

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana M. Medigović

MORFOFUNKCIONALNE OSOBINE  
REPRODUKTIVNOG SISTEMA  
NEZRELIH I ACIKLIČNIH ŽENKI PACOVA  
NAKON TRETMANA FITOESTROGENIMA  
IZ SOJE

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivana M. Medigović

MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF  
REPRODUCTIVE SYSTEM OF  
IMMATURE AND MIDDLE-AGED FEMALE  
RATS AFTER TREATMENTS WITH SOY  
PHYTOESTROGENS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

# MENTORI

---

**dr Nataša Nestorović**, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”,  
Univerzitet u Beogradu

**dr Aleksandra Korać**, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

# KOMISIJA

---


**dr Nataša Nestorović**, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”,  
Univerzitet u Beogradu

**dr Aleksandra Korać**, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Verica Milošević**, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”  
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

---



Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Odeljenju za Citologiju Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta “Odgovor neuroendokrinog sistema pacova na odabrane biljne ekstrakte, fitoestrogene, steroidne i peptidne hormone” (br. 173009) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

# *Hvala Vam*

**Dr Nataši Nestorović**, mojoj Mentorki, ogromnu zahvalnost dugujem na podršci koju mi je pružila prilikom prvih naučnih koraka, na svemu što me je naučila i podstakla da naučim, na nadahnuću, na većitom preispitivanju kao jedinom putu intelektualnog usavršavanja, na dugim konstruktivnim razgovorima i usađenom imperativu da uvek težim ka boljem.

**Dr Aleksandri Korać**, na poverenju koje mi je ukazala, i na inspirativnim predavanjima i konsultacijama tokom osnovnih i doktorskih studija, sa posebno kreativnim pristupom biologiji ćelija, kojim je trajno obeležila moj naučni put.

**Dr Verici Milošević** na brizi, razumevanju, osloncu, na veri i strpljenju, a posebno na samopregornom ličnom i profesionalnom zalaganju prilikom kreiranja radnog ambijenta na Projektu, na sadržajnim diskusijama i sugestijama koje su značajno doprinele kvalitetu ove teze. Čast mi je, zadovoljstvo i privilegija što sam deo njenog naučno-istraživačkog tima.

**Jasmini Živanović**, na njenoj nepresušnoj energiji kojom nas je gurala kroz najteža razdoblja u izradi naših teza, na svim eksperimentima koje smo zajedno uz smeh uradile u trećoj smeni, a najviše na prijateljstvu. Postoje u nama neke neprevodive dubine, postoje u nama neke stvari neprevodive u reči, a reči bi sve pokvarile.

Veliku zahvalnost dugujem našim momcima, **Vladi** i **Marku**, za podršku, pomoć i neprocenjivo prijateljstvo koje mi nesebično pružaju, jer prijateljstvo se ne bira, ono biva.

**Dr Nataši Ristić** na vedrini, optimizmu i lepoti koje je darivala od prvih dana našeg poznanstva, na sugestijama i konstruktivnim savetima, kao i za mnogogodišnju podršku, koja mi je veoma značila.

**Dr Milki Sekulić** na pozitivnom duhu koji je unosila u našu svakodnevnu komunikaciju i na beskompromisnoj afirmaciji pravih vrednosti i stremljenju ka ostvarenju ideala.

Dragim kolegama, **Milici**, **Branku**, **Branki** i **Lani** sa kojima sam svih ovih godina lepo saradivala zahvaljujem na dugogodišnjoj podršci, toleranciji, konstruktivnim razgovorima i nesebičnoj pomoći na koju sam uvek mogla da računam.

**Kolegama sa Katedre za Biologiju ćelija i tkiva** Biološkog fakulteta zahvaljujem na predusretljivosti, profesionalnosti i velikoj stručnoj pomoći u radu na konfokalnom mikroskopu.

Mojim kolegenicima i drugaricama, neprevaziđenoj **Mariji** i božanstvenoj **Ani**, koje su unosile osmehe i pesmu u napore radne dane, a često i vikende.

Najdražim prijateljima **Tanji**, **Jeleni**, **Danici**, **Senki**, **Vladi**, **Marku**, **Zokiju** i mom **Milošu**, koji su bili moja bezrezervna podrška, tu pored mene, uvek spremni da saslušaju, razumeju i pomognu da istrajem.

Hvala mojoj **mami**, **baki** i **dedi** na beskrajnoj ljubavi i podršci, a posebno na hrabrosti koju su imali kada su mi podarili svoj najveći poklon - samostalnost.

# MORFOFUNKCIONALNE OSOBINE REPRODUKTIVNOG SISTEMA NEZRELIH I ACIKLIČNIH ŽENKI PACOVA NAKON TRETMANA FITOESTROGENIMA IZ SOJE

---

## Rezime

Fitoestrogeni iz soje, pre svega genistein i daidzein, su veoma zastupljeni u životu savremenog čoveka, kako kroz ishranu, tako i kroz pomoćna lekovita sredstva. Zbog svog selektivno modulatorskog, tj. tkivno specifičnog estrogenskog delovanja, fitoestrogeni poslednjih godina postaju atraktivno polje intenzivnih studija. Period gašenja reproduktivne funkcije kod žena, tj. menopauza, vrlo često je praćen tegobama i poremećajima koje su posledica smanjenja koncentracije endogenog estradiola, odnosno funkcije ovarijuma. Stoga je jedna od mogućih terapijskih aplikacija genisteina i daidzeina upravo sprečavanje i ublažavanje ovih tegoba, a kao alternativa supstitucionoj hormonskoj terapiji. Međutim, njihovo delovanje na organe ženskog reproduktivnog sistema, naročito u periodu menopauze, još uvek nije u potpunosti istraženo.

Cilj ove studije obuhvata rasvetljavanje dejstava fitoestrogena na reproduktivni sistem nezrelih i acikličnih ženki pacova. Od posebnog interesa je jasno definisanje potencijala fitoestrogena u poboljšanju funkcije reproduktivnog sistema u animalnom modelu menopauze, kao i poređenje efekata njihove aplikacije sa onima koje ima aplikacija terapijske doze estradiol dipropionata, koji se koristi kao lek izbora u prevenciji i terapiji menopauzalnih simptoma.

Za ispitivanje estrogenske aktivnosti fitoestrogena (genisteina i daidzena) korišćen je uterotrofni esej po protokolu Organizacije za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD). Ženkama pacova starosti 19 dana aplikovani su fitoestrogeni (genistein i daidzein), tokom tri dana u tri doze (visokoj, srednjoj i niskoj). U okviru protokola predviđene su i kontrolne

grupe - pozitivne kontrolne grupe, koje su primale  $17\alpha$ -etinil estradiol (u dve doze), negativne kontrolne grupe koje su primale rastvarače, kao i intaktna kontrolna grupa.

Nakon uterotrofnog eseja, utvrđeno je koja doza fitoestrogena (genisteina i daidzeina) ispoljava minimalan estrogenski efekat. Ta doza je, tokom četiri nedelje, aplikovana acikličnim ženka pacova starosti 12 meseci, koje predstavljaju eksperimentalni model menopauze. Na ovaj način utvrđeno je da li ispitivani fitoestrogeni (genistein i daidzein) imaju efekat na strukturu i funkciju organa reproduktivnog sistema, hipofize, ovarijuma, uterusu i vagine. Dodatno su efekti fitoestrogena poređeni sa efektima koje u organima reproduktivnog sistema izaziva terapijska doza estradiol dipropionata.

Promene u strukturi i funkciji organa reproduktivnog sistema analizirane su histološkim, imunofluorescentnim, savremenim stereološkim, morfometrijskim i molekularno biološkim metodama. Imunofluorescentno obeležavanje specifičnih antigena, omogućilo je vizuelizaciju gonadotropnih i laktotropnih ćelija hipofize, i izračunavanje relativnog intenziteta fluorescentnog signala. Istim metodama, detektovano je i prisustvo laktoferina, kao i steroidnih receptora u uterusu nezrelih i acikličnih ženki pacova. Metodama savremene stereologije, uz pomoć *newCast* stereološkog softverskog sistema, određeni su volumeni organa, volumenske gustine osnovnih gradivnih faza organa, kao i broj i volumen pojedinačnih granulosa luteinskih ćelija u žutim telima. Izračunavanje visine endometrijalnog epitela, broja endometrijalnih žlezda, broja ovarijalnih folikula u različitim stadijumima folikulogeneze i atrezije kao i broja, kako pojedinačnih klasa, tako i ukupnog broja žutih tela, omogućila je primena morfometrijskih metoda. Molekularno biološka metoda, reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu "Real-time" PCR, korišćena je za određivanje relativne ekspresije gena za estrogenski receptor alfa ( $ER\alpha$ ), estrogenski receptor beta ( $ER\beta$ ) i progesteronski receptor (PR) u uterusu acikličnih ženki pacova. Dobijeni rezultati su statistički obrađeni.

Uterotrofnim esejem pokazano je da genistein u dozama od 35 i 50 mg/kg telesne mase na dan ispoljava estrogensko delovanje, koje se ogleda u gravimetričkom porastu uterusa, te možemo reći da deluje kao agonista estradiola, dok daidzein ne izaziva ove efekte. Evaluacijom visoke, srednje i niske doze ustanovljeno je da genistein aplikovan u visokoj i srednjoj dozi, ima ulogu estrogenskog agoniste u pogledu svih ispitivanih karakteristika u uterusu, hipofizi i vagini nezrelih ženki pacova. Međutim, iste doze su u ovarijumima uslovile antagonističko delovanje. Zahvaljući uključivanju dodatnih analiza, osetljivost uterotrofne probe je povećana i ustanovljeno je da i daidzein poseduje estrogensko delovanje u svim ispitivanim dozama, koje se ogleda u povećanju broja i volumenske gustine endometrijalnih žlezda i stimulaciji gonadotropnih i laktotropnih ćelija hipofize. Minimalne efektivne doze, tj. doze koje izazivaju estrogenski efekat u organima ženskog reproduktivnog sistema, su doze od 35 mg/kg telesne mase na dan genisteina i daidzeina.

U animalnom modelu menopauze, tretman estradiolom je izazvao inhibiciju gonadotropnih ćelija, koja se ogleda, ne samo u smanjenju intenziteta fluorescentnog signala, već i u smanjenju veličine ćelija. Istovremeno, estradiol je delovao stimulatorno na laktotropne ćelije, povećanjem njihove zastupljenosti, kao i povećanjem relativnog intenziteta fluorescentnog signala immunoobeležnog prolaktina. Nakon tretmana genisteinom i daidzeinom, nasuprot estradioloskom tretmanu, izostaju promene u relativnom intenzitetu fluorescentnog signala unutar gonadotropnih i laktotropnih ćelija. Međutim, fitoestrogeni su izazvali promene u morfologiji ćelija. Gonadotropne ćelije su veće, dok su laktotropne ćelije nešto manje u poređenju sa kontrolnom grupom. Međutim, fitoestrogeni su u navedenim ćelijskim populacijama uslovili promenu oblika, dok se u citoplazmi uočavaju nebojeni delovi koji joj daju izgled vakuoliziranosti.



Hroničan tretman terapijskim dozama estradiola, u ovarijumima acikličnih ženki, generalno je pokazao negativan uticaj. U grupi malih folikula izazvao je značajno povećanje atretičnih, primordijalnih, primarnih i preantralnih folikula. Slična slika je uočena i u grupi antralnih folikula. Tretman estradiolom, uslovio je povećanje broja i volumena žutih tela, koje za posledicu ima povećanje volumena ovarijuma. Međutim, hronična aplikacija kako genisteina, tako i daidzeina, uslovlila je višestruko povećanje broja folikula inicijalne faze folikulogeneze (primordijalnih i primarnih). Sa druge strane, genistein i daidzein nisu uticali na promenu apsolutnog broja atretičnih primordijalnih folikula, dok su značajno smanjili atreziju primarnih folikula. Tretmani fitoestrogenima nisu uticali na promenu sume preantralnih i antralnih folikula, dok su izazvali smanjenje apsolutnog broja atretičnih antralnih folikula. Tretman genisteinom, nije uticao ni na promenu pojedinačnih klasa žutih tela, kao ni na promenu njihovog ukupnog broja. Za razliku od genisteina, daidzein je povećao brojnost zrelih žutih tela, što je uzrokovalo povećanje njihovog ukupnog broja, usled čega je došlo i do povećanja apsolutnog volumena ovarijuma. Međutim, usled očuvanja zdravih folikula, oba tretmana su uzrokovala povećanje volumena folikularnog parenhima.

Tretman estradiolom izazvao je povećanje apsolutne i relativne mase uterusa, koje je posledica povećanja volumenskih gustina endometrijuma, endometrijalnog epitela i endometrijalnih žlezda. Ekspresija ER $\alpha$  je smanjena, PR povećana, dok promene u ekspresiji ER $\beta$  izostaju. Nakon tretmana genisteinom, uočena je povećana masa uterusa, kao i povećana volumenska gustina endometrijuma. Genistein je smanjio ekspresiju ER $\alpha$ , i povećao ekspresiju PR i ER $\beta$ . Za razliku od genisteina, daidzein nije izmenio masu uterusa, njegove morfološke i stereološke karakteristike, kao ni ekspresiju ER $\alpha$  i PR, dok je uslovio povećanje ER $\beta$ .

Aplikacija estradiola izazvala je hipertrofiju vaginalnog epitela, praćenu deskvamacijom ćelija. Nakon tretmana fitoestrogenima, promena opšte histološke slike vaginalnog epitela nije zapažena u poređenju sa kontrolnim presecima. Međutim detaljnom analizom uočava se odsustvo piknotičnih jedara, dok se mogu zapaziti ćelije u mitozu.

Genistein i daidzein, u poređenju sa estradiolom, ispoljavaju niz pozitivnih efekata na reproduktivni sistem acikličnih ženki, a posebno na nivou ovarijuma. Imajući u vidu da menopauza, između ostalog, nastaje usled smanjene funkcije ovarijuma, rezultati ove studije imaju veliki značaj i primenu, s obzirom na to da očuvanje funkcije ovarijuma značajno utiče na kvalitet života žena. Stoga se može reći da genistein i daidzein mogu biti uspešna alternativa supstitucionoj hormonskoj terapiji.

**Ključne reči:** ženski reproduktivni sistem, fitoestrogeni, estradiol, uterotrofni esej, menopauza.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Reproductivna endokrinologija

**UDK broj:** 596.465: 636.028]: 547.926 (043.3)

## MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF REPRODUCTIVE SYSTEM OF IMMATURE AND MIDDLE-AGED FEMALE RATS AFTER RATS AFTER TREATMENTS WITH SOY PHYTOESTROGENS

---

### Summary

Soy phytoestrogens, primarily genistein and daidzein, are widely used through diet and as dietary supplements. Since they may act as “natural” selective modulators of estrogen receptor, scientific interest for phytoestrogens is constantly increasing. Cessation of a women’s reproductive function, *i.e.* menopause, is often accompanied with disorders that are consequence of reduced ovarian function and low estrogen concentration. Therefore, one of the possible therapeutic application of genistein and daidzein is prevention and alleviation of menopausal symptoms, as an alternative to hormone replacement therapy.

The aim of this study is to examine the effects of phytoestrogens on the reproductive system of immature and middle-aged female rats. Of particular interest is to define the potential of phytoestrogens for improvement of reproductive system function in an animal model of menopause, and to compare these effects with the effects of therapeutic doses of estradiol dipropionate, commonly used in prevention and treatment of menopausal symptoms.

Uterotrophic assay was used in order to test estrogenic activity of genistein and daidzein, according to the protocol of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Immature female rats received phytoestrogens (genistein and daidzein), in three doses (high, medium and low) for three consecutive days, from 19<sup>th</sup> till 21<sup>st</sup> day of life. According to the protocol, control groups were formed - the positive control groups that received 17 $\alpha$  - ethynyl estradiol (in two doses), negative control groups that received solvents, and the intact control group.

After uterotrophic assay, minimal dose of genistein and daidzein that exerts estrogenic effect was determined. This dose was administered to 12 months old, middle-aged female rats, for four weeks. After this period it was analyzed whether genistein and daidzein exerted beneficial effects on the structure and function of the pituitary, ovary, uterus and vagina. These effects were then compared with the effects of the therapeutic dose of estradiol dipropionate.

Changes in the structure and function of the organs of reproductive system of immature and middle-aged female rats were analyzed by histological, immunofluorescence, design-based stereological, morphometric and molecular biological methods. Immunofluorescent labeling of specific antigens allowed the visualization of the pituitary lactotropic and gonadotropic cells, and the calculation of the relative intensity of fluorescent signal, *i.e.* concentration of antigen within the cell. In the same manner, the presence of lactoferrin and steroid receptors in the uterus of immature and middle-aged female rats was analysed. Unbiased, design-based stereological methods were used for determination of volume of reproductive organs, volume density of their basic compartments, as well as volume, number and volume density of granulosa lutein cells of the *corpora lutea*. The endometrial epithelium height, endometrial gland number, number of ovarian follicles at different stages of folliculogenesis and atresia, as well as the number of individual classes and the total number of *corpora lutea* were performed using morphometric methods. "Real-time" PCR was used to determine the relative gene expression of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ), estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) and progesterone receptor (PR) in the uterus of middle-aged female rats. All results were statistically analyzed.

Uterotrophic assay showed that genistein, at doses of 35 and 50 mg/kg b.w., increased gravimetric uterine growth and acted as an estrogen agonist, while daidzein, in any dose used, did not cause these effects. It has been shown that genistein, in medium and

high dose, acted as an estrogen agonist in terms of all tested parameters in uterus, pituitary gland, and vagina. However, the same doses in the ovaries caused antagonistic effects. By including additional analyses, the sensitivity of uterotrophic assay was increased. This resulted in an observation that daidzein also exerts estrogenic activity in all tested doses. The estrogenic activity of daidzein was reflected in the increase of endometrial gland number and volume density, and stimulation of pituitary gonadotropic and lactotropic cells. The minimal effective dose, *i.e.* the dose that causes the estrogenic effect in the organs of female reproductive system, is the dose of 35 mg/kg b.w. *per* day of genistein and daidzein.

Chronic estradiol treatment of middle-aged female rats caused an inhibition of gonadotropic cells, which was reflected not only in the reduction of fluorescent signal intensity, but also in reduction of the cell size. At the same time, estradiol stimulated lactotrops, by increasing their density and the relative intensity of the immunolabeled prolactin in cells.

In contrast to estradiol treatment, genistein and daidzein did not cause changes in the relative intensity of the fluorescent signal within the gonadotropic or lactotropic cells. However, changes in cell morphology were observed after treatment with both phytoestrogens. Gonadotropic cells were larger in size, while lactotropic cells were smaller comparing to the controls. All types of examined pituitary cells were changed in shape with unevenly stained cytoplasm, that is, immunolabeled parts of cytoplasm were separated by unstained regions, which gave cells the appearance of vacuolization.

Chronic treatment with therapeutic doses of estradiol, in the ovaries of acyclic females, generally had a negative effect. In the group of small follicles, estradiol caused a significant increase of atretic, primordial, primary and preantral follicles. Similar effect was observed in the group of antral follicles. Estradiol treatment caused an increase of volume and number of *corpora lutea*, which resulted in the ovary volume increase. In contrast to

estradiol, chronic application of genistein and daidzein caused a significant increase in the number of follicles in initial stage of folliculogenesis (primordial and primary follicles), without affecting total number of atretic primordial follicles, but significantly reducing the number of primary atretic follicles. Treatments with phytoestrogens did not affect total number of preantral and antral follicles, while they caused a decrease of atretic antral follicle number. Genistein treatment did not change the number of individual classes of *corpora lutea*, or their total number. Unlike genistein, daidzein increased the number of mature *corpora lutea*, which resulted in an increase of their total number, and ovary volume. However, due to the preservation of healthy follicles, both treatments caused an increase of follicular parenchyma volume.

Estradiol treatment increased the absolute and the relative uterine weights. This is result of increased volume density of endometrium, endometrial epithelium and endometrial glands. Estradiol caused decrease of ER $\alpha$  mRNA and increase of PR mRNA expression, while ER $\beta$  mRNA expression was not changed. Genistein caused an increase of uterine weight and endometrial volume density, decrease of ER $\alpha$  mRNA expression, and increase of PR and ER $\beta$  mRNA expression. In contrast to genistein treatment, daidzein did not change uterine weight, or morphometric and stereological characteristics of uterus. Expression of ER $\alpha$  and PR mRNA was not affected, while expression of ER $\beta$  mRNA was increased.

In vagina, application of estradiol caused hypertrophy of the epithelium, followed by desquamation of epithelial cells. After treatment with phytoestrogens, changes in general histological appearance of the vaginal epithelium were not observed. However, detailed light microscopic analysis revealed less numerous pyknotic nuclei, and more numerous mitotic cells.

Comparing to estradiol, genistein and daidzein, exhibited numerous beneficial effects on the reproductive system of middle-aged females, especially in the ovary. Bearing in mind that menopause, among other things, is caused by reduced ovarian function, the results of this study are significant and applicable, given that the preservation of ovarian function can significantly improve the quality of life of women. Therefore, it can be concluded that genistein and daidzein could be a successful alternative to estrogen replacement hormone therapy.

**Key words:** female reproductive system, phytoestrogens, estradiol, uterotrophic assay, menopause.

**Research area:** Biology

**Area of special interest:** Reproductive endocrinology

**UDC number:** 596.465: 636.028]: 547.926 (043.3)

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. FITOESTROGENI .....	1
1.2. MEHANIZAM DELOVANJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST FITOESTROGENA ...	3
1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE ESTROGENSKE AKTIVNOSTI JEDINJENJA ...	9
1.4. ORGANI REPRODUKTIVNOG SISTEMA ŽENKI PACOVA OSETLJIVI NA ESTROGEN .....	11
1.4.1. Hipofiza .....	11
1.4.2. Ovarijumi i osnovne ovarijalne funkcije .....	12
1.4.3. Uterus i vagina .....	19
1.5. REGULACIJA FUNKCIJE ORGANA ŽENSKOG REPRODUKTIVNOG SISTEMA .....	20
1.6. MENOPAUZA I SUPSTITUCIONA HORMONSKA TERAPIJA .....	22
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>26</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>28</b>
3.1. LABORATORIJSKO ODRŽAVANJE ŽIVOTINJA .....	28
3.2. EKSPERIMENTALNE GRUPE .....	29
3.2.1. Nezrele ženke .....	29
3.2.2. Aciklične ženke .....	31
3.3. UZIMANJE I PRIPREMA MATERIJALA ZA ANALIZU .....	33
3.4. HISTOLOŠKO BOJENJE .....	33
3.5. STEREOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA MERENJA .....	34
3.5.1. Kavalijerijev princip određivanja volumena .....	35
3.5.2. Određivanje volumenskih gustina .....	37
3.5.3. Fizički disektor .....	37
3.5.4. Određivanje volumena granulosa luteinskih ćelija u zrelim žutim telima acikličnih ženki pacova .....	39
3.5.5. Određivanje visine epitela lumena endometrijuma i broj endometrijalnih žlezda .....	39
3.5.6. Morfometrija i klasifikacija ovarijalnih folikula .....	40
3.5.7. Koeficijent greške .....	46



3.6. IMUNOCITOHEMIJSKO BOJENJE SPECIFIČNIH ANTIGENA .....	47
3.7. ODREĐIVANJE RELATIVNOG INTENZITETA FLUORESCENCE (RIF) ...	49
3.7.1. Određivanje relativnog intenziteta fluorescence u gonadotropnim i laktotropnim ćelijama hipofiza nezrelih ženki pacova .....	49
3.7.2. Određivanje relativnog intenziteta fluorescence u gonadotropnim i laktotropnim ćelijama hipofiza acikličnih ženki pacova .....	50
3.8. ANALIZA EKSPRESIJE GENA .....	50
3.8.1. Priprema uzoraka i izolacija totalne RNK .....	50
3.8.2. Reakcija reverzne transkripcije .....	51
3.8.2. Reakcija lančanog umnožavanje u realnom vremenu .....	52
3.9. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....	53

## 4. REZULTATI .....

4.1. UTEROTROFNI ESEJ .....	54
4.1.1. Analiza mase uterusa .....	54
4.1.2. Histološki i imunocitohemijski parametri uterusa nezrelih pacova .....	56
4.1.2.1. Histološke karakteristike uterusa nezrelih pacova .....	56
4.1.2.2. Imunocitohemijske karakteristike uterusa nezrelih ženki pacova .....	59
4.1.3. Stereološke i morfometrijske karakteristike uterusa nezrelih pacova .....	61
4.1.3.1. Volumenske gustine .....	61
4.1.3.2. Visina površinskog epitela endometrijuma i broj endometrijalnih žlezda ...	62
4.1.4. Promene u ovarijumu kao pokazatelji estrogenske aktivnosti .....	64
4.1.4.1. Apsolutne i relativne mase ovarijuma .....	64
4.1.4.2. Histološke i stereološke karakteristike ovarijuma nezrelih pacova .....	65
4.1.5. Promene u hipofizi kao pokazatelji estrogenske aktivnosti .....	70
4.1.5.1. Apsolutne i relativne mase hipofize .....	70
4.1.5.2. Morfološke i imunofluorescentne karakteristike gonadotropnih (FSH i LH) i laktotropnih (PRL) ćelija nezrelih ženki pacova .....	70
4.1.6. Promene morfologije vaginalnog epitela kao pokazatelj estrogenske aktivnosti .....	77
4.2. ANIMALNI MODEL MENOPAUZE .....	79
4.2.1 Promene u hipofizi acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima .....	79

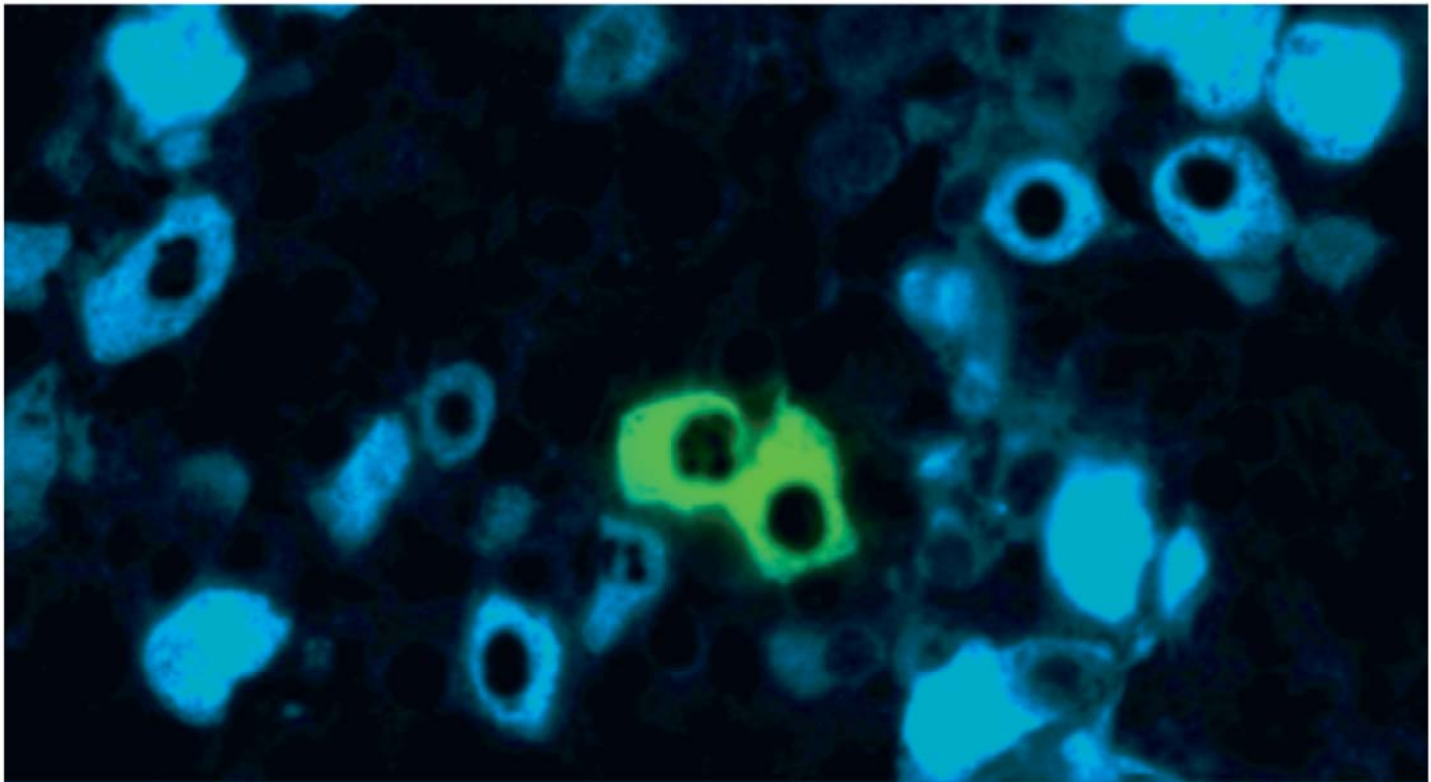
4.2.1.1. Apsolutna i relativna masa hipofize .....	79
4.2.1.2. Morfološke i imunofluorescentne karakteristike gonadotropnih (FSH i LH) i laktotropnih (PRL) ćelija acikličnih ženki pacova .....	80
4.2.2. Promene u ovarijumu acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima .....	85
4.2.2.1. Apsolutne i relativne mase ovarijuma .....	85
4.2.2.2. Histološke karakteristike ovarijuma acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima .....	86
4.2.2.3. Stereološke i morfometrijske karakteristike ovarijuma acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima .....	89
4.2.3. Promene u uterusu acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima .....	100
4.2.3.1. Apsolutne i relativne mase uterusa .....	100
4.2.3.2. Histološke karakteristike uterusa acikličnih pacova .....	101
4.2.3.3. Stereološke i morfometrijske karakteristike uterusa acikličnih pacova ....	103
4.2.3.4. Visina površinskog epitela endometrijuma i broj endometrijalnih žlezda ...	104
4.2.3.4. Imunocitohemijske karakteristike estrogenskih i progesteronskog receptora i analiza njihove relativne genske ekspresije u uterusu acikličnih ženki pacova .....	105
4.2.4. Promene morfologije vaginalnog epitela acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima .....	108
4.2.4.1. Histološke karakteristike vaginalnog epitela acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima .....	108

## **5. DISKUSIJA .....** 110

5.1. UTEROTROFNI ESEJ I OSETLJIVOST ORGANA REPRODUKTIVNOG SISTEMA NA FITOESTROGENE .....	110
5.2. FITOESTROGENI I ESTRADIOL U ANIMALNOM MODELU MENOPAUZE .....	120

## **6. ZAKLJUČCI .....** 133

## **7. LITERATURA .....** 135



# UVOD

1.

## 1.1. FITOESTROGENI

---

Poslednju dekadu prošlog veka karakteriše značajno povećanje broja podataka o štetnim efektima izlaganju različitim hemijskim jedinjenjima (prirodnim i sintetičkim) koja mogu da utiču na funkciju reproduktivnog sistema (Vos i sar., 2000). Sa aspekta zdravlja ljudi i životinja posebno je interesantna grupa jedinjenja iz spoljašnje sredine čiji je efekat na organizam sličan efektu estrogena, a koji se zovu estrogeni životne sredine (*eng. environmental estrogens*) ili ekoestrogeni. Prema Bakeru (2001) ekoestrogeni su klasifikovani u tri grupe.

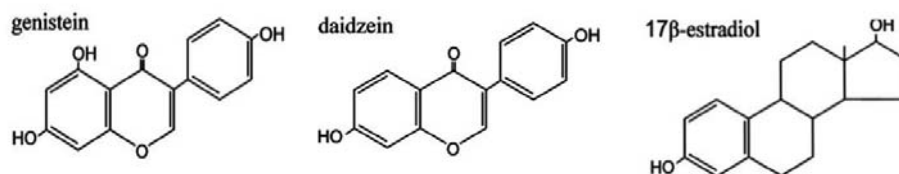
Prvu grupu čine sintetički hormoni stvoreni sa terapijskim ciljem da modulišu funkciju endokrinog sistema ( $17\alpha$ -etinil estradiol). U drugoj grupi se nalaze sintetička hemijska jedinjenja stvorena za industrijske potrebe za koje se tek naknadno ustanovilo da imaju estrogensku aktivnost (elementi plastike). U treću grupu se svrstavaju prirodne komponente koje imaju mogućnost da aktiviraju estrogenske receptore i izazovu estrogenski efekat u ženskom reproduktivnom traktu (Mazur i Adlercreutz, 1998), poznate kao fitoestrogeni.

Međutim, postoje brojne dileme i neslaganja oko definisanja pojma fitoestrogena. U osnovi se termin fitoestrogeni koristi za nesteroidna jedinjenja biljnog porekla, koja poseduju hemijsku strukturu i biološku aktivnost sličnu  $17\beta$ -estradiolu ili se *in vivo* transformišu u jedinjenja slična estrogenima (Setchell, 1998) ili prouzrokuju efekte koji bi se mogli očekivati kao posledica egzogene aplikacije estrogena (Kuiper i sar., 1998).

Najpoznatija klasifikacija fitoestrogena obuhvata četiri glavne kategorije: flavone, izoflavone, kumestane i lignane (Perabo i sar., 2008), ali ne smemo zanemariti činjenicu da je broj poznatih nesteroidnih jedinjenja sa estrogenom aktivnošću poreklom iz biljaka u stalnom porastu. Biljke obično sadrže više od jedne grupe fitoestrogena. Tako je zrno soje bogato izoflavonima, dok klica soje obiluje kumestrolom, najzastupljenijim kumestanom (Brossner i sar., 2004).

Fitoestrogeni se nalaze u velikom broju biljnih vrsta koje se svakodnevno koriste kako u ljudskoj tako i u životinjskoj ishrani: začini (luk, mirođija, kim, peršun), mahunarke (soja, grašak, detelina), zrnavlje (žito, ječam, raž, pirinač, ovas), povrće (šargarepa, krompir), voće (jabuka, šljiva, kruška, grožđe, urma, trešnja) kao i pića (pivo, kafa) (Kurzer i Xu, 1997). Proizvodi od soje, bilo prehrambeni (sojino mleko, sojin jogurt, tofu, soja sos) bilo u vidu dodataka ishrani ili medicinskih preparata, predstavljaju dominantan komercijalni izvor izoflavona za savremenog čoveka.

Najpoznatiji fitoestrogeni iz soje genistein (**4',5,7-trihidroksiizoflavon**) i daidzein (**4',7-dihidroksiizoflavon**), koji po hemijskoj strukturi predstavljaju heterociklična bifenolna jedinjenja (Šema 1) u biljkama se nalaze se u vidu kompleksnih glikozilovanih struktura i derivati su njihove hidrolize (de Lima Toccafondo Vieira i sar., 2008). Genistin, 6'-0-malonil genistin i 6'-0-acetil genistin su glikozilovane forme genisteina, dok su glikozilovane forme daidzeina daidzin, 6'-0-malonil daidzin i 6'-0-acetil daidzin (Kulling i sar. 2002; Rowland i sar., 2003).



**Šema 1.** Hemijska struktura **genisteina** (**4',5,7-trihidroksiizoflavon**;  $C_{15}H_{10}O_5$ ; Mt 270.24), **daidzeina** (**4',7-dihidroksizoflavon**;  $C_{15}H_{10}O_4$ ; Mt 254.24) i **17β-estradiola** (estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diolβ;  $C_{18}H_{24}O_2$ ; Mt 272.38).

Tokom digestije u *in vivo* uslovima, u gastrointestinalnom traktu, kompleksne strukture podležu enzimskoj hidrolizi pri čemu nastaju fitoestrogeni slični strukturi 17β-estradiola (Šema 1) (Setchell i sar., 1998). Apsorbovani fitoestrogeni ulaze u enterohepatičku cirkulaciju i mogu biti ekskretovani putem žuči nakon dekonjugacije gastrointestinalnom florom, reapsorbovani, rekonjugovani u jetri i ekskretovani urinom (Axelson i Setchell,

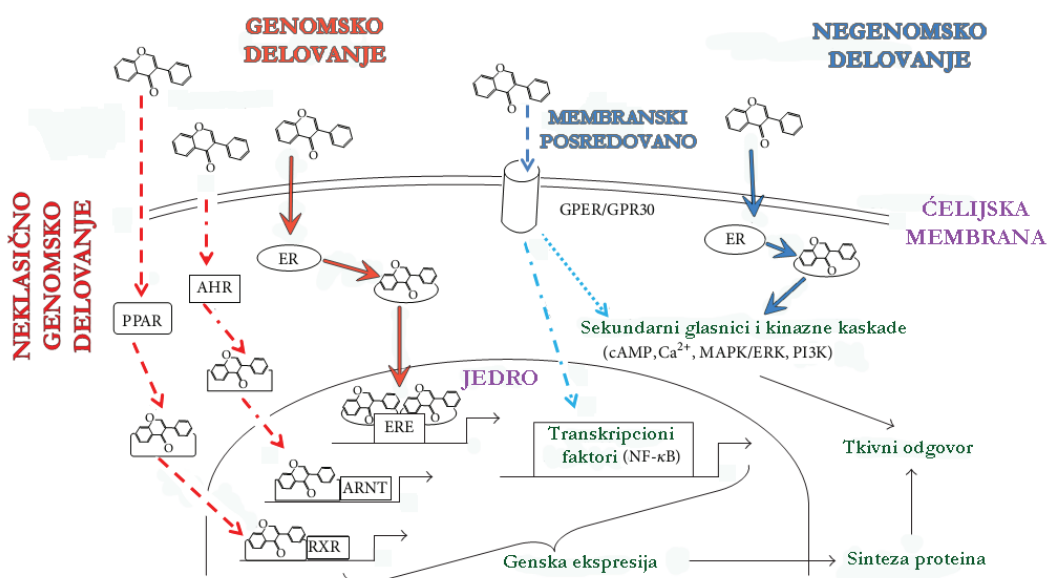
1981; Adlercreutz i sar., 1986). Fitoestrogeni su u detektabilnim koncentracijama zastupljeni u urinu, plazmi, fecesu, spermi, žuči, salivi i mleku (Adlercreutz i sar., 1995). Pomenute koncentracije različitih fitoestrogena variraju u širokim granicama čak i pri kontrolisanom doziranju. Metabolizam fitoestrogena, unetih *per os* određuje gastrointestinalna flora, te ga unošenje antibiotika i bolesti creva mogu izmeniti (Setchell i sar., 2002). Masnoće u ishrani, proteini, alkohol, različiti mikronutrijenti, voće, povrće, odnosno hrana bogata celuloznim vlaknima znatno utiču na metabolizam izoflavona (Tew i sar., 1996, Hutchins i sar., 1995, Lu i sar., 1996a).

## 1.2. MEHANIZMI DELOVANJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST FITOESTROGENA

---

Mehanizam delovanja fitoestrogena još uvek nije rasvetljen u potpunosti. Potencijalni mehanizmi njihovog delovanja prikazani su na šemi 2. Nedvosmisleno je utvrđeno da fitoestrogeni usled različitog afiniteta vezivanja za estrogenske receptore alfa ( $ER\alpha$ ) i beta ( $ER\beta$ ), prilikom kompeticije sa estradiolom (Mesiano i sar., 1999), indukuju transkripciju gena čija je ekspresija inače kontrolisana estrogenima (Kuiper i sar., 1998) i da u zavisnosti od doze, mogu imati estrogensko ili antiestrogensko dejstvo (Price i Fenwick, 1985; Hughes, 1998). Smatra se da egzogeno aplikovani fitoestrogeni, koji su slabiji ligandi, pri višim koncentracijama mogu biti u kompeticiji za receptor sa endogenim estrogenima, i tako umanjiti njihov efekat (Adlercreutz i sar., 1997). Takođe, pri normalnom nivou endogenih estrogena i niskoj dozi aplikovanih fitoestrogena, fitoestrogeni potenciraju estrogenske efekte kod životinja (Adlercreutz i sar., 1997). Zahvaljujući niskom nivou endogenih estrogena, fitoestrogeni se vezuju za slobodne receptore. Ova svojstva genisteina i daidzeina su karakteristična za selektivne modulatore estrogenskih receptora (SERM), koji u nekim tkivima mogu delovati kao agonisti ili antagonisti, u kompeticiji sa endogenim estradiolom za mesto vezivanja. U skladu sa tim, genistein i daidzein mogu da

stimulišu ili blokiraju delovanje  $17\beta$ -estradiola. Da li će fitoestrogeni delovati kao agonisti i/ili antagonisti estogena zavisi i od njihove koncentracije. Setchell i Cassidy (1999) ukazuju da je efekat fitoestrogena dozno zavisian. Međutim, i veoma niske koncentracije fitoestrogena izazvaju promene, koje su najčešće uslovljene aktivacijom negenomskih signalnih puteva (Watson i sar., 2007; 2010). Potvrđeno je da fitoestrogeni inhibiraju: translokaciju NF- $\kappa$ B (eng. nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B cells) iz citoplazme u jedro ćelije (Souza i sar., 2010; Li i sar., 2011) i aktivnost matriksnih metaloproteinaza (MMP) (Xu i Bergan, 2006; Li i sar., 2006), tirozin- i Akt-kinaza (Akiyama i sar., 1987; Li i sar., 2011).



**Šema 2.** Prikaz mogućih mehanizama delovanja fitoestrogena. AHR-aril hidrokarbonski receptor, ARNT-AHR jedarni translokator, ER-estrogenski receptor, ERE- eng. *Estrogen Response Element*, cAMP-ciklični adenzin monofosfat, Ca<sup>2+</sup>-jon kalcijuma, GPER/GPR30-G protein kuplovani estrogenski receptor 1, MAPK/ERK-mitogen aktivirajuće protein kinaze/vanćelijskim signalima regulisane kinaze, NF- $\kappa$ B- nuclear factor kappa of activated B cells, PI3K-fosfatidilinozitol 3 kinaze, PPAR-peroxisome-proliferator activating receptor, RXR retinoidni receptor X. (modifikovano od Woclawek-Potocka i sar., 2013).

Fitoestrogeni mogu uticati i na signalne mreže ekstracelularnog oksidativnog stresa (Borras i sar., 2006; Kang i sar., 2009; Choi, 2009). Dodatno, fitoestrogeni mogu biti ligandi

za vezivanje PPAR (*eng. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor*), receptora vezanih za G protein (GPER1; *eng. Protein-Coupled Estrogen Receptor 1*), aril-hidrokarbonskog receptora (AHR) (Dang, 2009; Prossnitz i Barton, 2009; Suetsugi i sar., 2003; Hirvonen i sar., 2011). Jedan od mogućih mehanizama delovanja fitoestrogena iz soje je vezivanje za androgenski receptor (AR). AR, takođe poznat kao NR3C4 (nuklearni receptori podfamilija 3, grupa C, član 4), pripada grupi nuklearnih receptora (Lu i sar., 2006) i aktivira se vezivanjem testosterona ili dihidrotestosterona (DHT) u citoplazmi, a potom se ovaj receptor-ligand kompleks translocira u jedro gde učestvuje u regulaciji genske transkripcije. Kalaiselvan i saradnici (2010), ukazuju na činjenicu da fitoestrogeni svoje dejstvo mogu ostvariti i vezivanjem za progesteronski receptore. Do danas nije utvrđeno vezivanje fitoestrogena za glukokortikoidni receptor i tiroidne receptore  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  (Takeuchi i sar., 2009). Pored navedenih efekata, fitoestrogeni mogu izazvati epigenetske promene izmenom aktivnosti DNK i histon metiltransferaza, NAD-zavisnih histon deacetilaza i drugih faktora koji utiču na organizaciju hromatinske strukture (Kao i sar., 1998; Silva i Price, 2000).

Dodatno, fitoestrogeni deluju i na enzime uključene u steroidogenezu. Genistein i daidzein direktno inhibiraju neke od najznačajnijih enzima ovog sintetskog puta i na taj način modulišu biološku aktivnost endogenih estrogena, testosterona i glukokortikoida (Kao i sar., 1998; Whitehead i sar., 2002; Holzbeierlein i sar., 2005; Ohno i sar., 2002). Pored aromataze, fitoestrogeni inhibiraju još dva enzima uključena u biosintezu estradiola,  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenazu i  $17\beta$ -hidroksisteroid oksidoreduktazu I (Ohno i sar., 2002). Na ovaj način fitoestrogeni smanjuju rizik od nastajanja karcinoma dojke, jer se smanjenjem nivoa estradiola gubi i jak stimulus za proliferaciju malignih ćelija (Peterson i Barnes, 1991, Constantinou i sar., 1995).

Pored ovih činjenica, utvrđeno je i da fitoestrogeni stimulišu produkciju SHBG (*eng. Sex Hormone Binding Globuline-SHBG*) u jetri, te i na taj način umanjuju efekte polnih



hormona (Adlercreutz i sar., 1987). Naime, utvrđeno je da biološka uloga SHBG nije tako jednostavna, te da se oni vezuju za receptore na ćelijskoj površini regulišući dostupnost ili dejstvo polnih hormona na veoma selektivan način (Hammond, 1995).

U sklopu ili mimo vezivanja za receptore, fitoestrogeni iz soje mogu delovati antioksidativno, antikancerogeno, antiaterogeno, hipolipidemijski, osteoprotektivno i imunosupresivno. Fitoestrogeni svoje antioksidativno dejstvo ispoljavaju direktno, vezujući i uklanjajući slobodne radikale iz medijuma ili indirektno, aktivirajući enzime antioksidativne zaštite ili menjajući fluidnost membrana (Takekawa i sar., 2006; Borrás i sar., 2006; Guo i sar., 2002). Potvrđeno je i da genistein smanjuje fluidnost membrane u površinskom regionu membrane, a daidzein povećava fluidnost u dubini membrane utičući na reološke karakteristike eritrocita (Ajđžanović i sar., 2010).

Utvrđeno je da fitoestrogeni inhibiraju lipidnu peroksidaciju i moduliraju produkciju prostaglandina i leukotrijena uključenih u karcinogenezu, te tako snižavaju rizik pojave maligne proliferacije ćelija (Swami i sar., 1983). Učestalost hormon zavisnih karcinoma niža je u zemljama Azije i Istočne Evrope nego u zapadnim zemljama (Adlercreutz, 1990) kao i kod vegetarijanaca (Hunter i sar., 1996). Antikancerogeno delovanje fitoestrogena potvrđeno je na različitim animalnim modelima i tumorskim ćelijskim linijama leukemija, limfoma, kancera jänika i grlića materice, melanoma, neuroblastoma, karcinoma želuca, pankreasa, dojki i prostate (Jamadar-Shroff i sar., 2009; El Touny i Banerjee, 2009). Istraživanja su pokazala da genistein dozno i vremenski zavisno inhibira ćelijski rast zaustavljajući ćelijski ciklus u G2/M fazi (Ismail i sar., 2007; Yan i sar., 2010). Dodatno, pokazano je da navedeni fitoestrogen svoje antikancerogeno delovanje ostvaruje inaktivacijom NFκB preko smanjenja kinazne aktivnosti i na taj način reguliše proteine uključene u proces apoptoze (Banerjee i sar., 2005; Kang i sar., 2009; Gong i sar.,

2003; Gwin i sar., 2011). Takođe, fitoestrogeni smanjuju ekspresiju telomerazne reverzne transkriptaze, c-myc iRNK i MDM2 onkogen (Ouchi i sar., 2005; Li i sar., 2005).

Postoje podaci koji govore u prilog hipotezi da fitoestrogeni, poreklom iz hrane, utiču na smanjenje rizika obolevanja od kardiovaskularnih bolesti u Azijskim zemljama i kod vegetarijanaca, te se može smatrati da imaju kardioprotektivno dejstvo (Adlercreutz, 1990). Odavno je poznato da konzumiranje sojinih proizvoda snižava nivo lipida u plazmi. Logičan zaključak koji se iz ovoga može izvesti je da su fitoestrogeni iz soje, bar delimično, odgovorni za ovaj efekat (Adlercreutz, 1990). Studija, sprovedena na mužjacima i ženka *Rhesus* majmuna čija se ishrana bazirala na soji, dokumentovala je smanjenje koncentracija holesterola vezanih za lipoprotein niske gustine (LDL) i lipoprotein veoma niske gustine (VLDL) u krvi, pri poređenju sa kontrolnim vrednostima (Anthony i sar., 1996). Pri tom je nivo holestrola vezanog za lipoprotein visoke gustine (HDL) znatno povećan kod oba pola. Genistein, kao snažan antioksidant, inhibira oksidaciju LDL, što je utvrđeno u *in vitro* studijama (Tikkanen i sar., 1998). Izoflavoni sprečavaju formiranje plaka u krvnim sudovima obolelih od ateroskleroze i inhibiraju adheziju ćelija, te i na taj način deluju antiaterogeno (Raines i Ross, 1995). Takođe, aplikovani fitoestrogeni izazivaju vazodilataciju krvnih sudova čime olakšavaju protok krvi (Clarkson, 2002). Zbog svega ovoga je zaključeno da fitoestrogeni iz soje imaju veliki potencijal u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja.

Pojedine studije ukazuju na moguću ulogu fitoestrogena u metabolizmu kostiju i prevenciju osteoporoze. Naime, kod postmenopauzalnih žena dolazi do povećanja mineralnog sadržaja u kostima usled unosa hleba obogaćenog komponentama soje u poređenju sa kontrolnom grupom žena, koje su u ishrani koristile običan pšenični hleb (Dalais i sar., 1998). Korišćenje soje u ishrani predupređuje gubitak koštane mase kod ovarijektomisanih pacova (Arjmandi i sar., 1996). Štaviše, utvrđeno je da fitoestrogeni

ispoljavaju pozitivan efekat na koštano tkivo kod ovarijektomisanih ženki pacova kao i kod postmenopauzalnih žena, koji se ogleda u inhibiciji aktivnosti osteoklasta i stimulaciji osteoblasta (Bitto i sar., 2008; Morabito i sar., 2002). Međutim, kada se ovarijektomisanim ženkama pacova pored genisteina daje i estradiol, ne uočava se smanjenje gubitka mase kostiju, što ukazuje da genistein ima zaštitni efekat na kosti samo u slučaju deficita ovarijalnih estrogena (Arjmandi i sar., 1996). Dodatno, genistein snižava nivo alkalne fosfataze u serumu, te i na taj način ispoljava svoje osteoprotektivno dejstvo (Anderson i sar., 1995).

Fitoestrogeni iz soje ispoljavaju svoje dejstvo i na nivou imunog sistema. Tako je utvrđeno da genistein inhibira produkciju azot oksida (NO) u makrofagima, te pokazuje modulatoran efekat u imunom odgovoru (Krol i sar., 1995).

Pokazano je da fitoestrogeni nesmetano prolaze placentalnu barijeru, što ukazuje da mogu uticati na potomstvo (Doerge i sar., 2001). Kouki i saradnici (2003) pokazuju da neonatalni tretman genisteinom dovodi do ranije pojave puberteta kao i do produžetka estrusa, dok tretman daidzeinom nema efekata. Neki autori sugerišu da fitoestrogeni deluju inhibitorno na sekreciju gonadotropina (Cassidy i sar., 1995), što se negativno odražava na nivo estradiola i progesterona u plazmi, a i utiče na dužinu menstrualnog ciklusa (Lu i sar., 1996b). Sniženje nivoa estradiola u plazmi može biti direktna posledica inhibicije aromataze, ili indirektna, sniženja koncentracije gonadotropina u plazmi (Lonning i Geisler, 2008).

Konačno, ne bi trebalo zanemariti blagotvoran efekat fitoestrogena na simptome koji prate menopauzu, poput valunga, gubitka vaginalne sekrecije, lošeg sna i nervoze praćene pojačanim lučenjem hormona stresa. Ukazuje se na ređe javljanje menopauzalnih simptoma kod Japanki u poređenju sa Kanadankama, verovatno usled ishrane bogate sojinim proizvodima (Adlercreutz i sar., 1995; Messina, 2010).

### 1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE ESTROGENSKE AKTIVNOSTI JEDINJENJA

---

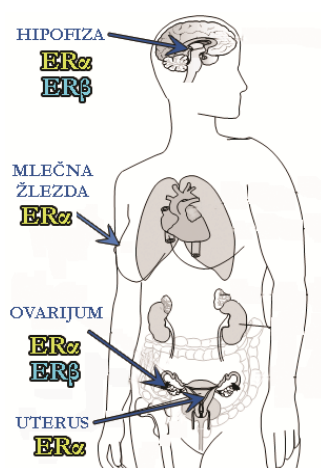
Poslednjih decenija, razvijeni su brojni *in vivo* testovi (animalni modeli) u cilju detekcije estrogenskog potencijala kako fitoestrogena, tako i drugih supstanci koje mogu uticati/remetiti funkciju endokrinog sistema (eng. *Endocrine Disrupting Chemicals*-EDC).

Uterotrofni esej na glodarima se trenutno koristi kao primarni *in vivo* esej za detekciju supstanci sa potencijalnim estrogenskim/antiestrogenskim delovanjem (Ashby, 2001; Odum i sar., 1997; Tinwell i sar., 2000; Yamasaki i sar., 2002). Ovom probom određuje se gravimetrički porast uterusa kao odgovor na aplikaciju različitih supstanci, a za probu se koriste polno nezrele ili ovarijektomisane ženke glodara. Oba animalna modela karakteriše nizak nivo endogenog estrogena (Kanno i sar., 2001; 2003), te se uočene promene, koje se upoređuju sa efektima estradiola, mogu pripisati isključivo delovanju ispitivane supstance.

Uterotrofni esej na nezrelim ženkama pacova zasniva se na trodnevnom aplikovanju različitih doza ispitivane supstance. Nekoliko sati nakon povećanja nivoa estrogena u cirkulaciji, uterus polno nezrelih pacova pokazuje porast mase nakupljanjem vode, a nakon toga i povećanje mase, koje je posledica hipertrofije i hiperplazije ćelija. Barton i saradnici (1998) navode da su promene, koje se uočavaju u uterusima nezrelih ženki pod uticajem estrogena i njegovih agonista, podeljene u dve faze. Ranu fazu karakterišu: hiperemija, infiltracija eozinofila, retencija vode, nakupljanje albumina, povećanje metabolizma glukoze, povećanje sinteze histonskih i nehistskih proteina, povećanje sinteze proteina nastalih transkripcijom *c-fos* i *c-myc* gena, ciklin-zavisne kinaze, ciklina, IGF1 (eng. *Insuline-like Growth Factor 1*) iRNK i/ili proteina i smanjenje sinteze *c-jun* iRNK. Kasnu fazu karakteriše sinteza DNK i mitoza kao i hipertrofija ćelija.

Kod nezrelih ženki pacova (18-25. dana starosti) visok nivo alfa-fetoproteina (AFP) u krvnoj plazmi vezuje  $17\beta$ -estradiol, smanjujući koncentraciju dostupnog hormona u cirkulaciji (OECD, 2003). Ovim vezivanjem onemogućen je uticaj  $17\beta$ -estradiola na uterus, kao i na druge organe reproduktivnog sistema (Meijs-Roelofs i Kramer, 1979). Međutim, oko 16. dana starosti, ženke postaju osetljive na egzogeni estrogen. Stoga je neophodno supstancu sa potencijalnim estrogenskim delovanjem aplikovati u periodu između 18. i 21. dana starosti (OECD, 2001). Nakon 21. dana života, kada nivo AFP u cirkulaciji opadne, dolazi do uspostavljanja negativne povratne sprege, hipofizno-gonadalna osa postaje funkcionalna, u ovarijumima dolazi do produkcije endogenog estrogena (Ojeda i Urbanski, 1994), koji može uticati na rast uterusa, a samim tim i na osetljivost uterotrofne probe.

