia и сар., 1996). Међу тим биопептидима, неуропептид Y је нарочито присутан у високој концентрацији у плазми и амнионској течности жене током трудноће (Petraglia и сар., 1989). Неуропептид Y је активни биопептид присутан у значајној концентрацији у централном и периферном нервном систему и укључен је у бројне процесе укључујући анксиозност, понашања у вези са стресом, апетит, варење, метаболизам, имунски одговор, учење и механизме стварања меморије (Heilig, 2004; Ferreira и сар., 2010; Farzi и сар., 2015; Reichmann и Holzer, 2016). Неуропептид Y поред бројних функција везаних за нервни и дигестивни систем, извесно је да има улогу и у репродуктивним процесима. Пун значај и важност овог неуропептида у гестацији још увек није потпуно разјашњена, али његова синтеза од стране цитотрофобласта, амниона, хориона и децидуе указује на значајну физиолошку улогу и у овим деловима организма (Petraglia и сар., 1993). Места везивања неуропептида Y су најбоље регистрована у синциотиотрофобластима терминалних ресица (Robidoux и сар., 1998), у којима је овај пептид укључен у регулацију ослобађања кортикотропин-релизинг фактора (CRF) и инхибина (Petraglia и сар., 1989).

Имуноцитохемијске анализе спроведене у овој докторској дисертацији су показале присуство  $Y_2$  рецептора на површини мембрана ћелија хумане линије трофобласта (JEG-3). Неколико експерименталних студија указује на присуство повишене концентрације неуропептида  $Y$  у различитим циркулаторним дериватима жена оболелих од прееклампсије (Khatun и сар., 2000; Paiva и сар., 2016). Циркулишући и тромбоцитни нивои неуропептида  $Y$  повишени су и до 4-5 пута код трудница оболелих од прееклампсије и еклампсије у поређењу са његовим нивоима код жена са здравом трудноћом (Khatun и сар., 2000). Прееклампсија је мултифакторијални синдром узрокован комбинацијом генетских, имунолошких, срединских и нутритивних фактора који погађа између 2-5 % трудница и водећи је узрок како материнског, тако и феталног морбидитета. Дијагностификује се у трећем триместру трудноће и најчешћи је узрок појаве хипертензије и протеинурије у трудноћи. Патофизиолошка основа клиничке манифестације прееклампсије се карактерише генерализованом вазоконстрикцијом, појачаном васкуларном реактивношћу, паренхимском хиперфузијом, едемима и активацијом тромбоцита који покрећу коагулаторне каскаде (Kharfi и сар., 2003). Повишена концентрација неуропептида  $Y$  у ткиву плаценте и/или плазми и тромбоцитима мајке може представљати значајан фактор патогенезе овог синдрома. Поред јасне клиничке слике, најдрастичнија хистоцелуларна карактеристика преекламптичне плаценте је плитка и недовољна инвазија трофобласта у ткиво утеруса, као и недовољан степен ремоделирања спиралних артерија.

У нашој студији постављена је хипотеза да повишена концентрација неуропептида  $Y$  представља један од потенцијалних узрочника неадекватне плацентације. Циљеви ове студије су усмерени на испитивање ефеката неуропептида  $Y$  на понашање хуманих трофобласта у култури ткива, пре свега на њихову способност преживљавања, оксидативни статус трофобласта, као и на промене у миграторном потенцијалу ових ћелија. Испитивана је и његова потенцијална улога у промени степена експресија ензима који генеришу азот моноксид као један од кључних сигналних молекула. На крају је тестиран и ефекат повишених концентрација овог неурохормона на дистрибуцију и квантитативну заступљеност молекула ћелијске адхезије.

Литературни подаци показују снижен степен преживљавања трофобласта у плаценти жена оболелих од прееклампсије, што вероватно значајно доприноси развоју

патолошких симптома овог поремећаја. Снижено преживљавање трофобласта узроковано је највећим делом повишеним нивоом апоптозе, нарочито на матернално-ембрионском интерфејсу, што доводи до убрзане дезинтеграције овог хистолошког слоја плаценте (Di Federico и сар., 1999; Neale и сар., 2003). Како би се испитао допринос неуропептида Y у смањеној вијабилности цитотрофобласта регистрованој у прееклампсији, у овој студији најпре су тестирани потенцијални цитотоксични ефекти неуропептида Y и његова потенцијална улога у индукцији апоптозе трофобласта.

Током ове студије испитивани су ефекти неуропептида Y у физиолошкој концентрацији од 0,1 nM (0,1 nmol/L) и патофизиолошкој од 1 nM (1 nmol/L) на апоптотски индекс трофобласта. Као орган који се развија, плацента подлеже константном ткивном ремоделовању, које се огледа и у функционалном губитку једног броја трофобластних ћелија процесом апоптозе. Након пролиферације и диференцијације у специфичне ћелијске подтипове, трофобласти који старе се селективно замењују новим ћелијама без утицаја на околне типове ћелија (Mayhew, 2001). Апоптоза, програмирана ћелијска смрт, је активан процес којим се дисфункционалне или остареле ћелије елиминишу како би се одржала ткивна хомеостаза и његово оптимално функционисање. Поред тога што се апоптоза сматра важним процесом за оптималан развој плаценте, она такође може бити посредник различитих патофизиолошких стања током трудноће. Апоптотске ћелије су идентификоване и у матерналним и у ембрионским ткивним компартментима током здраве трудноће, а присуство и степен заступљености оваквих ћелија може бити у вези са ступњем прогресије трудноће, укључујући везивање ембриона за ендометријум, трофобластну диференцијацију, инвазију трофобласта у децидуу, ремоделовање спиралних артерија и сам порођај (Galan и сар., 2000; Smith и сар., 2000; Ashton и сар., 2005). У зависности од врсте стимулса, апоптоза може да буде иницирана посредством два механизма: унутрашњим, помоћу митохондрија и спољашњим, у одговору на егзогене лиганде који је посредован рецепторима смрти. Главни ензимски егзекутори апоптозе су каспазе, фамилија цистеин протеаза које исецају виталне ћелијске протеине и спроводе апоптотске каскаде индукујући умирање ћелије (Fischer и сар., 2003). Поред наведених функција, апоптоза игра важну улогу у индукцији матерналне толеранције на патерналне антигене које трофобласти као ембрионске ћелије у значајној мери експримирају (Abrahams и сар., 2004). У различитим компликацијама трудноће, као

што су преекламсија и интраутерини застој у расту региструје се повишен степен апоптотских ћелија (Ishihara и сар., 2002; Crocker и сар., 2003) указујући да модификације у регулацији апоптозе трофобласта могу да допринесу патофизиологији ових обољења.

Контролне ћелије у нашој студији показују одређен спонтани ниво апоптозе услед интензивног раста и ћелијских деоба у култури. Оба временска третмана (24 сата и 72 сата) су показала да овај протеин остварује протективни ефекат на хуманим цитотрофобластима у култури, снижавајући статистички значајно индекс ћелија у апоптози у поређењу са контролом.

Већи број студија указује на снижавање степена апоптозе код цитотоксичности индуковане различитим лигандима. Неуропептид Y показује протективне ефекте у неуронима стријатума мишева код апоптозе индуковане метамфетаминим. Инкубација ових ћелија са агонистима рецептора Y<sub>1</sub> и/или Y<sub>2</sub>, доводи до снижавања апоптотског индекса у односу на ћелије третиране метамфетаминим, при чему Y<sub>2</sub> агонист показује снажнији протективни ефекат (Thiriet и сар., 2005). Активација свих подтипова рецептора за NPY инхибира аденилат-циклазу која регулише сигналне путеве зависне од калцијума, због чега је један од могућих механизма протективног ефекта регистрованог у студији, регулација инфлуksа калцијума и његове интрацелуларне концентрације, што неке предходне студије и показују (Silva и сар., 2001; Pedrazzini и сар., 2003). Други могући механизам који би био у основи наших резултата укључује сигналне путеве инициране митоген-активирајућим протеин киназама, имајући у виду да и Y<sub>1</sub> и Y<sub>2</sub> рецептори активирају ERK1 и ERK2 киназе (енг. *extracellular signal-regulated kinase 1*) (Mullins и сар., 2002). Активација ових киназа помоћу фруктозе-1,6-бифосфата такође доводи до протективног ефекта на преживљавање неурона погођених хипоксијом, вероватно услед ефекта ових киназа на одржавање високог нивоа митохондријалних процеса оксидације (Fahlman и сар., 2002). Неке студије такође показују да NPY може да учествује у превенцији апоптозе деловањем на неке сигналне путеве активираних р53 протеином (Gonçalves и сар., 2012; Santos-Carvalho и сар., 2013; Lim и сар., 2015). Студија која је испитивала протективне ефекте неуропептида Y на бубрежном ткиву указује да се они остварују највећим делом снижавањем експресије про-апоптотских гена и чак самог р53, као њиховог протеинског регулатора (Namoh и сар., 2016). Још један од могућих механизма смањивања степена апоптозе код хуманих трофобласта третираних

неуропептидом Y је инхибиција ензима iNOS које се региструје у нашој студији, а што су неке студије показале (Wang и сар., 2017).

Анти-апоптотско понашање неуропептида Y регистровано у нашем експерименту указује на његов допринос преживљавању ових ћелија у комплексним процесима прогресије трудноће. Циркулишуће физиолошке концентрације неуропептида Y, нарочито изражене у првој половини трудноће, свакако сугеришу да овај протеин може имати значајне физиолошке доприносе током трофобластне диференцијације и инвазије, од којих је један свакако промовисање преживљавања инхибирањем апоптотских процеса у овим ћелијама.

Поред утицаја на вијабилност и способност преживљавања трофобласта, у нашој студији анализирани су пролиферативни ефекти неуропептида Y на хуманим трофобластима коришћењем ћелијске боје трипан плаво (trypan blue), која не може да прође мембрану живих ћелија, због чега боји само мртве ћелије. Резултати су показали значајне пролиферативне ефекте у обе коришћене концентрације и у оба временска третмана у односу на контролу. Постоји такође значајан разлика индекса пролиферације између краткотрајног (24 сата) и дуготрајног (72 сата) третмана у обе аплициране концентрације NPY (0,1 nM и 1 nM), при чему степен пролиферације расте ~ 2 пута са дужином излагања неуропептиду Y. Не постоје статистички значајне разлике у овом ефекту између две примењене концентрације у оквиру исте дужине излагања, иако физиолошка концентрација од 0,1 nM NPY показује јачи пролиферативни ефекат у односу на концентрацију од 1 nM NPY.

Подаци из литературе показују да неуропептид Y индукује пролиферацију ћелија у туморима простате, дојке, као и код хепатичних миофибробласта, епителних ћелија и васкуларних глатких мишићних ћелија (Jeppsson и сар., 2017). Ове студије указују да се пролиферативни ефекти остварују преко Y<sub>1</sub> рецептора, а трансдукција сигнала се спроводи вероватно преко MAPK и ERK1/2 сигналних путева (Pedrazzini и сар., 2003; Meideros и сар., 2012; Oben 2012; Zhang и сар., 2015). Сматра се да је неуропептид Y значајан фактор прогресије тумора простате и андроген зависног и андроген независног облика. Механизам којим неуропептид Y индукује раст и пролиферацију ћелија хуманог карцинома простате реализују се преко Y<sub>1</sub> рецептора (Ruscica и сар., 2006; 2007).

Неколико студија сугерише да неуропептид  $\Upsilon$  индукује пролиферацију неуралних прекурсора хипокампаалних неурона посредством  $\Upsilon_1$  рецептора, због чега се интернеурони хипокампуса који продукују и ослобађају неуропептид  $\Upsilon$  сматрају главним кандидатима у процесима учења и меморије које се одигравају у хипокампусу (Howell и сар., 2003; Chamira и сар., 2010). Могући сигнални путеви који су у основи ове пролиферације су посредовани редукцијом концентрације cAMP, повећањем интрацелуларне концентрације калцијума и модулацијом MAPK пута преко неколико посредничких молекула укључујући протеин киназу C (PKC). Укљученост MAPK и ERK1/2 сигналних путева је индикован у већем броју ћелијских типова, док у неким случајевима захтева и ранију активацију протеин киназе C (Alblas и сар., 1998; Mannon и Raymond, 1998; Cho и сар., 2004; Howell и сар., 2005).

Реактивне врсте кисеоника и пероксинитрити вероватно су значајни медијатори у пролиферацији индукованој неуропептидом  $\Upsilon$  у неколико студија које су спроведене на неуралним прогениторским ћелијама и глатким мишићним ћелијама крвних судова. Пролиферација хипокампаалних ћелија мишијих ембриона посредована је реактивним врстама кисеоника, пошто примена селективних блокатора доводи до снижавања пролиферације. Код глатких васкуларних мишићних ћелија  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  су потребни за митогене ефекте водоник пероксида, па се сматра да ови молекули могу да буду изазивачи неких кардиоваскуларних обољења повећавањем броја ових ћелија у зидовима судова. Повишене концентрације пероксинитрита такође показују пролиферативан ефекат у васкуларним глатким мишићним ћелијама (Velarde и сар., 2004; Yoneyama и сар., 2010; Nihoaki и сар., 2013). Показано је да MAPK и ERK1/2 сигнални путеви посредују овим механизмима пролиферације који укључују реактивне врсте кисеоника (Reddy и Glaros, 2007). У нашој студији показани су повишени нивои реактивних врста кисеоника под деловањем неуропептида  $\Upsilon$  у концентрацији од 1 nM, што указује да су слични механизми контроле ћелијске пролиферације реактивним врстама кисеоника присутни и у хуманим трофобластима линије JEG-3.

Иако продукција ROS-а може имати штетне ефекте на различите ћелијске структуре, укључујући оштећења мембране и ДНК, ови молекули су важне сигналне карике у ћелијама. Нагло повећање концентрације ROS-а се уочава након стимулације великог броја ћелија факторима раста, док инхибиција њихове продукције може довести

до блокаде ћелијског сигналинга (Rhee и сар., 2005; Havens и сар., 2006; Iiyama и сар., 2006). Један студија такође сугерише да ROS промовише пролиферацију премалигних/малигних ћелија пружајући им на тај начин компетитивну предност, док код неких здравих типова ћелија инхибирају пролиферацију (Hole и сар., 2010). Узимајући у обзир да трофобластне ћелије у великој мери показују особине канцерних ћелија, могуће је да и ова њихова специфичност игра значајну улогу у пролиферативним ефектима које неуропептид Y у њима остварује.

Нитрити ( $\text{NO}_2^-$ ) представљају једну од главних показатеља нитрозитивног стреса у ћелијама, и индикатор су концентрације азот монооксида (NO) који је кључан сигнални молекул у бројним физиолошким процесима у ћелији. Резултати нашег експеримента показују значајно снижену концентрацију  $\text{NO}_2^-$  и након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана 1nM NPY у односу на контролну вредност, сугеришући да овај биоактивни пептид доводи до смањења количине доступног NO у трофоблатима третираним NPY у концентрацији од 1 nM.

Међутим, један број истраживања указује да је овај молекул пресудан за пролиферацију неких типова ћелија. Улога азот монооксида у овом процесу показана је на културама експланата хипокампуса пацова преко механизма зависног од pNOS ензима. Због тога је у овим ћелијама неуропептид Y означен као агонист интрацелуларног азот монооксида, а блокирана или смањена продукција NO доводи до смањења пролиферативног индекса ових ћелија (Cheung и сар., 2012). Резултати наших истраживања показују поред снижених концентрација азот монооксида и снижене нивое експресије индуцибилне синтазе азот монооксида (iNOS), док активност неуралне изоформе није испитивана. Резултати показују да дуготрајни третман у трајању од 72 сата неуропептидом Y у обе концентрације (0,1 nM и 1 nM NPY) изазива статистички значајно смањење експресије овог ензима (iNOS) у односу на контролне вредности.

Одсуство статистички значајне разлике у пролиферативном индексу хуманих цитотрофобласта JEG-3 између обе примењене концентрације неуропептида Y у овом експерименту, сугерише да неуропептид Y остварује значајне *in vitro* пролиферативне ефекте и у физиолошким концентрацијама које су важне за формирање и раст трофобластних колона плаценталних ресица, а тиме и за правилну прогресију раних фаза трудноће. Пролиферативни ефекти неуропептида Y који се запажају у нашем

експерименту сугеришу да неуропептид Y има значајан допринос у нормалним (физиолошким) условима у процесу умножавања хуманих цитотрофобласта и да вероватно представља значајан регулаторни молекул који учествује у регулацији пролиферативних процеса у ембрионским ткивима неопходних за правилну имплантацију и каснију инвазију ових ћелија на матернални ендометријум.

У студији су даље испитивани ефекти неуропептида Y на параметре оксидативног статуса хуманих цитотрофобласта у култури.

У нашој студији резултати показују да неуропептид Y само у концентрацији 1 nM индукује статистички значајно повећање концентрације  $O_2^{\bullet-}$  и  $H_2O_2$  и након краткотрајног (24 сата) и након дуготрајног (72 сата) третмана у поређењу са контролним вредностима. Пролонгирани третман (72 сата) изазива интензивније повећање концентрације  $O_2^{\bullet-}$ , као и  $H_2O_2$  у поређењу са краткотрајни третманом (24 сата) неуропептидом Y у концентрацији од 1 nM. Третман физиолошком концентрацијом NPY (0,1 nM) доводи до статистички значајног повећања концентрације  $H_2O_2$  само након дуготрајног (72 сата) третмана у JEG-3 ћелијама у односу на контролну вредност, док промене концентрација  $O_2^{\bullet-}$  нису статистички значајне.

Различите студије указују да сигнални путеви деловања овог неуропептида могу мењати оксидативни/антиоксидативни баланс ћелије. NPY путем својих рецептора покреће PLC-РКС сигнални пут (phospholipase C-protein kinase C), активирајући NADPH оксидазу (енг. *NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) у хуманим синциотиотрофобластима и ћелијама супрахијазмичких једара хрчка (Robidoux и сар., 1998; Schak и сар., 2001). NADPH оксидаза је важан ензим респираторног ланца и представља главни извор супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) у неутрофилима, васкуларним ендотелским ћелијама и трофобластима (Griendling и сар., 2000; Halliwell и Gutteridge, 2007). До данас је потврђено присуство  $Y_1$  и  $Y_3$  рецептора у хуманим трофобластима у форми помешаних популација (Robidoux и сар., 1998; Robidoux и сар., 2000). Резултати имуноцитохемијске анализе наше студије показују присуство макар  $Y_2$  рецептора на ћелијској линији хуманих цитотрофобласта коришћених у експерименту. Литературни подаци такође показују да  $Y_1$  и  $Y_2$  рецептори овог молекула остварују снажан прооксидативан ефекат у макрофагама (Dimitrijević и сар., 2005; Vedoui и сар., 2008), што указује да повишени нивои супероксид



анјон радикала у хуманим трофобластима изложеним деловању неуропептида Y могу да буду узроковани повишеном активношћу ензима NADPH оксидазе у овим ћелијама.

Неке раније студије су показале активност ензима који генеришу азот моноксид у хуманим трофобластима. Забележено је присуство како индуцибилне синтазе азот монооксида (iNOS), тако и конститутивно експримиране и активне ендотелијалне изоформе овог ензима (eNOS), због чега су ове ћелије способне за продукцију азот монооксида (Rossmann и сар., 1999; Hambartsoumian и сар., 2001). Резултати наше студије показали су да неуропептид Y у концентрацији од 1 nM доводи до значајног снижења концентрације азот монооксида у ћелијској линији трофобласта коришћеној у експерименту, при чему су ефекти израженији након пролонгираног третмана (72 сата) у односу на краткотрајни третман (24 сата). Инкубација ћелија са физиолошким концентрацијама NPY (0,1 nM) није довела до значајних промена концентрације азот монооксида.

Азот моноксид испољава различите сигналне активности у великом броју ткива и ћелија, а познате су његове бројне улоге у процесима гестације. Азот моноксид активира протеин киназу G која врши фосфорилацију бројних протеинских супстрата, међу којима су протеини ћелијске адхезивности (Bryan и сар., 2009). Миграција и инвазија трофобласта укључују прецизне интеракције молекула ћелијске адхезије и компоненти екстрацелуларног матрикса, као и активност екстрацелуларних ензима који промовишу инвазивност, у првом реду металопротеиназе (Zhu и сар., 2012). Интегрини су широко заступљени на ћелијским мембранама и укључени су у процес мобилизације ћелија, имунски одговор, развој ткива, одржавање хомеостазе и патогенезу канцера (Lapidot и сар., 2005). Подаци из литературе сугеришу постојање снажне регулације конформационог стања ових адхезионих протеина у трофобластима током миграције/инвазије, формирања плаценте и ремоделовања материнског крвотока. Инвазивни цитотрофобласти показују повишен ниво експресије  $\beta 1$  и  $\alpha 1$  интегрини и снижену експресију  $\beta 4$  интегрини у поређењу са неинвазивним трофобластима (Thirkill и сар., 2004). Фосфорилација активирана сигналним путевима посредованим азот моноксидом може да индукује конформационе промене интегрини и кадхерина, мењајући њихов афинитет за везивање лиганата. Промене у степену ћелијске адхезије која је зависна од интегрини, много већим делом су проузроковане брзим конформационим променама интегрини, него променама у нивоу њихове експресије (Chigaev и сар., 2011).

Бројни подаци показују да оксидативни стрес ремети биодоступност азот монооксида (Pandey и Rizvi, 2010; Prokić и сар., 2015).  $O_2^{\bullet-}$  радикал који се производи у повишеним концентрацијама, не само да врши оксидацију липида и протеина у ћелијској мембрани и цитоплазми изазивајући потенцијално летална оштећења ћелије, већ и интерагује са NO стварајући цитотоксичан пероксинитрит ( $ONOO^-$ ) (Jourdeuil и сар., 2001; Calabrese и сар., 2007). Формирање пероксинитрита резултује у смањеној биодоступности NO што погађа NO-зависне сигналне путеве. Азот моноксид утиче на миграторни и инвазивни потенцијал различитих типова ћелија (Murohara и сар., 1999; Giordano и сар., 2006; Li и сар., 2009). Бројне *in vitro* студије су показале да покретљивост трофобласта зависи од активности обе изоформе синтазе азот монооксида (iNOS и eNOS), односно од количине присутног NO у овим ћелијама (Cartwright и сар., 1999; Harris и сар., 2008). Једна од улога NO у ћелијској миграцији остварује се његовом регулацијом фосфорилативног статуса интегрин (Вуан и сар., 2008). У студији коју су спровели Cartwright и Balarajah (2005), показало се да су два адхезиона молекула VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1 – васкуларни молекул ћелијске адхезије 1) и  $\alpha 4\beta 1$  интегрин, познат и као VLA-4 (very late antigen 4 – касни антиген 4) битни у везивању трофобласта за ендотелијалне ћелије спиралних артерија утеруса. Конформационе промене проузроковане фосфорилацијом резултирају значајном променом адхезије ћелија зависне од VLA-4 протеина, што несумњиво указује на важну улогу сигналних путева посредованих азот моноксидом у редукцији лигандног афинитета овог интегрин, што доводи до деадхезије ћелије и повишене ћелијске покретљивости (Chigaev и сар., 2011).

У нашем експерименту такође смо испитали ефекте циљаног смањења концентрације азот монооксида у ћелијској линији хуманих цитотрофобласта аплицирањем специфичног блокатора ензима синтезе азот монооксида, L-NAME (L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester). Добијени подаци показују да је миграторни капацитет трофобласта више него двоструко редукован у поређењу са контролним условима, што имплицира есенцијалну улогу азот монооксида у механизму миграције и инвазије ових ћелија. Поред већ наведених могућих механизма, нека истраживања указују да азот моноксид такође може да промовише инвазију трофобласта механизмом различитим од фосфорилације; S-нитрозилација азот моноксидом протеина на водећем крају трофобласта који мигрирају доприноси повећању њихове покретљивости (Harris и сар., 2008).

Експериментални подаци наше студије су показали да је третман трофобласта неуропептидом Y (1 nM NPY) довео до значајног пораста концентрације  $O_2^{\bullet-}$  радикала, али и до значајног смањење концентрације  $NO_2^-$  (индикатори азот монооксида) у овим ћелијама, указујући да је један од механизма редуковане биодоступности азот монооксида формирање пероксинитрита ( $ONOO^-$ ), што може допринети редукцији NO-зависног миграторног потенцијала трофобласта.

Други могући узрок снижене доступности NO је његова смањена *de novo* синтеза од стране NO-генеришућих ензима (нарочито iNOS-a), чија је активност регистрована у хуманим трофобластима (Rossmann и сар., 1999; Hambartsoumian и сар., 2001). Показано је да NPY снажно може да снизи концентрацију азот монооксида и то преко активације  $Y_1$  рецептора у ћелијама микроглије (Ferreira и сар., 2010). У циљу тестирања ове претпоставке, испитивали смо експресиони профил ензима iNOS након пролонгираног третмана (72 сата) неуропептидом Y при обе примењене концентрације (0,1 nM и 1 nM NPY). Резултати су показали да овај биоактивни молекул доводи до статистички значајног снижења експресије iNOS-a у третираним ћелијама у поређењу са контролним ћелијама, што недвосмислено показује да неуропептид Y редукује количину доступног азот монооксида путем инхибиције његове *de novo* синтезе. Неуропептид Y и у физиолошкој концентрацији од 0,1 nM доводи до снижавања нивоа експресије iNOS-a, али мање драстично него у концентрацији од 1 nM, што свакако нема неког значајнијег утицаја на миграцију трофобласта у нашем експерименту.

