

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nataša M. Ristić

HIPOFIZNO-OVARIJALNI SISTEM PACOVA OD  
FETALNOG DO PERIPUBERTALNOG PERIODA ŽIVOTA  
NAKON INTRAUTERINOG IZLAGANJA  
DEKSAMETAZONU

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nataša M. Ristić

PITUITARY-OVARIAN AXIS OF RATS FROM FETAL TO  
PERIPUBERTAL PERIOD OF LIFE AFTER  
INTRAUTERINE EXPOSURE TO DEXAMETHASONE

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentori i član komisije:

Mentori: redovni profesor dr Vesna Koko Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet,  
naučni savetnik dr Verica Milošević Univerzitet u Beogradu, Institut za  
Biološka istraživanja "Siniša Stanković".

Član komisije: viši naučni saradnik dr Nataša Nestorović Univerzitet u Beogradu, Institut  
za Biološka istraživanja "Siniša Stanković".

Datum odbrane: \_\_\_\_\_ 2012. godine



*Imala sam čast i privilegiju da mi u osmišljavanju i realizaciji moje doktorske disertacije veliku pomoć pruže moje drage profesorke. Izražavam svoju zahvalnost*

*Prof. dr Vesni Koko, redovnom profesoru Biološkog fakulteta na profesionalnoj podršci, diskusijama i sugestijama koje su značajno doprinele kvalitetu ove teze.*

*Mentoru, dr Verici Milošević na ukazanom poverenju i podršci, na razumevanju, veri, strpljenju i istrajnosti, a posebno na nesebičnom ličnom i profesionalnom zalaganju i pomoći tokom rada na mojoj doktorskoj disertaciji.*

*dr Nataši Nestorović, uz koju sam kročila u svet nauke, zahvaljujem na znanju koje mi je prenela, na profesionalnoj podršci, diskusijama i dragocenim sugestijama u toku pisanja teze.*

*Mojoj dragoj kolegini Ivani Medigović, koja je u svakom trenutku bila spremna da saraduje, dugujem posebnu zahvalnost za svesrednu i nesebičnu pomoć kako u eksperimentalnom radu tako i tokom pisanja ove teze.*

*dr Vladimiru Ajdžanoviću se zahvaljujem na prijateljskoj podršci, korekcijama i korisnim sugestijama koje su mi pomogle tokom pisanja ove disertacije.*

*Mojim dragim kolegicama i kolegama iz laboratorije dr Milki Sekulić, dr Milici Manojlović Stojanoski, dr Svetlani Trifunović, dr Brankici Šošić-Jurjević, dr Branku Filipoviću kao i divnim mladim kolegama Jasmini Pantelić i Marku Mileru sa kojima sam tokom izrade teze lepo saradivala i bez kojih realizacija ove teze ne bi bila moguća, zahvaljujem na dugogodišnjoj podršci i prijateljstvu, konstruktivnim razgovorima i pomoći na koju sam uvek mogla da računam.*

## Hipofizno-ovarijalni sistem pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu

### Rezime

Tokom fetalnog razvića organizam prolazi kroz “kritične periode”, tokom kojih se dešavaju intenzivne ćelijske deobe, razvijanje i sazrevanje tkiva, organa i organskih sistema. Sredina u kojoj fetus raste i razvija se u velikoj meri određuje kvalitet razvojnog procesa, a svaka promena uslova dovodi do čitavog niza poremećaja, koji mogu biti praćeni smanjenjem fetalnog rasta ili IUGR (eng. Intrauterine growth retardation). Posledice IUGR su dugotrajne i ispoljavaju se u vidu različitih metaboličkih i kardiovaskularnih oboljenja u kasnijem životu. Fetalno okruženje na taj način određuje adultni fenotip, a njihova povezanost proučava se u okviru koncepta programiranja. Najčešće korišćeni eksperimentalni pristupi u proučavanju programiranja i efekta IUGR su dijeta majke koja vodi pothranjenosti, izazivanje stresne reakcije kod majke ili primena antenatalne terapije glukokortikoidima. Svaki od ovih eksperimentalnih modela različitim mehanizmima dovodi do izlaganja fetusa povećanoj koncentraciji glukokortikoida, koji u velikoj meri mogu da poremete fiziološki tok razvojnog procesa.

Cilj ove studije je bio da se ustanovi da li je izlaganje fetusa pacova od 16. do 18. dana gestacije sintetičkom glukokortikoidu deksametazonu programiralo razvoj i funkciju hipofizno-ovarijalnog sistema od fetalnog do peripubertalnog perioda života.

Predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji bili su fetusi i ženke pacova koje su od 16. do 18. dana gestacije izloženi deksametazonu.

Gravidne ženke pacova su tri uzastopna dana (od 16. do 18. dana gestacije) subkutano tretirane deksametazonom (*Dexamethasonis phosphat - Dx*, Krka, p.o., Novo Mesto) rastvorenom u fiziološkom rastvoru (0.9% NaCl), u dozi od 1.0, 0.5 i 0.5 mg Dx/kg

t.m./dan. Kontrolna grupa gravidnih ženki primala je u istom periodu, adekvatnu zapreminu fiziološkog rastvora.

Potomci gravidnih ženki koje su primale deksametazon (Dx), odnosno fiziološki rastvor (K) žrtvovani su u fetalnom (19. i 21. fetalni dan), neonatalnom (5. dan), infantilnom (16. dan) i peripubertalnom (38. dan) periodu života. Za obeležavanje gonadotropnih (FSH i LH) ćelija hipofize korišćeno je imunocitohemijsko bojenje, dok su preseći jajnika bojani histološkim bojenjem hematoksilin & eozin. Obojeni preseći hipofiza i jajnika stereološki i morfometrijski su analizirani, uz pomoć newCast stereološkog softverskog paketa. Dobijene su vrednosti volumena hipofize i jajnika, kao i apsolutni broj FSH i LH ćelija, njihov volumen, volumenska i numerička gustina. Koncentracija FSH i LH u cirkulaciji određena je biohemijskom RIA metodom. Pored volumena, u fetalnom jajniku određen je i apsolutni broj zdravih i degenerisanih germinativnih ćelija, a u jajniku ženki u postnatalnom periodu broj zdravih i atretičnih primordijalnih, primarnih, višeslojnih i antralnih folikula, kao i broj žutih tela. Dobijeni rezultati su statistički obrađeni.

Intrauterino izlaganje deksametazonu izazvalo je IUGR (eng. intrauterine growth retardation) koje se manifestuje značajno smanjenom ( $p < 0.05$ ) telesnom masom kod fetusa starih 21 dan, a značajno smanjenje ( $p < 0.05$ ) telesne mase zabeleženo je i u postnatalnim periodima

Volumen hipofize i adenohipoze značajno su smanjeni ( $p < 0.05$ ) u fetalnom, neonatalnom, infantilnom i peripubertalnom periodu života.

Analizirani stereološki parametri su se po istom obrascu menjali i kod FSH i kod LH ćelija, kod ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu u odnosu na kontrolu. Tako je broj gonadotropnih ćelija značajno smanjen ( $p < 0.05$ ) od fetalnog, preko neonatalnog, infantilnog do peripubertalnog perioda života, a volumen je značajno smanjen

( $p < 0.05$ ) samo 19. fetalnog dana. Volumenska i numerička gustina gonadotropnih ćelija značajno su smanjene ( $p < 0.05$ ) u neonatalnom i infantilnom periodu života.

Koncentracije FSH i LH su značajno smanjene ( $p < 0.05$ ) u neonatalnom, infantilnom i peripubertalnom periodu života kod ženki intrauterino izloženih deksametazonu u odnosu na kontrolu..

Nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu volumen jajnika se značajno smanjio ( $p < 0.05$ ) u svim ispitivanim periodima života u odnosu na kontrolne vrednosti.

Jajnik ženki pacova u fetalnom periodu nema definitivnu histološku organizaciju, tako da se u njima uočava prisustvo zdravih i degenerisanih germinativnih ćelija, i somatskih ćelija. Kvantifikacijom germinativnih ćelija, ustanovljeno je da je deksametazon u jajniku 19 dana starih fetusa uticao na značajno povećanje ( $p < 0.05$ ) broja degenerisanih na račun zdravih germinativnih ćelija, dok ukupan broj germinativnih ćelija nije promenjen u odnosu na kontrolu. U jajniku 21 dan starih fetusa, deksametazon je uticao na značajno smanjenje ( $p < 0.05$ ) ukupnog broja germinativnih ćelija, kao i na značajno smanjenje broja zdravih, a povećanje broja degenerisanih germinativnih ćelija ( $p < 0.05$ ).

U jajniku 5 i 16 dana starih ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu prisutne su iste klase zdravih i atretičnih folikula kao i kod kontrolnih životinja, odnosno primordijalni, primarni i višeslojni folikuli, ali u značajno smanjenom broju ( $p < 0.05$ ).

Za razliku od jajnika kontrolnih peripubertalnih ženki, u kojima su prisutna žuta tela, u jajnicima peripubertalnih ženki intrauterino izloženih deksametazonu još uvek ih nema. Broj zdravih primordijalnih i primarnih folikula je značajno smanjen ( $p < 0.05$ ), dok je broj analiziranih klasa zdravih i atretičnih višeslojnih i antralnih folikula značajno povećan ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti.

Rezultati ove studije nedvosmisleno pokazuju da je reproduktivni potencijal ženki koje su tokom fetalnog razvoja bile izložene deksametazonu smanjen, a polno sazrevanje

odloženo. S obzirom da je deksametazon uticao u ključnom momentu razvoja hipofize i jajnika u fetalnom periodu, promene koje je izazvao su trajne, i bitno određuju kvalitet reproduktivnog života ženki. Ovakav rezultat ima veliki značaj i primenu u humanoj medicini, s obzirom da su uslovi koji do njega mogu dovesti deo svakodnevnog života savremene žene i buduće majke.

ključne reči: deksametazon, fetusi, potomci, gonadotropne ćelije, jajnik, germinativne ćelije, folikuli

naučna oblast: biologija

uža naučna oblast: endokrinologija

UDK broj: 612.432+612.621]:599.323.4:[612.647:612.65]:612.453(043.3)



## **Pituitary-ovarian axis of rats from fetal to peripubertal period of life after intrauterine exposure to dexamethasone**

### Abstract

During fetal development an organism undergoes “critical periods” of intensive cell division as well as the growth and maturation of tissues, organs and organ systems. The fetal environment principally determines the quality of the developmental process, while variation of conditions may lead to a range of disorders followed by intrauterine growth retardation (IUGR). The consequences of IUGR are long-lasting and manifest through various metabolic and cardiovascular issues in later life. Thus, the fetal environment prejudices the adult phenotype, while their intertwining is elaborated with the programming concept. The most widely exploited experimental approaches in the field of programming and IUGR effects are maternal diet leading to offspring malnutrition, provoking stress to mother and antenatal glucocorticoid therapy. Each of these experimental approaches *via* different mechanisms leads to fetal exposure to elevated glucocorticoid levels, which may disrupt to a great extent the physiology of the developmental process.

The aim of this study was to establish whether the exposure of rat fetuses to synthetic glucocorticoid dexamethasone, during the period between days 16 and 18 of gestation, programmed the development and function of the pituitary-ovarian system, starting from the fetal to the peripubertal period of life.

The subject of this doctoral thesis investigation were rat fetuses and females exposed to dexamethasone from the 16<sup>th</sup> to the 18<sup>th</sup> gestational day.

During three consecutive days (16–18 days of gestation) pregnant rat females were subcutaneously treated with dexamethasone (*Dexamethasonis phosphate* – Dx, Krka, p.o., Novo Mesto) dissolved in saline (0.9% NaCl), in doses of 1.0, 0.5 and 0.5 mg Dx/kg

b.w./day. During the same period a control group of pregnant females received an adequate volume of saline.

The offspring of pregnant rat females which received dexamethasone (Dx) or saline (K) were sacrificed during the fetal (19<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> fetal day), neonatal (5<sup>th</sup> day), infantile (16<sup>th</sup> day) and peripubertal (38<sup>th</sup> day) period of life. Gonadotropic (FSH and LH) pituitary cells were immunocytochemically labeled, while the ovary sections were histologically stained with hematoxylin and eosin. Thus prepared pituitary and ovary sections were stereologically and morphometrically analyzed using the newCast stereological software package. The values of pituitary and ovary volume were obtained, as well as the absolute number of FSH and LH cells, their volume, volume density and numerical density. FSH and LH blood levels were biochemically (RIA) determined. Besides volume, the absolute numbers of healthy and degenerated cells in the fetal ovary were determined, while the numbers of healthy and atretic primordial, primary, secondary and antral follicles as well as *corpora lutea* were determined in the postnatal female ovaries. The obtained data were statistically processed.

Intrauterine exposure to dexamethasone caused IUGR, manifested with significantly ( $p < 0.05$ ) decreased body weight of 21 days old fetuses, but a significant ( $p < 0.05$ ) decrease of the same parameter was also observed during the postnatal period.

Pituitary and its adeno- fraction volumes were significantly ( $p < 0.05$ ) decreased in the fetal, neonatal, infantile and peripubertal period of life.

Compared to the controls, the analyzed stereological parameters demonstrated the same pattern of changes in both FSH and LH cells in the female rats exposed *in utero* to dexamethasone. Thus, the number of gonadotropic cells was significantly ( $p < 0.05$ ) decreased starting from the fetal, during the neonatal, infantile to the peripubertal period of life, while their volume was significantly ( $p < 0.05$ ) decreased only at fetal day 19. The

volume and numerical density of gonadotropic cells were significantly ( $p < 0.05$ ) decreased in neonatal and infantile periods of life.

Compared to the controls, the FSH and LH blood levels were significantly ( $p < 0.05$ ) decreased in neonatal, infantile and peripubertal periods of life in the female rats exposed *in utero* to dexamethasone.

After intrauterine exposure to dexamethasone, the ovary volume was significantly ( $p < 0.05$ ) decreased in all the examined periods of life, compared to the control values.

Female rat ovary, in the fetal period of development, does not have a definitive histological organization; therefore the presence of healthy and degenerated germinative cells, as well as somatic cells can be observed. Quantification of germinative cells showed that, in the ovaries of 19 days old fetuses, dexamethasone caused a significant ( $p < 0.05$ ) increase in degenerated cells number at the expense of the healthy germinative cells pool, while the total number of germinative cells was not changed in comparison with the controls. In the ovaries of 21 days old fetuses, dexamethasone caused a significant ( $p < 0.05$ ) decrease of germinative cells total number, as well as a significant ( $p < 0.05$ ) decrease of healthy and increase of degenerated cells number.

In the ovaries of 5 and 16 days old female rats exposed *in utero* to dexamethasone the same categories of healthy and atretic follicles were present as in the controls, *i.e.* primordial, primary and secondary follicles, but in a significantly ( $p < 0.05$ ) reduced number. Unlike the control, peripubertal female ovaries which possess *corpora lutea* are still missing in the ovaries of peripubertal females exposed *in utero* to dexamethasone. The number of healthy primordial and primary follicles was significantly ( $p < 0.05$ ) decreased, while the number of the analyzed categories of healthy and atretic secondary and antral follicles was significantly ( $p < 0.05$ ) increased, compared to the control values.

The results of this study definitely indicate that the reproductive potential of females exposed *in utero* to dexamethasone is decreased, while their sexual maturation is delayed. Considering that dexamethasone realized its effects at the crucial moment of pituitary and ovary development during the fetal period, the changes caused are permanent, and determine substantially the quality of female reproductive life. Such a result is very important and is applicable in human medicine, since the elaborated conditions are entwined with the everyday life of the modern woman and future mother.

Key words: dexamethasone, fetus, offspring, gonadotropic cells, ovary, germinative cells, follicles

Academic expertise: biology

Major in: endocrinology

UDC number: 612.432+612.621]:599.323.4:[612.647:612.65]:612.453(043.3)

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Hipofiza.....	1
1.1.1. Razvoj hipofize fetusa.....	3
1.1.1.1. Razvoj neurohipofize fetusa.....	3
1.1.1.2. Razvoj adenohipofize fetusa.....	4
1.1.1.3. Redosled pojavljivanja ćelija koje sintetišu hormone kod fetusa.....	6
1.1.2. Gonadotropne ćelije.....	9
1.1.3. Gonadotropni hormoni.....	10
1.2. Jajnik.....	12
1.2.1. Razvoj jajnika u fetalnom periodu.....	12
1.2.2. Fiziološki procesi u jajniku u postnatalnom periodu.....	18
1.3. Regulacija gonadotropnog sistema pacova.....	20
1.3.1. Regulacija gonadotropnog sistema u toku fetalnog perioda.....	20
1.3.2. Regulacija gonadotropnog sistema tokom neonatalnog perioda.....	22
1.3.3. Regulacija gonadotropnog sistema tokom infantilnog perioda.....	23
1.3.4. Regulacija gonadotropnog sistema tokom puberteta.....	25
1.4. Glukokortikoidni hormoni.....	27
1.4.1. Glukokortikoidni receptor.....	28
1.4.2. Metabolički efekti glukokortikoidnih hormona.....	30
1.4.3. 11 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza.....	32
1.4.4. Uloga glukokortikoida u fetalnom razviću.....	33
1.5. Programiranje.....	34
1.5.1. Stres tokom trudnoće, pothranjenost trudnice i antenatalna terapija.....	36
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	38
3. MATERIJAL I METODE.....	40
3.1. Laboratorijsko održavanje životinja.....	40
3.2. Eksperimentalne grupe.....	40
3.3. Uzimanje i priprema materijala za analizu.....	42
3.4. Hipofiza.....	42

3.4.1. Imunohistohemijsko obeležavanje gonadotropnih ćelija hipofize.....	42
3.4.2. Stereološka merenja.....	44
3.4.3. Stereološka merenja hipofize.....	45
3.4.3.1. Volumen hipofize.....	45
3.4.3.2. Volumenska gustina FSH i LH ćelija .....	46
3.4.3.3. Apsolutni broj FSH i LH ćelija.....	47
3.4.3.4. Volumen FSH i LH ćelija.....	49
3.4.3.5. Numerička gustina FSH i LH ćelija.....	49
3.5. Jajnik.....	50
3.5.1. Morfometrija i klasifikacija folikula.....	50
3.5.2. Određivanje volumena jajnika.....	52
3.5.3. Određivanje broja primordijalnih i primarnih folikula.....	54
3.6. Biohemijske analize.....	57
3.6.1. Priprema krvnog seruma.....	57
3.7. Statistička analiza podataka.....	57
4. REZULTATI.....	58
4.1. Telesne mase kontrolnih ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života.....	58
4.1.1. Telesne mase kontrolnih ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu.....	58
4.2. Anatomske karakteristike hipofize ženki pacova u fetalnom periodu.....	61
4.2.1. Folikulostimulirajuće ćelije.....	61
4.2.1.1. Folikulostimulirajuće ćelije hipofize fetusa pacova 19. fetalnog dana.....	61
4.2.1.2. Folikulostimulirajuće ćelije hipofize fetusa pacova 21. fetalnog dana.....	64
4.2.1.3. Folikulostimulirajuće ćelije hipofize pacova u neonatalnom periodu života.....	66
4.2.1.4. Folikulostimulirajuće ćelije hipofize pacova u infatilnom periodu života.....	68
4.2.1.5. Folikulostimulirajuće ćelije hipofize pacova u peripubertalnom periodu života.....	70
4.2.2. Luteinizirajuće ćelije hipofize.....	73

4.2.2.1. Luteinizirajuće ćelije hipofize fetusa pacova 19. fetalnog dana.....	73
4.2.2.2. Luteinizirajuće ćelije hipofize fetusa pacova 21. fetalnog dana.....	74
4.2.2.3. Luteinizirajuće ćelije hipofize pacova u neonatalnom periodu života....	75
4.2.2.4. Luteinizirajuće ćelije hipofize pacova u infantilnom periodu života.....	77
4.2.2.5. Luteinizirajuće ćelije hipofize pacova u peripubertalnom periodu života.....	79
4.3. Stereološke karakteristike hipofize.....	82
4.3.1. Volumen hipofize i adenohipofize kontrolnih ženki pacova.....	82
4.3.2. Volumen hipofize i adenohipofize ženki pacova nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu.....	84
4.4. Stereološke karakteristike gonadotropnih ćelija hipofize.....	87
4.4.1. Folikulostimulirajuće ćelije kontrolnih ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života.....	87
4.4.2. Folikulostimulirajuće ćelije ženki pacova nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu.....	91
4.4.3. Lueinizirajuće ćelije kontrolnih ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života.....	96
4.4.4. Lueinizirajuće ćelije ženki pacova nakon deksametazonu intrauterinog izlaganja deksametazonu.....	100
4.5. Koncentracija FSH i LH u serumu pacova.....	105
4.6. Histološke karakteristike fetalnog jajnika.....	107
4.6.1. Jajnik fetusa pacova 19.fetalnog dana.....	107
4.6.2. Jajnik fetusa pacova 21.fetalnog dana.....	109
4.7. Histoloskške karakteristike jajnika pacova od neonatnog do peripubertalnog perioda života.....	112
4.7.1. Jajnik fetusa pacova u neonatalnom periodu života.....	112
4.7.2. Jajnik fetusa pacova u infantilnom periodu života.....	116
4.7.3. Jajnik fetusa pacova u peripubertalnom periodu života.....	118
4.8. Stereološke i morfometrijske karakteristike jajnika.....	126
4.8.1. Volumen jajnika kontrolnih ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života.....	126

4.8.2. Volumen jajnika ženki pacova nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu.....	128
4.8.3. Broj germinativnih ćelija u jajnicima kontrolnog fetusa.....	130
4.8.4. Broj germinativnih ćelija u jajnicima fetusa izloženih deksametazonu.....	131
4.8.5. Broj folikula u jajnicima kontrolnih i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu u neonatalnom periodu života.....	134
4.8.6. Broj folikula u jajnicima kontrolnih i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu u infantilnom periodu života.....	137
4.8.7. Broj folikula u jajnicima kontrolnih i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu u peripubertalnom periodu života.....	141
5. DISKUSIJA.....	147
5.1. Uticaj deksametazona na telesnu masu.....	147
5.2. Uticaj deksametazona na hipofizu.....	153
5.2.1. Uticaj deksametazona na razvoj hipofize u fetalnom periodu.....	153
5.2.2. Hipofiza pacova u neonatalnom, infantilnom i peripubertalnom periodu života, nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu.....	154
5.3. Uticaj deksametazona na jajnik.....	156
5.3.1. Uticaj deksametazona na razvoj jajnika u fetalnom periodu.....	156
5.3.2. Jajnik ženke pacova u neonatalnom, infantilnom i peripubertalnom periodu života, nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu.....	157
6. ZAKLJUČCI.....	161
7. LITERATURA.....	162



## 1. UVOD

### 1.1. Hipofiza

Hipofiza je izgrađena od epitelnih i neuralnih elemenata, nalazi se ventralno od hipotalamusa sa kojim je povezana hipofiznom drškom, infundibulumom. Smeštena je u dorzalnem udubljenju sfenoidne kosti koje je označeno kao tursko sedlo (*sella turcica*). Hipofiza ima ključnu ulogu u regulisanju funkcije drugih endokrinih žlezda i često se označava kao glavni organ endokrinog sistema. U okviru kompleksnih kontrolnih sistema povratne sprege, hipofizna žlezda prenosi signale od hipotalamusa ka ciljnim organima i tkivima oslobađajući trofičke hormone. Kompenzatorni mehanizmi, koji uključuju regulaciju genske ekspresije, hormonske sekrecije i ćeliske proliferacije, omogućuju hipofizi da reaguje na promenljive potrebe u organizmu. Na ovaj način hipofiza utiče na mnoge vitalne fiziološke procese kao što su rast, reprodukcija, metabolička homeostaza, odgovor na stres i laktacija (Cushman i Camper, 2001).

Hipofizu čine neurohipofiza i adenohipofiza, delovi koji se međusobno razlikuju po strukturi, embrionalnom poreklu i produktima sekrecije.

Neurohipofiza obuhvata eminenciju medijanu (EM), infundibulum i *pars nervosa*. Neuralnu komponentu čine aksoni koji ispuštaju neurosekrete u primarni hipotalamo-hipofizni kapilarni pleksus i aksoni koji prolaze i formiraju infundibulum. Vaskularnu komponentu čine primarni kapilarni splet i venski portalni sistem. U *pars nervosa* prisutne su i pituicite koje nemaju funkciju neurosekrecije, kao i potporne i ependimske ćelije koje oblažu zidove treće moždane komore. Eminencija medijana predstavlja strukturu smeštenu na bazi hipotalamusa u kojoj se odvija neurosekrecija hormona iz parvocelularnih neurona nukleusa paraventricularisa (NPV) i nukleusa supraoptikusa (NSO) hipotalamusa u mrežu fenestrovanih kapilara. Oslobođeni hipofizeotropni hormoni dospevaju do adenohipofize i

regulišu sintetsku aktivnost žlezdano-epitelnih ćelija. Neurovaskularni kompleks EM označava se kao spoljašnja zona (zona externa). Unutrašnju zonu (zona interna) EM formiraju aksoni magnocelularnih hipotalamičnih nervnih puteva koji se produžavaju u infundibulum i završavaju u *pars nervosa*. Infundibulum obrazuje anatomsku i funkcionalnu vezu hipofize sa hipotalamusom. Čine ga supraoptički i tuberoinfundibularni nervni putevi. Magnocelularni neuroni NPVa i NSOa, čiji se aksoni završavaju u *pars nervosa*, sintetisaju oksitocin, vazopresin, kao i neurofizin I i II. Neurohormoni sintetisani u neuronima hipotalamusa, izlučuju se u perivaskularne prostore fenestrovanih kapilara *pars nervosa*, a ne u prostore sinaptičkih pukotina između dva neurona. Organizacija neurohipofize upravo je karakteristična po tome što neurohormoni dospevaju u sistemsku cirkulaciju zaobilazeći krvno-moždanu barijeru (Ross, 1997).

Adenohipofiza je građena od žlezdano-epitelnih ćelija, koje predstavljaju efektorske elemente neuroendokrinog sistema. Ove ćelije sintetisaju peptidne hormone kao odgovor na neuroendokrine signale koji dolaze iz hipotalamusa. Ćelije adenohipofize nalaze se u bliskoj vezi sa bogatom mrežom fenestrovanih kapilara tako da mogu veoma brzo da oslobode sintetisane hormone u cirkulaciju. Razlikuju se tri dela adenohipofize. *Pars distalis* zauzima najveći deo adenohipofize, a nastaje od prednjeg zida Ratkeovog džepa. *Pars intermedia* nastaje od zadnjeg zida Ratkeovog džepa, a nalazi se između *pars nervosa* i *pars distalis*, čine ga bazofilne ćelije, hromofobe i koloidne ciste koje su ostatak Ratkeovog džepa. U *pars intermedia* se sintetise melanocitni stimulirajući hormon (MSH), koji stimuliše sintezu melanina. *Pars tuberalis* predstavlja supraselarni deo adenohipofize koji nepotpuno obuhvata infundibulum, nastaje od prednjeg i bočnih zidova Ratkeovog džepa. U njemu se nalazi deo primarnog hipotalamo-hipofiznog kapilarnog spleta, završeci aksona pojedinih hipotalamičnih nukleusa, kao i pojedinačne gonadotropne i tireotropne ćelije (Ross, 1997).