Naglašena ekspresija ER u organima ženskog reproduktivnog sistema (hipofiza, ovarijum, uterus, vagina; Šema 3) čini ove organe ciljnim za delovanje estrogena (Pelletier i El-Alfy, 2000). Poznato je da je dominantna forma ER, u uterusu i vagini pacova,  $ER\alpha$  (Kuiper i Gustafsson, 1997), dok u ovarijumu preovlađuje  $ER\beta$  (Drumond i sar., 2010). Korišćenjem kombinovanih metoda imunocitohemije i *in situ* hibridizacije u gonadotropnim i laktotropnim ćelijama pronađena su oba tipa ER (Gonzales i sar., 2008).



**Šema 3.** Prikaz dominantnih formi ER u ženskom reproduktivnom sistemu.

## 1.4. ORGANI REPRODUKTIVNOG SISTEMA ŽENKI PACOVA OSETLJIVI NA ESTROGEN

---

### 1.4.1. Hipofiza

Hipofizu grade adenohipofiza i neurohipofiza, delovi koji se međusobno razlikuju po strukturi, embrionalnom poreklu i produktima sekrecije. Kod sisara, adenohipofiza je izgrađena od pet tipova žlezdano epitelnih ćelija: kortikotropnih, tireotropnih, somatotropnih, prolaktinskih i gonadotropnih ćelija. Ove ćelije proizvode adrenokortikotropni hormon (ACTH), tireotropni hormon (tireostimulirajući hormon; TSH), hormon rasta (GH), prolaktin (PRL) i gonadotropne hormone: folikulostimulirajući hormon (FSH) i luteinizirajući hormon (LH). Ekspresija gena za svaki od ovih hormona, što definiše krajnju diferencijaciju svakog od ćelijskih tipova, javlja se prema određenom prostornom i vremenskom rasporedu (Japon i sar., 1994; Burrows i sar., 1999). Hipofiza ima ključnu ulogu u regulisanju funkcije drugih endokrinih žlezda i često se označava kao glavni organ endokrino sistema. U okviru kompleksnih kontrolnih sistema povratne sprege, hipofiza prenosi signale od hipotalamusa ka ciljnim organima i tkivima, oslobađajući različite trofičke hormone. Kompenzatorni mehanizmi, koji uključuju regulaciju genske ekspresije, hormonske sekrecije i ćelijske proliferacije, omogućuju hipofizi da reaguje na promenljive potrebe u organizmu. Na ovaj način hipofiza utiče na mnoge vitalne procese kao što su rast, metabolizam, reprodukcija i odgovor na stres (Cushman i Camper, 2001).

Gonadotropne ćelije nazvane su po svojoj endokrinoj funkciji, sintetisanju i sekreciji dva gonadotropna hormona, FSH i LH, neophodnih za regulaciju reproduktivne funkcije. Uvođenjem imunocitohemijskih metoda ranih sedamdesetih, utvrđeno je populacija gonadotropnih ćelija heterogena. U velikom procentu ovih ćelija zabeležena je ekspresija oba hormona, ali je utvrđeno i prisustvo monohormonalnih ćelija u svim fiziološkim stanjima (Childs i sar., 1987). Oba tipa ER prisutna su u gonadotropnim

ćelijama hipofize, pri čemu je ekspresija ER $\beta$  najizraženija u adultnom u odnosu na ostale razvojne periode (Wilson i sar., 1998).

Prolaktinske (laktotropne) su ćelije adenohipofize koje oslobađaju prolaktin (PRL), čija je jedna od osnovnih funkcija produkcija mleka u mlečnim žlezdama u toku trudnoće i laktacije. Dodatne biološke uloge prolaktina uključuju, kako uticaj na reprodukciju, tako i na metabolizam. Na nivou elektronske mikroskopije uočava se da PRL ćelije predstavljaju heterogenu ćelijsku populaciju. Naime, neke ćelije poseduju krupne, gusto pakovane, nepravilne vezikule, dok se u nekim ćelijama uočavaju sitne okrugle vezikule. Funkcionalni značaj ove heterogenosti nije rasvetljen (Morris i sar., 2002). Usled izražene unutarćelijske ekspresije ER (Morris i sar., 2002) PRL ćelije predstavljaju ćelijski estrogen-zavisni model sistem (Steinmetz i sar., 1997).

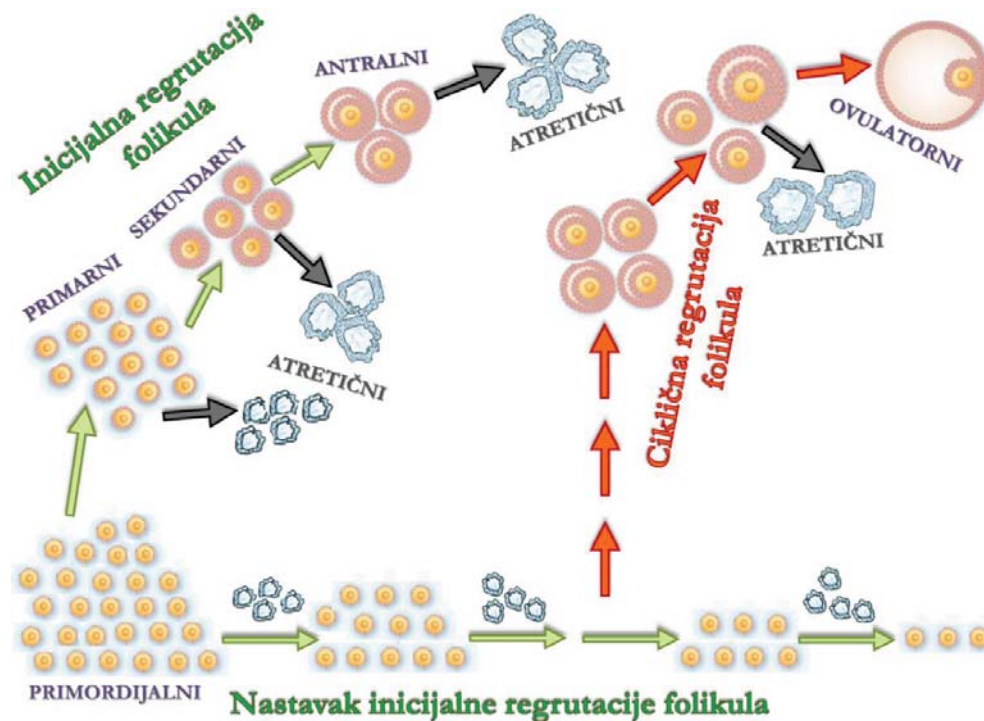
#### 1.4.2. Ovarijumi i osnovne ovarijalne funkcije

Ovarijumi su parne žlezde ovalnog oblika sa egzokrinom i endokrinom funkcijom. Izgrađeni su od folikularnog parehnima i ovarijalne strome. Folikularni parehnim čine folikuli u različitim fazama folikulogeneze, folikuli u propadanju (atretični folikuli) i žuta tela (*corpora lutea*). Ovarijalna stroma izgrađena je od rastresitog neorganizovanog vezivnog tkiva u kome se nalaze brojni krvni i limfni sudovi, i kontraktilnih i intersticijalnih ćelija (Westwood, 2008). Na površini ovarijuma se nalazi germinativni epitel izgrađen od jednog sloja kuboidalnih ćelija. Ove ćelije karakteriše krupno jedro, okruglog do nepravilnog oblika i veliki broj granula u citoplazmi. Ispod germinativnog epitela nalazi se tanak sloj gustog vezivnog tkiva (*tunica albuginea*) izgrađen od pet do sedam slojeva fibroblasta i kolagenih vlakana, koji formira čvrst omotač oko ovarijuma (Junqueira, 2009).

Egzokrina funkcija ovarijuma ogleda se u cikličnom oslobađanju zrele oocite, procesom ovulacije, koji je regulisan vremenski odvojenom sekrecijom gonadotropnih hormona hipofize. Endokrina funkcija podrazumeva sintezu i oslobađanje ženskih

(estrogen i progesteron) i muških (testosteron, dihidroepiandrosteron sulfat) polnih steroida. Pored steroidnih, ovarijumi oslobađaju i supstance peptidne strukture kao što su inhibini, aktivini i folistatini koji imaju važnu ulogu u regulaciji funkcije gonadotropne ose. Folikul predstavlja osnovnu funkcionalnu jedinicu ovarijuma (McGee i Hsueh, 2000).

Folikulogeneza obuhvata seriju fizioloških događaja koji su definisani procesom rasta i razvoja regrutovanog primordijalnog folikula, pri čemu folikul prolazi stadijume primarnog, sekundarnog, antralnog i na kraju Grafovog folikula ili preovulatornog folikula, koji ovulira tj. izbacuje oocitu u ovidukt. Folikuli koji nisu selektovani za dalji razvoj propadaju, tj. podležu atreziji (McGee i Hsueh, 2000). Razlikujemo inicijalnu i cikličnu regrutaciju folikula (Šema 4).



**Šema 4.** Prikaz procesa folikulogeneze. Primordijalni folikuli obrazuju pul mirujućih folikula, koja se progresivno smanjuje u toku reproduktivnog perioda života. Rast folikula, jednom započet, je kontinuiran proces bez faza stagnacije i završava ovulacijom, ili češće atrezijom. Folikulogeneza obuhvata aktivaciju primordijalnih folikula, rast primarnih i njihov prelazak u sekundarne, rast sekundarnih do antralnog stadijuma i njihov rast i formiranje ovulatornog (Grafovog) folikula.



Inicijalna regrutacija se odnosi na regrutaciju pojedinih primordijalnih folikula i njihov razvoj do antralnog folikula, proces koji se odvija kontinuirano i koji nije direktno regulisan delovanjem gonadotropnih hormona (Hunzicker-Dunn i Maizels, 2006). Ciklična regrutacija počinje sa polnom zrelosti i regulisana je sekrecijom FSH i kod ljudi se dešava se na svakih 28 dana. Od momenta selekcije antralnog folikula do ovulacije, kod ljudi prođe 14 dana (McGee i Hsueh, 2000). Ciklična regrutacija i pojava estrusnog ciklusa kod pacova počinje oko 34. dana života; nakon selekcije folikula ovulacija nastupa za 2-3 dana; estrusni ciklus traje 4-5 dana i odvija se regularno sve do 10-12. meseca starosti (Craig i sar., 2007).

Primarni folikuli proliferacijom folikularnih ćelija i rastom oocite prelaze u višeslojne, sekundarne folikule koji se sastoje od nekoliko slojeva granuloza ćelija, rastuće oocite i omotača koji ih odvaja. U ovoj fazi folikulogeneze dolazi do diferencijacije ćelija strome neposredno uz folikul. Spoljašnji deo folikula sačinjen je od teka ćelija (*techa interna* i *techa externa*), koje zajedno sa granuloza ćelijama učestvuju u sintezi ovarijalnih steroida. Naime, ćelije teke interne sintetisu polne steriode po  $\Delta^5$  putu biosinteze, dok u granuloza ćelijama po  $\Delta^4$  putu (Šema 5). I pored toga što obe vrste ćelija poseduju enzimski sistem sposoban za sintezu estrogena najznačajnije mesto sinteze i sekrecije estrogena su granuloza ćelije.

U mitohondrijama se odigrava ključna reakcija u procesu steroidogeneze, a to je nastanak pregnenolona (Hanukoglu, 1992). Ova reakcija je katalizovana enzimom CYP11A1 (citohromom P450<sub>sc</sub>, *side-chain cleavage*) koji se naziva i dezmolaza. Pregnenolon izlazi iz mitohondrija i u citoplazmi, uz prisustvo enzimskog kompleksa, metaboliše se do estrogena na dva načina, odnosno dva biohemijska puta (Christenson i Strauss, 2000; Stocco 2001).

Po prvom putu, nazvanom  $\Delta^4$  put, pregnenolon prelazi u progesteron. Enzim koji učestvuje u ovoj konverziji je  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza/ $\Delta^{5-4}$ -izomeraza

( $3\beta$ HSD). Pod uticajem enzima  $17\alpha$ -hidroksilaza/ $C_{17-20}$  liaza (CYP17) od progesterona nastaje  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron, a nakon toga androstenedion. Od androstenediona pod uticajem  $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze nastaje testosteron, a od testosterona uz prisustvo aromataze P450 (CYP19) nastaje  $17\beta$ -estradiol. Međutim, od androstenediona uz prisustvo aromataze P450 (CYP19) može nastati i estron, a od estrona uz prisustvo  $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze, nastaje takođe  $17\beta$ -estradiol (Hanukoglu, 1992).  $17\beta$ -estradiol i estron nastaju od testosterona i androstenediona u glatkom endoplazmatičnom retikulumu procesom aromatizacije.

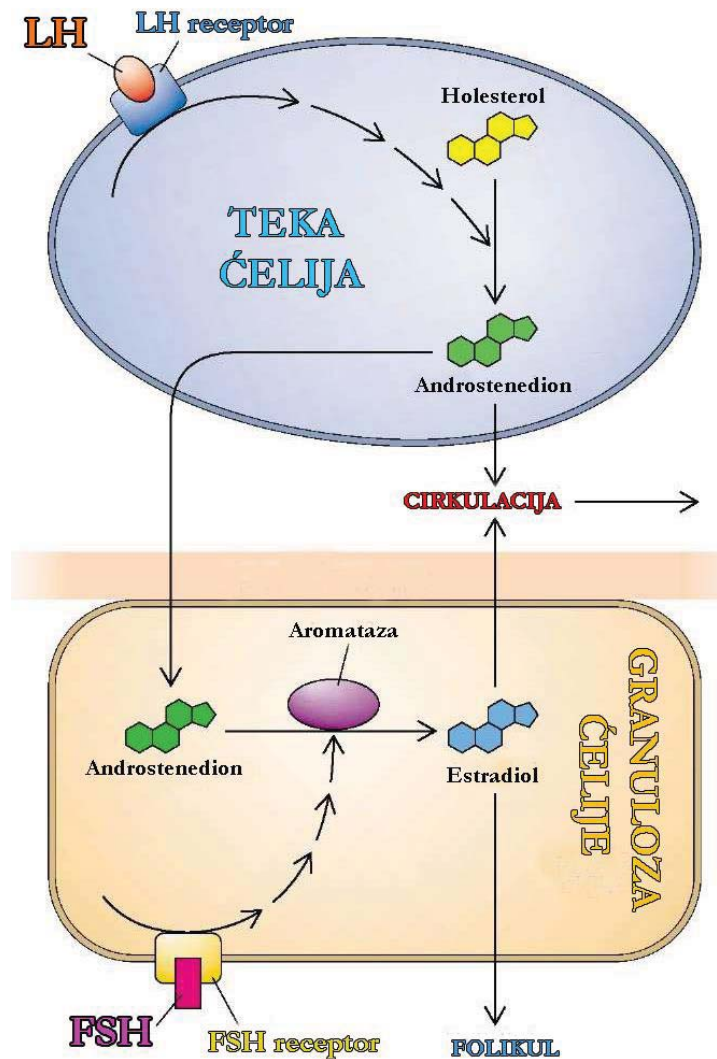
Po drugom putu, nazvanom  $\Delta^5$  put, uz prisustvo enzima CYP17, pregnenolon prelazi u  $17\alpha$ -hidroksipregnenolon, a od  $17\alpha$ -hidroksipregnenolona nastaje dehidroepiandrosteron. Od dehidroepiandrosterona, uz prisustvo enzima  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze/ $\Delta^{5-4}$ -izomeraze ( $3\beta$ HSD) nastaje androstenedion. Od androstenediona kao i po prvom putu, nastaju testosteron, estron i estradiol (Pandey i Miller, 2005).

Ovarijalna steroidogeneza se odvija po modelu dva gonadotropna hormona dva ćelijska tipa (Carson i sar., 1981). Osnovne postavke modela su sledeće:

- 1) granulosa ćelije, ali ne i teka ćelije ovarijuma poseduju FSH receptore na ćelijskoj membrani;
- 2) teka ćelije, ali ne i nezrele granulosa ćelije, poseduju receptore za LH;
- 3) FSH stimuliše aktivnost enzima aromataze, a ne sintezu androgena u granulosa ćelijama;
- 4) LH stimuliše sintezu androgena, a ne aktivnost aromataze u teka ćelijama (Hillier i sar., 1994).

Sinteza polnih steroida od holesterola do androgena je stimulisana sa LH i odvija se u ćelijama teke i intersticijuma ovarijuma, dok se aromatizacija androgena odvija u granulosa ćelijama preovulatornih folikula. Ovaj proces stimuliše FSH. Međutim početni

model “dve ćelije-dva gonadotropina” nije primenljiv za sve faze folikulogeneze. Uticaj LH na granulosa ćelije zavisi od prisustva LH receptora na njihovoj membrani. U toku sazrevanja folikula, FSH u sinergizmu sa estrogenom stimuliše ekspresiju LH receptora na membranama granulosa ćelija.



**Šema 5.** Prema teoriji “dve ćelije-dva gonadotropina” i FSH i LH su neophodni za sazrevanje folikula ovarijuma i sintezu steroidnih hormona. LH podstiče proizvodnju androgena iz holesterola podstičući aktivnost  $17\alpha$ -hidroksilaze u ćelijama teke. Androgeni zatim difuzijom prelaze do ćelija granulose u kojima FSH stimuliše ekspresiju aromataze, koja konvertuje androgene u estrogene.

Pored uticaja na ceo organizam, estrogen igra važnu ulogu i u funkciji organa u kom se produkuje (Rosenfeld i sar., 2001). Na primer, smatra se da je jedan od odlučujućih faktora da li će folikul podleći atreziji ili ovulirati, upravo količina estrogena koju produkuje. Estrogen na membrani granuloza ćelija stimuliše pojavu receptora za LH (Greenwald i Roy, 1994). Poznato je da estrogen ima antiatretogeno delovanje, kao i da stimulatorno deluje na proliferaciju granuloza ćelija malih preantralnih folikula (Drummond i sar., 1999b; Rosenfeld i sar., 2001; Fortune, 2003).

Estrogenima indukovani porast sekrecije hipofiznog hormona LH dovodi do ovulacije (McGee i Hsueh, 2000). Ovulacija kod sisara predstavlja specifičan biološki fenomen, koji obuhvata pucanje zdravog tkiva na površini ovarijuma i oslobađanje oocite. Ovulacija je veoma kompleksan proces, nalik akutnoj zapaljenskoj reakciji. Talas gonadotropina otpočinje sekvencionalnu transkripciju velikog broja specifičnih gena u granuloza ćelijama, ćelijama kumulusa i samoj oociti. Smatra se da u ovarijumu u toku ovulatornog procesa dolazi do diferencijalne ekspresije oko 100 gena. U svakom slučaju ovulatorni proces obuhvata kaskadu veoma dobro orkestrirane genske ekspresije, kako prostorno, tako i vremenski, i to sve kao odgovor na stimulaciju jednim jedinim hormonom (Espey i Richards, 2002). Nakon ovulacije, granuloza ćelije se transformišu u granuloza-luteinske ćelije u kojima se pod uticajem LH inhibira ekspresija aromataze što dovodi do smanjenja sinteze estradiola i povećanja sinteze progesterona (Fan i sar., 2009) u privremenoj endokrinoj žlezdi, tj. žutom telu. Progesteron je neophodan za implantaciju blastocista, blokadu uterusnih kontrakcija i održavanje intrauterine sredine povoljnom za razvoj embriona. Ukoliko ne dođe do oplodjenja i implantacije, žuto telo nestaje, a novi folikuli se razvijaju (Finn i Booth, 1977). Prekusor za sintezu progesterona, holesterol, luteinske ćelije unose u svoju unutrašnjost preko LDL čestica, posredstvom LDL receptora na membrani. Stopa sinteze progesterona u žutim telima je izrazito visoka, što ukazuje da

svaka luteinska ćelija mora biti u bliskom kontaktu sa kapilarima u cilju što boljeg snabdevanja LDL-om, koji se nakon ulaska u ćeliju transportuje u mitohondrije, pomoću steroid akutnog regulatornog proteina (*eng. Steroidogenic acute regulatory protein-StAR*) (Stocco, 2001). Posredstvom enzima CYP11A1, holesterol se konvertuje u pregnenolon (Nisvender, 2002).

Istovremeno sa procesom folikulogeneze u ovarijumu se dešavaju procesi atrezije. Atrezija je univerzalni fenomen i javlja se i kod sisara i kod nižih kičmenjaka. Procenjeno je da oko 99,9% folikula prisutnih na rođenju nikada svoj rast i razvoj ne završi ovulacijom (Hirshfield, 1991). Pritom, atrezija može nastupiti u bilo kom stadijumu folikulogeneze, u folikulima koji su započeli rast i razvoj, ali i u mirujućim, primordijalnim folikulima (Hsueh i sar., 1996). Još uvek nisu poznati svi faktori koji iniciraju ovaj proces, ali se sa sigurnošću može reći da atrezija nastupa kada se folikul nalazi u sredini koja po endokrinim i parakrinim uslovima nije odgovarajuća za diferencijaciju granulosa ćelija i nastavak rasta folikula (Markstrom i sar., 2002).

Oba tipa ER prisutna su u ovarijumima velikog broja vrsta, ali je njihova distribucija različita (Drummond, 1999a). Pokazano je da se ER $\alpha$  uglavnom nalazi u intersticijalnim ćelijama, uključujući i teka ćelije, koje regulišu steroidogenezu (Britt i Findlay, 2002). ER $\beta$  je dominantna forma u granulosa ćelijama preantralnih i antralnih folikula pacova (Sar i Welsch, 1999; Hosokawa i sar. 2001). Dodatno, ER $\beta$  je detektovan i u ćelijama površinskog epitela, žutim telima, kao i u oocitama (Juengel i sar. 2006; Drummond i Fuller, 2010).

Uloga estrogenskih receptora, kao i samog estrogena na rast, razvoj i funkciju ovarijuma, kao i njegove osnovne funkcionalne jedinice, folikula, najvećim delom je dobila na značaju pojavom “*knock-out*” modela miševa. Razvojem ovih modela primećeno je da su “*knock-out*” miševi za ER $\alpha$  (ERKO) aciklični, neplodni i da ne dolazi do razvoja žutih tela (Drummond i sar., 2010). Folikulogeneza je zaustavljena u stadijumu antralnih folikula

(Couse i sar., 1997). Kod “*knock-out*” miševa za ER $\beta$  (BERKO) primećeno je smanjenje ovarijuma usled sprećenog razvoja folikula, što za posledicu ima smanjenje plodnosti ovih životinja (Krege i sar., 1998). Razvojem duplih “*knock-out*” miševa (Couse i sar., 1999a; Dupont i sar., 2000) ustanovljeno je da su fenotipske karakteristike ovarijuma različite u odnosu na pojedinačne ER “*knock-out*” modele. Naime, kod ovih miševa uočava se transdiferencijacija ili rediferencijacija somatskih, folikularnih ćelija u ćelije koje su nalik Sertolijevim ćelijama, dok folikuli dobijaju izgled struktura sličnih tubulama, nalik semenim kanalčićima (Drummond i sar., 2010). Ovo ukazuje na izuzetan značaj estrogena u diferencijaciji ćelija ovarijuma.

### 1.4.3. Uterus i vagina

Uterus je prvenstveno mišićni organ koji ima važnu ulogu u reprodukciji, počevši od stalnog cikličnog pripremanja sluznice, implantacije embriona i obezbeđenja uslova za razvoj embriona i fetusa tokom gestacije. Zid uterusa građen je od endometrijuma, miometrijuma i perimetrijuma. Endometrijum, predstavlja glandularnu sluznicu uterusa, sastavljenu od jednoslojnog cilindričnog epitela i strome, u koju poniru endometrijalne žlezde. Počevši od puberteta pa sve do menopauze, endometrijum, pod uticajem ovarijalnih steroida, podleže intenzivnom remodeliranju, te se histološka slika ovog sloja neprestano menja (Westwood, 2008). U endometrijumu se zavisno od faze ciklusa, mogu uočiti dva osnovna sloja, različitih morfoloških karakteristika. Funkcionalni sloj (*stratum functionale*) čini gornje  $\frac{3}{4}$  endometrijuma, koje su histološka osnova za cilične menstrualne promene. Donji deo *stratum functionale*, koji zauzima  $\frac{1}{4}$  endometrijuma, je nešto homogenijeg izgleda jer sadrži vratne delove endometrijalnih žlezda i zgusnute stromalne ćelije. Ispod njega je oko dva puta deblji sloj sunderastog izgleda, zbog širokih lumena žlezda i krvnih sudova (Junqueira, 2009). Bazalni sloj (*stratum basale*) je najdublji sloj endometrijuma koji ne podleže cikličnim promenama, te služi za obnavljanje funkcionalnog sloja. Miometrijum je

najdeblji sloj sastavljen od slojeva glatkih mišićnih ćelija vretenastog oblika, koje pod dejstvom estrogena podležu intenzivnoj hipertrofiji, praćenoj povećanom sintezom kolagena. Osim toga, povećava se i broj ćelija, delom mitozom, delom diferencijacijom nediferenciranih ćelija mezenhinskog porekla (Branham i sar., 2002).

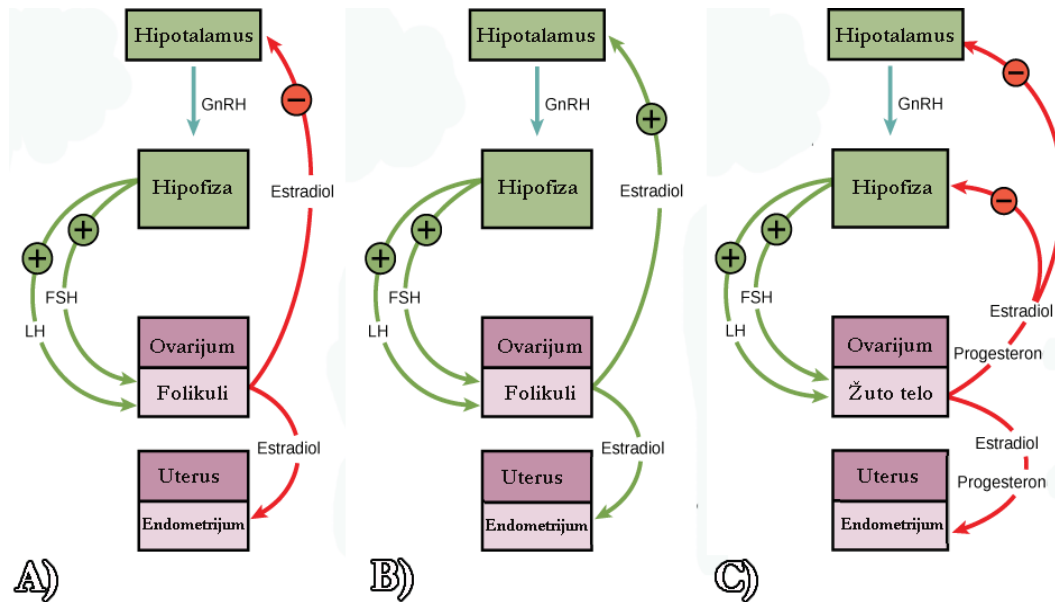
Poput ostalih ženskih reproduktivnih organa i vagina podleže dejstvu estrogena i progesterona, ali izostaju naglašene ciklične promene prisutne u endometrijumu uterusa polno zrelih jedinki ženskog pola. Epitelni, mišićni i vezivni, su tri sloja vaginalnog zida koji su kod žena u reproduktivnoj fazi oko 3 mm ukupne debljine (Junqueira, 2009). Vaginalni zid obiluje elastičnim vlaknima na čemu se bazira rastegljivost ovog organa. *Tunica mucosa* vagine oblaže celokopnu unutrašnjost, gradeći brojne niske poprečne nabore-*rugae vaginales*. Epitel vagine je pločasti slojevit bez orožavanja, povezan sa brojnim papilama rastresitog vezivnog tkiva *laminae propriae*. *Lamina propria* sluznice vagine je relativno debeo sloj čvrstog veziva sa puno elastičnih vlakana, venskih spletova i krvnih sudova. Mišićni sloj vagine (*tunica muscularis*) sastoji se od dva nejasno ograničena sloja glatko-mišićnih snopova (unutrašnji cirkularni i spoljašnji longitudinalni) prožeta obiljem veziva (*tunica adventitia*). Hormonska aktivnost ovarijuma bez obzira što ne prouzrokuje naglašene histološke promene vaginalnog zida, neprekidno menja ćelijski sastav njegovog epitela (Westwood, 2008).

## **1.5. REGULACIJA FUNKCIJE ORGANA ŽENSKOG REPRODUKTIVNOG SISTEMA**

---

Hormonska regulacija funkcije ženskog reproduktivnog sistema je veoma kompleksan proces, zasnovan na integraciji delovanja gonadotropnog oslobađajućeg hormona (GnRH) iz hipotalamusa, koji stimulacijom sekrecije gonadotropnih hormona hipofize utiče na sintezu i sekreciju polnih steroida u ovarijumima (Šema 6).

Polni steroidi mogu uticati na ciklične promene u ovarijumima, uterusu i vagini. Dodatno, polni steroidi deluju na sekreciju gonadotropnih hormona preko povratne sprege koja može biti pozitivna i negativna.



**Šema 6.** Hipotalamus luči **GnRH** u portalni krvotok hipofize u formi periodičnih pulseva, usled čega dolazi do sinteze i lučenja **FSH** i **LH** iz hipofize. Na početku **FOLIKULARNE FAZE (A)** hipofiza luči relativno visok nivo **FSH**. Primarna funkcija **FSH** je stimulacija rasta i razvoja većeg broja ovarijalnih folikula, a samim tim i sinteze i sekrecije estrogena. Rast i razvoj folikula, praćen je sazrevanjem oocite, koja u folikulu zauzima periferni položaj. Povećanje koncentracije estrogena u cirkulaciji dovodi do zadebljanja endometrijuma. Druga faza ciklusa je **OVULATORNA (B)**, u kojoj dolazi do ruptur folikula i oslobađanja zrele oocite. Visoka koncentracija estrogena zaustavlja sintezu **FSH** i stimuliše pulseve **GnRH** iz hipotalamusa, što uzrokuje produkciju i naglu sekreciju **LH** iz hipofize. Talas hormona **LH** izaziva ovulaciju. Treća **LUTEALNA (C)** faza počinje nakon ovulacije. Folikul se pod stimulacijom **LH** pretvara u privremenu endokrinu žlezdu, žuto telo, koje luči progesteron. Visok nivo progesterona zaustavlja hipofizno lučenje **LH**. Kako nivo **LH** opada, žuto telo degeneriše, a istovremeno dolazi do naglog opadanja nivoa estrogena i progesterona. Ovo stimuliše hipofizu da počne sa sintezom i sekrecijom **FSH**, što otpočinje novi ciklus. Istovremeno, pad progesterona i estrogena u cirkulaciji uzrokuje degeneraciju ćelijskih elemenata endometrijuma.



## 1.6. MENOPAUAZA I SUPSTITUCIONA HORMONSKA TERAPIJA

---

Menopauza je stanje uzrokovano smanjenjem funkcija ovarijuma, što kod žena za posledicu ima izostanak menstrualnog krvarenja u trajanju od najmanje 12 meseci. Imajuću u vidu da je savremena medicina znatno produžila život ljudi, epidemiološke studije pokazuju da većina žena provede trećinu, pa čak i polovinu života u menopauzi (Guida i sar., 2012). Prelazak iz reproduktivnog u nereproduktivni period praćen je brojnim tegobama koje utiču na svakodnevne aktivnosti (Budakoglu i sar., 2007), a samim tim i na kvalitet života žena (Chedraui i sar., 2008; Cagnacci i sar., 2012). Nedostatak produkcije estrogena, usled smanjene steroidogeneze u istrošenim ovarijalnim folikulima, dovodi se u vezu sa vazomotornim simptomima (valunzi, noćno preznojevanje), razvojem urogenitalnih poremećaja (Freeman i sar., 2011; Valentini i sar., 2011), bolovima u mišićima i razvojem depresije (Lee J i Lee D, 2013).

Kod primata, menopauza je uzrokovana potpunim kolapsom funkcije ovarijuma (Gleicher i sar., 2011). Reproductivno starenje kod ženki sisara je veoma tesno povezano sa istrošenim rezervama folikula u ovarijumima i lošijim kvalitetom oslobođenih oocita. Pre nego što u ovarijumima ne ostane ni jedan folikul i pre opadanja plodnosti, reproductivni ciklusi progresivno postaju neredovni da bi na kraju prestali da postoje (Wise, 1998). Kod ženki pacova starih od 8. do 15. meseci, estrusni ciklus se najpre produžava (sa 4 na više od 7 dana), a nakon ovog perioda, vaginalni brisevi pokazuju konstantnu kornifikaciju epitela što je opisano kao konstantni estrus (Lu i sar., 1981). Ovaj proces praćen je poremećajem u sekreciji gonadotropina i ovarijalnih steroida i peptida (Wise, 1998).

Mesto početka reproductivnog starenja unutar hipotalamo-hipofizno-ovarijalnog sistema još uvek nije poznato. Međutim, podaci ipak govore u prilog teze da je poremećaj u funkciji ovarijuma, tj. ubrzano gubljenje oocita, ovulacijom ili atrezijom, početni okidač

opadanja reproduktivne funkcije (Anzalone i sar., 2001). Kod ženki pacova starih 10 meseci kod kojih se još uvek održava četvorodnevni estrusni ciklus, uočene su promene u procesu folikulogeneze. U folikulima je detektovana veća koncentracija estradiola nego kod mladih ženki, a bez povećanja koncentracije u serumu (Lerner i sar., 1990).

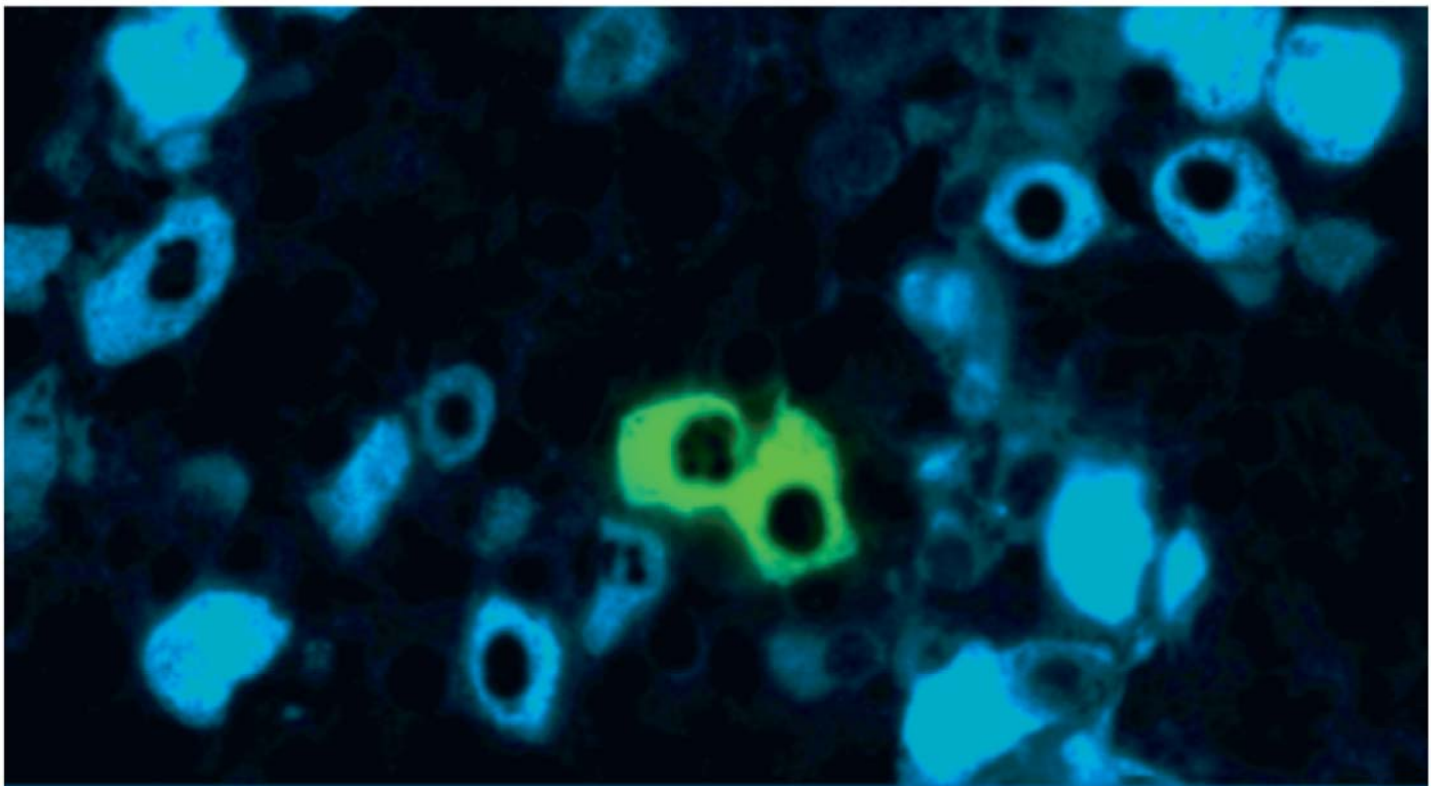
Važni pokazatelji neuroendokrinog reproduktivnog starenja su povećanje koncentracije FSH (DePaolo, 1987) i snižavanje preovulatornog LH talasa (Cooper i sar., 1980). Koncentracija FSH je povećana zbog smanjene sinteze i sekrecije inhibina B iz ovarijuma, uzrokovane malim brojem rastućih folikula (Klein i sar., 1996). Povećanje FSH koncentracije, zajedno sa poremećajem u receptoru za FSH, dovodi do rezistencije granulosa ćelija na pozitivne uticaje gonadotropina, što ubrzava ovarijalno starenje (Danilovich i sar., 2002; Danilovich i Sairam 2002). Uzrok sniženja visine preovulatornog LH talasa je, sa druge strane, još uvek nejasan. Neal-Perry i saradnici (2005) smatraju da uzrok leži u smanjenju osetljivosti hipotalamusa starih ženki na pozitivnu povratnu spregu ovarijalnih steroida, kao i poremećenog oslobađanja nekih transmitera u mediajalnoj preoptičkoj arei. Ovakvo stanovište podržavaju i Wise i saradnici (1998), koji smatraju da razlog reproduktivnog starenja leži u usporavanju "biološkog časovnika" i dishroniteta u ritmičnosti ključnih transmitera koji komuniciraju sa GnRH neuronima. Međutim, Anzalone i saradnici (2001) su utvrdili da redukcija u rezervi folikula ima značajan uticaj na visinu proestrusnog LH talasa. Isti autori su ustanovili da je visina LH talasa u direktnoj korelaciji sa brojem mirujućih folikula kod adultnih i starih ženki pacova, i da dodatno smanjenje broja folikula, unilateralnom ovarijektomijom starih pacova, utiče na još značajnije smanjenje visine proestrusnog LH talasa. Smanjenje ili nepostojanje LH talasa dovodi do produžavanja estrusnog ciklusa i do njegovog prestanka (Anzalone i sar., 2001).

U humanoj medicini proteklih decenija estrogene su masovno korišćeni za suzbijanje i/ili odlaganje pojave poremećaja koji prate menopauzu. Upravo su i najvažnije

indikacija za terapijsku primenu estrogena primarna insuficijencija ovarijuma i menopauza, stanja u kojima postoji nedostatak estrogena u organizmu. Čak i male doze estrogena dovoljne su da se kod žena u menopauzi suzbije delovanje gonadotropina koje se manifestuje valunzima, znojenjem i atrofičnim vaginitisom. Estrogeni se, takođe, mogu koristiti i u terapiji osteoporoze koja se najčešće javlja u menopauzi. Naime, estrogeni sprečavaju resorpciju kosti, koju izaziva parathormon koji stimulacijom osteoklastne resorpcije oslobađa kalcijum i fosfor u ekstracelularnu tečnost. Primena estrogena zaustavlja gubitak koštanog tkiva u menopauzi, ali ne povećava nivo stvaranja kosti. U te svrhe se moraju primeniti veće doze konjugovanih estrogena (Varagić i Milošević, 1995). Međutim, i pored brojnih pozitivnih efekata vezanih za korišćenje estrogena u terapijske svrhe, postoji veliki broj istraživanja koji ukazuju na štetne efekte njihove upotrebe. U prvom redu, ovi štetni efekti se odnose na poremećaje u funkciji reproduktivnih organa (Valbuena i sar., 2001; Matsuura i sar., 2004). Poslednjih 20 godina značajan broj epidemioloških studija ukazuje na povećan rizik od nastajanja tumora mlečne žlezde i uterusa, a vezanih za delovanje estrogena. Prema ovim istraživanjima evidentna je karcinogena aktivnost  $17\beta$ -estradiola. Njegova aplikacija kod miševa i pacova dovodi po pojave tumora mlečne žlezde, hipofize, uterusa, vagine, testisa i kostiju (Highman i sar., 1981; Shull i sar., 1997). Dodatno, tumori su indukovani u grupama životinja sa farmakološkim dozama estradiola u kratkom vremenskom periodu (Shull i sar., 1997).

Kod ljudi i male promene nivoa estrogena u krvi, bilo da su nastale kao posledica veće endogene proizvodnje, bilo unete kroz supstitucionu hormonsku terapiju (*eng. Hormone Replacement Therapy*-HRT) povećavaju rizik od nastajanja tumora (Liehr, 2000). Sam mehanizam delovanja estradiola kao kancerogena se zasniva na njegovoj dvojnoj ulozi. Jedna od uloga je da stimuliše ćelijsku proliferaciju, a druga je da kao prokarcinogen dovodi do oštećenja genoma ćelije (Liehr, 2000).

Kliničke studije su pokazale da HRT povećava rizik nastanka kardiovaskularnih oboljenja, hiperfosfaturije i holecistitisa (Schierbeck, 2012; Grodstein i sar., 1994). Dodatno, opsežna studija Rossouw i saradnika (2002), koja se zasnivala na aplikaciji estrogena i progestina zdravim menopauzalnim ženama, prekinuta je usled povećanog štetnog rizika u poređenju sa korisnim efektima. Upravo su navedeni autori konstatovali povećanje rizika od nastanka kardiovaskularnih oboljenja i kancera dojke (Rossouw i sar., 2002). Stoga je iznalaženje optimalnog rešenja u pogledu alterantivnog terapeutika, koji bi se mogao koristiti u prevenciji i terapiji menopauzalnih poremećaja, postalo imperativ.



## CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.

Fitoestrogeni iz soje, u prvom redu genistein i daidzein, su veoma zastupljeni u životu savremenog čoveka, kako kroz ishranu, tako i kroz pomoćna lekovita sredstva. Zbog osobine selektivnih modulatora estrogenskih receptora, poslednjih godina fitoestrogeni postaju atraktivno polje intenzivnih bazičnih istraživanja, predmet pretkliničkih i kliničkih studija i tema diskusija naučne i stručne javnosti. Jedna od mogućih terapijskih aplikacija genisteina i daidzeina je sprečavanje i ublažavanje tegoba koje nastaju u menopauzalnom periodu života žena, kao alternativa supstitucionoj hormonskoj terapiji. Međutim, njihovo delovanje na organe ženskog reproduktivnog sistema, naročito u periodu menopauze, još uvek nije u potpunosti istraženo.

Na osnovu napred navedenog ciljevi ove doktorske disertacije su:

**I U eksperimentalnom modelu nezrelih pacova:**

1. utvrditi potencijalno estrogensko delovanje visokih, srednjih i niskih doza genisteina i daidzeina, pomoću uterotrofnog eseja;
2. evaluirati efekat visoke, srednje i niske doze genisteina i daidzeina na hipofizu, ovarijume, uterus i vaginu nezrelih ženki pacova i uz uključivanje histoloških, stereološko-morfometrijskih i imunofluorescentnih pokazatelja, povećati osetljivost eseja.
3. definisati minimalne efektivne doze genisteina i daidzeina, koje ispoljavaju estrogensko delovanje.

**II U animalnom modelu menopauze:**

1. ispitati uticaj hronične aplikacije minimalnih efektivnih doza genisteina i daidzeina na morfološke i imunofluorescentne karakteristike gonadotropnih i laktotropnih ćelija u hipofizama acikličnih ženki pacova i uporediti ih sa efektima koje izaziva terapijska doza estradiola;

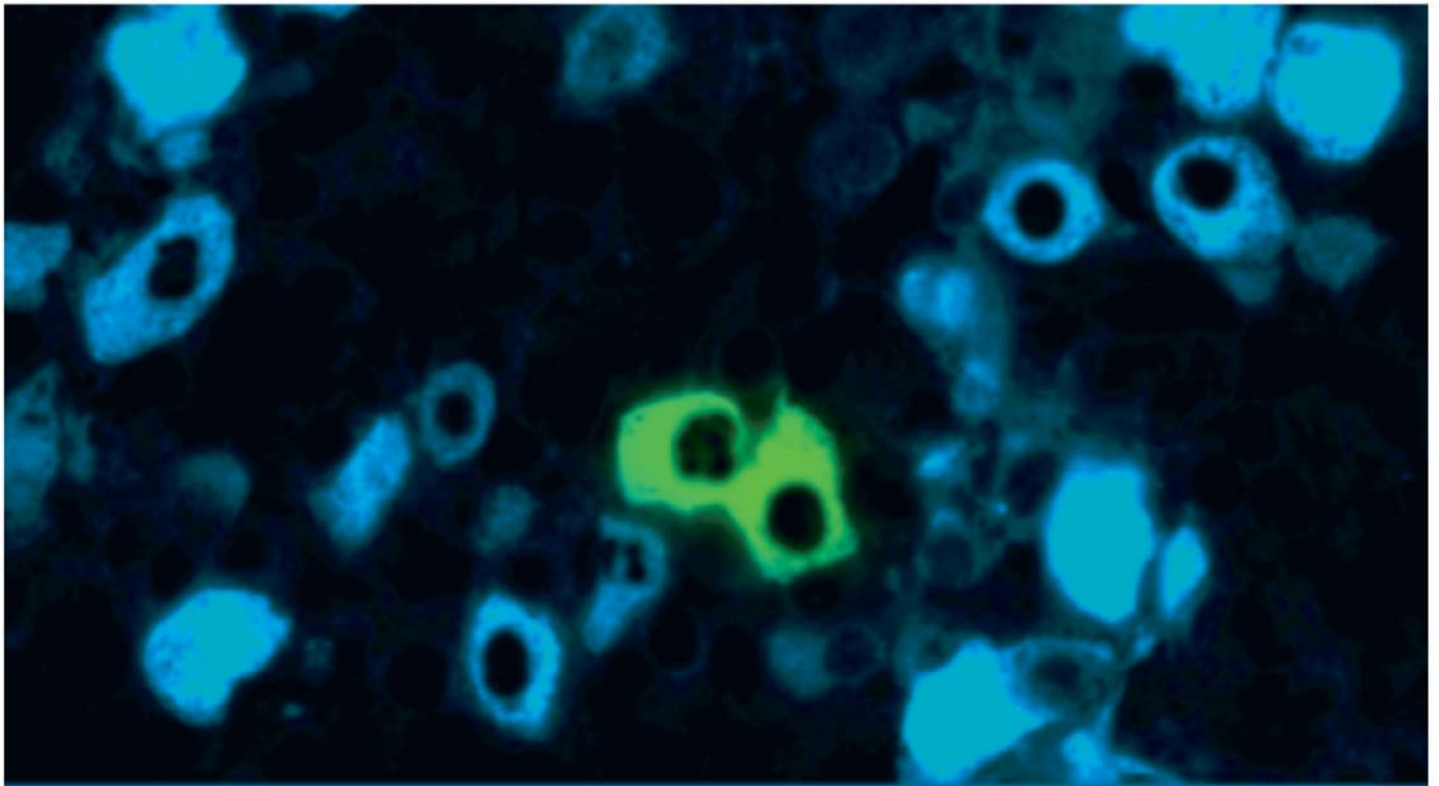
2. ispitati uticaj hronične aplikacije minimalnih efektivnih doza fitoestrogena, genisteina i daidzeina, na stereološke i morfometrijske karakteristike ovarijuma acikličnih ženki pacova, sa posebnim osvrtom na proces folikulogeneze, i uporediti ih sa efektima koje izaziva terapijska doza estradiola;

3. ispitati uticaj hronične aplikacije minimalnih efektivnih doza genisteina i daidzeina, na stereološke, morfometrijske i imunofluorescentne karakteristike uterusa, kao i na ekspresiju gena za receptore steroidnih hormona u uterusima acikličnih ženki pacova, i uporediti ih sa efektima koje izaziva terapijska doza estradiola;

4. ispitati uticaj hronične aplikacije minimalnih efektivnih doza genisteina i daidzeina, na histološke karakteristike vagina acikličnih ženki pacova i uporediti ih sa efektima koje izaziva terapijska doza estradiola.



**Iz ovako definisanih ciljeva istraživanja, proistekao je i opšti cilj koji obuhvata rasvetljavanje dejstava fitoestrogena na reproduktivni sistem ženki pacova. Od posebnog interesa je jasno definisanje potencijala fitoestrogena u poboljšanju funkcije reproduktivnog sistema u animalnom modelu menopauze, kao i poređenje efekata njihove aplikacije sa onima koje ima aplikacija estradiola.**



## MATERIJAL I METODE

3.



### 3.1. LABORATORIJSKO ODRŽAVANJE ŽIVOTINJA

Tokom studije korišćene su ženke pacova Wistar soja, gajene u vivarijumu Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Životinje su boravile u plastičnim kavezima sa prostirkom od sterilne strugotine u uslovima konstantne temperature prostorije ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) i režimom osvetljenja 12 sati svetla, 12 sati mraka, čime je omogućen adekvatan dnevno-noćni ritam. Tokom izvođenja eksperimenata, životinjama su bile slobodno dostupne voda i laboratorijska hrana. Uzevši u obzir da su životinje bile tretirane fitoestrogenima, laboratorijska hrana nije sadržala komponente iz soje i sastojke leguminoza koji bi mogli uticati na validnost rezultata istraživanja. Receptura za pripremu laboratorijske hrane, koja kao jedini izvor proteina sadrži kazein, preuzeta je od Picheriti i saradnika (2000). Komponente hrane su mešane na Katedri za ishranu Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu, Srbija (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sastav hrane bez prisustva soje koju su konzumirale eksperimentalne životinje.

SASTOJCI HRANE		g/100 g hrane
Proteini	Kazein	20.3
Ugljeni hidrati	Kukuruzno brašno	45
	Saharoza	20
Masti	Kukuruzno ulje	5.2
Celuloza, mikrokristalina <sup>1</sup>		3.7
Vitaminsko/Mineralni premiks <sup>2</sup>		1.5
di-Ca-fosfat ( $\text{CaHPO}_4$ ) <sup>2</sup>		3.3
Kreda ( $\text{CaCO}_2$ ) <sup>2</sup>		1
So ( $\text{NaCl}$ , jodirana sa 38 mg KJ/kg) <sup>2</sup>		0.5

Proizvođač: <sup>1</sup> Alfa Aesar, Johnson Matthey GmbH & Co.KG, Germany;

<sup>2</sup> PKB INSHRA, Srbija.

Eksperimentalna procedura obuhvatala je **dva animalna modela**:

- **Uterotrofni esej**, koji se koristi za ispitivanje estrogenske aktivnosti supstance, izveden je na nezrelim ženjkama pacova;
- **Animalni model menopauze**, u kom su korišćene aciklične ženke pacova.

Korišćenje životinja i eksperimentalni protokol za izradu ove doktorske disertacije odobrila je Etička komisija Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” (IBISS) u Beogradu. Postupanje sa eksperimentalnim životinjama bilo je u skladu sa regulativom objavljenom u “*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS no. 123 Appendix A)*”. Dodatno, eksperimentalni deo doktorske disertacije koji obuhvata ispitivanje estrogenske aktivnosti na nezrelim ženjkama pacova je urađen po protokolu koji propisuje Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD; *Guideline for the testing of chemicals*, 2007).

## **3.2. EKSPERIMENTALNE GRUPE**

---

### **3.2.1. Nezrele ženke**

Ženke i mužjaci Wistar soja sparivni su u adultnom uzrastu. Jedanaestog dana nakon sparivanja sa mužjacima, ženke su smeštane u kaveze pojedinačno. Pet dana nakon okota sakupljani su mladi iz svih legala, potom su odvojeni po polovima, nakon čega su formirane grupe. Jedna majka je u kavezu bila sa 8-10 mladunaca ženskog pola. U uzrastu od 18 dana obavljeno je odbijanje mladunaca od majki i formiranje grupa od 8 mladih po kavezu, tako da grupe budu ujednačene telesne mase.

Počevši od 19. dana života, polno nezrele ženke su merene i u toku tri dana subkutano (*s.c.*) tretirane genisteinom, daidzeinom i  $17\alpha$ -etinil estradiolom. Fitoestrogeni su rastvarani u smeši sterilnog maslinovog ulja i apsolutnog etanola (9:1). Etil-estradiol (pozitivna kontrola) je rastvaran u sterilnom maslinovom ulju. Stoga, kontrolne grupe za

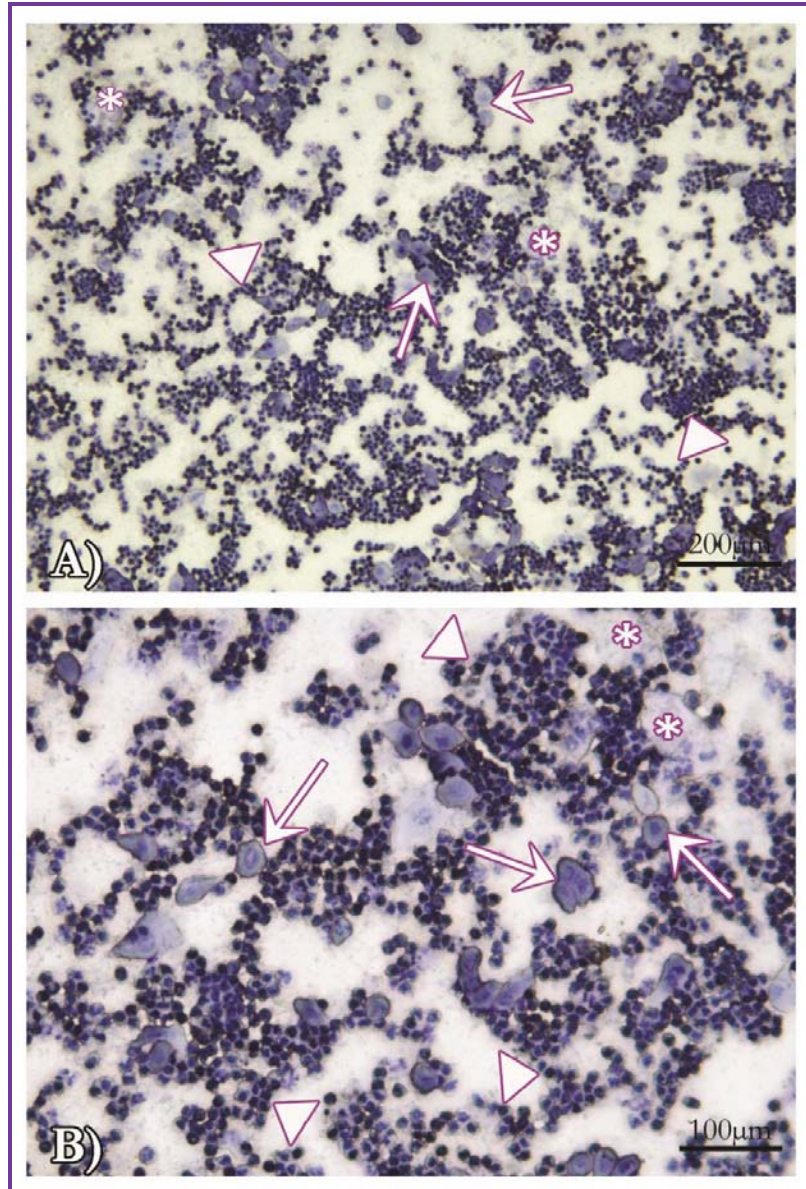
fitoestrogene, odnosno etinil-estradiol, primale su isti volumen rastvarača. Uvedena je i intaktna (nulta) kontrola. Doze aplikovanih supstanci prikazane su u Tabeli 2. Doze su birane na osnovu studije Kanno i saradnika (2003).