Поред испитивања промена у степену експресије (количина информационе РНК) iNOS-a, током студије су спроведена и имунохемијска бојења овог ензима у цитотрофобластима линије JEG-3 након пролонгираног третмана неуропептидом Y, а резултати су показали да је количина протеина смањена у односу на контролне ћелије, што је у складу са генским експресионим профилем. Можемо закључити да је снижење количине азот монооксида под утицајем неуропептида Y у овим ћелијама узроковано смањењем биодоступности азот монооксида услед појачане продукције реактивних врста кисеоника, као и смањењем синтезе овог сигналног молекула услед инхибиције експресије ензима који га синтетише.

Пролонгиран третман неуропептидом Y (72 сата) довео је до снажнијег снижења концентрације азот монооксида, као и до снажније редукције миграционог индекса

трофобласта у поређењу са краткотрајним третманом (24 сата). Предпостављамо да су разлози оваквог резултата студије у директној вези са променама механизма регулације концентрације азот монооксида у цитоплазми испитиваних ћелија, а то су пре свега продужена продукција реактивних врста кисеоника (нарочито  $O_2^{\cdot-}$ ) и у снижењу степена експресије iNOS-а.

Иако један број експеримената указује да неуропептид Y промовише инвазију различитих типова ћелија (Ruscica и сар., 2007; Sheriff и сар., 2010), постоји значајан број студија у којима је потврђен његов антимиграторни и антипролиферативни ефекат. Третман ћелија различитих типова инвазивних канцера неуропептидом Y резултовао је редукијом у инвазивном потенцијалу ових тумора и/или смањеном способношћу пролиферације у дозно-зависном маниру. Аплицирање неуропептида Y различитим ћелијским линијама канцера простате инхибира пролиферацију преко механизма зависног од  $Y_1$  рецептора, док третман ћелија холангиокарцинома *in vitro* овим неурохормоном редукује њихов инвазивни потенцијал у дозно-зависном маниру (Ogasawara и сар., 1997; DeMorrow и сар., 2011). Студија коју су спровели Nave и сарадници, указује да неуропептид Y инхибира и миграцију моноцита из циркулације у периферна ткива (Nave и сар., 2004). Резултати експеримената наше студије такође показују антимиграторни ефекат овог неурохормона на ћелијама хуманих трофобласта.

Глутатион (GSH) је трипептид који се састоји од аминокиселина цистеина, глутамата и глицина и представља једну од најјачих неезимских антиоксидативних компонента у ћелијама. Глутатион учествује у одржавању интрацелуларног нивоа тиолних група ( $-SH$ ), врши детоксификацију различитих метаболита и неопходан је за оптимално функционисање неких ензима и великог броја осталих група ћелијских протеина и макромолекула (Chung и сар., 2016). Пошто је GSH снажан дозор електрона представља један од најважнијих сквинцера ("хватача") слободних радикала, којом приликом се оксидује до своје димерне форме – GSSG (Jones, 2002). Повишена концентрација редукованог глутатиона (GSH) добијена у нашој студији, сугерише *de novo* синтезу глутатиона индуковану 1 nM неуропептидом Y. GSH се може синтетисати у ћелијама *de novo* и брза индукција његове синтезе се региструје у одговору на различите стресоре (Kondo и сар., 1993; Shi и сар., 1994). Показано је да оксидативни стрес индукује појачану експресију ензима биосинтезе глутатиона, као што је  $\gamma$ GCS (*gamma glutamyl*

*cysteine synthetase* – гама глутамил цистеин синтаза) (Rahman и MacNee, 1999; Ray и сар, 2002). Медијум за гајење ћелија коришћен у нашој студији (DMEM) садржи значајну количину цистина, прекурсора неопходног за биосинтезу глутатиона у ћелијама. На основу литературних података и резултата добијених у нашем експерименту може се сугерисати да је повишена концентрација GSH у трофобластима изложеним (24 сата и 72 сата) неуропептиду Y у концентрацији од 1 nM, производ његове *de novo* синтезе услед активирања ензима биосинтезе, узрокованим повишеним концентрацијама реактивних врста кисеоника. Изгледа да је повишена концентрација глутатиона важан одбрамбени механизам у одговору хуманих цитотрофобласта на оксидативни стрес индукован неуропептидом Y.

Оксидована форма глутатиона (GSSG) представља производ оксидације глутатиона услед интеракције са агресивним радикалским структурама. Повишена концентрација оксидованог глутатиона и смањење индекса GSH/GSSG представља поуздан индикатор антиоксидативне активности глутатиона у одговору на оксидативан стрес који може узроковати бројна оштећења ћелије (Lu, 2009). У студији нису забележене статистички значајне промене концентрације GSSG након краткотрајног излагања неуропептиду Y (24 сата) у поређењу са контролним вредностима, што може да укаже на високу активност глутатион редуктазе (GR), једне од најзначајних ензимских компоненти антиоксидативне заштите у трофобластима. Цитотрофобласти воде порекло од трофоектодермалних ембрионских стем ћелија и имајући у виду њихове способности инвазије и диференцијације, цитотрофобласти задржавају неке од особина стем ћелија (Harun и сар., 2006), због чега њихова базална антиоксидативна активност може бити виша у односу на друге, високодиференциране типове ћелија (Aplin и сар., 1999; Waszyk и сар., 2009; Shenghui и сар., 2009; Kobayashi и Suda, 2012). Након дуготрајног третмана неуропептидом Y (72 сата) концентрација GSSG је значајно повишена, што указује на знатан оксидативни стрес, вероватно услед нагомилавања реактивних врста кисеоника током стимулације, што превазилази регенерациони капацитет глутатион редуктазе водећи ка акумулацији оксидованог глутатиона. Активности GR и осталих ензима антиоксидативне заштите у JEG-3 ћелијској линији хуманих цитотрофобласта нису биле предмет анализе током ове студије и њихове вредности тек треба да буду квантификоване. У сваком случају, нивои реактивних врста кисеоника ( $H_2O_2$  и  $O_2^{\bullet-}$ ) у хуманим трофобластима након излагања

неуропептиду Y указују да овај неуропептид аплициран у концентрацији неколико пута вишој у односу на ону присутну у нормалној трудноћи, значајно индукује оксидативни стрес.

На основу резултата наше студије, закључујемо да неуропептид Y индукује оксидативни стрес у хуманој ћелијској линији трофобласта генеришући повећану продукцију реактивних врста кисеоника (пре свега  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{O}_2^{\cdot-}$  радикала) и то како након краткотрајног (24 сата), тако и након пролонгираног излагања (72 сата). Ниво глутататиона (GSH), као једног од главних компоненти антиоксидативне заштите је повишен у оба временска третмана, вероватно као последица његове *de novo* биосинтезе у одговору на оксидативни стимулус. Концентрација нитрита (индикатори азот монооксида) је значајно снижена у трофобластима након излагања неуропептиду Y (и у 24 часовном третману и у 72 часовном третману), у односу на вредности у контролним ћелијама, при чему је редукција концентрација израженија након пролонгираног (72 сата) третмана неуропептидом Y. Миграторни индекс хуманих трофобласта мерен 2D миграционим есејем, нижи је у оба третмана (24 сата и 72 сата) у односу на контролне вредности, при чему је редукција миграционе способности израженија након пролонгираног третмана. Резултати наше студије имплицирају да излагање неуропептиду Y у концентрацији од 1 nM у оба временска третмана редукује миграторну способност хуманих цитотрофобласта снижавањем биодоступности азот монооксида. Подаци добијени у нашој студији такође показују да третман специфичним блокатором NO-генеришућих ензима (L-NAME), интензивно снижава миграциони индекс трофобласта у односу на контролну вредност, без значајних разлика између краткотрајног и пролонгираног третмана. Овај податак свакако указује да је азот монооксид од великог значаја у миграционим механизмима хуманих трофобласта, иако ово не искључује постојање других сигналних молекула укључених у њихову миграцију и инвазију. Узимајући у обзир добијене резултате, наша студија сугерише да је један од механизма редукције покретљивости ових ћелија проузрокована снижењем биодоступности азот монооксида, који погађа NO-зависне механизме миграције, нпр. променом статуса фосфорилисаности или променом степена нитрозилованости неких молекула ћелијске адхезије. Наша студија сугерише да је редукција слободног азот монооксида посредована агресивним супероксид анјон радикалом који га преводи у

пероксинитритну фракцију и смањеном експресијом и количином ензима iNOS који продукује азот моноксид.

Да би остварили своје физиолошке функције, трофобласти поред миграторног потенцијала поседују и значајну инвазиону способност. Раније смо наводили постојање велике сличности између цитотрофобласта који врше инвазију на миометријум и канцерних ћелија у фазама метастазе, са том разликом да је миграција/инвазија трофобласта много строже регулисан и ограничен процес. Инвазија ћелија је комплексан вишестепен процес који укључује ћелијску деадхезију, разградњу компоненти екстрацелуларног матрикса протеолитичким ензимима и продукцију фактора раста који промовишу миграцију/ инвазију. Добро је позната улога матриксних металопроотеиназа (ММР) у процесима ремоделовања здравих ткива, као и у различитим патолошким стањима. Металопроотеиназе своју улогу остварују деградујући протеине строме ванћелијског матрикса и интеракцијом са рецепторима на ћелијској површини (Deryugina и Quigley, 2006; Malemud, 2006). Дерегулација металопроотеиназа индикована је у ангиогенези тумора, инвазији и метастази, запаљенској упали бешике, артритису, атеросклерози, респираторним и срчаним обољењима (Bjorklund и Koivunen, 2005; Cheng и сар., 2015).

Важна улога металопроотеиназа индикована је у трудноћи у већем броју фаза. Ови ензими имају значајан допринос успешном одвијању трудноће, пошто велики број података показује да су есенцијални у ремоделовању и деградацији екстрацелуларног матрикса омогућавајући имплантацију и формирање плаценте, али и оптимално одвијање процеса порођаја, омогућавајући сазревање цервикса, цепање феталних мембрана и на крају одвајање плаценте од утеруса мајке (Stygar и сар., 2002; Xu и сар., 2002; Goldman и сар., 2003). Металопроотеиназе су фамилија цинк-зависних ендопептидаза које се категоризују на основу своје структуре и функције као колагеназе, гелатиназе, стромелизини, матрилизини и мембрански тип металопроотеиназа (МТ-ММР) (Vu и Werb, 2000; Zitka и сар., 2010). ММР-1 је најпознатији члан подгрупе колагеназа и врши деградацију фибрила колагена тип I, II и III, док је ММР-9 члан групе гелатиназа и разлаже пептидне везе денатурираног колагена (гелатина) генеришући пептиде мале молекулске масе (Visse и Nagase, 2003). Поред металопроотеиназа, и њихови ткивни инхибитори (TIMPs) имају кључну улогу у регулацији инвазије трофобласта, будући да контролишу

образац и интензитет активности металопротеиназа (Mayor-Lynn и сар., 2011). У трофобластима је показано присуство две врсте металопротеиназа у већој количини: металопротеиназа 2 (гелатиназа А, 72-kDa) и металопротеиназа 9 (гелатиназа В, 92-kDa), као и неких других типова металопротеиназа, које представљају њихову главну инвазивну компоненту, што их чини кључним ензимима инвазионог процеса трофобласта (Librach и сар., 1991; Isaka и сар., 2003; Majali-Martinez и сар., 2017).

Цитолошке анализе су детектовале диференцијалну експресију металопротеиназе 2 и металопротеиназе 9, при чему је MMP-2 доминантно експримирана и активна у екстравилозним трофобластима, док је MMP-9 углавном присутна у вилозним трофобластима (Isaka и сар., 2003). Инвазија нормалних цитотрофобласта у ендометријум под деловањем ових ензима прецизно је регулисана и рестрикована, за разлику од канцерних ћелија са којима трофобласти деле већи број миграционих карактеристика. Металопротеиназа 9 (MMP-9) један је од најважнијих чланова фамилије матриксних металопротеиназа. MMP-9 деградује главну компоненту екстрацелуларног матрикса, колаген тип IV и директно је укључен у процес инвазије ћелија хорионских ресица у ендометријум омогућавајући имплантацију ембриона (Gong и сар., 2014; Lockwood и сар., 2014).

У нашој студији спроведена је анализа активности металопротеиназе 9 (MMP-9) у хуманим цитотрофобластима. Овај ензим остварује екстрацелуларну активност и синтетише се у ћелији у облику неактивног про-ензима, а тек након егзоцитозе везикула се активира. Активност ензима је мерена у медијуму за култивацију трофобласта и добијене вредности указују на његову значајно снижену активност у пролонгираном третману (72 сата), док је у краткотрајном третману неуропептидом Y активност снижена, али не статистички значајно. Активност металопротеиназе 9 је регулисана низом фактора, од којих је азот моноксид један од најзначајнијих. Бројни подаци из литературе указују да азот моноксид и његови деривати представљају кључне сигналне молекуле у активацији проензимских форми металопротеиназа, али и у регулацији већ активираних ензима. У студији коју су спровели Novago и сарадници показано је да хумани трофобласти изоловани из плаценте имају јасну корелацију количине азот монооксида и нивоа експресије синтазе азот монооксида током процеса диференцијације трофобласта. Још важније, студија је показала позитивну регулаторну улогу азот монооксида у активности и



протеинској експресији MMP-2 и MMP-9 будући да донори азот монооксида стимулишу, док његови инхибитори редукују ниво експресије и активност ових металопроотеиназа (Novaro и сар., 2001). Механизам активације про-ензима азот моноксидом предмет је бројних дебата, иако је већ предложено неколико потенцијалних механизма. Азот моноксид, због свог неспареног електрона ( $e^-$ ) у стању је да интерагује са аминокиселинским резидуама протеина, индукујући активацију или инхибицију ензима. У случају матриксне металопроотеиназе 2 и матриксне металопроотеиназе 9, азот моноксид може да модификује њихову активност одвајајући јон цинка од цистеинске резидуе локализоване у каталитичком центру проензима и у стању је да прекине везу атома цинка и тиолата за који је везан у про-металопроотеинази 9, узрокујући активацију овог про-ензима (Gu и сар., 2002; Novaro и сар., 2002; Pustovrh и сар., 2002). Постоје подаци који сугеришу да азот моноксид активира једну другу металопроотеиназу – TCE (TNF- $\alpha$ -конвертујући ензим) (Zhang и сар., 2000).

Пероксинитрит ( $ONOO^-$ ), метаболит настао реакцијом NO и  $O_2^{\cdot-}$  радикала изгледа да такође има битну улогу у активацији металопроотеиназа (Saari и сар., 1990; Migita и сар., 2005; Viarriani и сар., 2009). Механизам којим пероксинитрит индукује модулацију активности протеина се највероватније обавља путем S-нитрозилације цистеинске резидуе (Matthews и сар., 1996; Okamoto и сар., 2001), а показано је да је пероксинитрит такође у стању да ослободи јон цинка ( $Zn^{2+}$ ) и из других цинк-тиолских центара (St Croix и сар., 2002). Код ретиналних неурона пацова код којих је нокаутиран ген за неуралну синтазу азот монооксида (nNOS) активност MMP-9 је значајно смањена у поређењу са *wt* контролом, што је приписано S-нитрозилацији овог про-ензима (Manabe и сар., 2005). Колокализација MMP-9 и nNOS је такође забележена у неуронима кортекса, где је показана повишена S-нитрозилација про-ензима и његова последична активација, након апликације донора азот монооксида (Gu и сар., 2002). Још једна студија, извршена на астроцитима пацова показала је повишен степен копреципитације нитрита са тирозинским резидуама MMP-9, заједно у корелацији са појачавањем активности ензима и индукцијом, док је третман блокаторима NO синтезе довео до смањења активности оба ова ензима (Wang и сар., 2011).

Резултати добијени у нашој студији поред снижења активности MMP-9 мереној у медијуму за култивацију хуманих цитотрофобласта, показују и смањење концентрације

азот монооксида, што указује на могуће постојање корелације између вредности ова два параметра, нарочито у пролонгираном третману (72 сата) неуропептидом Y (1 nM NPY). Један од могућих објашњења оваквог тренда је смањење степена нитрозилованости про-MMP-9 у трофобластима услед смањене биодоступности азот монооксида индуковане оксидативним стресом, као и смањењем експресије iNOS-а у поређењу са нетретираним ћелијама. Са друге стране, више студија је потврдило да и пероксинитрит има способност активације металопроотеиназе. У нашој студији су потврђени значајни прооксидативни ефекти неуропептида Y (повишене концентрације  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ ), који заједно са значајно смањеном концентрацијом азот монооксида указују на вероватно формирање пероксинитрита као једног од најзначајних механизма смањене биодоступности азот монооксида. Формирање пероксинитрита могла би да буде значајан механизам у активацији металопроотеиназе 9, као што је то показано за неке друге металопроотеиназе (Rajagopalan и сар., 1996; Owens и сар., 1997). Поред инхибиције iNOS-а, и смањена продукција  $O_2^{\cdot-}$  радикала може бити у корелацији са смањеном зимографском активношћу металопроотеиназе 9, иако није јасно да ли се ефекат остварује смањеном протеинском синтезом или променом у активности ензима (Egi и сар., 2004). Про-MMP-9 се може активирати пероксинитритом, а у још већем степену и помоћу S-нитроглутатиона ( $GSNO_2$ ), производом реакције глутатиона и пероксинитрита (Okamoto и сар., 2001). Иако је активација про-MMP-9 сигнаlima ћелијске мембране изледа мање учестала, још један предложени механизам индиректне активације азот монооксидом је стимулација експресије /активације урокиназног активатора плазминогена (uPA), за који је потврђено да ефикасно активира MMP-9 (Legrand и сар., 2001; Vove и сар., 2007).

У експерименту је поред одређивања ензимске активности MMP-9 извршено и мерење експресије гена за MMP-9. Резултати су показали да неуропептид Y доводи до смањења нивоа експресије гена за MMP-9 при концентрацији од 1 nM NPY, што директно може да допринесе смањивању инвазионог потенцијала трофобласта, имајући у виду есенцијалну улогу овог ензима у реализацији инвазије. Смањење биодоступности азот монооксида показано у нашој студији вероватно има значајну улогу у регулацији експресије металопроотеиназе 9, што неке раније студије и показују (Novaro и сар., 2001). Додатно, индуцибилни фактор хипоксије  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) има значајан допринос експресији металопроотеиназе 2 и металопроотеиназе 9, што указује на могућност да се ради о истом

регулаторном механизму и у испитиваној линији хуманих трофобласта (Luo и сар., 2006; O'Toole и сар., 2008). Собзиром да је у нашој студији показано да је и експресија HIF-1 $\alpha$  снижена током третмана неуропептидом Y (у обе коришћене концентрације) могуће је да је регистровано снижење делом узроковано и променом у концентрацији овог транскрипционог фактора. У сваком случају, експресија металопротеиназе 9 није статистички значајно снижена у поређењу са контролом након третмана неуропептидом Y у концентрацији од 1 nM, што може да буде у вези са одржањем стабилне концентрације азот монооксида током овог третмана.

У циљу дубљег расветљавања механизма којима неуропептид Y доводи до смањивања миграционог потенцијала трофобласта, спроведене су анализе генске експресије неких гена за које је познато да могу имати утицај на миграцију и инвазионо понашање ћелија. Експресије ових гена одређиване су након пролонгираног третмана (72 сата) у обе коришћене концентрације (0,1 nM и 1 nM NPY).

Миграција трофобласта и њихов инвазивни потенцијал регулисани су различитим срединским факторима (егзогени фактори) који укључују сигнале који се преносе посредством адхезионих молекула ћелије, солубилне факторе децидуе који делују услед интеракције трофобласта са овим ткивним окружењем, као и неке ћелијске компоненте матерналног имунитета као што су Т лимфоцити и макрофаги (Harris, 2010). Нарочито значајан егзогени фактор који регулише трофобластну способност миграције и инвазије је хипоксија, односно снижен парцијални притисак кисеоника у односу на нормалне услове у организму. Током ране трудноће, парцијални притисак кисеоника у материци је само 17,9 mm Hg, што је значајно ниже у односу на нормалне услове где та вредност износи 55 mm Hg. Ова чињеница указује да трофобласти инвадују и мигрирају децидуално ткиво и матерналне судове у условима константне хипоксије.

Један од најзначајних ћелијских протеина који посредују прилагођавању трофобласта на услове хипоксије, а који је и значајан регулатор миграције/инвазије трофобласта јесте индуцибилни фактор хипоксије 1 $\alpha$  (енг. *hypoxia inducible factor* – HIF-1 $\alpha$ ). Резултати мерења експресије овог гена у цитотрофобластима након пролонгираног третмана неуропептидом Y показали су да концентрација неуропептида Y од 1 nM доводи до статистички значајног снижавања експресије HIF-1 $\alpha$  у поређењу са контролним

вредностима. Статистички значајне разлике у експресији овог HIF-1 $\alpha$  гена су забележене и након третмана физиолошком концентрацијом од 0,1 nM NPY.

HIF-1 $\alpha$  припада групи транскрипционих фактора који регулишу експресије оних гена чија индукција зависи од концентрације кисеоника и функционише као хетеродимерни комплекс који се састоји од субјединице HIF-1 $\alpha$  и субјединице HIF-1 $\beta$ . Шта више, HIF-1 $\alpha$  се превасходно експримира у хипоксичним условима. У условима нормоксије, овај протеин се везује за *VHL* тумор супресор (von Hippel Lindau) преко активације пролил хидроксилазе и деградује се убиквитинацијом. У условима хипоксије HIF-1 $\alpha$  мигрира у нуклеус, везује се за p300-CBP транскрипциони коактиватор и бива стабилизован, тиме што хипоксија доводи до супресије активности пролил хидроксилазе (Nizet и Johnson, 2009). Неколико студија показује да се HIF-1 $\alpha$  експримира у високом степену у хуманим трофобластима током раних ступњева трудноће (Caniggia и сар., 2000; de Marco и Caniggia., 2002). Подаци из литературе показују да је миграциона и инвазиона способност регулисана експресијом HIF-1 $\alpha$  гена посредством ефеката на пролиферациони и апоптотски индекс (Genbacev и сар., 1999; Dubinsky и сар., 2010; Choi и сар., 2016). Витексин, специфични инхибитор HIF-1 $\alpha$ , значајно редукује миграциони индекс ћелија феохромоцитома пацова као и JNK (c-jun N-terminal kinase) сигнални пут, који се индукује хипоксијом (Choi и сар., 2006) што указује да хипоксија и HIF-1 $\alpha$  имају кључну улогу у миграцији ових ћелија. Ћелије којима је нокаутуран HIF-1 $\alpha$  показују такође значајни пад у миграционом потенцијалу (и до 80%) у поређењу са контролним здравим ћелијама (Li и сар., 2010). Хипоксија такође активира факторе трофобласта који имају ангиогенетски потенцијал и који додатно стимулишу прокрвљавање матерналне децидуе. Једна скорија студија је показала да и миграција и инвазија трофобласта, али и њихов пролиферативни потенцијал зависи од HIF-1 $\alpha$ , будући да утишавањем иРНК за HIF-1 $\alpha$  долази до значајне редукције трофобластне способности кретања (Dubinsky и сар., 2010). HIF-1 $\alpha$  чију експресију индукује хипоксија, доводи до промене у обрасцу дистрибуције неких интегрина на ћелијској мембрани, као што је  $\alpha 5\beta 3$  што указује да хипоксија и на овом нивоу доводи до стимулације миграције и инвазије како канцерних, тако и трофобластних ћелија (Cowden Dahl и сар., 2005).

Реактивне врсте кисеоника, нарочито водоник пероксид супримирају концентрацију HIF-1 $\alpha$  протеина у пролонгираном деловању, док се у краткотрајним излагањима може чак

запазити и његова повишена концентрација. Индукција продукције ROS-а доводи до супресије генске експресије HIF-1 $\alpha$  (Köhl и сар., 2006; Niecknig и сар., 2012). Још један битан регулаторни молекул HIF-1 $\alpha$  који спречава његову протеозомалну деградацију је азот моноксид. Снижење концентрације азот монооксида услед повишене концентрације реактивних врста кисеоника, доводи до јаког смањења акумулације HIF-1 $\alpha$  у ћелијама и то у дозно-зависном маниру (Köhl и сар., 2006). Третман хуманих цитотрофобласта у култури неуропептидом Y у нашем експерименту показао је битну улогу овог биопептида у индукцији оксидативног стреса. Неуропептид Y у обе коришћене концентрације доводи до повишених концентрација водоник пероксида и супероксид анјон радикала, а са друге стране се запажа статистички значајно снижење концентрације нитрита (индикатори азот монооксида), што сугерише да овакво ремећење оксидативно/антиоксидативног баланса у трофобластима у култури може бити узрок сниженом степену експресије HIF-1 $\alpha$  који се запажа у овим ћелијама. Будући да је наша студија показала да концентрација неуропептида Y од 1 nM остварује значајне антимигранторне ефекте на хуманим трофобластима у култури, можемо претпоставити да је један од механизма којима се овакав ефекат постиже бар делом посредован снижавањем степена експресије HIF-1 $\alpha$ , које може да буде проузроковано индукцијом оксидативног стреса у овим ћелијама од стране неуропептида Y аплицираног у његовим патолошким концентрацијама.