### 1.1.1. Razvoj hipofize fetusa

#### 1.1.1.1. Razvoj neurohipofize fetusa

Tokom embrionalnog razvoja pacova ventralni deo diencefalona tj. budući hipotalamus formira nabor, evaginaciju, koja raste ventralno, "na dole", formirajući infundibulum, začetak neurohipofize. Istovremeno dorzalni evaginacija ektoderma krova usne duplje obrazuje rudamentaran Ratkeov džep, odnosno začetak adenohipofize. Kontakt između začetka adenohipofize, Ratkeovog džepa i buduće neurohipofize, struktura koje rastu iz suprotnih pravaca, zapaža se od 13. dana fetalnog razvoja. Pod treće moždane komore u tom periodu čini šest do deset slojeva okruglih i ovalnih ćelija koje svojom proliferacijom obezbeđuju rast i izduživanje začetka neurohipofize ka Ratkeovom džepu (Svalander, 1974). Kapilarna mreža, koja počinje da se formira između dva primordijuma i to anteriornog dela ventralnog diencefalona i Ratkeovog džepa zajedno sa aksonima neurona čija su tela smeštena u jedrima hipotalamusa, predstavljaju buduću spoljašnju zonu EM. Endotelne ćelije kapilara odlikuje samo nekoliko fenestara, dok su pinocitotske vezikule česte. Nastavci ependimskih ćelija treće moždane komore imaju bitnu ulogu u orijentaciji aksona neurosekretnih ćelija hipotalamusa, a time i u uspostavljanju strukture unutrašnje zone EM. Dugački nastavci neurosekretnih ćelija još nemaju definitivnu strukturu, a karakteristične mikrotubule i sekretne granule zastupljene su u veoma malom broju (Cannata i Tramezzani, 1977; Page, 1994). Spoljašnja i unutrašnja zona EM i infundibulum mogu se raspoznavati od 16. dana fetalnog razvoja. Tokom naredna dva dana fetalnog razvoja pacova povećava se broj aksona koji ulaze u sastav EM, infundibulum se izdužuje, a kapilarni plexusi između EM i *pars distalis* adenohipofize uspostavljaju definitivnu strukturu, tako da omogućavaju dostavljanje hormona hipotalamusa do ćelija buduće adenohipofize (Page, 1994). Nemijelinizirani silazni nervni putevi, supraoptičkohipofizealni i paraventrikulohipofizealni, formiraju infundibulum i

završavaju se u *pars nervosa* gde svoje neurosekretne produkte oslobađaju u krvotok. Osnovna struktura neurohipofize uspostavlja se 18. dana fetalnog razvoja pacova. Neuralni karakter ova komponenta hipofize zadržava tokom celog života (Page, 1994).

#### ***1.1.1.2. Razvoj adenohipofize fetusa***

Adenohipofiza se razvija tokom fetalnog perioda evaginacijom Ratkeovog džepa. Proliferacija ćelija Ratkeovog džepa obezbeđuje rast i izduživanje u pravcu buduće neurohipofize tj. evaginacije diencefalona, kao i kontakt neuralnog i epitelnog pupoljka, delova koji rastu iz suprotnih pravaca. Dorzalni deo zadnjeg, posteriornog, zida Ratkeovog džepa koji stupa u kontakt sa budućim *pars nervosa* postaje *pars intermedia*. Dok ćelije posteriornog dela zaostaju u pogledu proliferativne aktivnosti, brojne ćelijske deobe karakteristične su za prednji zid Ratkeovog džepa, koji će se diferencirati u buduću *pars distalis*. Ostatak lumena usne duplje odvaja *pars intermedia* i *pars distalis*. *Pars tuberalis* čine dva ili tri sloja kontinuirano raspoređenih epitelnih ćelija, koje se razvijaju od lateralnih zidova Ratkeovog džepa. Ćelije ovog regiona se dele i migriraju u anteriornom pravcu, obavijajući infundibulum i EM (Sasaki i Nishioka, 1998; Hori i sar., 1999).

Ratkeov džep 13. dana fetalnog razvoja sastavljen je od ćelija cilindričnog i poligonalnog oblika koje se intenzivno dele. Kontakt sa usnom dupljom i dalje postoji. U ovom periodu ćelije odlikuju relativno krupni nukleusi, nekoliko ovalnih mitohondrija, slabo razvijen granulirani endoplazmin retikulum (ER), retki ribozomi prisutni u citoplazmi ili na membranama cisterni ER. Nekoliko diktiozoma formira Goldžijev aparat, a sekretne granule nisu prisutne u citoplazmi. Pukotinaste međućelijske veze zadržavaju se i prilikom deoba ćelija. Kontakt između začetka adenohipofize i neurohipofize je uspostavljen 13. fetalnog dana (Svalander, 1974). U sledećim danima, 14. i 15. dana razvoja fetusa, veza Ratkeovog džepa i usne duplje zadobija izgled kraniofaringealnog kanala koji se postepeno

sužava, i na kraju iščezava. Međutim, grupacije ćelija koje su nekada formirale kraniofaringealni kanal zadržavaju se na pojedinim mestima i tokom adultnog perioda (Hori i sar., 1999). Dorzalno-posteriorni deo buduće adenohipofize koji je u kontaktu sa budućom neurohipofizom, predstavlja začetak *pars intermedia* i čine ga ćelije koje zadržavaju cilindrični oblik. Ćelije ventralnog dela i dalje se intenzivno dele i formiraju manje medijalne i veće lateralne delove budućeg *pars distalis*. Ove ćelije su i dalje malih dimenzija, ovalnog oblika i sa malo citoplazme, dok se broj mitohondrija kao i ribozoma u citoplazmi i na membranama cisterni ER povećava. Primordijum *pars tuberalis* nastaje od proliferativno aktivnih ćelija prednjeg zida buduće adenohipofize, i to njegovih ventralnih i lateralnih delova koji se izdužuju i migriraju u anteriornom pravcu. Ćelije su okruglog i poligonalnog oblika i naležu na buduću EM i infundibulum. Između ove dve strukture, epitelne i neuralne, nalazi se vaskularizovan mezenhim (Svalander, 1974).

Sledećeg, 16. dana razvoja fetusa pacova značajno se povećava veličina buduće hipofize. Primordijume *pars intermedia* i neurohipofize međusobno razdvajaju podepitelske lamine. *Pars intermedia* je građena od dva do tri reda cilindričnih ćelija, nervni završeci nisu prisutni, sintetski aparat ćelija se diferencira i razvija tako da su granulirani ER i polizomi značajno zastupljeni u citoplazmi. Diferencijacija ćelijskih organela odvija se paralelno sa deobama ćelija i u budućem *pars distalis*. Pojavljuju se i folikulo-zvezdaste ćelije između kojih je smešten karakterističan lumen. Ćelije marginalnog sloja koje okružuju ostatak lumena usne duplje zadržavaju cilindrični oblik. Bogata kapilarna mreža se formira između ćelija budućeg *pars distalis*, endotelne ćelije imaju tanku podepitelsku laminu, a fenestri još nisu formirani. Ćelije začetka *pars tuberalis* se dalje umnožavaju. Ultrastrukturu ovih ćelija odlikuje prisustvo lizozoma i sitnih granula sa gustim elektronskim sadržajem, dok prisustvo granuliranog ER i diktiozoma Goldžijevog aparata nije značajno (Schulze-Bonhage i Wittkowski, 1990).

Povećanje volumena hipofize naročito je izraženo 17. i 18. dana fetalnog razvoja. *Pars distalis* i *pars intermedia* histološki se jasno razlikuju. Ostatak lumena usne duplje dobija izgled pukotine. U *pars distalis* ćelije se diferenciraju u sekretne, skladišćeci u citoplazmi brojne sekretne granule različitog dijametra. *Pars distalis* odlikuju brojne ćelijske deobe, kao i dalji razvoj guste kapilarne mreže. Sazrevanje i povećanje broja organela odvija se i u ćelijama *pars tuberalis*, koje formira sloj ćelija smešten ventralno od EM i infundibuluma (Svalander, 1974; Page, 1994; Taniguchi i sar., 2000).

Definitivan oblik hipofize pacova uspostavlja se 19. dana razvoja fetusa. Osnovna organizacija hipofize ostaje nepromenjena ali se proliferacija ćelija nastavlja, kao i razvoj vaskularne mreže (Svalander, 1974; Carbajo-Perez i sar., 1989; Page, 1994).

#### ***1.1.1.3. Redosled pojavljivanja ćelija koje sintetišu hormone kod fetusa***

Razvojne studije kod mnogih vrsta otkrile da su interakcije između embrionalnog ventralnog diencefalona i Ratkeovog džepa neophodne za normalan razvoj hipofize (Gleiberman i sar., 1999). Molekularni i genetički eksperimenti dokazali su prisustvo signalnih molekula, odnosno transkripcionih faktora, uključenih u kontrolu proliferacije i diferencijacije ćelija hipofize u razvoju, koje kasnije postaju hormon produkujuće ćelije, karakteristične za zrelu i funkcionalnu hipofizu (Treirer i sar, 1998, 2001). Ovi signalni proteini uključuju FGFs (eng. fibroblast growth factors), BMP4 (eng. bone morphogenetic protein 4) i WNT5 koji potiču iz ventralnog diencefalona, kao i BMP2 (eng. bone morphogenetic protein 2) i WNT4 poreklom iz Ratkeovog džepa. SHH (eng. Sonic hedgehog) igra vodeću ulogu u ograničavanju regiona koji formira Ratkeov džep, a uključen je i u aktivaciju transkripcionih faktora tokom ranog razvoja hipofize (Treirer i sar., 1998, 2001). Postoje i druge klase signalnih molekula veoma značajnih za embrionalni razvoj

hipofize. Dickman i sar. (1997) ukazuju na veliki značaj retinoida u ovom procesu, jer su kod pacovskih embriona koji su deficitarni za retinoičnu kiselinu primetili poremećaj u formiranju Ratkeovog džepa.

Sintetska aktivnost primordijalnih ćelije adenohipofize kao i njihova diferencijacija tokom perioda fetalnog razvoja takođe su pod kontrolom transkripcionih faktora. Transkripcioni faktori određuju ekspresiju pojedinih gena determinišući na taj način tipove ćelija adenohipofize koje će sintetisati specifičan trofički hormon (Savage i sar., 2003). Jedan od najpoznatijih je Pit-1 (eng. pituitary-specific transcription factor), koji je odgovoran za diferencijaciju i proliferaciju somatotropnih, laktotropnih i tireotropnih ćelija u hipofizi. Transkripcioni faktor SF-1 (eng. steroidogenic factor-1), čija se ekspresija javlja u hipofizi 13. dana fetalnog razvoja utiče na ekspresiju velikog broja gena koji su uključeni u determinaciju i diferencijaciju gonadotropne ćelijske loze (Zhu i sar., 2007). Najpoznatiji transkripcioni faktor koji određuje diferencijaciju i proliferaciju kortikotropnih ćelija je Ptx-1 (eng. pituitary homeo box 1 factor, Lamonerie i sar., 1996).

Korišćenjem imunocitohemijskih metoda pokazano je da kortikotropne ćelije prvi tip ćelija koji dostiže terminalnu diferencijaciju i otpočinje hormonsku sintezu, u periodu kada još nije uspostavljena definitivna, adultna organizacija hipofize. Adrenokortikotropni hormon (ACTH) je imunocitohemijski obeležen najpre u ćelijama budućeg *pars tuberalis*, 13. dana razvoja fetusa pacova, a zatim u *pars distalis* 14. dana fetalnog razvoja (Chatelain i sar., 1979).

Tireotropne (TSH) ćelije se diferenciraju nakon kortikotropnih ćelija. Pozitivna imunoreakcija u ćelijama *pars tuberalis* javlja se 16. dana gestacije, a nekoliko pojedinačnih tireotropnih ćelija je prisutno u *pars distalis* 17.5 dana fetalnog života (Chatelain i sar., 1979; Schulze-Bonhage i Wittkowski, 1990).

Gonadotropne ćelije u kojima je prisutan luteinizirajući hormon (LH) pojavljuju se 17. dana gestacije u *pars distalis*, nešto su brojnije 18. dana graviditeta, a do kraja perioda fetalnog razvoja njihova brojnost se znatno uvećava. Ćelije koje sintetišu folikulostimulirajući hormon (FSH) pojavljuju se nešto kasnije, 19. i 20. dana razvoja *in utero*. FSH i LH ćelije vode poreklo od zajedničkih prekursorskih ćelija (Pope i sar., 2006), i u ovom periodu fetalnog razvića često su bihormonalne, što ukazuje da se FSH sintetiše u ćelijama u kojima je LH već prisutan (Setalo i Nakane, 1976; Watanabe i Daikoku, 1979). Poput kortikotropnih i somatotropnih, tokom organogeneze hipofize u fetalnom periodu, i gonadotrone ćelije se povezuju u velike ćelijske mreže, čime se postiže integrisan i mnogo efikasniji ćelijski odgovor. Za sada nije dokazano postojanje posebnog transkripcionog faktora odgovornog za diferencijaciju gonadotropnih ćelija (Budry i sar., 2011).

Somatotropne (GH) ćelije se pojavljuju 18. dana razvoja fetusa u *pars distalis*, a prolaktinske (PRL) ćelije su poslednji tip ćelija koji se diferencira. Mogu se imunocitohemijski detektovati od 18.5 dana gestacije. (Chatelain i sar., 1979; Watanabe i Haraguchi, 1994).

Pored diferenciranih žlezdanih epitelnih ćelija, u *pars distalis* se nalaze i nediferencirane ćelije. Po osobini ovih ćelija da se ne boje histološkim bojama, dobile su naziv hromofobe. Ovoj grupi ćelija pripadaju progenitorske ćelije adenohipofize, malobrojne matične ćelije i folikulo-stelatne ćelije (Rinehart i Farquhar, 1953; Kagayama, 1965).

Kontrola funkcije adenohipofize obuhvata tri nivoa. Prvi nivo je hipotalamusna kontrola koja se odvija preko adenohipofiziotropnih hormona sekretovanih u portalni sistem hipofize. Oni se direktno vezuju za membranske receptore na ćelijama adenohipofize, visoko selektivne i specifične za svaki od hipotalamusnih hormona, i izazivaju stimulatoran ili inhibitoran uticaj na sintezu i sekreciju hipofiznih hormona. Drugi



nivo kontrole predstavljaju periferni hormoni, produkti sekrecije ciljnih žlezda ili organa adenohipofiznih hormona, koji uglavnom preko negativne povratne sprege regulišu funkciju žlezdano-epitelnih ćelija. Treći nivo kontrole su autokrini i parakrini faktori koji lokalno regulišu sopstvenu i funkciju susednih ćelija (Melmed i Kleinberg, 2002).

### 1.1.2. Gonadotropne ćelije

Gonadotropne ćelije pripadaju grupi bazofilnih žlezdano-epitelnih ćelija *pars distalis*. Pozitivne su na PAS bojenje, što ukazuje na prisustvo ugljenih hidrata u citoplazmi. Gonadotropne ćelije su uglavnom krupnije od ostalih žlezdano-epitelnih ćelija adenohipofize. Raspoređene su po celom žlezdanom parenhimu *pars distalis*, pojedinačno ili u grupama i uglavnom su lokalizovane uz krvne sudove. Jedro im je okruglo, često ekcentrično postavljeno. U citoplazmi se nalaze dobro razvijene organele uključene u sintetske procese, što se posebno odnosi na Goldžijev aparat. Sekretorne granule su brojne i raspoređene po čitavoj citoplazmi u kojima se nalazi osmiofilan sadržaj. Prečnik sekretornih granula se kreće između 200 i 400 nm (Horvath i Kovacs, 1988).

Gonadotropne ćelije nazvane su po svojoj endokrinoj funkciji, sintetisanju i sekreciji dva gonadotropna hormona, neophodnih za regulaciju reproduktivne funkcije – folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Bilo je pokušaja da se gonadotropne ćelije, na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije, u izmenjenim fiziološkim uslovima (gonadektomija), odvoje na one koje luče FSH i one koje luče LH (Farquhar i Rinehart, 1954; Purves i Griesbach, 1954). Međutim, uvođenjem imunocitohemijskih metoda ranih sedamdesetih godina prošlog veka, utvrđeno je da se antigeni oba hormona nalaze u istim ćelijama (Nakane, 1970; Moriarty, 1975), čime je opovrgnuta hipoteza "jedna ćelija - jedan hormon". Childs i sar. (1987) navode da je u vreme maksimalnog sintetisanja i deponovanja FSH i LH kod ženki pacova, 70%

gonadotropnih ćelija bihormonalno, t.j. da u citoplazmi sadrže i FSH i LH antigene. Ovaj procenat se smanjuje nakon maksimalne sekrecije u estrusu. Međutim, utvrđeno je i prisustvo monohormonalnih ćelija bez obzira na fiziološko stanje organizma, pa se može izvući zaključak da je populacija gonadotropnih ćelija heterogena (Childs, 1997).

### 1.1.3. Gonadotropni hormoni

Gonadotropni hormoni su po hemijskoj strukturi glikoproteini i zajedno sa tireostimulirajućim hormonom (TSH) i horiogonadotropnim hormonom (CG) čine familiju glikoproteinskih hormona. Svaki od njih izgrađen je od dve, nekovalentno vezane subjedinice  $\alpha$  i  $\beta$ , koje su produkt dva različita gena. Alfa ( $\alpha$ ) subjedinica je gotovo identična kod svakog člana ove familije, dok je  $\beta$  različita, i nosilac je hormonske specifičnosti (Pierce i Parsons, 1981). Obe subjedinice poseduju ugljenohidratnu komponentu. Translacija iRNK  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice odvija se na ribozomima odakle sintetisani polipeptid prelazi u cisterne rapavog endoplazminog retikuluma, a zatim prelazi u vezikule Goldžijevog aparata, u kojima se obavlja postranslaciona obrada transkripata i dodavanje ugljenih hidrata. Sintetisani hormoni se nalaze u sekretornim vezikulama i na stimulus se egzocitozom oslobađaju u vanćelijski prostor (Kurosumi, 1991).

Osnovna uloga gonadotropnih hormona je u regulaciji egzokrine i endokrine funkcije gonada. Folikulostimulirajući hormon u jajnicima stimuliše rane faze folikulogeneze, dok je LH odgovoran za sazrevanje folikula, luteinizaciju i održavanje žutog tela. Pored procesa folikulogeneze, FSH stimuliše aromatizaciju androgena. Takođe, delujući zajedno sa estrogenom, stimuliše pojavu LH receptora. Uloga LH je uglavnom orijentisana na stimulaciju sinteze steroidnih hormona.

Receptori za gonadotropne hormone se nalaze na površini membrane ciljnih ćelija i pripadaju superfamiliji receptora vezanih za G protein (GTP-vezujući regulatorni protein).

Izgrađeni su od intracelularnog (COOH) domena, sedam transmembranskih, i ekstracelularnog (NH<sub>2</sub>) domena koji se nalazi na površini ćelijske membrane. Međutim, receptori za glikoproteinske hormone se od ostalih receptora vezanih za G protein razlikuju po izuzetno dugom NH<sub>2</sub>-terminalnom delu i čine posebnu podgrupu. Receptori za FSH i LH strukturno su veoma slični, tako da im je 50% ekstracelularnog i 89% transmembranskog domena identično (Sprengel i sar., 1990). Pored ovoga, LH i CG su sposobni za vezivanje za isto receptorno mesto (Roche i Ryan, 1985). Nakon vezivanja hormona za receptor, dolazi do povećanja aktivnosti adenilat ciklaze i akumulacije cikličnog adenozin monofosfata (cAMP; Ryan, 1982).

Model stimulacije sinteze estrogena u jajniku gonadotropnim hormonima naziva se "dve ćelije - dva gonadotropina" i predložen je još 1979. godine (Armstrong i sar., 1979). Osnovne postavke ovog modela su sledeće: 1) granulosa ćelije, ali ne i teka ćelije jajnika, 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; i 4) LH stimuliše sintezu androgena, a ne aktivnost aromataze u teka ćelijama. Sinteza polnih steroida od holesterola do androgena je LH stimulisana i odvija se u ćelijama teke i intersticijumu jajnika, dok se aromatizacija androgena odvija u granulosa ćelijama preovulatornih folikula. Ovaj proces stimuliše FSH. Početni model "dve ćelije - dva gonadotropina", međutim, 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 (Shima i sar., 1987). Stoga, u toku terminalnog rasta folikula LH izaziva identičan odgovor kao i FSH u granulosa ćelijama, uključujući aromatizaciju androgena (Zelevnik i Hillier, 1984).

## 1.2. Jajnik

Jajnici (ovarijumi) su parne žlezde ovalnog oblika. Izgrađeni su od kore (cortex) i srži (medulla), ali jasna granica među njima se teško uočava. Na površini jajnika 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* i neorganizovano rastresito vezivno tkivo. *Tunica albuginea* izgrađena je od pet do sedam slojeva fibroblasta i kolagenih vlakana i formira čvrst omotač oko celog jajnika. Unutar vezivne strome korteksa smešten je parenhim ovarijuma koga čine folikuli u različitim fazama folikulogeneze, folikuli u propadanju (atretični folikuli) i žuta tela (corpora lutea). Medulu jajnika čini rastresito neorganizovano vezivno tkivo u kome se nalaze brojni krvni i limfni sudovi, kao i nervi. Stroma jajnika je izgrađena od tri osnovna tipa ćelija: ćelija vezivnog tkiva, kontraktilnih ćelija i intersticijalnih ćelija (Guraya, 1977).

Osnovna funkcija jajnika je diferencijacija i oslobađanje jajne ćelije zrele za oplodjenje i time uspešna propagacija vrste. Pored ove uloge, u jajnicima se proizvode steroidni hormoni, koji omogućavaju razvoj sekundarnih seksualnih karakteristika i održavanje trudnoće. Stoga, jajnici pripadaju i egzokrinim i endokrinim žlezdama.

### 1.2.1. Razvoj jajnika u fetalnom periodu

Delovi budućeg jajnika sisara počinju da se formiraju već u prvim danima intrauterinog života. Kod miša primordijalne germinativne ćelije uočene su sredinom gastrulacije, tačnije 7.25 fetalnog dana kod miša kao grozdovi (eng. clusters) ćelija koje pokazuju intenzivnu alkalno fosfataznu aktivnost. Ove ćelije su smeštene na bazi žumancetne kese. Njihovim uklanjanjem, razvijali su se fetusi koji uopšte nisu posedovali germinativne ćelije, a transplantacijom se postizala proliferacija germinativnih ćelija. Ovako

je pokazano da alkalna fosfataza može biti korišćena kao marker za linije germinativnih ćelija još od 7.25 fetalnog dana (Ginsburg i sar., 1990). Odsustvo alkalne fosfataze nije uticalo na broj primordijalnih germinativnih ćelija, niti na njihovu migraciju (MacGregor i sar., 1995). Brojna istraživanja bavila su se pitanjem faktora koji su uključeni u formiranje i sudbinu primordijalnih germinativnih ćelija (Saga, 2008). Knockout modeli su značajno pomogli da se definišu članovi familije BMP 2, BMP 4 i BMP 8 (eng. bone morphogenetic protein 2, 4, 8) koji su ključni za rano odvajanje prekursora primordijalnih germinativnih ćelija od somatskih ćelija embriona. Smatra se da ovi faktori počinju da deluju između 5. i 6. fetalnog dana na pluripotentne ćelije proksimalnog epiblasta (budućeg embriona) stimulišući ih da se razvijaju kao prekursori primordijalnih germinativnih ćelija (Lawson i sar., 1999; Ying i sar., 2000, 2001). Prva životna faza ovih ćelija naziva se crevna faza, kada su uglavnom lokalizovane uz ventralnu stranu creva, gde su rasute između epitelijalnih ćelija zida creva, bez kontakta sa intestinalnim lumenom. Druga životna faza primordijalnih germinativnih ćelija je migratorna faza, tokom koje ameboidnim pokretima ove ćelije kroz mezenteru ili preko krvotoka dospevaju do genitalnih nabora. Genitalni nabori se formiraju zadebljanjem celomskog epitela i mezenhima, a ove dve komponente participiraju u formiranju jajnika (Guraya, 1977). Okidač koji inicira migraciju do genitalnog nabora, i hemoatraktanti koji regulišu usmereno kretanje primordijalnih germinativnih ćelija do genitalnog nabora još uvek nisu poznati (Edson i sar., 2009). Treća faza podrazumeva naseljavanje genitalnih nabora, što se dešava između 10. i 11. fetalnog dana kod miša (McLaren, 2000). Nakon dospevanja do genitalnih nabora počinje mitotska proliferacija primordijalnih germinativnih ćelija (Tam i Snow, 1981).

Pre ulaska u genitalne nabore, ženske (XX) i muške (XY) primordijalne germinativne ćelije imaju identične karakteristike u svim aspektima. To ukazuje da ne postoje polne razlike u formiranju, migraciji i ulasku primordijalnih germinativnih ćelija u

genitalne nabore i da polni hromozomi nisu uključeni u taj proces. To je posledica inaktivacije jednog od dva X hromozoma kod ženki, što je jedan od najranijih događaja u embrionalnom razviću. Dešava se u fazi zigota, na dvoćelijskom stadijumu i time se postiže izjednačavanje transkripcionih nivoa kod ženskih i muških zigota (Sarraj i Drummond, 2012). Ključni događaj u razdvajanju sudbina XX i XY primordijalnih germinativnih ćelija u genitalnim naborima je reaktivacija neaktivnog X hromozoma u ženskim germinativnim ćelijama. Nakon reaktivacije X hromozoma sudbine ženskih i muških germinativnih ćelija se odvajaju. Dok XY germinativne ćelije ostaju “zarobljene” u mitozu, i tek postnatalno, u pubertetu nastavljaju da se dele kao spermatogonije, XX germinativne ćelije nastavljaju da se dele, i tada se označavaju kao oogonije. Proces oogeneze dalje se nastavlja ulaskom oogonija u mejozu. Mnoge od njih na putu umnožavanja i sazrevanja bivaju degenerisane i eliminisane. Ovakav sled događaja je fiziološki za fetalni razvoj jajnika kod većine sisarskih vrsta (Edson i sar., 2009).

Genitalni nabori su identični i za ženski i za muški pol, i ostaju bipolarni sve do 11.5 fetalnog dana kod miša. U njima su tada prisutni i Mullerian-ov i Wolffian-ov kanal. Iz Mullerianovog kanala se razvijaju jajovodi, materica, grlić i gornji delovi vagine, dok se Wolffianov kanal diferencira u epididimis, vas deferens i semene kanaliće. U odsustvu Sry gena (eng. sex-determining region of the Y chromosome), koji se eksprimira u somatskim ćelijama XY gonada između 10.5 i 12. fetalnog dana i kodira transkripcioni faktor koji deluje kao genetički regulator razvoja testisa, i u prisustvu FOXL2, WNT4 i FST gena bipolarne gonade se diferenciraju u jajnik. Međutim, danas se smatra da je formiranje i ženskih gonada aktivan proces. Nakon polne determinacije, Mullerianov kanal se zadržava u jajniku, dok Wolffianov podleže regresiji (Sarraj i Drummond, 2012).