**Tabela 2.** Eksperimentalne grupe nezrelih ženki pacova.

Naziv grupe	Oznaka grupe	Tretman	Koncentracija supstance
Intaktna (nulta) kontrola	K	/	/
Kontrolna grupa za estradiol	KE	Sterilno maslinovo ulje	/
Kontrolna grupa za fitoestrogene	KF	Sterilno maslinovo ulje i apsolutni etanol (odnos 9:1)	/
Etinil-Estradiol Visoka doza	EE1	17 $\alpha$ -etinil estradiol (Sigma-Aldrich, USA)	1 $\mu$ g/kg t.m./dan
Etinil-Estradiol Niska doza	EE2		0.03 $\mu$ g/kg t.m./ dan
Genistein visoka doza	G1	Genistein (LC Laboratories, MA, USA)	50 mg/kg t.m./ dan
Genistein srednja doza	G2		35 mg/kg t.m./dan
Genistein niska doza	G3		15 mg/kg t.m./dan
Daidzein visoka doza	D1	Daidzein (LC Laboratories, MA, USA)	100 mg/kg t.m./dan
Daidzein srednja doza	D2		50 mg/kg t.m. /dan
Daidzein niska doza	D3		35 mg/kg t.m./dan

### 3.2.2. Aciklične ženke

Kod ženki svih kontrolnih i eksperimentalnih grupa počevši od jedanaestog meseca starosti praćen je estrusni ciklus uzimanjem i mikroskopskim pregledom vaginalnog brisa. Estrusni ciklus ženki bio je iregularan sa dugim periodima diestrusa (Slika 1A i B) tj. ponovljenih lažnih trudnoća.



**Slika 1.** Diestrus - vaginalni bris. **Strelica** - ovalne epitelne ćelije sa jedrima; **Zvezdica** - kornifikovane ćelije ljuspastog oblika bez jedra; **Glava strelice** - leukociti. H&E, bar 200 µm (A), bar 100 µm (B).

Aciklične ženke odvojene su u eksperimentalne grupe i smeštene po dve životinje po kavezu. Dve nedelje pre početka, kao i tokom tretmana, životinje su konzumirale isključivo laboratorijsku hranu bez komponenata soje. Potom su životinjama svakodnevno, u trajanju od četiri nedelje, *s.c.* aplikovane minimalne efektivne doze sojinih fitoestrogena genisteina i daidzeina, kao i terapijska doza estradiol-dipropionata (EDP). Efektivne doze sojinih fitoestrogena su najmanje doze koje su u okviru uterotrofnog eseja uticale na porast bilo kog od ispitivanih parametara u uterusima nezrelih ženki. Formirane su tri kontrolne grupe: intaktna, kontrola za tretman estradiol-dipropionatom i kontrola za tretman fitoestrogenima. Doze aplikovanih supstanci prikazane su u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Eksperimentalne grupe acikličnih ženki pacova.

Naziv grupe	Oznaka grupe	Tretman	Koncentracija supstance
Intaktna (nulta) kontrola	K		/
Kontrolna grupa za estradiol	KE	Sterilno maslinovo ulje	/
Kontrolna grupa za fitoestrogene	KF	Sterilno maslinovo ulje i apsolutni etanol (odnos 9:1)	/
Estradiol	E	Estradiol dipropionat - EDP, ICN Galenika, Srbija.	0.625 mg/kg t.m./dan
Genistein	G	Genistein (LC Laboratories, MA, USA)	35 mg/kg t.m/ dan
Daidzein	D	Daidzein (LC Laboratories, MA, USA)	35 mg/kg t.m./dan

### **3.3. UZIMANJE I PRIPREMA MATERIJALA ZA ANALIZU**

---

Dvadeset četiri časa nakon poslednjeg injeciranja životinje oba eksperimentalna modela su merene i žrtvovane dekapitacijom. Nakon žrtvovanja izolovane su hipofize ovarijumi, uterusi i vagine. Sa uterusa je pažljivo odstranjeno masno tkivo, a potom im je preciznim merenjem na analitičkoj vagi (*Mettler, Switzerland*) određivana masa. Nakon izolacije, hipofize, jedan od ovarijuma i delovi desnog roga uterusa fiksirani su u 4% paraformaldehidu (*Sigma-Aldrich, USA*) u trajanju od 24 sata, dok su drugi ovarijum i deo levog roga uterusa fiksirani u Bouen-ovom fiksativu u trajanju od 48 sati. Delovi uterusa zamrznuti su u tečnom azotu i čuvani u zamrzivaču na  $-80^{\circ}\text{C}$  do korišćenja i izolacije RNK. Nakon fiksacije, organi su dehidratirani u seriji etanola rastuće koncentracije (30-100%), prosvetljeni u ksilolu i ukalupljeni u paraplastu (*Histowax, Histolab Product AB, Sweden*).

Organi su sečeni na preseke debljine 3  $\mu\text{m}$ , rotacionim mikrotomom (*Leica Microsystems GmbH, Germany*). Nakon sušenja preseci su pripremljeni za histološko bojenje ili imunocitohemijsko obeležavanje specifičnih antigena.

### **3.4. HISTOLOŠKO BOJENJE**

---

Osnovno histološko bojenje hematoksilin-eozin (H&E) korišćeno je za vizuelizaciju građe uterusa, ovarijuma i vagine nezrelih i acikličnih ženki pacova. Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidratacije preseka u seriji etanola opadajuće koncentracije (100-96-70%), preseci su bojani Mayer-ovim hematoksilinom (*Merck-Alkaloid, BJR Macedonia*) u trajanju od 5 minuta, a zatim eozinom u trajanju od 3 minuta. Zatim je sledila dehidratacija u seriji etanola rastuće koncentracije (96-100%), i montiranje pokrovnog stakla DPX-om (*Fluka, Switzerland*).

### **3.5. STEREOLOŠKA I MOFOMETRIJSKA MERENJA**

---

Stereološkim i morfometrijskim metodama analizirani su uterus i ovarijumi nezrelih i acikličnih ženki pacova. Pri merenju korišćeni su H&E obojeni preseci debljine 3  $\mu\text{m}$ . Stereološkim metodama određivani su: volumeni frakcija uterusa, volumeni ovarijuma, volumenske gustine osnovnih faza ovarijuma i uterusa i broj i volumen granulosa luteinskih ćelija u žutim telima ovarijuma acikličnih ženki pacova. Morfometrijskim metodama određivani su: visina endometrijalnog epitela, broj endometrijalnih žlezda, broj pojedinačnih klasa ovarijalnih folikula i broj žutih tela.

Stereološka analiza je rađena uz pomoć *newCAST* stereološkog softverskog paketa (VIS-*Visiopharm Integrator System, version 3.2.7.0. Visiopharm, Denmark*). Mikroskop (*Olympus BX-51, Olympus Europa GmbH, Germany*) je opremljen motorizovanim stočićem (*Prior*) sa preciznošću pomeranja po x-y osi od 1  $\mu\text{m}$ . Pomeranje stočića po z osi kontrolisano je mikrokatorom (*Heidenbain MT1201, Heidenbain, Germany*) sa preciznošću od 0.2  $\mu\text{m}$ . Za mikroskop je vezana CCD video kamera (*Pixelink*). Pri analizi korišćeni su planahromatski objektivni visoke numeričke aperture, uvećanja 4x, 40x i 100x. Opcija "Mask" omogućava definisanje okvira analiziranog tkiva, a opcija "Meander sampling" nasumično uzorkuje zadati procenat. *NewCast* stereološki sistem je generisao interaktivne stereološke mrežice i stereološke disektorske ramove prilikom analize uterusa i ovarijuma. Kako bi bila određena stvarna debljina preseka analiziranog tkiva neophodna u stereološkoj analizi, korišćena je metoda napredovanja parafinskog bloka odnosno "block advance" (BA) metoda (Dorph-Petersen i sar., 2001). Ova metoda se sastoji u sledećem: sa sečenjem parafinskog bloka njegova visina se smanjuje, a smanjenje tj. "block advance" - BA predstavlja rastojanje za koje je parafinski blok napredovao prema nožu mikrotoma u toku sečenja preseka. Kako bi utvrdili prosečnu BA treba iseći veliki broj preseka parafinskog bloka i izmeriti promene u visini bloka. Izmerena promena se deli sa brojem preseka. Koristeći metod BA

ustanovljeno je da je stvarna debljina preseka uterusa i ovarijuma jednaka debljini zadatoj na mikrotomu (3  $\mu\text{m}$ ). Presek od kog će otpočeti analiza, biran je pomoću tablice nasumičnih brojeva.

### 3.5.1. Kavalijerijev princip određivanja volumena

Kavalijerijev princip je stereološka metoda koja omogućava da se iz dvodimenzionalnih histoloških preseka kvantitativno procenjuje volumen organa (Gundersen i Jensen, 1987). Volumen organa izračunava se kao zbir pojedinačnih volumena analiziranih faza, pri čemu se volumen faze izračunava po formuli:

$$\bar{V} = a(p) \cdot \bar{d} \cdot \sum_{i=1}^n P_i$$

Gde je  $a(p)$  površina koja pripada svakoj tački uzorkovanja tj. jednom pogotku koji pada na analiziranu fazu,  $(\bar{d})$  rastojanje između dva uzastopno analizirana preseka, i  $\Sigma P_i$  suma pogodaka koji padaju na analiziranu fazu. Analiziran je svaki deseti presek, stoga je  $(\bar{d})$  iznosilo 30  $\mu\text{m}$ .

Volumen uzorkovane frakcije uterusa ( $V_U$ ) nezrelih i acikličnih ženki pacova izračunat je kao zbir volumena endometrijava  $V_E$ , miometrijava  $V_M$  i perimetrijava  $V_P$

$$\bar{V}_U = \bar{V}_E + \bar{V}_M + \bar{V}_P$$

Kako bi se osiguralo da po svakoj od analiziranih faza uterusa bude izbrojano od 100 do 200 pogodaka, generisane su tri interaktivne stereološke mrežice:

- 1) Mrežica za endometrijum, u okviru koje su brojani pogoci koji padaju ne samo na stromu endometrijava već i na njegove specifične kompartimente (endometrijalne žlezde i epitel lumena endometrijava),  $a(p) = 268434.77 \mu\text{m}^2$ ;
- 2) Mrežica za miometrijum,  $a(p) = 10956.52 \mu\text{m}^2$ ;



3) Mrežica za perimetrijum,  $a(p) = 14913.04 \mu\text{m}^2$ .

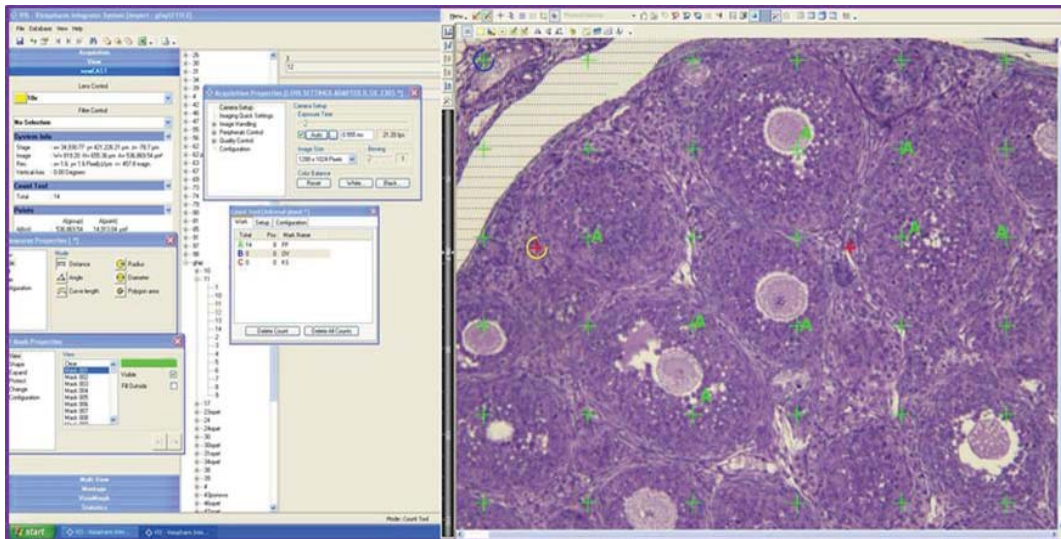
Volumen ovarijuma ( $V_{ov}$ ) nezrelih ženki pacova izračunat je kao zbir volumena folikularnog parenhima ( $V_{fp}$ ) i volumena ovarijalne strome ( $V_{os}$ ).

$$\bar{V}_{ov} = \bar{V}_{fp} + \bar{V}_{os}$$

Generisane su dve interaktivne stereološke mrežice (Medigović i sar. 2012b) :

1) Mrežica za folikularni parenhim,  $a(p) = 167\ 771.73 \mu\text{m}^2$ ;

2) Mrežica za ovarijalnu stromu,  $a(p) = 74\ 565.21$ .



**Slika 2.** Interfejs pri merenju volumena Kavalijerijevim principom. Desno su prikazane interaktivne stereološke mrežice za određivanje volumena ovarijuma nezrelih ženki pacova.

Volumen ovarijuma ( $V_{ov}$ ) acikličnih ženki pacova izračunat je kao zbir volumena folikularnog parenhima ( $V_{fp}$ ), volumena ovarijalne strome ( $V_{os}$ ) i volumena žutih tela ( $V_{cl}$ ).

$$\bar{V}_{ov} = \bar{V}_{fp} + \bar{V}_{os} + \bar{V}_{cl}$$

Pri čemu je volumen ovarijalne strome ( $V_{os}$ ) izračunat kao zbir volumena intersticijuma ( $V_i$ ) i volumena krvnih sudova ( $V_{ks}$ ) :

$$\bar{V}_{os} = \bar{V}_i + \bar{V}_{ks}$$

Generisane su dve interaktivne stereološke mrežice:

- 1) Mrežica za folikularni parenhim, intersticijum i krvne sudove,  $a(p) = 268437.77 \mu\text{m}^2$ ;
- 2) Mrežica za žuta tela,  $a(p) = 74\,565.21 \mu\text{m}^2$ .

Volumeni organa i njihovih faza izražavani su u  $\text{mm}^3$ .

### 3.5.2. Određivanje volumenskih gustina

Volumenska gustina ( $V_V$ ), odnosno procentualna zastupljenost pojedinačnih faza u ukupnom volumenu organa, izračunava se kao količnik volumena pojedinačnih faza, i ukupnog volumena uzorkovane faze uterusa, odnosno ovarijuma. Ovaj količnik množi se brojem 100:

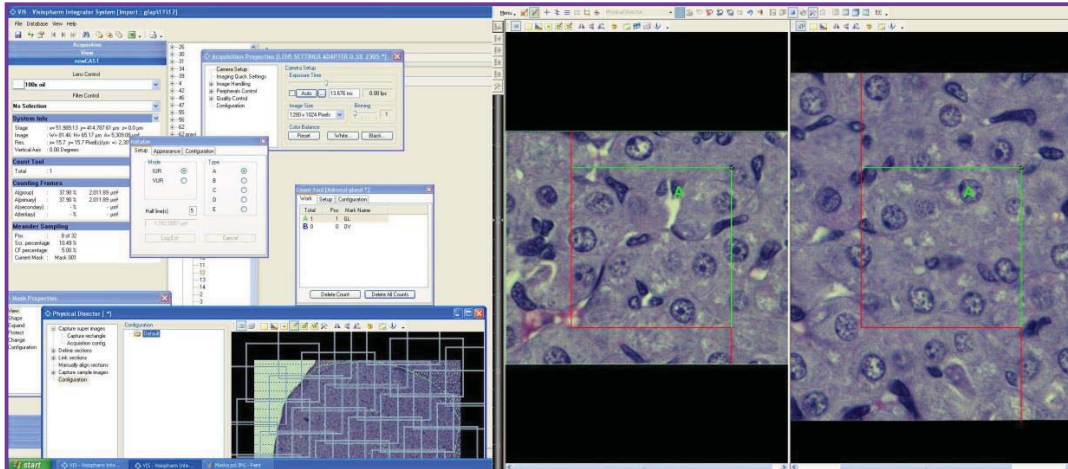
$$V_V = V_{(faze)} / V_{U/OV} \cdot 100$$

Volumenska gustina je relativna, bezdimenziona stereološka veličina koja se izražava u procentima (%).

### 3.5.3. Fizički disektor

Za određivanje broja granulosa luteinskih ćelija u zrelih žutim telima ovarijuma kontrolnih i eksperimentalnih acikličnih ženki pacova korišćen je metod fizičkog disektora (Howard i Reed, 2005). Preseci koji su određeni da predstavljaju disektorski par prvo su skenirani uz pomoć BX-51 mikroskopa i motorizovanog stočića. Na skeniranoj “super” fotografiji dva preseka, definisani su pojedinačni preseci i spojeni u parove.

Nakon definisanja i spajanja u parove, pomoću opcije montaže *newCAST* softvera, preseci se poravnavaju. Jedan od preseka iz para imenovan je kao referentni a drugi kao kontrolni (“*look up*”) presek. Potom je brojanje obavljeno u suprotnom pravcu, tj. kontrolni presek postaje referentni i obrnuto (Slika 3).



**Slika 3.** Interfejs pri fizičkom disektoru. Desno je dat prikaz nepristrasnih stereoloških ramova za brojanje granulosa luteinskih ćelija u zrelim žutim telima ovarijuma acikličnih ženki pacova. Na slici se uočavaju referentni i kontrolni “look up” presek.

Za izračunavanje broja granulosa luteinskih ćelija u zrelim žutim telima acikličnih ženki pacova, korišćen je nepristrasni stereološki ram (“*unbiased stereological frame*”; Gundersen, 1986). Cilj dizajna je da po ovarijumu jedne životinje bude izbrojano 100 - 200 ćelija. Stoga je dimenzija nepristrasnog rama za brojanje iznosila je 150 x 150  $\mu\text{m}$ , a uzorak za analizu određen na 5% svakog pojedinačnog zrelog žutog tela. Opcija “*Meander sampling*” obezbeđuje nasumično uzorkovanje zadanog procenta.

Brojanje granulosa luteinskih ćelija obavljeno je uz pomoć uljanog objektiva uvećanja 100x visoke numeričke aperture, pri čemu je konačno uvećanje na monitoru iznosilo 3750x. Poređenje referentnog i kontrolnog preseka je omogućeno opcijom *newCAST* softvera. Prvo je izabrana pozicija na referentnom preseku, a zatim računar pomera motorizovani stočić do iste pozicije na kontrolnom preseku. Računar na kontrolnom preseku skenira široko polje od 4 mikrografije. Njihovim spajanjem, lako se nalazi vidno polje koje odgovara onom na referentnom preseku.

Referentna partikula u granulosa luteinskim ćelijama je jedro, pa je broj ćelija izjednačen sa brojem jedara. Metoda fizičkog disektora podrazumeva da se broji ona

referentna partikula, tj. jedro, koja se nalazi unutar nepristrasnog rama za brojanje, koju ne seku zabranjene linije i koja se ne nalazi na kontrolnom preseku (Gundersen, 1986).

#### **3.5.4. Određivanje volumena granuloza luteinskih ćelija u zrelih žutih telima acikličnih ženki pacova**

Volumen pojedinačnih granuloza luteinskih ćelija meren je lokalnim stereološkim alatom - rotatorom. Merenje je obavljano na ćelijama koje su brojane, tj. uzorkovane fizičkim disektorom. Nakon ograničavanja veličine ćelije, softverski paket preračunava volumen ćelije po formuli:

$$V = \sum l_i^2 \cdot t \cdot \frac{\pi}{2}$$

Pri čemu je  $t$  rastojanje između osnovnih testnih linija koje prolaze kroz centar ćelije (centar jedra), a  $l_i$  rastojanje između osnovnih testnih linija i granica analizirane ćelije.

#### **3.5.5. Određivanje visine epitela lumena endometrijuma i broja endometrijalnih žlezda uterusa**

Visina epitela endometrijuma, kao pokazatelj estogenske aktivnosti, određivana je pomoću *newCAST* softverskog paketa (VIS-*Visiopharm Integrator System, version 3.2.7.0. Visiopharm, Denmark*). Analiziran je svaki dvadeseti presek, pri čemu je analizirano 200 ćelija po životinji. Visina površinskih epitelnih ćelija endometrijuma precizno je izmerena pomoću opcije "*Distance*". Merene su ćelije u kojima se jasno uočavaju jedro, bazalni i apikalni deo ćelijske membrane. Merenje je izvršeno pomoću uljanog objektiva uvećanja 100x visoke numeričke aperture, pri čemu je konačno uvećanje monitora iznosilo 3750x.

Broj endometrijalnih žlezda određivan je na serijskim parafinskim presecima uzorkovane frakcije uterusa, na konačnom uveličanju monitora 1500x (uveličanje objektiva 40x). Prilikom brojanja analiziran je svaki dvadeseti presek.

### **3.5.6. Morfometrija i klasifikacija ovarijalnih folikula**

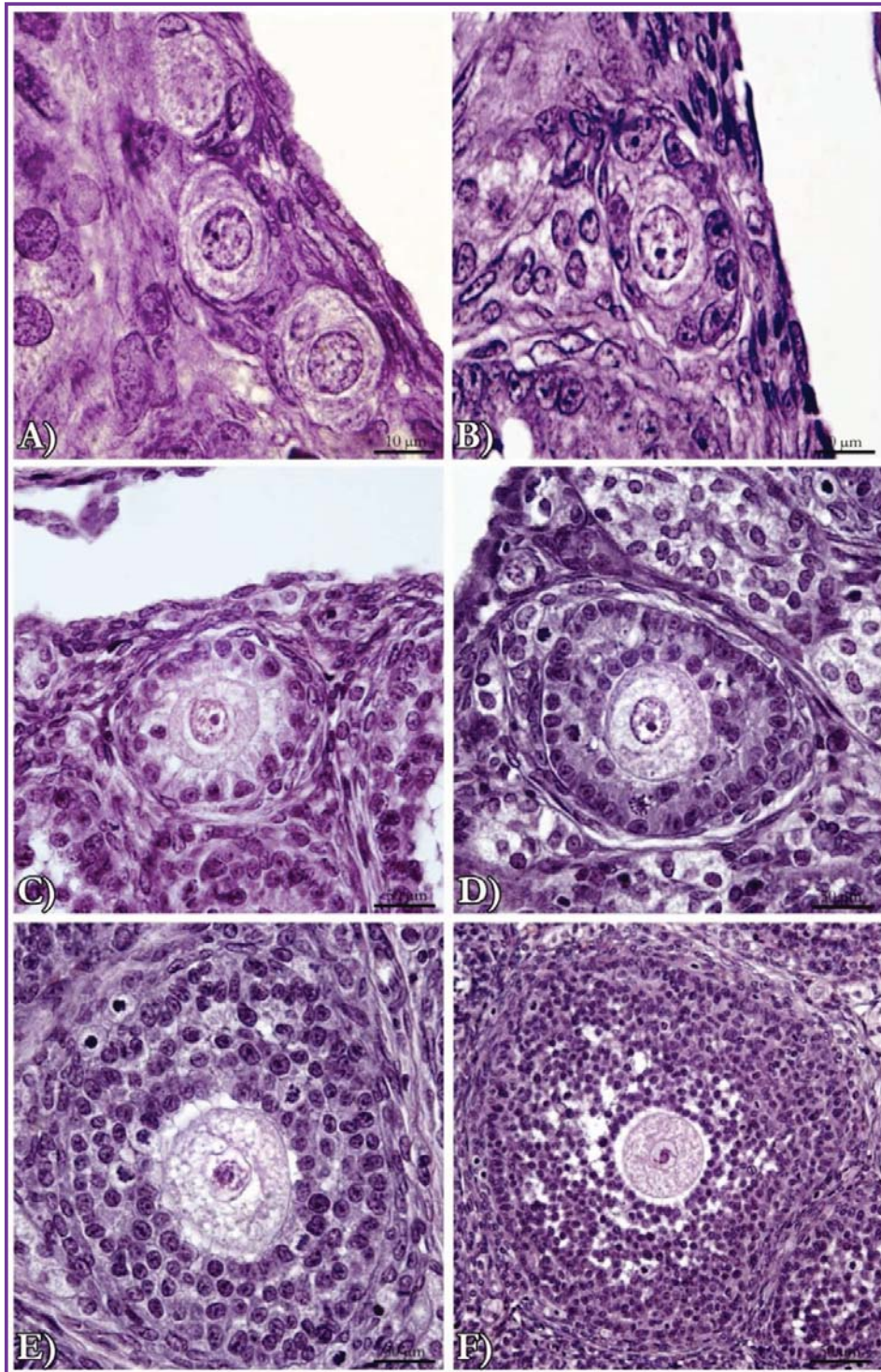
Za brojanje folikula korišćena je klasifikacija folikula po veličini prečnika folikula koju su opisali Gaytan i saradnici (1998) za kategorizaciju malih folikula i Osman (1985) za kategorizaciju antralnih i atretičnih folikula. Na osnovu toga folikuli su klasifikovani u dve grupe.

**I mali folikuli**, odnosno folikuli čiji je prečnik  $< 275 \mu\text{m}$  na najširem preseku (Slika 4)

**II veliki** (antralni) folikuli čiji je dijametar  $\geq 275 \mu\text{m}$  (Slika 5).

**Mali folikuli** su podeljeni na šest klasa (Slika 4 A-F):

- A)** primordijalni folikuli - izgrađeni su od oocite oko koje se nalazi 3-5 niskoprizmatičnih folikularnih ćelija;
- B)** primarni folikuli - jedan sloj folikularnih ćelija okružuje oocitu. Primarnim se smatraju folikuli kod kojih je bar jedna folikularna ćelija uvećana, do folikula kod kojih je kompletan sloj izgrađen od prizmatičnih folikularnih ćelija;
- C)** višeslojni folikuli klase a - **Va** - izgrađeni su od oocite i 1-2 sloja folikularnih ćelija i imaju prečnik  $< 75 \mu\text{m}$ ;
- D)** višeslojni folikuli klase b - **Vb** - imaju dijametar  $76-150 \mu\text{m}$ , a izgrađeni su od nekoliko slojeva granuloza ćelija i oocite. Kod ove klase folikula jasno se uočava sloj niskoprizmatičnih ćelija teke;
- E)** višeslojni folikuli klase c - **Vc** - dijametar je  $151-200 \mu\text{m}$  ;
- F)** višeslojni folikuli klase d - **Vd** - dijametar je  $201-275 \mu\text{m}$ ; ovoj grupi folikula pripadaju veliki sekundarni i manji antralni folikuli.



**Slika 4.** Klase malih folikula. **A)** Primordijalni; **B)** Primarni; **C)** Va i **D)** Vb; **E)** Vc; **F)** Vd. H&E, bar 10 µm (A-B), bar 50 µm (C-F).

Druga grupa je grupa **velikih, antralnih folikula** koji su po dijametru podeljeni u pet klasa (Slika 5 A-E). Folikuli klase pet po morfofunkcionalnoj klasifikaciji pripadaju preovulatornim folikulima.

- A) folikuli **klase I** - 276-350  $\mu\text{m}$  u dijametru;
- B) folikuli **klase II** - 351-400  $\mu\text{m}$  u dijametru;
- C) folikuli **klase III** - 401-450  $\mu\text{m}$  u dijametru;
- D) folikuli **klase IV** - 451-575  $\mu\text{m}$  u dijametru;
- E) folikuli **klase V** - >575  $\mu\text{m}$  u dijametru.

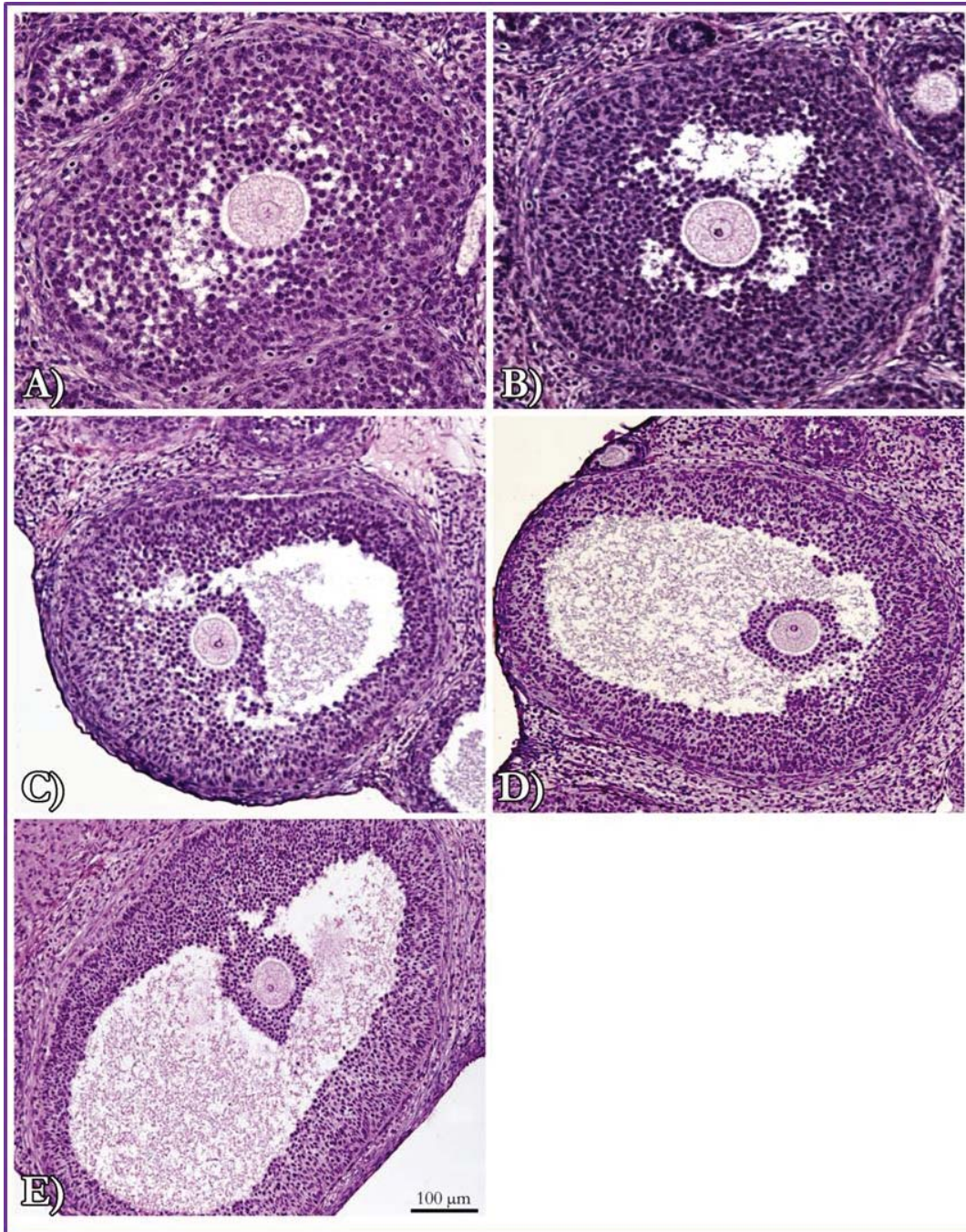
Osman (1985) je na nivou svetlosne mikroskopije opisao dva osnovna stadijuma atrezije antralnih atretičnih folikula (Slika 6): **Stadijum I** sa podstadijumima **Ia** i **Ib**, i **stadijum II** sa podstadijumima **IIa** i **IIb**.

**Stadijum I.** U ovom stadijumu atrezije, degenerativne promene su uočljive isključivo u sloju granuloza ćelija, koje se ogledaju u skupljanju ćelija i prisustvu piknotičnih jedara. Po razmeri ovih promena, stadijum jedan se dalje može podeliti na (Slika 6 A-B):

- A) **Ia** podstadijum, koji karakterišu promene granuloza ćelija vidljive samo na većim uvećanjima, lokalizovane na maloj površini granuloza sloja, uglavnom do antralne šupljine;
- B) **Ib** podstadijum, u kome su degenerativne promene zahvatile kompletan granuloza sloj.

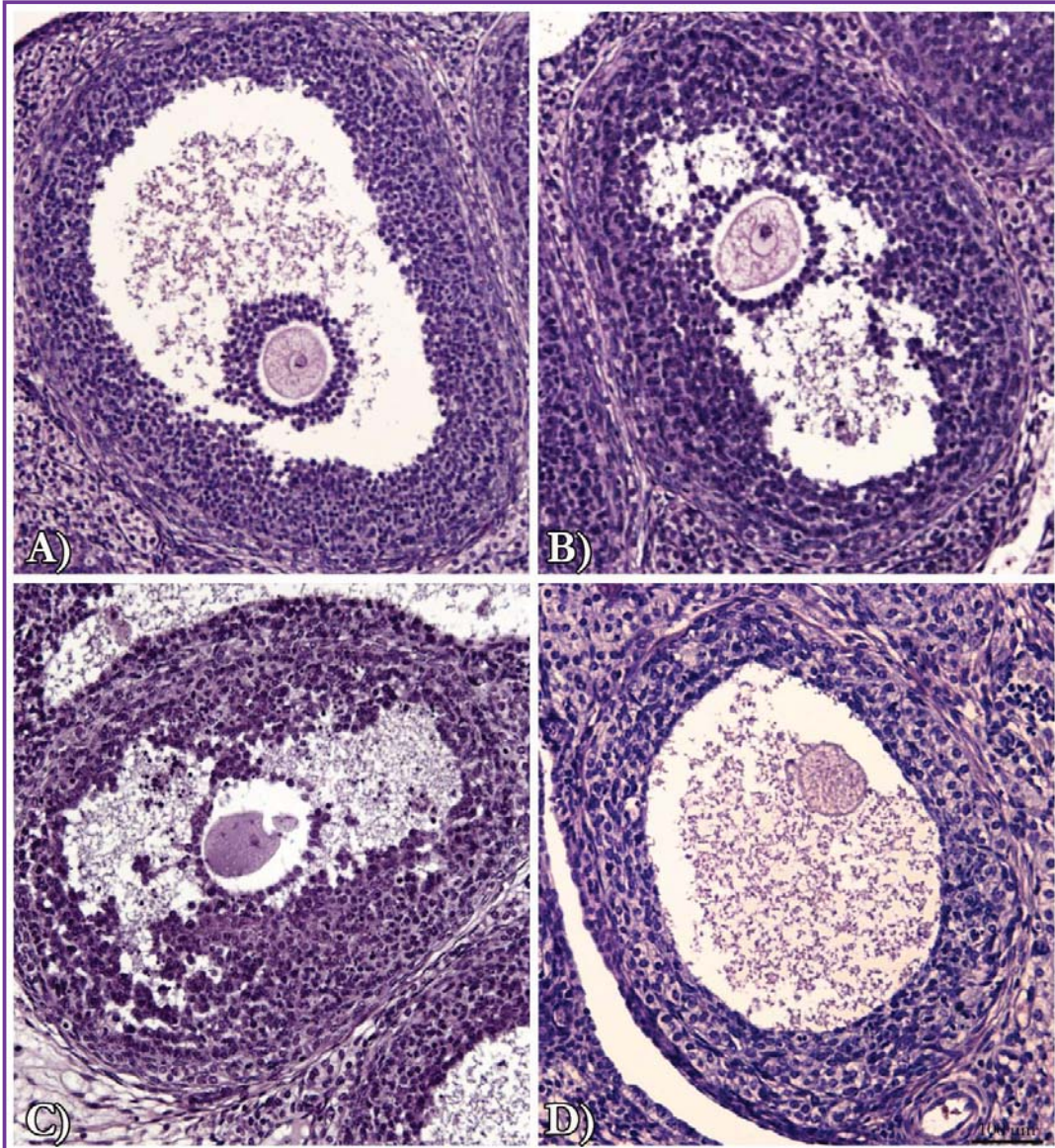
**Stadijum II.** Degenerativne promene se u ovom stadijumu uočavaju i na oociti, koja pokazuje znake nastavljanja mejotičke deobe, kao što je propadanje nuklearne membrane sa ili bez formiranja pseudomaturacionog deobnog vretena. Stadijum II se može podeliti na (Slika 6 C-D):

- C) **IIa** podstadijum, gde je oocita okružena ćelijama *cumulus-a oophorus-a*, ili njihovim ostacima;
- D) **IIb** podstadijum, koga karakteriše prisustvo potpuno "gole" oocite koja pliva u folikularnoj tečnosti.



**Slika 5.** Klase velikih folikula. **A)** Klasa I; **B)** Klasa II; **C)** Klasa III i **D)** Klasa IV; **E)** Klasa V; H&E, bar 100 µm.





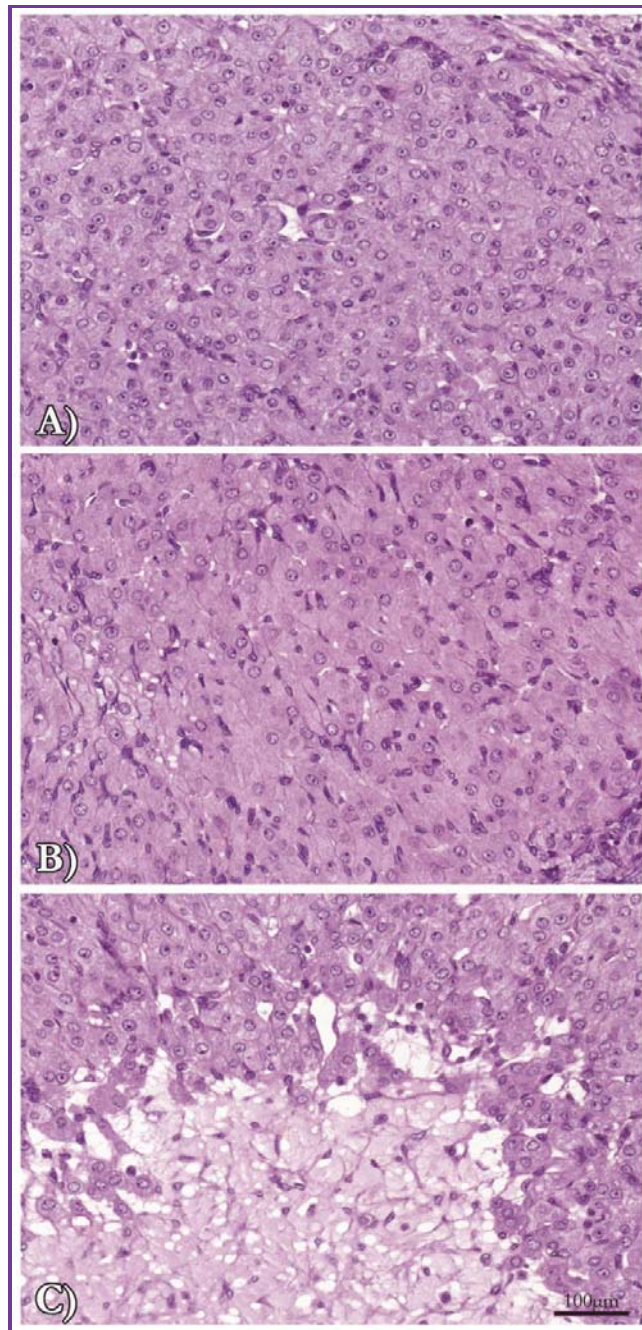
**Slika 6.** Stadijumi atrezije antralnih folikula. **A)** Stadijum Ia; **B)** Stadijum Ib; **C)** Stadijum IIa i **D)** Stadijum IIb; H&E, bar 100  $\mu$ m.

**Žuta tela** (Slika 7) se po svojim morfološkim odlikama mogu podeliti na:

**A) Mlada** žuta tela - po svojoj veličini prevazilaze sva ostala žuta tela, ćelije su bazofilnije, a prisustvo elemenata strome je izuzetno malo;

**B) Zrela** žuta tela - po svojoj veličini manja od mladih, sa svetlije obojenim parenhimskim ćelijama i većim udelom elemenata strome;

**C) Regresivna** žuta tela - najmanja po veličini sa eozinofilnim parenhimskim ćelijama i velikim udelom elemenata strome. U regresivnim žutim telima uočava se prisustvo piknotičnih ćelija i ćelija imunog sistema. U centralnom delu je prisutno jezgro izgrađeno od vezivnog tkiva.



**Slika 7.** Klase žutih tela. **A)** Mlada; **B)** Zrela; **C)** Regresivna; H&E, bar 100 µm.

Tačan broj folikula (zdravih i atretičnih) određen je brojanjem svakog četvrtog preseka, u svakom od parafinskih blokova tkiva. Brojanje folikula je obavljeno uz pomoć suvog objektiva uvećanja 40x visoke numeričke aperture, pri čemu je konačno uvećanje na monitoru iznosilo 1500x. Referentna partikula u brojanju folikula je jedro oocite, pa je broj folikula izjednačen sa brojem jedara oocita. Sve kategorije folikula brojane su u svom najširem preseku, tj. samo ukoliko je u njima bila vidljiva oocita sa nukleusom i nukleolusom, kako bi se izbeglo brojanje istih folikula više puta (Ristić i sar., 2008; Medigović i sar., 2012b). Prečnik folikula određen je pomoću opcije "Diameter". Budući da oblik folikula nije savršena kugla, konačni prečnik, na osnovu koga su folikuli svrstavani u kategorije je izračunat kao polovina zbira dva prečnika koja su normalna jedan na drugi, a oba prolaze kroz centar folikula. Žuta tela su brojana na svom najširem preseku.

Numerička gustina je relativna stereološka veličina koja pokazuje koliko je brojna merena faza (ćelije, folikuli) u jedinici zapremine i izračunata je po referentnom volumenu (ovarijuma, žutog tela).

### **3.5.7. Koeficijent greške**

Kvalitet kvantitativnih procena u "design based" stereološkim metodama i sam može biti procenjen. Ovo zapravo znači da možemo imati uvid u tačnost procena koje smo dobili u stereološkoj proceduri. Mera kvaliteta ovih procena, naziva se koeficijent greške (*coefficient of error*; CE). Nakon stereoloških merenja izračunate su vrednosti CE za Kavalijerijev princip određivanja volumena i za metod fizičkog disektora, kako po pojedinačnim životinjama, tako i njihova srednja vrednost po grupama. Vrednost CE je uvek bila ispod 0.05, što ukazuje da izabran dizajn stereoloških metoda validan.

### **3.6. IMUNOCITOHEMIJSKO BOJENJE SPECIFIČNIH ANTIGENA**

---

Za vizuelizaciju interakcije antigen - antitelo korišćena je imunofluorescentna (IF) metoda. Primarna antitela kod primenjene metode su neobeležena. Sekundarno antitelo predstavlja most, jer se vezuje za primarno antitelo, a sa druge strane je konjugovano sa fluorescentnom bojom. Specifičnost korišćenih antitela je potvrđena izostankom imunoreakcije kada je izostavljeno inkubiranje sa primarnim antitelom. Čitav postupak se odvija na sobnoj temperaturi, izuzev inkubacije u primarnom antitelu koja se odvija na +4°C. Nakon deparafinizacije, rehidratacije, ispiranja u 0.01M fosfatnom puferu (*eng. Phosphate Buffer Saline*-PBS; pH 7.6; 10 minuta), preseci su inkubirani u normalnom serumu magarca (*normal donkey serum, Sigma-Aldrich, Co., USA*; razblaženje 1:10 u PBS-u) u trajanju od 1 čas, sa ciljem blokiranja nespecifičnog bojenja. Preseci potom nisu ispirani, već je nanešeno primarno antitelo koje je inkubirano preko noći. Specifikacija korišćenih primarnih i sekundarnih antitela prikazana je u Tabeli 4. Sledećeg dana višak antitela je ispran u PBS-u (3 x 10 minuta) i preseci su inkubirani u sekundarnom antitelu, koje je obeleženo fluorescentnom bojom, u trajanju od 2 časa. Nakon ispiranja, 10 x 5 minuta u PBS-u, montirana su pokrovna stakla Moviol-om 4-88 (*Sigma-Aldrich, Co., USA*).

U uterusu nezrelih i acikličnih ženki pacova IF su obeleženi estrogen inducibilni protein, **laktoferin (LAC)**, **estrogenski (ER  $\alpha$  i ER  $\beta$ )** i **progesteronski (PR) receptor**. Za bolju detekciju ER i PR, pre postupka imunocitohemije, korišćena je tehnika demaskiranja antigena, koja ima za cilj bolje otkrivanje antigena, jer u toku fiksacije tkiva dolazi do formiranja kovalentnih veza između aldehida iz fiksativa i antigena. Ovaj postupak zahteva tretiranje preparata 0.01M citratnim puferom (pH 6) u mikrotalasnoj pećnici na 750W, 3 x 7 minuta.

U hipofizama nezrelih i acikličnih ženki pacova obeležene su gonadotropne (folikulostimulirajuće i luteinizirajuće) i laktotropne (prolaktinske) ćelije.

**Tabela 4.** Specifikacija primarnih i sekundarnih antitela.

PRIMARNA ANTITELA			
NAZIV	POREKLO	PROIZVODJAČ	KONCENTRACIJA u PBS-u
Anti-LAC (N-20) poliklonal IgG	koza	Santa Cruz, Biotechnology, USA	1:200
Anti-ER $\alpha$ (H184) poliklonal IgG	zec		1:100
Anti-ER $\beta$ (H150) poliklonal IgG	zec		1:100
Anti-PR poliklonal IgG	zec	Dako Cytomation, Denmark	1:100
Anti pacov-FSH poliklonal IgG	zec	National Institut of Health, Bethesda, Md., USA	1:300
Anti pacov-LH poliklonal IgG	zec		1:500
Anti pacov-PRL poliklonal IgG	zec		1:300
SEKUNDARNA ANTITELA			
NAZIV	POREKLO	PROIZVODJAČ	KONCENTRACIJA u PBS-u
Anti-zec Alexa fluor 488 IgG	magarac	Molecular Probes, Inc., USA	1:400
Anti-koza Alexa fluor 555 IgG	magarac		

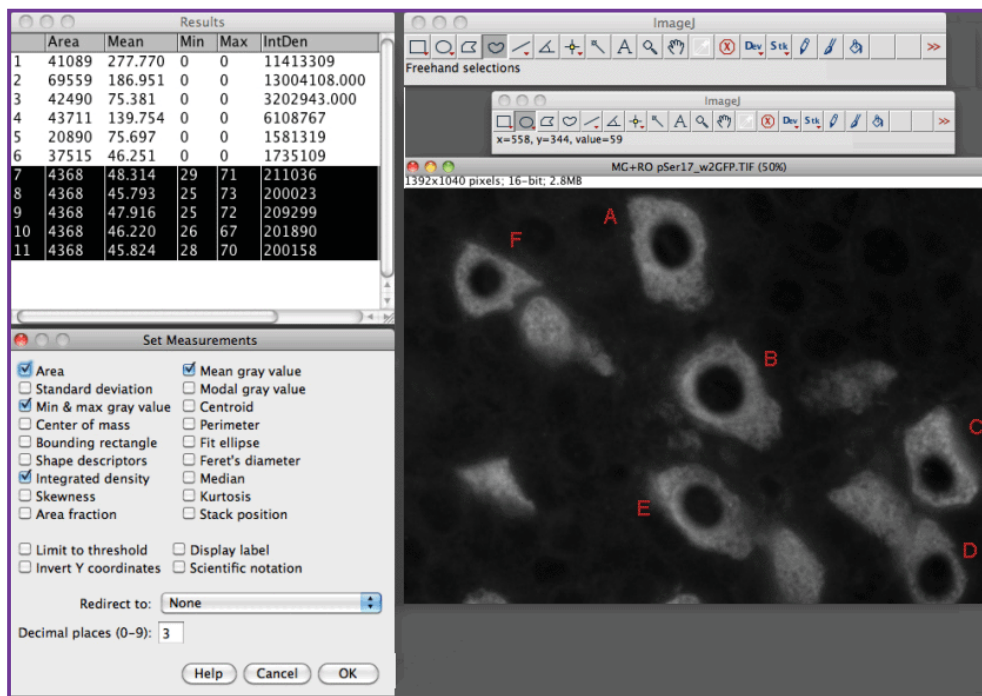
Preparati su analizirani i fotografisani korišćenjem Zeiss Axiovert (*Carl Zeiss GmbH, Germany*) fluorescentnog mikroskopa opremljenim kamerom i EC Plan-Apochromat-om i skenirajućeg laserskog konfokalnog mikroskopa, *Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM), Leica TCS SP5 II Basic (Leica Microsystems CMS GmbH; Germany)*. Fluorescentna boja Alexa fluor 488 pobuđuje se na 492 nm i uočava se na 510 nm u zelenom delu spektra. Alexa fluor 555 pobuđuje se na 550 nm, emituje signal na 570 nm u crvenom delu spektra, a

vidljiva je pod zelenim filterom. Prilikom analize na CLSM-u za pobuđivanje zelene fluorescence na 488 nm korišćen je argonski (Ar-ion) laser.

### 3.7. ODREĐIVANJE RELATIVNOG INTENZITETA FLUORESCENCE (RIF)

#### 3.7.1. Određivanje relativnog intenziteta fluorescence u gonadotropnim i laktotropnim ćelijama hipofiza nezrelih ženki pacova

Za merenje intenziteta fluorescentnog signala u gonadotropnim i laktotropnim ćelijama hipofize nezrelih ženki pacova korišćen je kompjuterski program *Image J* 1.47 (*public domain Java image processing program by National Institutes of Health (NIH)*). Program omogućava da na jednostavan način utvrdimo intenzitet fluorescence u regionima od interesa (Slika 8).



**Slika 8.** Prikaz određivanja relativnog intenziteta fluorescence u LH ćelijama hipofize nezrelih ženki pacova, pomoću *Image J* programa.

Prilikom merenja intenziteta fluorescentnog signala, analizirane su samo ćelije u nivou jedra. Analizirano je 150 ćelija po životinji, pet životinja iz odgovarajuće kontrolne odnosno eksperimentalne grupe. Vrednost je preračunata po formuli:

$$\text{RIF} = \text{ID} - (\text{CA} \times \text{MB})$$

Pri čemu je **ID**- integrisana gustina, **CA** - površina analizirane ćelije i **MB**-srednja vrednost fluorescentnog signala pozadine.

### **3.7.2. Određivanje relativnog intenziteta fluorescence u gonadotropnim i laktotropnim ćelijama hipofiza acikličnih ženki pacova**

Za analizu i kvantifikaciju fluorescentnog signala u gonadotropnim i laktotropnim ćelijama hipofize acikličnih ženki pacova korišćen je konfokalni laserski skenirajući mikroskop, *Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM), Leica TCS SP5 II Basic (Leica Microsystems CMS GmbH, Germany)*. Relativni intenzitet fluorescence određen je uz pomoć *Quantify* opcije LAS AF Lite softverskog paketa (*Leica Microsystems CMS GmbH, Germany*). Analizirane su samo ćelije u nivou jedra. Analizirano je 150 ćelija po životinji od pet životinja iz odgovarajuće kontrolne odnosno eksperimentalne grupe.

## **3.8. ANALIZA EKSPRESIJE GENA**

---

### **3.8.1. Priprema uzoraka i izolacija totalne RNK**

Za izolaciju RNK, korišćeni su centralni delovi desnog roga uterusa, koji su odmrznuti na ledu. Od svakog uzorka odmereno je 100 mg i homogenizovano u 1 ml TRizol-a (*Life Technologies, USA*). Nakon homogenizacije, tkivo je inkubirano na ledu 5 minuta u cilju što bolje disocijacije nukloproteinskog kompleksa. Zatim je u ependorfe dodato 0.2 ml hloroforma i inkubirano na ledu u trajanju od 3 minuta. Nakon centrifugiranja na 12000 x g u trajanju od 20 minuta na 4°C, u ependorfama su se jasno izdvojila tri sloja: gornja vodena faza u kojoj se nalazila RNK, intermedijarna faza sa proteinima i lipidima i donja faza u kojoj je DNK. Gornji, vodeni sloj je pipetiran u sterilne

konusne ependorfe. RNK je precipitirana dodavanjem 500  $\mu$ l izopropil-alkohola po uzorku, nakon čega su ependorfe vorteksovane i inkubirane 10 minuta na ledu. Zatim su ependorfe centrifugirane 20 minuta na 12000 x g na 4°C. RNK je istaložena na dnu, a supernatanti pipetirani. Slabo vidljiv talog RNK je zatim ispiran dodavanjem 1 ml 75% etanola, resuspendovanjem i centrifugiranjem dva puta u trajanju od 5 minuta na 7500 x g na 4°C. Potom je odliven etanol, a talog RNK je sušen 5 do 10 minuta na sobnoj temperaturi dok etanol nije potpuno ispario. Uzorci RNK finalno su rastvoreni u 37  $\mu$ l dietilpirokarbonatne (DEPC) vode.

### **3.8.2. Reakcija reverzne transkripcije**

Nakon izolacije RNK molekuli su prevedeni u komplementarnu DNK (cDNK) reakcijom reverzne transkripcije (RT). Za prevođenje RNK u cDNK korišćen je kit cDNK (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, USA*) koji se sastoji od: nasumičnih heksamernih prajmera, 100 mM rastvora sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, po 2 mM ATP, TTP, GTP i CTP), pufera za reverznu transkripciju, enzima reverzna transkriptaza i inhibitora RNaze. Za reakciju prevođenja RNK u cDNK pravljena je originalna mešavina koja se sastoji od 10  $\mu$ l uzorka (3  $\mu$ g RNK rastvorene u DEPC vodi), 2  $\mu$ l pufera za reverznu transkripciju, 0.8  $\mu$ l 100 mM rastvora sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata, 2  $\mu$ l nasumičnih prajmera, 1  $\mu$ l enzima reverzne transkriptaze, 1  $\mu$ l inhibitora RNaze i 3.2  $\mu$ l DEPC vode. Uzorci su inkubirani na +25°C u trajanju od 10 minuta, a zatim na +37°C, temperaturi optimalnoj za funkcionisanje reverzne transkriptaze u trajanju od 120 minuta. Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka 5 minuta na +85°C, temperaturi na kojoj dolazi do inaktivacije enzima reverzne transkriptaze i razdvajanja sintetisanih lanaca cDNK. Uzorci cDNK su čuvani na -20°C do dalje upotrebe.



### **3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu**

Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu ("Real-time" PCR) je metoda koja pored umnožavanja proizvoda omogućava njegovu kvantifikaciju i koristi se za analizu relativne ekspresije gena. U eksperimentima je korišćena mikroploča sa 96 bunarića prilagođena za kvantitativni PCR (*MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, California, USA*) i u svaki od bunarića dodavano je po 5 µl reakcione smeše *SYBR Green PCR Master Mix*, koji sadrži potrebnu fluorescentnu boju *SYBR Green*, enzim *AmpTaq Gold* koji je DNK polimeraza i dNTP i po 0.5 µl specifičnih prajmera (finalna koncentracija prajmera je 500 nM) za gen od interesa ili za referentni gen ciklofilin A. Korišćeni parovi prajmera dati su u Tabeli 5. Potom je u svaki bunarić dodavano po 4 µl odgovarajućeg uzorka cDNK. Svi uzorci su rađeni u triplikatima. Bunarići su zapečaćeni optičkim adhezivnim filmom (*Applied Biosystems, California, USA*), ploča je centrifugirana 2 minuta na 1200 x g, prenetu u termoblok aparata za kvantitativni PCR (*ABI Prism 7000, Applied Biosystems, California, USA*). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 1 minut na 95°C u cilju denaturacije lanaca, a zatim 60 ciklusa koji su obuhvatali 15 sekundi na 95°C za početnu denaturaciju lanaca i 1 minut na 60°C za vezivanje prajmera i elongaciju lanaca. Po završenom umnožavanju postepeno se snižava temperatura termo bloka, uz praćenje smanjenja intenziteta fluorescencije, koje odgovara disocijaciji nastalog proizvoda. Ovaj korak obezbeđuje proveru kontaminacija uzoraka genomskom DNK kao i eventualnog nastanka tzv. dimer prajmera. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski program (*7500 System software; Applied Biosystems, California, USA*) obezbeđen od proizvođača aparata za kvantitativni PCR. Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za ciklofilin A detektovanog u istom uzorku i iskazan kao  $2^{-dCt}$  gde je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i ciklofilina A (Cyc A).