И имуноцитохемијске анализе показују снижену заступљеност HIF-1 $\alpha$  протеина у цитоплазми трофобласта, што је додатни доказ да неуропептид Y супримира овај транскрипциони фактор у хуманим трофобластима у култури.

Васкуларни ендотелијални фактор раста (енг. *vascular endothelial growth factor* – VEGF) је хомодимерни гликопротеин који је селективни митоген за ендотелијалне ћелије, који игра важну улогу у ангиогенези, регулацији микроваскуларне пермеабилности и вазодилатацији (Kingdom и Kaufmann, 1999; Favier и Corvol, 2000; Kingdom и сар., 2000). VEGF је укључен и у ремоделовање судова и ангиогенезу која се одиграва током раста плаценте (Shore и сар., 1997; Ahmed и сар., 2000). Поред добро познате функције у ангиогенези, VEGF има улогу и у регулацији трофобластне инвазије, пролиферације и диференцијације (Taylor и сар., 1997; Crocker и сар., 2001). Експресија гена за VEGF у цитотрофобластима након пролонгираног третмана (72 сата) неуропептидом Y показали су

да концентрација неуропептида Y од 1 nM доводи до статистички значајног снижавања експресије VEGF-a у поређењу са његовим нивоима измереним у контролним ћелијама.

Хипоксија је снажан стимулус који индукује експресију VEGF гена и такође стимулише стабилизацију VEGF информационе РНК (Taylor и сар., 1997). Велики број студија је показало присуство овог молекула у раним вилозним трофобластима првог триместра, као и у синциотиотрофобластима и екстравилозним трофобластима у касној плаценти. Продукција VEGF-a је показана такође и у културама трофобласта, где се његови нивои експресије мењају у одговору на различите стимулусе (Cheung, 1997; Chung и сар., 2000). Рани цитотрофобласти (првог триместра) показују више нивое експресије VEGF-a у односу на ове типове ћелија у каснијим фазама трудноће, а такође и синциотиотрофобласти који се гаје у хипоксичним условима након порођаја имају значајно више нивое у поређењу са контролним ћелијама (Cheung, 1997; Chung и сар., 2000; Lash и сар., 2002; Li и сар., 2015). Испитивања су показала снижене нивое VEGF-a у прееклампитичним плацентама у односу на здраве, док неке студије ову разлику не пријављују. Ипак сматра се да је VEGF снижен у плаценти трудница са поремећајима трудноће хипертензивног типа, као и да је степен смањења експресије у вези са степеном клиничке озбиљности поремећаја (Cooper и сар., 1996; Cheng и сар., 2001; Ranheim и сар., 2001; Sgambati и сар., 2004). Снижење нивоа експресије VEGF-a које се бележи у нашој студији показује да се антимигрантни ефекти овог биопептида остварују и променама концентрације овог молекула, највероватније путем снижавања експресије и заступљености HIF-1 $\alpha$  након инкубације са неуропептидом Y.

Још један ензим за који постоје подаци да може да има значајну улогу у регулацији миграције ћелија је циклооксигеназа. Постоје две форме циклооксигеназе: COX-1 и COX-2. Експресија COX-1, која генерише простагландин 1 (PTGS1), је конститутивна у већини ткива и укључена је у одржавање ткивне хомеостазе, док је експресија COX-2 (синтетише PTGS2) индукована различитим стимулусима, укључујући цитокине, факторе раста, проинфламаторне цитокине, хормоне, инфективне агенсе, митогене и хипоксију (Kniss 1999; Li и сар., 2014). Велики број студија показује да је експресија COX-2 повишена у неколико типова хуманих канцера, укључујући канцер дебелог црева, коже, јетре, дојке, плућа и јајника (Вае и сар. 2001, Shirahama и Sakakura 2001; Li и сар. 2004; Lee и сар. 2013), док инхибитори овог ензима значајно редукују прогресију неких тумора (Howe и

Dannenbergh, 2003). Улога циклооксигеназе 2 индикована је у инвазији и епителско-мезенхимској транзицији трофобласта, што указује да овај ензим може бити значајан фактор у регулацији миграције и диференцијације трофобласта (Zuo и сар., 2016), а подаци из литературе показују да простагландини стимулишу миграцију хуманих трофобласта првог семестра (Fosslien, 2000; Horita и сар., 2007). Нивои иРНК експресије СОХ-2 ензима добијени у нашој студији показују статистички значајно снижење количине транскрипта у третману неуропептидом Y у обе експерименталне концентрације, указујући на још један могући фактор регулације миграције у хуманим трофобластима. Пад експресије овог ензима може да буде проузрокован снижењем експресије HIF-1 $\alpha$ , што је у експериментима такође показано, или због смањене биодоступности азот монооксида.

Е-кадхерини представљају протеине ћелијске адхезије и припадају фамилији Ca<sup>2+</sup> зависних протеина. Интрацелуларни домен Е-кадхерина интерагује са актинским цитоскелетом преко бројних протеина, укључујући  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  катенин (Nakamura и сар., 2005). Промена степена експресије кадхерина, односно смањење количине ових протеина у ћелији у директној је вези са повећањем миграционог индекса трофобласта, док појачана индукција њихове експресије доводи до смањене покретљивости трофобласта (Irtegun и сар., 2016). Једна студија је показала да интерлеукин-1 (IL-1) снижава ниво експресије Е-кадхерина и доводи до пораста инвазивности трофобластних ћелија линије JEG-3 хуманог хориокарцинома, док је TGF- $\beta$ 1 посредована експресија Е-кадхерина повезана са смањеном инвазивношћу (Karmakar и Das, 2004). Иницијација метастаза приписује се великим делом епителско мезенхимској транзицији (EMT), процесу уз помоћ ког се туморске ћелије трансформишу у инвазивне, покретљиве и отпорне ћелије (Zeisberg и Neilson, 2009). Епителско-мезенхимска транзиција се карактерише снижавањем експресије епителијалних маркера, нарочито Е-кадхерина, као и појачаном експресијом мезенхимских маркера, нарочито виментина и фибронектина (Hollier и сар., 2009). Снижавање нивоа експресије Е-кадхерина је детектован у трофобластима који задобијају инвазивни фенотип (Floridon, 2000). Вилозни цитотрофобласти подлежу делимичној епителско-мезенхимској транзицији када се диференцирају у екстравилозне цитотрофобласте и задобијају миграциони и инвазивни капацитет (Davies и сар., 2016). Имуноцитохемијске анализе спроведене у нашој студији показале су повишену протеинску експресију Е-кадхерина у третману неуропептидом Y концентрације 1 nM, што је још један параметар који показује да неуропептид Y индукује редукцију трофобластне покретљивости.

---

## **6. Закључци**



На основу експерименталних резултата истраживања ефеката које неуропептид Y изазива својом физиолошком и патолошком концентрацијом на вијабилност, пролиферативни капацитет, апоптотски индекс, оксидативни статус, миграциони потенцијал и инвазиони капацитет хуманих трофобласта линије JEG-3 добијених током израде ове докторске дисертације, могу се извести следећи закључци:

- Неуропептид Y у концентрацији од 0,1 pmol/L повећава вијабилност хуманих трофобласта током краткотрајног (24 сата) и дуготрајног третмана (72 сата), што указује да може имати улогу метаболичког регулатора хуманих трофобласта у својим физиолошким концентрацијама. Овакав ефекат може да буде значајан за функционисање трофобласта у условима снижених концентрација кисеоника какви владају у раним фазама трудноће.
- Неуропептид Y у концентрацији од 1 pmol/L не индукује значајне промене вијабилности хуманих трофобласта током краткотрајног (24 сата) и дуготрајног третмана (72 сата), што, узимајући у обзир предходно наведени резултат, може да буде сигнал ремећења оксидо–редукционих процеса у митохондријалном ланцу респирације услед појачане продукције реактивних врста кисеоника која се запажају при аплицирању ове концентрације неуропептида Y.
- Пролиферативни индекс хуманих трофобласта је повишен под деловањем неуропептида Y у обе испитиване концентрације, сугеришући на његов значајан допринос у индукцији пролиферације трофобласта у колонама плаценталних ресица током имплантације и формирања плаценте.
- Ниво апоптозе трофобласта након краткотрајног (24 сата) и дуготрајног третмана (72 сата) неуропептидом Y у обе испитиване концентрације је значајно снижен у односу на вредности у контролним ћелијама, што указује да неуропептид Y промовише преживљавање трофобласта линије JEG-3, односно да остварује протективне ефекте на преживљавање ових ћелија.

- Промене концентрација параметара оксидативног / антиоксидативног статуса у трофобластним ћелијама су много израженије након третмана патолошком концентрацијом неуропептида Y у поређењу са променама које се региструју након третмана физиолошком концентрацијом. Након третмана физиолошком концентрацијом NPY-а региструје се само статистички значајан пораст концентрације водоник пероксида ( $H_2O_2$ ), вероватно као последица стимулације митохондријалних редуктаза, а што је у вези са повишеном вијабилношћу трофобласта након третмана концентрацијом од 0,1 nM NPY. Концентрација од 1 pmol/L NPY-а доводи до много интензивнијег пораста концентрација супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) и водоник пероксида ( $H_2O_2$ ), што указује да у овој концентрацији долази до индукције значајног оксидативног стреса. Такође се региструје и снажно опадање концентрације азот монооксида (NO), што може да буде последица појачаног присуства реактивних врста кисеоника након третмана неуропептидом Y у овој концентрацији.
- Концентрације неензимских параметара антиоксидативне заштите (GSH и GSSG) се мењају у таквом тренду да указују на значајан антиоксидативни потенцијал хуманих цитотрофобласта, што је очекивано имајући у виду њихове карактеристике матичних ћелија.
- Неуропептид Y у концентрацији од 1 pmol/L изазива значајно редуковање миграционог потенцијала трофобласта, док његове физиолошке концентрације не показују ефекат на њихове промене у односу на индекс контролних ћелија. Ови резултати показују да је повишена концентрација NPY битан негативни регулатор миграционог капацитета трофобласта и да у одређеним патолошким стањима може да буде један од фактора ризика поремећаја имплантације и плацентације.
- Имуноцитохемијске анализе показале су присуство рецептора Y<sub>2</sub> рецептора за неуропептид Y на мембрани хуманих цитотрофобласта линије JEG-3, што представља додатну потврду постојања рецептора за овај биоактивни пептид, поред већ познатог присуства Y<sub>1</sub> и Y<sub>3</sub> рецептора.

- Имуноцитохемијске анализе су показале повишену количину Е-кадхерина у трофобластима третираним неуропептидом Y у концентрацији од 1 pmol/L, што представља још један показатељ који иде у прилог хипотези да патолошка концентрација NPY доводи до значајног смањења миграторног потенцијала хуманих трофобласта у култури. Значајне количинске промене Е-кадхерина нису запажене након третмана ових ћелија физиолошком концентрацијом NPY.
- Протеинска квантификација екстрацелуларне фракције металопротеиназе 9 (ММП-9) након дуготрајног третмана (72 сата) неуропептидом Y у концентрацији од 1 pmol/L показала је смањењу активност овог ензима у поређењу са контролом, што указује да се ефекат на смањену инвазивност трофобласта остварује и путем регулације ослобађања металопротеиназе 9. Неуропептид Y такође доводи и до снижавања експресије гена за ММП-9, тако да се може закључити да се његов ефекат значајно испољава и на транскрипционом нивоу регулације.
- Експресиони нивои гена за индуцибилну синтазу азот монооксида (iNOS), као и његова количина у цитоплазми су такође смањени под деловањем NPY у концентрацији од 1 pmol/L, па је интензивно смањење биодоступности азот монооксида узроковано, поред интеракције са супероксид анјон радикалом и његовом сниженом *de novo* продукцијом.
- Мерење нивоа експресије гена за индуцибилни фактор хипоксије (HIF-1 $\alpha$ ) указује да неуропептид Y вероватно има ефекат и на потенцијал адаптације на хипоксичне услове који владају у плаценталном ткиву у ранијим ступњевима трудноће. Експресиони нивои гена за HIF-1 $\alpha$  су снижени након оба временска третмана неуропептидом Y у концентрацији од 1 pmol/L у односу на контролне вредности, па се може закључити да овај биоактивни пептид смањује способност трофобласта да се путем овог транскрипционог фактора прилагоде хипоксичним условима, што је значајан фактор у одржавању нивоа њиховог метаболизма у условима снижене концентрације кисеоника.

- Нивои експресије гена који могу да буду укључени у регулацију миграционих и инвазионих способности трофобласта мерени у овој студији (COX-2 и VEGF) су такође снижени у поређењу са контролним вредностима, након третмана неуропептидом Y у концентрацији од 1 nmol/L, вероватно имплицирајући различите сигналне путеве које овај биоактивни пептид може да погоди током његове регулације покретљивости трофобласта, аплициран у концентрацијама карактеристичним за нека патолошка стања трудноће.

## ОПШТИ ЗАКЉУЧАК

Експериментални подаци добијени током ове студије показали су да неуропептид Y аплициран у физиолошкој (0,1 nmol/L) и патолошкој (1 nmol/L) концентрацији остварује различите ефекте на параметре оксидативног / антиоксидативног метаболизма, миграције, као и на вијабилност, апоптотски индекс и пролиферативну способност хуманих трофобласта линије JEG-3. Најзначајнији ефекат физиолошке концентрације неуропептида Y је повећавање вијабилности трофобласта, што указује на значајан допринос одржавању нивоа оксидативног метаболизма у трофобласима који природно функционишу у стању хипоксије. Физиолошка концентрација неуропептида Y не индукује значајан оксидативни стрес, указујући да трофобласти при овој концентрацији ефикасно могу неутралисати продукте повишене активности митохондријалног ланца респирације. Неуропептид Y аплициран у концентрацији од 0,1 nmol/L показује протективан ефекат на преживљавање трофобласта, као и значајан пролиферативан ефекат. Ови подаци указују да NPY у физиолошким концентрацијама може имати допринос у остваривању функција трофобласта неопходних за оптималну имплантацију и плацентацију.

Патолошке концентрације неуропептида  $\Upsilon$  доводе до индукције снажног оксидативног стреса, као и до значајног смањења миграционих способности трофобласта. Смањење миграционог индекса трофобласта корелира са сниженом биодоступношћу азот монооксида, што је последица његове интеракције са продуктима оксидативног стреса, као и са снижењем експресије и количинске заступљености iNOS ензима. Неуропептид  $\Upsilon$  такође индукује повишење количине Е-кадхерина и снижење експресије гена потенцијално укључених у стимулацију трофобластне миграције. Количина металопротеиназе 9 (ММП-9), параметра инвазионог потенцијала ћелија, као и ниво њене генске експресије значајно је снижен у односу на контролне ћелија након третмана патолошком концентрацијом NPY. Наведени резултати имплицирају да повишена концентрација NPY која се региструје у неким патолошким формама трудноће повезаних са смањеном или недовољно интензивном миграцијом и инвазијом трофобласта, може да буде један од значајних фактора који доприноси редукцији трофобластне миграције.

Ова докторска дисертација представља допринос бољем разумевању механизма регулације миграције трофобластних ћелија, која је есенцијална за оптимално формирање плаценте, исхрану ембриона и успешан порођај.

---

## **7. Литература**

1. Acuna-Goycolea C, Tamamaki N, Yanagawa Y, Obata K, van den Pol AN. Mechanisms of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus. *J Neurosci* 2005; 25: 7406–7419.
2. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(1): 55–63.
3. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen—a review. *Placenta* 2000; 21(Suppl A): S16–S24.
4. Alblas J, Slager-Davidov R, Steenbergh PH, Sussenbach JS, van der Burg B. The role of MAP kinase in TPA-mediated cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Oncogene* 1998; 16(1): 131–139.
5. Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, et al. The Concise Guide To Pharmacology 2013/14: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology* 2013; 170(8): 1459–1581.
6. Ananthkrishnan Revathi, Allen Ehrlicher. The Forces Behind Cell Movement. *Int J Biol Sci* 2007; 3(5): 303–317.
7. Aplin JD, Lacey H, Haigh T, Jones CJ, Chen CP, Westwood M. Growth factor-extracellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 199–202.
8. Aplin JD. Developmental cell biology of human villous-trophoblast: current research problems. *Int J Dev Biol* 2010; 54: 323–329.
9. Aplin AE, Howe AK, Juliano RL. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(6): 737–744.
10. Aplin JD. Expression of integrin alpha 6 beta 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta* 1993; 14(2): 203–215.
11. Aplin JD. MUC-1 glycosylation in endometrium: possible roles of the apical glycocalyx at implantation. *Hum Reprod* 1999; 14(Suppl 2): 17–25.
12. Apps R, Sharkey A, Gardner L, Male V, Trotter M, Miller N, North R, Founds S, Moffett A. Genome-wide expression profile of first trimester villous and extravillous human trophoblast cells. *Placenta* 2011; 32: 33–43.
13. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 2014; 5: 196.
14. Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN, Cartwright JE. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(1): 102–108.
15. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. 2 CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton, Florida, USA: 3 CRC Press, pp. 123–132.

16. Babawale MO, Van Noorden S, Pignatelli M, Stamp GW, Elder MG, Sullivan MH. Morphological interactions of human first trimester placental villi co-cultured with decidual explants. *Hum Reprod* 1996; 11: 444–450.
17. Baczyk D, Drewlo S, Proctor L, Dunk C, Lye S, Kingdom J. Glial cell missing-1 transcription factor is required for the differentiation of the human trophoblast. *Cell Death Differ* 2009; 16: 719–727.
18. Bae SH, Jung ES, Park YM, Kim BS, Kim BK, Kim DG, Ryu WS. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398. *Clin Cancer Res* 2001; 7(5): 1410–1418.
19. Baker D, Wuestehube L, Schekman R, Botstein D, Segev N. GTP-binding Ypt1 protein and Ca<sup>2+</sup> function independently in a cell-free protein transport reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(1): 355–359.
20. Ballatori N. Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Adv Pharmacol* 1994; 27: 271–298.
21. Bansal AS, Bora SA, Saso S, Smith JR, Johnson MR, Thum MY. Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol* 2012; 8: 747–753.
22. Baraban SC, Hollopeter G, Erickson JC, Schwartzkroin PA, Palmiter RD. Knock-out mice reveal a critical antiepileptic role for neuropeptide Y. *J Neurosci* 1997; 17(23): 8927–8936.
23. Bedoui S, Kromer A, Gebhardt T, Jacobs R, Raber K, Dimitrijevic M, Heine J, Von Horsten S. Neuropeptide Y receptors specifically modulates human neutrophil function. *J Neuroimmunol* 2008; 195(1-2): 88–95.
24. Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1989; 108: 2435–2447.
25. Berg G, Nollet P, van Roy F. Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes Commun* 1998; 6: 171–184.
26. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 1995; 14: 6107–6115.
27. Beutler E (1975). Reduced Glutathione (GSH). In: Beutler E, editor. *Red Cell 14 Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. 7th ed. New York, NY, USA: Grune 15 and Stratton, pp. 112–114.
28. Biadasiewicz K, Sonderegger S, Haslinger P, Haider S, Saleh L, Fiala C, Pollheimer J, Knöfler M. Transcription factor AP-2 $\alpha$  promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast. *Endocrinology* 2011; 152: 1458–1469.
29. Bilban M, Tauber S, Haslinger P, Pollheimer J, Saleh L, Pehamberger H, Wagner O, Knöfler M. Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures. *Placenta* 2010; 31: 989–996.
30. Birchmeier W. Molecular aspects of the loss of cell adhesion and gain of invasiveness in carcinomas. *Princess Takamatsu Symp* 1994; 24: 214–232.



31. Bischof P, Martelli M, Campana A. La regulation des metalloproteinases endometriales et trophoblastiques lors de l'implantation du blastocyst. *Contracept Fertil Sex* 1994; 22: 48–52.
32. Bischof P, Meisser A, Campana A Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review. *Placenta* 2000; 21(Suppl A): S55–60.
33. Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1755(1): 37–69.
34. Bove PF, Wesley UV, Greul AK, Hristova M, Dostmann WR, van der Vliet A. Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(2): 138–146.
35. Breault JE, Shiina H, Igawa M, Ribeiro-Filho LA, Deguchi M, Enokida H, Urakami S, Terashima M, Nakagawa M, Kane CJ, Carroll PR, Dahiya R. Methylation of the gamma-catenin gene is associated with poor prognosis of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 557–564.
36. Bromage SJ, Lang AK, Atkinson I, Searle RF. Abnormal TGFbeta levels in the amniotic fluid of Down syndrome pregnancies. *Am J Reprod Immunol.* 2000; 44(4): 205–210.
37. Bromée T, Sjödin P, Fredriksson R, Boswell T, Larsson TA, Salaneck E, Zoorob R, Mohell N, Larhammar D. Neuropeptide Y-family receptors Y6 and Y7 in chicken. Cloning, pharmacological characterization, tissue distribution and conserved synteny with human chromosome region. *FEBS J* 2006; 273(9): 2048–2063.
38. Brothers SP, Wahlestedt C. Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. *EMBO Mol Med* 2010; 2(11): 429–439.
39. Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14: 1–18.
40. Bryan NS, Grisham M. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(5): 645–657.
41. Bulmer JN, Williams PJ, Lash, GE. Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol* 2010; 54: 281–294.
42. Burrows TD, King A, Loke YW. Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin. *Hum Reprod* 1993; 8(3): 475–484.
43. Burrows TD, King A, Smith SK, Loke YW. Human trophoblast adhesion to matrix proteins: inhibition and signal transduction. *Hum Reprod* 1995; 10(9): 2489–2500.
44. Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta* 2007; 28(Suppl. A): S64–S69.
45. Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. The influence of the intra uterine environment on human placental development. *Int J Dev Biol* 2010; 54: 303–312.
46. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8(10): 766–775.

47. Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF- $\beta$  3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest* 1999; 103: 1641–1650.
48. Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF beta(3). *J Clin Invest* 2000; 105(5): 577–587.
49. Cartwright JE, Balarajah G. Trophoblast interactions with endothelial cells are increased by interleukin-1beta and tumour necrosis factor alpha and involve vascular cell adhesion molecule-1 and alpha4beta1. *Exp Cell Res* 2005; 304(1): 328–336.
50. Cartwright JE, Holden DP, Whitley GSJ. Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1999; 128(1): 181–189.
51. Chaddha V, Viero S, Huppertz B, Kingdom J. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med* 2004; 9(5): 357–369.
52. Cheeseman K, Rouleau E, Vannier A, Thomas A, Briaux A, Lefol C, Walrafen P, Bensimon A, Lidereau R, Conseiller E, Ceppi M. A diagnostic genetic test for the physical mapping of germline rearrangements in the susceptibility breast cancer genes BRCA1 and BRCA2. A diagnostic genetic test for the physical mapping of germline rearrangements in the susceptibility breast cancer genes BRCA1 and BRCA2. *Hum Mutat* 2012; 33(6): 998–1009.
53. Chen HC. Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol* 2005; 294: 15–22.
54. Chen Q, Zhang Y, Peng H, Lei L, Kuang H, Zhang L, Ning L, Cao Y, Duan E. Transient [beta]2-adrenoceptor activation confers pregnancy loss by disrupting embryo spacing at implantation. *J Biol Chem* 2011; 286(6): 4349–4356.
55. Chen Y, Junger WG. Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils. *Methods Mol Biol* 2012; 844: 115–124.
56. Chen Y, Khoo SK, Leach R, Wang K. MTA3 Regulates Extravillous Trophoblast Invasion Through NuRD Complex. *AIMS Med Sci* 2017; 4(1): 17–27.
57. Cheng CW, Wu PE, Yu JC, Huang CS, Yue CT, Wu CW, Shen CY. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 2001; 20: 3814–3823.
58. Cheng Z, Lin Q, Shen Z. Study on association of vascular endothelial growth factor with the pathogenesis of pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chaan Ke Za Zhi* 2001; 36(2): 72–75.
59. Cheng X, Yang Y, Fan Z, Yu L, Bai H, Zhou B, Wu X, Xu H, Fang M, Shen A, Chen Q, Xu Y. MKL1 potentiates lung cancer cell migration and invasion by epigenetically activating MMP9 transcription. *Oncogene* 2015; 34(44): 5570–5581.
60. Cheung A, Newland PL, Zaben M, Attard GS, Gray WP. Intracellular nitric oxide mediates neuroproliferative effect of neuropeptide y on postnatal hippocampal precursor cells. *J Biol Chem* 2012; 287(24): 20187–20196.