Germinativne ćelije su najveće ćelije u fetalnom jajniku, najčešće okruglog oblika. Imaju veliko, ovalno, ekcentrično postavljeno jedro, potisnuto citoplazmom, koja se

akumulira na suprotnom polu ćelije U neposrednom kontaktu sa germinativnim ćelijama nalaze se i somatske ćelije, koje potiču od nediferenciranih mezenhimskih ćelija ili od celomskog epitela. U ranoj fazi formiranja genitalnog nabora, bazalna membrana celomskog epitela puca i epitelijalni derivati dospevaju u nabor. Smatra se da su te ćelije prekursori granulosa ćelija (Karl i Capel, 1998). Ove ćelije su obično manjih dimenzija i nepravilnog oblika u odnosu na germinativne ćelije, a značajne su zato što obezbeđuju egzogene izvore energije, koji su neophodni za rast i ćelijske deobe germinativnih ćelija (Guraya, 1977).

Razvoj jajnika u fetalnom periodu podrazumeva grupisanje germinativnih i somatskih ćelija u klastere, koji se nazivaju i cistama germinativnih ćelija. Ciste su jedne od drugih odvojene nizovima mezenhimskih ćelija, koje se zrakasto šire iz centralnog dela jajnika. Zašto se germinativne i somatske ćelije organizuju u ciste tokom fetalnog razvoja jajnika još uvek je nejasno. Nicolas i sar. (2010) ukazuju da je ovakva struktura fetalnog jajnika neophodna za pravilan razvoj oocita. Ako bi se germinativne ćelije iz razorene ciste, jajnika fetusa miševa između 13.5 i 15.5 fetalnog dana, transplantirale ispod bubrežne kapsule imunodeficientnih miševa, to bi rezultiralo smanjenjem broja germinativnih ćelija. Ova studija ukazuje na značaj intaktne strukture jajnika između 13.5 i 16.5 fetalnog dana za programiranje preživljavanja germinativnih ćelija u folikulima miša nakon rođenja.

U toku fetalnog razvoja pacova oogonije se intenzivno mitotski dele tako da od 15.5 do 17.5. fetalnog dana njihov broj se sa 12000 poveća na 71000, kada veliki broj ćelija ulazi u profazu I mejoze. Mitotska proliferacija oogonija praćena je nekompletnom citokinezom, tako da ćerke ćelije ostaju povezane međućelijskim mostovima. Iako međućelijski mostovi predstavljaju evolutivno konzervirane strukture, koje povezuju germinativne ćelije od insekata do sisara, još uvek nije dokazano da su neophodni za formiranje folikula niti razvoj fertiliteta (Edson i sar., 2009). Oogonije koje ulaze u profazu

I mejoze nazivaju se primarne oocite. Početak leptotena profaze I kod većine primarnih oocita, poklapa se sa naglim smanjenjem broja oogonija koje se mitotski dele. Do 19. fetalnog dana najveći broj oocita ulazi u fazu zigotena, da bi oko 21. fetalnog dana nastupila faza pahitena. Primarne oocite u fazi diplotena uglavnom se viđaju tek drugog postnatalnog dana, gde ostaju “zarobljene” sve do puberteta (Beaumont i Mandl, 1961). Tada se završava mejoza I, tokom koje se primarne oocite dele na dve haploidne ćelije koje su nejednake veličine: krupnu sekundarnu oocitu (sadrži skoro svu citoplazmu) i sićušnu polocitu I (prvo polarno telašce ili primarna polocita). U mejozi II, koja se dešava neposredno pred oplodjenje obe ove ćelije se podele i to tako što od sekundarne oocite opet nastaju ćelije nejednake veličine: krupna ootida i sitna polocita II, a polocita I se podeli na dve polocite II. Tako, krajnji rezultat mejoze je da od jedne primarne oocite nastane krupna ootida, koja predstavlja jajnu ćeliju (funkcionalna ćelija) i tri nefunkcionalne polocite.

Dugo se smatralo da se proliferacija oogonija isključivo dešava u fetalnom periodu, i da tačno određen broj oogonija biva transformisan u primarne oocite, “zarobljene ” u diplotenu profaze prve mejotičke deobe. Ulaskom u mejozu, oocite gube sposobnost dalje proliferacije. Tako da od tog trenutka, njihov broj postaje definitivan i po dogmama reproduktivne biologije predstavlja kompletan reproduktivni potencijal jedinke. Broj oocita tokom fetalnog i postnatalnog života se samo smanjuje kroz procese degeneracije, kasnije atrezije folikula i eventualne ovulacije (Greenwald i Roy, 1994). Međutim, na osnovu rezultata savremenih istraživanja uvodi se koncept neo-oogeneze. Neo-oogeneza podrazumeva produkovanje novih oocita iz matičnih germinativnih ćelija koje su prisutne u površinskom epitelu jajnika adultnih miševa, a pod uticajem ćelija koštane srži (Johnson i sar., 2004., 2005). De Felici (2010) ukazuje na činjenicu da adultni sisarski jajnik sadrži ćelije sa karakteristikama matičnih ćelija, koje su ili originalne primordijalne germinativne ćelije, ili nediferencirane ćelije koje vode direktno poreklo od njih, i koje i nakon fetalnog perioda,



pod određenim uslovima mogu nastaviti mejozu i dati nove oocite. Ovakvi rezultati će u budućnosti sigurno imati primenu u borbi protiv steriliteta, koji postaje akutni problem savremene zene.

Propadanje (degeneracija) germinativnih ćelija uočava se tokom oogeneze u fetalnom i ranom postnatalnom periodu. Javljaju se tri talasa ćelijske smrti germinativnih ćelija. Prvi talas zahvata oogonije koje se mitotski dele i dostiže svoj vrhunac 19. fetalnog dana kod pacova, kada je frekvencija normalnih mitotskih deoba relativno niska. Za ove oogonije kaže se da su “zarobljene u mitozu”. Drugi talas zahvata germinativne ćelije koje su u profazi I mejotičke deobe, najčešće u fazi zigotena ili pahitena. Ćelije zahvaćene ovim tipom degeneracije prepoznaju se po izrazito kondenzovanim hromozomima i prosvetljenom citoplazmom, a najbrojnije su 21. fetalnog dana kod pacova. Treći talas degeneracije zahvata germinativne ćelije koje su u fazi diplotena profaze I, i obično se javlja drugog neonatalnog dana (Beaumont i Mandl, 1961). Degeneracija germinativnih ćelija tokom oogeneze je kontinuiran proces, tokom koga se broj germinativnih ćelija redukuje za oko 65% (McClellan i sar., 2003).

Degeneracija germinativnih ćelija tokom oogeneze pokazuje karakteristike programirane ćelijske smrti. To je ćelijska smrt koja se javlja na predviđenom mestu, a to je fetalni jajnik, i u predviđeno vreme, a to je kasna gestacija, i rezultira u eliminaciji znatnog broja germinativnih ćelija, bez ikakve inflamatorne reakcije. Iako programirana ćelijska smrt germinativnih ćelija tokom oogeneze pokazuje karakteristike apoptoze (Lobascio i sar., 2007), uzroci i molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ovog procesa još uvek nisu u potpunosti shvaćeni (Morita i Tilly, 1999; Tilly, 2001; De Felici i sar., 2005). Postoje dve glavne hipoteze koje objašnjavaju procese ćelijske smrti germinativnih ćelija u fetalnom jajniku. Germinativne ćelije, kao i većina ostalih ćelijskih tipova preživljavaju u prisustvu faktora rasta, od kojih su najznačajniji KL (eng. kit ligand) i LIF (eng. leukemia inhibitory

factor, De Felici, 2000). Pored njih direktan ili indirektan anti-apoptotski efekat ispoljavaju i IGF-I (eng. insulin growth factor I), Interleukini  $\alpha$  i  $\beta$ , neurotrophin 4 i 5, i BDNFs (eng. brain-derived neurotrophic factors). Ograničenost ovih faktora determiniše apoptozu germinativnih ćelija (Morita i Tilly, 1999; Tilly, 2001; De Felici i sar., 2005). Po drugoj hipotezi apoptoza zahvata germinativne ćelije kod kojih postoje defekti u hromozomskom krosingoveru, čime se postiže kontrola kvaliteta germinativnih ćelija (Kneitz i sar., 2000). U prilog ovoj teoriji idu i zapažanja da se kod miševa kojima nedostaje jedan X hromozom (XO), u fetalnom jajniku uočava znatno povećan broj degenerisanih germinativnih ćelija u odnosu na XX miševе (Burgoyne i Baker, 1985). Nedostajanje jednog X hromozoma kod ljudi (Turnerov sindrom, XO) povezano je sa masivnom apoptozom germinativnih ćelija u fetalnom jajniku (Modi i sar., 2003).

Ravnoteža između preživljavanja i smrti germinativnih ćelija u fetalnom jajniku je kritična tačka koja obezbeđuje pravilnu oogenezu, razvoj jajnika i garantuje reproduktivni uspeh (Albamonte i sar., 2008).

### **1.2.2. Fiziološki procesi u jajniku ženki u postnatalnom periodu**

Folikulogeneza podrazumeva rast i razvoj folikula kroz seriju koordinisanih koraka koji dovode do morfoloških i funkcionalnih promena u folikulu, u osnovi kojih su ćelijska diferencijacija i razvoj oocite. U skladu sa razvojnim procesima i uticaju gonadotropnih hormona na njih, folikulogeneza se može podeliti na tri faze. Prva faza podrazumeva formiranje primordijalnih folikula od prvobitnih germinativnih cisti, i dalji rast do primarnog, odnosno sekundarnog stupnja. Ova faza u folikulogenezi je nezavisna od uticaja gonadotropnih hormona. Druga faza predstavlja tranziciju iz preantralne do rane antralne faze, koja je takođe nezavisna od gonadotropnih hormona. Prva i druga faza folikulogeneze su prvenstveno kontrolisane intraovarijalnim regulatorima kao što su faktori rasta i citokini.

Treća faza folikulogeneze prati rast folikula od rane antralne faze pa sve do zrelih, De Grafovih folikula. Odvijanje ove faze moguće je jedino u prisustvu gonadotropnih hormona (Craig i sar., 2007).

I u postnatalnom periodu u jajniku se nastavljaju degenerativni procesi. Propadanje ovarijalnih folikula naziva se atrezija. 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. Mnogo je češća sudbina folikula da budu zahvaćeni atrezijom (Markström i sar., 2002). Pritom, atrezija može nastupiti u bilo kom stadijumu folikulogeneze, u folikulima koji su započeli rast i razvoj, ali i u mirujućim, primordijalnim folikulima (Ingram, 1962). 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 (Markström i sar., 2002). Proces atrezije zahvata sve tri osnovne komponente koje strukturno grade jedan folikul: granulosa sloj, oocitu i teka sloj. Opšte je prihvaćeno mišljenje da propadanje granulosa ćelija u toku atrezije ima sve karakteristike programirane ćelijske smrti, apoptoze (Hsueh i sar., 1996; Tilly, 1998).

Ovulacija u jajniku sisara predstavlja specifičan biološki fenomen, koji obuhvata pucanje zdravog tkiva na površini jajnika i oslobađanje oocite. Za ovulaciju je neophodan preovulatorni talas LH koji izaziva veliki broj biohemijskih, biofizičkih i molekularnih promena u funkciji folikularnih ćelija: nastavak mejotičke deobe oocite i njeno sazrevanje; sazrevanje ćelija kumulusa; i na kraju pucanje folikula i oslobađanje zrele oocite; a potom luteinizaciju granulosa ćelija preovulatornog folikula i njegovu transformaciju u žuto telo.

Ovulacija je veoma kompleksan proces, nalik akutnoj zapaljenskoj reakciji. Talas gonadotropina otpočinje sekvencionalnu transkripciju velikog broja specifičnih gena u granulosa ćelijama, ćelijama kumulusa i samoj oociti. Smatra se da u jajniku u toku

ovulatornog procesa dolazi do diferencijalne ekspresije (ili su stimulirani ili su inhibirani) 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).

Žuto telo – CL (Corpus Luteum) je prolazna, endokrina žlezda, koja u okviru jajnika raste, sazreva i nestaje u toku svakog estrusnog, odnosno menstrualnog ciklusa i trudnoće. Nastaje od ovuliranog folikula i luči veliku količinu steroidnih hormona, uglavnom progesterona i nešto estrogena. Progesteron je neophodan za implantaciju blastocista, blokadu uterusnih kontrakcija i održavanje intrauterine sredine povoljnom za razvoj embriona. Ukoliko ne dođe do oplodjenja i implantacije, CL nestaje, a novi folikuli se razvijaju (Finn i Booth, 1977).

### **1.3. Regulacija gonadotropnog sistema pacova**

#### **1.3.1. Regulacija gonadotropnog sistema u toku fetalnog perioda**

Hipotalamo-hipofizno-ovarijalni (HPO) sistem, čija funkcija zauzima centralno mesto u reproduktivnoj fiziologiji, formira se tokom fetalnog perioda. Sazrevanje i diferencijacija ovog sistema kod fetusa podrazumeva početak sinteze gonadotropnog-oslobađajućeg hormona (GnRH) u hipotalamusu, pristup GnRH hipotalamo-hipofiznoj cirkulaciji, pojavu GnRH receptora na membranama hipofiznih ćelija i početak sinteze i sekrecije gonadotropnih hormona. Ovo bi bio logičan sled događaja u sazrevanju hipotalamo-hipofizno-ovarijalnog sistema, ali dosadašnji podaci ukazuju na izvesne nelogičnosti u njihovom vremenskom poretku. Naime, sinteza gonadotropina u hipofizi počinje pre nego što je GnRH u mogućnosti da na nju deluje.

Razvoj hipotalamo-hipofiznog sistema počinje sintezom GnRH u olfaktornom bulbusu, početnoj lokaciji GnRH neurona. To se dešava 11. embrionalnog dana kod miša

(Schwanzel-Fukuda i Pfaff, 1989), dok kod pacova vreme početka sinteze GnRH još uvek nije tačno određeno. U mozgu i u amnionskoj tečnosti, GnRH se može detektovati između 11.5 i 12.5 dana fetalnog razvoja pacova (Aubert i sar., 1985; Nemeskeri i sar., 1986; Jennes, 1989), ali se u olfaktornom bulbusu GnRH-reaktivni neuroni pojavljuju tek oko 15. dana (Jennes, 1989). Ovaj raskorak može biti objašnjen nemogućnošću neurona da deponuju GnRH, već ga oslobađaju u nazalnu šupljinu i amnionsku tečnost.

GnRH neuroni migriraju sa zadnjeg zida nazalne šupljine ka hipotalamusu između 17. i 19., a njihovi aksoni dosežu eminenciju medijanu 19. fetalnog dana (Jennes, 1990). Međutim, sinteza LH u hipofizi počinje 17. dana gestacije (Setalo i Nakane, 1976; Watanabe i Daikoku, 1979) i to verovatno bez ikakve hipotalamusne kontrole. Druga nelogičnost vezana za početak sinteze gonadotropina je pojava receptora za GnRH na membranama gonadotropnih ćelija 13. fetalnog dana pacova, daleko pre pojave GnRH u eminenciji medijani (Jennes, 1989). Kod GnRH deficijentnih hipogonadalnih miševa utvrđeno je prisustvo niske ali merljive koncentracije gonadotropnih hormona, što dokazuje mogućnost sinteze FSH i LH bez prisustva GnRH (Cattanach i sar., 1977). Međutim, sinteza dovoljne količine LH je ipak zavisna od hipotalamusne stimulacije, jer se do 19. fetalnog dana ne dostižu fiziološki značajne koncentracije LH (Huhtaniemi i sar., 1996).

Fetalni jajnik nije osetljiv na gonadotropne hormone. Metodom PCR dokazano je da se u jajniku 14.5 dana starih fetusa pacova javlja iRNK za ekstracelularni domen LH receptora, koji nije funkcionalan. Kompletan LH receptor je u jajniku detektovan tek 7. postnatalnog dana (Sokka i Huhtaniemi, 1990). Ekspresija iRNK ekstracelularnog domena FSH receptora detektovana je u jajniku fetusa starih 20.5 dana, a receptora pune dužine 3. dana života (Sokka i Huhtaniemi, 1990). Međutim, ukoliko se fetalnim jajnicima u kulturi dodaju cAMP ili aktivatori adenilat ciklaze, dolazi do stimulacije aromatazne aktivnosti. Ovo sugeriše da neki drugi faktori, koji ne uključuju gonadotropne hormone, imaju

mogućnost aktivacije funkcije jajnika, čak pre otpočinjanja folikulogeneze. Smatra se da to mogu biti različiti neurotransmiteri i/ili neutrofini, budući da se simpatička inervacija jajnika razvija pre formiranja prvih primordijalnih folikula (Ahmed i sar., 1986).

### **1.3.2. Regulacija gonadotropnog sistema tokom neonatalnog perioda**

U toku neonatalnog perioda života (od 1. do 7. dana) koncentracija gonadotropnih hormona u plazmi postepeno raste i znatno je veća u odnosu na vrednosti kod adulta (Herath i sar., 2001). Kod miša se od 7. do 8. postnatalnog dana beleži pik LH koncentracije, koja kasnije značajno fluktuirira (Michael i sar., 1980). Hipofizno-ovarijalna povratna sprega nije aktivna u toku neonatalnog perioda života. Visoka koncentracija alfa fetoproteina (AFP), koji vezuje estrogen u cirkulaciji, u neonatalnom periodu odgovorna je za smanjenje bioaktivnosti estrogena (Meijs-Roelofs i Kramer, 1979). Pored toga, pretpostavlja se da je sekrecija gonadotropina u neonatalnom periodu života više pod androgenom kontrolom (Andrews i Ojeda, 1981).

U mleku pacova utvrđeno je postojanje supstanci sličnih GnRH, koje se po karakteristikama utvrđenim metodom tečne hromatografije (HPLC) ne razlikuju od GnRH iz hipotalamusa (Amarant i sar., 1982; White i Ojeda, 1981). Sadržaj želuca neonatalnih pacova je nakon sisanja imunohistochemijski pozitivan na GnRH, koji prolazi gastroinestinalno-epitelnu barijeru, ulazi u krvotok, i njegova koncentracija u krvi počinje da raste. U *in vitro* uslovima, GnRH iz mleka stimuliše oslobađanje gonadotropnih hormona iz hipofize (Smith i Ojeda, 1984; Baram i sar., 1977) i inhibira stimulisano oslobađanje estrogena i progesterona iz jajnika (Smith i Ojeda 1984). Vezujući se za svoje receptore u neonatalnom jajniku, GnRH iz mleka, kontinuirano prisutan u cirkulaciji, ograničava njegov razvoj (Dalkin i sar., 1981, Smith i Ojeda, 1984).

Jajnik neonatalnih ženki, kao i jajnik fetusa, nije osjetljiv na stimulaciju LH, budući da se kompletna forma njegovog receptora javlja tek 7. postnatalnog dana (Sokka i Huhtaniemi, 1990). Jajnici neonatalnih pacova ne počinju sekreciju estrogena do kraja prve nedelje života (Lamprecht i sar., 1976).

Imunoreaktivni inhibin je detektovan u jajnicima pacova od 5. dana života. Herath i sar.(2001) smatraju da sintezu i sekreciju inhibina stimuliše FSH, budući da je u *in vitro* uslovima dokazano da je FSH najvažniji stimulator sinteze inhibina u granulosa ćelijama (Lanuza i sar., 1999; Welt i Schneyer, 2001).

### **1.3.3. Regulacija gonadotropnog sistema tokom infantilnog perioda**

U toku infantilnog perioda života kod ženki pacova (od 8. do 21. dana) koncentracija gonadotropnih hormona, i FSH i LH, je povećana u odnosu na adultne vrednosti (Dohler i Wuttke, 1975; Ojeda i Ramirez, 1972). Dvanaestog postnatalnog dana, u nivou FSH u plazmi se beleži dvostruko do trostruko povećanje. Wilson i Handa (1997) navode da nakon ovog povećanja dolazi do naglog opadanja nivoa FSH do 15. dana života, dok Herath i sar. (2001) beleže opadanje FSH do 25. dana života. Ekspresija FSH $\beta$  iRNK je u korelaciji sa nivoom FSH u cirkulaciji. Uočena korelacija ukazuje da je regulacija FSH u infantilnom periodu na nivou ekspresije iRNK. Međutim, nije poznato da li je povećanje FSH $\beta$  iRNK u hipofizi u toku infantilnog perioda, i njenog pika 12. dana, rezultat pojačane transkripcije ili povećanja stabilnosti iRNK (Wilson i Handa, 1997). Nivo LH u plazmi infantilnih ženki pacova, takođe, je povećan u odnosu na adultni period života, a karakteriše ga značajna promenljivost (Ojeda i Ramirez, 1972). Ekspresija LH $\beta$  iRNK u hipofizi se postepeno povećava u toku infantilnog perioda i nije u korelaciji sa koncentracijom LH u cirkulaciji. Wilson i Handa (1997) su ustanovili da se postepeno

povećanje LH $\beta$  iRNK dešava u vreme već povećane koncentracije LH u plazmi. Moguće je da se od 8. do 12. dana života oslobađa velika količina LH iz depoa gonadotropnih ćelija, a da se ekspresija LH $\beta$  iRNK postepeno povećava kao odgovor na iskorišćene depoe. Jedan od razloga varijabilnog lučenja LH u toku infantilnog perioda života je taj što se GnRH iz hipotalamusa ne oslobađa u ravnomernim pulsevima kao kod adulta. Druga mogućnost je nezrelost transdukcije GnRH signala u hipofizi infantilnih ženki, s obzirom da se vezivanje GnRH za receptor u toku infantilnog perioda konstantno povećava do svog maksimuma oko 20. dana života (Chan i sar., 1981). Osetljivost gonadotropnih ćelija na GnRH stimulaciju je najveća od 10. do 15. dana (Ojeda i sar., 1977). Broj receptora za GnRH je u korelaciji sa osetljivošću hipofize u ovom periodu, ali ova korelacija prestaje nakon 15. dana života, jer se osetljivost smanjuje, a broj receptora nastavlja da raste (Wilson i Handa, 1997). Pokazano je da u toku infantilnog perioda života GnRH stimuliše oslobađanje FSH i LH, ali nije odgovoran za njihovu selektivnu regulaciju. Ekspresija iRNK za aktivin, folistatin i aktivinski receptor je utvrđena u hipofizi infantilnih ženki. Takođe, iRNK za aktivinski receptor je detektovana u ćelijama koje sintetišu FSH, pa se kao mogući diferencijalni regulator gonadotropnih hormona pominje aktivin (Wilson i Handa, 1998a). U infantilnom periodu života ženki pacova sekrecija gonadotropnih hormona je diferencijalno regulisana, ali u odsustvu inhibitornih uticaja (Wilson i Handa, 1997).

Endogeni estrogen ne utiče negativnom povratnom spregom na hipofizu do 15. dana života zbog visokog nivoa AFP (Meijs-Roelofs i Kramer, 1979), dok egzogeni sintetički estrogeni inhibiraju gonadotropne ćelije (Lovren i sar., 1997). Tek nakon 20. dana života, kada nivo AFP u cirkulaciji opadne, dolazi do uspostavljanja negativne povratne sprege estrogena na gonadotropne hormone (Ojeda i Urbanski, 1994). Inhibin, takođe, nije fiziološki značajan do 20. dana života, jer imunoneutralizacija inhibina, koja kod adulta dovodi do značajnog skoka FSH, nema efekata u periodu od 10. do 15. dana (Rivier i Vale,



1987). Blokadam efekata estrogena i androgena *in vivo* kod ženki pacova dokazano je da ovarijalni steroidi direktno pozitivno utiču na sekreciju FSH i LH od 8. do 14. dana kod ženki pacova (Wilson i Handa, 1998b). Vezivanje  $17\beta$  estradiola u hipofizi značajno raste od 10. do 15. dana (MacLusky i sar., 1979), i broj  $\beta$  receptora za estrogen je daleko veći u odnosu na adultni period (Wilson i sar., 1998). Takođe, moguće je da estrogen u toku razvoja stimuliše aktivin, jer je njegov stimulatoran uticaj na sintezu i sekreciju aktivina dokazan u granulosa ćelijama (Tate i sar., 1996), a pored toga utiče i na folistatin (Halvorson i sar., 1994).

U drugoj nedelji života, u jajnicima ženki pacova počinje rast i razvoj duplo većeg broja folikula nego kod adultnih ženki. Pretpostavlja se da pik FSH u ovom periodu života upravo ima ulogu u inicijaciji rasta prvog talasa folikula u jajniku (Ojeda i Urbanski, 1994). Proces folikulogeneze u jajnicima ženki pacova do 20. dana života dolazi do stupnja preantralnih folikula, a tek nakon ovog perioda dolazi do formiranja velikih antralnih folikula (Herath i sar., 2001). Preovulatorni folikuli se u jajnicima uočavaju tek u vreme puberteta (Ojeda i Urbanski, 1994). Herath i sar. (2001) su pokazali da se u jajnicima infantilnih ženki produkuje inhibin, kao i da su ovarijumu mesto sinteze i sekrecije polnih steroida, androgena i estrogena, čija se povećana koncentracija beleži u ovom periodu života.

#### **1.3.4. Regulacija gonadotropnog sistema tokom puberteta**

Pubertet se može definisati kao prelazan period između detinjstva i odraslog doba kod ljudi, ili od polne nezrelosti do polne zrelosti kod životinja. U toku puberteta dolazi do uspostavljanja reproduktivne funkcije, odnosno sazrevanja gonada i oslobađanje prvih zrelih polnih ćelija. Pubertet je određen velikim brojem međusobno povezanih događaja, od kojih neki započinju u toku infantilnog perioda života.

Kod ženki pacova pubertet nastupa oko 38. dana života. Znak otpočinjanja puberteta je otvaranje vagine, koja je uglavnom praćena prvim ovulacijama. Prva hormonska manifestacija koja nedvosmisleno pokazuje da pubertalno sazrevanje počinje je dnevna varijacija oslobađanja LH, koja se uočava nakon 4. nedelje života (Ojeda i Urbanski, 1994). Meijs-Roelofs i sar. (1983) su detektovali prepubertalno povećanje koncentracije LH u krvi 8 do 9 dana pre nastupanja puberteta, koja je u toku popodneva bila veća u odnosu na onu merenu ujutru. Detaljnijom analizom krvi svakih pet minuta, konstatovano je povećanje i bazalnog nivoa i amplitude pulseva LH u popodnevnom časovima u poređenju sa jutarnjim (Urbanski i sar., 1984). Dokazano je da dnevni ritam lučenja LH ima izuzetan značaj u funkcionalnom sazrevanju jajnika peripubertalnih ženki. Perfuzijom jajnika koncentracijama LH sličnim popodnevnom ustanovljena je značajnija sekrecija estrogena i progesterona, u odnosu na one izazvane znatno nižim (jutarnjim) koncentracijama (Urbanski i Ojeda, 1985). Dnevni ritam lučenja LH u peripubertalnom periodu ne zavisi od steroidnih i/ili peptidnih hormona jajnika, s obzirom da se kod peripubertalnih ženki 48 h nakon ovarijektomije, takođe, beleži popodnevno povećanje LH koncentracije (Urbanski i Ojeda, 1987). Dnevne promene u pubertalnom pulsatilnom oslobađanju LH zavise dakle od aktivacije GnRH sekrecije (Ojeda i Urbanski, 1994).