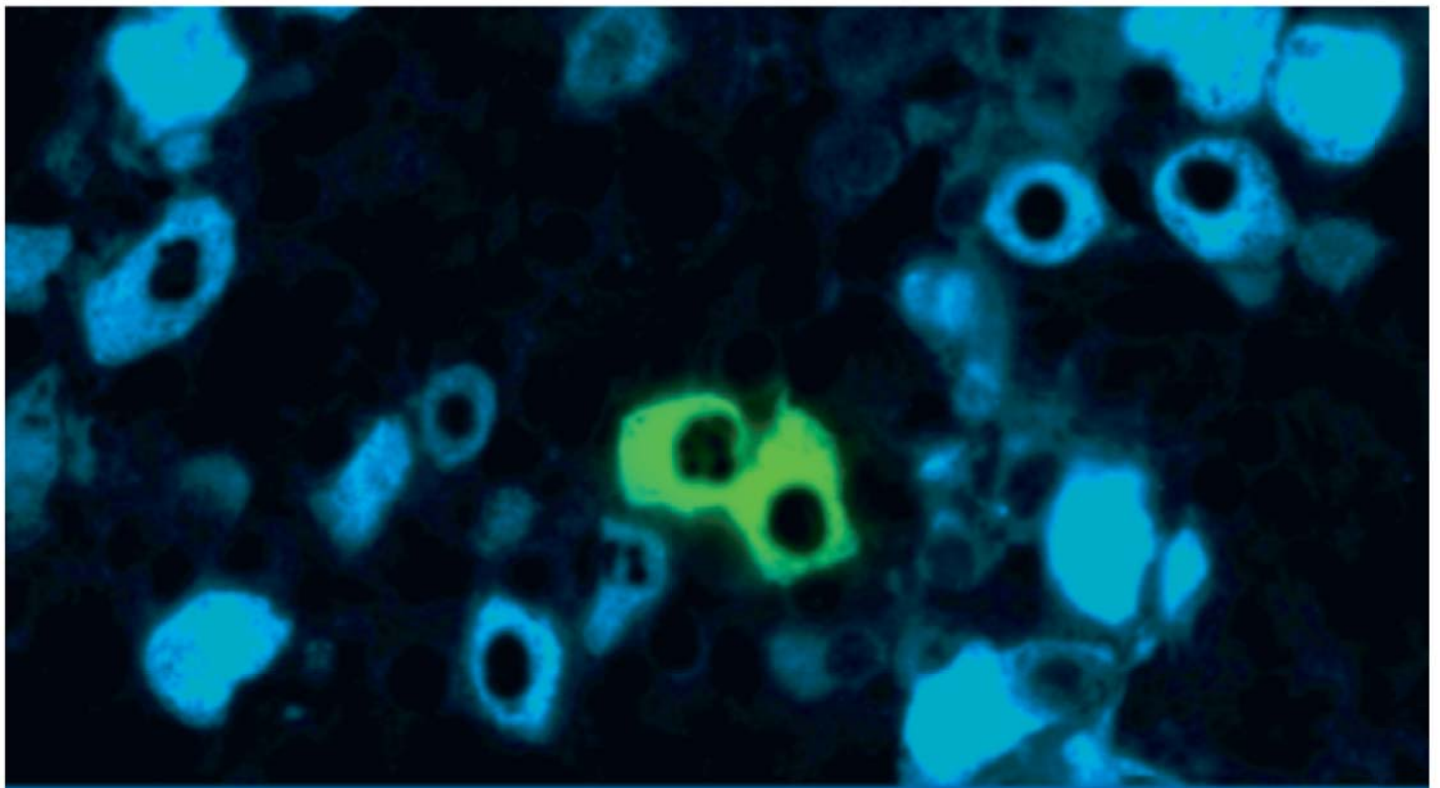
Tabela 5. Parovi prajmera.

GEN	PAROVI PRAJMERA	Pristupni broj u bazi podataka
<b>ER<math>\alpha</math></b>	5'-CTGACAATCGACGCCAGAA-3' 5'-CAGCCTTCACAGGACCAGAC-3'	NM_012689.1
<b>ER<math>\beta</math></b>	5'-AACAAAGGGCATGGAACATCTGCT-3' 5'-TCCGCCTCAGGCCTGGCCATCA-3'	NM_012754.1
<b>PR</b>	5'-CTTTGTTTCCTCTGCAAAAATTG-3' 5'-GTATACACGTAAGGCTTTCAGAAGG-3'	NM_022847.1
<b>Cyc A</b>	5'-CAAAGTTCCAAAGACAGCAGAAAA-3' 5'-CCACCCTGGCACATGAAT-3'	NM_017101.1

### 3.9. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

---

Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ . Dobijeni podaci su statistički obrađeni. Pri statističkoj obradi prvo je urađena analiza normalne distribucije podataka uz pomoć Kolmogorov-Smirnov testa. Pošto je utvrđeno da se radi o normalnoj raspodeli, korišćena je analiza varijanse (ANOVA), a zatim je Duncanov test korišćen za *post hoc* poređenje između grupa. Statistički značajnom se smatra razlika ukoliko je verovatnoća razlike  $p < 0.05$ .



## REZULTATI

4.

## 4.1. UTEROTROFNI ESEJ

### 4.1.1. Analiza mase uterusa

Povećanje mase uterusa (uterotrofni efekat) predstavlja jedan od najvažnijih parametara za utvrđivanje estrogenske aktivnosti supstance. Masa uterusa životinja određivana je nakon trodnevne aplikacije različitih koncentracija 17 $\alpha$ -etinil estradiola (EE), genisteina (G) i daidzeina (D). Prosečne telesne mase, apsolutne i relativne mase uterusa životinja u uzrastu od 22 dana prikazane su u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Prosečne telesne mase, apsolutne i relativne mase uterusa kontrolnih i tretiranih nezrelih ženki pacova.

GRUPA	Masa životinje (g)	Masa uterusa (mg)	
		Apsolutna (mg)	Relativna (mg%)
K	37.6 $\pm$ 1.2	23.9 $\pm$ 2.3	63.6 $\pm$ 4.4
KE	36.7 $\pm$ 1.3	23.0 $\pm$ 1.8	62.7 $\pm$ 4.1
EE1	38.1 $\pm$ 1.1	<b>158.3 <math>\pm</math> 9.5 *</b>	<b>415.5 <math>\pm</math> 21.5 *</b>
EE2	37.2 $\pm$ 0.9	<b>76.4 <math>\pm</math> 6.2 *</b>	<b>205.4 <math>\pm</math> 15.4 *</b>
KF	36.9 $\pm$ 1.2	24.3 $\pm$ 1.6	65.8 $\pm$ 5.6
G1	36.9 $\pm$ 1.1	<b>68.2 <math>\pm</math> 2.1 *</b>	<b>184.8 <math>\pm</math> 12.7 *</b>
G2	37.9 $\pm$ 1.2	<b>56.7 <math>\pm</math> 1.9 *</b>	<b>149.6 <math>\pm</math> 13.1 *</b>
G3	36.9 $\pm$ 1.3	25.4 $\pm$ 2.3	68.8 $\pm$ 5.3
D1	37.5 $\pm$ 0.8	22.3 $\pm$ 1.4	59.5 $\pm$ 5.1
D2	36.9 $\pm$ 0.9	22.1 $\pm$ 1.9	59.9 $\pm$ 4.1
D3	36.3 $\pm$ 1.3	21.8 $\pm$ 1.7	60.1 $\pm$ 3.9

Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD; p<0.05, \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

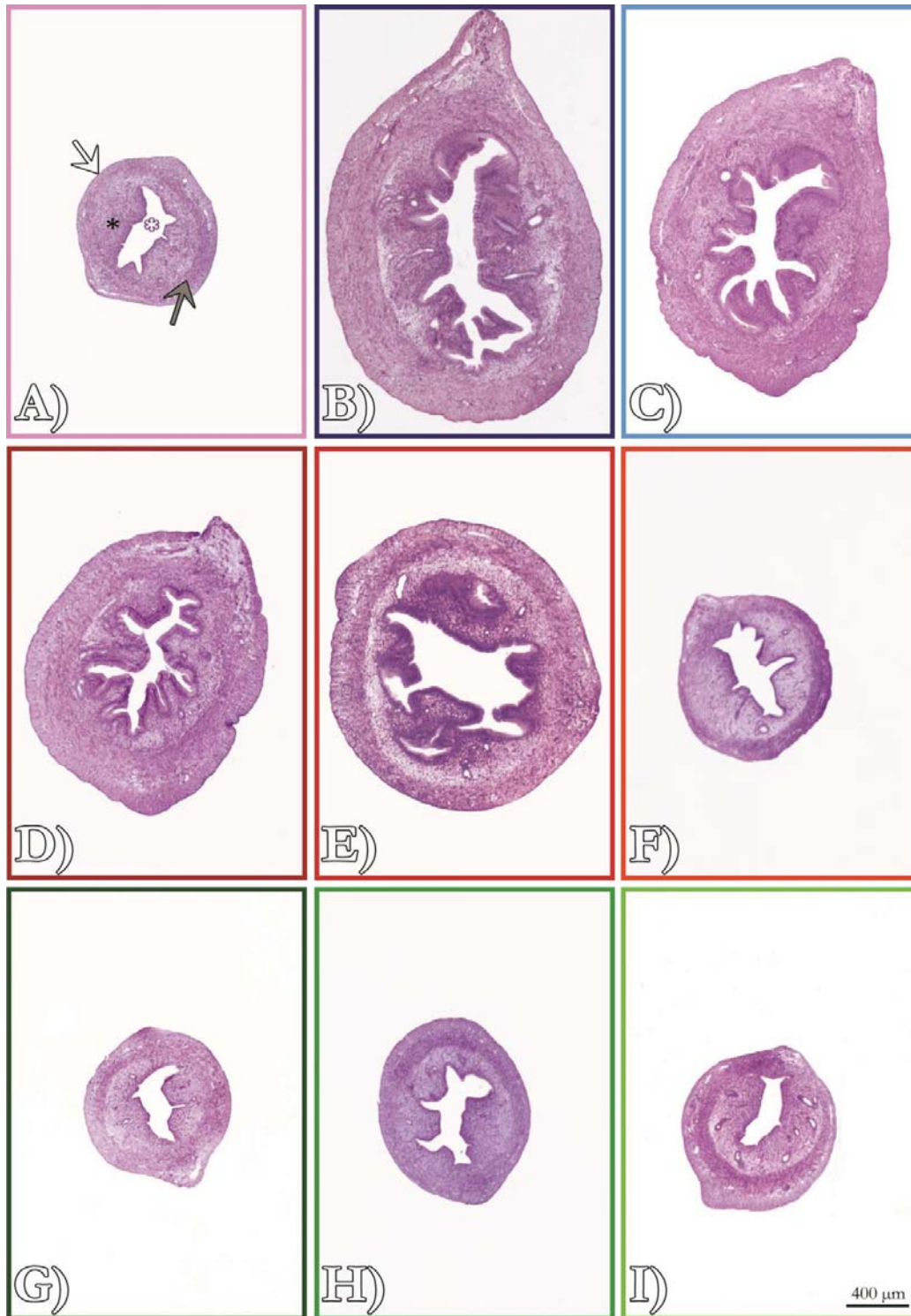
Iz Tabele 6 se uočava da između intaktne kontrolne grupe (K) i grupa kojima je aplikovano maslinovo ulje (KE) i smeša maslinovog ulja i apsolutnog etanola (KF) nije bilo statistički značajnih razlika u telesnim masama, apsolutnim i relativnim masama uterusa što ukazuje da pomenuti rastvarači nisu uticali na rezultate i da se promene mogu pripisati isključivo delovanju ispitivanih supstanci. Takođe, prikazani rezultati ukazuju da tretmani nisu izazvali statistički značajne promene telesne mase u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima.

Kod životinja tretiranih visokom (EE1) i niskom (EE2) dozom 17 $\alpha$ -etinil estradiola, uočeno je povećanje apsolutne i relativne mase uterusa oko 7x ( $p < 0.05$ ), odnosno 3.3x ( $p < 0.05$ ), u poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom. Genistein aplikovan u koncentracijama od 50 i 35 mg/kg t.m./dan (G1 i G2) uzrokovao je statistički značajno povećanje apsolutne i relativne mase uterusa za 1.8x ( $p < 0.05$ ), odnosno za 1.3x ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima. Koncentracija genisteina od 15 mg/kg t.m./dan (G3), kao ni jedna od aplikovanih koncentracije daidzeina (D) nisu statistički značajno uticale na promenu apsolutne i relativne mase uterusa. Nakon poređenja vrednosti apsolutnih i relativnih masa uterusa svih tretiranih životinja zapaža se da je porast mase uterusa dozno zavisian.

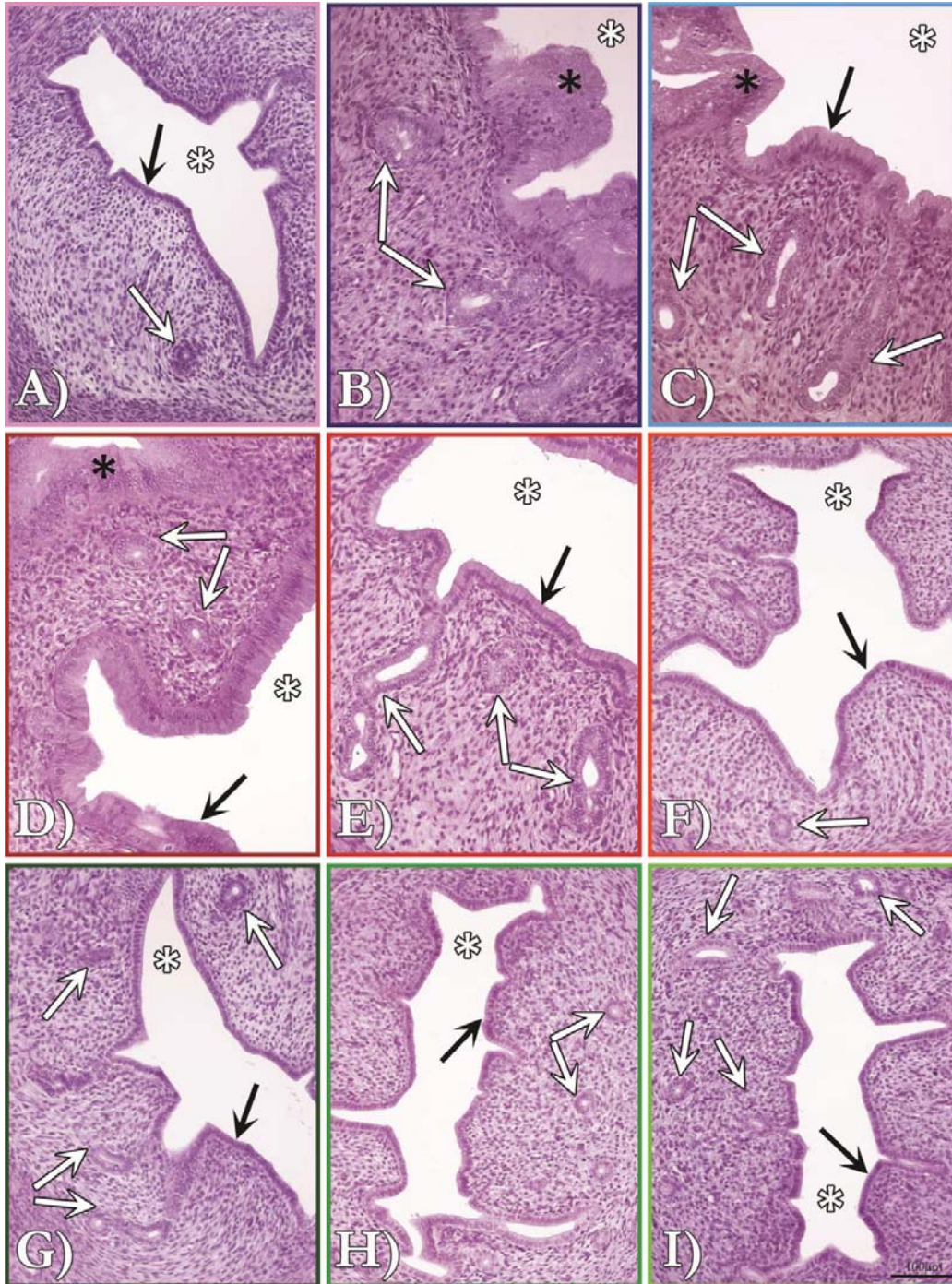
#### **4.1.2. Histološki i imunocitohemijski parametri uterusa nezrelih pacova**

##### **4.1.2.1. Histološke karakteristike uterusa nezrelih pacova**

Histološkom analizom uterusa kontrolnih ženki pacova, kako intaktnih, tako i onih koje su primale maslinovo ulje ili smešu maslinovog ulja i etanola, nije primećena razlika u histološkoj građi i organizaciji. Stoga je prikazana histološka slika uterusa intaktnih ženki pacova (Slika 9A i 10A). Na poprečnom preseku centralnog dela levog roga uterusa kontrolnih ženki starih 22 dana uočavaju se endometrijum, miometrijum i perimetrijum (Slika 9A). Endometrijum je diferenciran na jednoslojni cilindrični epitel, koji okružuje lumen i endometrijalnu stromu u kojoj se mogu uočiti endometrijalne žlezde (Slika 10A). Tretman estradiolom uzrokovao je hipertrofiju ćelija endometrijuma i miometrijuma (Slika 9B i C). Promene su posebno izražene u uterusima životinja EE1 eksperimentalne grupe (Slika 9B). Jednoslojni epitel lumena endometrijuma i epitel endometrijalnih žlezda poprima pseudoslojevit izgled usled intenzivnih mitozâ, pri čemu su ćelije značajno veće sa izrazito bazalno postavljenim jedrom (Slika 10B i C). Genistein (G1 i G2) je izmenio opšte histološke slike uterusa (Slika 9D i E) slično kao i estradiol (Slika 9B i C), pri čemu su promene nešto slabijeg intenziteta (Slika 10D i E). U uterusima ženki G3 eksperimentalne grupe nije zapažena promena opšte histološke slike (Slika 9F i 10F) u poređenju sa kontrolnim presecima (Slika 9A i 10A). Tretman daidzeinom nije značajno izmenio opštu histološku sliku uterusa (Slika 9G-I). Međutim, detaljnijom histološkom analizom zapaženo je povećano prisustvo endometrijalnih žlezda (Slika 9G-I).



**Slika 9.** Poprečni preseki centralnog dela levog roga uterusa. **A)** Kontrolne; **B)** EE1; **C)** EE2; **D)** G1; **E)** G2; **F)** G3; **G)** D1; **H)** D2; **I)** D3 nezrele ženke pacova starosti 22 dana. H&E, bar 400  $\mu\text{m}$ . **Bela zvezdica**-lumen uterusa; **Crna zvezdica**-endometrijum, **Siva strelica**-miometrijum; **Bela strelica**- perimetrijum.

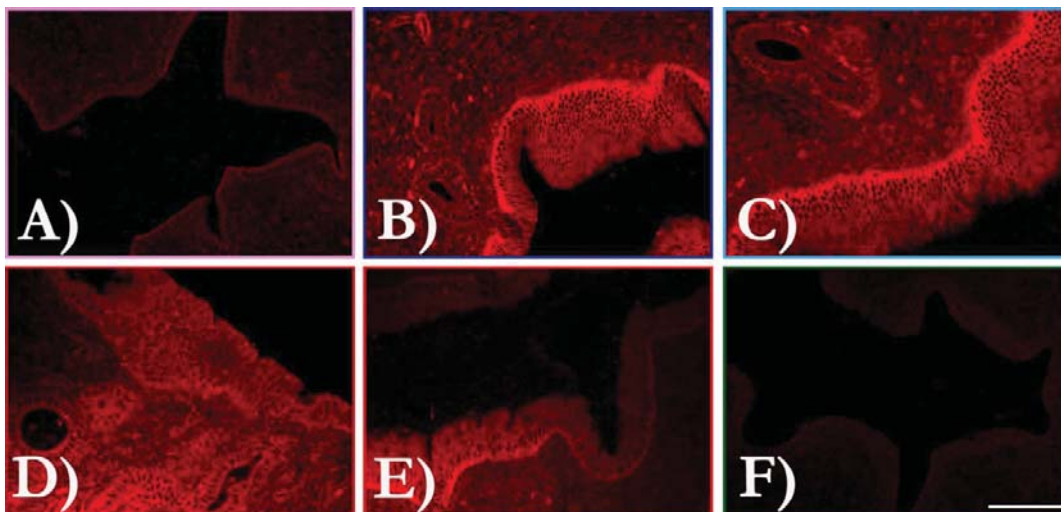


**Slika 10.** Poprečni presecci centralnog dela levog roga uterusa. **A)** Kontrolne; **B)** EE1; **C)** EE2; **D)** G1; **E)** G2; **F)** G3; **G)** D1; **H)** D2; **I)** D3 nezrele ženke pacova starosti 22 dana. H&E, bar 100  $\mu$ m. **Bela zvezdica**-lumen uterusa; **Bela strelica**-endometrijalne žlezde; **Crna strelica**-površinski, jednoslojni cilindrični epitel endometrijuma; **Crna zvezdica**-pseudoslojevi površinskog epitela.



#### 4.1.2.2. Imunocitohemijske karakteristike uterusa nezrelih ženki pacova

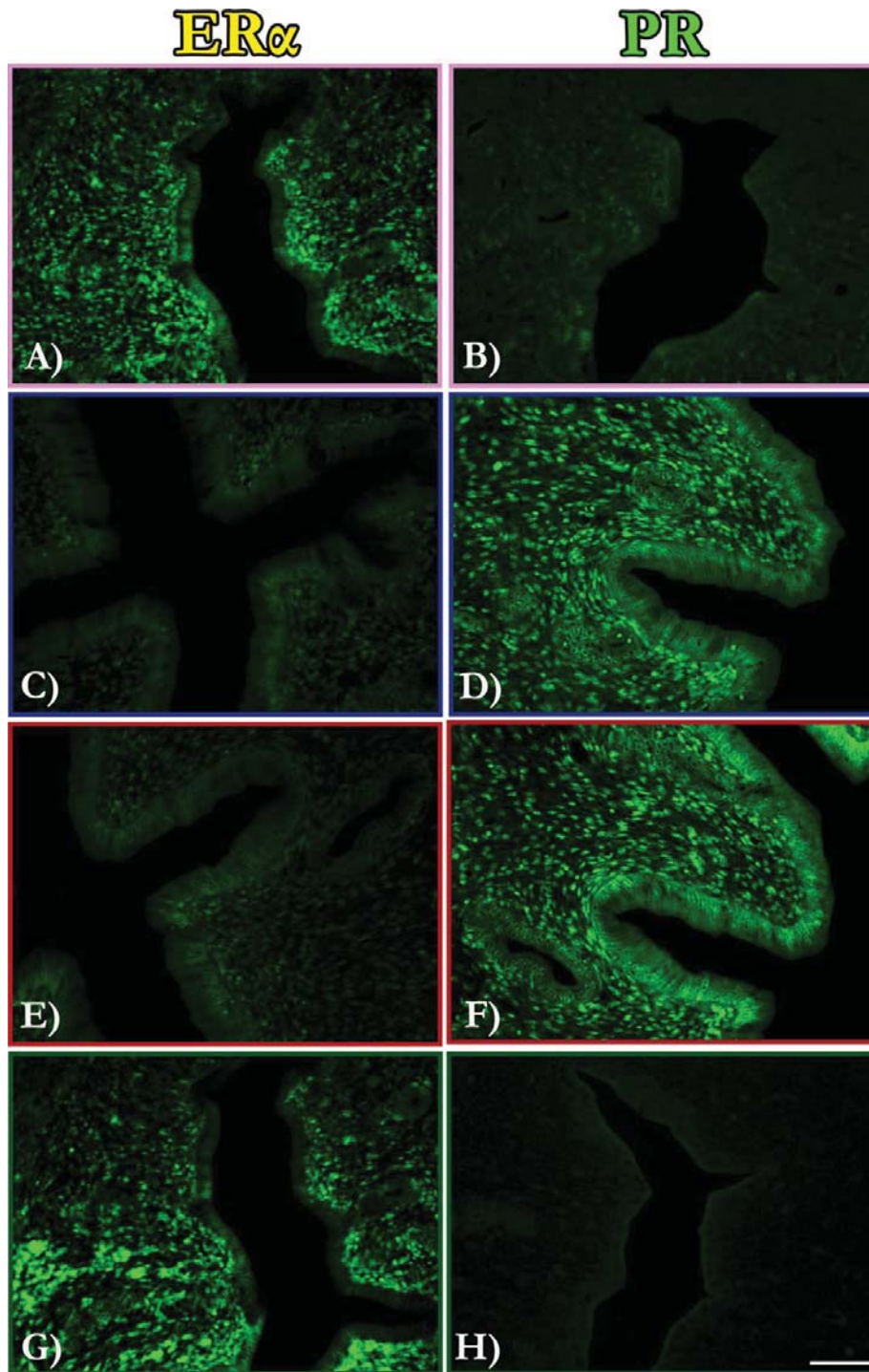
Količina laktoferina (LAC) se menja u zavisnosti od faze estrusnog ciklusa, što se dovodi u vezu sa nivoom estrogena i stoga se koristi kao jedan od pokazatelja estrogenog delovanja supstanci. Na poprečnim presecima uterusa kontrolnih ženki pacova starih 22 dana, nije zabeležen signal nakon IF obeležavanja LAC-a (Slika 11A). Tretmani EE1 i EE2 indukovali su sintezu LAC-a u bazolateralnim delovima ćelija površinskog endometrijalnog epitela (Slika 11B i C). Intenzivan IF signal uočen je u uterusima ženki pacova nakon aplikacije G1 (Slika 11D) i G2 (Slika 11E). Na ekspresiju LAC-a nije uticala aplikacija G3 (slika nije prikazana) kao ni jedna od doza D-a (Slika 11F).



**Slika 11.** Imunofluorescentno obeležen laktoferin (LAC) u epitelnim ćelijama endometrijuma. **A)** Kontrolne; **B)** EE1; **C)** EE2; **D)** G1; **E)** G2; **F)** D1 nezrele ženke pacova starosti 22 dana. Bar 50  $\mu$ m.

Prisustvo IF obelaženog ER $\alpha$  i PR u uterusu kontrolnih ženki nezrelih pacova uočava se u ćelijama endometrijuma (Slika 12A i B). 17 $\alpha$ -etnil estradiol (EE1 i EE2) uzrokuje smanjenje ekspresije ER $\alpha$  praćeno povećanjem ekspresije PR, u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 12C i D), koje se može detektovati IF. Na isti način, ali nešto slabijim intenzitetom, deluju G1 i G2 tretmani (Slika 12C i D). Na promenu intenziteta IF signala ER $\alpha$  i PR nije uticala aplikacija G3, kao ni jedna od aplikovanih doza daidzeina.

Promene nisu dozno zavisne, stoga su na slici 12 prikazane reprezentativne mikrografije uterusa kontrolnih i ženki kojima su ispitivane supstance aplikovane u visokoj dozi.



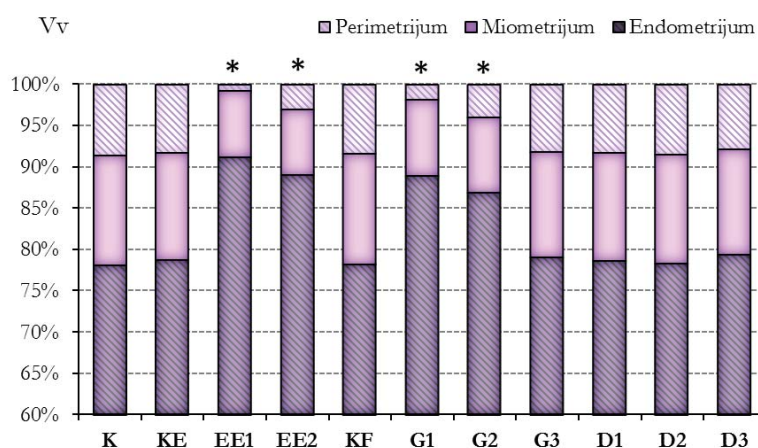
**Slika 12.** Imunofluorescentno obeležen ERα i PR u ćelijama endometrijuma. **A-B)** Kontrolne; **C-D)** EE1; **E-F)** G1 i **G-H)** D1 nezrele ženke pacova starosti 22 dana. Bar 50 μm.

### 4.1.3. Stereološke i morfometrijske karakteristike uterusa nezrelih pacova

#### 4.1.3.1. Volumenske gustine

Međusobni odnosi volumenskih gustina endometrijuma ( $V_{V_E}$ ), miometrijuma ( $V_{V_M}$ ) i perimetrijuma ( $V_{V_p}$ ) u uterusima kontrolnih i tretiranih ženki pacova predstavljani su Histogramom 1. Tretman visokom dozom  $17\alpha$ -etinil estradiola (EE1) uzrokovao je povećanje  $V_{V_E}$  za 15.7% ( $p < 0.05$ ), koje je praćeno statistički značajnim smanjenjima  $V_{V_M}$  (37.2%;  $p < 0.05$ ) i  $V_{V_p}$  (91.5%;  $p < 0.05$ ) u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima. Nakon aplikacije EE2 doze,  $V_{V_E}$  je povećana za 13.1% ( $p < 0.05$ ), dok su  $V_{V_M}$  i  $V_{V_p}$  smanjene za 38.7% ( $p < 0.05$ ), odnosno 63.8% ( $p < 0.05$ ).

Tretmani G1 i G2 usloveli su statistički značajne promene volumenskih gustina. Vrednosti  $V_{V_E}$  su povećane u G1 (13.7%;  $p < 0.05$ ) i G2 (11.1%;  $p < 0.05$ ) eksperimentalnoj grupi u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti. Sa druge strane, vrednosti  $V_{V_M}$  i  $V_{V_p}$  su značajno smanjene nakon oba tretmana. U G1 eksperimentalnoj grupi zabeleženo je smanjenje  $V_{V_M}$  za 31.1% ( $p < 0.05$ ), odnosno  $V_{V_p}$  za 77.7% ( $p < 0.05$ ), dok smanjenje ovih parametara u G2 grupi iznosi 32.1% ( $p < 0.05$ ), odnosno 52.5% ( $p < 0.05$ ).



**Histogram 1.** Međusobni odnosi i vrednosti volumenskih gustina endometrijuma, miometrijuma i perimetrijuma u uterusima kontrolnih i tretiranih nezrelih ženki pacova. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

Vrednosti volumenskih gustina endometrijalnog epitela ( $V_{VEE}$ ) i endometrijalnih žlezda ( $V_{VEŽ}$ ) prikazane su u Tabeli 7. Tretman visokom dozom etinil-estradiola (EE1) uzrokovao je povećanja  $V_{VEE}$  (76.8%;  $p < 0.05$ ) i  $V_{VEŽ}$  (55.9%;  $p < 0.05$ ) u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima. Nakon aplikacije EE2,  $V_{VEE}$  je povećana za 49.9% ( $p < 0.05$ ), a  $V_{VEŽ}$  za 39.9% ( $p < 0.05$ ). Tretmani G1 i G2 usloveli su statistički značajne promene volumenskih gustina. U G1 eksperimentalnoj grupi zabeleženo je povećanje  $V_{VEE}$  za 43.1% ( $p < 0.05$ ), odnosno  $V_{VEŽ}$  za 40.7% ( $p < 0.05$ ), dok povećanje ovih parametara u G2 grupi iznosi 22.4% ( $p < 0.05$ ), odnosno 33.3% ( $p < 0.05$ ). Tretman daidzeinom (D) je statistički značajno povećao  $V_{VEŽ}$ . Povećanje ovog parametra uočeno je u D1 (40.7%;  $p < 0.05$ ), D2 (37.1%;  $p < 0.05$ ) i D3 (33.3%;  $p < 0.05$ ) eksperimentalnoj grupi, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima.

**Tabela 7.** Volumenske gustine endometrijalnog epitela i endometrijalnih žlezda u uterusu kontrolnih i tretiranih nezrelih ženki pacova.

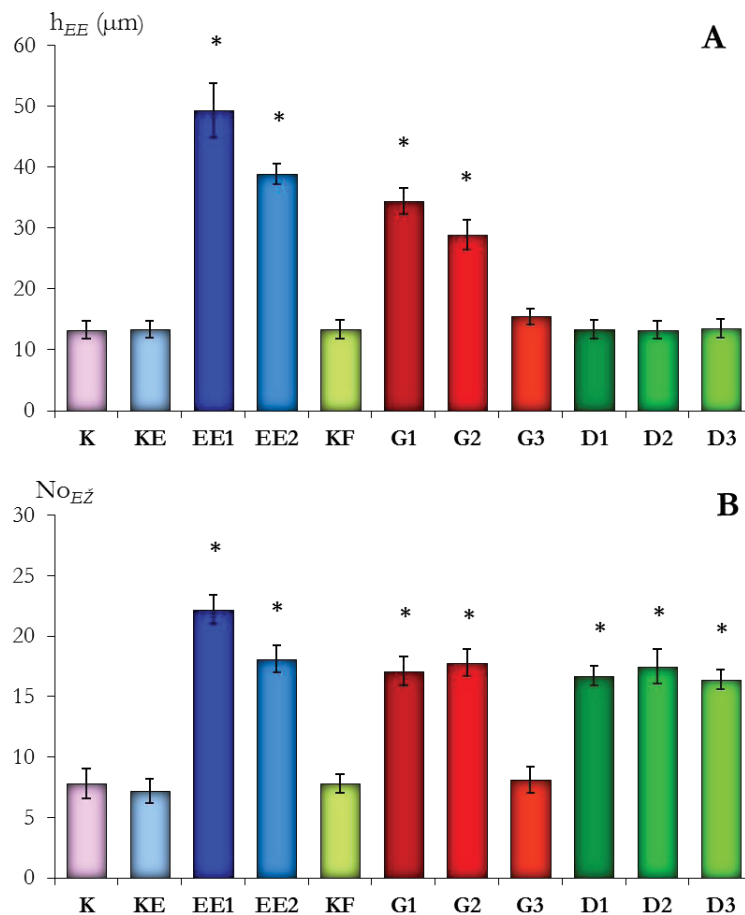
GRUPA	Volumenske gustine (%)	
	endometrijalni epitel $V_{VEE}$	endometrijalne žlezde $V_{VEŽ}$
K	5.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1
KE	5.6 ± 0.1	2.5 ± 0.2
EE1	9.9 ± 0.2 *	3.9 ± 0.1 *
EE2	8.4 ± 0.5 *	3.5 ± 0.1 *
KF	5.8 ± 0.2	2.7 ± 0.1
G1	8.3 ± 0.3 *	3.8 ± 0.2 *
G2	7.1 ± 0.4 *	3.6 ± 0.3 *
G3	5.7 ± 0.2	2.7 ± 0.2
D1	5.7 ± 0.1	3.8 ± 0.2 *
D2	5.5 ± 0.2	3.7 ± 0.1 *
D3	5.5 ± 0.1	3.6 ± 0.2 *

Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

#### 4.1.3.2. Visina površinskog epitela endometrijuma i broj endometrijalnih žlezda

U cilju preciznije ocene estrogenske aktivnosti određivani su morfometrijski parametri koji su direktno povezani sa koncentracijom estradiola u organizmu. Nakon

poređenja sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima ustanovljeno je da je visina površinskog epitela endometrijuma ( $h_{EE}$ ) EE1 i EE2 grupe životinja statistički značajno povećana 2.7, odnosno 1.9x ( $p < 0.05$ ). Vrednosti  $h_{EE}$  beleže povećanje 1.6x ( $p < 0.05$ ) u G1, odnosno 1.2x ( $p < 0.05$ ) u G2 eksperimentalnoj grupi, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima. Dodatno, možemo uočiti da je ovo povećanje dozno zavisno (Histogram 2A).



**Histogram 2.** Morfometrijski parametri uterusa. **A)** Visina površinskog epitela endometrijuma ( $h_{EE}$ ); **B)** Broj endometrijalnih žlezda ( $No_{EZ}$ ) u uterusu tretiranih i kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

Broj endometrijalnih žlezda je statistički značajno povećan 2x ( $p < 0.05$ ), odnosno 1.2x ( $p < 0.05$ ) kod životinja EE1 i EE2 grupe. Genistein je uzrokovao povećanje broja žlezda za 119.7% ( $p < 0.05$ ) u G1, odnosno 128.2% ( $p < 0.05$ ) u G2 grupi. U G3 eksperimentalnoj grupi nisu uočene statistički značajne promene. Tretman daidzeinom (D) uzrokovao je statistički značajno povećanje ovog parametra. Povećanje broja žlezda uočeno je u D1 (114.1%;  $p < 0.05$ ), D2 (125.8%;  $p < 0.05$ ) i D3 (110.8%;  $p < 0.05$ ) eksperimentalnoj grupi, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima. Dodatno, možemo uočiti da povećanje broja endometrijalnih žlezda nije dozno zavisno (Histogram 2B).

#### 4.1.4. Promene u ovarijumu kao pokazatelji estrogenske aktivnosti

##### 4.1.4.1. Apsolutne i relativne mase ovarijuma

Rezultati dobijeni merenjem mase ovarijuma i preračunavanjem relativne mase prikazani su u Tabeli 8.

**Tabela 8.** Apsolutne i relativne mase ovarijuma kontrolnih i tretiranih nezrelih ženki pacova.

GRUPA	Masa ovarijuma (mg)	
	Apsolutna (mg)	Relativna (mg <sup>0</sup> %)
K	10.5 ± 0.9	27.9 ± 0.9
KE	10.2 ± 1.1	27.8 ± 1.1
EE1	9.8 ± 0.8	26.3 ± 1.8
EE2	10.0 ± 0.9	26.8 ± 1.6
KF	10.9 ± 1.6	27.3 ± 1.2
G1	10.5 ± 0.9	27.8 ± 1.3
G2	10.1 ± 1.1	28.3 ± 0.8
G3	11.2 ± 0.8	30.3 ± 1.9
D1	10.3 ± 0.9	27.6 ± 1.4
D2	10.1 ± 1.1	28.2 ± 0.9
D3	11.1 ± 0.8	30.5 ± 1.9

Rezultati su prikazani kao SV ± SD; n=6.

Iz Tabele 8 uočava se da između intaktne kontrolne grupe i grupa kojima je aplikovano maslinovo ulje i smeša maslinovog ulja i apsolutnog etanola nije bilo statistički značajnih razlika u apsolutnim i relativnim masama ovarijuma. Tretmani 17 $\alpha$ -etinil

estradiolom, genisteinom i daidzeinom nisu izazvali statistički značajne promene apsolutne i relativne mase ovarijuma u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima.

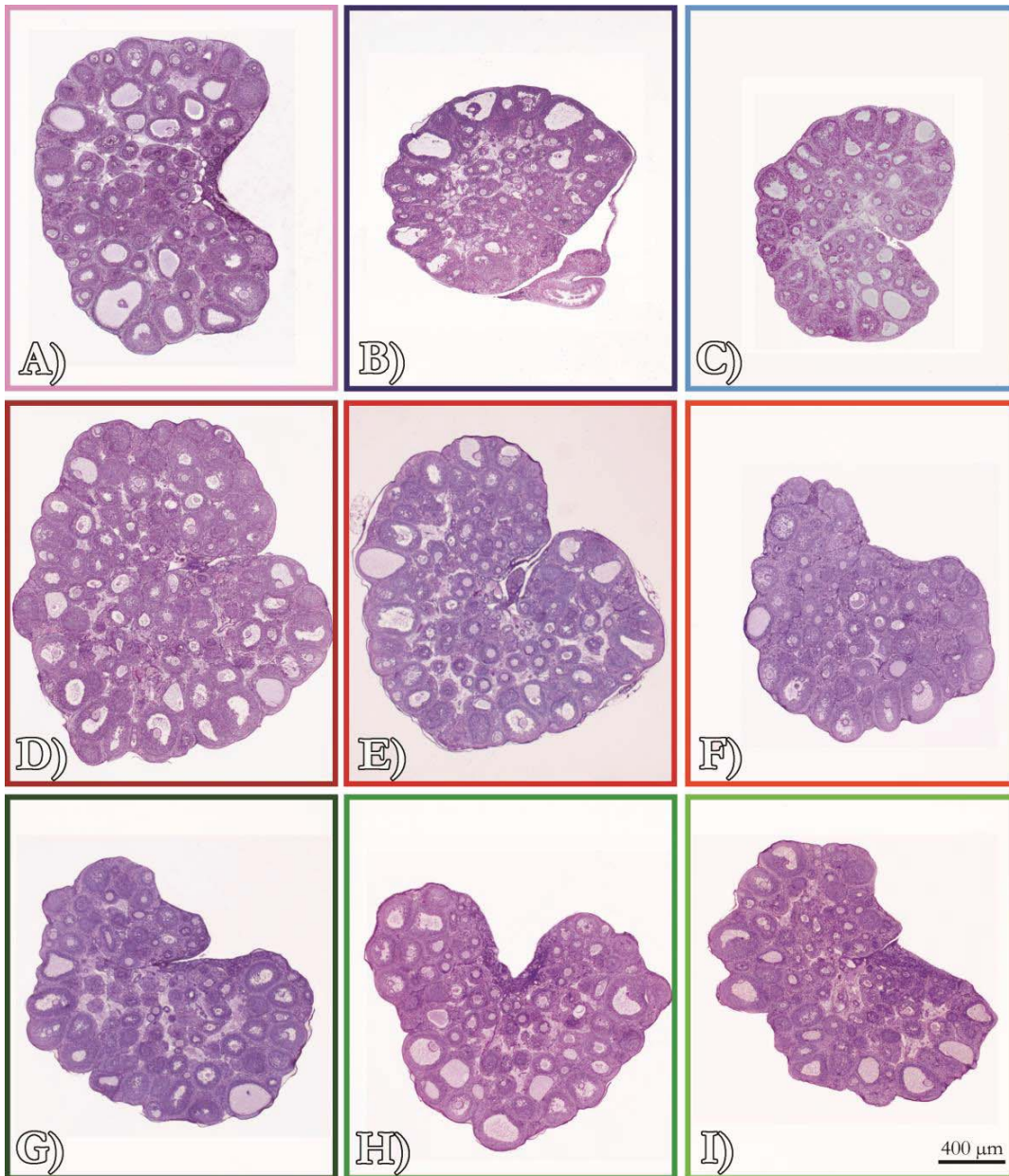
#### **4.1.4.2. Histološke i stereološke karakteristike ovarijuma nezrelih pacova**

Histološkom analizom ovarijuma kontrolnih ženki pacova, kako intaktnih, tako i onih koje su primale maslinovo ulje ili smešu maslinovog ulja i etanola, nije primećena razlika u histološkoj građi i organizaciji. Stoga je prikazana histološka slika ovarijuma intaktnih ženki pacova (Slika 13A).

Na poprečnom preseku centralnog dela ovarijuma kontrolnih ženki starih 22 dana uočava se veliki broj malih zdravih folikula, a prisutni su i mali atretični folikuli. U ovom periodu života nije došlo do odvajanja korteksa i medule, pa se folikuli nalaze kako na periferiji, tako i u centralnoj zoni ovarijuma. U interfolikularnim prostorima nalazi se sekundarni intersticijum i intersticijalne žlezde, kao i ćelijski elementi strome jajnika. Oko ovarijuma se uočava prisustvo ovarijalne burse (Slika 13A).

Tretman  $17\alpha$ -etinil estradiolom (EE1 i EE2) uzokovao je smanjenje veličine ovarijuma u odnosu na kontrole (Slika 13B, C).

Tretman genisteinom (G1 i G2) uslovio je povećanje veličine ovarijuma (Slika 13D, E) u odnosu na kontrole (Slika 13A). Međutim, promene histološke slike nisu zapažene kod životinja G3 (Slika 13F), kao ni kod životinja iz grupa tretiranih daidzeinom (Slika 13G-I).



**Slika 13.** Poprečni presecci centralnog dela ovarijuma. **A)** Kontrolne; **B)** EE1; **C)** EE2; **D)** G1; **E)** G2; **F)** G3; **G)** D1; **H)** D2; **I)** D3 nezrele ženke pacova starosti 22 dana. H&E, bar 400  $\mu\text{m}$ .

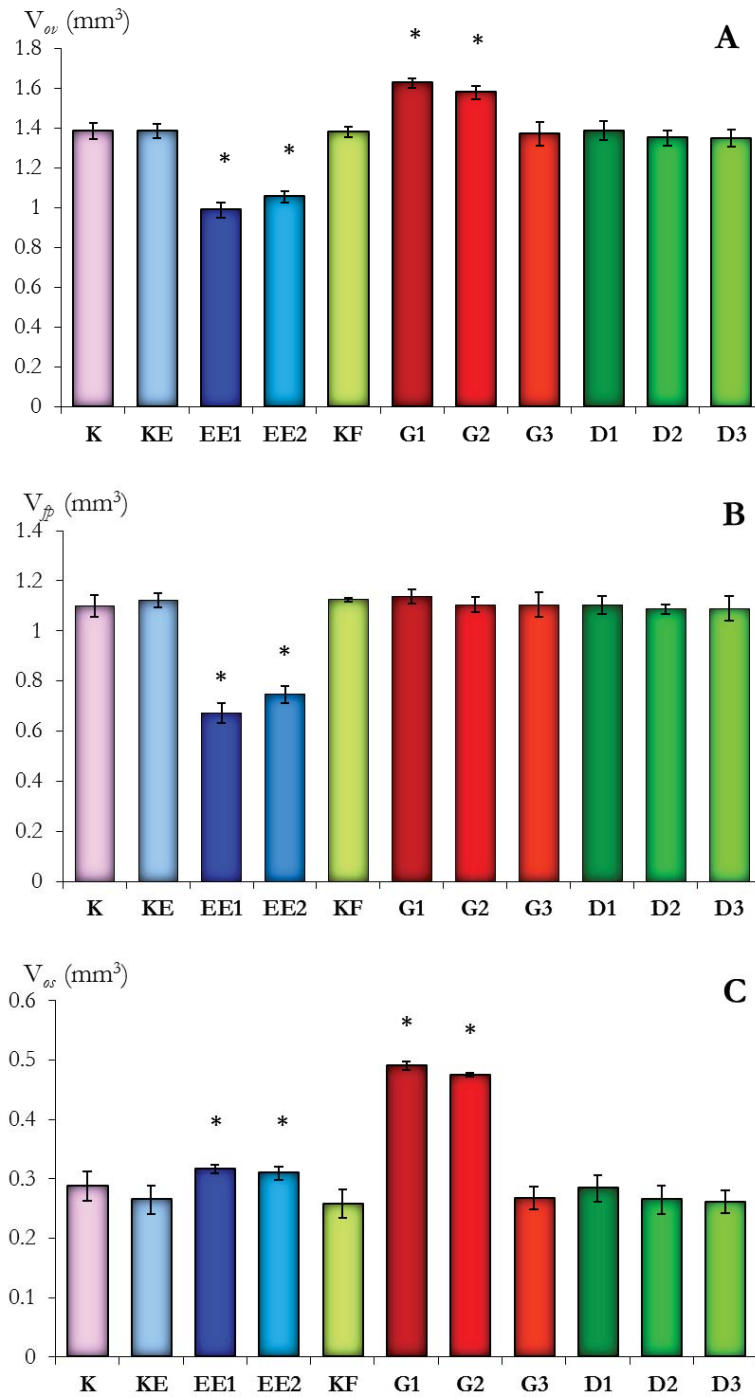


Promene uočene na histološkim preseccima ovarijuma dodatno su stereološki analizirane korišćenjem Kavalierijevog principa.

Rezultati su predstavljeni Histogramom 3. Nakon tretmana visokom dozom etinil-estradiola (EE1) smanjen je apsolutni volumen ovarijuma ( $V_{ov}$ ) (28.6%;  $p < 0.05$ ; Histogram 3A), kao i volumen folikularnog parenhima ( $V_{fp}$ ) (39.9%;  $p < 0.05$ ; Histogram 3B), dok je volumen ovarijalne strome ( $V_{os}$ ) povećan za 19.3% ( $p < 0.05$ ; Histogram 3C).

Slične promene uočavaju se i u EE2 eksperimentalnoj grupi. Vrednost volumena ovarijuma je smanjena za 23.8% ( $p < 0.05$ ; Histogram 3A), kao i vrednost volumena folikularnog parenhima za 33.4% ( $p < 0.05$ ; Histogram 3B). Međutim, vrednosti volumena ovarijalne strome beleže povećanje za 16.9% ( $p < 0.05$ ; Histogram 3C) u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima.

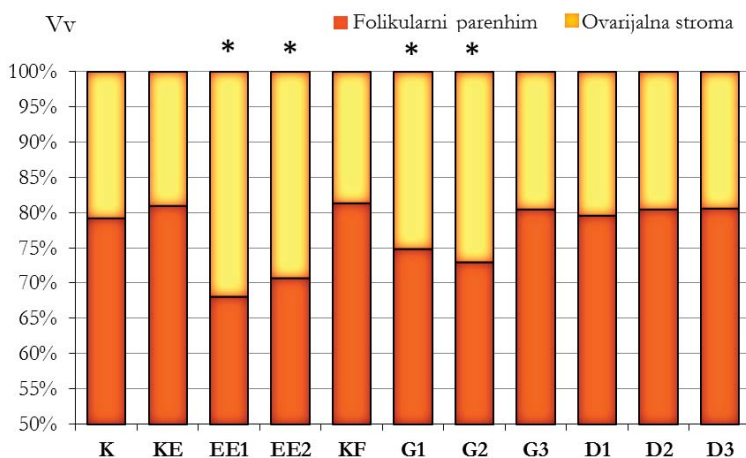
Trodnevni tretmani visokom (G1) i srednjom (G2) dozom genisteina doveli su do statističke promene vrednosti volumena ovarijuma i volumena ovarijalne strome u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti. U G1 eksperimentalnoj grupi vrednosti su povećane za 17.7% ( $p < 0.05$ ; Histogram 3A) i za 90.3% ( $p < 0.05$ ; Histogram 3C), dok vrednosti istih parametara u G2 eksperimentalnoj grupi beleže povećanje za 14.3% ( $p < 0.05$ ; Histogram 3A), odnosno 83.2% ( $p < 0.05$ ; Histogram 3B).



**Histogram 3.** A) Volumen ovarijuma; B) Volumen folikularnog parenhima i C) Volumen ovarijalne strome u ovarijumima tretiranih i kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao SV±SD; p<0.05, \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

Međusobni odnosi volumenskih gustina folikularnog parenhima i intersticijuma u ovarijumima kontrolnih i tretiranih ženki predstavljeni su Histogramom 4. Tretman visokom dozom  $17\alpha$ -etinil estradiola (EE1) uzrokovao je smanjenje  $V_{V_{fp}}$  (15.9%;  $p < 0.05$ ), koje je praćeno povećanjem  $V_{V_{os}}$  (67.5%;  $p < 0.05$ ) u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima. Nakon aplikacije EE2 doze,  $V_{V_{fp}}$  je smanjena za 12.6% ( $p < 0.05$ ), dok je  $V_{V_{os}}$  povećana za 53.7% ( $p < 0.05$ ).

Tretmani G1 i G2 dozom usloveli su statistički značajne promene volumenskih gustina. Vrednosti  $V_{V_{fp}}$  su smanjene u G1 (8.1%;  $p < 0.05$ ) i G2 (10.3%;  $p < 0.05$ ) eksperimentalnoj grupi u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti. Sa druge strane, vrednosti  $V_{V_{os}}$  su značajno povećane za 34.9% ( $p < 0.05$ ), odnosno za 45.3% ( $p < 0.05$ ). Dodatno, zapažamo da su tretmani genisteinom (G1 i G2) izazvali nešto manji poremećaj odnosa između folikularnog parenhima i intersticijuma nego tretmani estradiolom (EE1 i EE2).



**Histogram 4.** Međusobni odnosi volumenskih gustina folikularnog parenhima i intersticijuma u ovarijumima tretiranih i kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

#### 4.1.5. Promene u hipofizi kao pokazatelji estrogenske aktivnosti

##### 4.1.5.1. Apsolutne i relativne mase hipofize

Rezultati dobijeni merenjem mase hipofize i preračunavanjem relativne mase prikazani su u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Apsolutne i relativne mase hipofiza kontrolnih i tretiranih nezrelih ženki pacova.

GRUPA	Masa hipofize (mg)	
	Apsolutna (mg)	Relativna (mg%)
K	3.9 ± 0.4	10.4 ± 0.9
KE	3.8 ± 0.1	10.3 ± 0.8
EE1	3.8 ± 0.3	10.2 ± 0.9
EE2	3.5 ± 0.2	9.4 ± 0.8
KF	4.1 ± 0.4	10.9 ± 0.7
G1	3.8 ± 0.4	10.3 ± 0.8
G2	3.5 ± 0.3	9.5 ± 0.9
G3	3.6 ± 0.3	9.7 ± 0.7
D1	3.7 ± 0.2	10.1 ± 0.8
D2	4.1 ± 0.3	10.9 ± 0.9
D3	3.5 ± 0.3	9.5 ± 0.9

Rezultati su prikazani kao SV±SD; n=6.

Trodnevni tretman različitim dozama 17 $\alpha$ -etinil estradiola, genisteina i daidzeina, nije uzrokovao statistički značajne promene u vrednostima apsolutnih i relativnih masa hipofiza u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima.