61. Cheung CY. Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function. *J Soc Gynecol Invest* 1997; 4(4): 169–177.
62. Chigaev A, Smagley Y, Sklar LA. Nitric oxide/cGMP pathway signaling actively down-regulates  $\alpha_4\beta_1$ -integrin affinity: an unexpected mechanism for inducing cell de-adhesion. *BMC Immunol* 2011; 12: 28.
63. Cho YR, Kim CW. Neuropeptide Y promotes  $\beta$ -cell replication via extracellular signal-regulated kinase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(3): 773–780.
64. Choi HJ, Eun JS, Kim BG, Kim SY, Jeon H, Soh Y. Vitexin, an HIF-1 $\alpha$  inhibitor, has anti-metastatic potential in PC12 cells. *Mol Cells* 2006; 22(3): 291–299.
65. Choi JH, Lee YB, Jung J, Hwang SG, Oh IH, Kim GJ. Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Regulates the Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via Integrin  $\alpha_4$ . *Stem Cells Int* 2016; Article ID 7932185, 11 pages.
66. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156–159.
67. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule Ecadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 73–76.
68. Chung BY, Choi SR, Moon IJ, Park CW, Kim YH, Chang SE. The glutathione derivative, GSH monoethyl ester, may effectively whiten skin but GSH does not. *Int J Mol Sci* 2016; 17(5): 629.
69. Chung IB, Yelian FD, Zaher FM, Gonik B, Evans MI, Diamond MP, Svinarich DM. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in a first trimester trophoblast cell line. *Placenta* 2000; 21(4): 320–324.
70. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268(5208): 233–239.
71. Cockburn K, Rossant J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest* 2010; 120(4): 995–1003.
72. Cohen M, Reale V, Olofsson B, Knights A, Evans P, de Bono M. Coordinated regulation of foraging and metabolism in *C. elegans* by RFamide neuropeptide signaling. *Cell Metab* 2009; 9(4): 375–385.
73. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 339–355.
74. Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Palmer CR, Smith SK. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103(12): 1191–1196.
75. Coutifaris C, Kao LC, Sehdev HM, Chin U, Babalola GO, Blaschuk OW, Strauss JF. E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Development* 1991; 113: 767–777.
76. Cowden Dahl KD, Robertson SE, Weaver VM, Simon MC. Hypoxia-inducible factor regulates  $\alpha_3\beta_1$  integrin cell surface expression. *Mol Biol Cell* 2005; 16(4): 1901–1912.

77. Crocker IP, Strachan BK, Lash GE, Cooper S, Warren AY, Baker PN. Vascular endothelial growth factor but not placental growth factor promotes trophoblast syncytialization in vitro. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8(6): 341–346.
78. Crocker IP, Cooper S, Ong SC, Baker PN. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol* 2003; 162(2): 637–643.
79. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994; 266(5190): 1508–1518.
80. Curtis Hewitt S, Goulding EH, Eddy EM, Korach KS. Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod* 2002; 67(4): 1268–1277.
81. Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 1994; 120: 3657–3666.
82. Damsky C, Tremble P, Werb Z. Signal transduction via the fibronectin receptor: do integrins regulate matrix remodeling? *Matrix Suppl* 1992a; 1: 184–191.
83. Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, *in vivo*. *J Clin Invest* 1992b; 89(1): 210–222.
84. Davies JE, Pollheimer J, Yong HEJ, Kokkinos MI, Kalionis B, Knöfler M, Murthi P. Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation. *Cell Adh Migr* 2016; 10(3): 310–321.
85. Day BJ. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochem Pharmacol* 2009; 77(3): 285–296.
86. Decressac M, Barker RA. Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair. *Exp Neurol* 2012; 238(2): 265–272.
87. De Marco CS, Caniggia I. Mechanisms of oxygen sensing in human trophoblast cells. *Placenta* 2002; 23(Suppl A): S58–68.
88. De Morrow S, Onori P, Venter J, Invernizzi P, Frampton G, White M, Franchitto A, Kopriva S, Bernuzzi F, Francis H, Coufal M, Glaser S, Fava G, Meng F, Alvaro D, Carpino G, Gaudio E, Alpini G. Neuropeptide Y inhibits cholangiocarcinoma cell growth and invasion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300(5): 1078–1089.
89. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(1): 9–34.
90. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004; 25: 341–373.
91. Di Federico E, Genbacev O, Fisher SJ. Fisher Preeclampsia Is Associated with Widespread Apoptosis of Placental Cytotrophoblasts within the Uterine Wall. *Am J Pathol* 1999; 155(1): 293–301.

92. Dimitriadis E, Stoikos C, Baca M, Fairlie WD, McCoubrie JE, Salamonsen LA. Relaxin and prostaglandin E(2) regulate interleukin 11 during human endometrial stromal cell decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3458–3465.
93. Dimitrijevic M, Stanojevic S, Vujic V, Beck-Sickinger A, Von Horsten S. Neuropeptide Y and its receptor subtypes specifically modulate rat peritoneal macrophage functions *in vitro*: counter regulation through Y1 and Y2/5 receptors. *Regul Pept* 2005; 124(1-3): 163–172.
94. Ding Y, Choi KJ, Kim JH, et al. Endogenous hydrogen peroxide regulates glutathione redox via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 downstream of phosphatidylinositol 3-kinase during muscle differentiation. *Am J Pathol* 2008; 172: 1529–1541.
95. Dubinsky V, Poehlmann TG, Suman P, Gentile T, Markert UR, Gutierrez G. Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63(3): 193–199.
96. Dumont Y, Jacques D, Bouchard P, Quirion R. Species differences in the expression and distribution of the neuropeptide Y Y1, Y2, Y4, and Y5 receptors in rodents, guinea pig, and primates brains. *J Comp Neurol* 1998; 402(3): 372–384.
97. Edmondson DE. Hydrogen peroxide produced by mitochondrial monoamine oxidase catalysis: biological implications. *Curr Pharm Des* 2014; 20(2): 155–160.
98. Egi K, Conrad NE, Kwan J, Schulze C, Schulz R, Wildhirt SM. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and superoxide production reduces matrix metalloproteinase-9 activity and restores coronary vasomotor function in rat cardiac allografts. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 26(2): 262–269.
99. Enders AC, Blankenship TN. Interstitial trophoblast cells: an enigmatic and variable component of the developing macaque placenta. *Placenta* 2012; 33(9): 672–676.
100. Eva C, Serra M, Mele P, Panzica G, Oberto A. Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. *Front Neuroendocrinol* 2006; 27(3): 308–339.
101. Fahlman CS, Bickler PE, Sullivan B, Gregory GA. Activation of the neuroprotective ERK signaling pathway by fructose-1,6-bisphosphate during hypoxia involves intracellular Ca<sup>2+</sup> and phospholipase C. *Brain Res* 2002; 958(1): 43–51.
102. Fanjul-Fernandez, M, Folgueras AR, Cabrera S, et al. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 3–19.
103. Farzi A, Reichmann F, Holzer P. The homeostatic role of neuropeptide Y in immune function and its impact on mood and behavior. *Acta Physiol (Oxf)* 2015; 213(3): 603–627.
104. Favier J, Corvol P. Physiological angiogenesis. *Therapie* 2000; 56(5): 455–463.
105. Ferenczy A, Bertrand G, Gelfand MM. Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 133(8): 859–867.
106. Ferreira R, Santos T, Viegas M, Cortes L, Bernardino L, Vieira OV, Malva JO. Neuropeptide Y inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced phagocytosis by microglial cells. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 169.

107. Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Human Reproduction Update* 2007, 13: 121–141.
108. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003; 10(1): 76–100.
109. Florian Reichmann and Peter Holzer. Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides* 2016; 55: 99–109.
110. Floridon C, Nielsen O, Holund B, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, Teisner B. Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblasts during intrauterine, ectopic and molar pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 943–950.
111. Forbes K, Westwood M, Baker PN, Aplin JD. Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblastin the developing human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C1313–C1322.
112. Fosslien E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000; 37(5): 431–502.
113. Frank GR, Brar AK, Cedars MI and Handwerger S. Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* 1994; 134: 258–263.
114. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques, Alan R. Liss, Inc New York, 1983.
115. Fu X, Kao JL, Bergt C, Kassim SY, Huq NP, d'Avignon A, Parks WC, Mecham RP, Heinecke JW. Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. *J Biol Chem* 2004; 279: 6209–6212.
116. Galan A, O'Connor JE, Valbuena D, Herrer R, Remohi J, Pampfer S, Pellicer A, Simon C. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *Biol Reprod* 2000; 63(2): 430–439.
117. Genbacev O, DiFederico E, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast factors with angiogenic potential are activated by hypoxia. *Hum Reprod* 1999; 14(Suppl 2): 59–66.
118. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997; 277:1669–1672.
119. Giordano D, Magaletti DM, Clark EA. Nitric oxide and cGMP protein kinase (cGK) regulate dendritic-cell migration toward the lymph-node-directing chemokine CCL19. *Blood* 2006; 107(4): 1537–1545.
120. Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shaley E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(6): 367–373.
121. Gonçalves J, Ribeiro CF, Malva JO, Silva AP. Protective role of neuropeptide Y Y<sub>2</sub> receptors in cell death and microglial response following methamphetamine injury. *Eur J Neurosci* 2012; 36(9): 3173–3183.

122. Gong LL, Liu H, Liu LH. Lack of association between matrix metalloproteinase-9 gene-1562C/T polymorphism and preeclampsia: a meta-analysis. *Hypertens Pregnancy* 2014; 33(4): 389–394.
123. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 11 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126(1): 131–138.
124. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86(5): 494–501.
125. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002; 297(5584): 1186–1190.
126. Gupta AK, Rusterholz C, Huppertz B, Malek A, Schneider H, Holzgreve W, Hahn S. A comparative study of the effect of three different syncytiotrophoblast micro-particles preparations on endothelial cells. *Placenta* 2005; 26(1): 59–66.
127. Gupton SL, Gertler FB. Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci STKE*. 2007; 2007(400): re5.
128. Haider S, Knöfler M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* 2009; 30: 111–123.
129. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Oxford University Press Inc. 2007.
130. Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 2004; 13(19): 2263–2278.
131. Hambartsoumian E, Srivastava RK, Seibel MM. Differential expression and regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in human trophoblasts in vitro. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45(2): 78–85.
132. Hancock J.T., R. Desikan, S.J. Neill. Role of Reactive Oxygen Species in Cell Signaling Pathways. *Biochem Soc Trans* 2001; 29(2): 345–350.
133. Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T. Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: Comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 2007; 28: 175–184.
134. Haouzi D, Dechaud H, Assou S, Monzo C, de Vos J, Hamamah S. Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophoblast and endometrial cells during the implantation period. *Hum Reprod* 2011; 26(6): 1440–1449.
135. Harris LK. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta* 2010; 31(Suppl): S93–S98.
136. Harris LK. IFPA Gabor than award lecture: Transformation of the spiral arteries in human pregnancy: key events in the remodelling timeline. *Placenta* 2011; 32(Suppl 2): S154–S158.

137. Harris LK, McCormick J, Cartwright JE, Whitley GS, Dash PR. S-nitrosylation of proteins at the leading edge of migrating trophoblasts by inducible nitric oxide synthase promotes trophoblast invasion. *Exp Cell Res* 2008; 314(8): 1765–1776.
138. Harun R, Ruban L, Matin M, Draper J, Jenkins NM, Liew GC, Andrews PW, Li TC, Laird SM, Moore HD. Cytotrophoblast stem cell lines derived from human embryonic stem cells and their capacity to mimic invasive implantation events. *Hum Reprod* 2006; 21(6): 1349–1358.
139. Havens CG, Ho A, Yoshioka N, Dowdy SF. Regulation of late G1/S phase transition and APC Cdh1 by reactive oxygen species. *Mol Cell Biol* 2006; 26(12): 4701–4711.
140. Heilig M. The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides* 2004; 38(4): 213–224.
141. Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massagué J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem* 1989; 264(1): 380–388.
142. Hensley K, Floyd RA. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Arch Biochem and Biophys* 2002; 397(2): 377–383.
143. Hiby SE, Walker JJ, O’shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004; 200: 957–965.
144. Higuchi KH, Nakano T, Tsuboi A, Suzuki Y, Ohno T, Oka K. Flow cytometric and Ki-67 immunohistochemical analysis of cell cycle distribution of cervical cancer during radiation therapy. *Anticancer Res* 2001; 21(4A): 2511–2518.
145. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998; 153(2): 333–339.
146. Hirsch D, Zukowska Z. NPY and stress 30 years later: the peripheral view. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32(5): 645–659.
147. Hoffman DL, Brookes PS. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *J Biol Chem* 2009; 284: 16236–16245.
148. Hole PS, Pearn L, Tonks AJ, James PE, Burnett AK, Darley RL, Tonks A. Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2010; 115(6): 1238–1246.
149. Hollier BG, Evans K, Mani SA. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; 14(1): 29–43.
150. Horita H, Kuroda E, Hachisuga T, Kashimura M, Yamashita U. Induction of prostaglandin E2 production by leukemia inhibitory factor promotes migration of first trimester extravillous trophoblast cell line, HTR-8/SVneo. *Hum Reprod* 2007; 22(7): 1801–1809.
151. Hörsten S, Hoffmann T, Alfalah M, Wrann CD, Karl T, Pabst R, Bedoui S. In: PP, PYY and NPY: synthesis, storage, release and degradation. Neuropeptide Y and related peptides. Michel MC, editor. Berlin: Springer; 2004. pp. 23–44.



152. Howe LR, Dannenberg AJ. COX-2 inhibitors for the prevention of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 31–43.
153. Howell OW, Doyle K, Goodman JH, Scharfman HE, Herzog H, Pringle A, Beck-Sickinger AG, Gray WP. Neuropeptide Y stimulates neuronal precursor proliferation in the post-natal and adult dentate gyrus. *J Neurochem* 2005; 93(3): 560-570
154. Howell OW, Scharfman HE, Herzog H, Sundstrom LE, Beck-Sickinger A, Gray WP. Neuropeptide Y is neuroproliferative for post-natal hippocampal precursor cells. *J Neurochem* 2003; 86(3): 646–659.
155. Howell OW, Silva S, Scharfman HE, Sosunov AA, Zaben M, Shtaya A, McKhann G, Herzog H, Laskowski A, Gray WP. Neuropeptide Y is important for basal and seizure-induced precursor cell proliferation in the hippocampus. *Neurobiol Dis* 2007; 26(1): 174–188.
156. Hu L, Plafker K, Henthorn J, Ceresa BP. A non-invasive technique for quantifying and isolating fused cells. *Cytotechnology* 2008; 58(3): 113–118.
157. Hung TH, Skepper JN, Charnok-Jones DS, Burton GJ. Hypoxia-reoxygenation: A potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res* 2002; 90: 1274–1281.
158. Hynes RO. The impact of molecular biology on models for cell adhesion. *Bioessays* 1994; 16(9): 663–669.
159. Iiyama M, Kakihana K, Kurosu T, Miura O. Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression. *Cell Signal* 2006; 18(2): 174–182.
160. İrtegun S, Tekin MA, Alpaycı R. Increased Expression of E-cadherin, Endothelin-1, and CD68 in Preeclamptic Placentas. *Erciyes Med J* 2016; 38(4): 149–152.
161. Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, Suzuki Y, Li YF, Takayama M. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 2003; 24(1): 53–64.
162. Isaka K, Nishi H, Nakai H, Nakada T, Feng Li Y, Ebihara Y, Takayama M. Matrix metalloproteinase-26 is expressed in human endometrium but not in endometrial carcinoma. *Cancer* 2003; 97(1): 79–89.
163. Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186(1): 158–166.
164. Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 2001; 20: 4782–4793.
165. Iwashita M. Characterization of Morphological and Cytoskeletal Changes in Trophoblast Cells Induced by Insulin-Like Growth Factor-I. *J Clinical Endoc & Metabolism* 2002; 87(12): 5751–5759.

166. Jaffe AB, Hall A. Rho GTP-ases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 247–269.
167. Janatpour MJ, McMaster MT, Genbacev O, Zhou Y, Dong J, Cross JC, Israel MA, Fisher SJ. Id-2 regulates critical aspects of humancy trophoblast differentiation, invasion and migration. *Development* 2000; 127: 549–558.
168. Jeppsson S, Srinivasan S, Chandrasekharan B. Neuropeptide Y (NPY) promotes inflammation-induced tumorigenesis by enhancing epithelial cell proliferation. *Am J Physiol* 2017; 312(2): 103–111.
169. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 2002; 20: 85–93.
170. Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002; 143(6): 2119–2138.
171. Karagiannis A, Gallopin T, Dávid C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B. Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J Neurosci* 2009; 29(11): 3642–3659.
172. Karmakar S, Das C. Modulation of ezrin and E-cadherin expression by IL-1beta and TGF-beta1 in human trophoblasts. *J Reprod Immunol* 2004; 64(1-2): 9–29.
173. Kask A, Harro J, von Hörsten S, Redrobe JP, Dumont Y, Quirion R. The neurocircuitry and receptor subtypes mediating anxiolytic-like effects of neuropeptide Y. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26(3): 259–283.
174. Kassim SY, Fu X, Liles WC, Shapiro SD, Parks WC, Heinecke JW. NADPH oxidase restrains the matrix metalloproteinase activity of macrophages. *J Biol Chem* 2005; 280(34): 30201–30205.
175. Kastin AJ, Akerstrom V. Nonsaturable entry of neuropeptide Y into brain. *Am J Physiol* 1999; 276(3 Pt 1): E479–E482.
176. Kharfi A, Giguère Y, Sapin V, Massé J, Dastugue B, Forest JC. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clin Biochem* 2003; 36(5): 323–331.
177. Khatun S, Kanayama N, Belayet HM, Bhuiyan AB, Jahan S, Begum, A, Kobayashi T, Terao T. Increased concentrations of plasma neuropeptide Y in patients with eclampsia and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182(4): 896–900.
178. King A, Loke YW. The influence of the maternal uterine immune response on placentation in human subjects. *Proc Nutr Soc* 1999; 58(1): 69–73.
179. Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92(1): 35–43.
180. Kingdom JC, Kaufmann P. Oxygen and placental vascular development. *Adv Exp Med Biol* 1999; 474: 259–275.
181. Kniss DA. Cyclooxygenases in reproductive medicine and biology. *J Soc Gynecol Investig* 1999; 6(6): 285–292.

182. Knöfler M, Pollheimer J. IFPA Award in Placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion. *Placenta* 2012; 33(Suppl): S55–S62.
183. Knöfler M, Pollheimer J. Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet* 2013; 4: 190.
184. Knöfler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol* 2010; 54: 269–280.
185. Kobayashi CI, Suda T. Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. *J Cell Physiol* 2012; 227(2): 421–430.
186. Koepke J, Dresel M, Schmid S, Greulich T, Beutel B, Schmeck B, Vogelmeier CF, Janciauskiene S, Koczulla AR. Therapy with plasma purified alpha1-antitrypsin (Prolastin®) induces time-dependent changes in plasma levels of MMP-9 and MPO. *PLoS One* 2015; 10(1): e0117497.
187. Köhl R, Zhou J, Brüne B. Reactive oxygen species attenuate nitric-oxide-mediated hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(8): 1430–1442.
188. Kondo T, Yoshida K, Urata Y, Goto S, Gasa S, Taniguchi N.  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase and active transport of glutathione S-conjugate are responsive to heat shock in K562 erythroid cells. *J Biol Chem* 1993; 268(27): 20366–20372.
189. Kopp J, Xu ZQ, Zhang X, Pedrazzini T, Herzog H, Kresse A, Wong H, Walsh JH, Hökfelt T. Expression of the neuropeptide Y Y1 receptor in the CNS of rat and of wild-type and Y1 receptor knock-out mice. Focus on immunohistochemical localization. *Neuroscience* 2002; 111(3): 443–532.
190. Korhonen M, Yläne J, Laitinen L, Cooper HM, Quaranta V, Virtanen I. Distribution of the alpha 1-alpha 6 integrin subunits in human developing and term placenta. *Lab Invest* 1991; 65(3): 347–356.
191. Krüssel JS, Bielfeld P, Polan ML, Simón C. Regulation of embryonic Implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110: S2–S9.
192. Lala PK, Chakraborty C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to preeclampsia and fetal injury. *Placenta* 2003; 24: 575–587.
193. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their wayhome?. *Blood* 2005; 106(6): 1901–1910.
194. Larsson LI, Bjerregaard B, Talts JF. Cell fusions in mammals. *Histochem Cell Biol* 2008; 129(5): 551–561.
195. Lash GE, Taylor CM, Trew AJ, Cooper S, Anthony FW, Wheeler T, Baker PN. Vascular endothelial growth factor and placental growth factor release in cultured trophoblast cells under different oxygen tensions. *Growth Factors* 2002; 20(4): 189–196.
196. Ledbetter TK, Paape MJ, Douglass LW. Cytotoxic effects of peroxynitrite, polymorphonuclear neutrophils, free-radical scavengers, inhibitors of myeloperoxidase, and inhibitors of nitric oxide synthase on bovine mammary secretory epithelial cells. *Am J Vet Res* 2001; 62(3): 286–293.

197. Lee JY, Myung SK, Song YS. Prognostic role of cyclooxygenase-2 in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of observational studies. *Gynecologic Oncology* 2013; 129: 613–619.
198. Legrand C, Polette M, Tournier JM, de Bentzmann S, Huet E, Monteau M, Birembaut P. uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Exp Cell Res* 2001; 264(2): 326–336.
199. Lévesque MA, Katsaros D, Yu H, Zola P, Sismondi P, Giardina G, Diamandis EP. Mutant p53 protein overexpression is associated with poor outcome in patients with well or moderately differentiated ovarian carcinoma. *Cancer* 1995; 75(6): 1327–1338.
200. Li L, Madu CO, Lu A, Lu Y. HIF-1 $\alpha$  Promotes A Hypoxia-Independent Cell Migration. *Open Biol J* 2010; 3: 8–14.
201. Li N, Lu X, Zhao X, Xiang FL, Xenocostas A, Karmazyn M, Feng Q. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ . *Stem Cells* 2009; 27(4): 961–970.
202. Li S, Miner K, Fannin R, Carl Barrett J, Davis BJ. Cyclooxygenase-1 and 2 in normal and malignant human ovarian epithelium. *Gynecologic Oncology* 2004; 92: 622–627.
203. Li W, Mao Z, Fan X, Cui L, Wang X. Cyclooxygenase 2 promoted the tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Tumour Biol* 2014; 35(3): 2271–2278.
204. Li Y, Zhu H, Klausen C, Peng B, Leung PC. Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) Mediates Activin A-Induced Human Trophoblast Endothelial-Like Tube Formation. *Endocrinology* 2015; 156(11): 4257–4268.
205. Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang K, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8757–8761.
206. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelyny D, Galardy R, Damsky CH. 92-kDa type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991; 113(2): 437–449.
207. Lim SW, Jin L, Piao SG, Chung BH, Yang CW. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV protects tacrolimus-induced kidney injury. *Lab Invest* 2015; 95(10): 1174–1185.
208. Lim HJ, Wang H. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest* 2010; 120(4): 1004–1015.
209. Lin CH, Stoeck J, Ravanpay AC, Guillemot F, Tapscott SJ, Olson JM. Regulation of neuroD2 expression in mouse brain. *Dev Biol* 2004; 265(1): 234–245.
210. Lipinski B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2011; 2011: 809696.
211. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 2001; 25(4): 402–408.
212. Lockwood CJ, Basar M, Kayisli UA, GuzelogluKayisli O, Murk W, Wang J, De Paz N, Shapiro JP, Masch RJ, Semerci N, Huang SJ, Schatz F. Interferon-gamma protects first-trimester decidual cells against aberrant matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 expression in preeclampsia. *Am J Pathol* 2014; 184(9): 2549–2559.

213. Loke YW, King A, Burrows TD. Decidua in human implantation. *Hum Reprod* 1995; 10(Suppl 2): 14–21.
214. Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 800–808.
215. Lu C, Koppenol WH. Inhibition of the Fenton reaction by nitrogen monoxide. *J Biol Inorg Chem* 2005; 10(7): 732–738.
216. Lu SC. Regulation Of Glutathione Synthesis. *Molecular aspects of medicine*. 2009; 30(1-2): 42–59.
217. Luo Y, He DL, Ning L, Shen SL, Li L, Li X, Zhou HE, Chung LW. Over-expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  increases the invasive potency of LNCaP cells in vitro. *BJU Int* 2006; 98(6): 1315–1319.
218. Ma C, Ning J, You J, Liu L, Wang J, Cui X, Wu B, Zheng J. Primary functional identification of gene TMSG-1. *Sci China C Life Sci* 2003; 46(6): 641–650.
219. Male D, Rahman J, Linke A, Zhao W, Hickey W. An interferon-inducible molecule on brain endothelium which controls lymphocyte adhesion mediated by integrins. *Immunology* 1995; 84(3): 453–460.
220. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006; 11: 1696–1701.
221. Malva JO, Xapelli S, Baptista S, Valero J, Agasse F, Ferreira R, Silva AP. Multifaces of neuropeptide Y in the brain-neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation. *Neuropeptides* 2012; 46(6): 299–308.
222. Manabe S, Gu Z, Lipton SA. Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death Invest. *Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(12): 4747–4753.
223. Majali-Martinez A, Velicky P, Pollheimer J, Knöfler M, Yung H, Burton G, Tabrizi-Wizsy N, Lang U, Hiden U, Desoye G, Dieber-Rotheneder M. Endothelin-1 down-regulates matrix metalloproteinase 14 and 15 expression in human first trimester trophoblasts via endothelin receptor type B. *Human Reproduction* 2017; 32(1): 46–54.
224. Mannon PJ, Raymond JR. The neuropeptide Y/Peptide YY Y1 receptor is coupled to MAP Kinase via PKC and Ras in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246(1): 91–94.
225. Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol* 2000; 156: 321–331.
226. Marksteiner J, Ortler M, Bellmann R, Sperk G. Neuropeptide Y biosynthesis is markedly induced in mossy fibers during temporal lobe epilepsy of the rat. *Neurosci Lett* 1990; 112(2-3): 143–148.
227. Marksteiner J, Sperk G, Maas D. Differential increases in brain levels of neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide after kainic acid-induced seizures in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1989; 339(1-2): 173–177.
228. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(12): 2236–2242.

229. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(6): 446–454.
230. Mayhew TM. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol Histopathol* 2001; 16(4): 1213–1224.
231. Mayor-Lynn K, Toloubeydokhti T, Cruz AC, Chegini N. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reprod Sci* 2011; 18(1): 46–56.
232. Mazur P. Cryobiology: Freezing of biological systems. *Science (Wash D.C.)*. 1970; 168(3934): 939–949.
233. Medeiros PJ, Al-Khazraji BK, Novielli NM, Postovit LM, Chambers AF, Jackson DN. Neuropeptide Y stimulates proliferation and migration in the 4T1 breast cancer cell line. *Int J Cancer* 2012; 131(2): 276–286.
234. Merten N, Beck-Sickinger AG. Molecular ligand-receptor interaction of the NPY/PP peptide family. *EXS* 2006; 95: 35–62.
235. Migita K, Maeda Y, Abiru S, Komori A, Yokoyama T, Takii Y, Nakamura M, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Peroxynitrite-mediated matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2005; 579(14): 3119–3125.
236. Min B, Ahn DU. Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products - A Review. *Food Sci Biotechnol* 2005; 14(1): 152–163.
237. Morales-Medina JC, Dumont Y, Quirion R. A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. *Brain Res* 2010; 1314: 194–205.
238. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983, 65(1-2): 55–63.
239. Mukhina S, Mertani HC, Guo K, Lee KO, Gluckman PD, Lobie PE. Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15166–15171.
240. Mullins DE, Zhang X, Hawes BE. Activation of extracellular signal regulated protein kinase by neuropeptide Y and pancreatic polypeptide in CHO cells expressing the NPY Y(1), Y(2), Y(4) and Y(5) receptor subtypes. *Regul Pept* 2002; 105(1): 65–73.
241. Murohara T, Witzendichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(5): 1156–1161.
242. Nadeem L, Munir S, Fu G, Dunk C, Baczyk D, Caniggia I, Lye S, Peng C. Nodal signals through activin receptor-like kinase 7 to inhibit trophoblast migration and invasion: implication in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Pathol* 2011; 178: 1177–1189.
243. Nakamura E, Sugihara H, Bamba M, Hattori T. Dynamic alteration of the E-cadherin/catenin complex during cell differentiation and invasion of undifferentiated-type gastric carcinomas. *J Pathol* 2005; 205: 349–358.
244. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol* 2013; 35(2): 123–137.

245. Nave H, Bedoui S, Moenter F, Steffens J, Felies M, Gebhardt T, Straub RH, Pabst R, Dimitrijevic M, Stanojevic S, von Hörsten S. Reduced tissue immigration of monocytes by neuropeptide Y during endotoxemia is associated with Y2 receptor activation. *J Neuroimmunol* 2004; 155(1–2): 1–12.
246. Nayal A, Webb DJ, Horwitz AF. Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16(1): 94–98.
247. Neale D, Demasio K, Illuzi J, Chaiworapongsa T, Romero R, Mor G. Maternal serum of women with pre-eclampsia reduces trophoblast cell viability: evidence for an increased sensitivity to Fas-mediated apoptosis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; 13(1): 39–44.
248. Niecknig H, Tug S, Reyes BD, Kirsch M, Fandrey J, Berchner-Pfannschmidt U. Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia. *Free Radic Res* 2012; 46(6): 705–717.
249. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(9): 609–617.
250. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001; 345: 1400–1408.
251. Novaro V, Colman-Lerner A, Ortega FV, Jawerbaum A, Paz D, Lo Nostro F, Pustovrh C, Gimeno MF, González E. Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture. *Reprod Fertil Dev* 2001; 13(5–6): 411–420.
252. Novaro V, Pustovrh C, Colman-Lerner A, Radisky D, Lo Nostro F, Paz D, Jawerbaum A, Gonzalez E. Nitric oxide induces gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) during rat embryo implantation. *Fertil Steril* 2002; 78(6): 1278–1287.
253. Oben JA, Yang S, Lin H, Ono M, Diehl AM. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302(4): 685–690.
254. Ogasawara M, Murata J, Ayukawa K, Saiki I. Differential effect of intestinal neuropeptides on invasion and migration of colon carcinoma cells in vitro. *Cancer Lett* 1997; 119(1): 125–130.
255. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem* 2001; 276(31): 29596–29602.
256. Oreshkova T, Dimitrov R, Mourdjeva M. A cross-talk of decidual stromal cells, trophoblast, and immune cells: a prerequisite for the success of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2012; 68: 366–373.
257. O'Toole EA, van Koningsveld R, Chen M, Woodley DT. Hypoxia induces epidermal keratinocyte matrix metalloproteinase-9 secretion via the protein kinase C pathway. *J Cell Physiol* 2008; 214(1): 47–55.
258. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 657–672.
259. Owens MW1, Milligan SA, Jourdeuil D, Grisham MB. Effects of reactive metabolites of oxygen and nitrogen on gelatinase A activity. *Am J Physiol* 1997; 273(2 Pt 1): L445–450.

260. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 315–424.
261. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 221–233.
262. Paiva SP, Veloso CA, Campos FF, Carneiro MM, Tilan JU, Wang H, Umans JG, Zukowska Z, Kitlinska J. Elevated levels of neuropeptide Y in preeclampsia: A pilot study implicating a role for stress in pathogenesis of the disease. *Neuropeptides* 2016; 55: 127–135.
263. Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2010; 3(1): 2–12.
264. Parsons JT. Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8(2): 146–152.
265. Pazos P, Lima L, Diéguez C, García MC. Energy Balance Regulating Neuropeptides Are Expressed through Pregnancy and Regulated by Interleukin-6 Deficiency in Mouse Placenta. *Int J Endocrinol* 2014; 2014: 537–603.
266. Pedragosa-Badia X, Stichel J, Beck-Sickinger AG. Neuropeptide Y receptors: how to get subtype selectivity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 5.
267. Pedrazzini T, Pralong F, Grouzmann E. Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(2): 350–377.
268. Pennisi DJ, Kinna G, Chiu HS, Simmons DG, Wilkinson L, Little MH. Crim1 has an essential role in glycogen trophoblast cell and sinusoidal-trophoblast giant cell development in the placenta. *Placenta* 2012; 33(3): 175–182.
269. Petraglia F, Calzà L, Giardino L, Sutton S, Marrama P, Rivier J, Genazzani AR, Vale W. Identification of immunoreactive neuropeptide-gamma in human placenta: localization, secretion, and binding sites. *Endocrinology* 1989; 124(4): 2016–2022.
270. Petraglia F, Calzà L, Giardino L, Zanni M, Florio P, Ferrari AR, Nappi C, Genazzani AR. Maternal decidua and fetal membranes contain immunoreactive neuropeptide Y. *J Endocrinol Invest* 1993; 16(3): 201–205.
271. Petraglia F, Coukos G, Battaglia C, Bartolotti A, Volpe A, Nappi C, Segre A, Genazzani AR. Plasma and amniotic fluid immunoreactive neuropeptide-Y level changes during pregnancy, labor, and at parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69(2): 324–328.
272. Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev* 1996; 17(2): 156–186.
273. Petraglia F, Sutton S, Vale W. Neurotransmitters and peptides modulate the release of immunoreactive corticotropin-releasing factor from cultured human placental cells. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160(1): 247–251.
274. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of 10 hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38(1-2): 161–170.
275. Pijnenborg R, Vercruyssen L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006; 27: 939–958.



276. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; 112(4): 453–465.
277. Pollheimer J, Haslinger P, Fock V, Prast J, Saleh L, Biadasiewicz K, Jetne-Edelmann R, Haraldsen G, Haider S, Hirtenlehner-Ferber K, Knöfler M. Endostatin suppresses IGF-II-mediated signaling and invasion human extravillous trophoblasts. *Endocrinology* 2011; 152: 4431–4442.
278. Pollheimer J, Knöfler M. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta* 2005; 26(Suppl A): S21–S30.
279. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 1980; 283(5743): 139–146.
280. Prakash S, Caldwell JC, Eberl DF, Clandinin TR. Drosophila N-cadherin mediates an attractive interaction between photoreceptor axons and their targets. *Nat Neurosci* 2005; 8(4): 443–450.
281. Prakobphol A, Genbacev O, Gormley M, Kapidzic M, Fisher SJ. A role for the L-selectin adhesion system in mediating cytotrophoblast emigration from the placenta. *Dev Biol* 2006; 298: 107–117.
282. Prokić MD, Paunović MG, Matić MM, Djordjević NZ, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Saičić ZS. Effect of aspartame on biochemical and oxidative stress parameters in rat blood. *Arch Biol Sci* 2015; 67: 535–545.
283. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1995; 268: L699–L722.
284. Pustovrh C, Jawerbaum A, Sinner D, White V, Capobianco E, González E. Metalloproteinase 2 activity and modulation in uterus from neonatal streptozotocin-induced diabetic rats during embryo implantation. *Reprod Fertil Dev* 2002; 14(7-8): 479–485.
285. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007; 26: 587–596.
286. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biol Med* 2001; 30: 463–488.
287. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 1): 1067–1088.
288. Rahnema F, Shafiei F, Gluckman PD, Mitchell MD, Lobie PE. Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion. *Endocrinology* 2006; 147(11): 5275–5283.
289. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996; 98(11): 2572–2579.
290. Ranheim T, Staff AC, Henriksen T. VEGF mRNA is unaltered in decidual and placental tissues in preeclampsia at delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80(2): 93–98.

291. Ray S, Watkins DN, Misso NL, Thompson PJ. Oxidant stress induces gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in human bronchial epithelial NCI-H292 cells. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(4): 571–577.
292. Reddy KB, Glaros S. Inhibition of the MAP kinase activity suppresses estrogen-induced breast tumor growth both in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2007; 30(4): 971–975.
293. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal–fetal interface. *J Clin Invest* 2004; 114(6): 744–754.
294. Red-Horse K, Kapidzic M, Zhou Y, Feng KT, Singh H, Fisher SJ. EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation. *Development* 2005; 132(18): 4097–4106.
295. Redman CW, Sargent IL. Immunology of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 534–543.
296. Redman CW, Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Southcombe JH, Collett GP, Sargent IL. Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 2012; 33(Suppl): S48–S54.
297. Reese J, Das SK, Paria BC, Lim H, Song H, Matsumoto H, Knudtson KL, DuBois RN, Dey SK. Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. *J Biol Chem* 2001; 276(47): 44137–44145.
298. Rhee Sg, Kang SW, Jeong W. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(2): 183–189.
299. Richardson A, Parsons JT. Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinase? *Bioessays* 1995; 17(3): 229–236.
300. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003; 302(5651): 1704–1709.
301. Riesewijk A, Martín J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(5): 253–264.
302. Roberts RM, Fisher SJ. Trophoblast stem cells. *Biol Reprod* 2011; 84(3): 412–421.
303. Robertson CR, Flynn SP, White HS, Bulaj G. Anticonvulsant neuropeptides as drug leads for neurological diseases. *Nat Prod Rep* 2011; 28: 741–762
304. Robertson WB, Warner B. The ultrastructure of the human placental bed. *J Pathol* 1974; 112(4): 203–211.
305. Robidoux J, Simoneau L, St-Pierre S, Ech-Chadli H, Lafond J. Human syncytiotrophoblasts NPY receptors are located on BBM and activate PLC-to-PKC axis. *Am J Physiol* 1998; 274(3 Pt 1): E502–E509.
306. Robidoux J, Simoneau L, St-Pierre S, Masse A, Lafond J. Characterization of neuropeptide Y-mediated corticotropin-releasing factor synthesis and release from human placental trophoblasts. *Endocrinology* 2000; 141(8): 2795–804.

307. Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, Baker PN, Robson SC, Bulmer JN. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J* 2012; 26: 4876–4885.
308. Rodrigo C, Zaben M, Lawrence T, Laskowski A, Howell OW, Gray WP. NPY augments the proliferative effect of FGF2 and increases the expression of FGFR1 on nestin positive postnatal hippocampal precursor cells, via the Y1 receptor. *J Neurochem* 2010; 113(3): 615–627.
309. Rossmannith WG, Hoffmeister U, Wolfahrt S, Kleine B, McLean M, Jacobs RA, Grossman AB. Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(5): 487–494.
310. Ruscica M, Dozio E, Boghossian S, Bovo G, Martos Riaño V, Motta M, Magni P. Activation of the Y1 receptor by neuropeptide Y regulates the growth of prostate cancer cells. *Endocrinology* 2006; 147(3): 1466–1473.
311. Ruscica M, Dozio E, Motta M, Magni P. Modulatory actions of neuropeptide Y on prostate cancer growth: role of MAP kinase/ERK 1/2 activation. *Adv Exp Med Biol* 2007; 604: 96–100.
312. Saari H, Suomalainen K, Lindy O, Kontinen YT, Sorsa T. Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171(3): 979–987.
313. Salamonsen LA, Shuster S, Stern R. Deposition of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle: implications for implantation and menstruation. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 335–340.
314. Santos-Carvalho A, Elvas F, Alvaro AR, Ambrósio AF, Cavadas C. Neuropeptide Y receptors activation protects rat retinal neural cells against necrotic and apoptotic cell death induced by glutamate. *Cell Death Dis* 2013; 4: e636.
315. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 2001; 23: 912–923.
316. Schaller MD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6(5): 705–710.
317. Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 549–599.
318. Schwartz J, Freeman R, Frishman W. Clinical pharmacology of estrogens: cardiovascular actions and cardioprotective benefits of replacement therapy in postmenopausal women. *J Clin Pharmacol* 1995; 35(1): 1–16.
319. Sela Passwell N, Rosenblum G, Shoham T, Sagi I. Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: can it pave the path for selective inhibition? *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 29–38.
320. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 2012; 48(2): 158–167.

321. Sgambati E, Marini M, Zappoli Thyron GD, Parretti E, Mello G, Orlando C, Simi L, Tricarico C, Gheri G, Brizzia E. VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. *BJOG* 2004; 111: 564–570.
322. Shenghui H, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009; 25: 377–406.
323. Sheriff S, Ali M, Yahya A, Haider KH, Balasubramaniam A, Amlal H. Neuropeptide Y Y5 receptor promotes cell growth through extracellular signal-regulated kinase signaling and cyclic AMP inhibition in a human breast cancer cell line. *Mol Cancer Res* 2010; 8(4): 604–614.
324. Shi JJ, Ma XH, Diao HL, Ni H, Xu LB, Zhu H, Yang ZM. Differential expression of prostaglandin E receptor subtype EP2 in rat uterus during early pregnancy. *Histol Histopathol* 2005; 20: 1021–1028.
325. Shi MM, Iwamoto T, Forman HJ.  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase and GSH increase in quinone-induced oxidative stress in BPAEC. *Am J Physiol* 1994; 267(42): 414–421.
326. Shiina H, Breault JE, Basset WW, Enokida H, Urakami S, Li LC, Okino ST, Deguchi M, Kaneuchi M, Terashima M, Yoneda T, Shigeno K, Carroll PR, Igawa M, Dahiya R. Functional Loss of the gamma-catenin gene through epigenetic and genetic pathways in human prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 2130–2138.
327. Shimokawa H. Reative Oxygen Species Promote Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circ Res* 2013; 113(9): 1040–1042.
328. Shirahama T, Sakakura C. Overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2001; 7(3): 558–561.
329. Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997; 18(8): 657–665.
330. Shounan Y, Feng X, O'Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1998; 217(1-2): 61–70.
331. Silva AP, Carvalho AP, Carvalho CM, Malva JO. Modulation of intracellular calcium changes and glutamate release by neuropeptide Y1 and Y2 receptors in the rat hippocampus: differential effects in CA1, CA3 and dentate gyrus. *J Neurochem* 2001; 79(2): 286–296.
332. Sjödin P, Holmberg SKS, Åkerberg H, Berglund MM, Mohell N, Larhammar D. Re-evaluation of receptor–ligand interactions of the human neuropeptide Y receptor Y1: a site-directed mutagenesis study. *Biochem J* 2006; 393(1): 161–169.
333. Smith SC, Leung TN, To KF, Baker PN. Apoptosis is a rare event in first-trimester placental tissue. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(3): 697–699.
334. Soundararajan R, Rao AJ. Trophoblast 'pseudo-tumorigenesis': significance and contributory factors. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 15.

335. St Croix CM, Wasserloos KJ, Dineley KE, Reynolds IJ, Levitan ES, Pitt BR. Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(2): L185–L192.
336. Staff AC. An introduction to cell migration and invasion. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61(4): 257–268.
337. Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS.(2007): Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja. Udžbenik, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 1–449.
338. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 59.
339. Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 56.
340. Strathdee G. Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol* 2002; 12(5): 373–379.
341. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 5331–5338.
342. Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod* 2002; 67(3): 889–894.
343. Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisov GG. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* 2003; 160(3): 409–421.
344. Taga T. Analysis of cytokine receptor function by gene manipulation. *Nihon Rinsho* 1998; 56(7): 1674–1680.
345. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 806–811.
346. Tal R. The role of hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha in preeclampsia pathogenesis. *Biol Reprod* 2012; 87: 134.
347. Tan HN, Liu Y, Diao HL, Yang ZM. Cyclooxygenases and prostaglandin E synthases in preimplantation mouse embryos. *Zygote* 2005; 13: 103–108.
348. Taylor CM, Stevens H, Anthony FW, Wheeler T. Influence of hypoxia on vascular endothelial growth factor and chorionic gonadotrophin production in the trophoblast-derived cell lines: JEG, Jar and BeWo. *Placenta* 1997; 18(5-6): 451–458.
349. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6): 740–746.
350. Thiriet N, Deng X, Solinas M, Ladenheim B, Curtis W, Goldberg SR, Palmiter RD, Cadet JL. Neuropeptide Y protects against methamphetamine-induced neuronal apoptosis in the mouse striatum. *J Neurosci* 2005; 25(22): 5273–5279.

351. Thirkill TL, Hendren SR, Soghomonians A, Mariano NF, Barakat AI, Douglas GC. Regulation of trophoblast beta1-integrin expression by contact with endothelial cells. *Cell Commun Signal* 2004; 2(1): 4.
352. Tranguch S, Daikoku T, Guo Y, Wang H, Dey SK. Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(17): 1964–1973.
353. Van den Brûle F, Berndt S, Simon N, Coulon C, Le Goarant J, Munaut C, Noël A, Frankenne F, Foidart JM. Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Chem Immunol Allergy* 2005; 88: 163–180.
354. Van Dijk M, and Oudejans CB. STOX1: key player in trophoblast dysfunction underlying early onset preeclampsia with growth retardation. *J Pregnancy* 2011; 2011: 521826.
355. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5578–5582.
356. Velarde V, de la Cerda PM, Duarte C, Arancibia F, Abbott E, González A, Moreno F, Jaffa AA. Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biol Res* 2004; 37(3): 419–430.
357. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 2007; 15(6): 2223–2268.
358. Vesce F, Scapoli C, Giovannini G, Tralli L, Gotti G, Valerio A, Piffanelli A. Cytokine imbalance in pregnancies with fetal chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 2002; 17(3): 803–808.
359. Vezzani A, Sperk G. Overexpression of NPY and Y2 receptors in epileptic brain tissue: an endogenous neuroprotective mechanism in temporal lobe epilepsy? *Neuropeptides* 2004; 38(4): 245–252.
360. Viappiani S, Nicolescu AC, Holt A, Sawicki G, Crawford BD, León H, van Mulligen T, Schulz R. Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem Pharmacol* 2009; 77(5): 826–834.
361. Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. Cell migration at a glance. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 21): 4917–4919.
362. Vicovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat (Basel)* 1996; 156: 202–216.
363. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* 2007; 213: 355–364.
364. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8): 827–839.
365. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14(17): 2123–2133.
366. Wang H, Dey SK. Road map to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006; 7(3): 185–199.

367. Wang HH, Hsieh HL, Yang CM. Nitric oxide production by endothelin-1 enhances astrocytic migration via the tyrosine nitration of matrix metalloproteinase-9. *J Cell Physiol* 2011; 226(9): 2244–2256.
368. Wang L, Wang H, Wang Y, Wang J. MicroRNA-195 is downregulated in the peripheral blood of pregnant women with pregnancy-induced hypertension and inhibits the trophoblast apoptosis through targeting iNOS. *Int J Clin Exp Med* 2017; 10(1): 716–723.
369. Wang Y, Zhang Y, Lewis DF, Gu Y, Li H, Granger DN, Alexander JS. Protease chymotrypsin mediates the endothelial expression of P- and E-selectin, but not ICAM and VCAM, induced by placental trophoblasts from pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 2003; 24: 851–861.
370. Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 1999; 96(2): 175–183.
371. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 2004; 6(2): 154–161.
372. Wells M. The pathology of gestational trophoblastic disease: Recent advances. *Pathology* 2007; 39: 88–96.
373. Winn RA, M. BR, Bemis L, Franklin WA, Miller YE, Cool C, Heasley LE. Gamma-Catenin expression is reduced or absent in a subset of human lung cancers and re-expression inhibits transformed cell growth. *Oncogene* 2002; 21: 7497–7506.
374. Wright A, Zhou Y, Weier JF, Caceres E, Kapidzic M, Tabata T, Kahn M, Nash C, Fisher SJ. Trisomy 21 is associated with variable defects in cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Med Genet* 2004; 130A(4): 354–364.
375. Xapelli S, Agasse F, Ferreira R, Silva AP, Malva JO. Neuropeptide Y as an endogenous antiepileptic, neuroprotective and pro-neurogenic peptide. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2006; 1(3): 315–324.
376. Xu P, Alfaidy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(3): 1353–1361.
377. Yagel S, Parhar RS, Jeffrey JJ, Lala PK. Normal nonmetastatic human trophoblast cells share in vitro invasive properties of malignant cells. *J Cell Physiol* 1988; 136: 455–462.
378. Yamada KM, Miyamoto S. Integrin transmembrane signalling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 681–689.
379. Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 2005; 435(7038): 104–108.
380. Yoneyama M, Kawada K, Gotoh Y, Shiba T, Ogita K. Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochem Int* 2010; 56(6-7): 740–774.

381. Yoon K, Nery S, Rutlin ML, Radtke F, Fishell G, Gaiano N. Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors. *J Neurosci* 2004; 24(43): 9497–9506.
382. Yoshioka S, Ochsner S, Russell DL, Ujioka T, Fujii S, Richards JS, Espey LL. Expression of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 in the rat ovary in response to an ovulatory dose of gonadotropin. *Endocrinology* 2000; 141(11): 4114–4119.
383. Yulyaningsih E, Zhang L, Herzog H, Sainsbury A. NPY receptors as potential targets for anti-obesity drug development. *Br J Pharmacol* 2011; 163(6): 1170–1202.
384. Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt3): 416–420.
385. Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 2001; 114: 3583–3590.
386. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119(6): 1429–1437.
387. Zhang P, Qi YX, Yao QP, Chen XH, Wang GL, Shen BR, Han Y, Gao LZ, Jiang ZL. Neuropeptide Y Stimulates Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells from Pregnancy Hypertensive Rats via Y1 and Y5 Receptors. *PLoS One* 2015; 10(7): e0131124.
388. Zhang Z, Kolls JK, Oliver P, Good D, Schwarzenberger PO, Joshi MS, Ponthier JL, Lancaster JR Jr. Activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide. *J Biol Chem* 2000; 275(21): 15839–15844.
389. Zhang L, Lee IC, Enriquez RF, Lau J, Vähätalo LH, Baldock PA, Savontaus E, Herzog H. Stress- and diet-induced fat gain is controlled by NPY in catecholaminergic neurons. *Mol Metab* 2014; 3(5): 581–591.
390. Zhou Y, Chorich LP, Mahesh VB, Ogle TF. Regulation of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid by estradiol and progesterone in rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 46(6): 687–698.
391. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997; 99: 2139–2151.
392. Zhou Y, Gormley MJ, Hunkapiller NM, Kapidzic M, Stolyarov Y, Feng V, Nishida M, Drake PM, Bianco K, Wang F, McMaster MT, Fisher SJ. Reversal of gene dysregulation in cultured cytotrophoblasts reveals possible causes of preeclampsia. *J Clin Invest* 2013; 123: 2862–2872.
393. Zhu JY, Pang ZJ, Yu YH. Regulation of Trophoblast Invasion: The Role of Matrix Metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol* 2012; 5(3-4): 137–143.
394. Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem* 2010; 17(31): 3751–3768.
395. Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movafagh S, Ji H, Yeh Y, Chen WT, Kleinman HK, Grouzmann E, Grant DS. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res* 1998; 83(2): 187–195.



- 
396. Zuo Q, Huang S, Zou Y, Xu Y, Jiang Z, Zou S, Xu H, Sun L. The Lnc RNA SPRY4-IT1 Modulates Trophoblast Cell Invasion and Migration by Affecting the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Sci Rep* 2016; 6: 371–383.
397. Zybina TG, Kaufmann P, Frank HG, Freed J, Kadyrov M, Biestrefeld SZ. Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of differentiatio and invasion into endometrium and myometrium. I. Dynamics of polyploidization. *Tsitologija* 2002; 44: 1058–1067.