Sisk i sar. (2001) su kod ženki pacova u periodu od 30. do 47. dana života detektovali značajno ubrzanje frekvencije GnRH pulseva, ali bez povećanja njihove amplitude. Najizraženije povećanje frekvencije zabeleženo je nakon otvaranja vagine. Pubertalno povećanje frekvencije GnRH pulseva može dovesti do povećanja amplitude LH pulseva stimulišući ekspresiju iRNK za sopstveni receptor u gonadotropnim ćelijama (Turgeon i sar., 1996) i/ili favorizujući sintezu LH u odnosu na FSH (Shupnik, 1996).

Dakle, promena u lučenju LH je rezultat hipotalamusne stimulacije (Ojeda i Urbanski, 1994), pa se postavlja pitanje "šta okida pubertalno povećanje sekrecije GnRH?"

Povećanje GnRH iRNK u GnRH neuronima kod nezrelih ženki pacova (između 20. i 30. dana života) može biti stimulirano aktivacijom receptora za ekscitatornu aminokiselinu N-metil-D-aspartat (Gore i sar., 1996), pa je moguće da je pubertalno povećanje frekvencije pulseva GnRH, i samim tim povećanje sekrecije gonadotropina, rezultat elektrofiziološke aktivacije GnRH neurona (Sisk i sar., 2001). Možda se upravo ekscitabilnost GnRH neurona povećava kod peripubertalnih životinja. U ovom procesu učestvuju mnogi faktori kao što su ekstrahipotalamusni, t.j. metabolički i senzorni signali. Poznato je da je energetska balans jedan od ključnih faktora, budući da gladovanje sprečava nastupanje puberteta kod ženki pacova (Bronson, 1986). Do sada nije u potpunosti jasno kako metabolički faktori utiču na sazrevanje generatora GnRH pulseva, ali su u ovaj proces sigurno uključeni leptin (Cunningham i sar., 1999), insulin (Bucholtz, 2000), GH (Wilson, 1992), IGF-1 (Hiney i sar., 1996) i glukoza (Medina i sar., 1998).

U jajnicima pubertalnih ženki pacova prvi put se uočavaju veliki antralni folikuli u terminalnoj fazi rasta, kao i preovulatorni folikuli. Talasi LH u ovom periodu izazivaju prve ovulacije, što rezultuje pojavom prvih žutih tela (Ojeda i Urbanski, 1994).

#### **1.4. Glukokortikoidni hormoni**

Glukokortikoidni hormoni su steroidni hormoni koji se sintetiziraju u *zona fasciculata* kore nadbubrežne žlezde. Njihovu sintezu i sekreciju reguliraju kortikotropni oslobađajući hormon CRH, odnosno ACTH, a i glukokortikoidi negativnom povratnom spregom, reguliraju sopstvenu sekreciju. Ovi hormoni su derivati holesterola, i kao i ostali steroidni hormoni, imaju ciklopentanoperhidrofenantrensko jezgro, sa 17 ugljenikovih atoma i 4 prstena. Najzastupljeniji glukokortikoid kod čoveka, mačke, govečeta, ovce i majmuna je kortizol, koji na C-17 ima hidroksilnu grupu, a kod pacova, miša i ptica zastupljen je uglavnom kortikosteron, koji ima hidroksilnu grupu na C-11. Ulazak holesterola iz

cirkulacije u parenhimske ćelije *zone fasciculata*, i pretvaranje holesterola u pregnenolon, su prvi koraci u biosintezi glukokortikoida, koje podstiče ACTH.

Sa mesta biosinteze, glukokortikoidi se cirkulacijom prenose do svojih ciljnih ćelija vezani za alfa globuline plazme (transkortin). Hormon u vezanom obliku je neka vrsta rezerve, odakle se po potrebi oslobađa. Transkortin, takođe štiti ćelije od visoke koncentracije hormona u stresnim situacijama. Glukokortikoidi zahvaljući svojoj lipofilnosti, prolaze kroz membrane ciljnih ćelija difuzijom, i tako ulaze u citoplazmu. Ulaskom u ciljnu ćeliju, hormoni se reverzibilno vezuju za glukokortikoidne receptore, koji posreduju u njihovom delovanju, prenoseći hormonski signal do genoma.

#### **1.4.1. Glukokortikoidni receptor**

Glukokortikoidni receptor (GR) je protein, koji je prvi put otkriven u limfocitima pacova (Munck i Brink-Johnsen, 1968), a njegovo prisustvo je kasnije konstatovano u skoro svim tkivima. Postoje velika (9S) i mala (4S) forma ovog receptora. Velika forma GR, koja se nalazi u citoplazmi, u stvari je multiproteinski kompleks, koji pored jednog molekula GR, sačinjavaju i proteini toplotnog šoka - Hsp90, Hsp70, imunofilin Hsp56 i mali protein p23. U ovakvom obliku GR nema sposobnost vezivanja za DNK. Tu sposobnost zadobija u procesu transformacije, odnosno konverzijom 9S u 4S oblik, poznat u literaturi pod nazivom »transformisani GR«. Jedino u 9S obliku, receptor može da veže ligand - hormon, što dovodi do transformacije 9S u 4S oblik, a asosovani proteini omogućavaju održavanje receptora u konformaciji neophodnoj za taj proces (Pratt, 1993).

GR može da se javlja u dva osnovna stanja, neaktivnom-defosforilisanom i aktivnom-fosforilisanom, a do fosforilacije dolazi nakon vezivanja hormona za receptor. Dakle, interakcija hormon - receptor dovodi do značajnih konformacionih promena receptorskog molekula sa funkcionalnim posledicama. Takva promena je disocijacija Hsp90

iz kompleksa, bez mogućnosti reasocijacije (Tsai i O'Malley, 1994). Time je omogućeno oslobađanje hormon-vezujućeg domena (HBD) i transformacija receptora. Asocijacija receptora sa ovim proteinom je odlučujući faktor za njegovo održavanje u transkripciono neaktivnom stanju. Takođe, značajna promena je i hiperfosforilacija receptora, odnosno njegova aktivacija (Bodwell i sar., 1993).

Nakon vezivanja hormona za GR, i njegove transformacije i aktivacije na njemu možemo razlikovati tri funkcionalna domena:

C - terminalni, odnosno domen koji je odgovoran za vezivanje hormona. U okviru ovog domena nalaze se i sekvence odgovorne za vezivanje Hsp (Pratt, 1993), translokaciju u jedro (Picard i Yamamoto, 1987), dimerizaciju (Dahlman-Wright i sar., 1994), transaktivaciju (Lanz i Rusconi, 1994), i inaktivaciju receptora u odsustvu hormona (Hollenberg i sar., 1987).

DNK - vezujući domen nalazi se u centralnom delu receptornog molekula. Ovo je evolutivno veoma konzerviran domen u okviru cele receptorske superfamilije. Ovaj domen sastoji se od dva nezavisna subdomena, koji se razlikuju strukturno i funkcionalno. Oba subdomena sadrže po jedan atom cinka, koordinativno vezan za četiri cisteinska ostatka. Prvi subdomen je odgovoran za precizno prepoznavanje DNK sekvenci, odnosno odgovarajućih genskih regulatornih elemenata, koji odgovaraju na glukokortikoide. Drugi subdomen stabilizuje interakciju receptor - DNK.

N - terminalni, odnosno imunogeni domen, sadrži sekvence odgovorne za aktivaciju specifičnih ciljnih gena i/ili interakciju sa komponentama transkripcionog aparata (Dahlman-Wright i sar., 1994). Ovaj domen se verovatno nalazi na površini molekula.

Dakle, nakon vezivanja hormona za njegov specifičan receptor, i transformacije i aktivacije receptora, hormon - receptor kompleks se transportuje u jedro, gde se vezuje za specifičnu DNK sekvencu (GRE - glucocorticoid responsive element). Sledeći korak je

inicijacija transkripcije, koja dovodi do aktivacije ili inhibicije ekspresije gena u ciljnim ćelijama.

Ulaskom u jedro, aktivirani receptor može da moduliše transkripciju vezivanjem za specifičnu DNK sekvencu, ili interakcijom sa drugim transkripcionim faktorima bez direktnog vezivanja za DNK. GRE se nalaze u promotorskom regionu gena koje aktiviraju glukokortikoidi, i njegova interakcija sa receptorom ima za posledicu modulaciju transkripcije. U promotoru mnogih gena, koji kodiraju metabolički važne proteine, prisutan je GRE, koji ima uočljiv efekat na transkripciju, kao odgovor na hormonski signal (Roesler i Park, 1998).

U promotorima nekih gena, vezivanje aktiviranog kompleksa hormon - receptor za tzv. negativne glukokortikoid responsive elements (nGRE), dovodi do inhibicije transkripcije, mada u interakciji sa drugim transkripcionim faktorima može dovesti i do stimulacije transkripcionog procesa (Drouin i sar., 1993).

#### **1.4.2. Metabolički efekti glukokortikoidnih hormona**

Glukokortikoidi svoje biološke efekte ostvaruju regulacijom različitih metaboličkih procesa u velikom broju tkiva i organa. Promene metabolizma pod uticajem glukokortikoida obuhvataju anaboličke efekte u jetri i brojne kataboličke efekte u mišićima, vezivnom tkivu, limfatičnom tkivu uključujući i mozak.

Glukokortikoidi deluju tako što suprimiraju ulazak i iskorišćavanje glukoze u ćeliji, dovodeći do povećanja njene koncentracije u plazmi (Simpson i Cushman, 1986).

U metabolizmu ugljenih hidrata, glukokortikoidi deluju anabolički, odnosno stimulišu proces glukoneogeneze u jetri, čime se povećava i deponovanje glikogena u jetri. Ovaj efekat glukokortikoidi ostvaruju na nivou gena za fosfoenolpiruvat karboksikinazu i drugih enzima glukoneogeneze (Imai i sar., 1990).

Glukokortikoidi stimulišu katabolizam masnih kiselina iz masnog tkiva, njihovu oksidaciju u ćelijama, i povećavaju nivo lipida u krvi, kao i katabolizam proteina u mišićima, (Meyer, 1985).

Svojim delovanjem glukokortikoidi omogućavaju da se energetske depoe prevode u lako dostupne oblike, koji u svakom trenutku mogu da se iskoriste, što je od velikog značaja za organizam izložen stresorima, jer mu je za vraćanje u stanje ravnoteže neophodna energija.

Pored ovih metaboličkih efekata, za glukokortikoide je karakteristično i snažno antiinflamatorno i imunosupresivno dejstvo. Antiinflamatorni efekat glukokortikoida zasniva se na inhibiciji transkripcije velikog broja molekula, koji su uključeni u procese inflamacije, kao što su citokini, hemokini, endotelini i adhezioni molekuli. Takođe inhibitorno deluju na sintezu prostaglandina, ali stimulišu produkciju antiinflamatornih proteina, kao što je lipokortin (van der Velden, 1998). Ovi steroidni hormoni mogu da izazovu apoptozu u ćelijama hematopoetičnog sistema, koje su uključene u inflamatornu reakciju kao što su monociti, makrofage i T limfociti (Amsterdam i sar., 2002). Inače je poznato snažno apoptotsko dejstvo glukokortikoida na ćelije različitih tkiva, na timocite, normalne i neoplastične limfocite, granulocite, zatim na epitelijalne ćelije, germinativne ćelije, osteoblaste i neurone (Riccardi i sar., 1999). Uloga glukokortikoida u inicijaciji apoptoze, ogleda se pre svega u aktivaciji transkripcije familije Bcl-2 gena, koji kodiraju sintezu nekih proapoptičnih (Bcl-x<sub>s</sub>, Bad, Bax, Bid) ali i nekih antiapoptičnih (Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Mcl-1) proteina (Nagata, 1997).

Glukokortikoidi kao i ostali hormoni HPA (hipotalamo-hipofizno-adrenalnog) sistema pokazuju imunosupresivni efekat, (Bateman i sar., 1989), što se ogleda u redukciji broja cirkulišućih makrofaga i monocita, inhibiciji produkcije interleukina (IL-1 i IL-2), tumor necrosis factor- $\alpha$  i  $\gamma$ -interferona, blokiranju aktivnosti fosfolipaze A2 i uticaju na

povećano propadanje nezrelih T-ćelija (Harbuz i Linghtman, 1992). Zbog ovakvog efekta, glukokortikoidi se često primenjuju u terapijske svrhe u odgovarajućim stanjima.

U mozgu glukokortikoidi imaju dvostruko dejstvo: s jedne strane sastavni su deo neuroendokrinih puteva u odgovoru na različite stimulse, dok s druge strane određuju sudbinu hormon senzitivnih neurona, i modifikuju morfologiju i biohemiju ovih ćelija tokom celog života (Meyer, 1985). Takođe, utiču na jonsku provodljivost neuronske membrane, na efikasnost transmitterskog sistema u mozgu i na metaboličke osobine i ćelijsku morfologiju neurona (Joels i de Kloet, 1994).

#### **1.4.3. 11 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza 2 (11 $\beta$ -HSD2)**

Prvi, kritičan korak u aktivaciji GR je pod kontrolom dve izoforme enzima 11 $\beta$ -HSD. 11 $\beta$ -HSD-1 je NADPH-zavisna forma enzima, koja kod ljudi prevodi kortizon u bioaktivni kortizol, a 11-dehidrokortikosteron u kortikosteron kod pacova. 11 $\beta$ -HSD-2 je NAD-zavisna forma enzima i katalizuje prevođenje kortizola i kortikosterona u neaktivne 11-keto forme - cortizon i 11-dehidrokortikosteron (Edwards, 1996). Ovi enzimski sistemi prisutni su u većini fetalnih tkiva, gde modulišu pristup liganda GR.

11 $\beta$ -HSD-2 je visoko ekspimiran u placenti, i selektivno reguliše prolaz glukokortikoida iz cirkulacije majke u cirkulaciju fetusa (Waddell, 1998). S obzirom da je nivo glukokortikoida u cirkulaciji fetusa znatno niži nego kod majke, 11 $\beta$ -HSD-2 ima ulogu enzimske placentalne barijere štiteći na taj način osetljiva fetalna tkiva od visokih nivoa glukokortikoida. Međutim, ovaj enzim funkcionalan je samo u fiziološkim uslovima. Kada su glukokortikoidi majke značajno povišeni, kao u uslovima stresa, glukokortikoidi "izbegavajući" placentalnu barijeru dospevaju do fetusa (Seckl, 1997). Smanjena aktivnost ovog placentalnog enzima za posledicu ima izlaganje fetusa povećanoj koncentraciji glukokortikoida u odnosu na fiziološke vrednosti, što izaziva IUGR i programira sklonost



ka različitim poremećajima kasnije u životu. Sintetički glukokortikoidi nesmetano prolaze placentalnu barijeru, tako da se mogu koristiti u terapijske ali i u eksperimentalne svrhe.

#### **1.4.4. Uloga glukokortikoida u fetalnom razviću**

U fiziološkim uslovima sinteza glavnog adrenalnog glukokortikoida kod pacova - kortikosterona počinje 13. fetalnog dana (Mitani i sar., 1999). Od tada je i iRNK za glukokortikoidni receptor prisutna u tkivnim derivatima sva tri klicina lista i njena koncentracija se postepeno povećava tokom fetalnog razvića (Kitraki i sar., 1997). Ove činjenice ukazuju da glukokortikoidi sintetisani u adrenalnim žlezdama fetusa imaju značajnu ulogu u fetalnom rastu i razviću (Miller, 1998). Fiziološko povećanje koncentracije glukokortikoida majke i fetusa, i smanjenje aktivnosti placentalnog enzima 11  $\beta$ -HSD2 u poslednjim danima trudnoće, ima veliki stimulatorni uticaj na sazrevanje mnogih fetalnih tkiva i organa, naročito onih koji su neophodni za preživljavanje u neonatalnom periodu. Delujući na ćelijskom i molekularnom nivou, glukokortikoidi indukuju promene u rastu i diferencijaciji tkiva direktnim i indirektnim mehanizmima. Povećanje koncentracije nativnih glukokortikoida dovodi do promena na nivou receptora, enzima, jonskih kanala i transportera, kao i do promene ekspresije različitih faktora rasta, proteina citoskeleta i proteinskih komponenti intracelularnih signalnih puteva u različitim tipovima ćelija. Sve ove promene doprinose regulaciji ćelijskog rasta, stepenu njihove proliferacije i terminalne diferencijacije i imaju maturacioni efekat. Ovim adaptibilnim procesima postižu se maksimalne šanse za preživljavanje *in utero* i na rođenju (Fowden i Forhead, 2004). Na primer cirkulišući glukokortikoidi indukuju sazrevanje pluća fetusa i sintezu plućnih surfaktanata, stimulišu diferencijaciju ćelija mozga i procese sinaptogeneze, stimulišu produkciju enzima glukoneogeneze u jetri, utiču na razviće  $\beta$  ćelija pankreasa i količinu insulina, na razvijanje bubrega i imunog sistema. Metaboličke, kardiovaskularne i

imunološke adaptacije pod uticajem glukokortikoida su neophodne za uspešno prevazilaženje stresa pri rođenju i za postnatalne adaptacije na novonastale uslove sredine (Fowden i Forhead, 1998).

Dakle, iako neophodni za regulaciju fetalnog razvića, intrauterino izlaganje povećanim koncentracijama endogenih ili egzogenih glukokortikoida u nepovoljnim životnim uslovima, ili kroz određene eksperimentalne pristupe može imati štetne efekte i dovesti do smanjenog rasta u intrauterinoj sredini-IUGR (eng. intrauterine growth retardation) i razvojnog programiranja organa i organskih sistema sa dugotrajnim posledicama (Manojlović, Nestorović i Milošević, 2012).

### **1.5. Programiranje**

Tokom razvića organizam prolazi kroz “kritične periode” tokom kojih se dešavaju intenzivne ćelijske deobe, razvijanje i sazrevanje organa i organskih sistema. Ovi periodi su kratki, za različite organske sisteme javljaju se u različito vreme, i uglavnom traju i završavaju se tokom intrauterinog života. Nakon rođenja kod većine sisarskih vrsta samo mozak, jetra i imuni sistem zadržavaju plastičnost. Tokom ovih osetljivih razvojnih perioda svaka promena uslova koji vladaju u materici može biti ključna za određivanje toka kojim će se odvijati procesi razvića i diferencijacije. Tako, na primer smanjena oksigenacija, smanjen dotok hranljivih materija ili promene u hormonskom statusu mogu rezultirati razvojnim adaptacijama, koje trajno menjaju strukturu, fiziologiju i metabolizam. Ovakve promene delotvorne su u datom trenutku, jer omogućavaju preživljavanje, ali mogu biti uzrok brojnih patoloških stanja koja se ispoljavaju kasnije u životu. Dakle, događaji tokom intrauterinog razvoja na taj način utiču na celokupni životni ciklus i sudbinu organizma. Ovakva zapažanja doprinela su nastanku koncepta “programiranja”, koji govori o

povezanosti promena nastalih tokom fetalnog razvoja, i pojave niza oboljenja u kasnijem periodu života (Barker, 2012).

Mnoge epidemiološke studije na ljudima su pokazale da IUGR i smanjena težina na rođenju mogu biti povezani sa hipertenzijom, intolerancijom na glukozu, rezistencijom na insulin, dijabetesom tipa 2, gojaznošću i reproduktivnim poremećajima u adultnom dobu (Barker, 2004). Tome najčešće vodi pothranjenost trudnice, izloženost stresu ili terapijskim glukokortikoidima, koji u organizmu fetusa izazivaju usporavanje ćelijskih deoba i smanjenje broja ćelija u svakom organu. Promenjena koncentracija faktora rasta i insulina se odražava na metaboličku aktivnost organa (Barker, 1995).

Takozvana holandska glad je “ratni eksperiment” tokom koga su zbog ratnih uslova i okupacije, od oktobra 1944. godine do aprila 1945. godine Holandani na jednom delu teritorije živeli u uslovima gladi. S obzirom da se radi o populaciji ljudi koji su pre iznenadnog nastupanja gladi, imali normalne navike u ishrani, da se zna tačno vreme gladovanja i da je u tom periodu medicinska dokumentacija vrlo pedantno vođena, glad, kao jedinstvena paralela animalnim modelima potvrdila je da smanjena ishrane majke tokom trudnoće i IUGR vode rođenju potomaka sa smanjenom težinom, kod kojih se sa većom verovatnoćom razvijaju metabolički sindrom, kardiovaskularni i reproduktivni poremećaji (Roseboom i sar., 2006).

Kod potomaka majki koje su u toku trudnoće bile izložene stresnim situacijama, takođe je prisutan IUGR, te se rađaju sa smanjenom telesnom težinom, sa umanjenim motornim, verbalnim i socijalnim veštinama, i predispozicijom za niz metaboličkih i reproduktivnih poremećaja u kasnijem životu (Weinstock, 1988).

Koncept programiranja eksperimentalno je testiran kod mnogih vrsta, gde je korišćen širok spektar eksperimentalnih pristupa, da bi se postigao IUGR. Neki od najčešće korišćenih eksperimentalnih modela su dijeta majke, insuficijencija placente, izazivanje

stresne reakcije kod majke, tretiranje majke sintetičkim glukokortikoidima ili inhibicija enzima 11  $\beta$ -HSD2 (Nathanielsz, 2006). Svaki od ovih eksperimentalnih pristupa različitim mehanizmima doveo je do izlaganja fetusa povećanoj koncentraciji glukokortikoida, što je izazvalo IUGR.

### **1.5.1. Stres tokom trudnoće, pothranjenost trudnice i antenatalna terapija**

Izloženost stresu tokom trudnoće direktno je povezana sa poremećajima u ponašanju, povećanoj sklonosti potomaka ka razvijanju različitih metaboličkih i reproduktivnih poremećaja, i izmenjenom odgovoru na stres u adultnom dobu. Mada mehanizmi kojima stres tokom trudnoće može uticati na fetalni razvoj, još uvek nisu u potpunosti jasni, povećan nivo glukokortikoida majke u stresnim uslovima može dovesti do poremećaja u razviću fetalnih organa i organskih sistema, i programiranja određenih fizioloških i psihijatrijskih poremećaja kod potomaka (Williams i sar., 1999).

Enzim 11  $\beta$ -HSD2, visoko eksprimiran u placenti, predstavlja prirodnu barijeru, i štiti nežna fetalna tkiva od glukokortikoida majke, čije se koncentracije fiziološki povećavaju u drugoj polovini trudnoće (Edwards i sar., 1993). Međutim, kada se kao odgovor hipotalamo-hipofizno-adrenalnog (HHA) majke na stresne faktore, cirkulišuće koncentracije glukokortikoida višestruko povećaju u odnosu na fiziološke vrednosti, glukokortikoidi prolaze placentu bez enzimske inaktivacije i dospevaju do fetusa. Izlaganje fetusa povećanoj koncentraciji glukokortikoida, redukuje fetalni rast i uzrokuje programiranje čitavog niza poremećaja u adultnom dobu (Williams i sar., 1999).

Pothranjenost majke tokom trudnoće, naročito usled izlaganja niskoproteinskim dijetama, dovodi do smanjenja rasta placente i smanjenja intrauterinog rasta potomaka, koji na svet dolaze sa smanjenom telesnom težinom. Smanjen fetalni rast i u ovim okolnostima nastaje kao posledica izlaganja fetalnih tkiva povećanim koncentracijama glukokortikoida,

samo što su u ovom slučaju glukokortikoidi fetalnog porekla. Pothranjenost trudnice usled smanjenog unosa proteina dovodi do aktivacije HHA sistema fetusa i povećane sinteze fetalnih glukokortikoida, kao i do smanjenja nivoa jednog od ključnih fetalnih faktora rasta, IGF2( eng. insulin-like growth factor 2 ). Smanjenje fetalnog rasta u takvim okolnostima sa sobom nosi povećan rizik od kardiometaboličkih, neuropsihijatrijskih i reproduktivnih poremećaja u adultnom dobu (Cottrell i sar., 2012).

S obzirom na dobro poznate efekte glukokortikoida na rast i sazrevanje brojnih tkiva i organa tokom fetalnog perioda, a i na njihovu regulatornu ulogu u čitavom nizu fizioloških procesa, njihovi sintetički analozi danas se široko primenjuju u kliničkoj praksi. Antenatalna terapija podrazumeva tretiranje majke sintetičkim glukokortikoidima u slučajevima kada postoji rizik od prevremenog porođaja. Deksametazon, betametazon i prednisolon, najčešće korišćeni sintetički glukokortikoidi, nesmetano prolaze placentalnu barijeru i dospevaju do fetusa, gde ispoljavaju svoj veoma potentan maturacioni efekat na fetalne organe i organske sisteme, čime se smanjuje rizik od neonatalnog mortaliteta i morbiditeta. Antenatalnom terapijom glukokortikoidima danas se uglavnom sprovodi prevencija respiratornog distres sindroma (RDS), koji se zbog nezrelosti respiratornog sistema i nedostotka alveolarnog surfaktanta javlja kod prevremeno rođene dece. Međutim glukokortikoidi se daju tokom trudnoće i u drugim kliničkom stanjima majke i fetusa, kao alergije, astma i kongenitalna adrenalna hiperplazija (CAH). Posledice ovakve terapije ogledaju se u smanjenoj telesnoj težini novorođene dece kao i povećanoj sklonosti ka čitavom nizu fizioloških i psiholoških poremećaja u kasnijem životu, tako da je pitanje veće koristi ili rizika prenatalne terapije sintetičkim glukokortikoidima još uvek otvoreno (Tegethoff i sar., 2009).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Fetalni razvoj predstavlja kritičan deo životnog ciklusa, tokom koga se dešavaju intenzivne ćelijske deobe, razvijanje i sazrevanje tkiva, organa i organskih sistema. Svaka promena uslova u materici, sredini gde fetus raste i razvija se može da poremeti fiziološki tok ovog procesa, odrazi se na adultni fenotip i celokupni životni ciklus jednog organizma. Povezanost promena nastalih tokom fetalnog razvoja i čitavog niza poremećaja koji se ispoljavaju kasnije u životu, proučava se u okviru koncepta programiranja. Neki od najčešće korišćenih eksperimentalnih modela u proučavanju programiranja su dijeta majke, izazivanje stresne reakcije kod majke, tretiranje majke sintetičkim glukokortikoidima- antenatalna terapija, insuficijencija placente i inhibicija enzima  $11\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze ( $11\beta$ -HSD2). Svaki od ovih eksperimentalnih pristupa predstavlja paralelu realnih i čestih životnih situacija, u kojima se trudnica savremenog doba može naći, i različitim mehanizmima dovodi do izlaganja fetusa povećanoj koncentraciji glukokortikoida.