##### 4.1.5.2. Morfološke i imunofluorescentne karakteristike gonadotropnih (FSH i LH) i laktotropnih (PRL) ćelija nezrelih ženki pacova

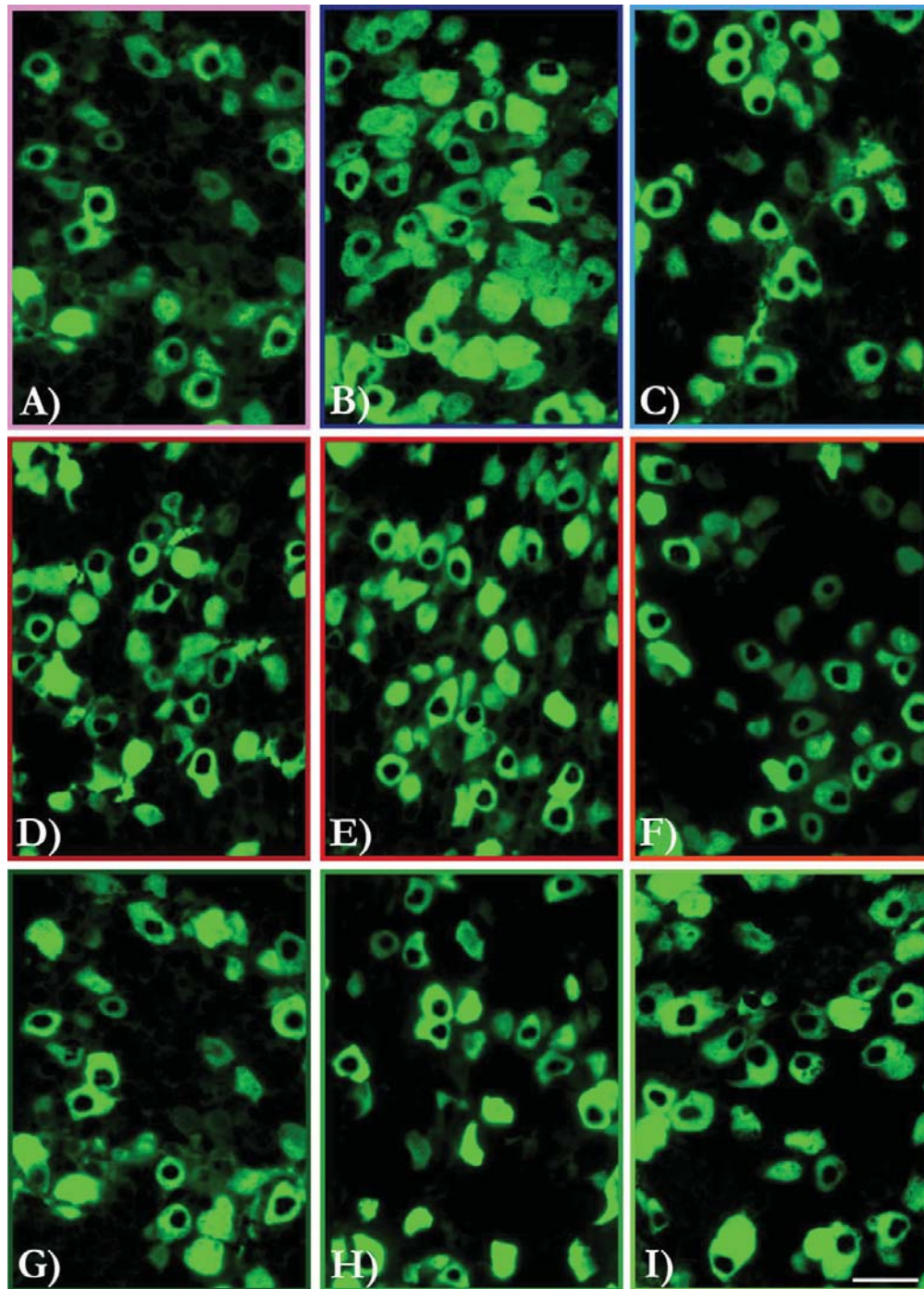
Analizom imunofluorescentno obeleženih FSH, LH i PRL ćelija adenohipofize kontrolnih ženki pacova kako intaktnih, tako i onih koje su primale maslinovo ulje ili smešu maslinovog ulja i etanola, nije primećena razlika u morfologiji i imunofluorescentnim karakteristikama. Stoga su prikazane FSH, LH i PRL ćelije intaktnih ženki pacova. U adenohipofizama kontrolnih ženki pacova starih 22 dana, uočavaju se uglavnom pojedinačne i ravnomerno raspoređene folikulostrimulirajuće (Slika 14A) i luteinizirajuće

ćelije (Slika 15A). Oblik im je kružan, ređe poligonalan, sa okruglim ekscentrično postavljenim jedrom (Slika 14A i 15A). Intenzivno su imunocitohemijski obojene, sa ravnomerno raspoređenim IF signalom u citoplazmi. PRL ćelije su karakterističnog ovalnog do kupastog oblika, sa tankim slojem citoplazme, koji okružuje ovalno centralno postavljeno jedro. Intenzitet IF signala u citoplazmi PRL ćelija kontrolnih nezrelih ženki pacova je veoma slab (Slika 16A).

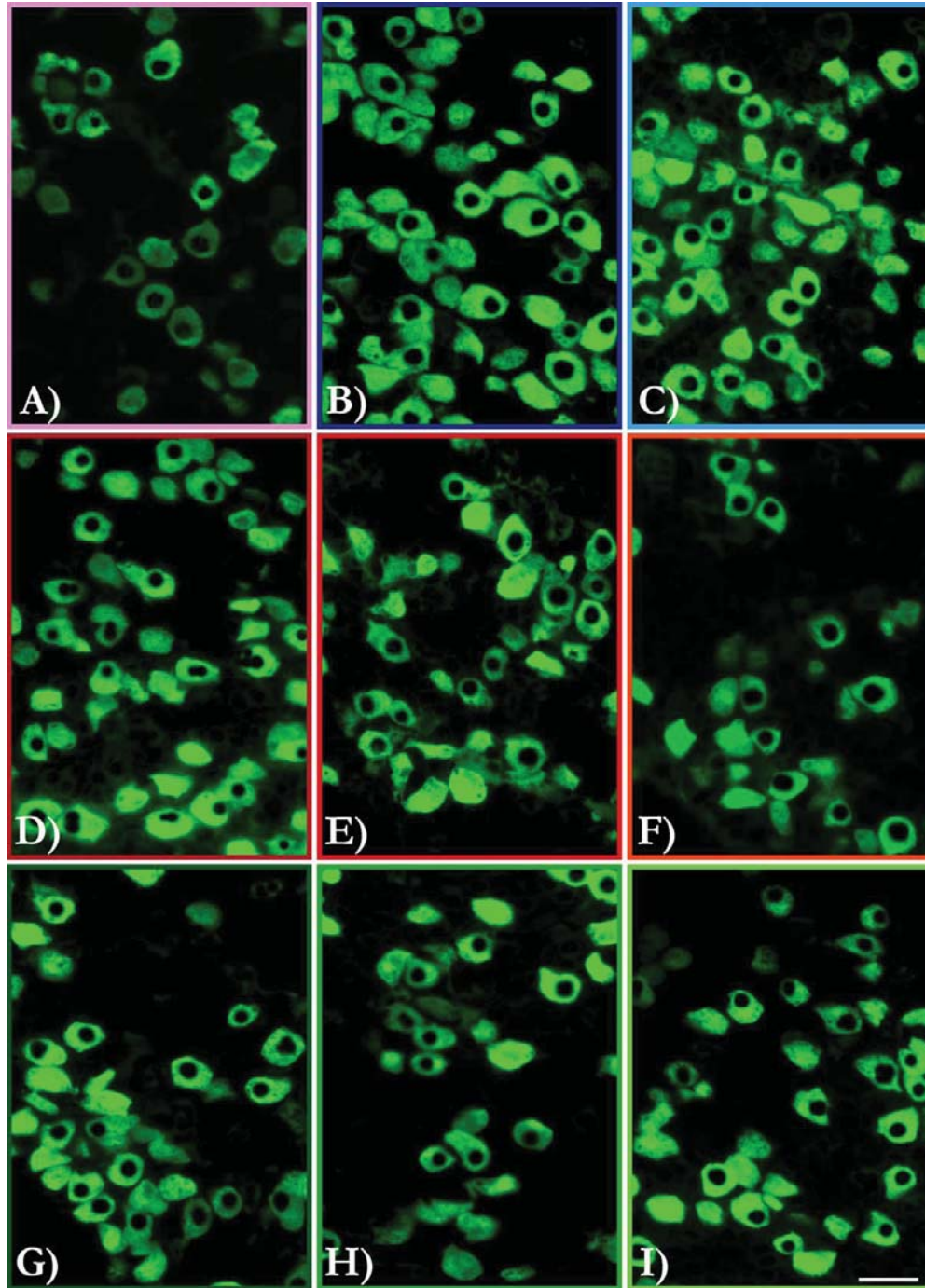
Nakon tretmana  $17\alpha$ -etinil estradiolom (EE1 i EE2) FSH (Slika 14B i C) i LH (Slika 15B i C) ćelije su zastupljenije nego kod kontrola (Slika 14A i 15A). Veće su i češće se uočavaju u grupama. Oblik ćelija je više poligonalan, intenzivnije su obojene sa izraženijom granulacijom citoplazme. Tretmani  $17\alpha$ -etinil estradiolom (EE1 i EE2) uticali su i na povećanje zastupljenosti PRL ćelija u adenohipofizama nezrelih ženki pacova (Slika 16B i C). Ćelije su zadržale karakterističan nepravilan oblik, dok se u citoplazmi uočava lokalizovano povećanje intenziteta IF bojenja.

Na isti način, ali nešto slabijim intenzitetom, deluju G1 i G2 tretmani (Slike 14, 15 i 16D-E). U hipofizama ženki G3 eksperimentalne grupe nisu uočene promene.

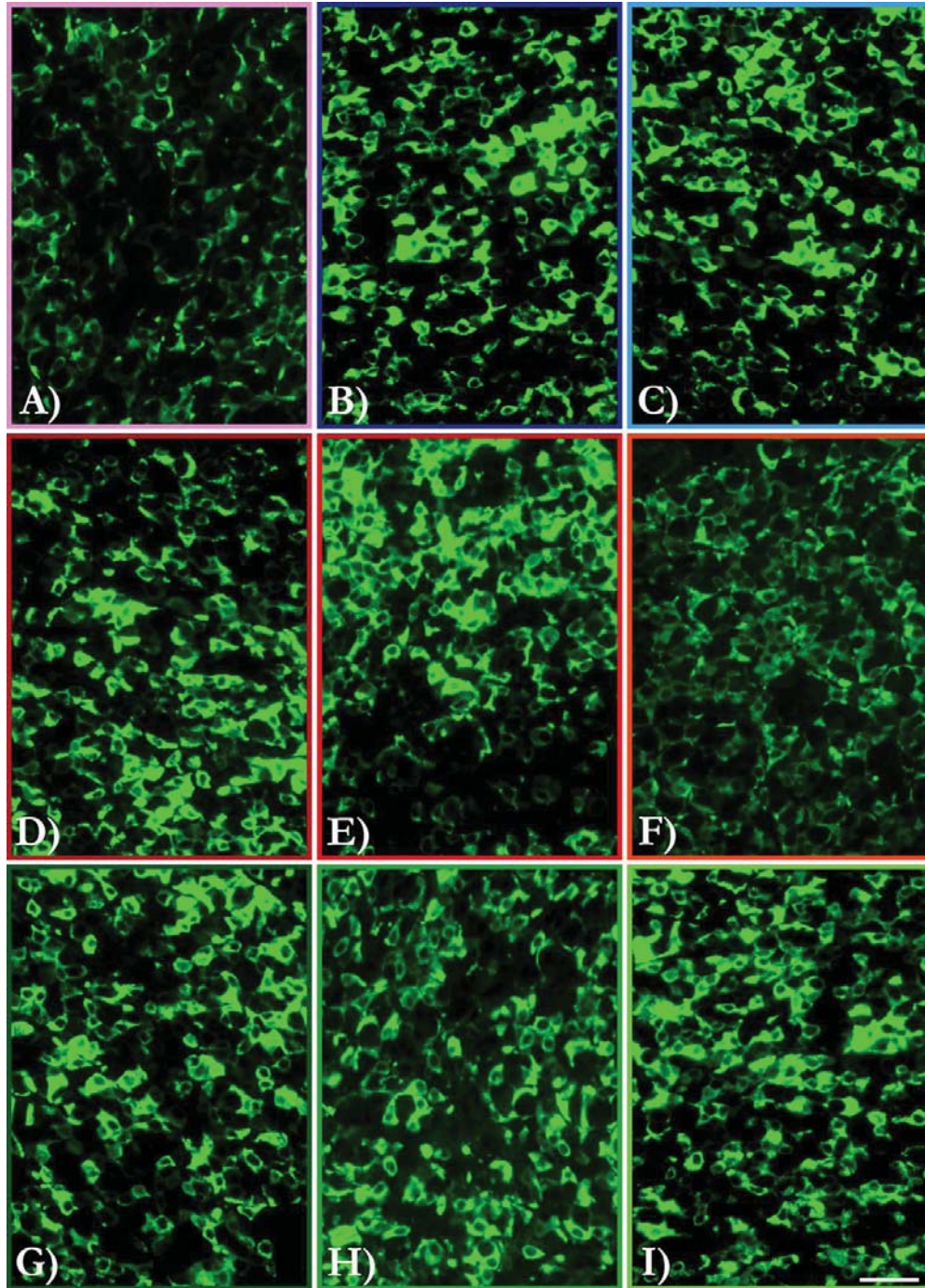
Daidzein je u svim ispitivanim dozama, doveo do promena u morfološkim i imnofluorescentnim karakteristikama FSH (Slika 14G-I) i LH (Slika 15G-I) ćelija. Ćelije su intenzivnije obojene, sa izraženom granulacijom citoplazme, najčešće poligonalnog oblika, lokalizovane u grupama. Nakon tretmana daidzeinom, PRL ćelije, karakterističnog nepravilnog oblika su zastupljenije i intenzivnije imunocitohemijski obojene (Slika 16G-I) u poređenju sa presecima hipofiza kontrolnih životinja (Slika 16A).



**Slika 14.** Imunofluorescentno obeležene FSH ćelije u adenohipofizi. **A)** Kontrolne; **B)** EE1; **C)** EE2; **D)** G1; **E)** G2; **F)** G3; **G)** D1; **H)** D2; **I)** D3 nezrele ženke pacova starosti 22 dana. Bar 50  $\mu\text{m}$ .



**Slika 15.** Imunofluorescentno obeležene LH ćelije u adenohipofizi. **A)** Kontrolne; **B)** EE1; **C)** EE2; **D)** G1; **E)** G2; **F)** G3; **G)** D1; **H)** D2; **I)** D3 nezrele ženke pacova starosti 22 dana. Bar 50  $\mu\text{m}$ .



**Slika 16.** Imunofluorescentno obeležene **PRL** ćelije u adenohipofizi. **A)** Kontrolne; **B)** EE1; **C)** EE2; **D)** G1; **E)** G2; **F)** G3; **G)** D1; **H)** D2; **I)** D3 nezrele ženke pacova starosti 22 dana. Bar 50  $\mu\text{m}$ .

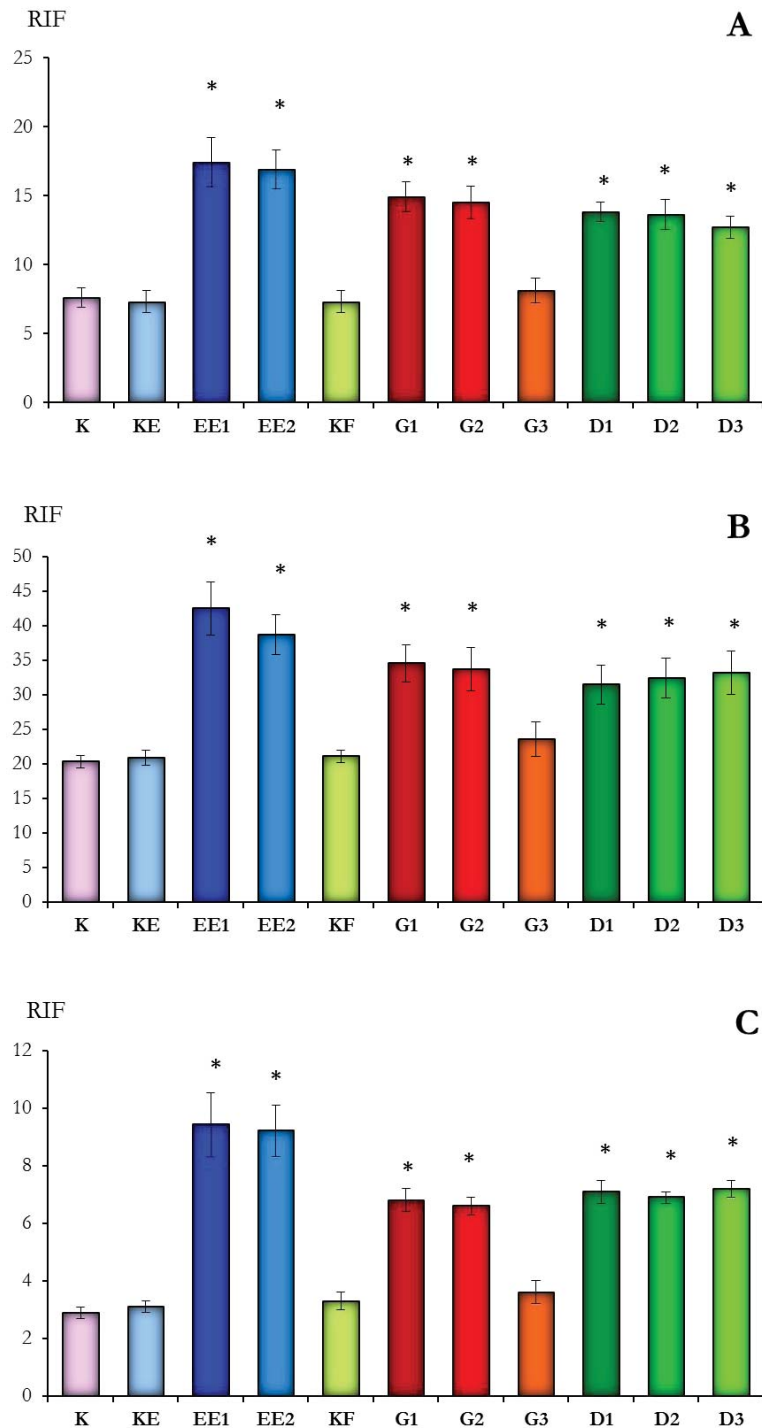
Relativni intenzitet fluorescentnog (RIF) signala imunoobeđenih FSH ćelija, statistički značajno je povećan 1.4x ( $p < 0.05$ ), odnosno 1.2x ( $p < 0.05$ ) kod životinja EE1 i



EE2 grupe. Genistein je uzrokovao povećanje RIF za 104.1% ( $p < 0.05$ ) u G1, odnosno 98.6% ( $p < 0.05$ ) u G2 grupi. U G3 eksperimentalnoj grupi nisu uočene statistički značajne promene. Tretman daidzeinom (D) je statistički značajno povećao ispitivani parametra. Povećanje RIF uočeno je u D1 (89.1%;  $p < 0.05$ ), D2 (86.3%;  $p < 0.05$ ) i D3 (73.9%;  $p < 0.05$ ) eksperimentalnoj grupi, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima (Histogram 5A).

U imunoobebeženim LH ćelijama adenohipofize vrednosti RIF nakon tretmana estradiolom (EE1 i EE2) beleže statistički značajno povećanje za 103.4%, odnosno za 85.1% ( $p < 0.05$ ). Genistein je uzrokovao povećanje RIF za 63.9% ( $p < 0.05$ ) u G1, odnosno 59.7% ( $p < 0.05$ ) u G2 grupi. U G3 eksperimentalnoj grupi nisu uočene statistički značajne promene. Nakon tretmana daidzeinom (D) RIF je statistički značajno povećan. Povećanje RIF uočeno je u D1 (49.2%;  $p < 0.05$ ), D2 (53.5%;  $p < 0.05$ ) i D3 (57.5%;  $p < 0.05$ ) eksperimentalnoj grupi, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima (Histogram 5B).

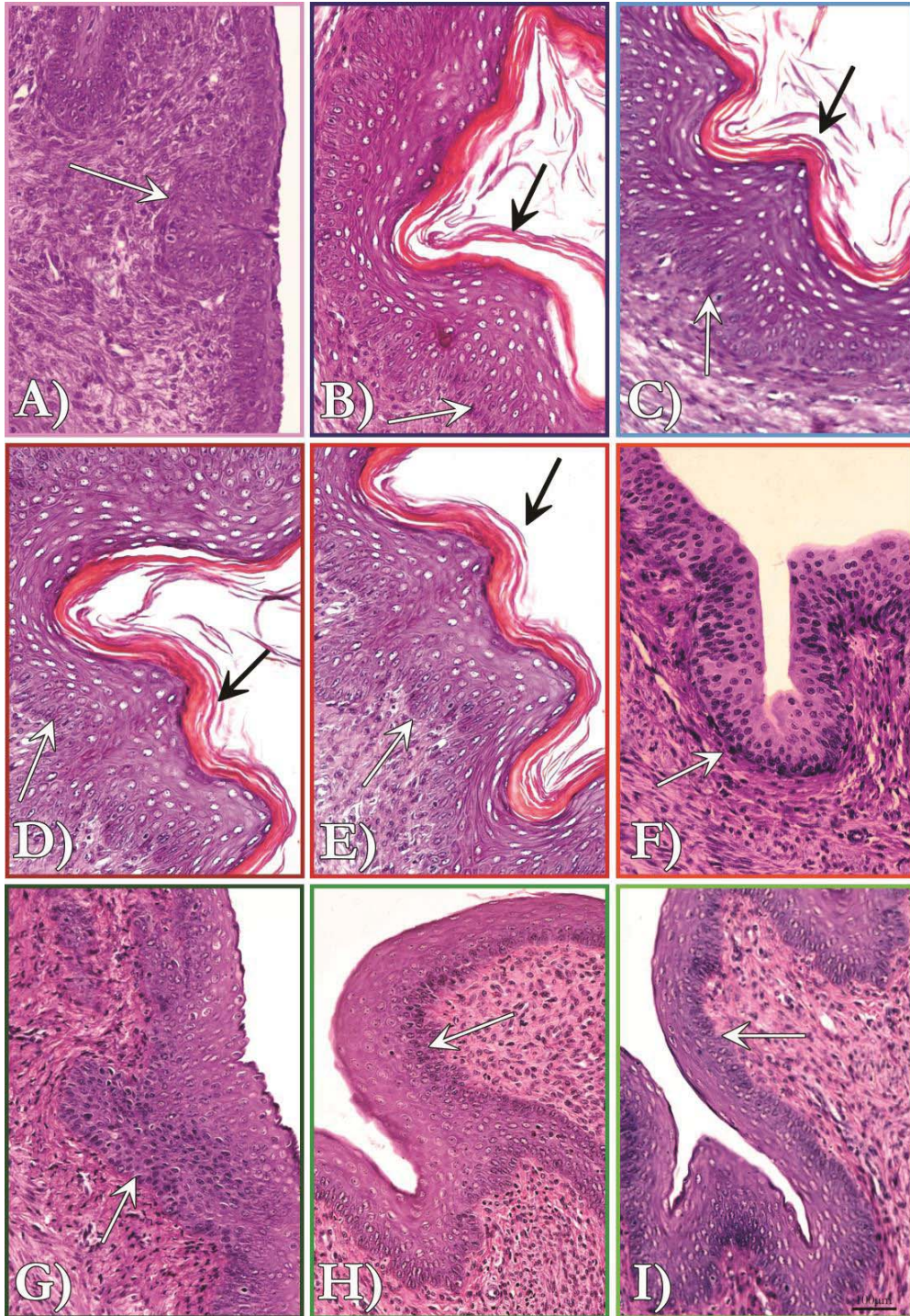
Relativni intenzitet fluorescentnog signala imunoobebeženih PRL ćelija, statistički značajno je povećan 2.1x ( $p < 0.05$ ), odnosno 1.8x ( $p < 0.05$ ) kod životinja EE1 i EE2 grupe. Genistein je uzrokovao povećanje RIF za 106.2% ( $p < 0.05$ ) u G1, odnosno 100.3% ( $p < 0.05$ ) u G2 grupi. U G3 eksperimentalnoj grupi nisu uočene statistički značajne promene. Tretman daidzeinom (D) je statistički značajno povećao ovaj parametra. Povećanje RIF uočeno je u D1 (115.1%;  $p < 0.05$ ), D2 (109.3%;  $p < 0.05$ ) i D3 (118.2%;  $p < 0.05$ ) eksperimentalnoj grupi, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima (Histogram 5C).



**Histogram 5.** Vrednosti relativnog intenziteta fluorescencije **A)** FSH; **B)** LH i **C)** PRL ćelija u adenohipofizama tretiranih i kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

#### **4.1.6. Promene morfologije vaginalnog epitela kao pokazatelj estrogenske aktivnosti**

Histološkom analizom vagina kontrolnih ženki pacova, kako intaktnih, tako i onih koje su primale maslinovo ulje ili smešu maslinovog ulja i etanola, nije primećena razlika u histološkoj građi i organizaciji. Stoga je prikazana histološka slika vagina intaktnih ženki pacova. Epitel vagine je pločast i slojevit bez orožavanja, čvrsto povezan sa brojnim papilama rastresitog veziva i kod nezrelih ženki se sastoji od 5-10 slojeva (Slika 17A). Tretman estradiolom uzrokovao je hiperplaziju ćelija površinskog epitela vagine (Slika 17B i C). Promene su posebno izražene u vaginama životinja EE1 eksperimentalne grupe (Slika 17B). Pod uticajem estradiola, paralelno sa povećanjem slojeva vaginalnog epitela, dolazi i do deskvamacije ćelija površinskog epitela (Slika 17B i C). Genistein (G1 i G2) je, slično estradiolu, uslovio izmenu opšte histološke slike vagine, pri čemu su promene nešto slabijeg intenziteta (Slika 17D i E). Promena opšte histološke slike vaginalnog epitela nije zapažena kod ženki G3 eksperimentalne grupe (Slika 17F) u poređenju sa kontrolnim presecima. Tretman daidzeinom je doveo do povećanja broja slojeva vaginalnog epitela ali ne i do deskvamacije površinskih ćelija (Slika 17G-I).



**Slika 17.** Poprečni preseki vagine. **A)** Kontrolne; **B)** EE1; **C)** EE2; **D)** G1; **E)** G2; **F)** G3; **G)** D1; **H)** D2; **I)** D3 nezrele ženke pacova starosti 22 dana. H&E, bar 100 $\mu$ m. **Crna strelica-** hiperplazija površinskog epitela, praćena deskvamacijom ćelija; **Bela strelica-** površinski pseudoslojeviti pločasti epitel vagine.

## 4.2. ANIMALNI MODEL MENOPAUZE

### 4.2.1 Promene u hipofizi acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima

#### 4.2.1.1. Apsolutna i relativna masa hipofize

Masa hipofize kod acikličnih ženki pacova određivana je nakon hronične aplikacije terapijske doze estradiol dipropionata (0.625 mg/kg t.m./dan; E) i minimalnih efektivnih doza fitoestrogena (35mg/kg t.m./dan), genisteina (G) i daidzeina (D). Rezultati dobijeni merenjem telesne mase životinja, mase hipofize i preračunavanjem relativne mase prikazani su u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Telesne mase, apsolutne i relativne mase hipofiza kontrolnih i tretiranih nezrelih ženki pacova.

GRUPA	Masa životinje (g)	Masa hipofize	
		Apsolutna (mg)	Relativna (mg %)
K	326 ± 21	12.5 ± 0.2	3.9 ± 0.4
KE	3α ± 24	13.1 ± 0.7	4.1 ± 0.3
E	308 ± 28	<b>47.5 ± 0.54*</b>	<b>14.9 ± 0.9*</b>
KF	311 ± 28	13.5 ± 1.1	4.3 ± 0.2
G	310 ± 28	<b>16.3 ± 1.4*</b>	<b>5.2 ± 0.5*</b>
D	311 ± 28	<b>16.1 ± 0.9*</b>	<b>5.1 ± 0.4*</b>

Rezultati su prikazani kao SV±SD; p<0.05, \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

Iz Tabele 10 uočava se da između intaktne kontrolne grupe (K) i grupa kojima je aplikovano maslinovo ulje (KE) i smeša maslinovog ulja i apsolutnog etanola (KF) nije bilo statistički značajnih razlika u telesnim masama, apsolutnim i relativnim masama hipofiza što ukazuje da pomenuti rastvarači nisu uticali na rezultate, i da se promene mogu pripisati delovanju ispitivanih supstanci. Takođe, prikazani rezultati ukazuju da tretmani nisu izazvali statistički značajne promene telesne mase u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima. Kod životinja tretiranih E, vrednosti apsolutne i relativne mase hipofize povećane su 3.6x (p<0.05) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu životinja.

Tretmani G i D uzrokovali su statistički značajno povećanje apsolutne i relativne mase hipofize za 20.7% ( $p < 0.05$ ), odnosno za 19.3% ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima.

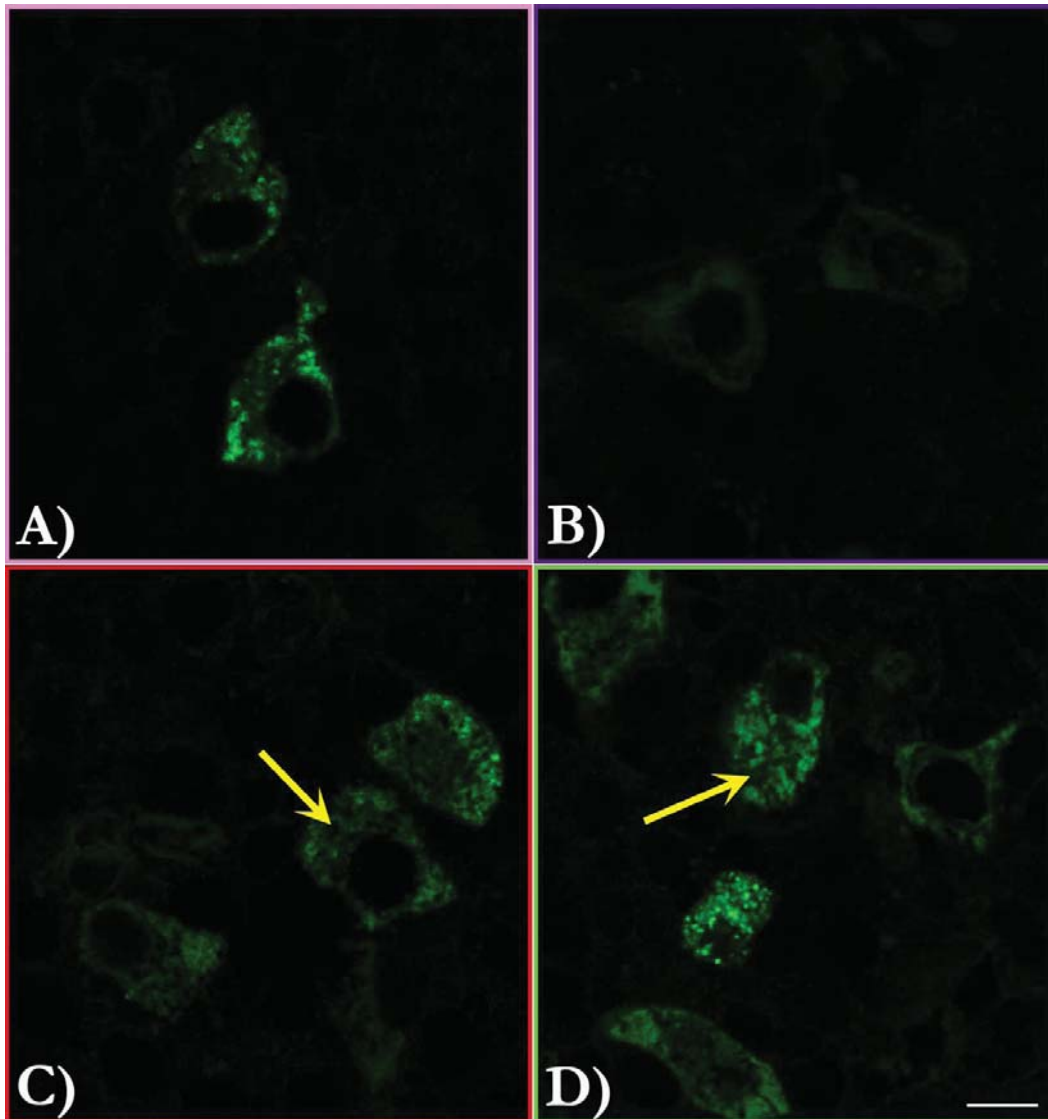
#### **4.2.1.2. Morfološke i imunofluorescentne karakteristike gonadotropnih (FSH i LH) i laktotropnih (PRL) ćelija acikličnih ženki pacova**

U adenohipofizama acikličnih kontrolnih ženki pacova starih 13 meseci, uočavaju se uglavnom pojedinačne i ravnomerno raspoređene folikulostimulirajuće (Slika 18A) i luteinizirajuće ćelije (Slika 19A). FSH i LH ćelije su krupne, ovalnog, poligonalnog ili polihedralnog oblika i javljaju se pojedinačno ili češće u grupama. Jedra su im okrugla, uglavnom ekscentrično postavljena sa homogeno imunocitohemijski obojenom citoplazmom. PRL ćelije su karakterističnog ovalnog do kupastog oblika sa tankim slojem citoplazme, koji okružuje ovalno, centralno postavljeno jedro. U citoplazmi PRL ćelija kontrolnih acikličnih ženki uočavaju se intenzivno IF obojeni regioni, najčešće postavljeni uz jedro (Slika 20A).

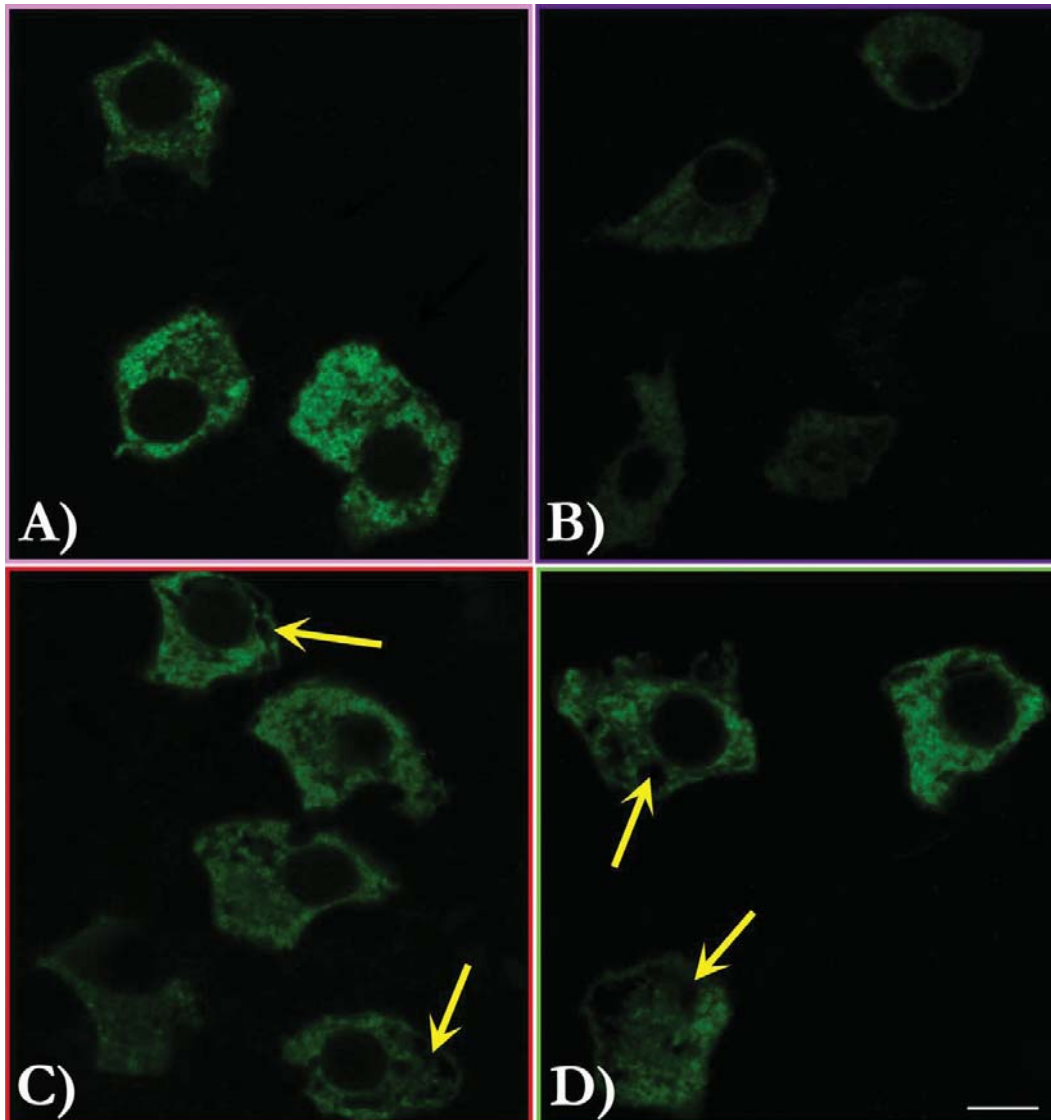
Tretman E doveo je do izrazitog smanjenja IF signla FSH (Slika 18B) i LH (Slika 19B) ćelija u odnosu na kontrole (Slika 18A i 19A). Dodatno, zapaža se da su ćelije poprimile više poligonalan, a manje ovalan oblik. Estradiol je uticao i na povećanje zastupljenosti PRL ćelija u adenohipofizama acikličnih ženki pacova (Slika 20B). Ćelije su zadržale karakterističan nepravilan oblik, dok se u citoplazmi uočava povećanje intenziteta IF bojenja, posebno u regionima postavljenim uz jedro.

U hipofizama acikličnih ženki pacova, aplikacija fitoestrogena uslovlila je promene morfoloških i imunofluorescentnih karakteristika gonadotropnih i laktotropnih ćelija. Nakon tretmana G i D, gonadotropne FSH (Slika 18 i 19C) i LH (Slika 18 i 19C) ćelije su sličnog intenziteta obojenosti citoplazme kao kod kontrola (Slika 18 i 19A), ali izmenjenog oblika i neravnomerno raspoređenog IF signala. U citoplazmi se uočavaju neobojeni delovi,

koji joj daju izgled vakuoliziranosti. Tretmani fitoestrogenima uticali su i na morfološke i na IF karakteristike PRL ćelija. Laktotropne ćelije su nešto veće nego kod kontrola, sa karakterističnim neobojenim regionima kako nakon tretmana G (Slika 20C), tako i nakon tretmana D (Slika 20D).

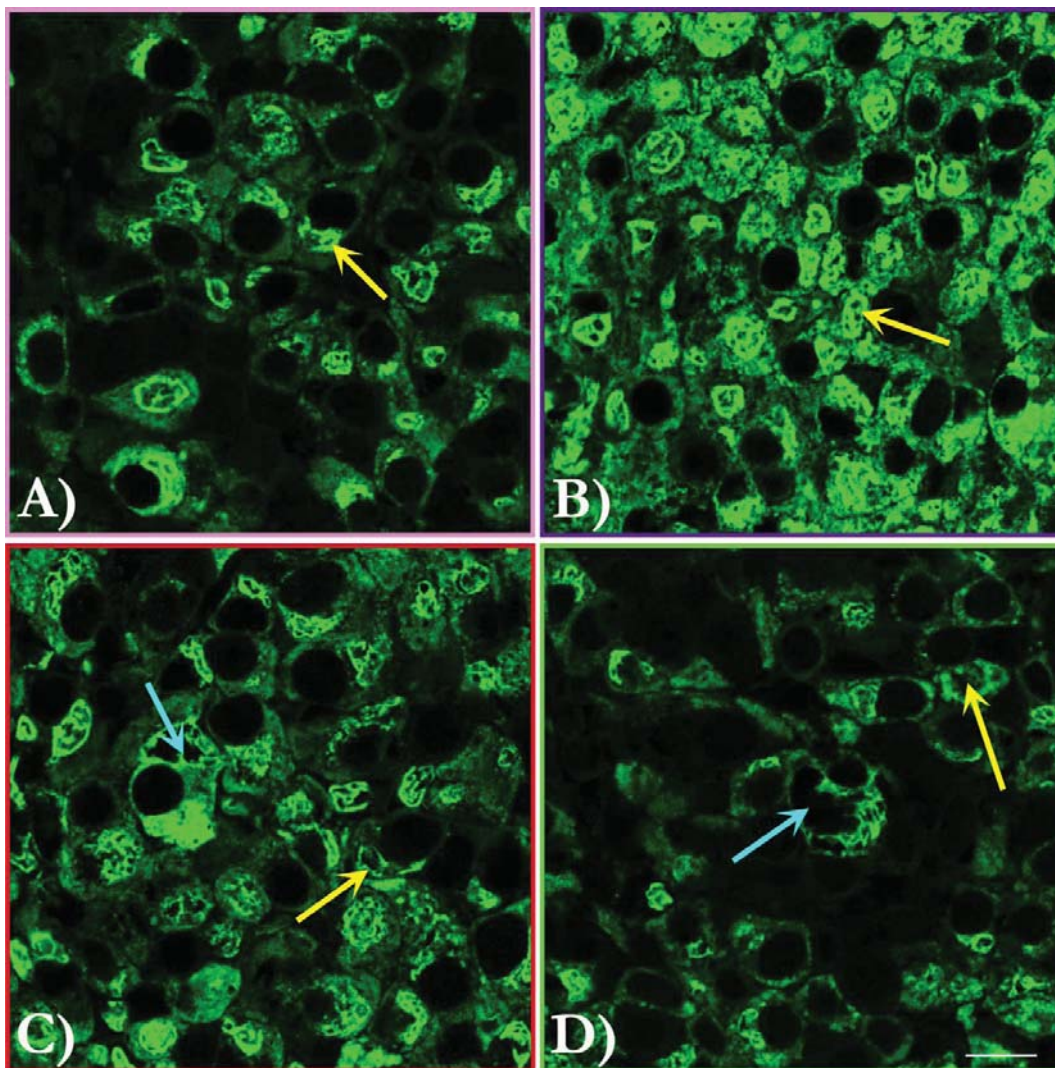


**Slika 18.** Imunofluorescentno obeležene FSH ćelije u adenohipofizi. **A)** Kontrolne; **B)** Estradiolom; **C)** Genisteinom i **D)** Daidzeinom tretirane aciklične ženke pacova starosti 13 meseci. **Žute strelice** - vakuolizacija citoplazme. Bar 50  $\mu\text{m}$ . ROI 2,8x.



**Slika 19.** Imunofluorescentno obeležene LH ćelije u adenohipofizi. **A)** Kontrolne; **B)** Estradiolom; **C)** Genisteinom i **D)** Daidzeinom tretirane aciklične ženke pacova starosti 13 meseci. **Žute strelice** - vakuolizacija citoplazme. Bar 50  $\mu\text{m}$ . ROI 2,8x.

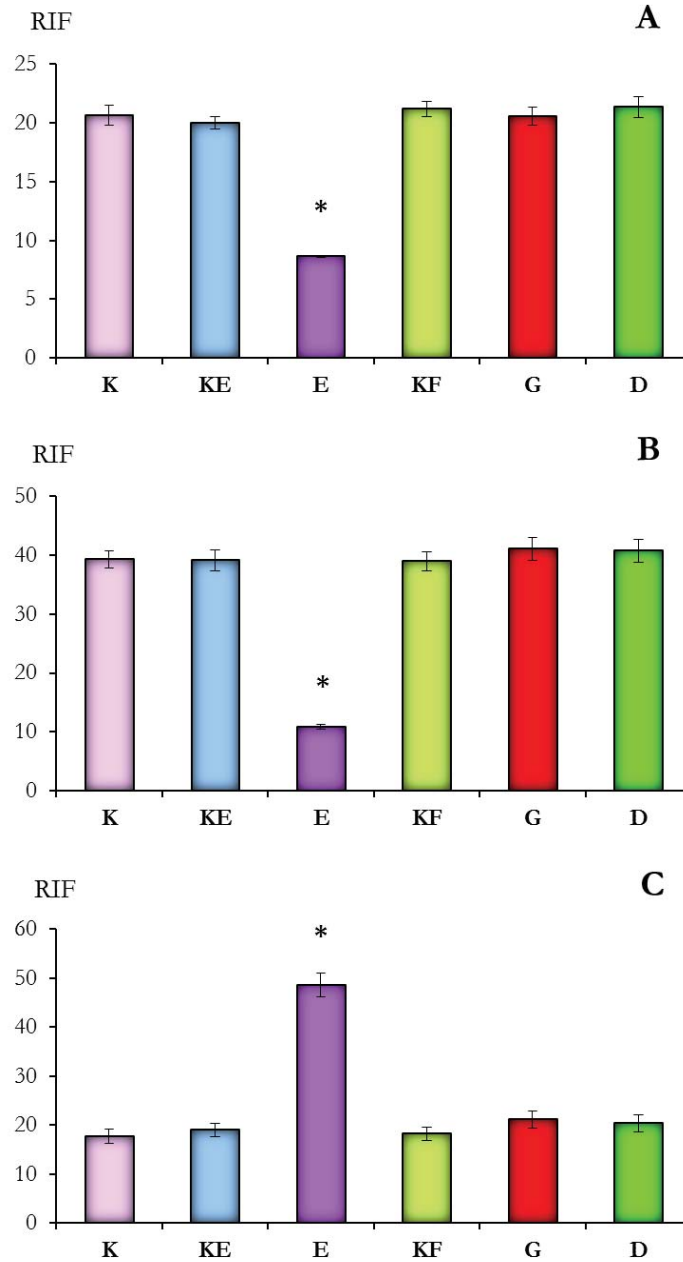




**Slika 20.** Imunofluorescentno obeležene **PRL ćelije** u adenohipofizi. **A)** Kontrolne; **B)** Estradiolom; **C)** Genisteinom i **D)** Daidzeinom tretirane aciklične ženke pacova starosti 13 meseci. **Žute strelice** - ekscentrično postavljeni intenzivno IF obojeni regioni u citoplazmi; **Plave strelice** - vakualizacija citoplazme. Bar 50  $\mu\text{m}$ . ROI 2.8x.

Relativni intenzitet fluorescentnog (RIF) signala imunoobeđenih gonadotropnih ćelija, statistički značajno je smanjen za 56.7% ( $p < 0.05$ ; Histogram 6A), odnosno za 72.3% ( $p < 0.05$ ; Histogram 6B) nakon tretmana estradiolom. Nakon tretmana fitoestrogenima, nisu uočene statistički značajne promene vrednosti RIF u citoplazmi, kako FSH (Histogram 6A), tako ni LH (Histogram 8B) ćelija. Tretman E izazvao je povećanje RIF imunoobeđenih PRL ćelija 1.6x ( $p < 0.05$ ; Histogram 6C), dok tretmani fitoestrogenima

nisu uzrokovali statistički značajne promene u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti.



**Histogram 6.** Vrednosti relativnog intenziteta fluorescence (RIF) **A)** FSH; **B)** LH i **C)** PRL ćelija u adenohipofizama tretiranih i kontrolnih acikličnih životinja. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

#### 4.2.2. Promene u ovarijumu acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima

##### 4.2.2.1. Apsolutne i relativne mase ovarijuma

Rezultati dobijeni merenjem mase ovarijuma i preračunavanjem njihove relativne mase prikazani su u Tabeli 11.

**Tabela 11.** Apsolutne i relativne mase ovarijuma kontrolnih i tretiranih nezrelih ženki pacova.

GRUPA	Masa ovarijuma	
	Apsolutna (mg)	Relativna (%)
<b>K</b>	29.1 ± 2.4	8.8 ± 0.7
<b>KE</b>	28.5 ± 2.7	8.9 ± 0.9
<b>E</b>	<b>36.2 ± 3.1*</b>	<b>11.8 ± 0.9 *</b>
<b>KF</b>	27.8 ± 2.6	8.9 ± 0.6
<b>G</b>	26.9 ± 2.5	8.7 ± 0.5
<b>D</b>	29.5 ± 2.7	9.4 ± 0.7

Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

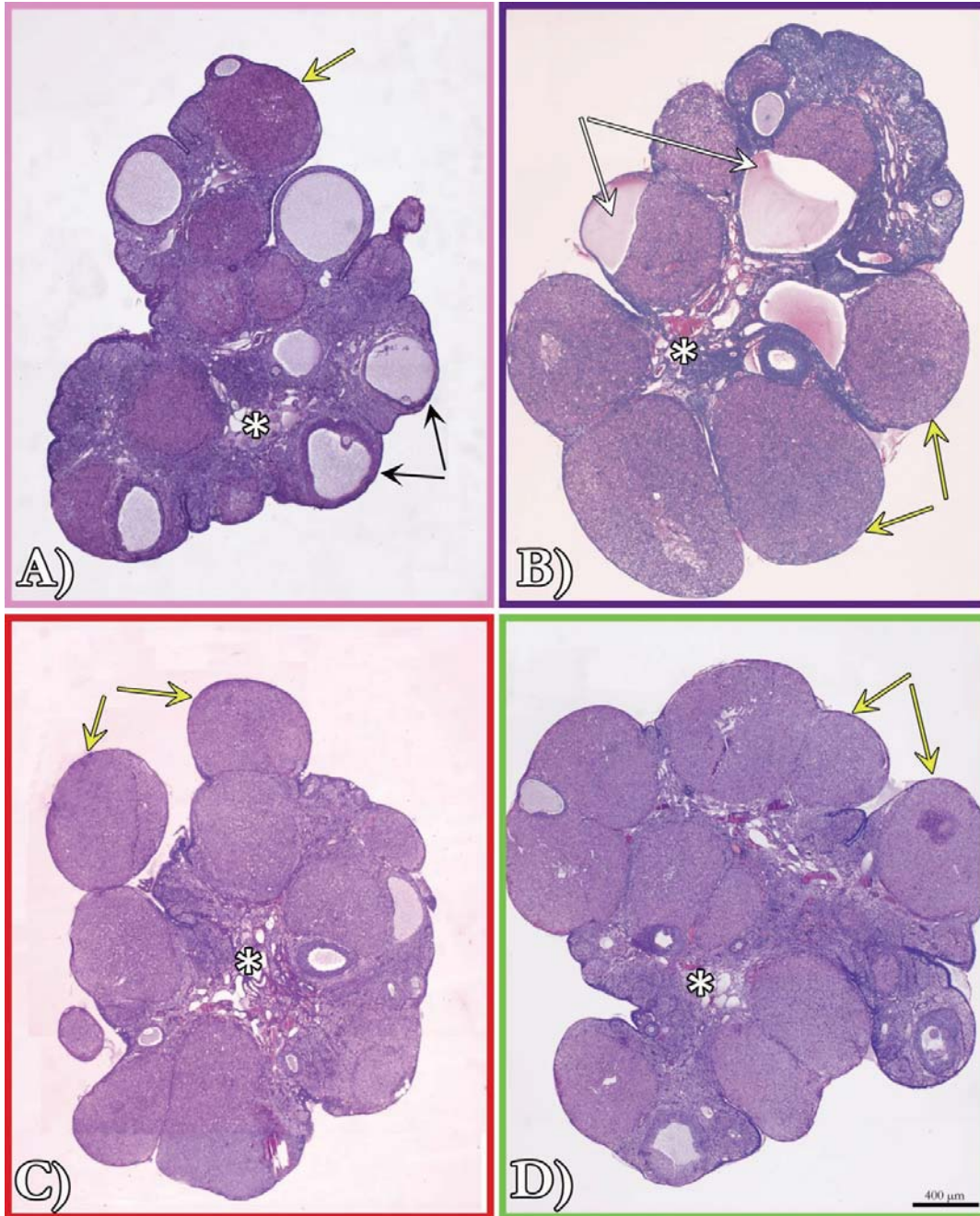
Aplikacija estradiola uslovila je statistički značajno povećane (oko 30%;  $p < 0.05$ ) apsolutne i relativne masa ovarijuma, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima. Tretmani fitoestrogenima, genisteinom i daidzeinom, nisu uticali na promenu ovih parametara.

#### 4.2.2.2. Histološke karakteristike ovarijuma acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima

Histološkom analizom ovarijuma kontrolnih acikličnih ženki pacova, kako intaktnih, tako i onih koje su primale maslinovo ulje ili smešu maslinovog ulja i etanola, nije primećena razlika u histološkoj građi i organizaciji. Stoga je prikazana histološka slika ovarijuma intaktnih ženki pacova (Slika 21A). Na poprečnom preseku centralnog dela ovarijuma kontrolnih ženki starih 13 meseci mogu se uočiti folikuli u svim fazama folikulogeneze, žuta tela, a prisutni su i folikuli zahvaćeni atretičnim, degenerativnim promenama (Slika 21A). Dominantna komponenta u ovarijumima acikličnih ženki je stroma, odnosno intersticijum. Pored zdravih folikula u različitim stadijumima folikulogeneze i atretičnih u različitim stadijumima atrezije, u ovarijumima 13 meseci starih ženki pacova, uočavaju se i papilarni uvrati granuloza sloja koji zalaze u lumen folikula. U te uvrate zalaze i ćelije teka sloja koje neretko prate i krvni kapilari, što predstavlja fazu formiranja folikularnih cisti.

Tretman E uzrokovao je povećanje veličine ovarijuma (Slika 21B) u odnosu na kontrole (Slika 21A). Ovo povećanje rezultat je povećanja broja žutih tela, pre svega zrelih i regresivnih, kao i izrazite dilatacije krvnih sudova u ovarijalnoj stromi (Slika 21B). Ovarijalne folikularne ciste se češće javljaju kod ženki tretiranih E nego kod kontrolnih ženki.

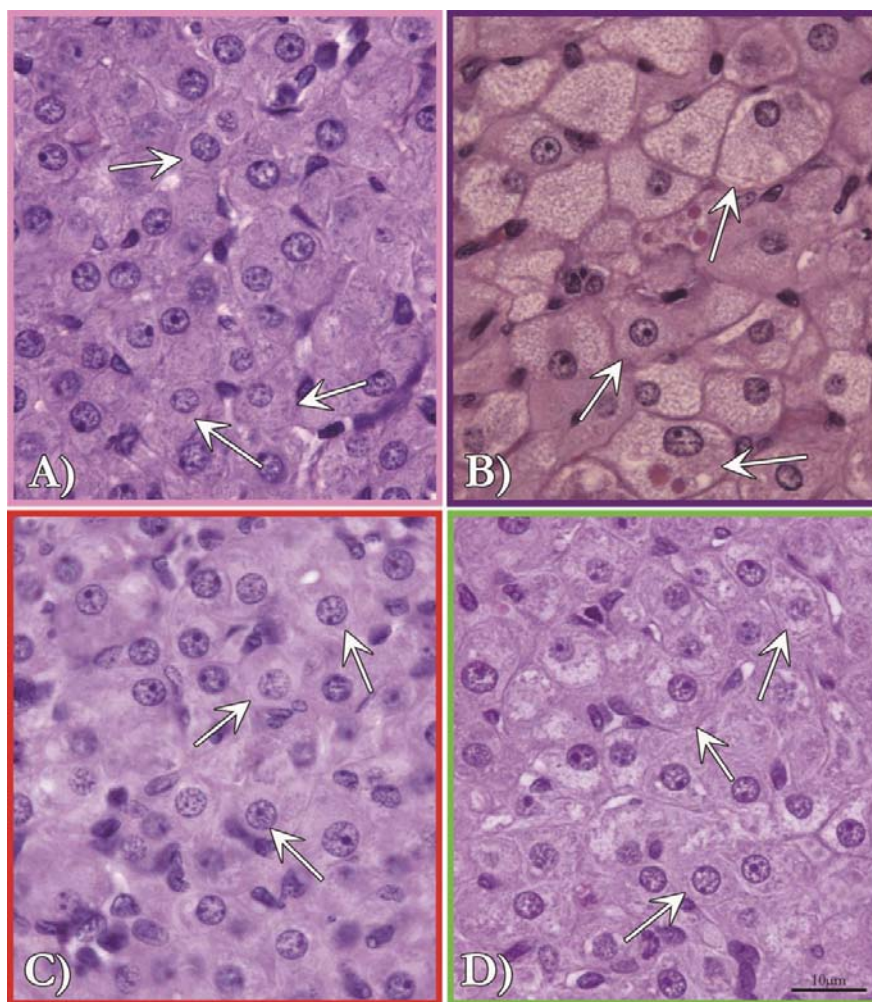
Nakon tretmana G, veličina ovarijuma nije izmenjena, ali se zapaža dilatacija krvnih sudova, kao i brojna žuta tela i folikuli u različitim stadijumima folikulogeneze i atrezije (Slika 21C). D je uslovio značajno povećanje ovarijuma (Slika 21D), kao dilataciju krvnih sudova u ovarijalnoj stromi. Dodatno, detaljnom histološkom analizom, uočava se da je nakon tretmana fitoestrogenima broj folikularnih cista manji u poređenju sa kontrolama.



**Slika 21.** Poprečni preseki centralnog dela ovarijuma. **A)** Kontrolne; **B)** Estradiolom; **C)** Genisteinom i **D)** Daidzeinom tretirane aciklične ženke pacova starosti 13 meseci. H&E, bar 400 µm. **Bele zvezdice**-krvni sudovi; **Žute strelice**-žuta tela; **Crne strelice**-formiranje folikularnih cisti; **Bele strelice**-ciste žutih tela.