---

## БИОГРАФИЈА

**Милош М. Матић** рођен је 21. 04. 1984. године у Крагујевцу. Основну школу завршио је у Крагујевцу. Прву крагујевачку гимназију, природно-математички смер, завршио је 2003. године. Школске 2003./2004. године започео је студије Молекуларне биологије и физиологије на Биолошком факултету у Београду. Студије је завршио 2010. године са просечном оценом 9,49 (девет и 49/100). Дипломски рад под насловом "Утицај туморских фибробласта на покретљивост ћелија канцера дебелог црева" урадио је у лабораторији за ћелијску биологију на Институту „Кири“, Париз, Француска (под руководством др Данијеле Вигњевић; ментор Доц. др Горан Брајушковић) и одбранио са оценом 10,00, чиме је стекао звање Дипломирани молекуларни биолог и физиолог.

Уписао је школске 2010./2011. године Докторске академске студије Биологије, смер Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. Све испите предвиђене наставним планом и програмом положио је са просечном оценом 10,00. Изабран је у истраживачко звање истраживача приправника 19.01.2011. године и ангажован на научном пројекту Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије ("Молекуларно физиолошки биомониторинг аеробних организама заснован на одређивању биохемијских биомаркера оксидационог стреса" - евиденциони број пројекта 173041, под руководством др Зорице С. Саичић, научног саветника). Као сарадник у настави ангажован је на извођењу практичне наставе у школској 2011./2012. години. 15.05.2013. године изабран је у звање и на радно место асистента, за ужу научну област *Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија*, у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Изводи практичну наставу из обавезних и изборних предмета на Основним и Мастер академским студијама Биологије и Екологије.

Милош М. Матић се успешно бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за експерименталну физиологију, Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, где је овладао савременим биохемијским и молекуларно-биолошким техникама. У току свог научно-истраживачког рада стекао је основна теоријска знања и укључио се у експериментална истраживања из области физиологије.

Предмет истраживања докторске дисертације Милоша М. Матића, било је испитивање ефеката неуропептида Y на вијабилност, способност преживљавања и индукцију оксидативног стреса у хуманим трофобластима пореклом из хуманог хориокарцинома плаценте, као и испитивање ефеката на њихову способност

---

покретљивости са циљем утврђивања његове потенцијалне улоге у смањеној миграторној и инвазивној способности хуманих трофобласта приликом формирања плаценте. У оквиру научно-истраживачког рада, осим испитивања директно везаних за тему своје докторске дисертације, спроводио је истраживања везана и за испитивање ефекта акутног третмана хипоксијом, интерлеукином 6 (IL-6), никотином и кадмијумом на ћелијским културама мишијег и хуманог хориокарцинома, као и за испитивање токсичних ефекта аспартама, цисплатине и антиоксидативних својстава витамина Ц, селена, естрадиола и биљних флавоноида на оксидативно-антиоксидативни статус еритроцита и ткива пацова.

Милош М. Матић је резултате научно-истраживачког рада објавио у врхунским међународним научним часописима (M21-2 рада), водећим међународним часописима (M22-1 рад), међународним научним часописима (M23-4 рада), часопису националног значаја (M52 - 1 рад), саопштени на међународним научним скуповима (M34-19 саопштења) и националним научним скуповима (M64-7 саопштења), што укупно чини **34** библиографске јединице. Цитираност - **43** хетероцитата (извор Scopus).

Члан је Друштва физиолога Србије и Српског друштва за митохондријалну и слободно-радикалску физиологију.

---

## БИБЛИОГРАФИЈА

### НАУЧНИ ЧАСОПИСИ МЕЂУНАРОДНОГ ЗНАЧАЈА (M20)

#### Радови објављени у врхунским међународним часописима (M21)

1. Ognjanović BI, Djordjević NZ, Matić MM, Obradović JM, Mladenović JM, Štajn AŠ, Saičić ZS. Lipid peroxidative damage on Cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: a possible protective effect of selenium. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012; 13, 1790–1803. ISSN: 1422-0067; IF2011 - 2.598
2. Prokić D. Marko, Paunović G. Milica, Matić M. Miloš, Djordjević Z. Nataša, Ognjanović I. Branka, Štajn Š. Andraš, Saičić S. Zorica. Prooxidative effects of aspartame on antioxidant defense status in erythrocytes of rats. *Journal of Biosciences*, 2014; 39: 859–866. ISSN: 0250-5991; IF2014 - 2.064

#### Рад објављен у водећем научном часопису међународног значаја (M22)

3. Miloš Matić, Milica Paunović, Branka Ognjanović, Andraš Štajn, Zorica Saičić. Neuropeptide Y reduces migration capacity of human choriocarcinoma cell line by altering oxidative/antioxidative status. *Turkish Journal of Biology*, 2017; 41: (In press) doi: 10.3906/biy-1606-73. ISSN: 1303-6092; IF2015 - 1.183

#### Радови објављени у научним часописима међународног значаја (M23)

4. Mladenović M. Jelena, Ognjanović I. Branka, Djordjević Z. Nataša, Matić M. Miloš, Knežević Veroljub, Štajn Š. Andraš, Saičić S. Zorica. Protective effects of oestradiol against cadmium-induced changes in blood parameters and oxidative damage in rats. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 2014; 65: 37–46. ISSN: 0004-1254; IF2015 - 0.971
5. Mladenović M. Jelena, Paunović G. Milica, Matić M. Miloš, Knežević S. Veroljub, Ognjanović I. Branka, Štajn Š. Andraš, Saičić S. Zorica. Copper-induced changes of lipid peroxidation and hemato-biochemical parameters in rat blood: protective role of flavonoids. *Archives of Biological Sciences*, 2014; 66(3): 1271–1279. ISSN: 0354-4664; IF2012 - 0.791
6. Prokić D. Marko, Paunović G. Milica, Matić M. Miloš, Djordjević Z. Nataša, Ognjanović I. Branka, Štajn Š. Andraš, Saičić S. Zorica. Effect of aspartame on biochemical and oxidative stress parameters in rat blood. *Archives of Biological Sciences*, 2015; 67(2): 535–545. ISSN: 0354-4664; IF2014 - 0.718
7. Milica G. Paunović, Branka I. Ognjanović, Miloš M. Matić, Andraš Š Štajn, Zorica S. Saičić. Protective effects of quercetin and vitamin C against nicotine-induced toxicity in the blood of Wistar rats. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 2016; 67: 304–310. ISSN: 0004-1254; IF2015 - 0.971

---

### Рад објављен у часопису националног значаја (M52)

1. Matić M. Miloš, Milošević D. Marija, Paunović G. Milica, Ognjanović I. Branka, Štajn Š. Andraš, Saičić S. Zorica. Paracetamol-induced changes of haemato-biochemical and oxidative stress parameters in rat blood: protective role of vitamin C and  $\beta$ -glucan. *Kragujevac Journal of Sciences*, 2016; 38: 135–146. ISSN: 1450-9636

### Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

1. Matić M., Schoumacher M., Vignjević D. (2011): The effects of tumor-associated fibroblasts on motility of colorectal cancer. Preclinical testing of active substances and cancer research, Kragujevac, P20.6.
2. Djordjević N., Babić G., Ognjanović B., Štajn A., Matić M., Paunović M., Saičić Z. (2012): Estrogen improves vascular function in preeclampsia via ROS reduction. *FEBS JOURNAL*, 279, 112-112.
3. Matić M., Paunović M., Ognjanović B., Štajn A., Babić G., Saičić Z., Djordjević N. (2012): The effects of neuropeptide Y on oxidative/antioxidative status in trophoblasts. *FEBS JOURNAL*, 279, 221-221.
4. Matić M.M., Ognjanović B.I., Djordjević N.Z., Paunović G.M., Štajn A.Š., Saičić Z.S. (2012): Protective effects of Coenzyme Q<sub>10</sub> and Vitamin E on cadmium-induced oxidative stress and alterations in antioxidant defense system in rat liver. Belgrade Food International Conference, Food, health and well being. Belgrade, Serbia, November 26-28, P 1.16, p.55.
5. Prokić M.D., Ognjanović B.I., Đorđević N.Z., Matić M.M., Paunović M.G., Štajn A.Š., Saičić Z.S. (2012): Prooxidative effects of aspartame in blood of rats. Belgrade Food International Conference, Food, health and well being. Belgrade, Serbia, November 26-28, P 2.11, p.81.
6. Paunović M.G., Đorđević N.Z., Matić M.M., Prokić M.D., Ognjanović B.I., Štajn A.Š., Saičić Z.S. (2012): Diminished antioxidant defense potencial of erythrocyte and serum from rats with subacute aspartame intoxication. Belgrade Food International Conference, Food, health and well being. Belgrade, Serbia, November 26-28, P 2.12, p.82.
7. Matić M.M., Paunović M.G., Mladenović J.M., Đorđević N.Z., Babić G.M., Ognjanović B.I., Štajn A.Š., Saičić Z.S. (2014): Quercetin and vitamin C protects nicotine-induced oxidative stress in erythrocytes of rats. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation. Molecular, Cellular and Integrative Basis of Health and Disease: Transdisciplinary Approach, Belgrade, Serbia, October 29-31, ABSTRACT BOOK, p. 138.
8. Matić M.M., Paunović M.G., Đorđević N.Z., Babić G.M., Ognjanović B.I., Štajn A.Š., Saičić Z.S. (2014): Testosterone-induced changes of behavior in rats. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation. Molecular, Cellular and Integrative Basis of Health and Disease: Transdisciplinary Approach, Belgrade, Serbia, October 29-31, ABSTRACT BOOK, p. 139.
9. Mladenović J.M., Ognjanović B.I., Matić M.M., Paunović M.G., Štajn A.Š., Saičić Z.S. (2014): The protective effects of quercetin and (-)-epicatechin against copper-induced oxidative stress in rat erythrocytes. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation. Molecular, Cellular and Integrative Basis of Health and Disease: Transdisciplinary Approach, Belgrade, Serbia, October 29-31, ABSTRACT BOOK, p. 147.

- 
10. Paunović M.G., Matić M.M., Mladenović J.M., Đorđević N.Z., Babić G.M., Ognjanović B.I., Štajn A.Š., Saičić Z.S. (2014): Potential protective effects of beta-glucan and vitamin C on paracetamol-induced oxidative stress in rats. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation. Molecular, Cellular and Integrative Basis of Health and Disease: Transdisciplinary Approach, Belgrade, Serbia, October 29-31, ABSTRACT BOOK, p. 152.
  11. Paunović M.G., Matić M.M., Đorđević N.Z., Babić G.M., Ognjanović B.I., Štajn A.Š., Saičić Z.S. (2014): Behavioral effects of electromagnetic field mediated by nitric oxide. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation. Molecular, Cellular and Integrative Basis of Health and Disease: Transdisciplinary Approach, Belgrade, Serbia, October 29-31, ABSTRACT BOOK, p. 153.
  12. Prokić M.D., Paunović M.G., Matić M.M., Đorđević N.Z., Ognjanović B.I., Štajn A.Š., Saičić Z.S. (2014): Effects of aspartame on changes in haemato-biochemical and oxidative stress parameters in red blood cells of rats. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation. Molecular, Cellular and Integrative Basis of Health and Disease: Transdisciplinary Approach, Belgrade, Serbia, October 29-31, ABSTRACT BOOK, p.166.
  13. Jelena M. Mladenović, Branka I. Ognjanović, Miloš M. Matić, Milica G. Paunović, Andraš Š. Štajn, Zorica S. Saičić (2015): Protective effects of quercetin and (-)-epicatechin against copper induced oxidative stress in rat liver. Third Congress, *REDOX MEDICINE: Reactive species signaling, analytical methods, phytopharmacy, molecular mechanisms of disease*. Belgrade, Serbia, September 25-26, BOOK OF ABSTRACTS p.51.
  14. Marija D. Milošević, Milica G. Paunović, Miloš M. Matić, Branka I. Ognjanović, Andraš Š. Štajn, Zorica S. Saičić (2015): Acetaminophen-induced changes of haemato-biochemical and oxidative stress parameters in rat blood: Protective role of vitamin C and  $\beta$ -glucan. Third Congress, *REDOX MEDICINE: Reactive species signaling, analytical methods, phytopharmacy, molecular mechanisms of disease*. Belgrade, Serbia, September 25-26, BOOK OF ABSTRACTS p.66.
  15. Milica G. Paunović, Miloš M. Matić, Branka I. Ognjanović, Andraš Š. Štajn, Zorica S. Saičić (2015): Nicotine toxicity and changes of redox status in the blood of rats: Protective effects of quercetin and vitamin C. Third Congress, *REDOX MEDICINE: Reactive species signaling, analytical methods, phytopharmacy, molecular mechanisms of disease*. Belgrade, Serbia, September 25-26, BOOK OF ABSTRACTS p.77.
  16. Miloš Matić, Milica Paunović, Branka Ognjanović, Nataša Đorđević, Andraš Štajn, Zorica Saičić (2015): The role of neuropeptide Y in oxidative/antioxidative balance in human trophoblast cell line. Third Congress, *REDOX MEDICINE: Reactive species signaling, analytical methods, phytopharmacy, molecular mechanisms of disease*. Belgrade, Serbia, September 25-26, BOOK OF ABSTRACTS p.78.
  17. Matić M. Miloš, Obradović D. Ana, Milošević D. Marija, Paunović G. Milica, Ognjanović I. Branka, Saičić S. Zorica (2016): Neuropeptide Y induces nitrosative stress and inhibits migration in human choriocarcinoma cell line JEG-3. Serbian Biochemical Society, Sixth Conference, Biochemistry and Interdisciplinarity: Transcending the Limits of Field. 18. november, Belgrade, Serbia, proceedings, p.133.
  18. Obradović Ana, Matić Miloš, Ušćumlić Gordana, Božić Biljana (2016): Antiproliferative, antioxidative and promigratory effects of 3-benzyl-5-isopropyl-5-phenylhydantion in human breast cancer cell line MDA-MB-231. Serbian Biochemical Society, Sixth Conference, Biochemistry and Interdisciplinarity: Transcending the Limits of Field, 18. november, Belgrade, Serbia, proceedings, p.141.

- 
19. Paunović G. Milica, Matić M. Miloš, Milošević D. Marija, Ognjanović I. Branka, Saičić S. Zorica (2016): Fenitrothion-induced changes of haemato-biochemical and oxidative stress parameters in rat blood: Protective role of selenium and vitamin C. Serbian Biochemical Society, Sixth Conference, Biochemistry and Interdisciplinarity: Transcending the Limits of Field, 18. november, Belgrade, Serbia, proceedings, p.147.

#### **Саопштења са националних скупова штампана у изводу (M64)**

1. Đorđević N., Babić G., Matić M., Ognjanović B., Štajn A. i Saičić Z.S. (2011): Antioksidacioni efekti estradiola u eritrocitima trudnica sa preeklampsijom. Prvi kongres, Mitohondrije i slobodni radikali u biomedicini - perspektive, Beograd, Srbija, Septembar 24, Knjiga sažetaka, p. 27.
2. Mladenović J.M., Matić M.M., Đorđević N.Z., Knežević V., Štajn A., Ognjanović B. i Saičić Z.S. (2011): Protektivni efekti estradiola na kadmijum indukovanu aktivnost neutrofila. Prvi kongres, Mitohondrije i slobodni radikali u biomedicini - perspektive, Beograd, Srbija, Septembar 24, Knjiga sažetaka, P20, 60.
3. Matić M., Đorđević N., Babić G., Ognjanović B., Štajn A. i Saičić Z.S. (2011): Promigratorni i antioksidacioni efekti interleukina-6 u trofoblastima miša. Prvi kongres, Mitohondrije i slobodni radikali u biomedicini - perspektive, Beograd, Srbija, Septembar 24, Knjiga sažetaka, P33, 73.
4. Đorđević N., Babić G., Matić M., Ognjanović B., Štajn A. i Saičić Z.S. (2011): Regulacija biodostupnosti azot monoksida u plazmi zdravih trudnica tretiranih estradiolom. Prvi kongres, Mitohondrije i slobodni radikali u biomedicini - perspektive, Beograd, Srbija, Septembar 24, Knjiga sažetaka, P35, 75.
5. Mladenović M. Jelena, Paunović G. Milica, Matić M. Miloš, Đorđević Z. Nataša, Babić M. Goran, Knežević S. Veroljub., Ognjanović I. Branka., Štajn Š. Andraš i Saičić S. Zorica (2013): Prooksidativni efekti bakra na oksidativno-antioksidativni zaštitni status eritrocita pacova. Drugi kongres, Život sa slobodnim radikalima - Hemija - Biologija - Medicina - Niš, Srbija, Septembar 28, Knjiga sažetaka, P22, 60.
6. Paunović G. Milica, Matić M. Miloš, Đorđević Z. Nataša, Babić M. Goran, Ognjanović I. Branka., Štajn Š. Andraš i Saičić S. Zorica (2013): Prooksidativni efekti kadmijuma u ćelijama citotrofoblasta miša. Drugi kongres, Život sa slobodnim radikalima - Hemija - Biologija - Medicina - Niš, Srbija, Septembar 28, Knjiga sažetaka, P36, 74.
7. Matić M. Miloš, Paunović G. Milica, Đorđević Z. Nataša, Babić M. Goran, Ognjanović I. Branka., Štajn Š. Andraš i Saičić S. Zorica (2013): Efekat hipoksije na redoks status mišijih trofoblasta. Drugi kongres, Život sa slobodnim radikalima - Hemija - Biologija - Medicina - Niš, Srbija, Septembar 28, Knjiga sažetaka, P38, 76.

## БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



### КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	<b>Милош М. Матић</b>
Ментор	Др Бранка Огњановић, редовни професор
Наслов рада	<b><i>In vitro</i> ефекти неуропептида Y на миграторни потенцијал и оксидативни статус ћелија хуманог хориокарцинома</b>
Језик публикација	Српски (ћирилица)
Језик извода	Српски
Земља публикавања	Србија
Година публикације	2017.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	34 000 Крагујевац, Р. Домановића 12
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Физиологија животиња и молекуларна биологија
Предметна одредница/кључне речи	Неуропетид Y, трофобласти хориокарцинома, оксидативни стрес, азот моноксид, миграција
Чува се	У библиотеци Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Р. Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



## РЕЗИМЕ

Трофобласти су ћелије плаценте и карактеришу се високом способношћу пролиферације, миграције и инвазије. Њихова контролисана миграција и инвазија у ендометријум, кључни су процеси у имплантацији, као и у формирању и развоју плаценте. Способност трофобласта да изврши миграцију и инвазију на матернално ткиво лежи у основи правилног одвијања трудноће и правилног развоја фетуса. Редукциони поремећаји трофобластне миграције узрокују аберантну имлантацију и плитку плацентацију, што често води различитим компликацијама трудноће које су у вези са недовољном плацентацијом, као што су прееклампсија и интраутерини застој у расту. У неколико патолошких форми трудноће показано је присуство значајно повишене концентрације неуропептида Y у поређењу са концентрацијама у здравој трудноћи, па је највећи део студије фокусиран на испитивање потенцијалних патолошких ефеката на трофобласте. Имајући у виду да је неуропептид Y присутан у одређеној концентрацији и у плазми здравих трудница, узети су у разматрање и ефекти ове концентрације, путем које је могуће да неуропептид Y оствари значајан физиолошки допринос у оптималном метаболизму трофобласта током здраве трудноће.

Циљеви ове студије представљају *in vitro* испитивања ефеката неуропептида Y на различите аспекте функционисања хуманих трофобласта. Током студије коришћена је ћелијска линија JEG-3 хуманих трофобласта изолованих из карцинома плаценте, која је погодан модел систем за проучавања процеса миграције и инвазије. У експериментима су испитивани ефекти неуропептида Y аплицираног у две концентрације (физиолошкој и патолошкој) у два временска третмана (24 сата и 72 сата) са циљем упоређивања његових физиолошких ефеката и ефеката које остварује у концентрацијама које се јављају у неким патолошким стањима трудноће. Посебан фокус студије је био на утврђивању потенцијалног доприноса овог молекула на промене миграторне и инвазивне способности трофобласта у његовим концентрацијама вишим од физиолошких.

Концентрације NPY од 0,1 nmol/L и 1 nmol/L коришћене су за тестирање ефеката на апоптотски индекс (преживљавање ћелија), вијабилност, миграциони капацитет, оксидативни / антиоксидативни статус, продукцију металопротеиназа (MMP-9), као и за мерење експресије гена (iNOS, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, COX-2 и MMP-9) и дистрибуције неких протеина у ћелији (iNOS, E-кадхерин). Контролне ћелије су гајене у чистом медијуму за култивацију да би се добиле базалне вредности испитиваних параметара.

Експериментални подаци добијени током ове студије показали су да неуропептид Y аплициран у физиолошкој (0,1 nmol/L) и патолошкој (1 nmol/L) концентрацији остварује различите ефекте на параметре оксидативног / антиоксидативног метаболизма, миграције, као и на вијабилност, апоптотски индекс и пролиферативну способност хуманих трофобласта линије JEG-3. Најзначајнији ефекат физиолошке концентрације неуропептида Y је повећавање вијабилности трофобласта, што указује на значајан допринос одржавању нивоа оксидтивног метаболизма у трофобласима који природно функционишу у стању

хипоксије. Физиолошка концентрација неуропептида Y не индукује значајан оксидативни стрес, указујући да трофобласти при овој концентрацији ефикасно могу неутралисати продукте повишене активности митохондријалног ланца респирације. Неуроптид Y аплициран у концентрацији од 0,1 pmol/L показује протективан ефекат на преживљавање трофобласта, као и значајан пролиферативан ефекат. Ови подаци указују да NPY у физиолошким концентрацијама може имати допринос у остваривању функција трофобласта неопходних за оптималну имплантацију и плацентацију.

Патолошке концентрације неуропептида Y доводе до индукције снажног оксидативног стреса, као и до значајног смањења миграционих способности трофобласта. Смањење миграционог индекса трофобласта корелира са сниженом биодоступношћу азот монооксида, што је последица његове интеракције са продуктима оксидативног стреса, као и са снижењем експресије и количинске заступљености iNOS ензима. Неуропептид Y такође индукује повишење количине E-кадхерина и снижење експресије гена потенцијално укључених у стимулацију трофобластне миграције. Количина металопротеиназе 9, параметра инвазионог потецјала ћелија, као и ниво њене генске експресије значајно је снижен у односу на контролне ћелија након третмана патолошком концентрацијом NPY. Наведени резултати имплицирају да повишена концентрација NPY која се региструје у неким патолошким формама трудноће повезаних са смањеном или недовољно интензивном миграцијом и инвазијом трофобласта, може да буде један од значајних фактора који доприносе редукацији трофобластне миграције.

Ова докторска дисертација представља допринос дубљем разумевању механизма регулације миграције трофобластних ћелија, која је есенцијална за оптимално формирање плаценте, исхрану ембриона и успешан порођај.

Датум прихватања теме од стране ННВ факултета	23.12.2015. године
Датум одбране	
Чланови комисије	Др Андраш Штајн, редовни професор Др Зорица Саичић, научни саветник Др Светлана Матић, научни саветник



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF SCIENCE  
INSTITUTE OF BIOLOGY AND ECOLOGY

Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia



**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD thesis
Author	<b>Miloš M. Matić</b>
Mentor	Dr Branka Ognjanović, Full professor
Title	<b><i>In vitro</i> effects of neuropeptide Y on migratory potential and oxidative status of human choriocarcinoma cells</b>
Language of text	Serbian (Roman) (scr)
Language of abstract	Serbian (Roman) / English
Country of publication	Serbia
Publication year	2017.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	Radoja Domanovića 12 34000 Kragujevac, Serbia
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Animal physiology and molecular biology
Key words	Neuropeptide Y, choriocarcinoma trophoblasts, oxidative stress, nitric oxide, migration
Holding data	In library of Faculty of Science, 34 000 Kragujevac, Serbia, R. Domanovića 12
Note	

---

## Abstract

Trophoblasts cells are placental cell type characterized by high proliferation capacity, migration and invasion. Highly regulated trophoblast migration and invasion of the endometrium, are the essential process in the implantation and development of the placenta. The migration and invasion of trophoblast cells of maternal tissues are basis of a proper progress of pregnancy and optimal fetal development. Reduced trophoblast migration and invasion cause aberrant implantation and shallow placentation, often leading to a various complications of pregnancy that are related with inadequate placentation, such as preeclampsia and intrauterine growth restriction. In several pathological forms of pregnancy the presence of significantly elevated concentration of neuropeptide Y in comparison with its concentrations in healthy pregnancy was recorded, so the largest part of the study were focused on the examination of potential pathological effects of NPY on trophoblast cells. Since neuropeptide Y is also present in a particular concentration in plasma of women with healthy pregnancy, the effects of this physiological concentration by which neuropeptide Y is possible to significantly contribute to the optimal physiological metabolism of trophoblasts during a healthy pregnancy were taken into consideration.

The objectives of this study were to investigate *in vitro* effects of neuropeptide Y on different aspects of the functioning of the human trophoblast. During the study we used the cell line JEG-3 of human trophoblast, isolated from placental cancer, which represents a suitable model system for examining of the processes of cell migration and invasion. In the experiments we have investigated the effects of neuropeptide Y applied in two concentrations (physiological and pathological) in two different time treatment (24 and 72 hours) with the aim of comparing its physiological effects and the effects achieved by its pathological concentrations present in some pregnancy disorders. A particular focus of the study was to determine the potential contribution of this molecule on changes of the migratory and invasive ability of trophoblast cells induced by concentrations higher than physiological. NPY concentration of 0,1 nmol/L and 1 nmol/L were used to examine the effects on apoptotic index (survival rate of the cells), cell viability, migration capacity, the oxidative / antioxidative status, the production of metalloproteinase (MMP-9), gene expression (iNOS, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, COX-2 and MMP-9) and the distribution of some proteins in cell (iNOS, E-cadherin). Control cells were grown in pure culture medium to obtain basal values of the examined parameters.