S obzirom da je poznato da izlaganje fetusa povećanim koncentracijama glukokortikoida u odnosu na fiziološke vrednosti vodi razvijanju čitavog niza metaboličkih i kardiovaskularnih poremećaja u adultnom dobu, a da su podaci o efektima na reproduktivni sistem oskudni,

cilj ove disertacije bio je da se ustanovi da li je i na koji način izlaganje fetusa pacova sintetičkom glukokortikoidu deksametazonu u najosetljivijem periodu za indukovanje promena u razvoju, od 16. do 18. fetalnog dana uticalo na programiranje razvoja i funkcije hipofizno-ovarijalnog sistema u fetalnom, neonatalnom, infantilnom i peripubertalnom periodu života.

Da bismo realizovali ovaj cilj ispitivali smo:

1. Efekat intrauterinog izlaganja deksametazonu na gonadotropne ćelije hipofize u fetalnom (19. i 21. dan) i ključnim postnatalnim periodima u razvoju hipofizno-ovarijalnog sistema.
2. Efekat intrauterinog izlaganja deksametazonu na jajnike pacova u fetalnom i navedenim postnatalnim periodima.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 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 na svetlostom režimu 12h dan / 12h noć. Standardna laboratorijska hrana i voda bili su slobodno dostupni životinjama tokom izvođenja eksperimenta.

Estrusni ciklus polno zrelih ženki svakodnevno je praćen uzimanjem vaginalnog brisa. Konstatovanjem faze estrusa, perioda koji traje 24 – 30 sati, ženke su spajane sa mužjacima na 24 sata. Nakon 24 sata ženke i mužjaci su odvajani u posebne kaveze, a kod sperm-pozitivnih ženki dan razdvajanja računat je kao prvi dan gestacije (dužina gestacije kod pacova iznosi 22 dana). U eksperimentalnu proceduru su bile uključene gravidne ženke, a predmet naših istraživanja bili su njihovi potomci u određenom periodu života.

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)".

#### 3.2. Eksperimentalne grupe

Predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji bili su fetusi i ženke pacova koje su od 16. do 18. dana gestacije izloženi deksametazonu.

Gravidne ženke pacova su tri uzastopna dana (od 16. do 18. dana gestacije) subkutano tretirane deksametazonom (*Dexamethasonis phosphat - Dx*, Krka, p.o., Novo



Mesto) rastvorenom u fiziološkom rastvoru (0.9% NaCl), u dozi od 1.0, 0.5 i 0.5 mg Dx/kg t.m./dan.

Kontrolna grupa gravidnih ženki primala je u istom periodu, adekvatnu zapreminu fiziološkog rastvora.

Potomci gravidnih ženki koje su primale deksametazon, odnosno fiziološki rastvor žrtvovani su u fetalnom (19. i 21. fetalni dan), neonatalnom (5. dan), infantilnom (16. dan) i peripubertalnom (38. dan) periodu života. Oni su svrstani u grupe sa po 6 ženki na sledeći način:

Period života	Grupa	Skraćenica
19. fetalni dan	Kontrolna grupa fetusa	f K19
	Eksperimentalna grupa fetusa	f Dx19
21. fetalni dan	Kontrolna grupa fetusa	f K21
	Eksperimentalna grupa fetusa	f Dx21
Neonatalni period (5. dan)	Kontrolna grupa ženki	K5
	Eksperimentalna grupa ženki	Dx5
Infantilni period (16. dan)	Kontrolna grupa ženki	K16
	Eksperimentalna grupa ženki	Dx16
Peripubertalni period (38. dan)	Kontrolna grupa ženki	K38
	Eksperimentalna grupa ženki	Dx38

➤ Kontrolne grupe fetusa, odnosno ženki podrazumevaju potomke majki koje su primale fiziološki rastvor tri uzastopna dana, od 16. do 18. dana graviditeta;

➤ eksperimentalna grupa fetusa, odnosno ženki podrazumevaju potomke majki koje su primale Dx rastvoren u fiziološkom rastvoru u dozi od 1.0, 0.5 i 0.5 mg Dx/kg t.m./dan, u periodu od 16. do 18. dana graviditeta.

### **3.3. Uzimanje i priprema materijala za analizu**

Fetusi stari 19 i 21 dan izolovani su iz materice majki, koje su prethodno dekapitovane. Po izolaciji celi fetusi su fiksirani u Bouen-ovom fiksativu u toku 24 sata, a zatim sprovedeni kroz seriju alkohola rastuće koncentracije - dehidratacija (30% etanol -2x po 30 min., 50% etanol- 2x po 30 min., 70% etanol – 24 h). Tek nakon sprovedenja kroz 70% etanol izoluju se hipofize i jajnici. Fetalna hipofiza je uzimana zajedno sa sfenoidnom kosti za koju je pričvršćena vezivnim tkivom, dok su jajnici pojedinačno izolovani. Po izolaciji organa nastavljen je proces dehidratacije (96% etanol - 2x po 60 min i 100% alkohol - 2x po 60 min), a zatim prosvetljavanja u ksilolu i kalupljenja u parafinu (Histowax; HistoLab Product AB, Göteborg, Sweden).

Ženke pacova stare 5, 16 i 38 dana žrtvovane su dekapitacijom u etarskoj anesteziji, nakon čega su izolovane hipofize i jajnici. Po izolaciji, organi su bili fiksirani, dehidrirani, prosvetljeni i ukalupljeni, na isti način kao i fetalni materijal.

Hipofize i jajnici su serijski sečeni na rotacionom mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) na preseke debljine 3  $\mu\text{m}$ , a jajnici fetusa na preseke debljine 2  $\mu\text{m}$ . Preseci hipofize i jajnika montirani su na mikroskopske predmetne pločice i pripremani za imunohemijska bojenja.

### **3.4. Hipofiza**

#### **3.4.1. Imunohistohemijsko obeležavanje gonadotropnih ćelija hipofize**

Gonadotropne (FSH i LH) ćelije hipofiza ženki pacova kontrolnih i ekperimentalnih grupa obeležavane su imunohistohemijskom metodom peroksidaza-antiperoksidaza (PAP; Sternberger, 1970). Imunohistohemijske metode, t.j. specifična reakcija između primarnog antitela i antigena omogućava diferencijalno bojenje ćelija koje nose specifični antigen, odnosno hormon. Radi izbegavanja nespecifične imunoreakcije, na

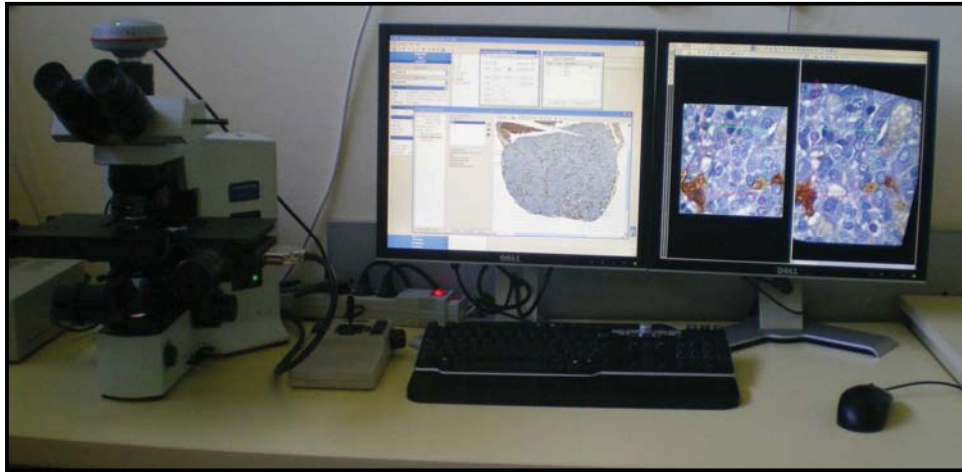
deparafinisanim i rehidriranim presecima hipofiza aktivnost endogene peroksidaze je inhibirana inkubacijom u 0.3% vodonik peroksidu u metanolu. Nakon toga preseci su ispirani u PBS-u (pH 7.4) dva puta po 5 minuta. Zatim je sledilo inkubiranje u normalnom svinjskom serumu (DAKO A/S, Glostrup, Danska) 1h na sobnoj temperaturi u koncentraciji 1:10 u PBS-u (pH 7.4), radi sprečavanja nespecifičnog bojenja. Za detekciju gonadotropnih ćelija korišćena su primarna anti-FSH (1:300) i anti-LH (1:500) anti-pacovska antitela (National Institut of Health, Bethesda, Md., USA) rastvorena u PBS-u. Nakon reakcije antigen - primarno antitelo, svi preseci su prošli istu proceduru: ispiranje u PBS-u, inkubiranje sa sekundarnim antitelima (svinja-antizec rastvorena u PBS-u–biotinylated link, LSAB System-HRP, DAKO A/S, Glostrup, Danska) 10 minuta na sobnoj temperaturi, zatim inkubiranje u Streptavidin-HRP kompleksu (Streptavidin-HRP, LSAB System-HRP, DAKO A/S, Glostrup, Danska) 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom sledi ispiranje preseka dva puta po 5 minuta u PBS-u (pH 7.4). Vizuelizacija kompleksa antigen antitelo obavljena je uz pomoć hromogenkog supstrata, 3.3 diaminobenzidin-tetrahlorida (DAB, DAKO A/S, Glostrup, Danska ). Nakon procedure imunohistohemijskog bojenja, preseci su kontrastirani u Mayer-ovom hematoksilinu (Merck-Alkaloid, Alkaloid, Skoplje, BJRM), a dehidrirani serijom etanola rastuće koncentracije. Montiranje je obavljeno DPX-om (Mountant for Histology, Sigma-Aldrich USA).

Specifičnost antitela je potvrđena izostavljanjem primarnog antitela tokom imunohistohemijske procedure, što je rezultiralo izostankom imunoreakcije.

### 3.4.2. Stereološka merenja

Stereologija (od grčkih reč *stereos* - solidan, trodimenzionalan i *logos* - nauka) je multidisciplinarna naučna oblast koja podrazumeva korišćenje metodologije, čijim se postupcima iz dvodimenzionalnih preseka tela kvantitativno procenjuje njihova trodimenzionalna unutrašnja građa (Howard i Reed , 2005).

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) je opremljen sa motorizovanim stočićem (Prior) sa preciznošću pomeranja po x-y osi od 1  $\mu\text{m}$  (Slika 1). Pomeranje stočića po z osi kontrolisano je mikrokatorom (Heidenhain MT1201) 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. NewCast stereološki sistem je generisao interaktivne stereološke mrežice i stereološki disektorske ramove prilikom analize hipofize i jajnika. Kako bi bila određena stvarna, debljina preseka (3,0  $\mu\text{m}$ ) 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 hipofize i jajnika jednaka debljini zadatoj na mikrotomu.

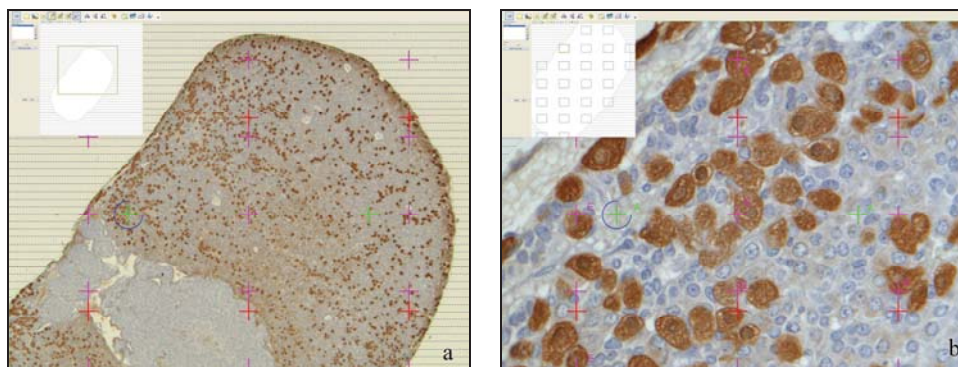


**Slika 1.** Mikroskop (Olympus BX-51) sa newCAST stereološkim softverskim paketom

### 3.4.3. Stereološka merenja hipofize

#### 3.4.3.1. *Volumen hipofize*

Volumen hipofize određen je primenom Kavalijerijevog principa (Gundersen, 1986). Analiziran je svaki deseti (kod fetusa i neonatalnih životinja), dvadeseti (kod infantilnih životinja) i trideseti (kod peripubertalnih životinja) imunohistohemijski obojen presek hipofize. Presek od kog će otpočeti analiza, izabran je pomoću tablice nasumičnih brojeva. Na monitoru, pri konačnom uveličanju 150x (uveličanje objektiva 4x) definisan je okvir analiziranog tkiva pomoću opcije *Mask* (Slika.2a). Generisane su 3 interaktivne stereološke mrežice a) mrežica za neobojenu fazu u okviru adenohipofize; b) mrežica za obojenu fazu u okviru adenohipofize – FSH i LH ćelije; c) mrežica za neurohipofizu i pars intermediju. Potom se pristupilo brojanju pogodaka koji padaju na određenu fazu unutar okvira analiziranog tkiva na konačnom uveličanju 1500x (uveličanje objektiva 40x), (Slika 2b).



Slika 2 a) Definisanje tkiva od interesa hipofize, b) interaktivne stereološke mrežice

Volumen hipofize izračunali smo kao zbir volumena neobojene faze adenohipofize  $V_{na}$ , volumena obojene faze adenohipofize  $V_{oa}$  i volumena neurohipofize i pars intermedije  $V_{ni}$ .

$$V_{hy} = V_{na} + V_{oa} + V_{ni}$$

Volumen pojedinačnih faza hipofize izračunat je 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, a  $\sum P_i$  je suma pogodaka koji padaju na analiziranu fazu.

Uslovi pod kojima se meri definišu se tako da broj pogodaka na svaku od analiziranih faza bude između 100 i 200. Volumen hipofize je apsolutna stereološka veličina koja se izražava u  $\text{mm}^3$ .

### 3.4.3.2. Volumenska gustina FSH i LH ćelija

Primenom Kavalijerijevog principa u određivanju volumena hipofize, određen je i volumen obojene faze u adenohipofizi, odnosno ukupan volumen koji zauzimaju imunoobeležene FSH i LH ćelije. Volumensku gustinu ( $V_v$ ) odnosno procentualnu

zastupljenost FSH odnosno LH ćelija u volumenu adenohipofize izračunavamo prema formuli:

$$V_V = V_{oa} / V_{na} + V_{ni} \cdot 100$$

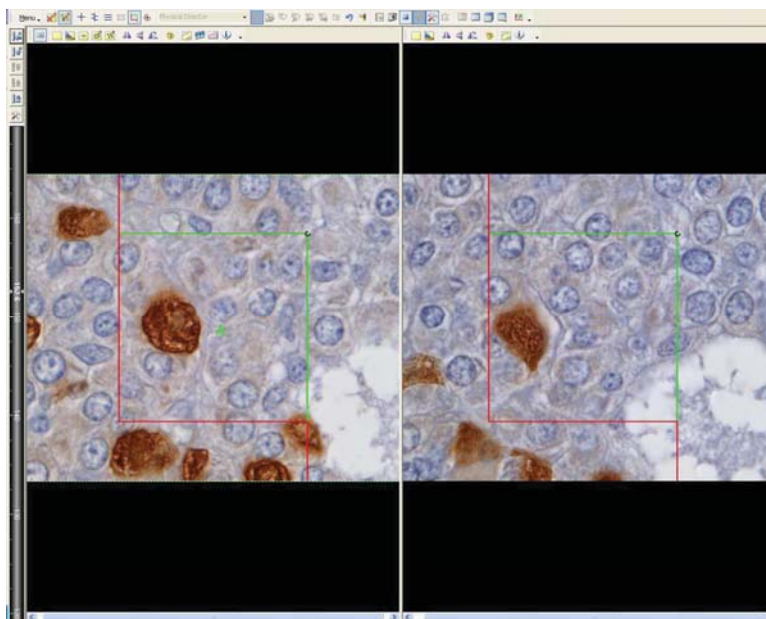
Volumenska gustina je relativna, bezdimenziona stereološka veličina koja se izražava u %.

### ***3.4.3.3. Apsolutni broj FSH i LH ćelija***

Broj FSH i LH ćelija određen je pomoću stereološkog, frakcionator/fizički disektor dizajna (Miller i sar., 1997; 1999; Mayers i sar., 2004), analiziranjem svakog desetog (kod fetusa i neonatalnih životinja), dvadesetog (kod infantilnih životinja), odnosno četrdesetog preseka hipofize (kod peripubertalnih životinja). Fizički frakcionator podrazumeva kombinaciju dva stereološka metoda, frakcionatora i fizičkog disektora. U okviru frakcionatora tkivo je uzorkovano na sistematski uniforman način na dva nivoa, pri čemu je početak uzorkovanja bio nasumičan (Gundersen i Jensen, 1987; Wreford, 1995; Miller i sar., 1997; Miller i sar., 1999). U prvom nivou uzorkovanja analiziran je svaki 10. i 11; 20. i 21. odnosno 40. i 41. presek. Preseci analizirani za dobijanje broja FSH i LH ćelija su isti kao i preseci korišćeni pri određivanju volumena hipofize. Prvi presek u serijskom nizu parafinskih preseka bio je izabran uz pomoć tablice nasumičnih brojeva. Preseci koji su određeni da predstavljaju disektorski par su prvo 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, izvršeno je poravnavanje preseka. Jedan od preseka iz para imenovan je kao referentni a drugi kao kontrolni (“look up”) presek (Slika 3). Potom je brojanje obavljeno u suprotnom pravcu, tj. kontrolni presek postaje referentni i obrnuto. Na ovaj način duplirana je prva frakcija uzorkovanja sa 1/10 na 1/5, tako da je  $f_1 = 0.2$  za

fetuse i neonatalne životinje; sa 1/20 na 1/10, tako da je  $f_1 = 0.1$  za infantilne životinje, odnosno sa 1/40 na 1/20, tako da je  $f_1 = 0.05$  za peripubertalne životinje.

Za izračunavanje broja FSH i LH ćelija korišćen je jedan nepristrasan stereološki ram (“unbiased stereological frame” Gundersen i Jensen, 1987). Cilj dizajna je da po hipofizi jedne životinje bude izbrojano 100 – 200 FSH, odnosno LH ćelija. Dimenzije nepristrasnog rama za brojanje FSH i LH ćelija bile su  $40 \times 40 \mu\text{m}$  ( $1600 \mu\text{m}^2$ ). Nakon definisanja dimenzije rama, opcijom “meander sampling” je uzorkovano 100% tkiva hipofize kod fetusa, 5% kod neonatalnih i infantilnih životinja, i 4% kod peripubertalnih životinja (pod kontrolom newCAST softvera). Dakle druga uzorkovana frakcija za ćelije hipofize bila je  $f_2 = 1$  za fetuse,  $f_2 = 0.05$  za neonatalne i infantilne životinje,  $f_2 = 0.04$  za peripubertalne životinje.



**Slika 3.** Referentni presek i kontrolni “look up” presek, na kojima se jasno uočavaju nepristrasni stereološki ramovi za brojanje gonadotropnih ćelija.

Brojanje gonadotropnih ćelija obavljeno je uz pomoć uljanog objektivu 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 brojanju ćelija je jedro ćelije. Fizički disektor metod podrazumeva da se broji ona referentna partikula, tj. jedro ćelije, koja se nalazi unutar nepristrasnog rama za brojanje, koju ne seku zabranjene linije (Gundersen, 1986) i koja se ne nalazi na kontrolnom preseku.

Dobijeni (početni) broj ćelija pomnožen je i na taj način je određen broj Apsolutan broj FSH odnosno LH ćelija po hipofizi dobija se množenjem broja ćelija dobijenog merenjem ( $Q^-$ ) sa recipročnim vrednostima frakcija uzorkovanja

$$N_o = Q^-_{(FSH, LH \text{ ćelija})} \cdot (1/f_1) \cdot (1/f_2)$$

#### ***3.4.3.4. Volumen FSH i LH ćelija***

Volumen pojedinačnih ćelija ( $V_c$ ) određen kao količnik totalnog volumena FSH i LH ćelija i njihovog apsolutnog broja (de Lima et al. 2007), i izražava se u  $\mu\text{m}^3$ .

$$V_c = V_{oa} / N_o$$

#### ***3.4.3.5. Numerička gustina FSH i LH ćelija***

Numerička gustina ( $N_v$ ) je relativna stereološka veličina koja pokazuje broj FSH ili LH ćelija u jedinici zapremine, a izračunava se kao količnik apsolutnog broja FSH ili LH ćelija i volumena adenohipofize. Dimenzija numeričke gustine ima eksponent -3.

$$N_v = N_o / V_{ahy}$$

### 3.5. Jajnik

Za određivanje broja folikula i žutih tela korišćeni su serijski parafinski preseći (debljine 3  $\mu\text{m}$ ) jednog jajnika kontrolnih i pacova iz eksperimentalne grupe u neonatalnom, infantilnom i peripubertalnom periodu života, odnosno 2  $\mu\text{m}$  u fetalnom periodu. Broj folikula i žutih tela određivan je po jajniku.

#### 3.5.1. Morfometrija i klasifikacija folikula

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

I mali folikuli, odnosno folikuli čiji je prečnik  $< 275 \mu\text{m}$  na najširem preseku i

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

#### I

Prva grupa je podeljena na šest klasa:

1. primordijalni folikuli - izgrađeni su od oocite oko koje se nalazi 3-5 niskoprizmatičnih folikularnih ćelija;
2. 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;
3. višeslojni folikuli klase a - Va - izgrađeni su od oocite i 1-2 sloja folikularnih ćelija i imaju prečnik  $< 75 \mu\text{m}$ ;

4. višeslojni folikuli klase b – Vb - imaju dijametar 76-150  $\mu\text{m}$ , a izgrađeni su od nekoliko slojeva granulosa ćelija i oocite. Kod ove klase folikula jasno se uočava sloj niskoprizmatičnih ćelija teke;
5. višeslojni folikuli klase c - Vc - dijametar je 151-200  $\mu\text{m}$ ;
6. višeslojni folikuli klase d – Vd - dijametar je 201-275  $\mu\text{m}$ ; Ovoj grupi folikula pripadaju veliki sekundarni i manji antralni folikuli.

## II

Druga grupa je grupa velikih, antralnih folikula koji su po dijametru podeljeni u 5 klasa.

1. folikuli klase I - 276-350  $\mu\text{m}$  u dijametru;
2. folikuli klase II - 351-400  $\mu\text{m}$  u dijametru;
3. folikuli klase III - 401-450  $\mu\text{m}$  u dijametru;
4. folikule klase IV - 451-575  $\mu\text{m}$  u dijametru;
5. folikuli klase V - >575  $\mu\text{m}$  u dijametru.

Folikuli klase pet po morfofunkcionalnoj klasifikaciji pripadaju preovulatornim folikulima.

Osman (1985) je na nivou svetlosne mikroskopije opisao dva osnovna stadijuma atrezije antralnih atretičnih folikula: 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 granulosa ćelija, koje se ogledaju u skupljanju ćelija i prisustvu piknotičnih jedara. Po razmeri ovih promena, stadijum jedan se dalje može podeliti na:

Ia podstadijum, koji karakterišu promene granulosa ćelija vidljive samo na većim uvećanjima, lokalizovane na maloj površini granulosa sloja, uglavnom do antralne šupljine;  
Ib podstadijum, u kome su degenerativne promene zahvatile kompletan granulosa 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: IIa podstadijum, gde je oocita okružena ćelijama *cumulus-a oophorus-a*, ili njihovim ostacima; IIb podstadijum, koga karakteriše prisustvo potpuno "gole" oocite koja pliva u folikularnoj tečnosti.

Žuta tela koja su prisutna u kontrolnim jajnicima peripubertalnih ženki po svojim morfološkim odlikama spadaju u mlada žuta tela, koja po svojoj veličini prevazilaze sva ostala žuta tela, ćelije su bazofilnije, a prisustvo elemenata strome je izuzetno malo.

Broj zdravih primordijalnih i primarnih folikula određen je pomoću sterološkog, fizičkog frakcionatora (Miller i sar., 1997; 1999; Mayers i sar, 2004; Ristić i sar., 2008). Zdravi i atretični sekundarni i antralni folikuli su relativno retki u poređenju sa primordijalnim i primarnim folikulima, tako da se njihov broj ne može precizno odrediti pomoću, fizičkog frakcionatora (Mayers i sar., 2004; Ristić i sar., 2008). Tačan broj sekundarnih i antralnih folikula (zdravih i atretičnih) određen je brojanjem svakog četvrtog preseka, u svakom od parafinskih blokova tkiva na uvećanju od 100x. Prebrojani su samo oni folikuli u čijim je oocitama uočeno prisustvo jedra (Ristić i sar., 2008). Prečnik folikula određivan je pomoću opcije *Diameter*. Budući da oblik folikula nije savršena kugla, konačni prečnik, na osnovu koga su folikuli svrstavani u kategorije je proračunavan kao polovina zbira dva prečnika koja su normalna jedan na drugi, a oba prolaze kroz centar folikula.

### **3.5.2. Određivanje volumena jajnika**

Volumeni jajnika određeni su pomoću Kavaljerijevog principa (Gundersen i Jensen, 1987). Analiziran je svaki deseti presek iz svakog od parafinskih blokova tkiva (isti preseki su kasnije upotrebljeni za procenu broja zdravih primordijalnih i primarnih folikula

folikula pomoću frakcionator/fizički disektor dizajna. Broj preseka od kog će otpočeti analiza, izabran je pomoću tablice nasumičnih brojeva. Na monitoru, konačnog uveličanja 150x omogućeno je jednostavno i tačno definisanje okvira analizirang tkiva (pomoću opcije *Mask*). Kod životinja u fetalnom i neonatalnom periodu života za određivanje volumena jajnika generisana je jedna stereološka mrežica ( za parenhim jajnika, intersticijum nije diferenciran). Brojani su pogoci koji su padali unutar definisanog okvira, na konačnom uveličanju 1500x (uveličanje objektiva 40x). Volumen jajnika ( $V_{ov}$ ) je izračunavan po formuli:

$$\overline{V}_{ov} = a(p) \cdot \bar{d} \cdot \sum_{i=1}^n Pi$$

Gde je  $a(p)$  površina koja pripada svakoj tački uzorkovanja tj. jednom pogotku koji pada unutar definisanog okvira,  $\bar{d}$  srednja vrednost između dva uzastopno analizirana preseka (20  $\mu\text{m}$  kod fetusa, a 30  $\mu\text{m}$  kod neonatalnih životinja) i  $\Sigma Pi$  suma pogodaka koji padaju unutar definisanog okvira.