Granuloza luteinske ćelije zrelih žutih tela, kontrolnih životinja, su izrazito bazofilne, okruglog do poligonalnog oblika, sa centralno postavljenim jedrom (Slika 22A). Nakon E tretmana, ćelije su krupnije, češće ovalnog do poligonalnog oblika. Jedro je

ekscentrično postavljeno u eoziofilnoj citoplazmi u kojoj se uočava veliki broj sitnih masnih kapi (Slika 22B). Tretman G, nije uticao na promenu oblika i veličine granuloza luteinskih ćelija, međutim citoplazma je nešto svetlija u odnosu na granuloza luteinske ćelije kontrolnih životinja (Slika 22C). Daidzein nije značajno izmenio opštu histološku sliku zrelih žutih tela u poređenju sa kontrolama. Međutim, detaljnijom histološkom analizom u granuloza luteinskim ćelijama zapažena je svetlija citoplazma u kojoj se može uočiti po neka masna kap (Slika 22D).



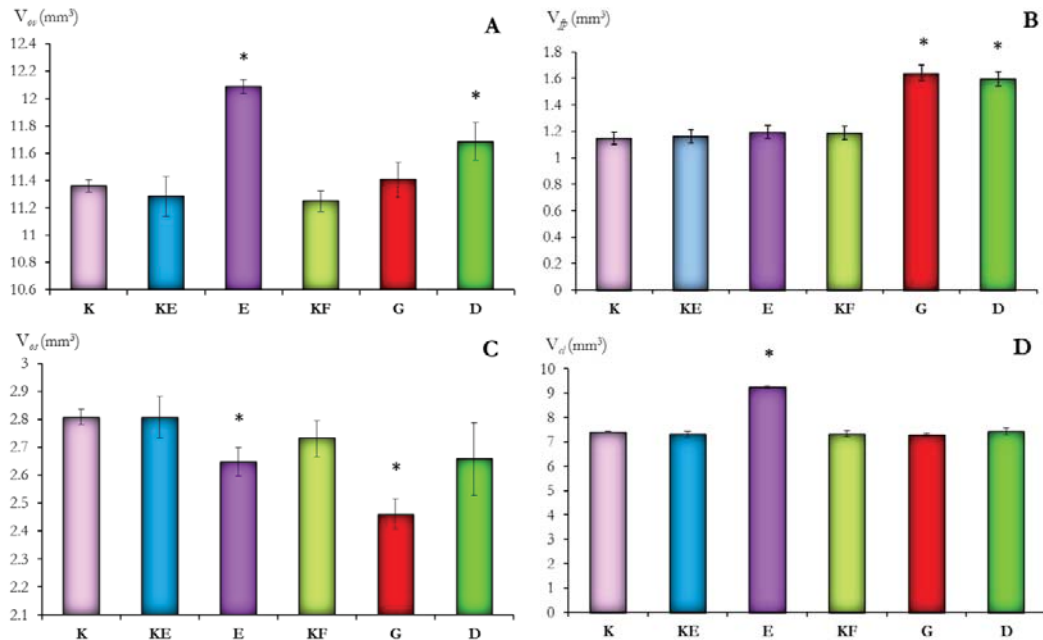
**Slika 22.** Poprečni presecci centralnog dela zrelog žutog tela. **A)** Kontrolne; **B)** Estradiolom; **C)** Genisteinom i **D)** Daidzeinom tretirane aciklične ženke pacova starosti 13 meseci. H&E, bar 10 µm. **Bele strelice**-granuloza luteinske ćelije.

#### 4.2.2.3. Stereološke i morfometrijske karakteristike ovarijuma acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima

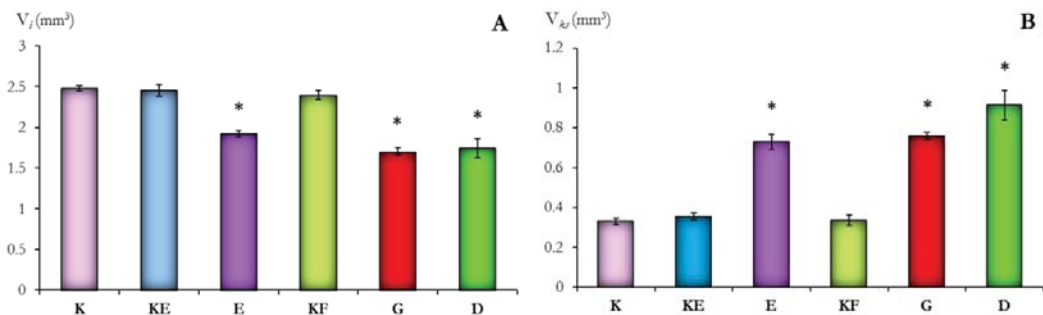
##### **Volumen i volumenske gustine**

Nakon E tretmana, apsolutni volumen ovarijuma se statistički značajno povećao (7.1%;  $p < 0.05$ ) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (Histogram 7A). Volumen folikularnog parenhima je nepromenjen (Histogram 7B), dok vrednosti volumena ovarijalne strome beleže smanjenje za 5.7% ( $p < 0.05$ ; Histogram 7C). Dodatno, stereološkom analizom osnovnih faza ovarijalne strome (intersticijuma i krvnih sudova) zapaža se da je tretman estradiolom uzrokovao smanjenje volumena intersticijuma (21.7%;  $p < 0.05$ ; Histogram 8A) i povećanje volumena krvnih sudova (97.2%;  $p < 0.05$ ; Histogram 8B). Tretman E izazvao je i statistički značajno povećanje volumena žutih tela za 26.4% ( $p < 0.05$ ; Histogram 7D) u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima.

Aplikacija G nije uzrokovala promene u vrednostima volumena celog ovarijuma u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima (Histogram 7A). Međutim, volumen folikularnog parenhima je statistički značajno povećan (38.3%;  $p < 0.05$ ; Histogram 7B), dok su vrednosti volumena ovarijalne strome smanjene (9.9%;  $p < 0.05$ ; Histogram 7C). Genistein je uticao na smanjenje volumena intersticijuma (28.9%;  $p < 0.05$ ; Histogram 8A), kao i na povećanje volumena krvnih sudova (1.2x;  $p < 0.05$ ; Histogram 8B), dok promene u vrednostima volumena žutih tela nisu zabeležene (Histogram 7D). Nasuprot genisteinu, daidzein je izazvao povećanje volumena ovarijuma (4.1%;  $p < 0.05$ ; Histogram 7A) i volumena folikularnog parenhima (34.6%;  $p < 0.05$ ; Histogram 7B), dok je volumen ovarijalne strome neizmenjen (Histogram 7C). Dodatno, D je izazvao smanjenje volumena intersticijuma (27.2%;  $p < 0.05$ ; Histogram 8A) i povećanje volumena krvnih sudova (1.7x;  $p < 0.05$ ; Histogram 8B) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu.



**Histogram 7.** Volumen **A)** Ovarijuma; **B)** Folikularnog parenhima; **C)** Ovarijalne strome i **D)** Žutih tela u ovarijumima tretiranih i kontrolnih acikličnih životinja. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .



**Histogram 8.** Volumen **A)** Intersticijuma i **B)** Krvnih sudova u ovarijumima tretiranih i kontrolnih acikličnih životinja. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

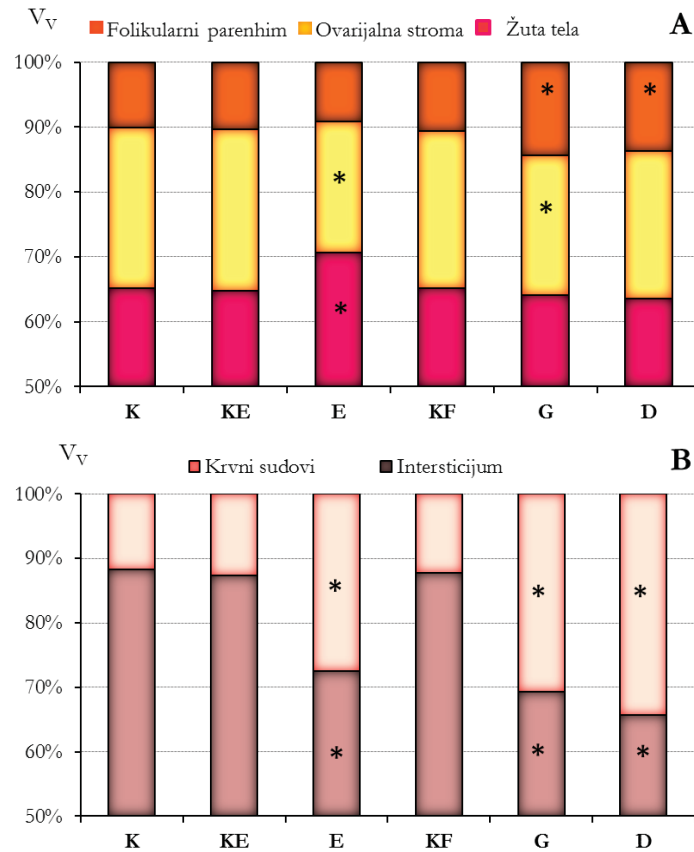
Međusobni odnosi volumenskih gustina folikularnog parenhima, ovarijalne strome i žutih tela u ovarijumima kontrolnih i tretiranih acikličnih ženki predstavljeni su Histogramom 9. Tretman E nije uticao na promenu volumenske gustine folikularnog parenhima.



Sa druge strane, vrednost volumenske gustine ovarijalne strome je statistički značajno povećana (18.7%;  $p < 0.05$ ; Histogram 9A) u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti. Dodatno, E je poremetio odnos volumenskih gustina osnovnih faza ovarijalne strome: intersticijuma i krvnih sudova (Histogram 9B). Procentualna zastupljenost intersticijuma je smanjena (16.9%;  $p < 0.05$ ; Histogram 9B), dok je krvnih sudova povećana (1.2x;  $p < 0.05$ ; Histogram 9B). Takođe, povećana je i volumenska gustina žutih tela (8.9%;  $p < 0.05$ ; Histogram 9A).

Tretmani fitoestrogenima uslovili su statistički značajne promene vrednosti volumenskih gustina folikularnog parenhima i strome. Vrednosti volumenske gustine folikularnog parenhima su u odnosu na kontrole statistički značajno povećane nakon tretmana G (36.4%;  $p < 0.05$ ; Histogram 9A) i D (29.6%;  $p < 0.05$ ; Histogram 9A). Međutim, vrednost volumenske gustine ovarijalne strome je značajno smanjena nakon tretmana G za 11.2% ( $p < 0.05$ ), dok D nije uticao na promenu ovog parametra.

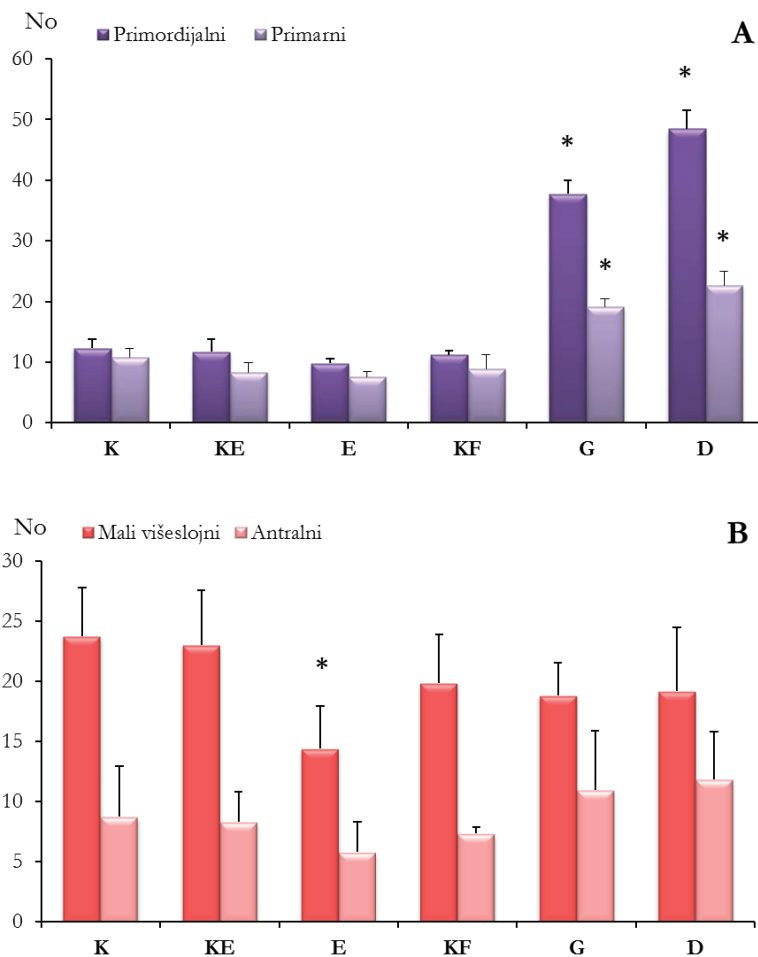
Unutar ovarijalne strome, takođe je zabeležen poremećaj procentulanih odnosa osnovnih gradivnih elemenata. Vrednosti volumenskih gustina intersticijuma su smanjene u G (21.1%;  $p < 0.05$ ; Histogram 9B) i D (25.2%;  $p < 0.05$ ; Histogram 9B) eksperimentalnoj grupi u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti. Sa druge strane, vrednosti volumenskih gustina krvnih sudova su značajno povećane 2.5x ( $p < 0.05$ ; Histogram 9B), odnosno za 1.8x ( $p < 0.05$ ; Histogram 9B). Genistein i daidzein, nisu uticali na promenu volumenske gustine žutih tela (Histogram 9A).



**Histogram 9.** Međusobni odnosi volumenskih gustina **A)** folikularnog parenhima, ovarijalne strome i žutih tela u ovarijumima i **B)** intersticijuma i krvnih sudova u ovarijalnoj stromi, tretiranih i kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

### Broj folikula i žutih tela

Tretman E u ovarijumima acikličnih pacova nije uslovio statistički značajne promene broja zdravih primordijalnih i primarnih folikula (Histogram 10A). Međutim, uzrokovao je statistički značajno povećanje broj atretičnih folikula (Tabela 14), kako primordijalnih (89.9%;  $p < 0.05$ ), tako i primarnih (86.2%;  $p < 0.05$ ).



**Histogram 10.** Ukupan broj zdravih **A)** Primordijalnih i primarnih; **B)** Malih višeslojnih i antralnih folikula u ovarijumima tretiranih i kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

U grupi zdravih malih folikula E je izazvao smanjenje broja svih pojedinačnih klasa, međutim statistički značajno je smanjen samo broj folikula klase **b** za 77.2 % ( $p < 0.05$ ; Tabela 12). Sumirano, E je izazvao značajno smanjenje malih zdravih višeslojnih folikula (46.6%;  $p < 0.05$ ; Histogram 10B), kao i malih višeslojnih atretičnih folikula (20.3%;  $p < 0.05$ ; Tabela 15) u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti. U grupi antralnih folikula (Tabela 13), nakon E tretmana uočeno je značajno smanjenje broja folikula klase **I** (90.7%;  $p < 0.05$ ) i klase **V** (40.7%;  $p < 0.05$ ). Sumirano, broj zdravih antralnih folikula je

nepromenjen (Histogram 10B), dok je broj atretičnih antralnih folikula povećan (71.7%;  $p < 0.05$ ) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Tabela 14). Dodatno, E je uzrokovao povećanje broja zrelih (4.1x;  $p < 0.05$ ) i regresivnih (93.1%;  $p < 0.05$ ) žutih tela, što je rezultiralo povećanjem ukupnog broja žutih tela 1.4x ( $p < 0.05$ ) u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti (Tabela 15).

**Tabela 12.** Broj pojedinačnih klasa malih zdravih višeslojnih folikula u ovarijumima tretiranih i kontrolnih acikličnih ženki pacova.

GRUPA	ZDRAVI Mali višeslojni folikuli			
	Va	Vb	Vc	Vd
<b>K</b>	5.1±2.7	11.2±3.3	5.1±1.4	4.5±3.6
<b>KE</b>	4.7±1.2	12.3±3.1	5.2±1.1	6.1±2.6
<b>E</b>	3.2±1.3	<b>2.8±0.8*</b>	3.4±1.3	5.2±3.2
<b>KF</b>	4.5±0.8	5.3±3.4	4.3±2.1	3.7±1.9
<b>G</b>	5.7±1.4	4.3±1.5	4.1±1.7	4.7±1.4
<b>D</b>	4.2±0.9	5.3±1.5	4.5±1.9	5.3±2.9

Rezultati su prikazani kao SV±SD;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

**Tabela 13.** Broj pojedinačnih klasa velikih zdravih antralnih folikula u ovarijumima tretiranih i kontrolnih acikličnih ženki pacova.

GRUPA	ZDRAVI Antralni folikuli				
	I	II	III	IV	V
<b>K</b>	4.8±0.9	1.1±0.8	0.5±0.0	1.1±0.6	2.5±0.6
<b>KE</b>	4.3±1.1	1.1±0.7	0.4±0.2	0.3±0.3	2.7±0.4
<b>E</b>	<b>0.4±0.4*</b>	1.1±0.6	0.9±0.4	0.8±0.5	<b>1.6±0.5*</b>
<b>KF</b>	2.8±0.9	2.3±0.9	0.3±0.3	0.8±0.6	1.1±0.8
<b>G</b>	4.1±0.8	1.1±0.5	1.1±0.5	1.4±0.7	3.4±1.2
<b>D</b>	2.8±0.9	1.7±0.7	0.7±0.4	2.3±1.1	3.7±1.5

Rezultati su prikazani kao SV±SD;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

Nakon poređenja sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima, ustanovljeno je da je broj primordijalnih folikula G i D grupe životinja statistički značajno povećan 3.3x ( $p < 0.05$ ), odnosno 2.2x ( $p < 0.05$ ; Histogram 10A). Takođe, broj primarnih folikula beleži povećanje 1.2x ( $p < 0.05$ ) u G, odnosno 1.6x ( $p < 0.05$ ) u D eksperimentalnoj grupi (Histogram 10A). Sa druge strane, G i D nisu uticali na promenu broja atretičnih primordijalnih folikula, ali je zabeleženo statistički značajno smanjenje broja atretičnih primarnih folikula za 32.6% ( $p < 0.05$ ), odnosno 23.5% ( $p < 0.05$ ; Tabela 14).

Tretmani fitoestrogenima nisu uticali na promenu broja pojedinačnih klasa malih zdravih višeslojnih folikula (Tabela 12). Ukoliko sumiramo njihov broj i uporedimo sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima, statistički značajne promene izostaju (Histogram 10B). Takođe, brojnost atretičnih malih višeslojnih folikula nije izmenjena (Tabela 14). U ovarijumima acikličnih ženki tretiranih fitoestrogenima nije uočena statistički značajna promena bilo koje od pojedinačnih klasa zdravih antralnih folikula (Tabela 13).

Dodatno, nakon sumiranja, zapaža se da je G imao trend povećanja broja zdravih antralnih folikula (Histogram 10B). Ovo povećanje praćeno je smanjenjem broja atretičnih antralnih folikula (22.6%;  $p < 0.05$ ; Tabela 14). Daidzein je delovao na isti način, uslovio je povećanje sume zdravih antralnih folikula, koje nije statistički značajno (Histogram 10B) i smanjenje broja atretičnih folikula za 32.3% ( $p < 0.05$ ; Tabela 15). Statistički značajne promene brojnosti pojedinačnih klasa i ukupnog broja žutih tela nisu uočene nakon aplikacije G (Tabela 15), dok je aplikacija D uzrokovala povećanje broja zrelih žutih tela za 86.8% ( $p < 0.05$ ), što je uticalo i na povećanje ukupnog broja žutih tela za 33.7% ( $p < 0.05$ ; Tabela 15).

**Tabela 14.** Broj atretičnih primordijalnih, primarnih, malih višeslojnih i antralnih folikula u ovarijumima tretiranih i kontrolnih acikličnih ženki pacova.

GRUPA	ATRETIČNI folikuli			
	Primordijalni	Primarni	Mali višeslojni	Antralni
<b>K</b>	9.1±0.8	14.7±1.3	13.2±1.4	11.7±1.2
<b>KE</b>	8.9±1.2	11.6±3.1	12.3±1.1	10.6±1.6
<b>E</b>	<b>16.9±1.3*</b>	<b>21.6±0.8*</b>	<b>9.8±1.1*</b>	<b>18.2±3.2*</b>
<b>KF</b>	8.3±0.6	13.2±1.2	12.2±2.1	9.3±0.8
<b>G</b>	9.2±1.4	<b>8.9±1.5*</b>	11.1±1.7	<b>7.2±0.6*</b>
<b>D</b>	9.7±0.9	<b>10.1±1.5*</b>	10.2±1.9	<b>6.3±0.9*</b>

Rezultati su prikazani kao SV±SD; p<0.05, \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

**Tabela 15.** Broj pojedinačnih klasa i ukupnan broj žutih tela u ovarijumima tretiranih i kontrolnih acikličnih ženki pacova.

GRUPA	ŽUTA TELA (CL)			
	mlada	zrela	regresivna	Σ
<b>K</b>	3.7±0.2	3.5±0.4	2.8±0.4	10.1±0.9
<b>KE</b>	3.6±0.3	3.5±0.3	2.9±0.3	10.2±0.3
<b>E</b>	4.4±0.5	<b>14.4±0.9*</b>	<b>5.6±0.6*</b>	<b>24.3±2.5*</b>
<b>KF</b>	3.8±0.4	3.8±0.4	3.1±0.3	10.7±0.8
<b>G</b>	3.8±0.3	4.4±0.5	2.8±0.5	11.1±1.3
<b>D</b>	4.1±0.3	<b>7.1±0.5*</b>	2.7±0.4	<b>14.3±1.1*</b>

Rezultati su prikazani kao SV±SD; p<0.05, \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

### Numerička gustina folikula i žutih tela

Numerička gustina je relativna stereološka veličina koja u međusobni odnos stavlja broj folikula i žutih tela, i volumen ovarijuma.

Tretman E u ovarijumima acikličnih ženki pacova uzrokovao je statistički značajna smanjenja vrednosti numeričkih gustina zdravih primordijalnih (33%; p<0.05; Tabela 16), primarnih (21.6%; p<0.05; Tabela 16) i ukupnog broja malih višeslojnih folikula (49.3%; p<0.05; Tabela 17). Statistički značajna povećanja uočena su i u vrednostima numeričkih gustina atretičnih primordijalnih (61.3%; p<0.05; Tabela 16) i primarnih (60.2%; p<0.05; Tabela 16) folikula. Međutim, E je izazvao statistički značajno smanjenje (34.8%; p<0.05;

Tabela 17) sume malih višeslojnih atretičnih folikula, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima. Tretman E, nije uticao na promenu vrednosti numeričke gustine sume zdravih i atretičnih antralnih folikula (Tabela 17). Nakon E tretmana, uočeno je značajno povećanje vrednosti numeričke gustine zrelih (88.1%;  $p < 0.05$ ) i regresivnih (65.4%;  $p < 0.05$ ) žutih tela, što rezultira i u statistički značajnom povećanju vrednosti numeričke gustine ukupnog broja žutih tela za 46.4% ( $p < 0.05$ ; Tabela 18).

**Tabela 16.** Vrednosti numeričkih gustina zdravih i atretičnih primordijalnih i primarnih folikula, tretiranih i kontrolnih acikličnih ženki pacova.

GRUPA	Numeričke gustine folikula (No/mm <sup>3</sup> )			
	Primordijalni		Primarni	
	Zdravi	Atretični	Zdravi	Atretični
<b>K</b>	1.11±0.13	0.88±0.10	0.76±0.12	1.3±0.08
<b>KE</b>	1.12±0.17	0.8±0.21	0.74±0.12	1.03±0.13
<b>E</b>	<b>0.75±0.06*</b>	<b>1.29±0.06*</b>	<b>0.58±0.07*</b>	<b>1.65±0.18*</b>
<b>KF</b>	1.09±0.07	0.74±0.04	0.78±0.19	1.17±0.25
<b>G</b>	<b>3.36±0.19*</b>	<b>0.82±0.09*</b>	<b>1.68±0.12*</b>	<b>0.78±0.12*</b>
<b>D</b>	<b>4.17±0.25*</b>	<b>0.84±0.07*</b>	<b>1.94±0.19*</b>	<b>0.85±0.07*</b>

Rezultati su prikazani kao SV±SD;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

**Tabela 17.** Vrednosti numeričkih gustina ukupnog broja zdravih i atretičnih malih višeslojnih i velikih, antralnih folikula, tretiranih i kontrolnih acikličnih ženki pacova.

GRUPA	Numeričke gustine folikula (No/mm <sup>3</sup> )			
	Mali višeslojni		Antralni	
	Zdravi	Atretični	Zdravi	Atretični
<b>K</b>	2.17±0.35	1.17±0.08	0.86±0.34	1.02±0.44
<b>KE</b>	2.19±0.43	1.09±0.19	0.74±0.21	0.95±0.33
<b>E</b>	<b>1.11±0.48*</b>	<b>0.74±0.10*</b>	0.44±0.18	1.37±0.19
<b>KF</b>	1.81±0.45	1.09±0.14	0.75±0.19	0.88±0.17
<b>G</b>	1.65±0.23	1.42±0.22	0.97±0.44	0.63±0.13
<b>D</b>	1.64±0.46	0.86±0.31	1.01±0.34	0.64±0.10

Rezultati su prikazani kao SV±SD;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

**Tabela 18.** Vrednosti numeričkih gustina pojedinačnih klasa i ukupnog broja ( $\Sigma$ ) žutih tela, tretiranih i kontrolnih acikličnih ženki pacova.

GRUPA	Numeričke gustine žutih tela (CL) (No/mm <sup>3</sup> )			
	Mlada	Zrela	Regresivna	$\Sigma$
<b>K</b>	0.46±0.04	0.51±0.04	0.24±0.04	1.21±0.08
<b>KE</b>	0.41±0.04	0.59±0.11	0.26±0.08	1.27±0.05
<b>E</b>	0.33±0.06	<b>1.11±0.09*</b>	<b>0.43±0.08*</b>	<b>1.86±0.12*</b>
<b>KF</b>	0.43±0.06	0.53±0.05	0.36±0.07	1.31±0.10
<b>G</b>	0.33±0.03	0.51±0.04	0.22±0.04	1.06±0.18
<b>D</b>	0.35±0.06	0.61±0.13	0.21±0.07	1.18±0.21

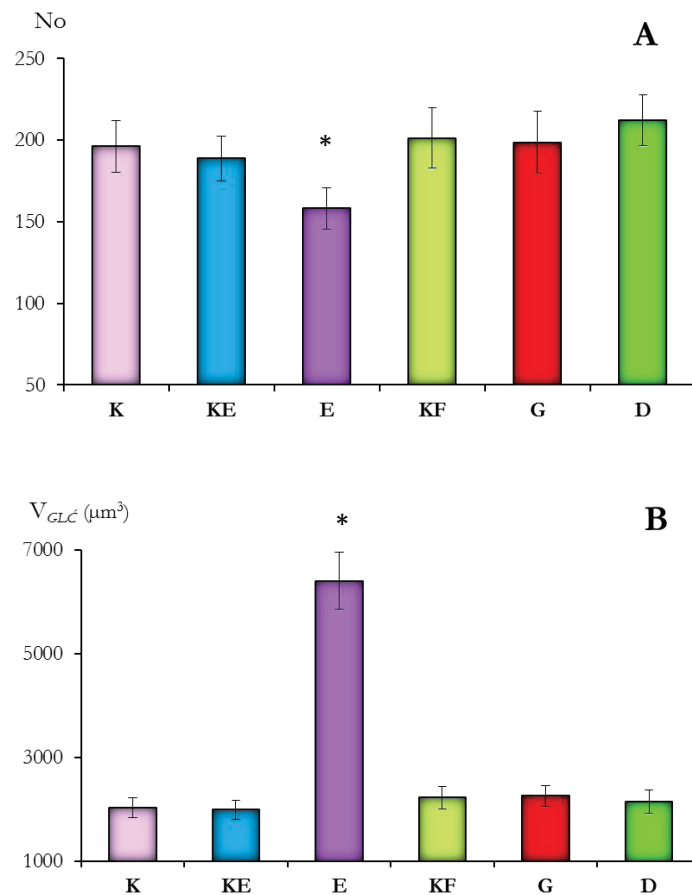
Rezultati su prikazani kao SV±SD; p<0.05, \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

Tretman G uslovio je statistički značajno povećanje vrednosti numeričke gustine zdravih primordijalnih (3x; p<0.05) i primarnih (2.2x; p<0.05) folikula u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti. Daidzein je takođe izazvao povećanje vrednosti numeričke gustine zdravih primordijalnih (3.8x; p<0.05) i primarnih (2.5x; p<0.05) folikula. Međutim, vrednosti numeričkih gustina atretičnih primordijalnih i primarnih folikula su značajno smanjene nakon oba tretmana. U G eksperimentalnoj grupi zabeleženo je smanjenje atretičnih primordijalnih folikula za 10.8% (p<0.05), odnosno atretičnih primarnih za 33.2% (p<0.05), dok smanjenje istih parametara u D grupi iznosi 13.5% (p<0.05), odnosno 27.3% (p<0.05; Tabela 16). Tretmani fitoestrogenima, nisu izazvali statistički značajne promene vrednosti numeričkih gustina sume zdravih i atretičnih malih višeslojnih i antralnih folikula, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima (Tabela 17). Takođe u ovarijumima acikličnih ženki pacova, vrednosti numeričkih gustina žutih tela, kako po klasama, tako i nakon sumiranja nisu izmenjene u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Tabela 18).



### Broj i volumen granulosa luteinskih ćelija u zrelim žutim telima

Na Histogramu 11A predstavljen je broj granulosa luteinskih ćelija, izražen po zreloom žutom telu u ovarijumima acikličnih ženki pacova kontrolnih i tretiranih životinja. Poređenjem i utvrđivanjem statističke značajnosti zapaža se da je E značajno smanjio broj (16.2%;  $p < 0.05$ ) granulosa luteinskih ćelija. Paralelno sa smanjenjem broja, tretman E uzrokovao je statistički značajno povećanje volumena granulosa luteinskih ćelija 3.2x ( $p < 0.05$ ; Histogram 11B). Tretmani fitoestrogenima nisu uzrokovali promene ovih parametara (Histogram 11A i B).



**Histogram 11.** Granuloza luteinske ćelije u zrelim žutim telima **A)** Broj i **B)** Volumen. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

### 4.2.3. Promene u uterusu acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima

#### 4.2.3.1. Apsolutne i relativne mase uterusa

Rezultati dobijeni merenjem apsolutne i relativne mase uterusa acikličnih ženki, uzrasta od 13 meseci prikazane su u Tabeli 19.

**Tabela 19.** Prosečne telesne mase, apsolutne i relativne mase uterusa kontrolnih i tretiranih acikličnih ženki pacova.

GRUPA	Masa uterusa (g)	
	Apsolutna (g)	Relativna (%)
<b>K</b>	0.57 ± 0.04	0.17 ± 0.02
<b>KE</b>	0.58 ± 0.04	0.18 ± 0.01
<b>E</b>	<b>5.49 ± 0.6 *</b>	<b>1.71 ± 0.47 *</b>
<b>KF</b>	0.61 ± 0.05	0.20 ± 0.01
<b>G</b>	<b>0.84 ± 0.06*</b>	<b>0.28 ± 0.03*</b>
<b>D</b>	0.63 ± 0.05	0.20 ± 0.02

Rezultati su prikazani kao SV±SD; p<0.05, \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. n=6.

Iz Tabele 19 uočava se da između intaktne kontrolne grupe (K) i grupa kojima je aplikovano maslinovo ulje (KE) i smeša maslinovog ulja i apsolutnog etanola (KF) nije bilo statistički značajnih razlika u telesnim masama, apsolutnim i relativnim masama uterusa što ukazuje da pomenuti rastvarači nisu uticali na rezultate, i da se promene mogu pripisati delovanju ispitivanih supstanci.

Životinje tretirane E, imale su veće vrednosti apsolutne i relativne mase uterusa 9.5x (p<0.05) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu životinja.

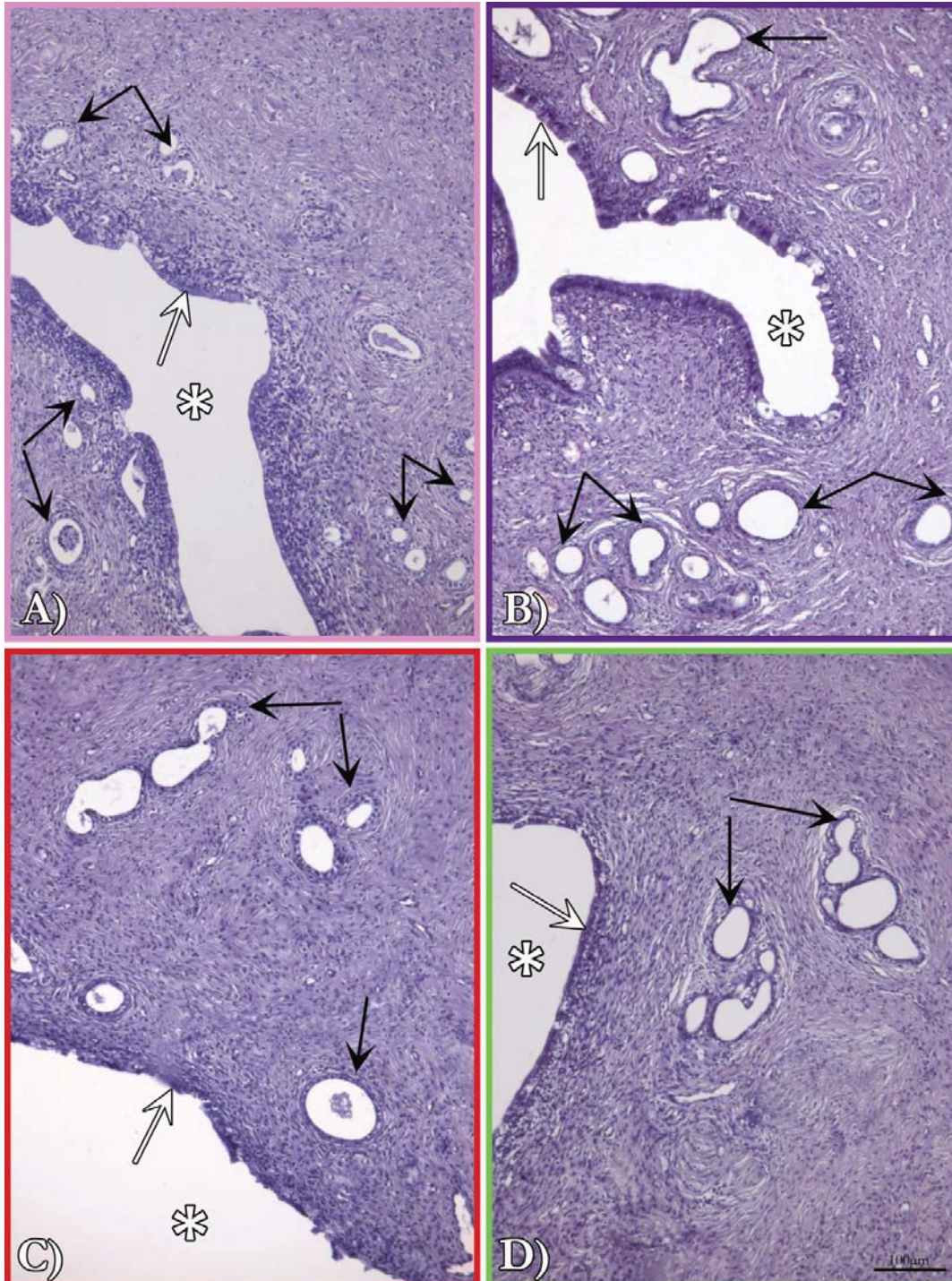
Genistein je uzrokovao statistički značajno povećanje apsolutne i relativne mase uterusa za 40.9% (p<0.05) u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima, dok D tretman nije izazvao promenu ovih parametara.

#### 4.2.3.2. Histološke karakteristike uterusa acikličnih pacova

Histološkom analizom uterusa kontrolnih ženki pacova, kako intaktnih, tako i onih koje su primale maslinovo ulje ili smešu maslinovog ulja i etanola, nije primećena razlika u histološkoj građi i organizaciji, stoga je prikazana histološka slika uterusa intaktnih acikličnih ženki pacova (Slika 23A). U uterusima acikličnih ženki pacova zapaža se inaktivni, jednoslojni kuboidealni epitel endometrijuma koji okružuje lumen, a u endometrijalnoj stromi uočavaju se žlezde (Slika 23A).

Nakon tretmana E ćelije površinskog endometrijalnog epitela su znatno veće, cilindričnog oblika sa bazalno postavljenim jedrom, pri čemu bazalni delovi ćelije poprimaju vakuoliziran izgled. Takođe se u stromi uočavaju brojne endometrijalne žlezde (Slika 23B).

Tretmani fitoestrogenima nisu usloveli promene opšte histološke slike uterusa acikličnih ženki pacova u poređenju sa kontrolnim (Slika 23C i D).

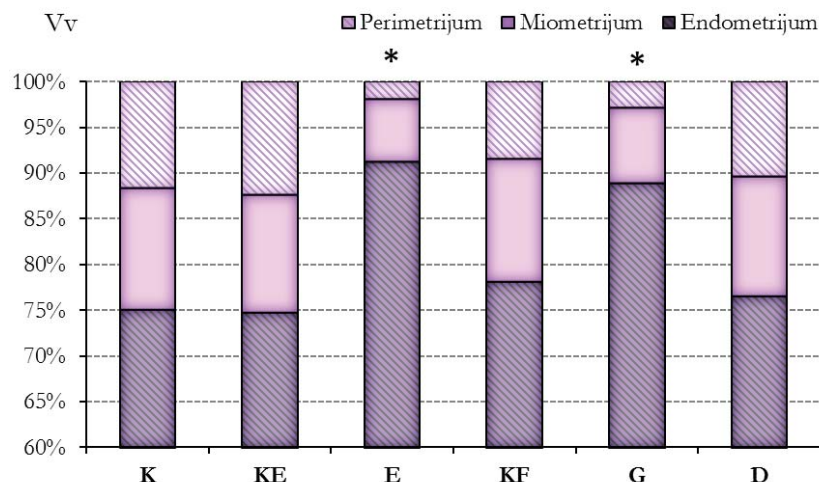


**Slika 23.** Poprečni preseki centralnog dela uterusa. **A)** Kontrolne; **B)** Estradiolom; **C)** Genisteinom i **D)** Daidzeinom tretirane aciklične ženke pacova starosti 13 meseci. H&E, bar 100  $\mu\text{m}$ . **Bele zvezdice**-lumen uterusa; **Crna strelica**-površinski, jednoslojni cilindrični epitel endometrijuma; **Bela strelica**- endometrijalne žlezde.

#### 4.2.3.3. Stereološki i morfometrijske karakteristike uterusa acikličnih pacova

##### Volumenske gustine

Međusobni odnosi volumenskih gustina endometrijuma ( $V_{V_E}$ ), miometrijuma ( $V_{V_M}$ ) i perimetrijuma ( $V_{V_P}$ ) u uterusima kontrolnih i tretiranih acikličnih ženki pacova predstavljani su Histogramom 12. U poređenju sa kontrolnim vrednostima, hronični tretman estradiolom uzrokovao je povećanje  $V_{V_E}$  za 13.1% ( $p < 0.05$ ), koje je praćeno statistički značajnim smanjenjima  $V_{V_M}$  (38.6%;  $p < 0.05$ ) i  $V_{V_P}$  (63.5%;  $p < 0.05$ ). Nakon aplikacije genisteina,  $V_{V_E}$  je povećana za 13.7% ( $p < 0.05$ ), dok su  $V_{V_M}$  i  $V_{V_P}$  smanjene za 31.1% ( $p < 0.05$ ), odnosno 77.7% ( $p < 0.05$ ). Tretman daidzeinom nije uslovio statistički značajne promene volumenskih gustina u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti.



**Histogram 12.** Međusobni odnosi i vrednosti volumenskih gustina endometrijuma, miometrijuma i perimetrijuma u uterusima kontrolnih i tretiranih acikličnih ženki pacova. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

Vrednosti volumenskih gustina endometrijalnog epitela ( $V_{V_{EE}}$ ) i endometrijalnih žlezda ( $V_{V_{EZ}}$ ) prikazane su u Tabeli 20. Tretman E uzrokovao je povećanja  $V_{V_{EE}}$  (78.3%;  $p < 0.05$ ) i  $V_{V_{EZ}}$  (98.5%;  $p < 0.05$ ) u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima.

Tretmani G i D nisu statistički značajno uticali na promene volumenskih gustina endometrijalnog epitela i žlezda (Tabela 20).

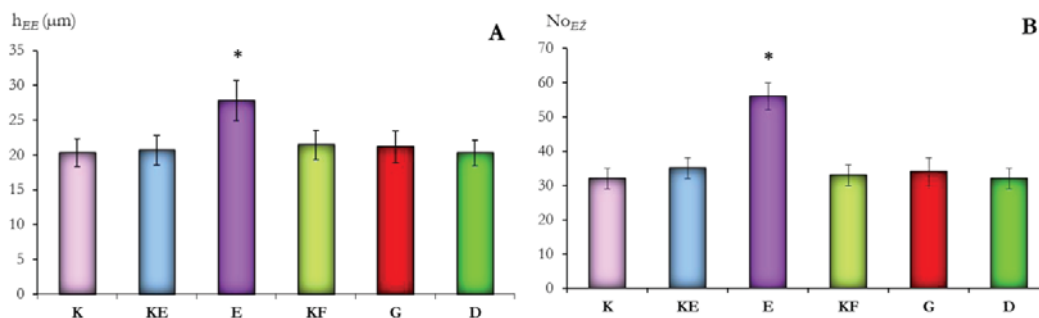
**Tabela 20.** Vrednosti volumenskih gustina endometrijalnog epitela i endometrijalnih žlezda u uterusu kontrolnih i tretiranih acikličnih ženki pacova.

GRUPA	Volumenske gustine (%)	
	endometrijalni epitel $V_{VE}$	endometrijalne žlezde $V_{EŽ}$
K	7.2 ± 0.6	6.6 ± 0.8
KE	6.9 ± 0.6	6.8 ± 0.9
E	12.3 ± 1.1 *	13.5 ± 0.9 *
KF	6.8 ± 0.8	6.7 ± 0.8
G	7.1 ± 1.1	7.2 ± 0.9
D	7.5 ± 0.9	7.4 ± 1.1

Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

#### 4.9.3.2. Visina površinskog epitela endometrijuma i broj endometrijalnih žlezda

Nakon poređenja sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima ustanovljeno je da je visina površinskog epitela endometrijuma ( $h_{EE}$ ) nakon tretmana E statistički značajno povećana za 34.4% ( $p < 0.05$ ; Histogram 13A), kao i broj endometrijalnih žlezda (59.8%;  $p < 0.05$ ; Histogram 13B). Tretmani G i D nisu uticali na promenu ovih parametara (Histogram 13 A i B).



**Histogram 13.** Morfometrijski parametri. **A)** Visina površinskog epitela endometrijuma ( $h_{EE}$ ); **B)** Broj endometrijalnih žlezda ( $No_{EŽ}$ ) u uterusu tretiranih i kontrolnih acikličnih ženki pacova. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

#### 4.2.3.4. Imunocitohemijske karakteristike estrogenskih i progesteronskog receptora i analiza njihove relativne genske ekspresije u uterusu acikličnih ženki pacova

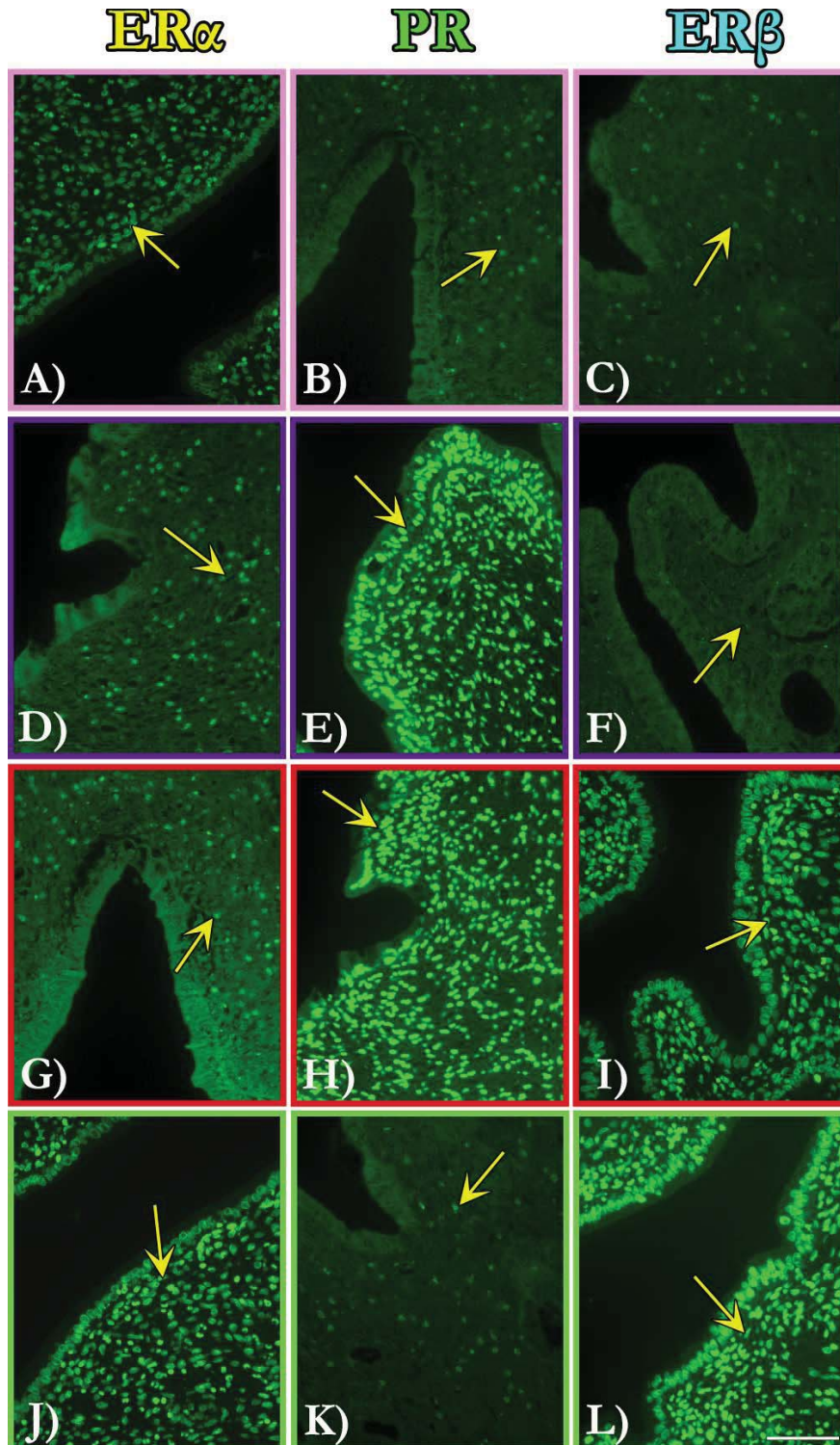
U ćelijama endometrijuma jasno se uočavaju imunoobeleženi ER $\alpha$  (Slika 24A) i PR (Slika 24B), dok je intenzitet IF obeleženog ER $\beta$  slab (Slika 24C). Hroničan E tretman uzrokovao je smanjenje intenziteta signala ER $\alpha$  (Slika 24D), koje je praćeno povećanjem intenziteta signala PR (Slika 24E), dok je intenzitet obojenosti ER $\beta$  nepromenjen (Slika 24F).

Na sličan način, delovao je i G tretman (smanjen intenzitet IF signala ER $\alpha$  (Slika 24G), praćen povećanjem intenziteta PR (Slika 24H). Međutim, G je izazvao i povećanje IF signala ER $\beta$  (Slika 24I), u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 24C). Na promenu intenziteta signala ER $\alpha$  (Slika 24J) i PR (Slika 24K) hroničan tretman D nije uticao, dok je IF signal ER $\beta$  (Slika 24L), povećan.

Nakon E tretmana vrednosti iRNK za ER $\alpha$  u uterusima acikličnih ženki pacova su statistički značajno smanjene 59.4% ( $p < 0.05$ ; Histogram 14A). Ovo smanjenje praćeno je povećanjem vrednosti iRNK za PR od 1.5x ( $p < 0.05$ ; Histogram 14B), dok ekspresija ER $\beta$  nije promenjena.

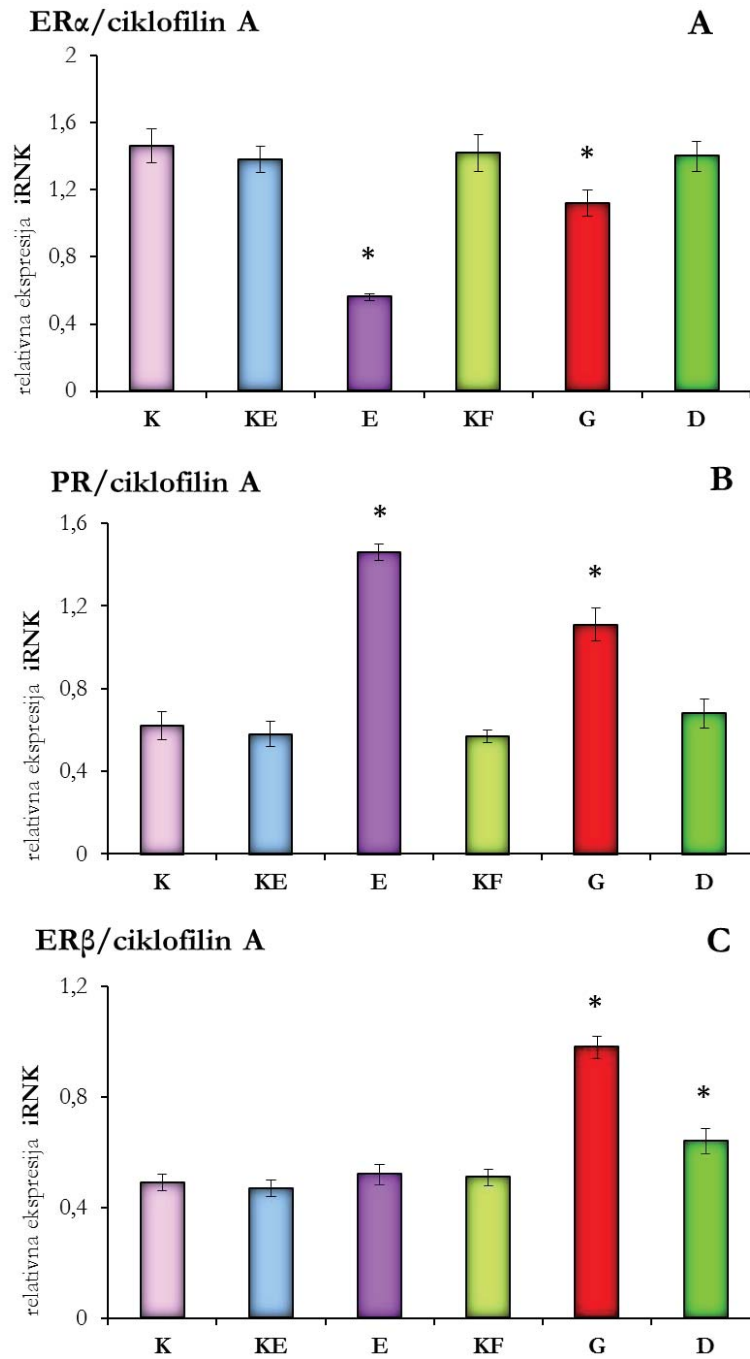
Tretman G uzrokovao je smanjenje relativne ekspresije ER $\alpha$  za 21.1% ( $p < 0.05$ ; Histogram 14A), povećanje nivoa ekspresije PR za 94.7% ( $p < 0.05$ ; Histogram 14B), kao i povećanje nivoa ekspresije ER $\beta$  za 92.2% ( $p < 0.05$ ; Histogram 14C).

Daidzein nije uticao na promenu relativne ekspresije ER $\alpha$  (Histogram 14A), kao ni na promenu ekspresije PR (Histogram 14B). Međutim, statistički značajno povećanje (za 25.5%;  $p < 0.05$ ; Histogram 14C) zabeleženo je u vrednostima iRNK za ER $\beta$ .



**Slika 24.** Imunofluorescentno obeležen ER $\alpha$ , PR i ER $\beta$  u ćelijama endometrijuma. **A-C)** Kontrolne; **D-F)** Estradiolom; **G-I)** Genisteinom i **J-L)** Daidzeinom tretirane aciklične ženke pacova starosti 13 meseci. Bar 50  $\mu$ m.





**Histogram 14.** “Real-time” PCR analiza iRNK za A) ER $\alpha$ ; B) PR i C) ER $\beta$  u uterusu tretiranih i kontrolnih acikličnih ženki pacova. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \*između odgovarajućih kontrolnih i eksperimentalnih grupa.  $n=6$ .