Experimental data obtained in this study showed that neuropeptide Y administered in physiological (0,1 nmol/L) and pathological (1 nmol/L) concentration achieves various effects on the parameters of the oxidative / antioxidative metabolism, migration and the viability index apoptotic index and proliferative rate of human trophoblast cell line JEG -3. The most significant effect of physiological concentrations of neuropeptide Y is increasing trophoblast viability, which indicates a significant contribution to maintaining the levels of oxidative metabolism trophoblasts, naturally operating in a state of hypoxia. Physiological concentrations of neuropeptide Y does not induce significant oxidative stress, indicating that trophoblasts at this

concentration can effectively neutralize the products of elevated activity of mitochondrial respiratory chain. Neuropeptide Y administered in a concentration of 0,1 nmol/L also showed protective effect on the survival of the trophoblast, as well as a significant proliferative effect. These data suggest that NPY in physiological concentrations may have a contribution in achieving the function of a trophoblast necessary for optimal implantation and placentation.

Pathological concentrations of neuropeptide Y leads to a strong oxidative stress, as well as to a significant reduction of migration ability of the trophoblast. Reduced migration index of trophoblast cells correlates with the reduced bioavailability of nitric oxide, which is due to its interaction with the products of oxidative stress, as well as due to decrease in the expression of iNOS and content of the enzyme. Neuropeptide Y also induces the increasing of the amount of E-cadherin and reduction of the expression of genes potentially involved in the stimulation of trophoblastic migration. The amount of metalloproteinase 9, the parameter cell invasive potential, as well as the levels of its gene expression are significantly decreased as compared to control cells after treatment with NPY pathological concentrations. These results imply that increased concentrations of NPY registered in some pathological forms of pregnancy associated with insufficient migration and invasion of trophoblast, may be one of the significant factors that could contribute to the reduction trophoblast migration.

This research is a contribution to a deeper understanding of the mechanisms of regulation of trophoblast cell migration, which is essential for optimal formation of the placenta, embryo nutrition and successful delivery.

Accepted by scientific board on	23.12.2015.
Defended on	
Commission	Dr Andraš Štajn, Full professor Dr Zorica Saičić, Full research professor Dr Svetlana Matić, Full research professor

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, **Милош Матић**, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

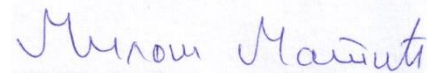
***In vitro* ефекти неуропептида Y на миграторни потенцијал и оксидативни статус ћелија хуманог хориокарцинома**

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету** Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 27.02.2017. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, **Милош Матић**

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

***In vitro* ефекти неуропептида Y на миграторни потенцијал и оксидативни статус хелија хуманог хориокарцинома**

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету** Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

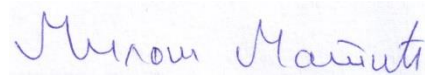
---

<sup>1</sup>Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *CreativeCommons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- (5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима**
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 27.02.2017. године,



потпис аутора

---

<sup>2</sup>Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *CreativeCommons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org/rs/>



## Neuropeptide Y reduces migration capacity of human choriocarcinoma cell line by altering oxidative/antioxidative status

Miloš MATIĆ<sup>1\*</sup>, Milica PAUNOVIĆ<sup>1</sup>, Branka OGNJANOVIĆ<sup>1</sup>, Andraš ŠTAJN<sup>1</sup>, Zorica SAIČIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup>Department of Physiology, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Received: 24.06.2016 • Accepted/Published Online: 11.10.2016 • Final Version: 00.00.2017

**Abstract:** Reduced migration capacity of trophoblast cells leads to poor placentation and correlates with severe pregnancy disorders such as intrauterine growth restriction and preeclampsia. Neuropeptide Y (NPY) is sympathetic cotransmitter involved in various physiological processes and its levels are significantly increased in preeclamptic pregnancy compared to healthy pregnancy. In this study the prooxidative role of NPY and its effects on migration capacity of human trophoblast cell line JEG-3 were investigated together with the effects of nitric oxide (NO) depletion, a molecule that was shown to play an important role in promoting cell migration. The cells were treated for 24 h (short-term stimulation) and 72 h (long-term stimulation) respectively with 1 nM NPY. Oxidative/antioxidative status and the migration index of cells were measured. The results showed increased concentrations of oxidative stress parameters ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ) and molecules of the antioxidant defense system (reduced glutathione and oxidized glutathione), while the levels of intracellular nitrites (indicators of NO) and cell migration index were significantly decreased in trophoblast cells treated with NPY (both at 24 h and 72 h of exposure) compared to the control cells. These results suggest that NPY may significantly contribute to reduced migration capacity of trophoblast cells by generating oxidative stress and reducing the bioavailability of NO.

**Key words:** Neuropeptide Y, choriocarcinoma trophoblasts, oxidative stress, nitric oxide, migration

### 1. Introduction

The essential role in placentation belongs to trophoblast cells, which arise from the outer layer of blastocysts (Pennisi et al., 2012). The cytotrophoblast stem cells undergo either the villous or the extravillous pathway of differentiation. In the villous pathway, cytotrophoblasts fuse to form multinucleated syncytiotrophoblasts or aggregate to form anchoring villous trophoblasts, which give rise to extravillous trophoblasts (Loke et al., 1995). Villous trophoblasts cover the chorionic villi, creating the placental–blood barrier, involved in gas exchange and nutrient supply between the mother and the fetus. Extravillous trophoblasts deeply invade the uterine connective tissue, degrading the extracellular matrix (interstitial route), and place themselves between decidual and myometrial cells and then invade the uterine spiral arteries (endovascular route) (Loke et al., 1995). At this stage the extravillous trophoblasts remodel the maternal spiral arteries, replacing smooth muscle and endothelial cells forming vessels with a larger diameter, and increase blood flow and reduce vascular resistance, making these maternal vessels independent of maternal vasoconstriction. This remodeling invasion is essential

in establishing and developing the placenta as well as in maintaining normal pregnancy, considering that the fetal requirement for blood supply is much higher in the later stages of pregnancy (Zhou et al., 1997). Since the process strongly depends on an optimal trophoblast invasion of the maternal tissue environment, failure of extravillous trophoblasts to fully invade and modify the uterine tissue leads to shallow placentation and is often associated with serious pregnancy complications such as preeclampsia and intrauterine growth restriction (Chaddha et al., 2004).

Neuropeptide Y (NPY) is a neuropeptide present in significant levels in the peripheral and central nervous systems and it has a role in various processes such as anxiety, stress-related behaviors, food intake, digestion, metabolism, immune response, memory, and learning (Heilig, 2004; Ferreira et al., 2010; Farzi et al., 2015). Literature data show that levels of NPY in patients with preeclampsia and eclampsia, both caused by inadequate placentation, are 2- to 4-fold higher than in women with normal pregnancies (Khatun et al., 2000).

The production of reactive oxygen species is a physiological process inherent to aerobic organisms due to mitochondrial respiratory chain activity and phagocytic

\* Correspondence: milosmatic@kg.ac.rs

actions (Nazıroğlu et al., 2015). Oxidative stress represents an imbalance between the production of reactive oxygen species and the compensating antioxidant mechanisms, which can lead to multiple cellular damages (Li et al., 2013).

Nitric oxide (NO) is a multifunctional signal molecule and has been reported as a mediator of many physiological and pathological processes in a variety of tissues, including those involved in human reproduction. NO is one of the most pleiotropic signaling molecules at systemic and cellular levels, participating in vascular tone regulation, cellular respiration, proliferation, apoptosis, and gene expression (Krause et al., 2011). Nitric oxide is generated from L-arginine by the enzyme nitric oxide synthase (NOS). Two of the three known isoforms of NOS are constitutively expressed in different cell types (NOS1 or neuronal; NOS3 or endothelial NOS - eNOS), whereas the expression of the third isoform (NOS2 or inducible NOS - iNOS) can be induced with cytokines and other agents (Moncada et al., 1991). Both iNOS and eNOS are present in human trophoblasts (Rossmanith et al., 1999; Hambartsoumian et al., 2001). The quantification of NO metabolites (like nitrites and nitrates) in biological samples provides valuable information with regard to in vivo NO production, bioavailability, and metabolism (Bryan et al., 2007). The production of NO by iNOS in the myometrium and placenta increases throughout pregnancy until delivery, when it decreases rapidly (Von Mandach et al., 2003). One of the main roles of NO increase during pregnancy is to stimulate vasodilatation and to increase blood flow subsequently (Benest et al., 2008). Nitric oxide activates protein kinase G (PKG), which phosphorylates multiple protein substrates including integrins and cell adhesion molecules. NO-dependent phosphorylation induces conformational changes of the integrins, altering their ligand-binding affinity, which affects cell motility (Cartwright and Balarajah, 2005; Chigaev et al., 2011).

It was shown in mice and rats that the stimulation of macrophages with NPY increased the production of reactive oxygen species such as peroxide and superoxide (De la Fuente et al., 2001; Dimitrijevic et al., 2005) and that these effects are mediated via Y1 and Y2 receptors (Bedoui et al., 2008). By stimulating the generation of these reactive oxygen molecules, which can alter levels of free NO (Jaimes et al., 2001; Hsieh et al., 2014), NPY could be an important factor in depletion of cell migration dependent on NO-mediated pathways. In this study we investigated the modulatory capacity of NPY on the mobility of a human choriocarcinoma cytotrophoblastic cell line by examining its effects on the oxidative/antioxidative balance and bioavailability of NO.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture and treatment

The cytotrophoblastic human choriocarcinoma cell line JEG-3, purchased from the American Type Culture Collection, was used in this study. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO) supplemented with heat-inactivated 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin, and streptomycin (GIBCO). The cells were grown to 80% confluence in 75-cm<sup>2</sup> flasks at 37 °C in a normal atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. This cell line is easy to culture and represents a convenient model for cell migration. NPY concentrations of 1 nM, 10 nM, and 100 nM were tested for cytotoxicity. In order to investigate the effects of NPY on oxidative/antioxidative status and cell migration capacity, 1 nM NPY was used as treatment. The stock solution of NPY was prepared in phosphate-buffered saline (PBS) and then the NPY stock was serially diluted in DMEM to final concentrations of 1 nM, 10 nM, and 100 nM. The control cells were cultured in conditioned medium only (DMEM) to acquire the basal levels of oxidative stress parameters and migration index.

### 2.2. MTT assay

The cells were seeded into a 96-well plate (10,000 cells per well) and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The medium was replaced with 100 µL of medium containing various concentrations of NPY (1 nM, 10 nM, and 100 nM) and cells were incubated for 24 h. Untreated cells were used as the control. After 24 h of NPY treatment, the cell viability was determined by MTT assay (Mosmann, 1983). The test was based on the color reaction of mitochondrial dehydrogenase in living cells by MTT. At the end of the treatment period, MTT (final concentration: 5 mg/mL of phosphate buffer solution) was added to each well, which were then incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 3 h. The colored crystals of produced formazan were dissolved in 150 µL of DMSO. The absorbance was measured by a microplate reader. The cell viability was calculated as a ratio of absorbance of the treated group divided by the absorbance of the control group and multiplied by 100 to give a percentage of viability.

### 2.3. Transwell assay for cell migration

The cell migration capacity was determined by the ability of cells to cross the pores of polycarbonate membranes (pore size 8 µm; Greiner Bio-One, Switzerland) fitted to the bottom of transwell chambers. The migration test was based on a protocol described by Chen (2005). The cells were exposed to 1 nM NPY for 24 h and 72 h, respectively. In another set of experiments the cells were incubated with 1 mM NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) for 24 h and 72 h. The initial solution of L-NAME in PBS was used for the study and then the solution was diluted in conditioned medium (DMEM) to acquire the

1 mM concentration. The control cells were cultured only in conditioned medium (DMEM, GIBCO). Each measurement was performed in triplicate (3 wells for each experimental cell group). After the exposures, all three groups of cells were trypsinized and placed in the upper chambers at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well in 500  $\mu$ L of DMEM with 10% FBS. The lower chambers of the control cells contained 750  $\mu$ L of DMEM supplemented with 10% FBS whereas the lower chambers with treated cells were filled with 1 nM NPY or 1 mM L-NAME diluted in 750  $\mu$ L of DMEM supplemented with 10% FBS. After 6 h of incubation at 37 °C, the cells from the upper surface of the filter were completely removed with gentle swabbing. The remaining migrated cells were fixed for 20 min at room temperature in 4% paraformaldehyde and stained with 0.1% crystal violet in 200 mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (pH 6.0) for 10 min. After adding 10% acetic acid, absorbance was measured by an ELISA microplate reader. The migration index was calculated as the ratio of absorbance of the treated group divided by the absorbance of the control and multiplied by 100 to give the percentage.

#### 2.4. Cell extraction

After 24 h or 72 h of NPY treatment, cells were trypsinized, transferred from each flask into a separate test tube, and centrifuged for 10 min at  $1000 \times g$  and 4 °C in order to remove the culture medium (discarded supernatant). The cells were washed with ice-cold PBS (GIBCO), and after recentrifugation (10 min,  $1000 \times g$ , 4 °C) they were resuspended in a volume of PBS in which the number of cells was  $10^6$ /mL. This cell suspension was used for further analysis.

#### 2.5. The determination of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ )

NPY-treated cells adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/mL in PBS were plated at 100  $\mu$ L/well in a 96-well flat-bottomed plate and mixed with 100  $\mu$ L of 0.1% nitro blue tetrazolium (NBT). The determination of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) was based on the reduction of NBT in the presence of  $O_2^{\cdot-}$  (Auclair and Voisin, 1985). The concentration was expressed as nmol/L in  $10^6$  cells/mL.

#### 2.6. $NO_2^-$ and $H_2O_2$ determination

To determine the concentration of  $NO_2^-$  and  $H_2O_2$ , cell membranes were broken by sonication of the cell suspension on ice with a series of 10 successive acoustic shocks. The samples were then centrifuged for 20 min at  $10,000 \times g$  and 4 °C. The concentrations of nitrites and hydrogen peroxide were determined in the supernatant. The determinations of nitrites ( $NO_2^-$ , indicator of NO concentration) were performed using the Griess method (Green et al., 1982). The determination of the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) concentration was based on oxidation of phenol red in the presence of horseradish peroxidase as

a catalyst (Pick and Keisari, 1980). The concentrations of both parameters were determined by ELISA microplate reader. The concentrations of  $NO_2^-$  were expressed as  $\mu$ mol/L in  $10^6$  cells, while the levels of  $H_2O_2$  were expressed as nmol/L in  $10^6$  cells/mL.

#### 2.7. Glutathione determination

For measuring the concentrations of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), the used supernatant was obtained by the following procedure: the cell suspension was centrifuged for 10 min at  $1000 \times g$  and 4 °C, and after the removal of supernatant, the pellet was resuspended in 2.25% sulfosalicylic acid. Cell membranes were lysed by alternate freezing (-80 °C) and thawing (37 °C) in 3 cycles for 15 min followed by 30 min of centrifugation at  $1000 \times g$ . The concentration of GSH was determined based on GSH oxidation with 5,5-dithiobis-6,2-nitrobenzoic acid (Beutler, 1975). The concentration of GSSG was determined based on GSH determination assay using glutathione reductase (Beutler, 1975) after inhibition of spontaneous GSH oxidation by 4-vinylpyridine. Glutathione concentration was expressed as  $\mu$ mol/L in  $10^6$  cells/mL.

#### 2.8. Statistical analysis

All groups of data were analyzed with SPSS 13.0 for Windows. The results are presented as the mean  $\pm$  SEM using the independent t-test to evaluate significant differences between experimental groups versus the control group. Probability values of less than 0.05 were considered significant.

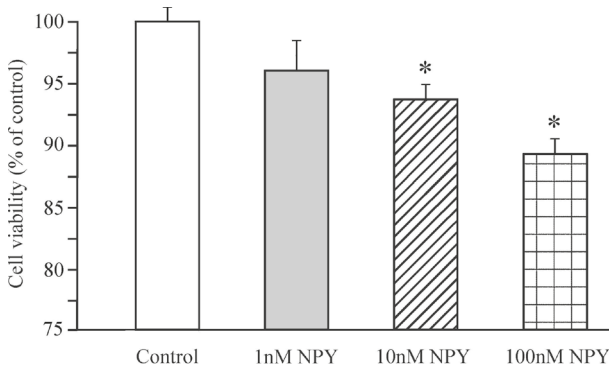
### 3. Results

#### 3.1. MTT viability assay

For the assessment of the appropriate concentration of NPY to be used for the treatment, the effect of this peptide on cytotrophoblast cell viability was examined. To investigate the acute effects of NPY on oxidative stress parameters and migration capacity, the highest noncytotoxic concentration of NPY was used in our study. The results of the MTT test showed that only the concentration of 1 nM was not cytotoxic for the JEG-3 cell line (more than 95% of cells survived). The higher tested concentrations of NPY (10 nM and 100 nM) significantly caused the decrease of the number of living cells (Figure 1).

#### 3.2. Concentrations of oxidative/antioxidative status parameters ( $O_2^{\cdot-}$ , $H_2O_2$ , and $NO_2^-$ )

The concentrations of oxidative stress parameters after exposure to 1 nM NPY were measured in our experiment. The results showed that the concentrations of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  were significantly increased in cells treated with NPY for both 24 h and 72 h compared to the control cells ( $P < 0.05$ ) (Figure 2). In this study the concentrations of  $NO_2^-$  (the indicator of NO) after 1 nM NPY treatment of trophoblast



**Figure 1.** The results of MTT viability assay of human choriocarcinoma cell line JEG-3 exposed to various concentrations of NPY. Data are representative of three independent experiments and values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*: Statistically significant compared to the control group ( $P < 0.05$ ).

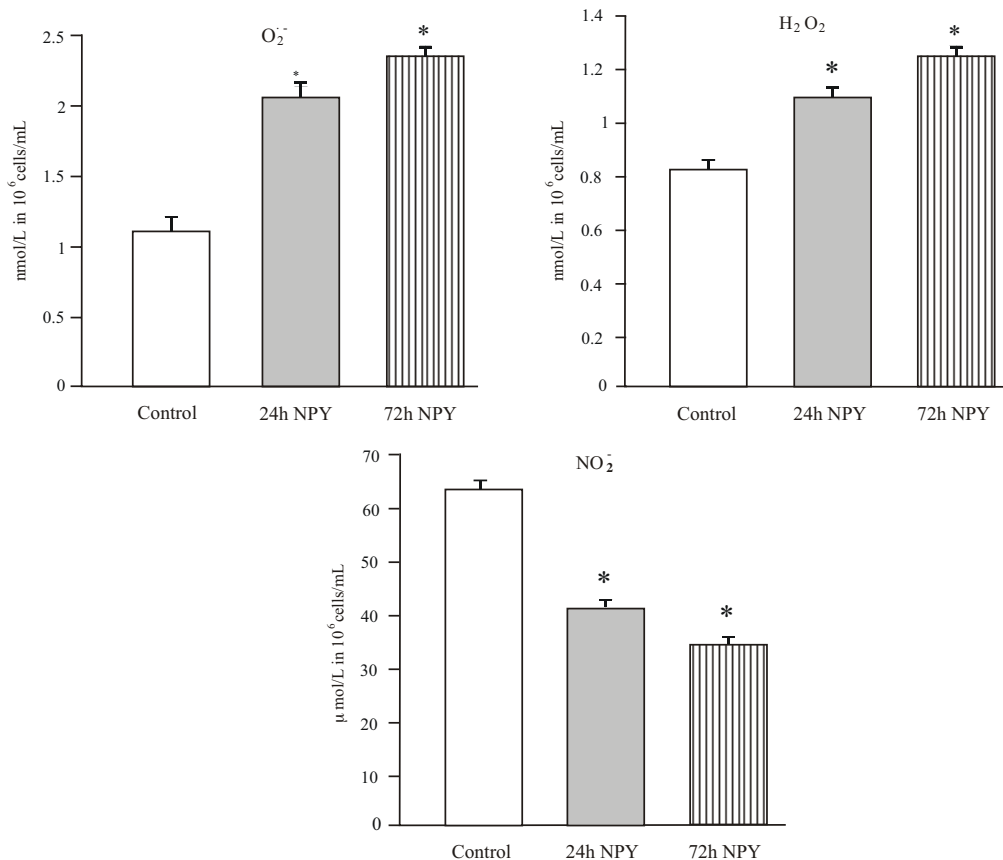
cells were also examined. The results showed that NPY induced significant decrease in the concentrations of  $\text{NO}_2^-$  in the cells treated with NPY for 24 h and even stronger decrease in long-term (72 h) treatment as compared to control cells ( $P < 0.05$ ) (Figure 2).

### 3.4. Concentrations of antioxidant defense system parameters (GSH and GSSG)

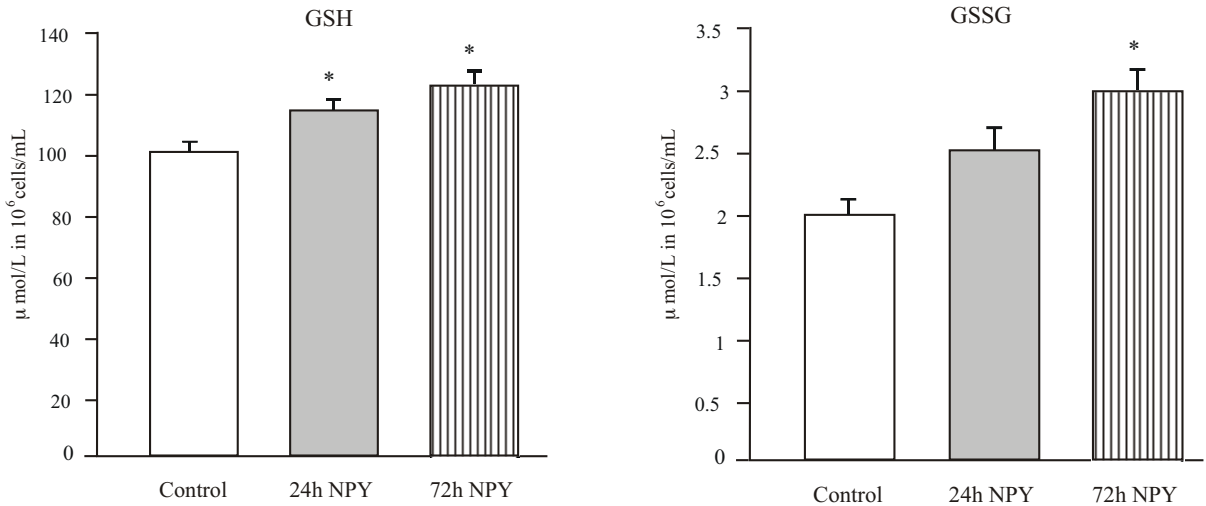
The concentrations of GSH in cells treated with NPY both for 24 h and 72 h were significantly increased compared to control cells ( $P < 0.05$ ) (Figure 3). Glutathione is one of the strongest antioxidative components and its increased concentration may indicate de novo synthesis induced by NPY. No significant changes in the concentration of GSSG were recorded in the cells treated with NPY for 24 h compared to the control cells (Figure 3), which could indicate the initial high activity of glutathione reductase (GR) as one of the major enzymes of the antioxidant defense system in trophoblasts. However, the GSSG level in cells treated with NPY for 72 h was significantly elevated compared to control cells (Figure 3).

### 3.5. Transwell migration assay (Boyden chamber assay)

To examine the effects of NPY on the migration capacity of a human trophoblast cell line, a transwell migration assay was performed. Results showed 1.38-fold and 1.58-fold decrease in the cell migration index of JEG-3 cells exposed to NPY for 24 h and 72 h, respectively, compared to the control cells. Long-term exposure to NPY induced



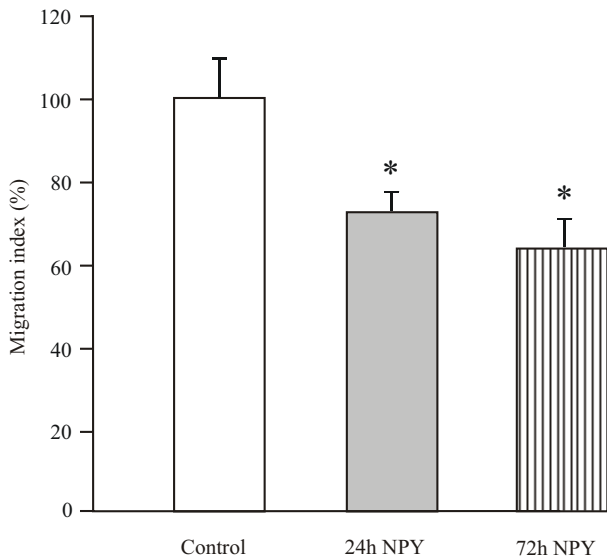
**Figure 2.** The effects of short-term (24 h) and long-term (72 h) exposure to NPY on parameters of oxidative/antioxidative status in human choriocarcinoma cell line JEG-3. Data are representative of three independent experiments and values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*: Statistically significant compared to the control group ( $P < 0.05$ ).