Za određivanje volumena jajnika kod infantilnih i peripubertalnih životinja generisane su dve interaktivne stereološke mrežice: a) mrežica za folikularni parenhim i b) mrežica za intersticijum. Potom se pristupilo brojanju pogodaka koji padaju na određenu fazu unutar definisanog okvira, na konačnom uveličanju 1500x (uveličanje objektiva 40x). Volumen jajnika kod ovih životinja izračunava se kao zbir volumena folikularnog parenhima ( $V_{fp}$ ) i volumena intersticijuma ( $V_i$ ).

$$V_{ov} = V_{fp} + V_i$$

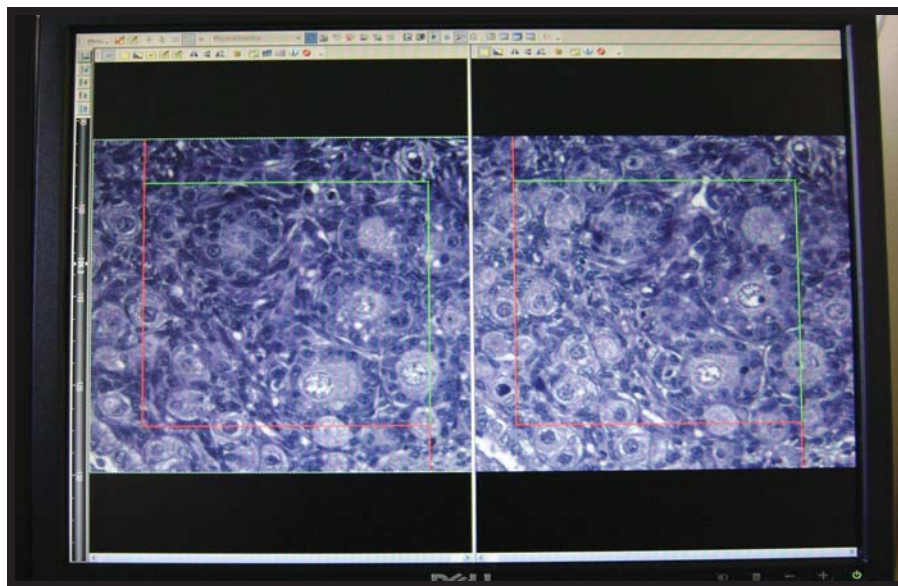
Volumen svake od navedenih faza izračunat je po formuli:

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

Gde je a (p) površina koja pripada svakoj tački uzorkovanja tj. jednom pogotku koji pada na analiziranu fazu,  $\bar{d}$  srednja vrednost između dva uzastopno analizirana preseka (30  $\mu\text{m}$ , odnosno 20 $\mu\text{m}$  za fetalne jajnike) i  $\sum P_i$  suma pogodaka koji padaju na analiziranu fazu.

### 3.5.3. Određivanje broja primordijalnih i primarnih folikula

Za određivanje broja zdravih primordijalnih i primarnih folikula u jajnicima kontrolnih i eksperimentalnih ženki pacova korišćen je fizički frakcionator (Mayers i sar., 2004; Ristić i sar., 2008). Frakcionator/fizički disektor dizajn, podrazumeva kombinaciju dva stereološka metoda, frakcionatora i fizičkog disektora. U okviru frakcionatora, tkivo je uzorkovano na sistematski uniforman način na dva/tri nivoa, pri čemu je početak uzorkovanja bio nasumičan (Gundersen i Jensen, 1987; Wreford, 1995; Miller i sar., 1997; Miller i sar., 1999; Ristić i sar., 2008). U prvom nivou uzorkovanja, analiziran je svaki 10-ti i 11-presek. Prvi presek u serijskom nizu parafinskih preseka bio je izabran, kao i u Kavalijerijevom principu određivanja volumena, uz pomoć tablice nasumičnih brojeva. 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, izvršeno je poravnavanje preseka. 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 4). Na ovaj način duplirana je prva frakcija uzorkovanja sa 1/10 na 1/5, tako da je  $f_1 = 1/5 = 0.2$ .



**Slika 4.** Ram za brojanje primarnih folikula, na referentnom i kontrolnom “look up” preseku.

Za izračunavanje broja primordijalnih i primarnih folikula korišćena su dva odvojena nepristrasna rama (“unbiased stereological frame” Mayers i sar., 2004). Cilj dizajna je da po jajniku jedne životinje bude izbrojano 100 – 200 folikula. Dimenzije nepristrasnog rama za brojanje primarnih folikula iznosile su  $150 \times 150 \mu\text{m}$  ( $22\,500 \mu\text{m}^2$ ), dok su za brojanje primordijalnih folikula iznosile  $94.8 \times 94.8 \mu\text{m}$  ( $8\,987 \mu\text{m}^2$ ). Nakon definisanja dimenzija ramova, opcijom “*Meander sampling*” nasumično je uzorkovano 70% tkiva jajnika (pod kontrolom newCAST softvera). Dakle druga uzorkovana frakcija za primordijalne i primarne folikule bila je 0.7 ( $f_2 = 0.7$ ). Za primordijalne folikule uzorkovana je treća frakcija koja je zapravo količnik površina rama za primarne i primordijalne folikule ( $f_3 = 8\,987 / 22\,500$ ) i iznosila je 0.39 ( $f_3 = 0.39$ ), (Ristić i sar., 2008).

Brojanje folikula je obavljeno uz pomoć suvog objektiva uvećanja 40x visoke numeričke aperture, pri čemu je konačno uvećanje na monitoru iznosilo 1500x. 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 brojanju folikula je jedro oocite, pa je broj folikula izjednačen sa brojem jedara oocita. Fizički disektor metod podrazumeva da se broji ona referentna partikula, tj. jedro oocite, koja se nalazi unutar nepristrasnog rama za brojanje, koju ne seku zabranjene linije (Gundersen, 1986) i koja se ne nalazi na kontrolnom preseku.

Dobijeni (početni) broj ( $Q^-$ ) broj folikula pomnožen je sa recipročnim vrednostima frakcija uzorkovanja i na taj način je određen broj folikula po jajniku. Konačan broj zdravih primordijalnih folikula jednak je  $= Q^-_{(\text{primordijalnih})} \cdot (1/f1) \cdot (1/f2) \cdot (1/f3) = Q^- \cdot 1/0.2 \cdot 1/0.7 \cdot 1/(8\ 987/22\ 500)$ , a konačan broj zdravih primarnih folikula je  $= Q^-_{(\text{primarnih})} \cdot (1/f1) \cdot (1/f2) = Q^- \cdot 1/0.2 \cdot 1/0.7$ .

Jajnik fetusa nema definitivnu histološku organizaciju, koja podrazumeva prisustvo zdravih i atretičnih folikula u različitim fazama folikulogeneze, čiji bi broj određivali na pomenute načine. U jajnicima fetusa starih 19 i 21 dan uočavamo prisustvo zdravih (Z) germinativnih ćelija (oocita), koje su uglavnom u profazi mejoze. U velikom procentu prisutne su i oocite koje se nalaze u određenim fazama degeneracije, tačnije one koje su „zarobljene” u mitozu (D1) i ostale kod kojih se procesi degeneracije javljaju tek nakon otpočinjanja mejoze (D2). Kvantifikacija zdravih i degenerisanih oocita vršena je pomoću fizičkog frakcionatora, sa jednim nepristrasnim ramom dimenzije  $40 \times 40 \mu\text{m}$  ( $1600 \mu\text{m}^2$ ). Brojanje oocita je obavljeno uz pomoć uljanog objektiva uvećanja 100x visoke numeričke aperture, pri čemu je konačno uvećanje na monitoru iznosilo 3750x. Da bi se dobio apsolutan broj zdravih i degenerisanih oocita, dobijeni (početni) broj oocita pomnožen je sa istim frakcijama koje su korišćene za dobijanje apsolutnog broja primarnih folikula ( $f1 = 0.5$ , a  $f2 = 0.7$ ).



### **3.6. Biohemijske analize**

#### **3.6.1. Priprema krvnog seruma**

Određivanje koncentracija FSH i LH vršeno je iz krvnog seruma pacova starih 5, 16 i 38 dana. Pojedinačni uzorci krvi ostavljeni su na sobnoj temperaturi. Nakon koagulacije, izdvojeni serum je centrifugiran na 3000 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Prečišćeni serum je izdvajan u mikro epruvete i čuvan na  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Koncentracije FSH i LH u serumu utvrđene su RIA metodom, korišćenjem specifičnih komercijalnih kitova primenljivih kod pacova (Rat Follicle Stimulating Hormone (rFSH), Rat Luteinizing Hormone (rLH): [ $^{125}\text{I}$ ] Biotrak Assay Systems with Magnetic Separation; Amersham Pharmacia Biotech, UK Ltd, Buckinghamshire, UK). Koeficijent varijacije unutar eseja za FSH iznosi 4.2%, odnosno za LH je 6.5%. Koeficijent varijacije izvan eseja za FSH je 7.9%, a za LH iznosi 10.9%. Analitička senzitivnost specifičnih kitova za FSH i LH iznosi 0.09ng/tubi.

### **3.7. Statistička analiza podataka**

Dobijeni stereološki i biohemijski podaci su statistički obrađeni. Prvo je urađena analiza normalne distribucije podataka uz pomoć Kolmogorov–Smirnov testa. Pošto je utvrđeno da se radi o normalnoj raspodeli korišćena je 2-way analiza varijanse (ANOVA), gde su starost životinja i tretman korišćeni kao faktori analize. Za određivanje značajnih razlika između grupa korišćen je post hoc Bonferoni test. Statistički značajnom je smatrana ona razlika čija je verovatnoća veća od 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Telesne mase kontrolnih ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života

Telesna masa kontrolnih ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života fiziološki se povećava. Rezultati su prikazani u Tabeli 1 i na Grafikonu 1.

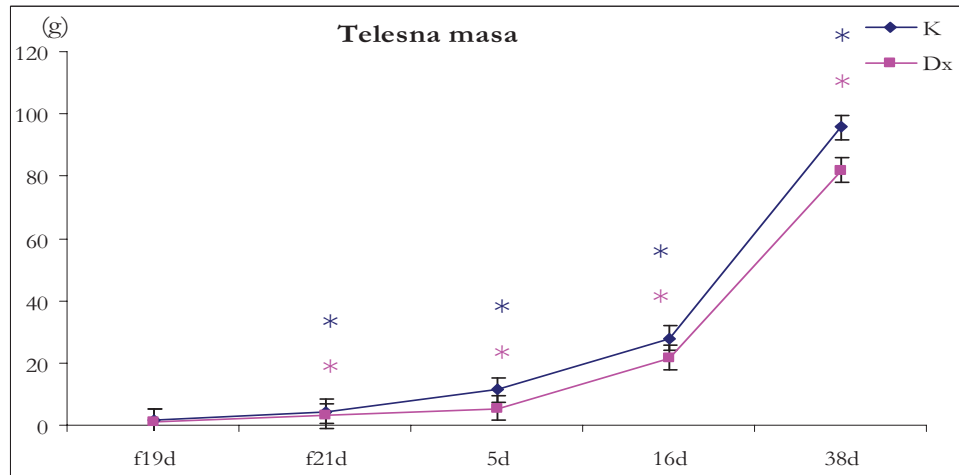
**Tabela 1.** Telesna masa (g) kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u fetalnom (19. i 21. dan), neonatalnom (5. dan), infantilnom (16. dan) i peripubertalnog (38. dan) periodu života.

Telesne mase (g)	19. dan (f)	21. dan (f)	5. dan	16. dan	38. dan
<b>K</b>	1.4 ± 0.07	4.4 ± 0.7 *	11.4 ± 0.5 *	28 ± 1.9 *	96 ± 2.9 *
<b>Dx</b>	1.1 ± 0.2	3.1 ± 0.2 *	5.5 ± 0.3 *	22 ± 2.1 *	82 ± 8 *

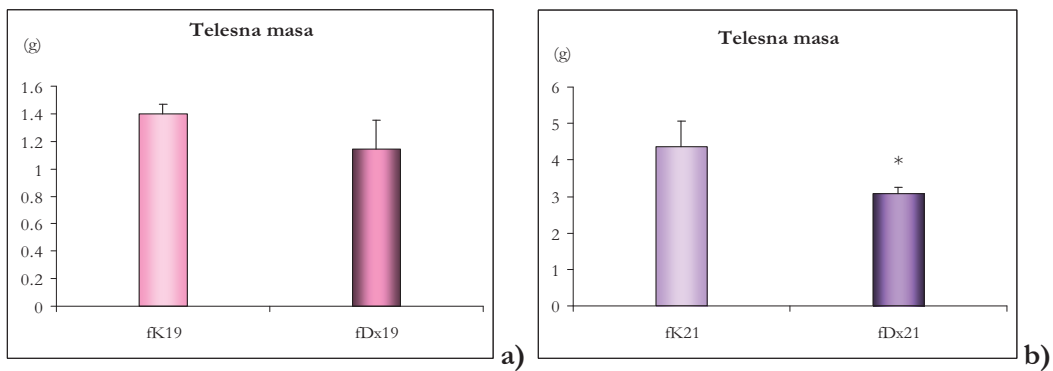
Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne i eksperimentalne grupe, \* između kontrolnih grupa, \* između eksperimentalnih grupa.

#### 4.1.1. Telesne mase ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu

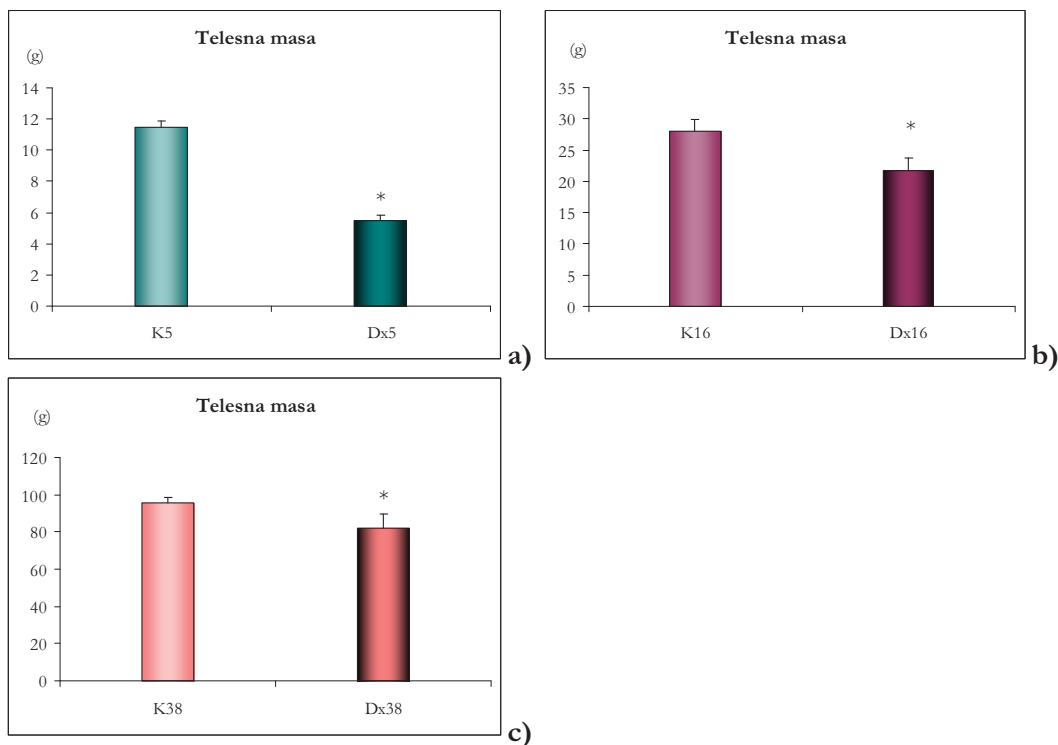
Nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu telesna masa fetusa starih 19 dana nije statistički značajno promjenjena u odnosu na kontrolne fetuse, dok je 21. fetalnog dana telesna masa statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolne fetuse iste starosti za 30% ( $p < 0.05$ ). Trend statistički značajnog smanjenja telesne mase kod životinja iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolne životinje se nastavlja i u neonatalnom za 51% ( $p < 0.05$ ), infantilnom za 21% ( $p < 0.05$ ) i peripubertalnog periodu života za 15% ( $p < 0.05$ ), (Tabela 1, Histogram 1 a, b i Histogram 2 a, b i c).



**Grafikon 1.** Prirast telesne mase kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) od fetalnog (19. i 21. dana), neonatalnog (5. dana), infantilnog (16. dana) do peripubertalnog (38. dana) perioda života. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolnih grupa, \* između odgovarajućih eksperimentalnih grupa.



**Histogram 1.** Telesna masa (g) kontrolnih (K) i ženki pacova izloženih deksametazonu (Dx) 19. i 21. fetalnog dana. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

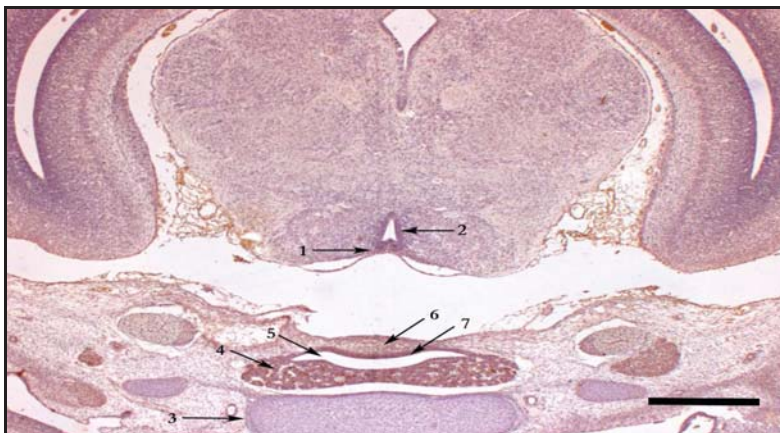


**Histogram 2.** Telesna masa (g) kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u neonatalnom (a), infantilnom (b) i peripubertalnom periodu života (c). Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Izlaganje deksametazonu tokom fetalnog perioda uticalo je i na promenu prirasta telesne mase kod ženki pacova iz eksperimentalne grupe u odnosu na trend koji je zapažen kod kontrola. Tako je telesna masa ženki pacova izloženih deksametazonu povećana 2.8 puta ( $p < 0.05$ ) od 19. do 21. fetalnog dana, dok je kod kontrolnih fetusa u istom periodu telesna masa povećana 3 puta ( $p < 0.05$ ). Od 21. fetalnog do 5. neonatalnog dana, telesna masa ženki iz eksperimentalne grupe se značajno povećala 1.8 puta ( $p < 0.05$ ), a kontrolnih ženki 2.6 puta ( $p < 0.05$ ). Od neonatalnog do infantilnog perioda života (od 5. do 16. dana) telesna masa ženki pacova iz eksperimentalne grupe značajno se povećala 4 puta ( $p < 0.05$ ), a kod kontrolnih ženki u istom periodu telesna masa se povećala 2.5 puta ( $p < 0.05$ ). Telesna masa ženki pacova iz eksperimentalne grupe povećana je 3.7 puta ( $p < 0.05$ ), a iz kontrolne grupe 3.4 puta ( $p < 0.05$ ) od infantilnog do peripubertalnog perioda života (od 16. do 38. dana, Grafikon 1). Telesna masa ženki pacova iz eksperimentalne grupe se od 19. fetalnog dana do 38. dana života ukupno povećala 75 puta, dok je kod kontrolnih ženki telesna masa povećana 69 puta.

## 4.2. Anatomske karakteristike hipofize ženki pacova u fetalnom periodu

Na frontalnom preseku glave kontrolne ženke pacova 19. fetalnog dana uočava se da mozak zauzima dorzalni položaj u odnosu na hipofizu, dok se ventralno od hipofize nalazi sfenoidna kost. Fetalnu hipofizu pacova obrazuju adenohipofiza i neurohipofiza. Na frontalnom preseku hipofize mogu se zapaziti *pars nervosa* neurohipofize, kao i delovi adenohipofize: *pars intermedia* i *pars distalis*, koji okružuju ostatak lumena usne duplje (Slika 5). *Pars distalis* je najveći deo hipofize, formiran od žlezdano-epitelnih ćelija, lokalizovanih oko krvnih sudova; *pars intermedia* je uzan pojas hipofize smešten između *pars nervosa* i ostatka lumena usne duplje, formiran od žlezdano-epitelnih ćelija, organizovanih u kružne ili folikularne strukture.

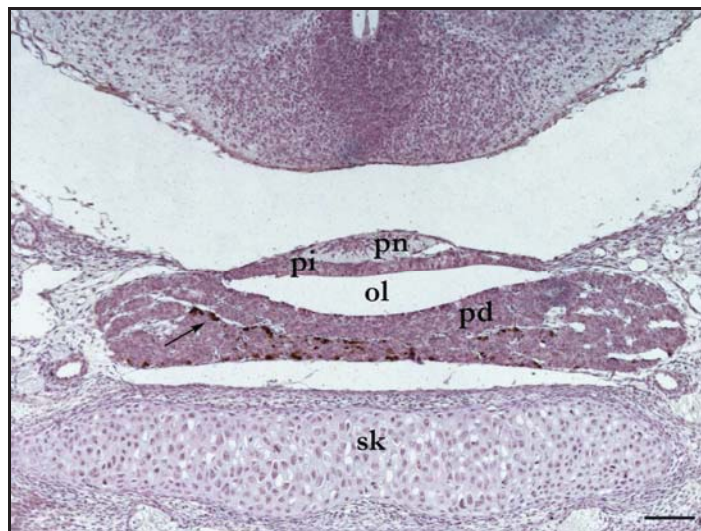


**Slika 5.** Frontalni presek glave kontrolne ženke pacova 19. fetalnog dana. 1 – hipotalamus, 2 – III moždana komora, 3 – sfenoidna kost, 4 – *pars distalis*, 5 – ostatak lumena usne duplje, 6 – *pars nervosa*, 7 – *pars intermedia*; bar 320  $\mu\text{m}$ .

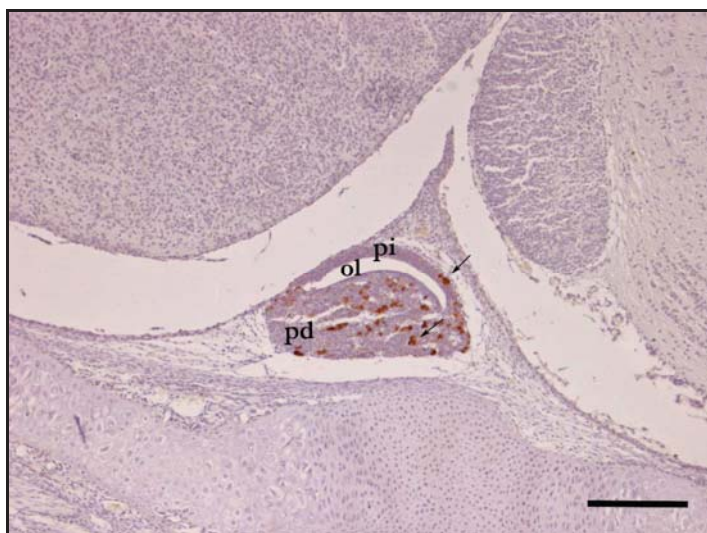
### 4.2.1. Folikulostimulirajuće ćelije

#### 4.2.1.1. Folikulostimulirajuće ćelije hipofize pacova 19. fetalnog dana

Hipofiza kontrolnih ženki pacova 19. fetalnog dana ima definitivan oblik i histološku organizaciju. Na frontalnim i sagitalnim presecima središnjeg dela hipofize uočava se *pars distalis*, koji je bogato vaskularizovan. Između marginalnog sloja epitelskih ćelija *pars distalis* i *pars intermedia* leži ostatak lumena usne duplje. (Slike 6 i 7).



**Slika 6.** Frontalni presek hipofize kontrolne ženke pacova 19. fetalnog dana. pd - *pars distalis*, pi - *pars intermedia*, pn - *pars nervosa*, ol - ostatak lumena usne duplje, sk - sfenoidna kost, strelice – imunocitohemijski obojene FSH ćelije, bar 200  $\mu$ m.

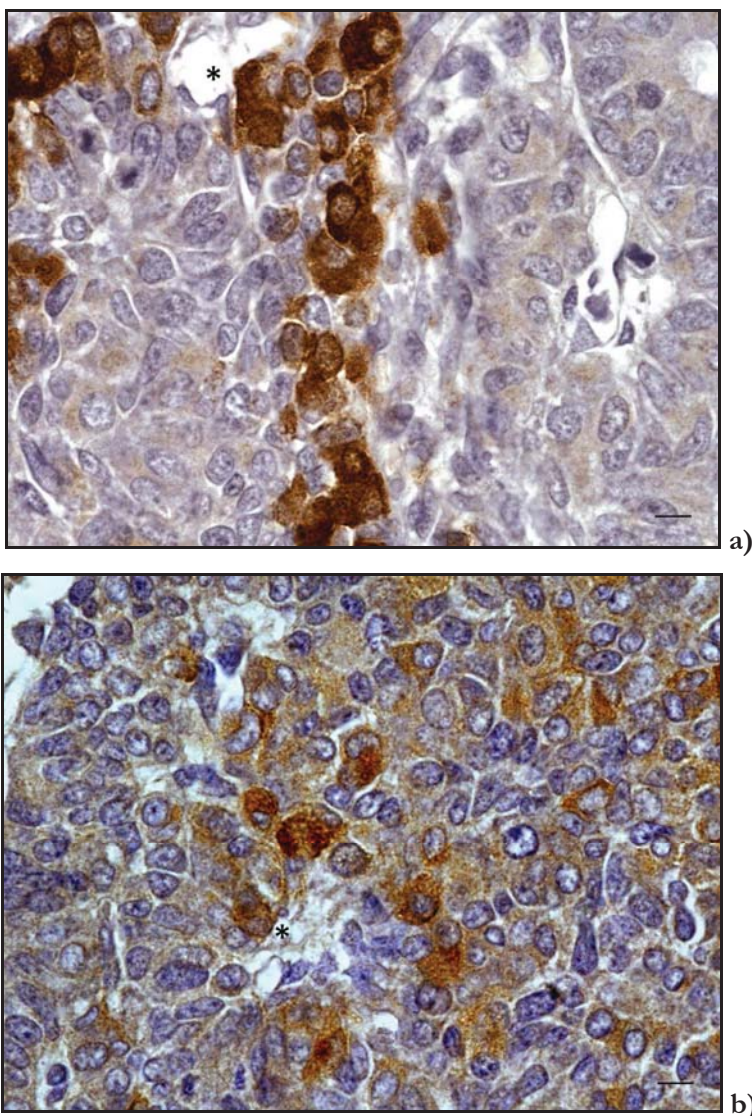


**Slika 7.** Sagitalni presek hipofize kontrolne ženke pacova 19. fetalnog dana: pd - *pars distalis*, pi - *pars intermedia*, ol - ostatak lumena usne duplje, strelice - imunocitohemijski obeležene FSH ćelije, bar 160  $\mu$ m.

Ćelije *pars distalis* adenohipofize organizovane su u kružne grupacije i folikularne strukture. Bogata kapilarna mreža prožima fetalnu hipofizu (Slika 8 a).