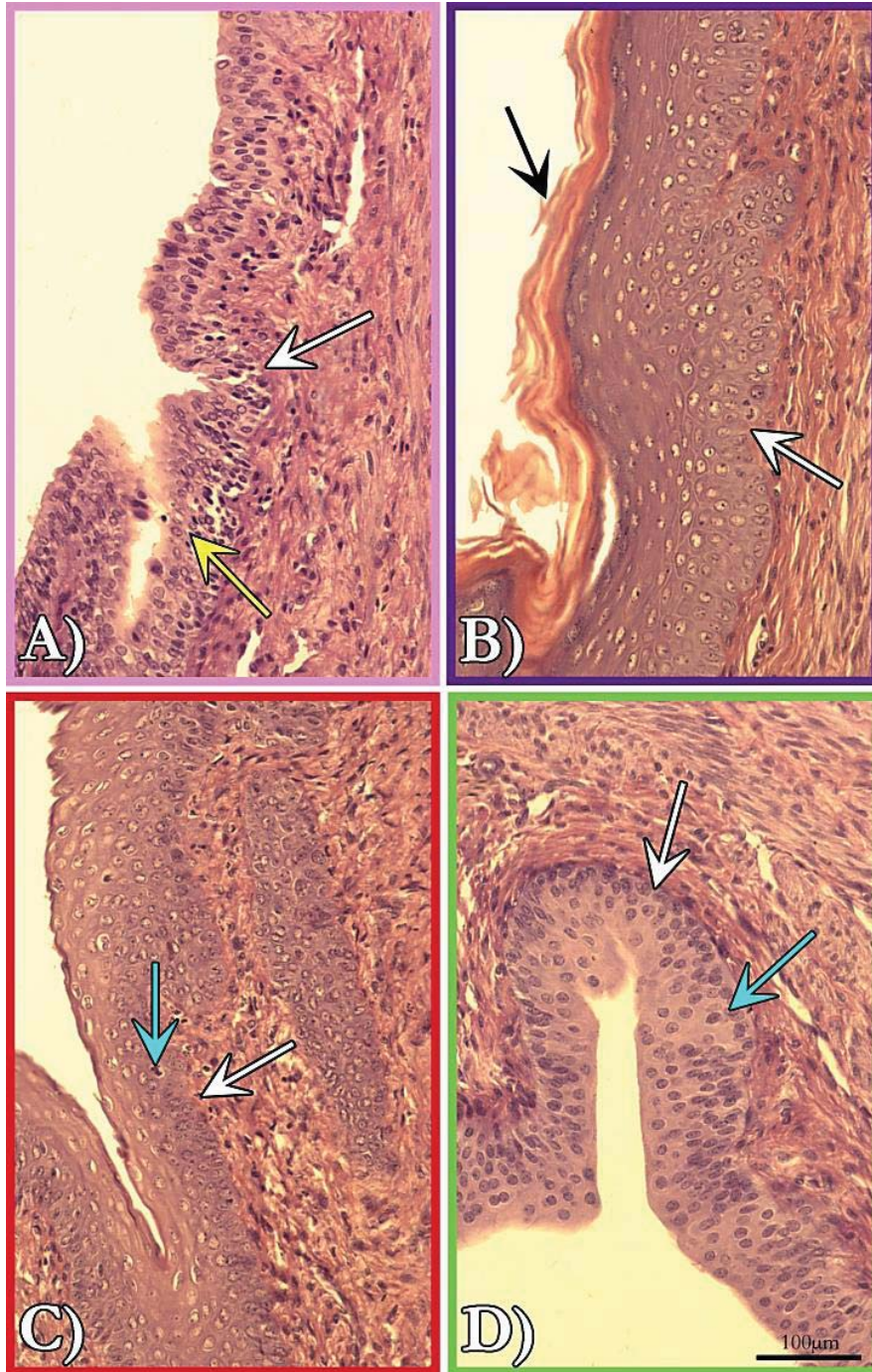
#### **4.2.4. Promene morfologije vaginalnog epitela acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima**

##### **4.2.4.1. Histološke karakteristike vaginalnog epitela acikličnih ženki pacova nakon tretmana estradiolom i fitoestrogenima**

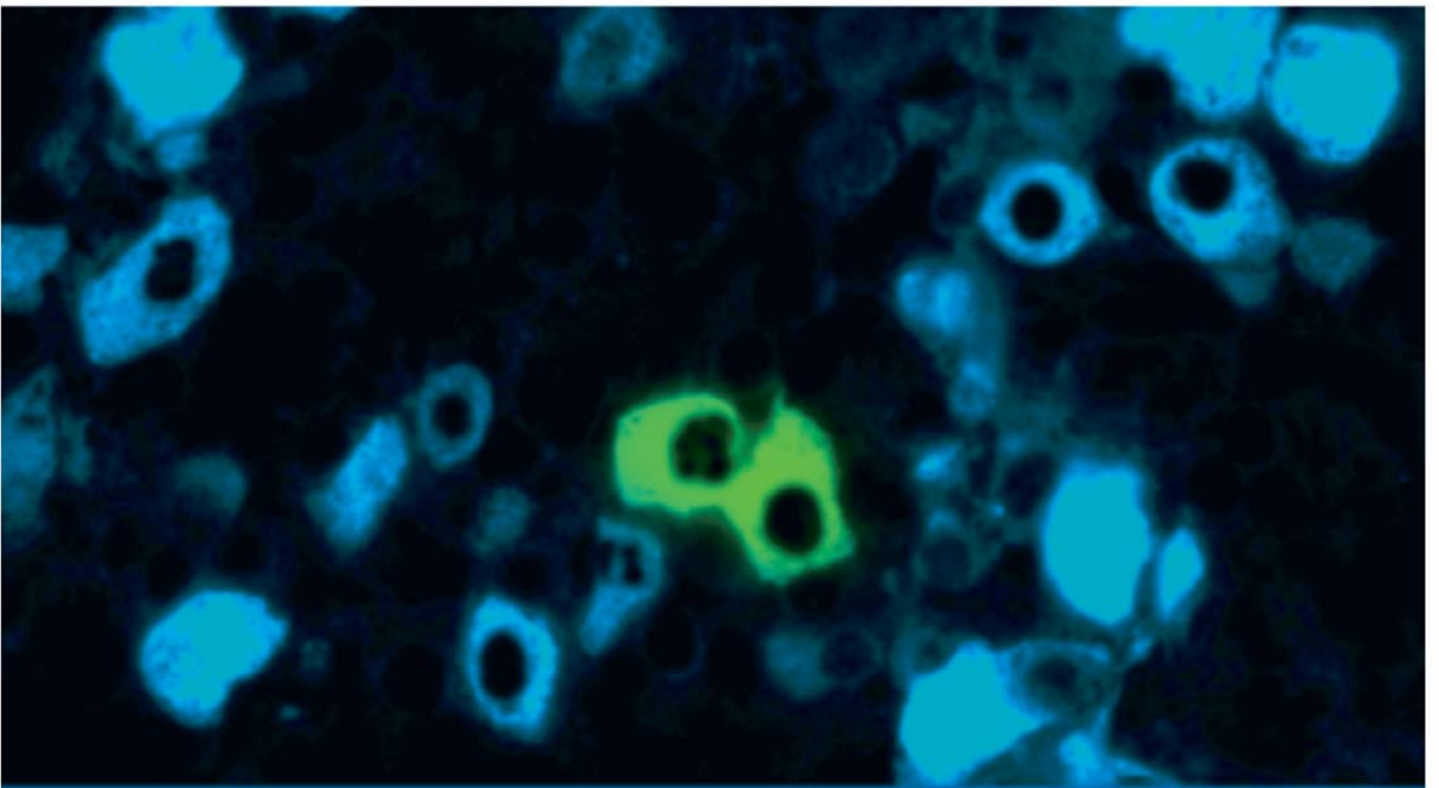
Histološkom analizom vagina kontrolnih ženki pacova, kako intaktnih, tako i onih koje su primale maslinovo ulje ili smešu maslinovog ulja i etanola, nije primećena razlika u histološkoj građi i organizaciji. Stoga je prikazana histološka slika vagina intaktnih acikličnih ženki pacova. Epitel vagine je pločast i slojevit bez orožavanja i čine ga od 3-7 slojeva ćelija (Slika 25A). U osnovi se nalazi *stratum basale* kog čini jedan sloj kolumnarnih ćelija, dok površinski sloj, *stratum spinosum*, gradi nekoliko slojeva polihedralnih ćelija. U epitelnim ćelijama mogu se uočiti brojna piknotična jedra.

Tretman E uzrokovao je hiperplaziju ćelija površinskog epitela vagine, praćenu deskvamacijom (Slika 25B).

Promena opšte histološke slike vaginalnog epitela nije zapažena nakon tretmana fitoestrogenima, genisteinom (Slika 25C) i daidzeinom (Slika 25D) u poređenju sa kontrolnim presecima (Slika 25A), međutim detaljnom analizom uočava se odsustvo piknotičnih jedara, dok se mogu zapaziti ćelije u mitozu (Slika 25C i D).



**Slika 25.** Poprečni preseki vagine. **A)** Kontrolne; **B)** Estradiolom; **C)** Genisteinom i **D)** Daidzeinom tretirane aciklične ženke pacova starosti 13 meseci. H&E, bar 100 µm. H&E, bar 100 µm. **Bela strelica**-površinski pseudoslojeviti pločasti epitel vagine. **Žuta strelica**-piknotična jezra; **Crna strelica**-hiperplazija površinskog epitela, praćena deskvamacijom ćelija; **Plava strelica** -mitoze.



## DISKUSIJA

## 5.1. UTEROTROFNI ESEJ I OSETLJIVOST ORGANA REPRODUKTIVNOG SISTEMA NA FITOESTROGENE

---

Izučavanje egzogenih materija koje pokazuju estrogensku aktivnost je od izuzetnog interesa jer one “imitiraju”, blokiraju ili na neki drugi način utiču na funkciju endogenog estrogena. Jedan od *in vivo* metoda za identifikaciju estrogenskih agonista i antagonista je uterotrofni esej na glodarima (OECD, 2007). Uterotrofnom probom se određuje gravimetrički porast uterusa kao odgovor na aplikaciju supstanci čije se potencijalno estrogensko delovanje ispituje.

Animalni modeli u kojima se ispituje da li neka supstanca ima estrogensko ili antiestrogensko delovanje, podrazumevaju nizak nivo ili eliminaciju endogenih estrogena. Postoje dva animalna modela koji uključuju ženke glodara. Prvi podrazumeva ispitivanja na polno zrelim ženkama kod kojih je endogeni estrogen eliminisan ovarijektomijom. Drugi podrazumeva ispitivanja na polno nezrelim ženkama (18-21. dana starosti). Trodnevna aplikacija, koja se koristi u uterotrofnom eseju, odgovara prirodnom vremenu neophodnom za porast uterusa kao odgovor na endogene estrogene (Ashby i sar., 1997; Owens i Ashby, 2002). U okviru ove teze, korišćen je animalni model nezrelih ženki pacova. Budući da kako uterus, tako i ostali organi osetljivi na estrogene, u toku života nisu bili izlagani delovanju ovog hormona endogenog porekla, model nezrelih ženki predstavlja najosetljiviji model sistem za ispitivanje potencijalnog estrogenskog delovanja neke supstance.

S obzirom na sve češću upotrebu soje kako u ishrani, tako i u brojnim dodacima ishrani, u delu ove teze uterotrofnom probom ocenjena je estrogenska aktivnost fitoestrogena iz soje i uz ocenu različitih histoloških, imunocitohemijskih i stereološko-morfometrijskih pokazatelja, povećala pouzdanost probe.

Rezultati dobijeni uterotrofnom probom, ukazuju na estrogensku aktivnost genisteina, koja se ogleda u povećanju apsolutne i relativne mase uterusa polno nezrelih pacova nakon trodnevne *s.c.* aplikacije. Povećanje mase uterusa uočeno je kod grupa koje su dobijale 35 i 50 mg/kg telesne mase dnevno. Nakon aplikacije genisteina u koncentraciji 15 mg/kg telesne mase dnevno, promene nisu uočene, što ukazuje da je granica osetljivosti uterotrofne probe na genistein između 15 i 35 mg. Po istom protokolu, Yamasaki i saradnici (2002) su ukazali na slab, ali značajan porast mase uterusa nakon aplikacije 20 mg genisteina po kg telesne mase dnevno, dok 5 mg/kg telesne mase nije imalo efekat. U ovoj tezi pokazano je da povećanje mase uterusa pokazuje zavisnost od doze aplikovanog genisteina. Sa druge strane, tretman daidzeinom nije uzrokovao značajan porast mase uterusa, koji bi ukazao na njegovu potencijalnu estrogensku aktivnost.

Kao pozitivnu kontrolu koristili smo grupe kojima su aplikovane visoka i niska doza  $17\alpha$ -etinil estradiola. Obe doze estradiola uslovile su značajno povećanje mase uterusa. Ovaj rezultat je u potpunosti u skladu sa rezultatima koje navode Kanno i saradnici (2001).

Povećanje mase uterusa, kao posledica delovanja  $17\alpha$ -etinil estradiola, se zasniva na hipertrofiji ćelija endometrijuma i miometrijuma, što se jasno može uočiti histološkom analizom poprečnih preseka uterusa. Detaljnom histološkom analizom u našem eksperimentu potvrđena je hipertrofija ćelija endometrijuma, miometrijuma, kao i hiperplazija ćelija endometrijalnog epitela, kako nakon aplikacije estradiola, tako i nakon aplikacije visoke i srednje doze genisteina. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima dobijenim određivanjem masa uterusa, jer je porast mase posledica hipertrofije ćelija.

Međutim, povećanje mase uterusa nije zabeleženo nakon aplikacije niske doze genisteina, kao ni jedne od doza daidzeina. Stoga je postojala potreba za primenom novih tehnika u cilju postizanja veće osetljivosti u odnosu na gravimetrički porast uterusa. Za

uvođenje dodatnih pokazatelja u cilju povećanja osetljivosti uterotrofne probe, zalažu se i Newbold i saradnici (2001), kao i Jefferson i saradnici (2002). Pomenuti autori takođe ukazuju na neophodnost proširenja uterotrofne probe primenom imunocitohemijskih i morfoloških pokazatelja, smatrajući da se metode kojima se ovi pokazatelji mogu oceniti, lako mogu ugraditi u samu probu.

Proteini čija se koncentracija u uterusu povećava kao posledica delovanja estrogena mogu se koristiti kao pokazatelji delovanja estrogenih supstanci. Laktoferin je najznačajniji glikoprotein u uterusu miša i pacova (Teng i sar., 2000). Lociran je u epitelnim ćelijama, a njegova količina se menja u zavisnosti od faze estrusnog ciklusa, što se dovodi u vezu sa nivoom estrogena (Walmer i sar., 1992, Kida i sar., 2006). U našim eksperimentalnim uslovima, tretmani kako  $17\alpha$ -etinil estradiolom, tako i visokom i srednjom dozom genisteina, indukovali su sintezu laktoferina u bazolateralnim delovima epitelnih ćelija endometrijuma koja je detektovana imunofluorescencijom. Na ekspresiju laktoferina, nije uticala mala doza genisteina, kao ni jedna od aplikovanih doza daidzeina. Na osnovu činjenice da je laktoferin protein čiju sintezu indukuju estrogeni, rezultati ukazuju na to da je laktoferin osetljiv marker u uterusu i da njegova ekspresija može biti upotrebljena u izučavanju efekta egzogenih estrogena kod različitih vrsta.

Analiza imunofluorescentno obeleženog ER $\alpha$  i PR u uterusima, takođe se može koristiti pri ispitivanju estrogenske aktivnosti supstance. Ova analiza u uterusima nezrelih ženki pacova pokazala je da genistein u visokoj i srednjoj dozi ima efekat estrogenskog agoniste, dok daidzein ni u jednoj od primenjenih doza nije menjao imunofluorescentne karakteristike ER $\alpha$  i PR. Genistein je značajno smanjio nivo relativnog intenziteta fluorescence ER $\alpha$  u svim delovima uterusa, površinskom i žlezdanom epitelu i ćelijama strome. Dodatno, estradiol i genistein uzrokuju povećanje ekspresije receptora za progesteron verovatno direktnim delovanjem na ER $\alpha$ . Međutim, Cotroneo i saradnici

(2001) navode da se i pored značajne uloge ER $\alpha$  u porastu mase uterusa kao odgovor na genistein, mora voditi računa i o mogućoj interakciji sa ER $\beta$ . Veći afinitet vezivanja genisteina za ER $\beta$  u odnosu na ER $\alpha$  (Kuiper i sar., 1997) ukazuje da ER $\beta$  može biti važan element u načinu delovanja genisteina i pored činjenice da genistein ne dovodi do značajne promene ekspresije ER $\beta$  u materici polno nezrelih pacova (Cotroneo i sar., 2001). Pre nego što je i bilo poznato postojanje obe vrste ER, Papa i saradnici (1991) ukazali su na estrogenima indukovanu ekspresiju *c-fos* gena. Nemos i saradnici (2004), navode da je *c-fos* gen sastavni deo mehanizma kojim estrogeni dovode do proliferacije epitelnih ćelija endometrijuma. Međutim, ovi autori ukazuju i na to da estrogeni ne izazivaju ekspresiju *c-fos* gena bez prisustva faktora rasta, što sugerise postojanje većeg broja mehanizama koji kontrolišu proliferaciju i hipertrofiju ćelija uterusa koja su rezultat delovanja estrogena i fitoestrogena. Međutim, promene koje se dešavaju u materici kao posledica delovanja navedenih supstanci nisu vezane samo za proliferaciju ćelija. Ikeda i saradnici (2004) navode da fitoestrogen kumestrol, delujući na ekspresiju familije *Ramp* gena, dovodi do indukcije vazoaktivnih faktora što dalje vodi do značajne mikrovaskularne permeabilnosti i nove vaskularizacije. Hiperemija materice i retencija vode predstavljaju promene vezane za ranu fazu odgovora na estrogene i estrogenske agoniste (Barton i sar., 1998).

U cilju detaljnije ocene estrogenske aktivnosti genisteina i daidzeina koristili smo, kako morfometrijsku, tako i stereološku analizu uterusa nezrelih ženki pacova kontrolnih i grupa koje su primale estradioli i različite doze fitoestrogena. Naime, kada se analiziraju međusobni odnosi, odnosno volumenske gustine osnovnih elemenata uterusa, rezultati nedvosmisleno pokazuju da su obe doze 17 $\alpha$ -etinil estradiola, kao i visoka i srednja doza genisteina povećale volumensku gustinu endometrijuma, praćenu smanjenjem volumenskih gustina miometrijuma i perimetrijuma, dok tretman daidzeinom nije izazvao promene ovog parametra. Dodatno, nakon tretmana 17 $\alpha$ -etinil estradiolom i visokom i srednjom dozom



genisteina, došlo je do povećanja volumenske gustine endometrijalnog epitela, što je posledica povećanja visine epitelnog sloja usled hiperplazije ćelija. Tretmani  $17\alpha$ -etinil estradiolom i visokom i srednjom dozom genisteina povećali su volumenske gustine endometrijalnih žlezda, što je praćeno povećanjem njihovog broja. Međutim, kako na povećanje volumenske gustine, tako i na povećanje broja endometrijalnih žlezda, uticao je i tretman daidzeinom. Navedeni rezultat ukazuje na to da je volumenska gustina endometrijalnih žlezda osetljiv pokazatelj estrogenske aktivnosti, jer su povećanja zabeležena i kod grupa tretiranih daidzeinom, kod kojih nije zabeležen ni jedan do sada ispitivan parametar. Iz rezultata se takođe uočava da promena broja žlezda nije dozno zavisna već da se ili povećava ili ne. Naime, regulacija ćelijskog rasta, može biti odvojena od regulacije ćelijske diferencijacije, što ukazuje na to da je daidzein, aktivirajući različite signalne puteve, nezavisne od vezivanja za  $ER\alpha$ , mogao uticati na povećanje broja žlezda. U skladu sa našim rezultatima povećanje broja endometrijalnih žlezda kod miševa pri tretmanu genisteinom i daidzeinom uočili su Jefferson i saradnici (2002). Naši rezultati ukazuju na to da je uključivanje stereoloških i morfometrijskih analiza neophodno pri ispitivanju estrogenske aktivnosti neke supstance, jer značajno povećavaju osetljivost uterotrofne probe.

Pored uticaja na uterus, estrogen igra važnu ulogu u funkciji ovarijuma (Rosenfeld i sar., 2001). Smatra se da je jedan od odlučujućih faktora da li će folikul podleći atreziji ili ovulirati, upravo količina estrogena koju dati folikul proizvodi. Estrogen stimuliše pojavu receptora za LH na membrani granuloza ćelija (Greenwald i Roy, 1994). Poznato je da estrogen stimuliše proliferaciju granuloza ćelija preantralnih folikula i da i u ovom stadijumu folikulogeze ispoljava antiatretogeno delovanje (Fortune, 2003). S obzirom na gore navedeno, kao i na činjenicu da je dominantna forma ER u granuloza ćelijama folikula  $ER\beta$  (Drummond i Fuller, 2010), tj. receptor za koji fitoestrogeni pokazuju veći afinitet

vezivanja (Pilšakova i sar., 2010), smatrali smo važnim da ispitamo uticaj estradiola, genisteina i daidzeina na histološke i stereološke karakteristike ovarijuma nezrelih pacova.

U našim eksperimentalnim uslovima obe doze  $17\alpha$ -etinil estradiola izazvale su smanjenje volumena ovarijuma. Ovo smanjenje je uzrokovano smanjenjem volumena folikularog parenhima, dok je volumen ovarijalne strome značajno uvećan. Odnos između ove dve osnovne faze ovarijuma je poremećen u korist intersticijuma. Lovren i Pantić (1987, 1989) su, takođe, pokazali smanjenje ovarijuma i hipertrofiju intersticijalnih ćelija nakon tretmana estradiolom, kako u neonatalnom, tako i u juvenilnom i peripubertalnom periodu života. Smanjenje volumena ovarijuma nakon tretmana estradiolom nije izazvalo promene u apsolutnoj i relativnoj masi ovog organa. Objašnjenje za ovaj rezultat se može naći u povećanju intersticijuma u kome se, pored relativno "laganih" intersticijalnih ćelija punih masnih kapi, nalaze i relativno "teški" krvni sudovi. Iako u ovom radu nije kvantifikovano prisustvo krvnih sudova, histološka analiza ovarijuma, kao i podaci iz literature (Lovren i Sekulić, 2000) ukazuju na to da estradiol izaziva njihovu dilataciju. Sa druge strane, visoka i srednja doza genisteina su povećale volumen ovarijuma, pri čemu je značajno povećanje uočeno u volumenu ovarijalne strome. Dodatno, kada se analiziraju odnosi između dve faze ovarijuma, uočava se da je genistein, kao i estradiol, poremetio ovaj odnos u korist intersticijuma. Genistein je imao slabiji efekat na uvećanje intersticijuma u odnosu na estradiol, ali je trend delovanja isti. Kao i kod tretmana estradiolom, promena volumena ovarijuma nakon tretmana genisteinom, nije izazvala promenu apsolutne i relativne mase ovih organa. S obzirom na to da tretmani genisteinom nisu uticali na promenu volumena folikularnog parenhima, a imajući u vidu ekspresiju ER $\beta$  u granulosa ćelijama preantralnih i antralnih folikula, rezultati isključuju mogućnost da je genistein uticao na povećanje volumena ovarijuma preko ER $\beta$ . Međutim, dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost vezivanja genisteina za ER $\alpha$  u intersticijalnim ćelijama ovarijuma, što za

posledicu ima proliferaciju ćelija (Couse i Korach, 1999). Ovi rezultati pokazuju da je, u pogledu volumena ovarijuma, genistein delovao suprotno od estradiola, kao antagonist iako je delovanje na ovarijalnu stromu agonističko. Stoga je razlika u delovanju genisteina i estradiola u izostanku inhibicije folikularnog parenhima nakon tretmana genisteinom (Medigović i sar., 2012b). Dodatno, oni ukazuju na to da je primena stereoloških metoda, kao što je određivanje volumena i volumenskih gustina organa i njihovih osnovnih komponenata, daje jasniju ocenu estrogenske aktivnosti supstance, u odnosu na analizu relativne i apsolutne mase organa. Treba reći, da su promene u vrednostima volumena ovarijuma i ovarijalne strome, dozno zavisne. Dodatno, visoka doza genisteina, ne samo da utiče na promenu volumena i volumenskih gustina ovarijuma i njegovih osnovnih faza, već utiče direktno na proces folikulogeneze. Naime, genistein u koncentraciji od 50 mg/kg telesne mase, inhibira inicijalnu fazu folikulogeneze, smanjujući broj ne samo primordijalnih, već i primarnih folikula. Sa druge strane, estradiol na ovu fazu folikulogeneze deluje stimulatorno, smanjenjem broja primordijalnih, na račun povećanja primarnih folikula. Ovi rezultati ukazuju na to da je genistein na inicijalnu fazu folikulogeneze, imao identično delovanje kao i na volumen ovarijuma, naime delovao je kao estrogenski antagonist (Medigović i sar., 2012b). Međutim, tretman daidzeinom nije uticao na promenu ispitivanih stereoloških parametara u ovarijumima nezrelih ženki pacova.

Kod nezrelih ženki pacova starih od 19 do 22 dana, dolazi do uspostavljanja funkcije regulacije hipofizno-ovarijalnog sistema, i endogeni estrogen je u mogućnosti da, kako pozitivnom, tako i negativnom povratnom spregom, reguliše funkciju gonadotropnih ćelija hipofize. Takođe, uspostavljena je i regulacija FSH putem inhibina. U hipofizama nezrelih ženki pacova prisutna su oba tipa ER, pri čemu je prisvo ER $\beta$  zabeleženo u skoro svim FSH ćelijama (Wilson i sar., 1998), te se smatra da gonadotropne ćelije mogu poslužiti kao dodatni pokazatelj u ispitivanju estrogenske aktivnosti supstance (Medigović i

sar., 2012a). Dosadašnji rezultati se uglavnom svode na efekte fitoestrogena kod koza (Polkowska i sar., 2004) kod kojih nakon intracerebroventrikularne (ICV) infuzije genisteina dolazi do smanjenja procenta prisutnih LH ćelija. Ovo smanjenje autori objašnjavaju stimulacijom sekrecije LH (Polkowska i sar., 2004). Kod nezrelih pacova prenatalno izloženih fitoestrogenima nisu uočeni efekti genisteina na procenat FSH i LH ćelija (Masutomi i sar., 2004). Međutim u našem eksperimentalnom modelu, tretmani  $17\alpha$ -etinil estradiolom, kao i visokom i srednjom dozom genisteina uticali su na morfološke i imunofluorescentne karakteristike gonadotropnih ćelija. Ono što je interesantno je da su i tretmani daidzeinom izazvali promene navedenih karakteristika. Naime kao i estradiol, fitoestrogeni su delovali stimulatorno na gonadotropne ćelije, ali u nešto manjoj meri, te možemo reći da su na gonadotropne ćelije hipofize genistein i daidzein delovali kao blagi estrogenski agonisti. Naime, fitoestrogeni su kao i etinil estradiol uticali na povećanje veličine ćelija, usled veće količine sintetisanog FSH, odnosno LH proteina, čije smo povećanje detektovali određivanjem relativnog inteziteta fluorescentnog signala. Sa obzirom na distribuciju ER $\beta$  u gonadotropnim ćelijama hipofize, pretpostavljamo da su fitoestrogeni svoje dejstvo ostvarili direktnim vezivanjem za receptor. Dodatno, pokazano je da visoka doza genisteina utiče i na povećanje broja gonadotropnih ćelija (Medigović i sar., 2012a). Ovo povećanje broja i veličine ćelija nije uticalo na promenu mase hipofize.

Poznato je da su prolaktinske ćelije izuzetno osetljive na delovanje estradiola, te se mogu koristiti kao dobar model za ocenu estrogenske aktivnosti. Stoga smo ispitivali uticaj estradiola i različitih koncentracija fitoestrogena i na ovu ćelijsku populaciju. Očekivano, tretman estradiolom delovao je stimulatorno na PRL ćelije, utičući na povećanje količine unutarćelijskog proteinskog sadržaja (Murai i sar., 1990). Takođe visoka i srednja doza genisteina, kao i sve aplikovane doze daidzeina delovale su slično estradiolu, tj. kao estrogenski agonisti. Obe forme ER prisutne su u PRL ćelijama hipofize, međutim u

poređenju sa gonadotropnim ćelijama, zabeležen je dva puta manji nivo iRNK za ER, što rezultuje smanjenjem nivoa proteina koji učestvuju i izgradnji ER u PRL ćelijama (Demay i sar., 1996). Stoga se može smatrati, da su tretmani fitoestrogenima na PRL ćelije delovali modulacijom hipotalamičkih faktora ili odgovora PRL ćelija na njih. Naime, poznato je da je sekrecija prolaktina pod toničnom inhibicijom dopamina i stimulatornim uticajem tirotrpnog oslobađajućeg hormona (TRH) poreklom iz hipotalamusa (Jones i Naftolin, 1990). Estrogen smanjenjem aktivnosti tirozin hidrosilaze, negativno utiče na koncentraciju dopamina u hipotalmusu i hipofizi, što za posledicu ima povećanje koncentracije prolaktina u plazmi (Jones i Naftolin, 1990). Dodatno, estrogen indirektno, preko povećanja koncentracije FGF-2 (*eng. Fibroblast-Growth Factor 2*), povećava osetljivost PRL ćelija na TRH i smanjuje osetljivost na dopamin (Spuch i sar., 2006). Naša zapažanja potvrđuju i rezultati Santell i saradnika (1997) koji su nakon oralnog aplikovanja fitoestrogena zabeležili povećanu sintezu prolaktina kod ovarijektomisanih pacova.

Vagina je takođe osetljiva na delovanje estrogena (Malavijitnond i sar., 2006), i tretman estradiolom izaziva proliferaciju i kornifikaciju ćelija vaginalnog epitela. Naši rezultati potvrđuju tu činjenicu s obzirom na to da su obe koncentracije 17 $\alpha$ -etinil estradiola uzrokovale hiperplaziju ćelija površinskog epitela praćenu deskvamacijom ćelija u lumen vagine. Treba pomenuti i da su promene izraženije kod životinja kojima je aplikovana visoka doza etinil estradiola. Tretman visokom i srednjom dozom genisteina je uticao na hiperplaziju epitelnih ćelija praćenu deskvamacijom, baš kao i estradiol, te možemo reći da je genistein delovao kao estradiolski agonista. Tretmani niskom dozom genisteina i ni jednom od aplikovanih doza daidzeina, nisu izazvali promene histološke građe vagina.

Pozitivan rezultat pri analizi estrogenske aktivnosti neke supstance ukazuje na potrebu ispitivanja delovanja različitih doza ispitivane supstance (Owens i Koeter, 2003).

Prvobitno negativan rezultat u analizi gravimetričkog porasta uterusa, dobijen validnim protokolom, sa druge strane ne mora značiti odsustvo estrogenskog delovanja ispitivane supstance, već ukazuje na neophodnost dodatnih ispitivanja u cilju povećanja osetljivosti uterotrofnog eseja, na šta naši rezultati i ukazuju.

Na osnovu rezultata uterotrofnog eseja, ustanovljeno je da su minimalne efektivne doze, tj. doze koje izazivaju estrogenski efekat u organima ženskog reproduktivnog sistema, doze genisteina i daidzeina od 35 mg/kg telesne mase na dan. Usled pokazanog estrogenskog delovanja primenjenih doza, a sa obzirom na sve češću primenu fitoestrogena kao zamene supstitucionoj hormonskoj terapiji, pre svega estrogenom, ove doze su aplikovane menopauzalnim ženkama pacova u cilju rasvetljavanja hroničnog delovanja fitoestrogena na ženski reproduktivni sistem u ovoj životnoj dobi.

## **5.2. FITOESTROGENI I ESTRADIOL U ANIMALNOM MODELU MENOPAUZE**

---

Menopauza je definisana kao trajan prestanak menstruacije zbog gubitka aktivnosti ovarijalnih folikula, koji odgovara završetku menstrualnog perioda (Hooper i sar., 2012; Cedaris i sar., 2013). Ona predstavlja period dinamičkih promena ne samo u reproduktivnim, već i u drugim organima i stoga se veruje da igra jednu od najvažnijih uloga u biološkom i zdravstvenom stanju žene koja stari. Iako je menopauza, u širem smislu, prirodna i sama po sebi nije indikacija za hormonsku supstitucionu terapiju, posledice nedostatka estrogena mogu zahtevati ovaj vid terapije.

Nedostatak estrogena se nadoknađuje  $17\beta$ -estradiolom, estradiol valeratom, estradiol piperazin sulfatom i konjugovanim estrogenima. Neki preparati sadrže estrogene identične onima koje izlučuje ovarijum, kao što je estradiol, a drugi sadrže spojeve estrogena koji u telu metabolišu u prirodne metabolite estradiola i kao takvi deluju. Doza se određuje individualno, praćenjem terapijskih efektata i pojave neželjenih simptoma. Jedan od ciljeva terapije je da se što manjom dozom postigne željeni efekt. Srednja efektivna doza uglavnom odgovara količini 0.625 mg konjugovanih estrogena (npr. estradiol dipropionata), koja je primenjena u ovoj studiji (Abdel-Dayem i Elgendy, 2009). Estrogeni se najčešće aplikuju u dva režima. Kontinuirani režim podrazumeva svakodnevnu primenu estrogena, bez pauze, dok ciklični režim podrazumeva da se estrogeni daju svakodnevno tri do četiri nedelje, nakon čega sledi jedna nedelja pauze (Abdel-Dayem i Elgendy, 2009). Međutim, supstitutivna hormonska terapija nosi sa sobom rizik od pojave hormon zavisnih karcinoma (Singh i Oehler, 2010), kao što su karcinomi organa ženskog reproduktivnog sistema, te se stoga sve češće u tu svrhu koriste alternativni terapeutici kao što su fitoestrogeni (Geller i sar., 2005). Usled činjenice da fitoestrogeni pokazuju izvesne prednosti u terapiji u poređenju sa polnim steroidima, poslednjih godina postaju atraktivno

polje intenzivnih bazičnih istraživanja, predmet pretkliničkih i kliničkih studija i tema diskusija naučne i stručne javnosti.

Ova studija je sprovedena sa ciljem dodatnog rasvetljavanja efekata estradiola i fitoestrogena iz soje, genisteina i daidzeina, na morfofunkcionalne osobine reproduktivnog sistema u animalnom modelu menopauze. Navedeni animalni model je podrazumevao korišćenje acikličnih ženki pacova srednje dobi. Kod primata je estrusni ciklus podeljen na folikularnu i lutealnu fazu, a kod laboratorijskih pacova ove dve faze se delimično preklapaju u skraćeni, estrusni ciklus (Butcher i sar., 1974). Estrusni ciklus pacova traje tipično četiri dana i uobičajena je podela na proestrus, estrus, postestrus i diestrus. Postoje mnoge sojne razlike u reproduktivnom ciklusu laboratorijskih pacova, ali kod svih sojeva, ciklus dužine 4-5 dana počinje nakon puberteta i prestaje između 7. i 10. meseca života (Aycock i Jollie, 1979). Nakon toga ciklus postaje nepravilan i produžen. Između 10 i 18 meseci starosti, pacovi ulaze u fazu konstantnog estrusa, fazu okarakterisanu dugim periodima vaginalne kornifikacije ili fazu ponovljenih lažnih trudnoća tj. diestrusa, koju karakterišu dugi periodi leukocitnog vaginalnog sekreta. Većina animalnih modela, pomoću kojih se prate efekti fitoestrogena na prevenciju i tretman menopauzalnih simptoma, izvode se na adultnim ovarijektomisanim ženkama, te se uklanjanjem ovarijuma, uklanja i najveći procenat endogenog estrogena, što dovodi do sličnog hormonskog stanja i poremećaja koji se javljaju u menopauzi. Međutim, najveći broj žena, koje uzimaju bilo konvencionalnu terapiju polnim steroidima, bilo alternativnu (kroz brojne dijetetske suplemente na bazi fitoestrogena) su ovarijum intaktne, tako da je ovo prva studija koja ispituje uticaj konvencionalne i alternativne terapije u realnim fiziološkim uslovima tokom menopauze.

Neophodno je reći da su u našem eksperimentu, fitoestrogeni iz soje subkutano injecirani životinjama, dok u humanoj medicini tretman preparatima koji ih sadrže, podrazumeva oralnu aplikaciju. Jefferson i saradnici (2007), međutim, navode da subkutana



aplikacija sojinih izoflavona u potpunosti odgovara oralnoj. Mi smo se, takođe, pri injeciranju odlučili za fitoestrogene iz soje u hemijskom obliku raspoloživom nakon digestivne transformacije, aglikone. Naposljetku, prilikom injeciranja supstanci kontrola primenjenih doza je daleko preciznija nego pri oralnoj aplikaciji.

Tretman estradiolom i fitoestrogenima (genisteinom i daidzeinom) nije uticao na promenu telesne mase acikličnih ženki pacova, kao i u modelu nezrelih ženki. Literaturni podaci o efektima sojinih izoflavona na telesnu masu su kontradiktorni, te se govori o smanjenju, povećanju i izostanku promene telesne mase (McClain i sar., 2006; Penza i sar., 2006; Faqi i sar., 2004), verovatno zahvaljujući različitim protokolima tretmana i različitim eksperimentalnim uslovima.

U našem eksperimentalnom modelu pokazano je da su gonadotropne i laktotropne ćelije acikličnih ženki pacova osetljive na hronični tretman estradiol dipropionatom. Naime, estradiol je inhibitorno delovao na FSH i LH ćelije, pri čemu se inhibicija ogleda u smanjenju unutarćelijske količine proteina, koje je detektovano smanjenjem imunofluorescentnog signala i smanjenjem veličine ćelija. Istovremeno, estradiol je delovao stimulatorno na PRL ćelije, povećanjem njihove zastupljenosti, kao i povećanjem relativnog intenziteta fluorescentnog signala. Naši rezultati potvrđuju činjenicu da različiti efekti steroida na različite ćelije hipofize mogu biti prisutni u isto vreme. Na primer,  $17\beta$ -estradiol stimuliše proliferaciju prolaktinskih ćelija i sintezu prolaktina, dok istovremeno inhibira sekreciju gonadotropina in vivo (Lieberman i sar., 1978; Nedvidkova i sar., 1998). Poznato je da estradiol reguliše sintezu i sekreciju različitih hormona hipofize na ćelijsko-specifičan i promotor-specifičan način (Schreihofner i sar., 2000). Pod mehanizmom ćelijske specifičnosti se podrazumeva diferencijalna ekspresija različitih izoformi ER, dok promotorska specifičnost uključuje regulaciju ekspresije određenih gena. Promotor-specifični mehanizmi delovanja  $17\beta$ -estradiola se odvijaju uz učešće ER (Mangelsdorf i sar.,

1995). Imunocitohemijske i autoradiografske studije su pokazale prisustvo ER u gonadotropnim i laktotropnim ćelijama hipofize (Morel i sar., 1981). Najmanje tri različite izoforme ER prisutne su u hipofizi pacova uključujući ER $\alpha$ , ER $\beta$  i specifičnu formu ER $\alpha$  (eng. *Truncated Estrogen Receptor Product-1*; TERP) čija je ekspresija specifična za hipofizu (Mitchner i sar. 1998). Dodatno, estradiol svoje delovanje može ostvariti i preko GPR30, membranskog estrogenskog receptora, koji nakon vezivanja liganda stimuliše aktivaciju sekundarnih glasnika u ćelijama kao što su cAMP, inozitol-tri-fosfata (IP3) i Ca<sup>2+</sup>, nezavisno od aktivacije jedarnih estrogenskih receptora (Filardo i Thomas, 2005). Pored direktnog delovanja, estradiol je na ispitivane hipofizne ćelije mogao delovati i indirektno. U slučaju gonadotropnih ćelija, moguće je da je estradiol, mehanizmom negativne povratne sprege, inhibitorno delovao i na nivou hipotalamusa, tj. na GnRH neurone. U slučaju PRL ćelija, uz modulaciju faktora iz hipotalamusa (Shull i Gorski 1985), estradiol preko promene koncentracije faktora rasta, kao što su PTTG (eng. *Pituitary Tumor Transforming Gene*), bFGF (eng. *basic Fibroblast Growth Factor*) i VEGF (eng. *Vascular Endothelial Growth Factor*) stimuliše PRL ćelije, povećavajući osetljivost na TRH i smanjujući osetljivost na dopamin (Spuch i sar., 2006). Ovaj mehanizam je verovatno odgovoran za estradiol-stimulisane hipofizne prolaktinome (Heaney i sar., 2002). Dodatno, u našem eksperimentalnom modelu, došlo je do povećanja mase hipofize, što je posledica stimulacije PRL ćelija.

Za razliku od podataka o uticaju estradiola na gonadotropne i laktotropne ćelija, radovi koji ispituju uticaj fitoestrogena su malobrojni, naročito u animalnom modelu menopauze, a rezultati istraživanja kontradiktorni. Većina radova ispituje indirektno delovanje fitoestrogena na ćelije hipofize preko GnRH i to kod nezrelih ili polno zrelih jedinki. Prema nekim autorima genistein nije uticao na GnRH indukovan puls LH oslobađanja (McGarvey i sar., 2001). Nasuprot njima, Hughes i saradnici (1991) su pokazali potpunu blokadu GnRH indukovanog LH oslobađanja genisteinom navodeći da je

genistein u tom smislu potentniji od estradiola. Lewis i saradnici (2003) ukazuju da dugoročni neonatalni tretman ovarijektomisanih pacova genisteinom utiče na bazalnu sekreciju GnRH, stimulišući lučenje LH. Perinatalna izloženost genisteinu kroz ishranu majke nije uticala na FSH i LH ćelije potomaka (Masutomi i sar., 2004). Međutim, nakon hronične aplikacije visokih doza genisteina nezrelim pacovima, koncentracija FSH u serumu je ostala nepromenjena, dok je koncentracija LH povećana (Ohno i sar., 2003). Kod nezrelih ženki pacova visoka doza genisteina je izazvala povećanje broja i volumena i FSH i LH ćelija (Medigović i sar., 2012a). Takođe, nakon ICV aplikacije genisteina, povećana je količina iRNK za LH $\beta$ , što je uticalo na povećanje brojnosti LH ćelija (Wojcik-Gładisz i sar., 2005). Međutim kod intaktnih, anestrusnih ovaca, procenat LH ćelija je u padu, što je praćeno povećanjem iRNK za LH $\beta$ , te se pretpostavlja da je genistein uslovio oslobađanje hormona (Polkovska i sar., 2004). Kod “*knockout*” miševa za aromatazu, tretman genisteinom uslovio je smanjenje koncentracije FSH i LH u serumu u poređenju sa “*wild type*” miševima (Bliedtner i sar., 2010). Kod žena u predmenopauzalnom periodu zabeleženo je smanjenje koncentracije FSH i LH, nakon ishrane obogaćene sojinim proteinima (Duncan i sar., 1999; Huper i sar., 2009). Međutim, uticaj fitoestrogena na populaciju gonadotropnih ćelija u hipofizama acikličnih ženki pacova je nedovoljno istražen i svodi se na naše preliminarne rezultate (Medigović, 2013). Naime, nakon tretmana genisteinom i daidzeinom, nasuprot estradioloskom tretmanu, promene u relativnom intenzitetu fluorescentnog signala izostaju. Međutim, fitoestrogeni su izazvali promene u morfologiji ćelija. Ćelije su veće, nepravilnog oblika, dok se u citoplazmi uočavaju nebojani delovi koji joj daju izgled vakuoliziranosti. Smatra se da do vakuolizacije dolazi usled dilatacije membrana endoplazmatičnog retikulima i Golži kompleksa (Cheville, 2009).

Tretmani fitoestrogenima, izazvali su promene u morfologiji PRL ćelija slične promenama viđenim i u populaciji gonadotropnih ćelija, međutim nisu uticali na promenu imunofluorescentnog signala. Naime, poznato je da fitoestrogeni imaju mogućnost inhibicije bFGF (Fotsis i sar., 1993; Kim i sar., 1998) što za posledicu može imati smanjenu proliferaciju PRL ćelija. Dodatno inhibicija bFGF koči neke rane događaje u procesu angiogeneze (Kim, 2003), koja je bitan korak u razvoju karcinoma. Mehanizam antiangiogenetskog dejstva genisteina može se ostvariti preko inhibicije tirozin kinaza, inhibicije S6 kinaze, kao i inhibicije DNK topoizomeraze I i II (Ullrich i sar., 1990; Okura i sar., 1988; Yamashita i sar., 1990). Ovaj rezultat govori u prilog činjenici da primena fitoestrogena kao alternativnih terapeutika u menopauzi donosi boljitak, a nosi manji rizik od pojave tumora.

Kod aciličnih ženki pacova, na stimulaciju gonadotropinima ovarijum odgovara smanjenim intenzitetom, usled svoje istrošenosti. Međutim, proces folikulogeneze se i dalje odvija. Kao što je poznato, ukupan broj primordijalnih folikula, prisutnih u ovarijumu pacova po rođenju, se progresivno smanjuje u toku reproduktivnog života (McGee i Hsueh, 2000). Primordijalni folikuli ulaze u fazu rasta i diferencijacije, koja se može završiti ovulacijom ili češće atrezijom, tako da se sa starenjem svakim ciklusom progresivno smanjuje broj primordijalnih folikula i u tom smislu dolazi do iscrpljivanja ovarijuma.

Faktori koji su presudni za inicijaciju rasta folikula, tj. prelazak primordijalnih u primarne folikule, još uvek su najvećim delom nepoznati. Primordijalni folikuli su pod uticajem, kako endokrinih, tako i parakrinih signala. Izvor parakrinih faktora može biti unutar samog folikula (oocita i folikularne ćelije) kao i van folikula (ćelije strome i drugi folikuli; Fortune, 2003). Smanjenje inhibitornih ili povećanje stimulatornih uticaja dozvoljava početak folikulogeneze (McGee i Hsueh, 2000; Fortune, 2003). Međutim, interesovanje za ovu fazu folikulogeneze je u stalnom porastu, jer pul mirujućih folikula

može biti iskorišćen za povećanje reproduktivne sposobnosti kao i za lečenje infertiliteta žena lečenih hemoterapijom ili radioaktivnim zračenjem (Fortune, 2003). Stoga je razumevanje aktivacije primordijalnih folikula i uslova za njihov rast i razviće postala neophodnost. Međutim, studije koje ispituju uticaj fitoestrogena na proces folikulogeneze tokom menopauzalnog perioda su malobrojne, a bile bi od značaja, jer bi potencijalno mogle pomoći u razumevanju ovog procesa, kao i faktora koji na njega utiču. Na neophodnost izučavanja procesa folikulogeneze kod acikličnih ženki nakon tretmana genisteinom, ukazuju i rezultati studija u animalnom modelu sa niskom koncentracijom endogenog estrogena. Naime, rezultati naše istraživačke grupe (Medigović i sar., 2012b) pokazuju inhibitoran uticaj genisteina na inicijalnu fazu folikulogeneze, dok Jefferson i saradnici (2007) ukazuju na brojne poremećaje koje u ovarijumu miševa, nakon neonatalnog tretmana, izaziva ista supstanca, a koji se ogledaju u smanjenju reproduktivne sposobnosti kasnije u životu. Imajući u vidu navedene rezultate, zadatak ove studije je da ispita uticaj fitoestrogena, genisteina i daidzeina, na proces folikulogeneze u ovarijumima acikličnih ženki pacova i da ih uporedi sa efektima koje izaziva estradiol dipropionat, sintetički estrogen, koji se koristi kao lek izbora u prevenciji i terapiji menopauzalnih simptoma.

Hroničan tretman terapijskim dozama estradiola, u ovarijumima acikličnih ženki, generalno je pokazao negativan uticaj. U grupi malih folikula izazvao je značajno povećanje atretičnih, kako folikula inicijalne faze folikulogeneze (primordijalnih i primarnih), tako i u stadijumu preantralnih folikula. Slična slika je uočena i u fazi antralnih folikula. Kako se smanjenje primordijalnih i primarnih folikula u ovarijumima smatra i jednim od uzroka nastanka menopauze, ubrzavanje degenerativnih procesa u grupi ovih folikula se može tumačiti i kao ubrzavanje ovarijanog starenja pod uticajem estradiola (Shirwalkar i sar., 2007). Odsustvo ER u ćelijama primordijalnih folikula (Sar i Welsch, 1999), činjenica da je

rast folikula do antralnog stadijuma nezavisan od gonadotropina, a pod snažnim uticajem parakrinih signala (Fortune, 2003), dovode do pretpostavke da je hroničan tretman estradiolom nepovoljno uticao na neke od parakrinih faktora važnih za otpočinjanje folikulogeneze. Stimulacija atrečnih procesa uočena je i u stadijumu antralnih folikula. Ovo je jednim delom svakako posledica inhibitornog delovanja estradiola na gonadotropne ćelije hipofize, budući da je ova faza folikulogeneze zavisna od FSH i LH (Greenwald i Roy, 1994). Smanjenje broja zdravih preantralnih i antralnih folikula pojedinih klasa, sa jedne strane je rezultat ubrzanja procesa atrežije, ali i maturacionog efekta estradiola na ovu fazu folikulogeneze. Maturacioni efekat je jasno vidljiv i u povećanju ukupnog broja žutih tela. Međutim, ovo je delimično i efekat stimulacije PRL ćelija, budući da PRL ima luteotrofnu funkciju (Karg, 1974). Dodatno, estradiol je u zrelih žutim telima uzrokovao povećanje volumena granulosa luteinskih ćelija, koje je praćeno smanjenjem njihovog broja. Poznato je da estradiol u zrelih žutim telima tokom trudnoće uslovljava hipertrofiju granulosa luteinskih ćelija (Bowen-Shauver i Gibori, 2004). S obzirom na to da su aciklične ženke pacova u našem animalnom modelu bile u stadijumu diestrusa (tj. ponovljenih lažnih trudnoća), smatramo da je estradiol delovao na isti način.

Usled povećanja broja žutih tela, dolazi i do povećanja volumena ovarijuma. Dodatno, analizirajući volumene osnovnih faza ovarijalne strome, uočavamo da je estradiol uzrokovao smanjenje volumena intersticijuma, praćeno povećanjem volumena krvnih sudova, što je u skladu sa dokumentovanim rezultatima (Lovren i Sekulić, 2000). Povećanje volumena, uticalo je i na povećanje mase organa.

Ono što daje značaj ovoj studiji, jesu i rezultati do kojih smo došli analizirajući brojnost primordijalnih i primarnih folikula nakon tretmana fitoestrogenima. Naime, hronična aplikacija kako genisteina, tako i daidzeina, višestruko je povećala broj primordijalnih i primarnih folikula. Međutim, genistein i daidzein nisu uticali na promenu

apsolutnog broja atretičnih primordijalnih folikula, dok su značajno smanjili atreziju primarnih folikula. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima koje su uočili i Zhuang i saradnici (2010). Pomenuta istraživačka grupa je aplikovala izrazito visoku dozu genisteina (čak 160mg/kg) 11 meseci starim ženka pacova, u trajanju od četiri meseca, i nakon toga zabeležila povećanje broja zdravih primordijalnih i primarnih folikula, uz smanjenje atretičnih promena (Zhuang i sar., 2010). Objašnjenje ovih rezultata treba tražiti u činjenici da fitoestrogeni smanjuju nivo oksidativnog stresa (Shin i sar., 2007), koji je povećan u menopauzalnom ovarijumu (Doshi i Agarwal, 2013). Poznato je da oksidativni stres, indukuje lipidnu peroksidaciju, remeti strukturu i funkciju proteina i utiče na molekul DNK, izazivajući apoptotske promene, i učestvuje u razvoju kancera preko remećenja redoks-statusa i/ili redoks-osetljivih signalnih puteva (Ames i sar., 1993). Takođe, poznato je da daidzein, indukuje *de novo* sintezu mitohondrija, nezavisno od aktivacije ER (Rasbach i Schnellmann, 2008). S obzirom na to da su u oocitama mitohondrije veoma zastupljene i igraju važnu ulogu u očuvanju ćelije (Bentov i Casper, 2013), smatramo da su fitoestrogeni mogli uticati na inhibiciju atrezije i na ovaj način. Imajući u vidu da je broj primordijalnih folikula u ovarijumu ključan za njegovo starenje, možemo reći da fitoestrogeni povećavajući njihov broj, usporavaju i ovarijano starenje.

Tretmani fitoestrogenima nisu uticali na promenu broja sume preantralnih i antralnih folikula. Dodatno, genistein i daidzein, uticali su na smanjenje apsolutnog broja atretičnih antrtalnih folikula. Pokazano je da daidzein u granulosa ćelijama svinja povećava ekspresiju ER $\beta$  (Nynca i sar., 2009). Imajući u vidu da je za pravilno funkcionisanje ovarijuma neophodno prisutvo ER $\beta$  (Drummond i Fuller, 2012), možemo pretpostaviti da su tretmani fitoestrogenima stimulacijom ekspresije ER $\beta$ , usporili kako atretične procese, tako i razvoj folikularnih cista u ovarijumima acikličnih ženki pacova. Dodatno, moguće je da su fitoestrogeni pozitivno delovali na očuvanje zdravih folikula i stimulacijom ekspresije

D2 ciklina, što za posledicu ima prelazak ćelije iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa (Quirk i sar., 2006). Smatra se da su fitoestrogeni mogli uticati na stimulaciju ekspresije nekog od brojnih parakrinih faktora u ovarijumu, kao što su IGF, bFGF i EGF, koji inhibiraju proces apoptoze, održavajući folikule u funkcionalnom stanju (Quirk i sar., 2004; Yang i Rajamahendran, 2000; Mani i sar., 2010).

Tretman genisteinom, nije uticao ni na promenu pojedinačnih klasa žutih tela, kao ni na promenu njihovog ukupnog broja. Za razliku od genisteina, daidzein je povećao brojnost zrelih žutih tela, što je uzrokovalo povećanje njihovog ukupnog broja. Povećanje broja žutih tela, možemo tumačiti kao posledicu ovulacije folikula u ovarijumu acikličnih ženki pacova, do koje je došlo zahvaljujući smanjenju slobodnih radikala, a samim tim i oksidativnog stresa. Objašnjenje ovog rezultata možemo tražiti u činjenici da je daidzein potentniji antioksidans, usled forme molekula. Naime, duga osa daidzeina, manjeg i mobilnijeg molekula, orijentiše se skoro paralelno ravni membranskog lipidnog dvosloja, sa karbonalnim grupama upravljanim ka proksimalnoj površini ćelijske membrane, što se odražava na strukturni integritet membrane i dodatno može otežati prodor slobodnih radikala u unutrašnjost ćelija (Raghunathan i sar., 2012). Tretmani fitoestrogenima nisu uticali na promenu brojnosti i volumena granulosa luteinskih ćelija.

Povećanje broja žutih tela nakon daidzeinskog tretmana, uzrokovalo je i povećanje volumena ovarijuma, dok tretman genisteinom nije uticao na promenu volumena. Međutim, usled očuvanja zdravih folikula, oba tretmana su uzrokovala povećanje volumena folikularnog parenhima, dok je na volumen ovarijalne strome delovao samo genistein i to smanjenjem. Dodatno, i genistein i daidzein, delovali su na smanjenje volumena koji zauzimaju intersticijalne ćelije, povećanje volumena krvnih sudova ovarijalne strome, što je praćeno i odgovarajućim promenama volumenskih gustina. Smatra se da su tretmani fitoestrogenima na krvne sudove ispoljili delovanje slično estradiolu produkcijom NO, što



za posledicu ima njihovu vazodilataciju (Walker i sar., 2001). Nakon aplikacije fitoestrogena, promene u masi ovarijuma izostaju. Međutim, interesantno je da je tretman daidzeinom uticao na povećanje volumena, ali ne i mase, verovatno usled sprečavanja formiranja folikularnih cisti.

Izračunavanje numeričke gustine svake od pojedinačnih klasa folikula potvrdio je, velikim delom, da su kako estradiol, tako i aplikovani fitoestrogeni, jednako delovali na folikul kao funkcionalnu jedinicu ovarijuma i ovarijum kao celinu.

Tretman estradiolom doveo je do povećanja apsolutne i relativne mase uterusa, koje je posledica povećanja volumenske gustine endometrijuma, pri čemu je isti parametar miometrijuma i perimetrijuma smanjen. Dodatno, tretman estradiolom izazvao je hiperplaziju ćelija endometrijalnog epitela i povećanje broja endometrijalnih žlezda što je dovelo do povećanja njihove volumenske gustine.

Uterus je dobar model sistem za praćenje ekspresije estrogenskih receptora nakon tretmana estradiolom. Međutim, rezultati su kontradiktorni, pošto je primećana kako smanjena, tako i povećana ekspresija ER $\alpha$ , u zavisnosti od fiziološkog stanja životinja i primenjenog eksperimentalnog modela (Rosser i sar., 1993; Zhou i sar., 1995) što dodatno otežava poređenje i tumačenje rezultata (Nephew i sar., 2000). Literaturni podaci, ukazuju da tretman estradiolom ima bifazično delovanje na ukupnu iRNK i nivo proteina za ER u uterusu (Zhou i sar., 1995). Međutim, ipak je opšte prihvaćeno da u uterusu estradiol svoje efekte ostvaruje preko ER $\alpha$ . Pokazano je da nakon delovanja estradiola, u uterusu dolazi do smanjenja ekspresije ER $\alpha$ , kako na genskom, tako i na proteinskom nivou. Ovo smanjenje, je praćeno značajnim povećanjem ekspresije PR (Nephew i sar., 2000; Sahlin i sar., 2006), što potvrđuju i rezultati ove studije.