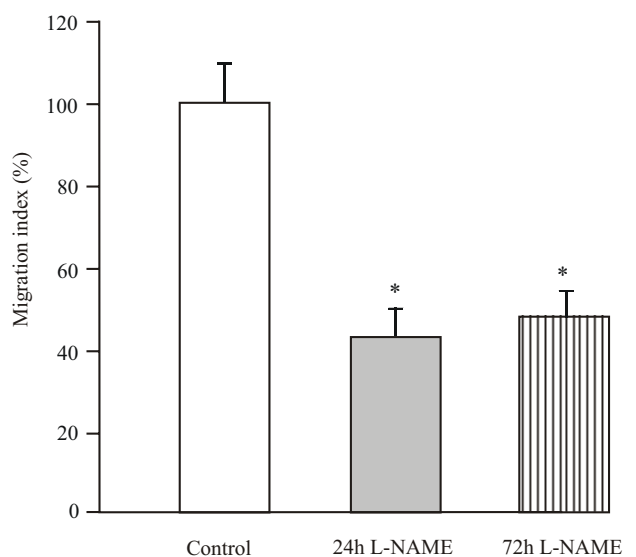
**Figure 3.** The effects of short-term (24 h) and long-term (72 h) exposure to NPY on reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels in human choriocarcinoma cell line JEG-3. Data are representative of three independent experiments and values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*: Statistically significant compared to the control group ( $P < 0.05$ ).

stronger reduction of trophoblast migration compared to 24 h of treatment. These data indicate that treatment with 1 nM NPY significantly reduced the migratory capacity of human choriocarcinoma trophoblast cells (Figure 4). We proposed that NPY-induced reduction of migration capacity was related to a decrease in NO concentration during NPY treatment, so we exposed cells to 1 mM L-NAME (NOS inhibitor) for 24 h and 72 h. Our results showed 2.36-fold decrease in cell migration index in cells

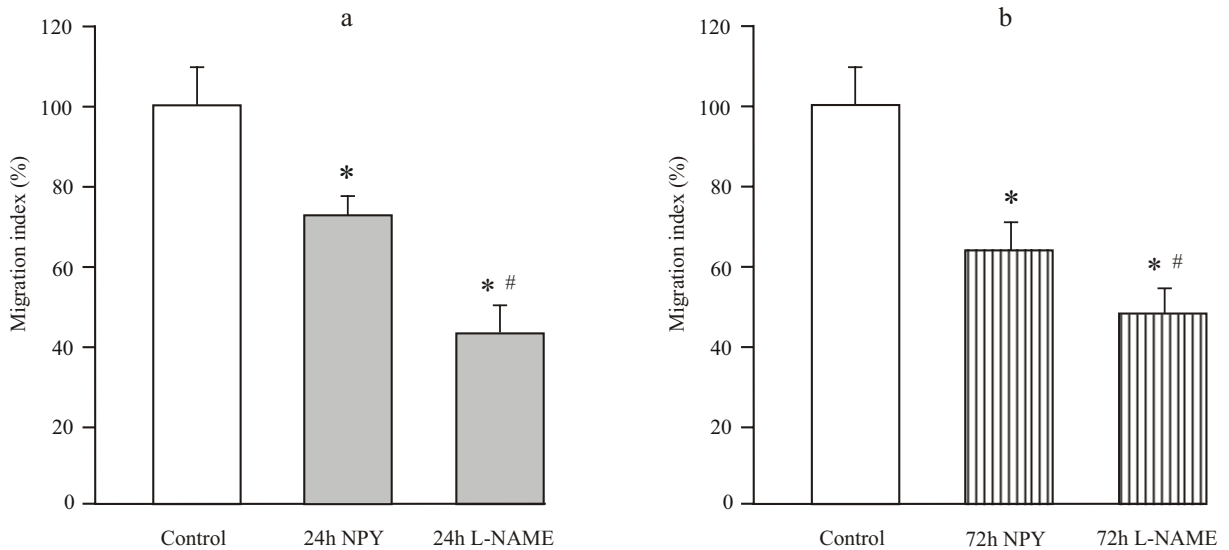
treated with L-NAME for 24 h and 2.14-fold decrease in cells treated with L-NAME for 72 h as compared to control cells (Figure 5). By comparing the migration index of the cells between NPY treatment and L-NAME treatment we could conclude that there was 1.76-fold decrease in cell migration index between short-term NPY and L-NAME exposures (24 h) (Figure 6a) and 1.36-fold decrease in cell migration index between long-term NPY and L-NAME exposures (72 h) (Figure 6b). These data indicate that



**Figure 4.** The effects of short-term (24 h) and long-term (72 h) exposure to NPY on migration capacity of human choriocarcinoma cell line JEG-3. Data are representative of three independent experiments and values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*: Statistically significant compared to the control group ( $P < 0.05$ ).



**Figure 5.** The effects of short-term (24 h) and long-term (72 h) exposure to L-NAME on migration capacity of human choriocarcinoma cell line JEG-3. Data are representative of three independent experiments and values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*: Statistically significant compared to the control group ( $P < 0.05$ ).



**Figure 6.** The ratio between the effects on migration capacity of human choriocarcinoma cell line JEG-3 of short-term (24 h) and long-term (72 h) exposure of these cells to 1 nM NPY and 1 mM L-NAME, respectively. Data are representative of three independent experiments and values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*: Statistically significant compared to the control group ( $P < 0.05$ ).

NO depletion by L-NAME, and to a lesser extent by NPY, is responsible for decreased cell migration capacity. Together, these results suggest that reduced migration of human trophoblast cell line JEG-3 could be mediated by decreased levels of NO.

#### 4. Discussion

Trophoblast migration is an essential step in successful implantation and formation of the placenta (Pijnenborg et al., 1983; Knöfler and Pollheimer, 2013). Khatun et al. (2000) showed that high concentrations of NPY may contribute to the development of preeclampsia, which is characterized by shallow trophoblast invasion. We proposed that NPY, regarding its increased level in preeclampsia, could be one of the factors that affect the migratory capacity of trophoblast cells by inducing oxidative stress. Various studies reported signal pathways that can affect the oxidative/antioxidative balance in cells. NPY has been shown to trigger the phospholipase C-protein kinase C (PLC-PKC) pathway, activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) via its receptors in human syncytiotrophoblasts and hamster suprachiasmatic nuclei cells (Robidoux et al., 1998; Schak et al., 2001). NADPH oxidase is an important respiratory chain enzyme and represents the main source of superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) in neutrophils, vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and trophoblasts (Griendling et al., 2000; Halliwell and Gutteridge, 2007). So far, the  $Y_1$  and  $Y_3$  receptors for this peptide have been described in human trophoblasts as a mixed population (Robidoux et al., 1998, 2000). Prooxidative effects of

neuropeptide Y mediated via  $Y_1$  and  $Y_2$  receptors were recorded in macrophages (Dimitrijevic et al., 2005; Bedoui et al., 2008), suggesting that elevated levels of reactive oxygen species in trophoblasts exposed to NPY could be caused by the elevated activity of NADPH oxidase in these cells. However, the possible activity alterations of NADPH oxidase induced by NPY exposure in trophoblasts are yet to be determined.

In this study we measured both the levels of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). Although these molecules might not directly interfere with nitric oxide, they are accepted as important markers of the oxidative/antioxidative status of the cell. Glutathione levels were measured in order to elucidate the intensity of oxidative stress induced by neuropeptide Y in trophoblasts, and to examine some antioxidative performances of these cells as well. The results showed increased levels of glutathione in both NPY treatments (24 h and 72 h). Reduced glutathione, a tripeptide consisting of cysteine, glutamate, and glycine, is one of the strongest antioxidative components in cells, maintaining intracellular thiol status and detoxicating various metabolites, essential for optimal activity of some enzymes and other cellular macromolecules (Chung et al., 2016). Since GSH is a potent electron donor, it represents the major nonenzymatic antioxidant component and one of the most important scavengers of free radicals, converting itself to the oxidized dimeric form, GSSG (Jones, 2002). Increased concentrations of reduced glutathione (GSH) recorded in our experiment suggest de novo synthesis of GSH induced by NPY. GSH is synthesized in cells de

novo and rapid induction of intracellular GSH synthesis occurs in response to various stressors (Kondo et al., 1993; Shi et al., 1994). Oxidative stress has been shown to induce transcriptional upregulation of the enzyme in the GSH biosynthesis pathway,  $\gamma$  GCS- $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase (Rahman and MacNee, 1999; Ray et al., 2002). The cell culture medium (DMEM) contains a significant amount of cystine, which is one of the components used in GSH biosynthesis. Our results show the elevated levels of glutathione (GSH), which might be caused by de novo synthesis. The increased activity of GSH biosynthesis enzymes could be due to the high concentrations of reactive oxygen species generated in trophoblasts by NPY. Elevated GSH levels appear to be an important defense mechanism in human cytotrophoblasts in response to aggressive oxidative stress radicals induced by NPY. An increase in GSSG levels and reduction of the GSH/GSSG ratio indicates glutathione antioxidative activity in response to oxidative stress, which could lead to numerous cell damages (Lu, 2009). No significant changes in the concentrations of GSSG were recorded in cells treated with NPY for 24 h compared to the control cells (Figure 3), which could indicate the initial high activity of glutathione reductase (GR) as one of the major enzymes of the antioxidant defense system in trophoblasts. Since trophoblasts have stem cell features, the basal antioxidative activity of these cells may be higher compared to the other highly differentiated cell types (Aplin et al., 1999; Baczyk et al., 2006; Shenghui et al., 2009; Kobayashi and Suda, 2012). However, after long-term NPY exposure, trophoblast cells express increased levels of oxidized glutathione (GSSG). This elevation might be caused by prolonged production of reactive oxygen species generated by long-term NPY exposure, exceeding the reductive capacity of the GR enzyme and leading to accumulation of GSSG. The activity of GR and other antioxidant defense enzymes in JEG-3 cells is yet to be determined. Our results indicate the high basic antioxidant potential of trophoblasts, which could mean that NPY has the ability to generate an abundant burst of reactive oxygen species in trophoblast cells. The increased levels of  $H_2O_2$  and  $O_2^{\cdot-}$  during NPY exposure demonstrated in our study suggest that this peptide is a significant inducer of oxidative stress in this cell line.

In human trophoblasts both iNOS and eNOS are present, so these cells synthesize NO (Rossmann et al., 1999; Hambartsoumian et al., 2001). Various actions of nitric oxide are known to contribute to the maintenance of pregnancy. Numerous data show that oxidative stress contributes to altered NO bioavailability (Pandey and Rizvi, 2010; Prokić et al., 2015). Superoxide anion radical, when produced in high concentrations, scavenges nitric oxide and forms cytotoxic peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) (Jourdeheuil et al., 2001; Calabrese et al., 2007). Not only does the

superoxide anion radical oxidize lipids and proteins in cell membranes and cytoplasm, but the formation of peroxynitrites also results in reduced NO bioavailability, affecting NO-mediated pathways. Nitric oxide has been shown to affect cell migration and invasion in a variety of cell types (Murohara et al., 1999; Giordano et al., 2006; Li et al., 2009). In vitro studies showed that motility and invasion of trophoblast cells also depend on trophoblast-derived NOS (Cartwright et al., 1999; Harris et al., 2008). Nitric oxide has significant roles in cell migration via regulation of integrin phosphorylation (Chigaev et al., 2011). NO appears to be involved in the regulation of the phosphorylated state of two adhesion molecules, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) and  $\alpha 4\beta 1$  integrin. These adhesion molecules are important in trophoblast interaction with endothelial cells in uterine arteries and their ligand binding affinity depends on phosphorylation performed by NO-dependent protein kinase G (Cartwright and Balarajah, 2005). In this study, the effects of NO depletion in the JEG-3 cell line on cell migration capacity were examined by treating the cells with 1 mM L-NAME, which is the inhibitor of NOS enzymes. Our data showed over 2-fold decrease in migration capacity (Figure 5), suggesting the essential role of nitric oxide in the migration mechanisms of these cells. The results obtained in a study by Harris et al. suggest that nitric oxide could also promote trophoblast invasion by mechanisms other than phosphorylation; S-nitrosylation of proteins at the leading edge of trophoblasts contributes to the elevated migration of these cells (Harris et al., 2008). The results of our experiment show that NPY treatment increased  $O_2^{\cdot-}$  and decreased NO levels, suggesting that the formation of peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) is one of the possible mechanisms of reducing NO bioavailability in JEG-3 cells, contributing to the reduction of NO-dependent migration capacity. Moreover, regarding the presence of NO-producing enzymes (eNOS and particularly iNOS) in human trophoblasts (Rossmann et al., 1999; Hambartsoumian et al., 2001), we assume that long-term (72 h) NPY treatment might affect expression patterns of these enzymes. Stronger reduction in NO bioavailability, as well as more severe reduction of migration capacity recorded in long-term NPY-treated cells in comparison to short-term NPY treatment, could be caused by prolonged production of reactive oxygen species (especially  $O_2^{\cdot-}$ ) and/or by changes in expression levels of NO-generating enzymes. In further research, we plan to investigate mRNA levels and protein quantification of iNOS in long-term NPY treatment of the same cell line.

Although the majority of studies have reported invasion-promoting effects of NPY on various cell types (Ruscica et al., 2007; Sheriff et al., 2010), there are a number of data that indicate its antimigratory and antiproliferative effects.

NPY administration to a variety of invasive cancers results in reduced invasive potential and/or decreased proliferation of cells of these tumors in a concentration-dependent manner. NPY administration to a number of prostate cancer cell lines inhibited the proliferation through an NPYR1-dependent mechanism, while NPY administration to cholangiocarcinoma cells in vitro reduced the invasion potential of these tumor cells in a concentration-dependent manner (Ogasawara et al., 1997; DeMorrow et al., 2011). One study indicated NPY as an inhibitor of migration of monocytes to the tissue (Nave et al., 2004). The results of our investigation also indicate an antimigratory role of NPY on human cytotrophoblast cells.

According to the results we conclude that NPY induces oxidative stress in human trophoblast cell line JEG-3 by stimulating increased production of oxygen reactive species such as  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  both in short-term (24 h) and long-term (72 h) treatments. The levels of GSH, as one of the main antioxidative components in trophoblasts, are increased probably due to its elevated de novo biosynthesis in response to NPY exposure, which implies considerable basal antioxidative capacity of human trophoblasts. Nevertheless, the increased levels of oxidized glutathione (GSSG) after long-term NPY exposure may suggest that NPY is a significant generator of oxidative stress, which can surpass the inherent trophoblast antioxidative capacity. The concentrations of nitric oxide are significantly decreased in trophoblasts exposed to NPY for both 24 h and 72 h of treatment compared to the control cells, as well as the migratory capacity of trophoblasts, with more severe reduction during long-term (72 h) exposure. Based on these data, we proposed

that 24 h and 72 h of NPY treatment reduced the migratory potential of human choriocarcinoma trophoblast cells by reducing the bioavailability of NO. The short-term and long-term treatments with a specific inhibitor of NOS enzymes (L-NAME) reduced the migration index of these cells. Accordingly, we assume that this motility reduction is caused by depleted bioavailability of NO, which affects NO-dependent migration pathways. NO is involved in the regulation of the function of cell adhesion molecules, presumably the integrins, important for cell motility. Since NO reduction is mediated by superoxide anion radical scavenging of free nitric oxide and possibly by altering the activities and expression patterns of NO-generating enzymes, we assume that NPY is responsible for depleted migration capacity of human trophoblasts by generating considerable oxidative stress in these cells. In future studies, we plan to examine the effects of NPY on the other antioxidant defense system components in trophoblasts, as well as on the expression patterns and activities of oxidative stress generating enzymes, such as NADPH oxidase. Furthermore, the impact of NPY on the activities and expressions of iNOS enzymes, and on the expression and distribution of both adhesion and invasion proteins, will be examined as well. These data should contribute to a better understanding of underlying mechanisms of placental disorders.

#### Acknowledgments

This study was supported by the Ministry of Education, Science, and Technological Development of the Republic of Serbia, grant no. 173041. We thank Dr Radmila Paunović-Štajn for proofreading the article.

#### References

- Aplin JD, Haigh T, Jones CJ, Church HJ, Vicovac L (1999). Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin  $\alpha\beta 1$ . *Biol Reprod* 60: 828-838.
- Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, pp. 123-132.
- Baczyk D, Dunk C, Huppertz B, Maxwell C, Reister F, Giannoulis D, Kingdom JC (2006). Bi-potential behaviour of cytotrophoblasts in first trimester chorionic villi. *Placenta* 27: 367-374.
- Bedoui S, Kromer A, Gebhardt T, Jacobs R, Raber K, Dimitrijevic M, Heine J, Von Horsten S (2008). Neuropeptide Y receptor-specifically modulates human neutrophil function. *J Neuroimmunol* 195: 88-95.
- Benest AV, Stone OA, Miller WH, Glover CP, Uney JB, Baker AH (2008). Arteriolar genesis and angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase overexpression results in a mature vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1462-1468.
- Beutler E (1975). Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E, editor. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. 7th ed. New York, NY, USA: Grune and Stratton, pp. 112-114.
- Bryan NS, Grisham M (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* 43: 645-657.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 8: 766-775.



- Cartwright JE, Balarajah G (2005). Trophoblast interactions with endothelial cells are increased by interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor alpha and involve vascular cell adhesion molecule-1 and  $\alpha_4\beta_1$ . *Exp Cell Res* 304: 328-336.
- Cartwright JE, Holden DP, Whitley GSJ (1999). Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide. *Br J Pharmacol* 128: 181-189.
- Chaddha V, Viero S, Huppertz B, Kingdom J (2004). Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med* 9: 357-369.
- Chen HC (2005). Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol* 294: 15-22.
- Chigaev A, Smagley Y, Sklar LA (2011). Nitric oxide/cGMP pathway signaling actively down-regulates  $\alpha_4\beta_1$ -integrin affinity: an unexpected mechanism for inducing cell de-adhesion. *BMC Immunol* 12: 28.
- Chung BY, Choi SR, Moon IJ, Park CW, Kim YH, Chang SE (2016). The glutathione derivative, GSH monoethyl ester, may effectively whiten skin but GSH does not. *Int J Mol Sci* 17: 629.
- De la Fuente M, Del Rio M, Medina S (2001). Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol* 116: 156-167.
- DeMorrow S, Onori P, Venter J, Invernizzi P, Frampton G, White M, Franchitto A, Kopriya S, Bernuzzi F, Francis H et al. (2011). Neuropeptide Y inhibits cholangiocarcinoma cell growth and invasion. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: 1078-1089.
- Dimitrijevic M, Stanojevic S, Vujic V, Beck-Sickinger A, Von Horsten S (2005). Neuropeptide Y and its receptor subtypes specifically modulate rat peritoneal macrophage functions in vitro: counter regulation through Y1 and Y2/5 receptors. *Regul Pept* 124: 163-172.
- Farzi A, Reichmann F, Holzer P (2015). The homeostatic role of neuropeptide Y in immune function and its impact on mood and behavior. *Acta Physiol (Oxf)* 213: 603-627.
- Ferreira R, Xapelli S, Santos T, Silva AP, Cristóvão A, Cortes L, Malva JO (2010). Neuropeptide Y modulation of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-induced nitric oxide production in microglia. *J Biol Chem* 285: 41921-41934.
- Giordano D, Magaletti DM, Clark EA (2006). Nitric oxide and cGMP protein kinase (cGK) regulate dendritic-cell migration toward the lymph-node-directing chemokine CCL19. *Blood* 107: 1537-1545.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501.
- Halliwel B, Gutteridge JM (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. New York, NY, USA: Oxford University Press.
- Hambartsoumian E, Srivastava RK, Seibel MM (2001). Differential expression and regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in human trophoblasts in vitro. *Am J Reprod Immunol* 45: 78-85.
- Harris LK, McCormick J, Cartwright JE, Whitley GS, Dash PR (2008). S-nitrosylation of proteins at the leading edge of migrating trophoblasts by inducible nitric oxide synthase promotes trophoblast invasion. *Exp Cell Res* 314: 1765-1776.
- Heilig M (2004). The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides* 38: 213-224.
- Hsieh HJ, Liu CA, Huang B, Tseng AHH, Wang DL (2014). Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J Biomed Sci* 21: 3.
- Jaimes EA, Sweeney C, Raji L (2001). Effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on endothelial nitric oxide production. *Hypertension* 38: 877-883.
- Jones DP (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Meth Enzymol* 348: 93-112.
- Jourd'heuil D, Jourd'heuil FL, Kutchukian PS, Musah RA, Wink DA, Grisham MB (2001). Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite /implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo. *J Biol Chem* 276: 28799-28805.
- Khatun S, Kanayama N, Belayet HM, Bhuiyan AB, Jahan S, Begum A, Kobayashi T, Terao T (2000). Increased concentrations of plasma neuropeptide Y in patients with eclampsia and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 182: 896-900.
- Knöfler M, Pollheimer J (2013). Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet* 4: 190.
- Kobayashi CI, Suda T (2012). Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. *J Cell Physiol* 227: 421-430.
- Kondo T, Yoshida K, Urata Y, Goto S, Gasa S, Taniguchi N (1993)  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase and active transport of glutathione S-conjugate are responsive to heat shock in K562 erythroid cells. *J Biol Chem* 268: 20366-20372.
- Krause BJ, Hanson MA, Casanello P (2011). Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta* 32: 797-805.
- Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari H (2013). Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 14: 24438-24475.
- Li N, Lu X, Zhao X, Xiang FL, Xenocostas A, Karmazyn M, Feng Q (2009). Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ . *Stem Cells* 27: 961-970.
- Loke YW, King A, Burrows TD (1995). Decidua in human implantation. *Hum Reprod* 10: 14-21.
- Lu SC (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspec Med* 30: 42-59.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.

- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM (1999). Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1156-1161.
- Nave H, Bedoui S, Moenter F, Steffens J, Felies M, Gebhardt T, Straub RH, Pabst R, Dimitrijevic M, Stanojevic S et al. (2004). Reduced tissue immigration of monocytes by neuropeptide Y during endotoxemia is associated with Y2 receptor activation. *J Neuroimmunol* 155: 1-12.
- Nazroğlu M (2015). Role of melatonin on calcium signaling and mitochondrial oxidative stress in epilepsy: focus on TRP channels. *Turkish J Biol* 39: 813-821.
- Ogasawara M, Murata J, Ayukawa K, Saiki I (1997). Differential effect of intestinal neuropeptides on invasion and migration of colon carcinoma cells in vitro. *Cancer Lett* 119: 125-130.
- Pandey KB, Rizvi SI (2010). Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev* 3: 2-12.
- Pennisi DJ, Kinna G, Chiu HS, Simmons DG, Wilkinson L, Little MH (2012). Crim1 has an essential role in glycogen trophoblast cell and sinusoidal-trophoblast giant cell development in the placenta. *Placenta* 33: 175-182.
- Pick E, Keisari Y (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38: 161-170.
- Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I (1983). Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 4: 397-413.
- Prokić MD, Paunović MG, Matic MM, Djordjević NZ, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Saičić ZS (2015). Effect of aspartame on biochemical and oxidative stress parameters in rat blood. *Arch Biol Sci* 67: 535-545.
- Rahman I, MacNee W (1999). Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 277: 1067-1088.
- Ray S, Watkins DN, Misso NL, Thompson PJ (2002). Oxidant stress induces gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in human bronchial epithelial NCI-H292 cells. *Clin Exp Allergy* 32: 571-577.
- Robidoux J, Simoneau L, St-Pierre S, Ech-Chadli H, Lafond J (1998). Human syncytiotrophoblast NPY receptors are located on BBM and activate PLC-to-PKC axis. *Am J Physiol* 274: 502-509.
- Robidoux J, Simoneau L, St-Pierre S, Masse A, Lafond J (2000). Characterization of neuropeptide Y-mediated corticotropin-releasing factor synthesis and release from human placental trophoblasts. *Endocrinology* 141: 2795-804.
- Rossmannith WG, Hoffmeister U, Wolfahrt S, Kleine B, McLean M, Jacobs RA, Grossman AB (1999). Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Mol Hum Reprod* 5: 487-494.
- Ruscica M, Dozio E, Motta M, Magni P (2007). Modulatory actions of neuropeptide Y on prostate cancer growth: role of MAP kinase/ERK 1/2 activation. *Adv Exp Med Biol* 604: 96-100.
- Schak KM, Scordilis SP, Ferreyra GA, Harrington ME (2001). Neuropeptide Y activates protein kinase C in hamster suprachiasmatic nuclei brain slices. *Biol Rhythm Res* 32: 201-206.
- Shenghui H, Nakada D, Morrison SJ (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 377-406.
- Sheriff S, Ali M, Yahya A, Haider KH, Balasubramaniam A, Amlal H (2010). Neuropeptide Y Y5 receptor promotes cell growth through extracellular signal-regulated kinase signaling and cyclic AMP inhibition in a human breast cancer cell line. *Mol Cancer Res* 8: 604-614.
- Shi MM, Iwamoto T, Forman HJ (1994).  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase and GSH increase in quinone-induced oxidative stress in BPAEC. *Am J Physiol* 267: 414-421.
- Von Mandach U, Lauth D, Huch R (2003). Maternal and fetal nitric oxide production in normal and abnormal pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 13: 22-27.
- Zhou GQ, Baranov V, Zimmermann W, Grunert F, Erhard B, Mincheva-Nilsson L, Hammarström S, Thompson J (1997). Highly specific monoclonal antibody demonstrates that pregnancy-specific glycoprotein (PSG) is limited to syncytiotrophoblast in human early and term placenta. *Placenta* 18: 491-501.