FSH ćelije kontrolnih ženki pacova 19. fetalnog dana su nepravilnog do okruglog oblika, sa velikim ekcentrično postavljenim ovalnim jedrom, oko koga se nalazi tanak sloj citoplazme. Pojedinačne su ili češće u grupama, uglavnom lokalizovane uz kapilare. Ove ćelije su heterogene po intenzitetu imunopozitivnosti, pa se razlikuju svetlije i tamnije obojene ćelije, a FSH imunoreaktivne granule se uočavaju u citoplazmi ćelija (Slika 8 a)

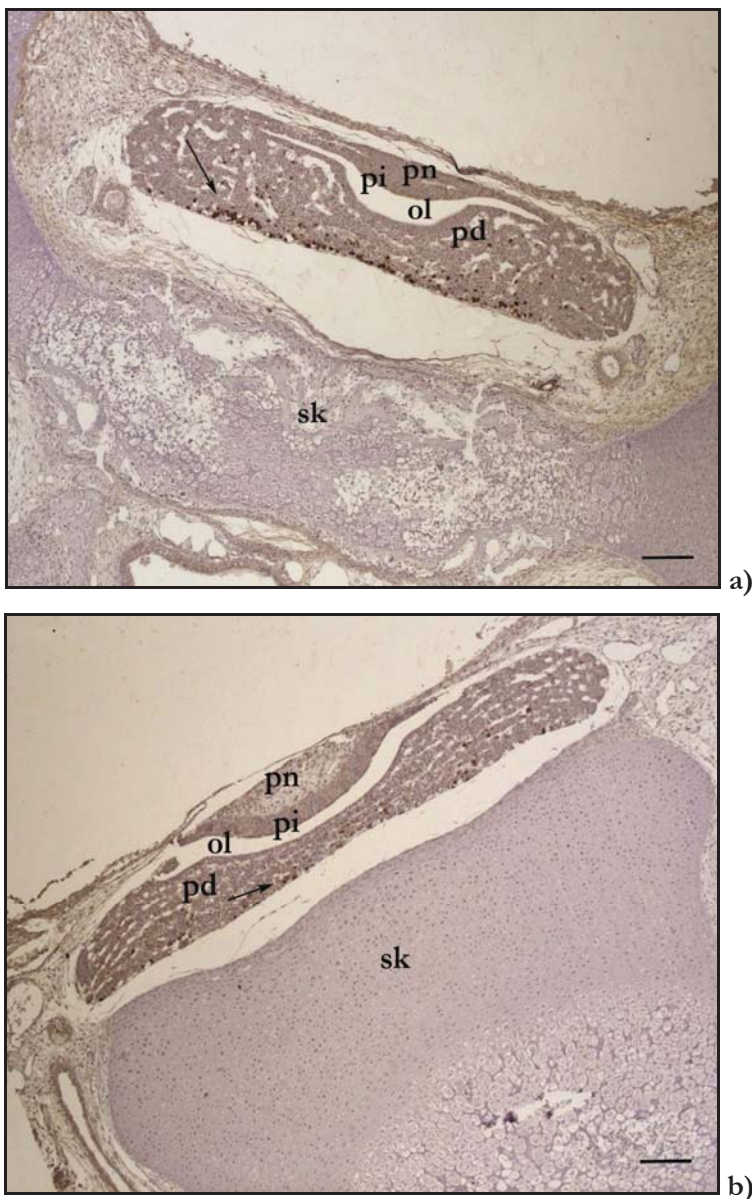
FSH ćelije ženki pacova 19. fetalnog dana koje su izložene deksametazonu su znatno slabije imunocitohemijski obeležene, a njihov broj i veličina su manji u odnosu na FSH ćelije kontrolnih fetusa (Slika 8 b).



**Slika 8.** Imunocitohemijski obeležene FSH ćelije hipofize ženki pacova 19. fetalnog dana. a) kontrolna ženka, b) ženka izložena deksametazonu, bar 10 µm, zvezdice - krvni sudovi.

#### 4.2.1.2. Folikulostimulirajuće ćelije hipofize pacova 21. fetalnog dana

Hipofiza ženki pacova 21. fetalnog dana i kod kontrolnih i kod fetusa izloženih deksametazonu potpuno je formirana. U odnosu na fetuse stare 19 dana volumen hipofize i broj ćelija znatno su povećani. Gonadotropne ćelije su jasno imunocitohemijski obojene i uglavnom raspoređene po periferiji *pars distalis* (Slike 9 a i 9 b).

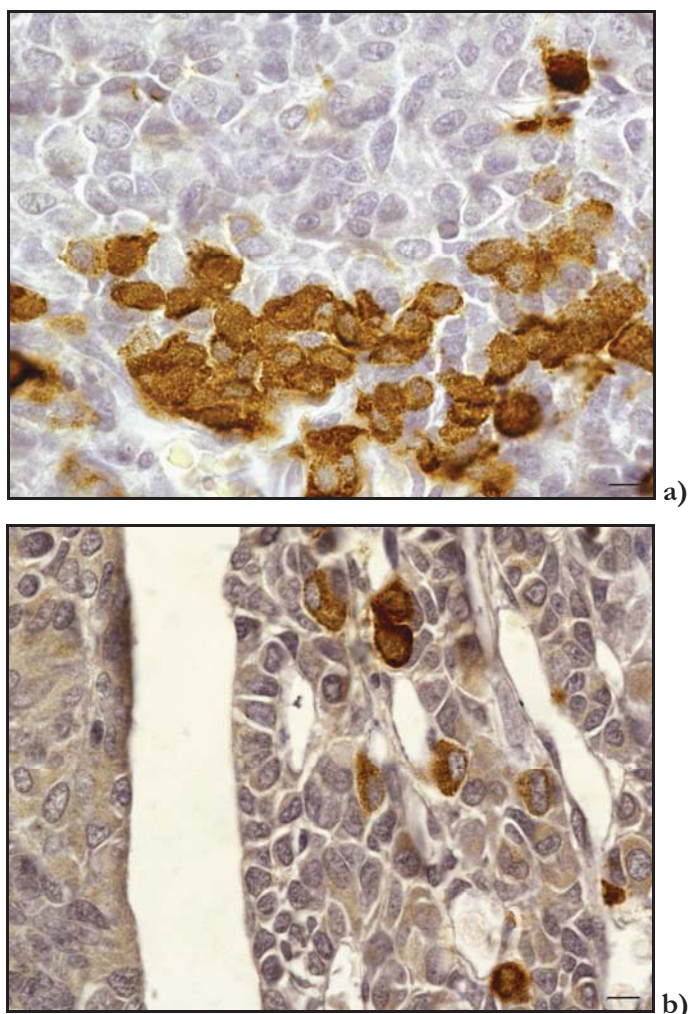


**Slika 9.** Frontalni presek hipofize ženke pacova 21. fetalnog dana a) kontrolne ženke, b) ženke izložene deksametazonu; pd - *pars distalis*, pi - *pars intermedia*, pn - *pars nervosa*, ol - ostatak lumena usne duplje, sk - sfenoidna kost, strelice - imunocitohemijski obojene FSH ćelije, bar 100  $\mu$ m.



U *pars distalis* hipofize kontrolnih ženki pacova 21. fetalnog dana FSH ćelije su raspoređene pojedinačno ili u grupama, i često su u neposrednom kontaktu sa krvnim sudovima. Ova ćelijska populacija je heterogena po intenzitetu imunopozitivnosti. Oblik FSH ćelija kreće se od poligonalnog do ovalnog. U citoplazmi se uočava veliko okruglo jedro oko koga se nalazi tanak sloj citoplazme. FSH ćelije hipofize kontrolnih ženki 21. fetalnog dana su brojnije i veće u odnosu na FSH ćelije u hipofizi kontrolnih fetusa starih 19. dana (Slika 10 a)

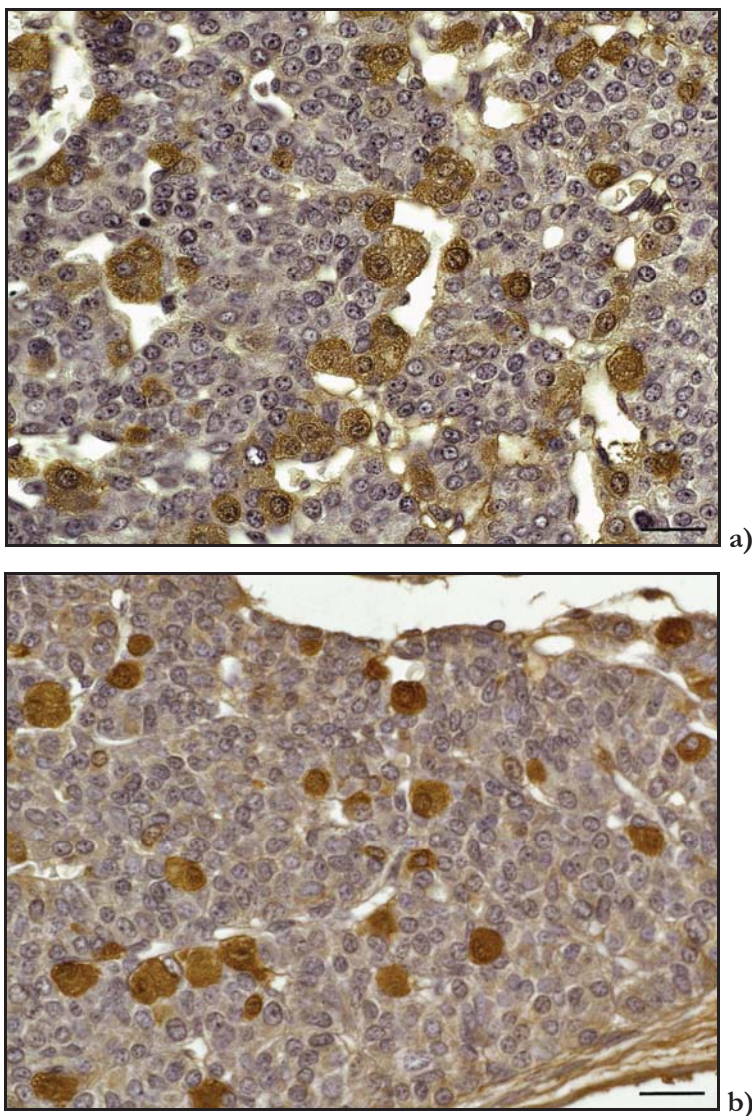
FSH ćelije ženki pacova 21. fetalnog dana koje su izložene deksametazonu su zastupljene u značajno manjem broju, a njihova veličina, raspored kao i intenzitet imunoreaktivnosti nisu promenjeni u odnosu na kontrolne fetuse (Slika 10 b).



**Slika 10.** Imunocitohemijski obeležene FSH ćelije hipofize ženki pacova 21. fetalnog dana. a) kontrolna ženka, b) ženka izložena deksametazonu, bar 10 µm.

#### 4.2.1.3. Folikulostimulirajuće ćelije hipofize pacova u neonatalnom periodu života

FSH ćelije hipofize ženki pacova starih 5 dana su ravnomerno raspoređene po *pars distalis* adenohipofize. Pojedinačne su ili u grupama, uglavnom u neposrednom kontaktu sa krvnim sudovima (Slika 11 a).

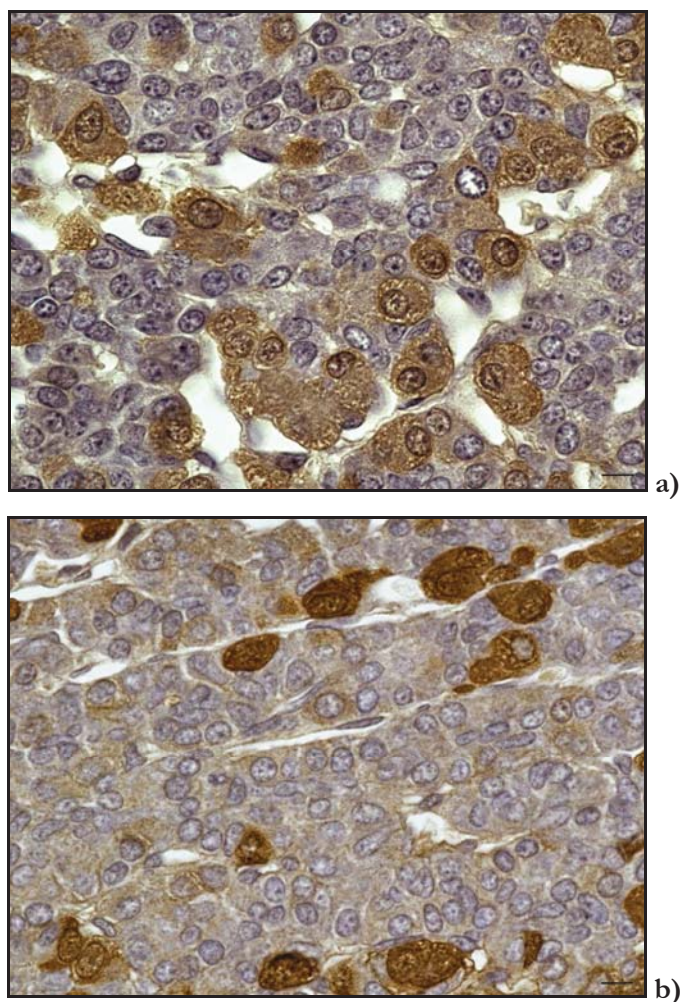


**Slika 11.** Imunocitohemijski obeležene FSH ćelije hipofize ženki pacova u neonatalnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 20  $\mu\text{m}$ .

Nepravilnog su do ovalnog oblika, sa velikim, ekcentrično postavljenim jedrom. Imunoreaktivnost je neujednačena, tako da se uočavaju svetlije i tamnije obojene ćelije. Tendencija povećanja brojnosti i veličine FSH ćelija sa rastom nastavlja se i do neonatalnog

perioda života, kada su FSH ćelije brojnije i veće u odnosu na FSH ćelije fetusa starih 21 dan (Slika 12 a). Za razliku od fetalnog perioda, gde u imunoobeleženim FSH ćelijama dominira jedro, oko koga se nalazi tanak sloj citoplazme (Slike 8 a i 10 a), u FSH ćelijama ženki pacova u neonatalnom periodu citoplazma u znatno debljem sloju okružuje jedro (Slika 12 a).

U hipofizama ženki pacova nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu uočava se manje FSH imunoobelaženih ćelija u odnosu na kontrolne životinje. Ove ćelije su intenzivnije imunoobeležene u odnosu na kontrolne. Slično kao i kod kontrola uglavnom su ovalnog oblika, ravnomerno raspoređene po *pars distalis* adenohipofize i u neposrednoj blizini krvnih sudova (Slike 11 b i 12 b).

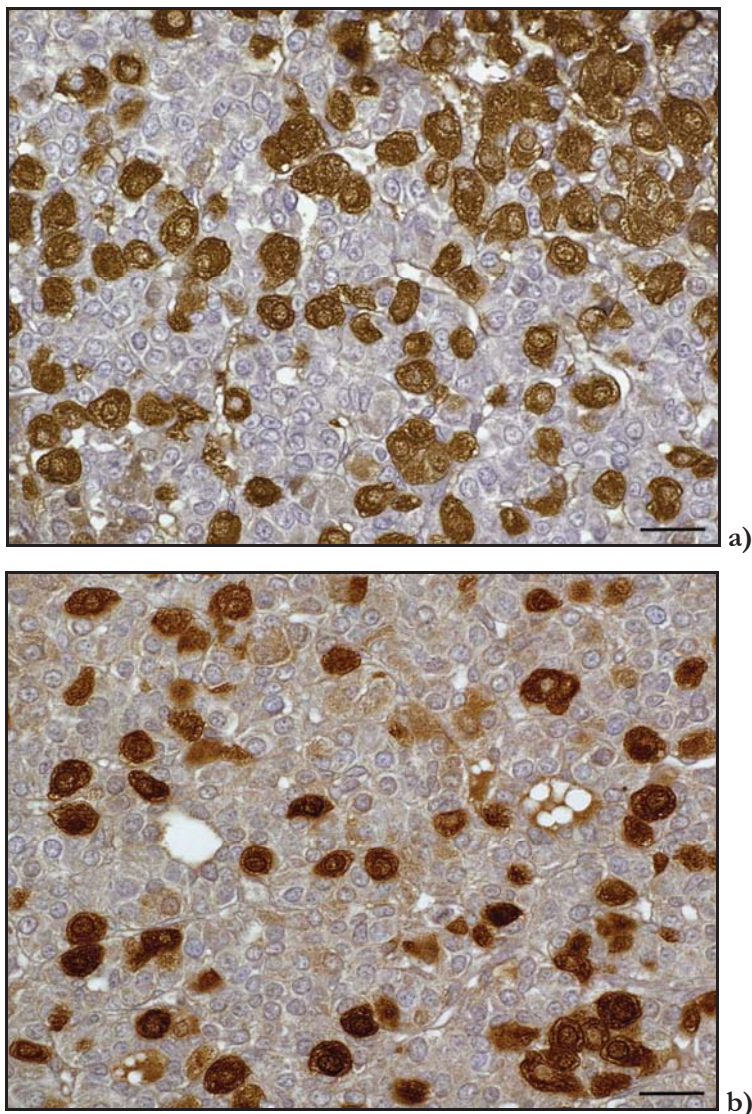


**Slika 12.** Imunocitohemijski obeležene FSH ćelije hipofize ženki pacova u neonatalnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 10  $\mu\text{m}$ .

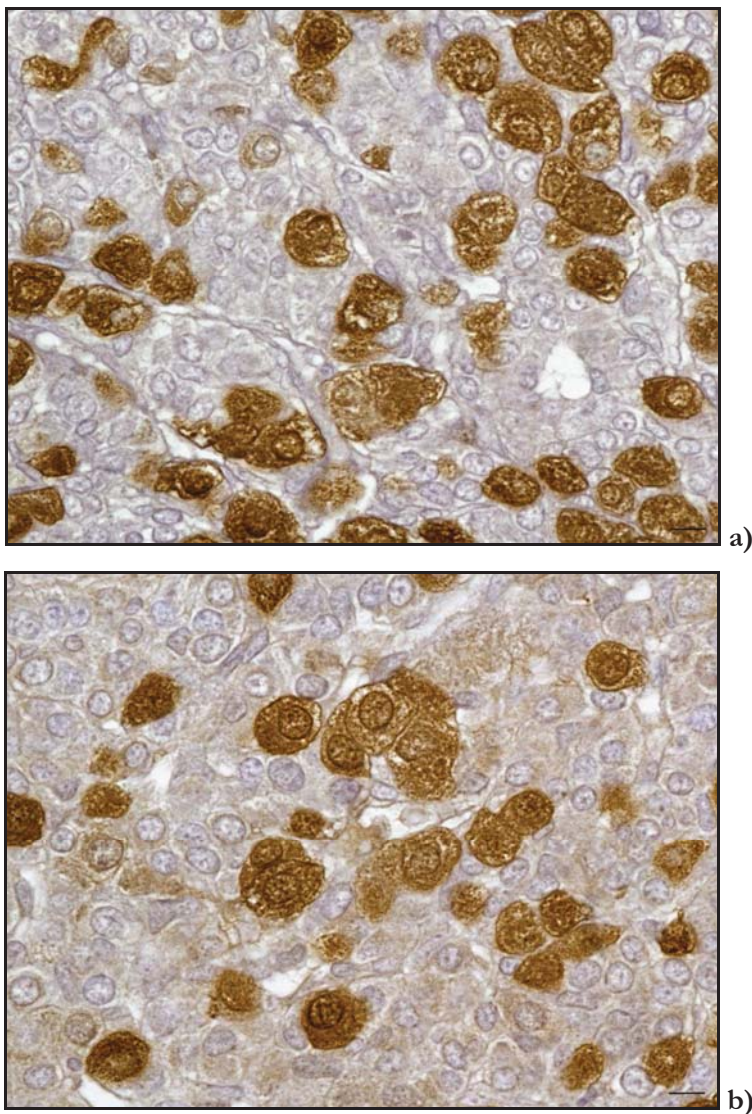
#### *4.2.1.4. Folikulostimulirajuće ćelije hipofize pacova u infantilnom periodu života*

FSH ćelije kod ženki pacova starih 16 dana izuzetno su brojne i ravnomerno raspoređene po *pars distalis*. Nalaze se pojedinačno ili u grupi uz krvne kapilare adenohipofize. U hipofizama infantilnih ženki uočena je veća tendencija grupisanja FSH ćelija nego u ostalim ispitivanim periodima života (Slika 13 a). Nepravilnog su do okruglog oblika. U citoplazmi dominira veliko, okruglo jedro, uglavnom ekcentrično postavljeno. Po intenzitetu imunopozitivnosti FSH ćelije predstavljaju veoma heterogenu grupu ćelija, s obzirom da su prisutne i svetlije i tamnije obojene ćelije. Uočava se i promena odnosa jedra i citoplazme u odnosu na fetalni period, u korist citoplazme, kakva je viđena i u neonatalnom periodu (Slika 14 a).

Intrauterino izlaganje deksametazonu, kod potomaka u infantilnom periodu života izazvalo je izrazito smanjenje zastupljenosti FSH ćelija. Ostale karakteristike FSH ćelija nisu značajno promenjene (Slike 13 b i 14 b).



**Slika 13.** Imunocitohemijski obeležene FSH ćelije hipofize ženki pacova u infantilnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 20 µm.

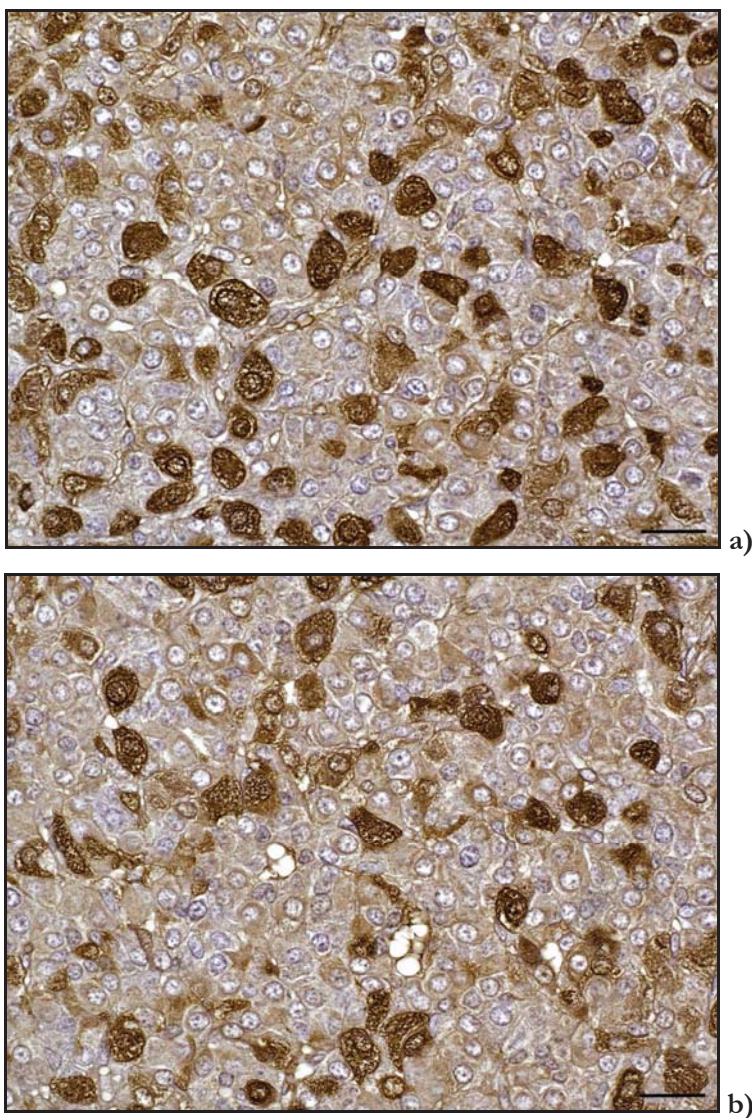


**Slika 14.** Imunocitohemijski obeležene FSH ćelije hipofize ženki pacova u infantilnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 10  $\mu\text{m}$ .

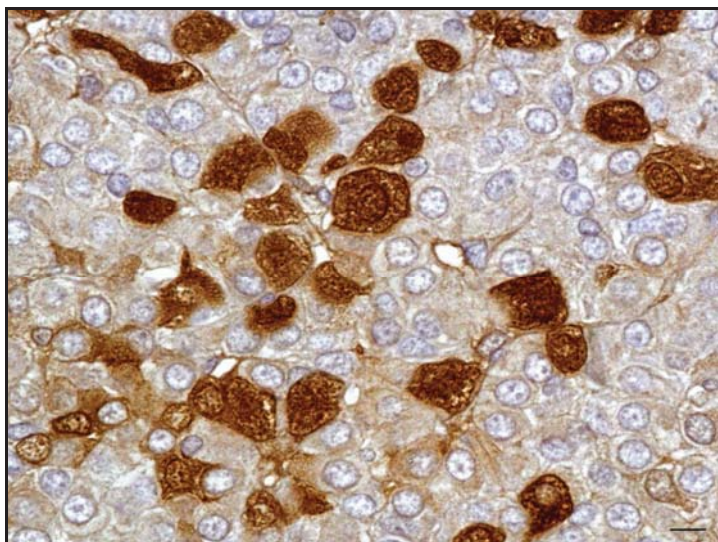
#### *4.2.1.5. Folikulostimulirajuće ćelije hipofize pacova u peripubertalnom periodu života*

U adenohipofizama ženki pacova u peripubertalnom periodu života (38 dana) uočavaju se uglavnom pojedinačne imunopozitivne FSH ćelije, ravnomerno raspoređene, često u direktnom kontaktu sa krvnim sudovima (Slika 15 a). Nepravilnog su do ovalnog oblika, sa velikim jedrom (Slika 16 a).

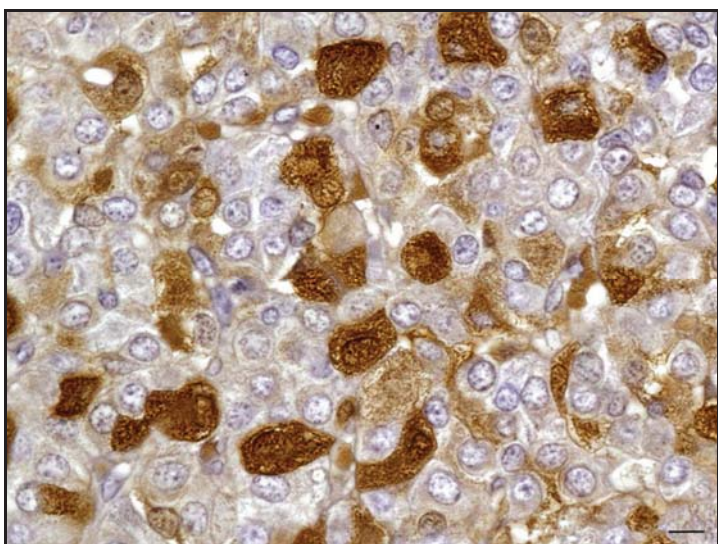
Intrauterino izlaganje deksametazonu izazvalo je smanjenje broja imunopozitivnih FSH ćelija, ali nije uticalo na promenu oblika, volumena, imunoreaktivnosti i raspored FSH ćelija po *pars distalis* adenohipofize u odnosu na kontrole (Slike 15 b i 16 b).