Naši rezultati su u skladu sa primećenim efektom estrogenske terapije na endometrijum, koja povećava rizik pojave hiperplazija (Lethaby i sar., 2000), kao i

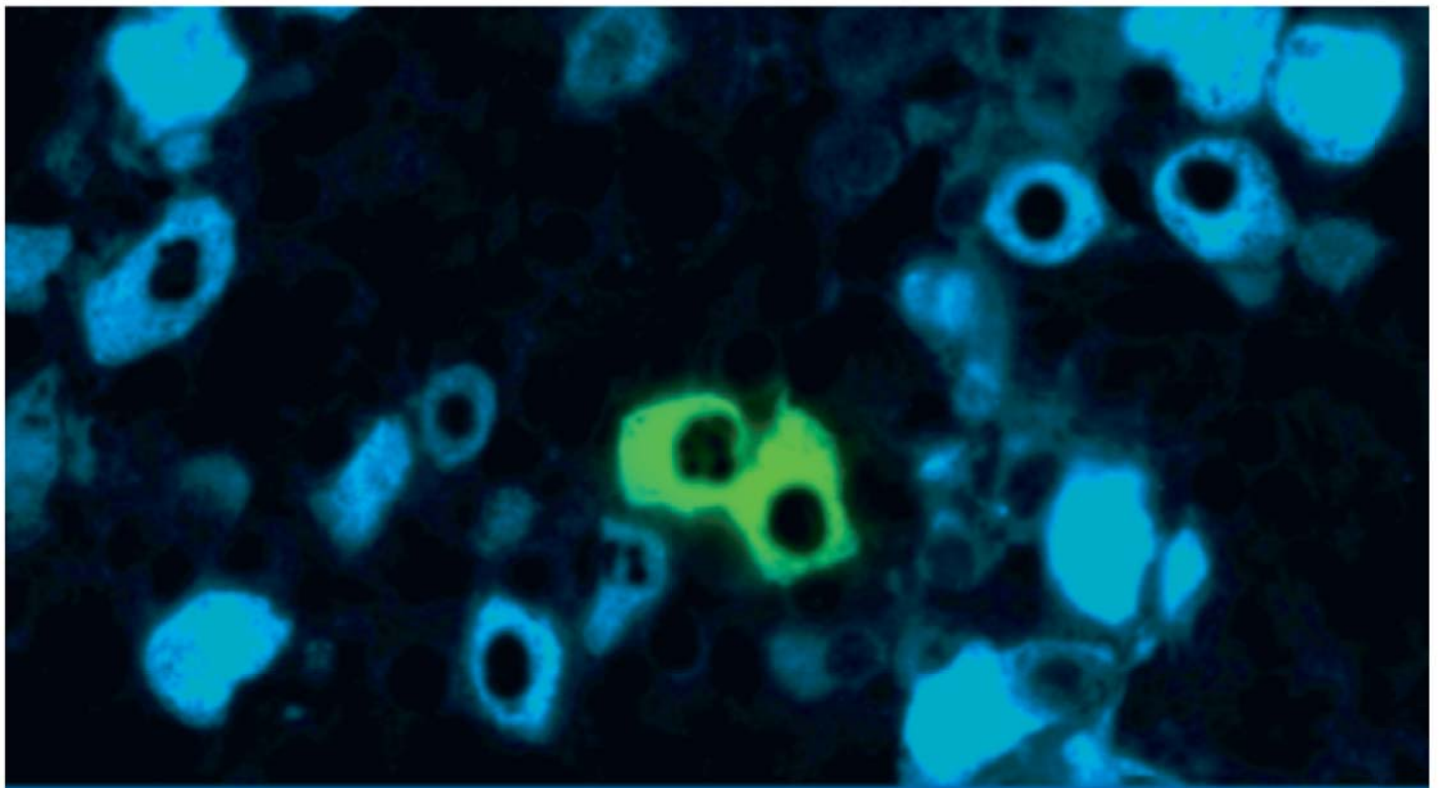
neoplastičnih transformacija (Albertazzi i Sharma 2005). Hiperplazije i neoplastične transformacije uzrokuju razvoj karcinoma endometrijuma, te supstituciona hormonska terapija estradiolom ne predstavlja dobar izbor.

Za razliku od estradiola, tretmani fitoestrogenima nisu doveli do promene u masi uterusa. Volumenska gustina endometrijuma povećana je nakon tretmana genisteinom, ali za skoro tri puta manji procenat u odnosu na estradiol. Razlog ovome je najverovatnije mali afinitet vezivanja genisteina za ER $\alpha$  (Kuiper, 1997). Cotroneo i saradnici (2002) navode da genistein slično estradiolu uzrokuje smanjenje ekspresije ER $\alpha$ , koje je praćeno povećanjem ekspresije PR. Pored ovoga Patisaul i saradnici (2002) navode da genistein povećava ekspresiju ER $\beta$ . Rezultati ove studije su u skladu sa navedenim literaturnim podacima.

Daidzein nije izmenio masu uterusa, morfometrijske i stereološke karakteristike, kao ni ekspresiju ER $\alpha$  i PR. Pretpostavka je da je uzrok neizmenjenih histoloških, morfometrijskih i stereoloških parametara upravo neizmenjena ekspresije ER $\alpha$ , za koji se smatra da je medijator ćelijske hipertrofije i hiperplazije (Newbold i sar., 2004). Staar i saradnici (2005) navode povećanje ekspresije ER $\beta$  u epitelu endometrijalnih žlezda nakon inkubacije sa daidzeinom. I u našim eksperimentalnim uslovima uočeno je povećanje ekspresije ovog receptora na genskom i proteinskom nivou. Dokazano je da konstelacija odnosa ER $\alpha$ /ER $\beta$ , u korist ER $\beta$ , smanjuje verovatnoću razvoja tumora (Pujol i sar., 1998; Deroo i Korach, 2006). U tom svetlu naši rezultati ukazuju na to da upotreba fitoestrogena u terapiji menopauzalnih simptoma, smanjuje rizik od razvoja karcinoma endometrijuma.

U našim eksperimentalnim uslovima, tretman estradiolom izazvao je hipertrofiju vaginalnog epitela, praćenu deskvamacijom ćelija, što je očekivan estrogenski efekat. Poznato je da supstituciona terapija polnim steroidima može značajno smanjiti ili u potpunosti eliminisati tegobe vaginalne atrofije (Nothnagle i Taylor, 2004), kao i tegobe nastale usled funkcionalnih atrofičkih promena u organima donjeg urinarnog trakta

(Ouslander i sar., 1997). Tretmani fitoestrogenima nisu ispoljili potencijalno estrogensko delovanje koje se ogleda u ER $\alpha$  zavisnoj hiperplaziji epitelnih ćelija, praćenoj deskvamacijom (Rimoldi i sar., 2007). Naši rezultati, ukazuju na to da su tretmani genisteinom i daidzeinom u manjoj meri povećali mitotsku aktivnost, a smanjili piknozu ćelija vaginalnog epitela, što je u skladu sa studijom Stevenson i Thornton (2007) koji su pokazali da fitoestrogeni sprečavaju atrofiju vaginalnog epitela. Dodatno, tretman fitoestrogenima pozitivno utiče na održavanje vlažnosti vaginalnog epitela (Kotsopoulos i sar., 2000), što predstavlja dodatni pozitivni efekat korišćenja fitoestrogena u prevenciji i terapiji tegoba i poremećaja koji se javljaju u menopauzi.



## ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata uterotrofnog eseja na nezrelim ženkama pacova, a u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, moguće je izvesti sledeće zaključke:

**1.** Uterotrofnim esejem pokazano je da genistein u dozama od 35 i 50 mg/kg telesne mase na dan ispoljava estrogensko delovanje, koje se ogleda u gravimetričkom porastu uterusa, te možemo reći da deluje kao agonista estradiola, dok daidzein ne izaziva ove efekte.

**2.** Evaluacijom visoke, srednje i niske doze ustanovljeno je da genistein aplikovan u visokoj i srednjoj dozi, ima ulogu estrogenskog agoniste u pogledu svih ispitivanih karakteristika u uterusu, hipofizi i vagini nezrelih ženki pacova. Međutim, iste doze su u ovarijumima uslovile antagonističko delovanje. Zahvaljući uključivanju dodatnih analiza, osetljivost uterotrofne probe je povećana i ustanovljeno je da i daidzein poseduje estrogensko delovanje u svim ispitivanim dozama, koje se ogleda u povećanju broja i volumenske gustine endometrijalnih žlezda i stimulaciji gonadotropnih i laktotropnih ćelija hipofize.

**3.** Minimalne efektivne doze, tj. doze koje izazivaju estrogenski efekat u organima ženskog reproduktivnog sistema, su doze od 35 mg/kg telesne mase na dan genisteina i daidzeina.

Nakon analize rezultata dobijenih nakon hronične aplikacije minimalnih efektivnih doza genisteina i daidzeina acikličnim ženkama pacova, a u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja moguće je izvesti sledeće zaključke:

**1.** Genistein i daidzein ne menjaju količinu proteina u gonadotropnim i laktotropnim ćelijama hipofize i na taj način pozitivno utiču na održavanje funkcije ovarijuma, za razliku od estradiola, koji inhibicijom gonadotropnih ćelija izaziva atretične promene u ovarijumu, a stimulacijom laktotropnih ćelija povećava rizik od nastanka adenoma.

2. Genistein i daidzein pozitivno utiču na proces folikulogeneze i ovarijum u celini, očuvanjem svih klasa zdravih folikula i smanjenjem atretičnih procesa, što za posledicu ima usporavanje reproduktivnog starenja, za razliku od estradiola koji ovaj proces ubrzava.

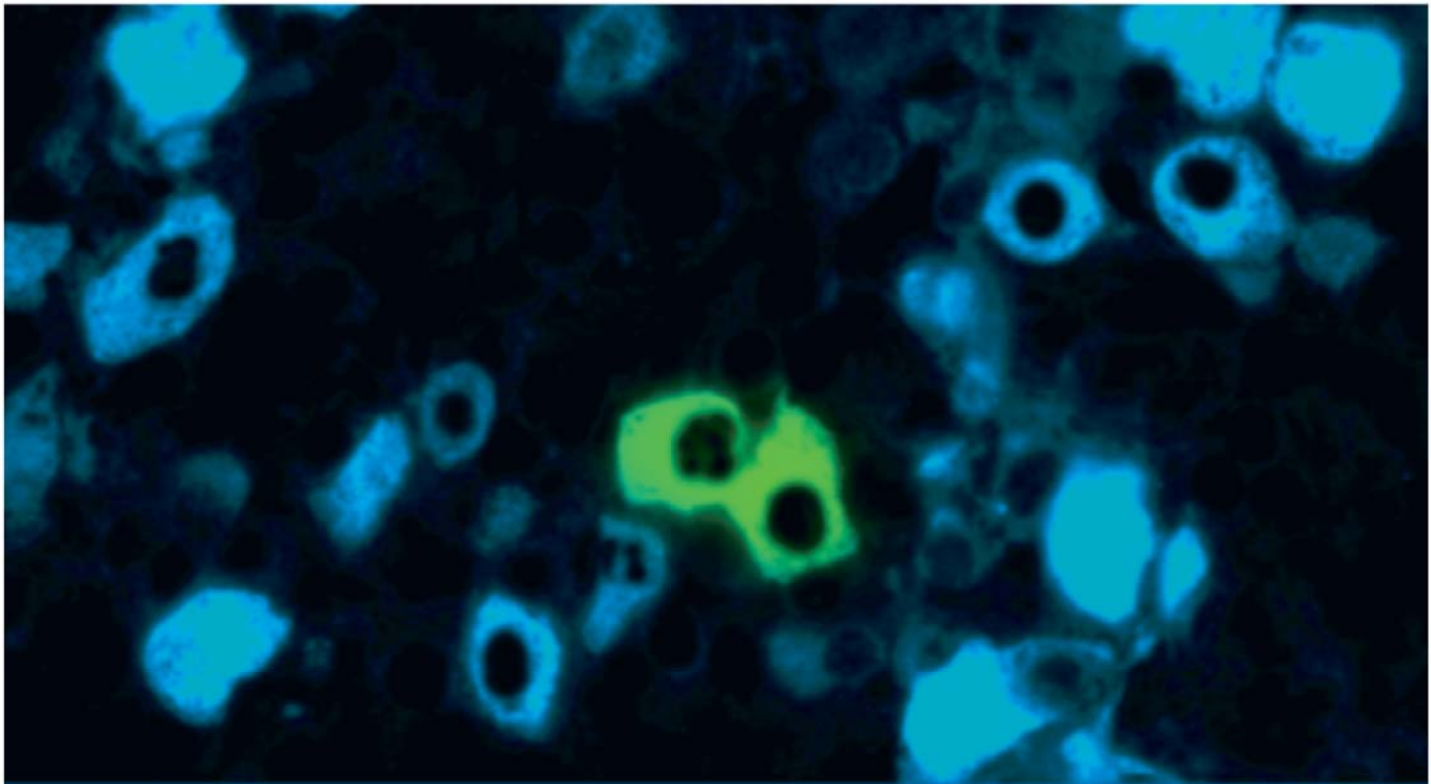
3. Genistein i daidzein, iako menjaju ekspresiju gena za polne steroide, ne izazivaju promene u histološkoj građi endometrijuma, za razliku od estradiola, koji izaziva hiperplaziju ćelija endometrijuma.

4. Genistein i daidzein sprečavaju atrofiju vaginalnog epitela acikličnih ženki pacova.

Sumiranjem dobijenih rezultata može se izvesti opšti zaključak.



Genistein i daidzein, ispoljavaju niz pozitivnih efekata na reproduktivni sistem acikličnih ženki pacova, posebno na nivou ovarijuma. Imajući u vidu da menopauza, između ostalog, nastaje usled smanjene funkcije ovarijuma, rezultati ove studije imaju veliki značaj i primenu, s obzirom na to da očuvanje funkcije ovarijuma značajno utiče na kvalitet života žena. Stoga se može reći da genistein i daidzein mogu biti uspešna alternativa supstitucionoj hormonskoj terapiji.



# LITERATURA

- Abdel-Dayem MM, Elgendy MS. (2009): Effects of chronic estradiol treatment on the thyroid gland structure and function of ovariectomized rats. 30; 173.
- Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach SL, Hockerstedt KA, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makela TH, Wahala KT, Adlercreutz T. (1995): Soybean phytoestrogen intake and cancer risk, Review. J Nutr. 125; 757-770.
- Adlercreutz H, Fotsis T, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T. (1986): Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets. J Steroid Biochem. 25; 791-797.
- Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C, Bloigu S, Hamalainen E, Fotsis T, Ollus A (1987): Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG) J Steroid Biochem. 27; 1135-1144.
- Adlercreutz H, Mazur W. (1997): Phyto-oestrogens and Western diseases. Ann Med 29; 95-120.
- Adlercreutz H. (1990): Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. Scand J Clin Lab Invest. 201; 3-23.
- Ajdžanović V, Spasojević I, Filipović B, Šošić-Jurjević B, Sekulić M, Milosević V. (2010): Effects of genistein and daidzein on erythrocyte membrane fluidity: an electron paramagnetic resonance study. Can J Physiol Pharmacol. 88; 497-500.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. (1987): Genistein, a specific inhibitor of tyrosinespecific protein kinases. J Biol Chem. 262; 5592-5595.
- Albertazzi P, Sharma S. (2005): Urogenital effects of selective estrogen receptor modulators: a systematic review. Climacteric. 8; 214-20.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 90; 7915-22.
- Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. (1995): Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. N Engl J Med. 333; 276-282.
- Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL Jr, Morgan TM, Burke GL. (1996): Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. J Nutr. 126; 43-50.



- Anzalone CR, Hong LS, Lu JK, LaPolt PS. (2001): Influences of age and ovarian follicular reserve on estrous cycle patterns, ovulation, and hormone secretion in the Long-Evans rat. *Biol. Reprod.* 64; 1056-1062.
- Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. (1996): Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr.* 126; 161-167.
- Ashby J, Odum J, Foster JR. (1997): Activity of raloxifene in immature and ovariectomized rat uterotrophic assays. *Regul Toxicol Pharmacol.* 25; 226-231.
- Ashby J. (2001): Increasing the sensitivity of the rodent uterotrophic assay to estrogen, with particular reference to bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 109; 1091-1094.
- Axelson M, Setchell KD. (1981): The excretion of lignans in rats: evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. *FEBS Lett.* 123; 337-342.
- Baker VA. (2001): Endocrine disrupters - testing strategies to assess human hazard. *Toxicol in vitro* 15; 413-419.
- Banerjee S, Zhang Y, Ali S, Bhuiyan M, Wang Z, Chiao PJ, Philip PA, Abbruzzese J, Sarkar FH. (2005): Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine by genistein in vitro and in vivo using an orthotopic model of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 65; 9064-72.
- Barton HA, Andersen ME, Allen BC. (1998): Dose-response characteristics of uterine responses in rat exposed to estrogen agonists. *Reg Toxicol Pharmacol.* 28; 133-149.
- Bentov Y, Casper RF. (2013): The aging oocyte-can mitochondrial function be improved? *Fertil Steril.* 99; 18-22.
- Bitto A, Burnett BP, Polito F, Marini H, Levy RM, Armbruster MA, Minutoli L, Di Stefano V, Irrera N, Antoci S, Granese R, Squadrito F, Altavilla D. (2008): Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol. *Br J Pharmacol.* 155; 896-905.
- Bliedtner A, Zierau O, Albrecht S, Liebhaber S, Vollmer G. (2010): Effects of genistein and estrogen receptor subtype-specific agonists in ArKO mice following different administration routes. *Mol Cell Endocrinol.* 314; 41-52.
- Borras C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE, Vina J. (2006): Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. *FASEB J.* 20; 2136-2138.

- Bowen-Shauver JM, Gibori G. (2004): The corpus luteum of pregnancy. In: Leung PC, Neill JD, eds. The ovary. San Diego: Elsevier Academic Press. p: 201-230.
- Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985): The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 beta-estradiol. *Endocrinology*. 117; 2229-37.
- Britt KL, Findlay JK. (2002): Estrogen actions in the ovary revisited. *J Endocrinol*. 175; 269-276.
- Brössner C, Petritsch K, Fink K, Auprich M, Madersbacher S, Adlercreutz H, Rehak P, Petritsch P. (2004): Phytoestrogen tissue levels in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer and their association with prostatic diseases. *Urology*. 64; 707-11.
- Budakoğlu I, Ozcan C, Eroğlu D, Yanik F. (2007): Quality of life and postmenopausal symptoms among women in a rural district of the capital city of Turkey. *Gynecol Endocrinol*. 23; 404-9.
- Burrows HL, Douglas KR, Seasholtz AF, Camper SA. (1999): Genealogy of the Anterior Pituitary Gland: Tracing a Family Tree. *Trends Endocrinol Metab*. 10; 343-352.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. (1974): Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*. 94; 1704-8.
- Cagnacci A, Cannoletta M, Palma F, Zanin R, Xholli A, Volpe A. (2012): Menopausal symptoms and risk factors for cardiovascular disease in postmenopause. *Climacteric*. 15; 157-62.
- Carson RS, Richards JS, Kahn LE. (1981): Functional and morphological differentiation of theca and granulosa cells during pregnancy in the rat: dependence on increased basal luteinizing hormone activity. *Endocrinology*. 9; 1433-41.
- Cassidy A, Bingham S, Setchell K. (1995): Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. *Br J Nutr*. 74; 587-601.
- Cedars MI. (2013): Biomarkers of ovarian reserve-do they predict somatic aging? *Semin Reprod Med*. 31; 443-51.
- Chedraui P, Blümel JE, Baron G, Belzares E, Bencosme A, Calle A, Danckers L, Espinoza MT, Flores D, Gomez G, Hernandez-Bueno JA, Izaguirre H, Leon-Leon P, Lima S, Mezones-Holguin E, Monterrosa A, Mostajo D, Navarro D, Ojeda E, Onatra W, Royer M, Soto E, Tserotas K. (2008): Impaired quality of life among middle aged women: a multicentre Latin American study. *Maturitas*. 61; 323-9.

- Cheville FN: (2009): Cell Death. In *Ultrastructural Pathology: The Comparative Cellular Basis of Disease*, 2<sup>nd</sup> Edition. Wiley-Blackwell. p 1-430.
- Childs GV, Unabia G, Tibolt R, Lloyd JM. (1987): Cytological factors that support nonparallel secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the estrous cycle. *Endocrinology*. 121; 1801-1813.
- Choi JS, Song J. (2009): Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats. *Nutrition*. 25; 676-85.
- Christenson LK, Strauss JF 3rd. (2000): Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta*. 2000 1529; 175-87.
- Clarkson TB. (2002): Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr*. 132; 566-569.
- Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. (1995): Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod*. 58; 217-225.
- Cooper RL, Conn PM, Walker RF. (1980): Characterization of the LH surge in middle-aged female rats. *Biol Reprod*. 23; 611-615.
- Cotroneo MS, Wang J, Eltoum IEA, Lamartiniere CA. (2001): Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. *Mol Cell Endocrinol*. 173; 135-145.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, et al. (1999): Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*. 286; 2328-2331.
- Couse JF, Korach KS. (1999): Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*. 20; 358-417.
- Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. (1997): Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse.
- Craig J, Orisaka M, Wang H, Orisaka S, Thompson W, Zhu C, Kotsuji F, Tsang BK. (2007): Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Front Biosci*. 12; 3628-3639.
- Cushman LJ, Camper SA. (2001): Molecular basis of pituitary dysfunction in mouse and human. *Mamm. Genome*. 12; 485-94.

- Dalais FS, Rice GE, Wahlqvist ML, Grehan M, Murkies AL, Medley G, Ayton R, Strauss BJ. (1998): Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. *Climacteric*. 1; 124-129.
- Dang ZC. (2009): Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action. *Obes Rev*. 10; 342-9.
- Danilovich N, Javeshghani D, Xing W, Sairam MR. (2002): Endocrine alterations and signaling changes associated with declining ovarian function and advanced biological aging in follicle-stimulating hormone receptor haploinsufficient mice. *Biol Reprod*. 67; 370-378.
- Danilovich N, Sairam MR. (2002): Haploinsufficiency of the follicle-stimulating hormone receptor accelerates oocyte loss inducing early reproductive senescence and biological aging in mice. *Biol Reprod*. 67; 361-369.
- de Lima Toccafondo Vieira M, Duarte RF, Campos LM, Nunan Ede A. (2008): Comparison of the estrogenic potencies of standardized soy extracts by immature rat uterotrophic bioassay. *Phytomedicine*. 15; 31-37.
- Demay F, Geffroy S, Tiffoche C, de Monti M, Thieulant ML. (1996): Cell-specific mechanisms of estrogen receptor in the pituitary gland. *Cell Biol Toxicol*. 12: 317-24.
- DePaolo LV. (1987): Age-associated increases in serum follicle-stimulating hormone levels on estrus are accompanied by a reduction in the ovarian secretion of inhibin. *Exp Aging Res*. 13; 3-7.
- Deroo BJ, Korach KS. (2006). Estrogen receptors and human disease. *The J Clin Invest*. 116; 561-570.
- Doerge DR, Churchwell MI, Chang HC, Newbold RR, Delclos KB. (2001): Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod Toxicol*. 15; 105-110.
- Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJG. (2001): Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc*. 204; 232-246.
- Doshi SB, Agarwal A. (2013): The role of oxidative stress in menopause. *J Mid-life Health*. 4; 140-6.
- Drummond AE, Baillie AJ, Findlay JK. (1999a): Ovarian estrogen receptor alpha and beta mRNA expression: impact of development and estrogen. *Mol Cell Endocrinol*. 149; 153-161.

- Drummond AE, Findlay JK. (1999b): The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 151; 57-64.
- Drummond AE, Fuller PJ. (2010): The importance of ERbeta signalling in the ovary. *J Endocrinol.* 205; 15-23.
- Drummond AE, Fuller PJ. (2012): Ovarian actions of estrogen receptor- $\beta$ : an update. *Semin Reprod Med.* 30; 32-8.
- Duncan AM, Merz BE, Xu X, Nagel TC, Phipps WR, Kurzer MS. (1999): Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 84; 192-7.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. (2000): Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development.* 127; 4277-4291.
- El Touny LH, Banerjee PP. (2009): Identification of a biphasic role for genistein in the regulation of prostate cancer growth and metastasis. *Cancer Res.* 69; 3695-703.
- Espey LL, Richards JS. (2002): Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat. *Biol Reprod.* 67; 1662-1670.
- Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS. (2009): MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science.* 324; 938-41.
- Faqi AS, Johnson WD, Morrissey RL, McCormick DL. (2004): Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *Reprod Toxicol.* 18; 605-611.
- Filardo EJ, Thomas P. (2005): GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab.* 16; 362-7.
- Finn CA, Booth JE. (1977): The physiological effects of estrogen and progesterone. In: S. Zuckerman, BJ. Weir, eds. *The ovary.* New York, London: Academic Press. p151-225.
- Fortune JE. (2003): The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 78; 135-163.
- Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. (1993): Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90; 2690-2694.

- Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Liu Z, Gracia CR. (2011): Duration of menopausal hot flushes and associated risk factors. *Obstet Gynecol.* 117; 1095-104.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. (2000): Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80; 1523-631.
- Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, Sanchez-Criado JE. (1998): Ovarian follicle macrophages: Is follicular atresia in the immature rat a macrophage-mediated event? *Biol Reprod.* 58,52-59.
- Geller SE, Studee L. (2005): Botanical and dietary supplements for menopausal symptoms: what works, what does not. *J Womens Health (Larchmt).* 14; 634-49.
- Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. (2011): Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. *Reprod Biol Endocrinol.* 9:23.
- Gong L, Li Y, Nedeljkovic-Kurepa A, Sarkar FH. (2003): Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene.* 22; 4702-9.
- González M, Reyes R, Damas C, Alonso R, Bello AR. (2008): Oestrogen receptor alpha and beta in female rat pituitary cells: an immunochemical study. *Gen Comp Endocrinol.* 155; 857-68.
- Greenwald GS, Roy SK. (1994): Follicular development and its control. In: *The physiology of reproduction*, E. Knobil, J. D. Neill eds. Raven Press, Ltd., New York. p 629-724.
- Grodstein F, Colditz GA, Stampfer MJ. (1994): Postmenopausal hormone use and cholecystectomy in a large prospective study. *Obstet Gynecol.* 83; 5-11.
- Guida M, Zullo F, Buonomo B, Marra ML, Palatucci V, Pascale R, Visconti F, Guerra G, Spinelli M, Di Spiezio Sardo A. (2012): Estrogens and neuropeptides in postmenopausal women: an update. *Transl Med UniSa.* 3; 25-41.
- Gundersen HJ, Jensen EB. (1987): The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 147; 229-263.
- Gundersen HJ. (1986): Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc.* 143; 3-45.
- Guo Q, Rimbach G, Moini H, Weber S, Packer L. (2002): ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology.* 179; 171-180.

- Gwin J, Drews N, Ali S, Stamschror J, Sorenson M, Rajah TT. (2011): Effect of genistein on p90RSK phosphorylation and cell proliferation in T47D breast cancer cells. *Anticancer Res.* 31; 209-14.
- Hammond GL. (1995): Potential functions of plasma steroid-binding proteins. *Trends Endocrinol Metab.* 6; 298-304.
- Hanukoglu I. (1992): Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 43; 779-804.
- Heaney AP, Fernando M, Melmed S. (2002): Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. *J Clin Invest.* 109; 277-83.
- Highman B, Roth SI, Greenman DL. (1981): Osseous changes and osteosarcomas in mice continuously fed diets containing diethylstilbestrol or 17 $\beta$ -estradiol. *J Natl Cancer Inst.* 67; 653-662.
- Hirshfield AN. (1991): Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 124; 43-101.
- Hirvonen J, Rajalin AM, Wohlfahrt G, Adlercreutz H, Wähälä K, Aarnisalo P. (2011): Transcriptional activity of estrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) is stimulated by the phytoestrogen equol. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 123; 46-57.
- Holzbeierlein JM, McIntosh J, Thrasher JB. (2005): The role of soy phytoestrogens in prostate cancer. Review. *Curr Opin Urol.* 15; 17-22.
- Hooper L, Ryder JJ, Kurzer MS, Lampe JW, Messina MJ, Phipps WR, Cassidy A. (2009): Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 15; 423-40.
- Hosokawa K, Ottander U, Wahlberg P, Ny T, Cajander S, Olofsson IJ. (2001): Dominant expression and distribution of oestrogen receptor beta over oestrogen receptor alpha in the human corpus luteum. *Mol Hum Reprod.* 7; 137-145
- Howard CV, Reed MG. (2005): *Unbiased Stereology. Second Edition.* Garland Science/Bios scientific publishers, New York. p: 1-277.
- Hsueh AJ, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H. (1996): Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res.* 51; 433-455.

- Hughes CL Jr, Chakinala MM, Reece SG, Miller RN, Schomberg DW Jr, Basham KB (1991): Acute and subacute effects of naturally occurring estrogens on luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat: Part 2. *Reprod Toxicol.* 5; 133-137.
- Hughes CL. (1998): Phytochemical Mimicry of Reproductive Hormones and Modulation of Herbivore Fertility by Phytoestrogens. *Environ Health Perspect.* 78; 171-174.
- Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Goldbohm RA, Graham S, Howe GR. (1996): Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer-a pooled analysis. *N Engl J Med.* 334; 356-361.
- Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. (2006): FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cellular signalling.* 18; 1351-9.
- Hutchins AM, Lampe JW, Martini MC, Campbell DR, Slavin JL. (1995): Vegetables, fruits, and legumes: effect on urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion. *J Am Diet Assoc.* 95; 769-774.
- Ikeda K, Arai Y, Otsuka H, Kikuchi A, Kayama F. (2004): Estrogen and phytoestrogen regulate the mRNA expression of adrenomedullin and adrenomedullin receptor components in rat uterus. *Mol Cell Endocrinol.* 223; 27-34.
- Ismail IA, Kang KS, Lee HA, Kim JW, Sohn YK. (2007): Genistein-induced neuronal apoptosis and G2/M cell cycle arrest is associated with MDC1 up-regulation and PLK1 down-regulation. *Eur J Pharmacol.* 575; 12-20.
- Jamadar-Shroff V, Papich MG, Suter SE. (2009): Soy-derived isoflavones inhibit the growth of canine lymphoid cell lines. *Clin Cancer Res.* 15; 1269-76.
- Japon MA, Rubinstein M, Low MJ. (1994): In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J. Histochem. Cytochem.* 42; 1117-25.
- Jefferson WN, Padilla-Banks E, Clark G, Newbold RR. (2002): Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *J Chromatogr B.* 777; 179-189.
- Jefferson WN, Padilla-Banks E, Newbold RR. (2007): Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: genistein as an example. *Mol Nutr Food Res.* 51; 832-44.
- Jones EE, Naftolin F. (1990): Estrogen effects on the tuberoinfundibular dopaminergic system in the female rat brain. *Brain Res.* 510; 84-91.



- Juengel JL, Heath DA, Quirke LD, McNatty KP. (2006): Oestrogen receptor alpha and beta, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction*. 131; 81-92.
- Junqueira LC, Carneiro J. (2009): The Female Reproductive System. In *Basic histology, Text&Atlas 11<sup>th</sup> edition*. Publisher MsGraw-Hill. P 429-434.
- Kalaiselvan V, Kalaivani M, Vijayakumar A, Sureshkumar K., Venkateskumar K. (2010). Current knowledge and future direction of research on soy isoflavones as a therapeutic agents. *Pharmacognosy Reviews*. 4; 111-117.
- Kang NJ, Lee KW, Rogozin EA, Cho YY, Heo YS, Bode AM, Lee HJ, Dong Z. (2009): Equol, a metabolite of the soybean isoflavone daidzein, inhibits neoplastic cell transformation by targeting the MEK/ERK/p90RSK/activator protein-1 pathway. *J Biol Chem*. 282; 32856-66.
- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogen response: Phase 1. *Environ Health Perspect*. 109; 785-794
- Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: Dose-response study. *Environ Health Perspect*. 111; 1530-1549.
- Kao YC, Zhou C, Sherman M, Laughton CA, Chen S. (1998): Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environ Health Perspect*. 106; 85-92.
- Kida K, Baba E, Torii R, Kawate N, Hatoya S, Wijewardana V, Sugiura K, Sawada T, Tamada H, Inaba T. (2006): Lactoferrin expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra. *Theriogenology*. 66; 1325-33.
- Kim H, Peterson TG, Barnes S. (1998): Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *Am J Clin Nutr*. 68; 1418S-1425S.
- Kim MH. (2003): Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J Cell Biochem*. 89; 529-38.
- King MM, McCay PB. (1983): Modulation of tumor incidence and possible mechanisms of inhibition of mammary carcinogenesis by dietary antioxidants. *Cancer Res*. 43; 2485-2490.

- Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR. (1996): Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 81; 2742-2745.
- Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K. (2003): Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J Agric Food Chem.* 51; 7632-7635.
- Kotsopoulos D, Dalais FS, Liang YL, McGrath BP, Teede HJ. (2000): The effects of soy protein containing phytoestrogens on menopausal symptoms in postmenopausal women. *Climacteric.* 3; 161-7.
- Kouki T, Kishitake M, Okamoto M, Oosuka I, Takebe M, Yamanouchi K. (2003): Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. *Horm Behav.* 44; 140-145.
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. (1998): Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95; 15677-15682.
- Krol W, Czuba ZP, Threadgill MD, Cunningham BD, Pietsz G. (1995): Inhibition of nitric oxide (NO) production in murine macrophages by flavones. *Biochem Pharmacol.* 50; 1031-1035.
- Kuiper GG, Gustafsson JA. (1997): The novel estrogen receptor-b subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett.* 410; 8-90.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, Van Der Burg B, Gustafsson J. (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology* 139; 4252-4263.
- Kulling SE, Lehmann L, Metzler M. (2002): Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 777; 211-218.
- Kurzer MS, Xu X. (1997): Dietary phytoestrogens. Review. *Annu Rev Nutr.* 17; 353-381.
- Lee JY, Lee DC. (2013): Muscle strength and quality are associated with severity of menopausal symptoms in peri- and post-menopausal women. *Maturitas.* 76; 88-94.
- Lerner SP, Meredith S, Thayne WV, Butcher RL. (1990): Age-related alterations in follicular development and hormonal profiles in rats with 4-day estrous cycles. *Biol Reprod.* 42; 633-8.

- Lethaby A, Farquhar C, Sarkis A, Roberts H, Jepson R, Barlow D. (2002): Hormone replacement therapy in postmenopausal women: endometrial hyperplasia and irregular bleeding. *Cochrane Database Syst Rev.* 2: CD000402.
- Lewis RW, Brooks N, Milburn GM, Soames A, Stone S, Hall M, Ashby J. (2003): The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. *Toxicol Sci.* 71; 74-83.
- Li M, Zhang Z, Hill DL, Chen X, Wang H, Zhang R. (2005): Genistein, a dietary isoflavone, down-regulates the MDM2 oncogene at both transcriptional and posttranslational levels. *Cancer Res.* 65; 8200-8.
- Li Y, Kong D, Bao B, Ahmad A, Sarkar FH. (2011): Induction of cancer cell death by isoflavone: the role of multiple signaling pathways. *Nutrients* 3; 877-896.
- Li Y, Kucuk O, Hussain M, Abrams J, Cher ML, Sarkar FH. (2006): Antitumor and antimetastatic activities of docetaxel are enhanced by genistein through regulation of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/MMP-9 signaling in prostate cancer. *Cancer Research.* 66; 4816-4825.
- Lieberman ME, Maurer RA, Gorski J. (1978): Estrogen control of prolactin synthesis in vitro *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75; 5946-5949.
- Liehr GJ. (2000): Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev.* 21; 40-54.
- Lønning PE, Geisler J. (2008): Aromatase inhibitors: assessment of biochemical efficacy measured by total body aromatase inhibition and tissue estrogen suppression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 108; 196-202.
- Lovren M, Pantić V. (1987): Ovarian follicle development and atresia in rats neonatally treated with estrogen. *Acta Vet.* 37; 81-92.
- Lovren M, Pantić V. (1989): Reaction of the ovarian tissues in rats treated with estrogen during postnatal development. *Acta Vet.* 39; 71-80.
- Lovren M, Sekulić M. (2000): The sensitivity of gonadotrophic cells to steroid and peptide hormones. *Jugoslov Med Biochem.* 19; 1-13.
- Lu JK, Gilman DP, Meldrum DR, Judd HL, Sawyer CH. (1981): Relationship between circulating estrogens and the central mechanisms by which ovarian steroids stimulate luteinizing hormone secretion in aged and young female rats. *Endocrinology.* 108; 836-841.
- Lu LJ, Anderson KE, Grady JJ, Nagamani M. (1996a): Effects of soya consumption for one month on steroid hormones in premenopausal women: implications for breast cancer risk reduction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5; 63-70.

- Lu LJ, Lin SN, Grady JJ, Nagamani M, Anderson KE. (1996b): Altered kinetics and extent of urinary daidzein and genistein excretion in women during chronic soya exposure. *Nutr Cancer*.26; 289-302.
- Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, Hochberg RB, McKay L, Renoir JM, Weigel NL, Wilson EM, McDonnell DP, Cidlowski JA. (2006): International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev*. 58; 782-797.
- Malaivijitnond S, Chansri K, Kijkuokul P, Urasopon N, Cherdshewasart W. (2006): Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herb. *J Ethnopharmacol*. 107; 354-60.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995):The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83; 835-839.
- Mani AM, Fenwick MA, Cheng Z, Sharma MK, Singh D, Wathes DC. (2010): IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction*. 139; 139-51.
- Markström E, Svensson ECh, Shao R, Svanberg B, Billig H. (2002): Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 123; 23-30.
- Masutomi N, Shibutani M, Takagi H, Uneyama C, Lee KY, Hirose M. (2004): Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch Toxicol*. 78; 232-40.
- Matsuura S, Itakura A, Ohno Y, Nakashima Y, Murata Y, Takeuchi M, Kobayashi M, Mizutani S. (2004): Effects of estradiol administration on fetoplacental growth in rat. *Early Hum Develop*. 44; 47-56.
- Mazur W, Adlercreutz H. (1998): Naturally occurring oestrogens in food. *Pure & Appl. Chem*. 70; 1759-1776.
- McClain MR, Wolz E, Davidovich A, Pfannkuch F, Edwards JA, Bausch J. (2006): Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats *Food Chem Toxicol*. 44; 56-80.
- McGarvey C, Cates PA, Brooks A, Swanson IA, Milligan SR, Coen CW, O'Byrne KT. (2001): Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology*. 142; 1202-1208.

- McGee EA, Hsueh AJ. (2000): Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21; 200-214.
- Medigović I, Manojlović-Stojanoski M, Trifunović S, Ristić N, Milošević V, Zikić D, Nestorović N. (2012a): Effects of genistein on gonadotropic cells in immature female rats. *Acta Histochem.* 114; 270-5.
- Medigović I, Ristić N, Trifunović S, Manojlović-Stojanoski M, Milošević V, Zikić D, Nestorović N. (2012b): Genistein affects ovarian folliculogenesis: a stereological study. *Microsc Res Tech.* 75; 1691-9.
- Medigović I. (2013): Effects of genistein on gonadotropic cells in middle-aged female rats. 11th Multinational Congress on Microscopy, Regensburg, Germany. August 25–30. *Proceedings.* p183-184.
- Meijs-Roelofs HM, Kramer P. (1979): Maturation of the inhibitory feedback action of oestrogen on follicle-stimulating hormone secretion in the immature female rat: a role for alpha-foetoprotein. *J Endocrinol.* 81; 199-208.
- Mesiano S, Katz SL, Lee JY, Jaffe RB. (1999): Phytoestrogens alter adrenocortical function: genistein and daidzein suppress glucocorticoid and stimulate androgen production by cultured adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 84; 2443-2448.
- Messina M. (2010): Insights gained from 20 years of soy research. *J Nutr.* 140; 2289S-2295S.
- Mitchner NA, Garlick C, Ben-Jonathan N. (1998): Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology.* 139; 3976-3983.
- Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F. (2002): Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res.* 17; 1904-12.
- Morel G, Raynaud JP, Dubois PM (1981): Ultrastructural localization of estradiol and moxestrol in the gonadotropic cells of rat by immunocytochemistry after cryo-ultramicrotomy: evidence for hormonal specificity *Experientia.* 37; 98-100.
- Morris JF, Christian HC, Chapman LP, Epton MJ, Buckingham JC, Ozawa H, Nishi M, Kawata M. (2002): Steroid effects on secretion from subsets of lactotrophs: role of folliculo-stellate cells and annexin 1. *Arch Physiol Biochem.* 110; 54-61.
- Murai I, Ben-Jonathan N. (1990): Acute stimulation of prolactin release by estradiol: mediation by the posterior pituitary. *Endocrinology.* 126; 3179-84.

- Neal-Perry GS, Zeevalk GD, Santoro NF, Etgen AM. (2005): Attenuation of preoptic area glutamate release correlates with reduced luteinizing hormone secretion in middle-aged female rats. *Endocrinology*. 146; 4331-4339.
- Nedvidkova J, Haluzik M, Pacak K, Schreiber V, Starka L. (1998): Estrogenic effect of estradiol-sulfamate on the male rat anterior pituitary. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 67; 359-362.
- Nemos C, Delage-Mourroux R, Jouvenot M, Adami P. (2004): Onset of direct 17 $\beta$ -estradiol effects on proliferation and *c-fos* expression during oncogenesis of endometrial glandular epithelial cells. *Exper Cell Res* 296; 109-122.
- Nephew KP, Long X, Osborne E, Burke KA, Ahluwalia A, Bigsby RM. (2000): Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types. *Biol Reprod*. 62; 168-77.
- Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E, Haseman J. (2004): Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. *Reprod Toxicol*. 18; 399-406.
- Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E, Walker VR, Pena DS. (2001): Cell response endpoints enhance sensitivity of the immature mouse uterotrophic assay. *Reprod Toxicol*. 15; 245-252.
- Niswender GD. (2002): Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*. 123; 333-339.
- Nothnagle M, Taylor JS. (2004): Vaginal estrogen preparations for relief of atrophic vaginitis. *Am Fam Physician*. 69; 2111-2.
- Nynca A, Jablonska O, Slomczynska M, Petroff BK, Ciereszko RE. (2009): Effects of phytoestrogen daidzein and estradiol on steroidogenesis and expression of estrogen receptors in porcine luteinized granulosa cells from large follicles. *J Physiol Pharmacol*. 60; 95-105.
- Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, Sumpter JP, Ashby J. (1997): The rodent uterotrophic assay: Critical protocol features, studies with nonyl phenols and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Reg Toxicol Pharmacol*. 25; 176-188.
- OECD. (2001): Final Report of the Phase 1 of the Validation Study of the Uterotrophic Assay. ENV/JM/TG/EDTA(2001)1. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.

- OECD. (2007): Guideline 440 for the testing of chemical: uterotrophic bioassay in rodents: a short-term screening test for estrogenic properties.
- OECD.(2003): Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environment, Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment, No. 38. ENV/JM/MONO(2003)I, Paris:OECD
- Ohno S, Nakajima Y, Inoue K, Nakazawa H, Nakajin S. (2003): Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats *Life Sci.* 74; 733-742.
- Ohno S, Shinoda S, Toyoshima S, Nakazawa H, Makino T, Nakajin S. (2002): Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 80; 355-363.
- Ojeda SR, Urbanski HE. (1994): Puberty in the rat. In: Knobil E, Neill J. eds. *The Physiology of Reproduction*, 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Raven Press. p: 363-409.
- Osman P. (1985): Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. *J Reprod Fertil.* 73; 261-270.
- Ouchi H, Ishiguro H, Ikeda N, Hori M, Kubota Y, Uemura H. (2005): Genistein induces cell growth inhibition in prostate cancer through the suppression of telomerase activity. *Int J Urol.* 12; 73-80.
- Ouslander JG. (1997): Aging and the lower urinary tract. *Am J Med Sci.* 14; 214-8.
- Owens W, Ashby J. (2002): Critical review and evaluation of the uterotrophic bioassay for identification of possible estrogen agonists and antagonists: In support of the validation of the OECD uterotrophic protocols for the laboratory rodent. *Critical Review in Toxicology.* 32; 445-520.
- Owens W, Koeter H. (2003): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: An overview. *Environ Health Perspect.* 111; 1527-1529.
- Pandey AV, Miller WL. (2005): Regulation of 17,20 lyase activity by cytochrome b5 and by serine phosphorylation of P450c17. *J Biol Chem.* 280; 13265-71.
- Papa M, Mezzogiorno V, Bresciani F, Weisy A. (1991): Estrogen induces c-fos expression specifically in luminal and glandular epithelia of adult rat uterus. *Biochem Biophys Res Commun.* 175; 480-485.

- Patisaul HB, Melby M, Whitten PL, Young LJ. (2002): Genistein affects ER beta-but not ER alpha-dependent gene expression in the hypothalamus. *Endocrinology*. 143; 2189-97.
- Patisaul HB. (2005): Phytoestrogen action in the adult and developing brain. Review. *J Neuroendocrinol*. 17; 57-64.
- Pelletier G, El-Alfy M. (2000): Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab*. 85; 4835-4840.
- Penza M, Montani C, Romani A, Vignolini P, Pampaloni B, Tanini A, Brandi ML, Alonso-Magdalenalena P, Nadal A, Ottobrini L, Parolini O, Bignotti E, Calza S, Maggi A, Grigolato PG, Di Lorenzo D. (2006): Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-depe and gender-specific manner. *Endocrinology* 147; 5740-5751.
- Perabo FG, Von Löw EC, Ellinger J, von Rücker A, Müller SC, Bastian PJ. (2008): Soy isoflavone genistein in prevention and treatment of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 11; 6-12.
- Peterson G, Barnes S. (1991): Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 179; 661-667.
- Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP. (2000): Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr*. 130; 1675-1681.
- Pilšáková L, Riečanský I, Jagla F. (2010): The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res*. 59; 651-64.
- Polkowska J, Ridderstrale Y, Wańkowska M, Romanowicz K, Misztal T, Madej A. (2004): Effects of intracerebroventricular infusion of genistein on gonadotrophin subunit mRNA and immunoreactivity of gonadotrophins and oestrogen receptor-alpha in the pituitary cells of the anoestrous ewe. *J Chem. Neuroanat*. 28; 217-24.
- Price KR, Fenwick GR. (1985): Naturally occurring oestrogens in foods-a review. *Food Addit Contam*. 2; 73-106.
- Prossnitz ER, Barton M. (2009): Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 89; 89-97.



- Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, Maudelonde T. (1998): Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.* 58; 5367-73.
- Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. (2004): Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci.* 82; 40-52.
- Quirk SM, Cowan RG, Harman RM. (2006): The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle. *J Endocrinol.* 189; 441-53.
- Raghunathan M, Zubovski Y, Venable RM, Pastor RW, Nagle JF, Tristram-Nagle S. (2012): Structure and elasticity of lipid membranes with genistein and daidzein bioflavonoids using X-ray scattering and MD simulations. *J Phys Chem B.* 116; 3918-27.
- Raines EW, Ross R. (1995): Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy, Review. *J Nutr* 125; 624-630.
- Rasbach KA, Schnellmann RG. (2008): Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 325; 536-43.
- Rimoldi G, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W. (2007): Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina. *Environ Health Perspect.* 115; 62-8.
- Ristić N, Nestorović N, Manojlović-Stojanoski M, Filipović B, Šošić-Jurjević B, Milošević V, Sekulić M. (2008): Maternal dexamethasone treatment reduces ovarian follicle number in neonatal rat offspring. *J Microsc.* 232; 549-557.
- Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. (2001): Intraovarian actions of oestrogen. *J Endocrinol.* 122; 215-26.
- Rosser M, Chorich L, Howard E, Zamorano P, Mahesh VB. (1993): Changes in rat uterine estrogen receptor messenger ribonucleic acid levels during estrogen- and progesterone-induced estrogen receptor depletion and subsequent replenishment. *Biol Reprod.* 48; 89-98.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 288; 321-33.

- Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wähälä K, Williamson G, Cassidy A. (2003): Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr.* 89; 45-58.
- Sahlin L, Masironi B, Akerberg S, Eriksson H (2006): Tissue- and hormone-dependent progesterone receptor distribution in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol.* 11; 4-47.
- Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG. (1997): Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr.* 127; 263-9.
- Sar M, Welsch F. (1999): Differential expression of estrogen receptor beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology.* 140; 963-971.
- Schierbeck LL, Rejnmark L, Tofteng CL, Stilgren L, Eiken P, Mosekilde L, Køber L, Jensen JE. (2012): Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial. *BMJ.* 345; e6409.
- Schreihofer DA, Stoler MH, Shupnik MA. (2000): Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ERalpha protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology.* 141; 2174-2184.
- Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. (2002): The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr.* 132; 3577-3584.
- Setchell KD, Cassidy A. (1999): Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr.* 129; 758-767.
- Setchell KD. (1998): Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr.* 68; 1333-1346.
- Shin JI, Lee YK, Kim YM, Hwang JT, Park OJ. (2007): Possible link between NO concentrations and COX-2 expression in systems treated with soy-isoflavones. *Ann N Y Acad Sci.* 1095; 564-573.
- Shirwalkar H, Modi DN, Maitra A. (2007): Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles. *Mol Cell Endocrinol.* 272; 22-37.
- Shull JD, Gorski J. (1985): Estrogen regulates the transcription of the rat prolactin gene in vivo through at least two independent mechanisms. *Endocrinology.* 116; 2456-2462.
- Shull JD, Spady TJ, Snyder MC, Johansson SL, Pennington KL. (1997): Ovary intact, but not ovariectomized female ACI rats treated with 17 $\beta$ -estradiol rapidly develop mammary carcinoma. *Carcinogenesis.* 18; 1595-1601.

- Silva JM, Price CA. (2000): Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod.* 62; 186-91.
- Singh P, Oehler MK. (2010): Hormone replacement after gynaecological cancer. *Maturitas.* 65; 190-7.
- Souza PL, Russell PJ, Kearsley JH, Howes LG. (2010): Clinical pharmacology of isoflavones and its relevance for potential prevention of prostate cancer. *Nutrition Reviews.* 68; 542-555.
- Spuch C, Diz-Chaves Y, Pérez-Tilve D, Mallo F. (2006): Fibroblast growth factor-2 and epidermal growth factor modulate prolactin responses to TRH and dopamine in primary cultures. *Endocrine.* 29; 317-24.
- Staar S, Richter DU, Makovitzky J, Briese V, Bergemann C. (2005): Stimulation of endometrial glandular cells with genistein and daidzein and their effects on ERalpha- and ERbeta-mRNA and protein expression. *Anticancer Res.* 25; 1713-8.
- Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N. (1997): The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinology.* 138; 1780-6.
- Stevenson S, Thornton J. (2007): Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs. *Clin Interv Aging.* 2; 283-97.
- Stocco C, Telleria C, Gibori G. (2007): The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev.* 28; 117-49.
- Stocco DM. (2001); StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol.* 63; 193-213.
- Suetsugi M, Su L, Karlsberg K, Yuan YC, Chen S. (2003): Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors. *Mol Cancer Res.* 1; 981-91.
- Swami S, Krishnan AV, Moreno J, Bhattacharyya RS, Gardner C, Brooks JD, Peehl DM, Feldman D. (2009): Inhibition of prostaglandin synthesis and actions by genistein in human prostate cancer cells and by soy isoflavones in prostate cancer patients. *Int J Cancer.* 124; 2050-9.
- Takekawa S, Matsui T, Arakawa Y. (2006): The protective effect of the soybean polyphenol genistein against stress-induced gastric mucosal lesions in rats, and its hormonal mechanisms. *J Nutr Sci Vitaminol.* 52; 274-280.

- Takeuchi S, Takahashi T, Sawada Y, Iida M, Matsuda T, Kojima H. (2009): Comparative study on the nuclear hormone receptor activity of various phytochemicals and their metabolites by reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 32; 195-202.
- Teng CT, Beard C, Gladwell W. (2002): Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat, and hamster. *Biol Reprod*. 67; 1439-49.
- Tew BY, Xu X, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S. (1996): A diet high in wheat fiber decreases the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women. *J Nutr*. 126; 871-877.
- Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V, Adlercreutz H. (1998): Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95; 3106-3110.
- Tinwell H, Soames AR, Foster JR, Ashby J. (2000): Estradiol-Type Activity of Coumestrol in Mature and Immature Ovariectomized Rat Uterotrophic Assays. *Environ Health Perspect*. 108; 631-634
- Ullrich A, Schlessinger J. (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 61; 203-212.
- Valbuena D, Martin J, Luis de Pablo J, Remohi J, Pellicer A, Simon C. (2001): Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertility and Sterility*. 76; 962-968.
- Valentini FA, Robain G, Marti BG. (2011): Urodynamics in women from menopause to oldest age: what motive? What diagnosis? *Int Braz J Urol*. 37; 100-7.
- Varagić V, Milošević M. (1995): Farmakologija hormona. U *Farmakologija*. Elit Medica, Beograd. p: 410-457.
- Vos JG, Dybing E, Grem HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD. (2000): Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology* 30; 71-131.
- Walker HA, Dean TS, Sanders TA, Jackson G, Ritter JM, Chowienzyk PJ. (2001): The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilation of human forearm vasculature with similar potency to 17beta-estradiol. *Circulation*. 103; 258-62.

- Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG (1992): Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*. 131; 1458-1466.
- Watson CS, Alyea RA, Jeng YJ, Kochukov MY. (2007): Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues PMCID: 17601655. *Mol Cell Endocrinol*. 274; 1-7.
- Watson CS, Jeng YJ, Kochukov MY (2010): Nongenomic Signaling Pathways of Estrogen Toxicity. *Toxicological sciences*. 115; 1–11.
- Westwood FR. (2008): The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol*. 36; 375-84.
- Whitehead SA, Cross JE, Burden C, Lacey M. (2002): Acute and chronic effects of genistein, tyrphostin and lavendustin A on steroid synthesis in luteinized human granulosa cells *Hum Reprod*. 17; 589-594.
- Wilson ME, Price Jr RH, Handa RJ. (1998): Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid expression in the pituitary gland. *Endocrinology*. 139; 5151-6.
- Wise PM. (1998): Female reproductive aging. In: Mobbs C.V, Hof P.R. eds. *Functional Endocrinology of aging*. *Intrdiscipl. Top. Geront. Basel: Karger*. 29; 89-104.
- Wocławek-Potocka I, Mannelli C, Boruszewska D, Kowalczyk-Zieba I, Waśniewski T, Dariusz J. Skarżyński DJ. (2013): Diverse Effects of Phytoestrogens on the Reproductive Performance: Cow as a Model. *International Journal of Endocrinology. Review*. Volume 2013, Article ID 650984, 15 pages.
- Wójcik-Gładysz A, Romanowicz K, Misztal T, Polkowska J, Barcikowski B. (2005): Effects of intracerebroventricular infusion of genistein on the secretory activity of the GnRH/LH axis in ovariectomized ewes. *Anim Reprod Sci*. 86; 221-35.
- Xu L, Bergan RC. (2006): Genistein Inhibits Matrix Metalloproteinase Type 2 Activation and Prostate Cancer Cell Invasion by Blocking the Transforming Growth Factor-Mediated Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2–27-kDa Heat Shock Protein Pathway. *Mol Pharmacol*. 70; 869-877.
- Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002): Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given diets of different phytoestrogen content and the ovarian change with ICI 182,780 or antide. *Arch Toxicol*. 76; 11: 613-20.

- Yamashita Y, Kawada S, Nakano H. (1990): Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem Pharmacol.* 39; 737-744.
- Yan GR, Xiao CL, He GW, Yin XF, Chen NP, Cao Y, He QY. (2010): Global phosphoproteomic effects of natural tyrosine kinase inhibitor, genistein, on signaling pathways. *Proteomics.* 10; 976-86.
- Yang MY, Rajamahendran R. (2000): Involvement of apoptosis in the atresia of nonovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. *Biol Reprod.* 63; 1313-21.
- Zhou Y, Shughrue PJ, Dorsa DM. (1995): Estrogen receptor protein is differentially regulated in the preoptic area of the brain and in the uterus during the rat estrous cycle. *Neuroendocrinology.* 61; 276-83.
- Zhuang XL, Fu YC, Xu JJ, Kong XX, Chen ZG, Luo LL. (2010): Effects of genistein on ovarian follicular development and ovarian life span in rats. *Fitoterapia.* 81; 998-1002.

# BIOGRAFIJA

---

Ivana Medigović rođena je 19. 09. 1984. godine na Cetinju. Studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, završila je septembra 2008. Diplomski rad pod naslovom: “Uticaj estradiola i genisteina na morfološke i stereološke karakteristike jajnika nezrelih pacova” uradila je u Odeljenju za citologiju Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” pod mentorstvom dr Nataše Nestorović. Iste godine započela je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Biologija ćelija i tkiva. Od maja 2009 je zaposlena u istraživačkom zvanju, prvo kao istraživač pripravnik na projektu #143007 Ministarstva nauke Republike Srbije (Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, Odeljenje za Citologiju), a potom od 2011. kao istraživač saradnik na projektu #173009 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, Odeljenje za Citologiju).

Ivana Medigović je dobitnica nagrade fondacije Goran Ljubijankić za najbolji diplomski rad, odbranjen u 2008. godini. Od 2010. članica je Srpskog i Evropskog društva za mikroskopiju.

Autor je Ivana Medigović 7 radova u časopisima međunarodnog značaja, ima 15 saopštenja na međunarodnim i 2 na domaćim naučnim skupovima.