**Slika 15.** Imunocitohemijski obeležene FSH ćelije hipofize ženki pacova u peripubertalnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 20  $\mu\text{m}$ .



a)



b)

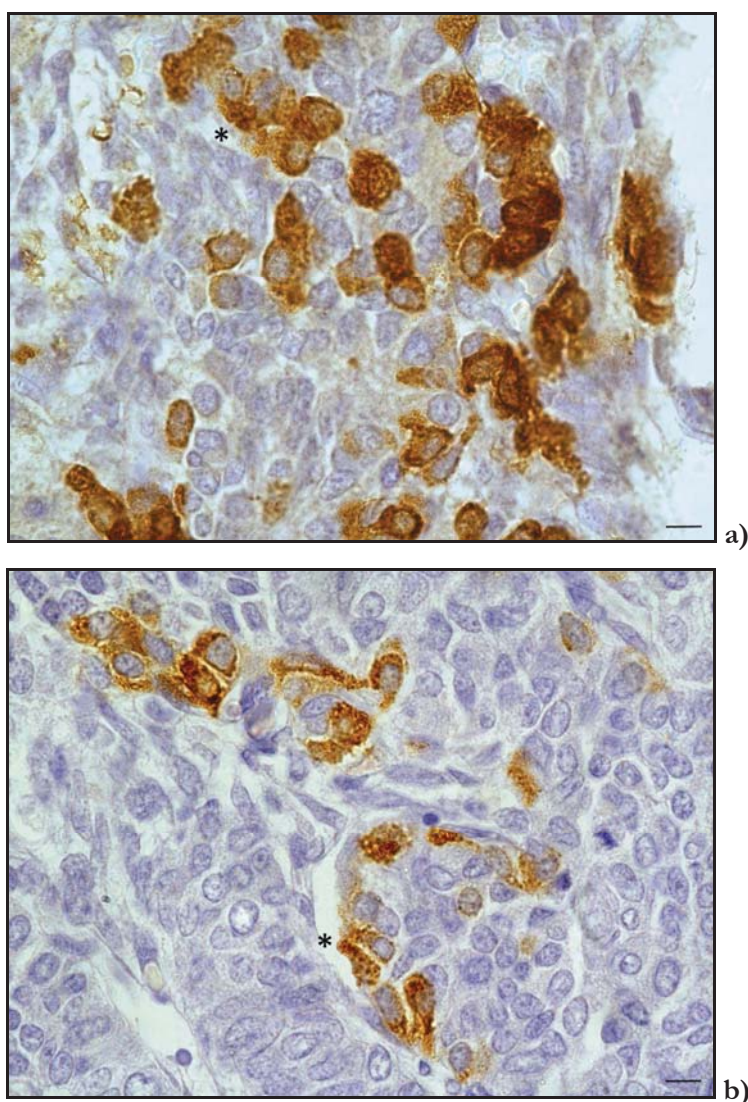
**Slika 16.** Imunocitohemijski obeležene FSH ćelije hipofize ženki pacova u peripubertalnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 10  $\mu\text{m}$ .



#### 4.2.2. Luteinizirajuće ćelije hipofize

##### 4.2.2.1. Luteinizirajuće ćelije hipofize fetusa pacova 19. fetalnog dana

LH ćelije kontrolnih ženki pacova 19. fetalnog dana su jasno imunocitohemijski obeležene i predstavljaju heterogenu ćelijsku populaciju po intenzitetu imunopozitivnosti, s obzirom da se uočavaju svetlije i tamnije obojene ćelije. U citoplazmi ovih ćelija uočavaju se LH imunopozitivne granule. LH ćelije su ovalnog oblika, sa velikim, jedrom, oko koga se nalazi tanak sloj citoplazme. Mogu biti pojedinačne, ali su uglavnom grupisane i nalaze se u neposrednoj blizini krvnih sudova (Slika 17 a).



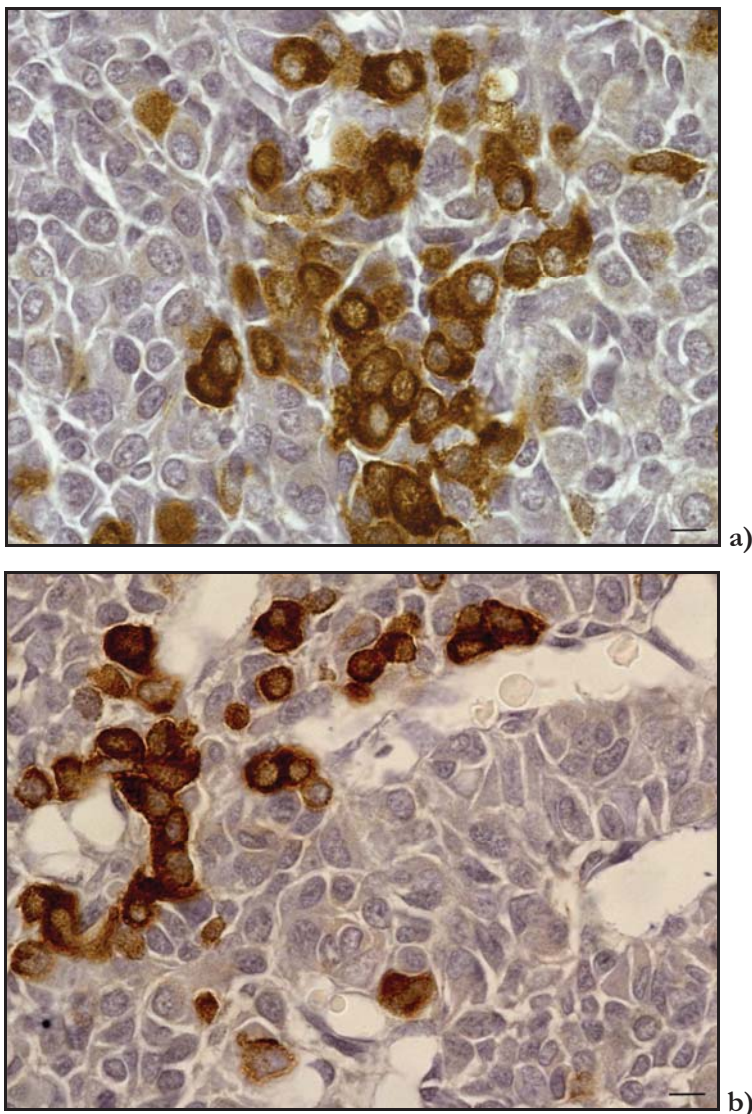
**Slika 17.** Imunocitohemijski obeležene LH ćelije hipofize ženki pacova 19. fetalnog dana. a) kontrolna ženka, b) ženka izložena deksametazonu, bar 10  $\mu\text{m}$ , zvezdice - krvni sudovi.

Nakon izlaganja deksametazonu uočava se manji broj LH ćelija, njihova veličina je manja u odnosu na LH ćelije kontrolnih fetusa. Ove ćelije su slabije imunocitohemijski obojene, sa izraženijom granulacijom citoplazme. Oblik LH ćelija je više poligonalan u odnosu na ovalne LH ćelije kod kontrolnih životinja (Slika 17 b).

#### ***4.2.2.2. Luteinizirajuće ćelije hipofize fetusa pacova 21. fetalnog dana***

U hipofizama kontrolnih ženki pacova 21. fetalnog dana LH ćelije su pojedinačne ili u grupama raspoređene između ostalih žlezdano – epitelnih tipova ćelija *pars distalis* ili uz krvne sudove. Intenzivno imunocitohemijski obojena citoplazma smeštena je oko jedra u tankom sloju, formirajući telo ćelije okruglog do poligonalnog oblika. Jedra su okrugla, ekcentrično postavljena i dominiraju u citoplazmi. LH ćelije 21 dan starih kontrolnih fetusa, a brojnije su u odnosu na LH ćelije kontrolnih fetusa starih 19 dana (Slika 18 a).

Intrauterino izlaganje deksametazonu kod fetusa starih 21 dan vidljivo je smanjilo broj LH ćelija, dok ostale karakteristike nisu promenjene u odnosu na kontrolne životinje (Slika 18 b).



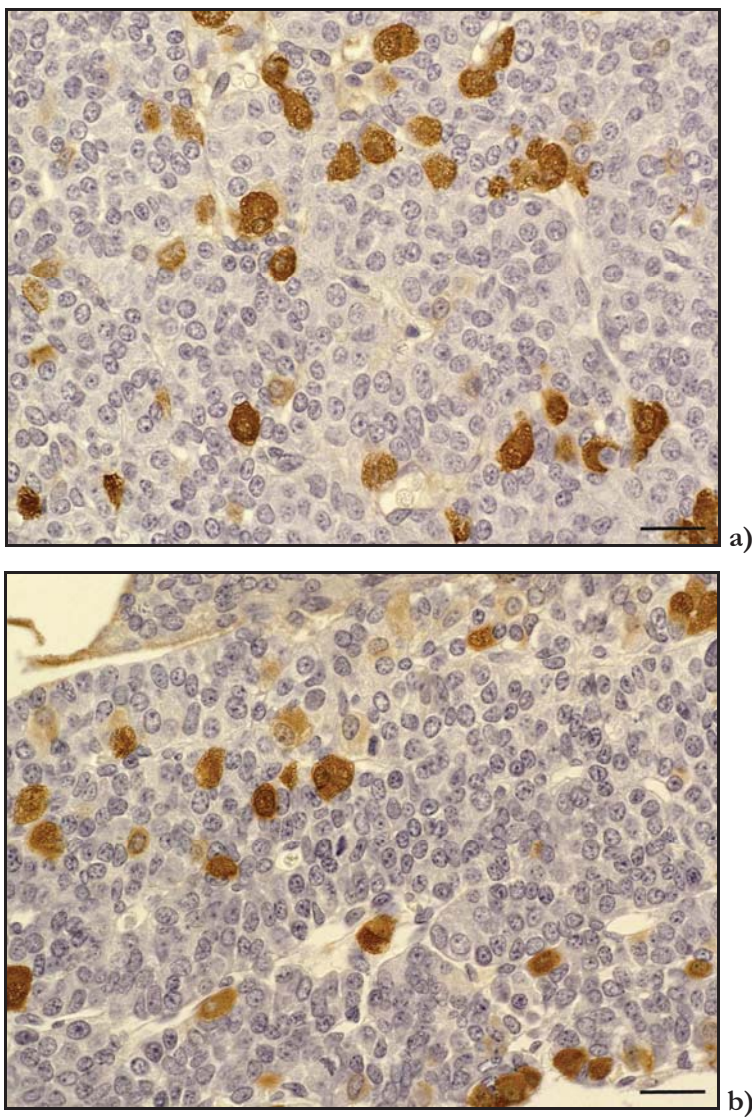
**Slika 18.** Imunocitohemijski obeležene LH ćelije hipofize ženki pacova 21. fetalnog dana. a) kontrolna ženka, b) ženka izložena deksametazonu, bar 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2.3. *Luteinizirajuće ćelije hipofize pacova u neonatalnom periodu života*

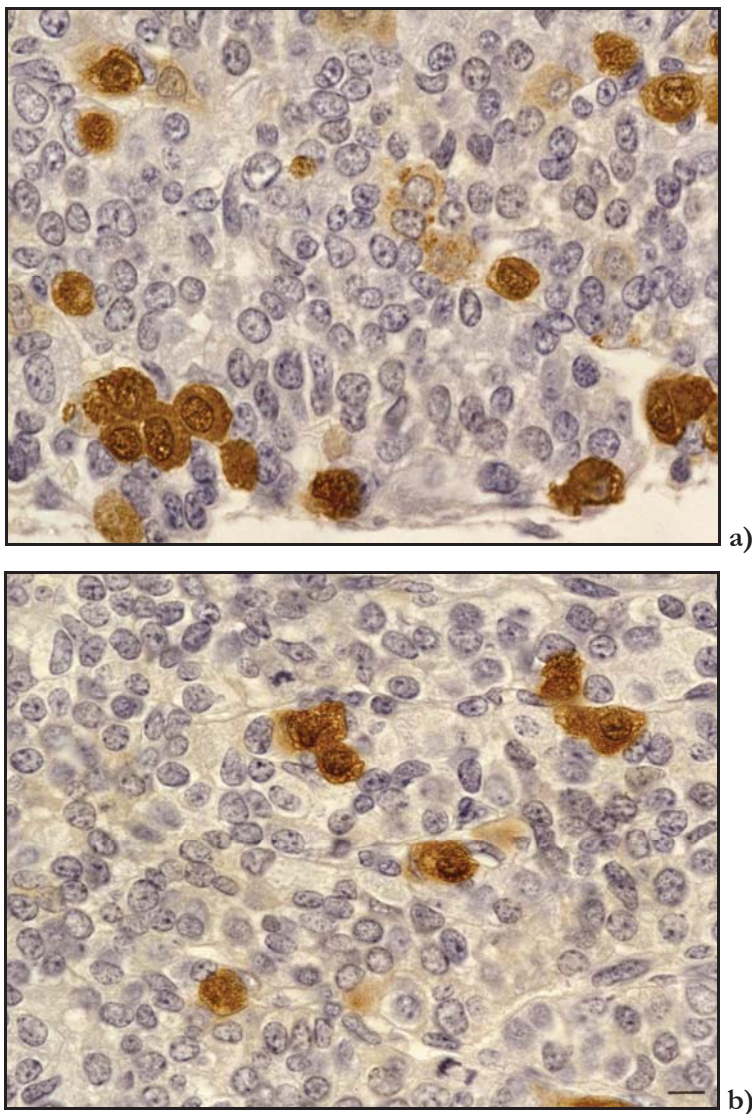
U hipofizama kontrolnih ženki pacova starih 5 dana LH ćelije su ravnomerno raspoređene po *pars distalis* adenohipofize. Uglavnom su pojedinačne, nepravilnog do ovalnog oblika, često u kontaktu sa krvnim sudovima (Slika 19 a). U citoplazmi se uočava veliko i okruglo jedro (Slika 20 a).

Nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu kod ženki pacova starih 5 dana uočava se manji broj LH ćelija u adenohipofizi, ćelije su poligonalnog oblika i manjih

dimenzija. Lokalizacija kao i intenzitet imunoreakcije nisu promenjeni u odnosu na kontrole (Slike 19 b i 20 b).



**Slika 19.** Imunocitohemijski obeležene LH ćelije hipofize ženki pacova u neonatalnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 20  $\mu\text{m}$ .



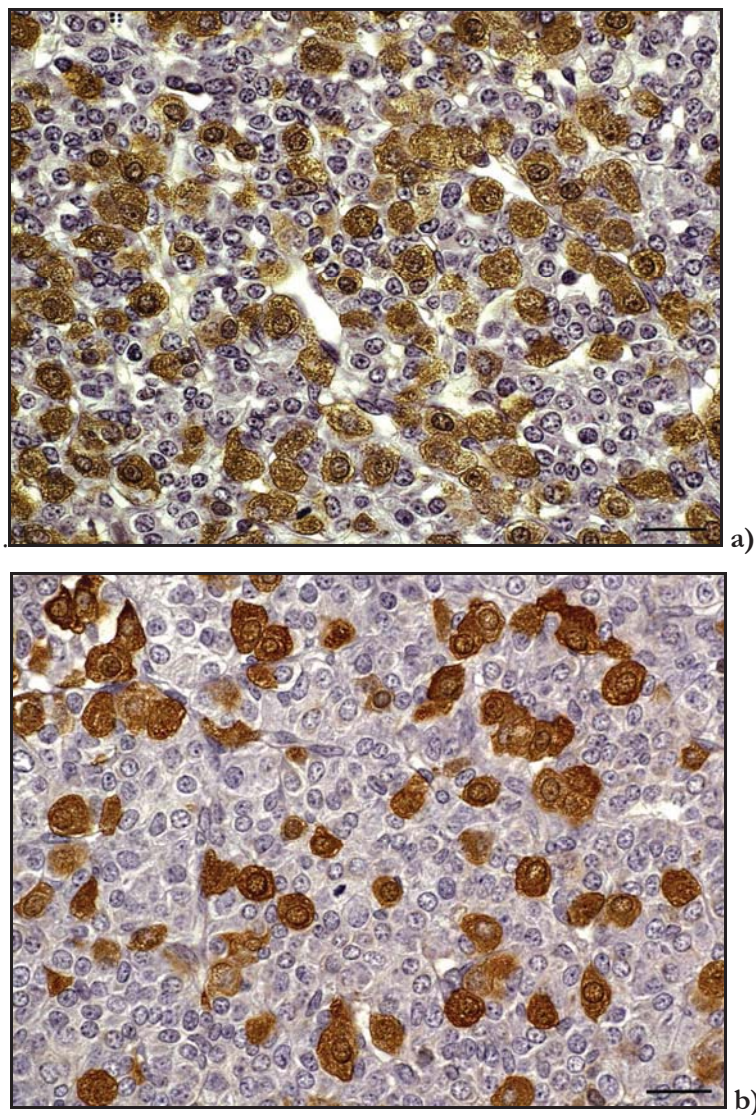
**Slika 20.** Imunocitohemijski obeležene LH ćelije hipofize ženki pacova u neonatalnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2.4. Luteinizirajuće ćelije hipofize pacova u infantilnom periodu života

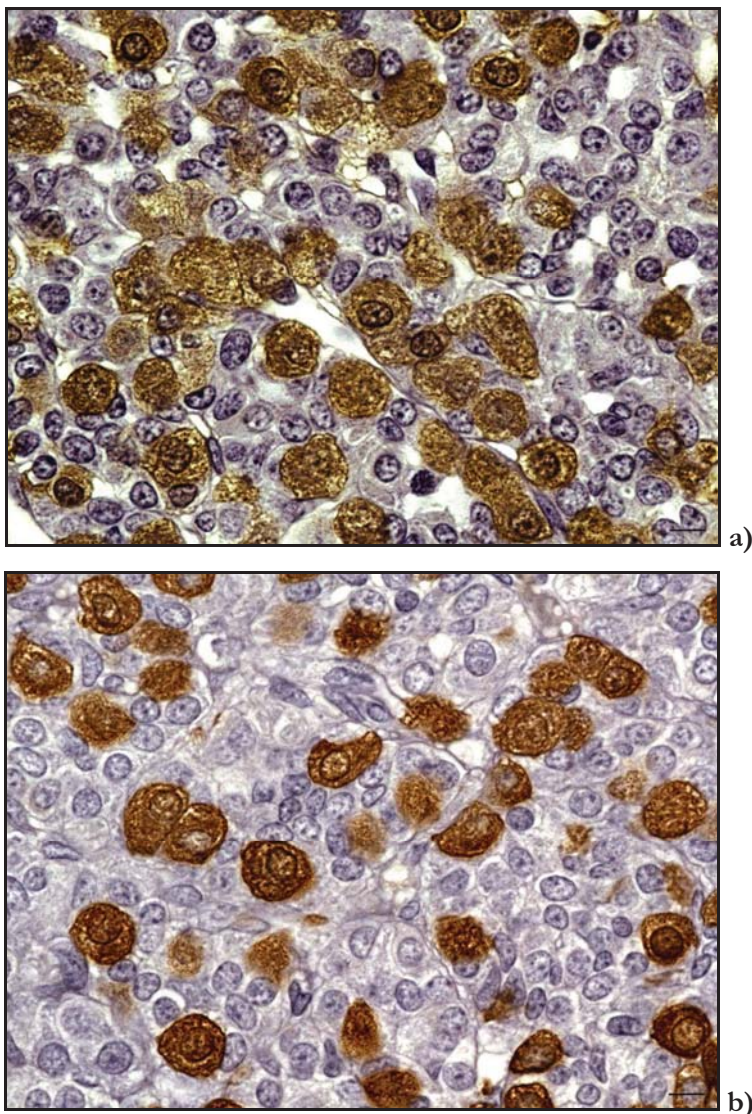
U hipofizama kontrolnih infantilnih ženki (16 dana), LH ćelije su veoma brojne i ravnomerno raspoređene po *pars distalis*. Kao i FSH, LH ćelije u ovom periodu života pacova pokazuju veću tendenciju grupisanja u poređenju sa drugim ispitivanim periodima života (Slika 21 a). Veoma su krupne i jasno imunocitohemijski obojene. Zastupljenost i veličina LH ćelija u hipofizi ženki pacova je najveća u ovom periodu života (Slika 22 a)

Nakon intrauterinog izlaganje deksametazonu kod potomaka u infantilnom periodu

života broj LH ćelija je manji, dok ostale histološke karakteristike LH ćelija nisu promjenjene (Slike 21 b i 22 b).



**Slika 21.** Imunocitohemijski obeležene LH ćelije hipofize ženki pacova u infantilnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 20 µm.

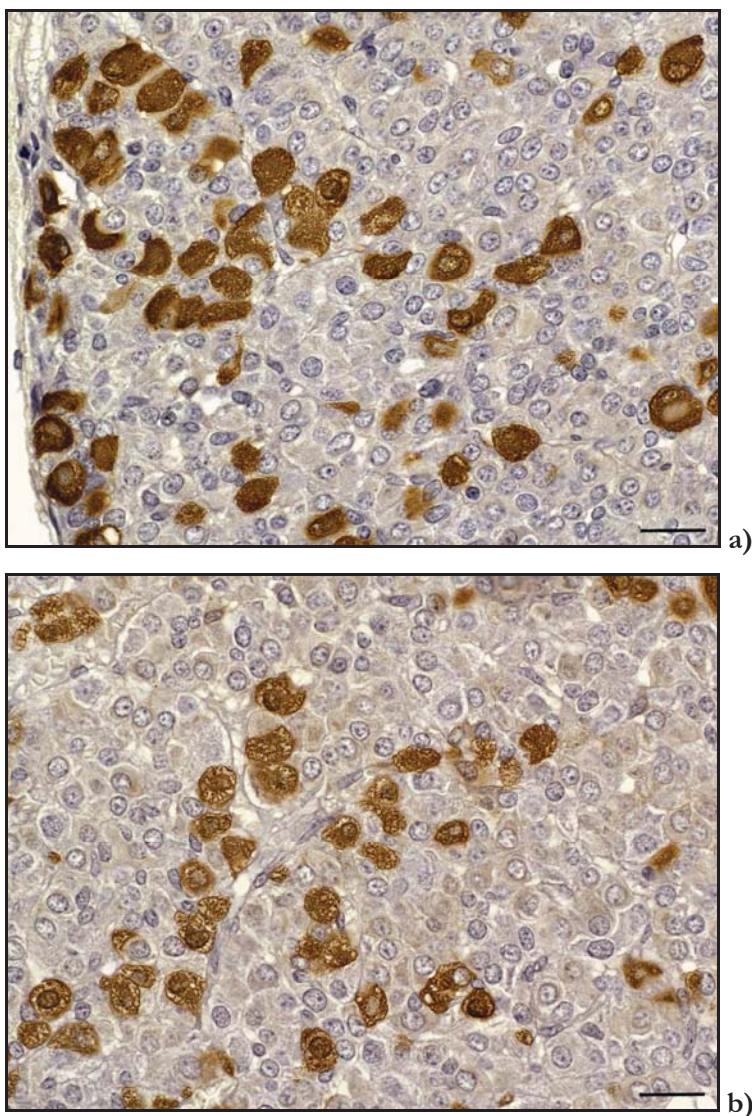


**Slika 22.** Imunocitohemijski obeležene LH ćelije hipofize ženki pacova u infantilnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2.5. Luteinizirajuće ćelije hipofize pacova u peripubertalnom periodu života

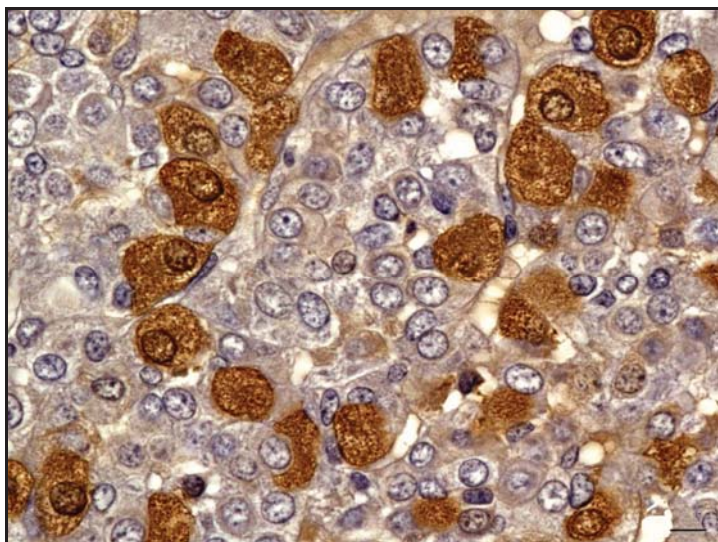
U hipofizama peripubertalnih ženki pacova, LH ćelije su ravnomerno raspoređene po *pars distalis* adenohipofize. Intenzivno su imunocitohemijski obojene, a poligonalnog su do ovalnog oblika (Slika 23 a). U citoplazmi LH ćelija uočava se veliko i okruglo, ekcentrično postavljeno jedro (Slika 24 a).

Nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu, kod potomaka u peripubertalnom periodu života uočava se manji broj i veličina LH ćelija. Ostale karakteristike LH ćelija nisu značajno promjenjene (Slike 23 b i 24 b).

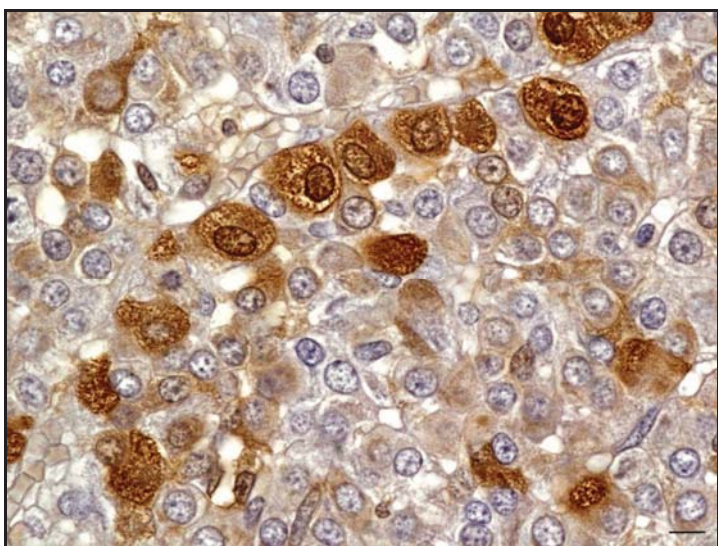


**Slika 23.** Imunocitohemijski obeležene LH ćelije hipofize ženki pacova u peripubertalnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 20 µm.





a)



b)

**Slika 24.** Imunocitohemijski obeležene LH ćelije hipofize ženki pacova u peripubertalnom periodu života a) kontrolna ženka, b) ženka intrauterino izložena deksametazonu; bar 10  $\mu\text{m}$ .

### 4.3. Stereološke karakteristike hipofize

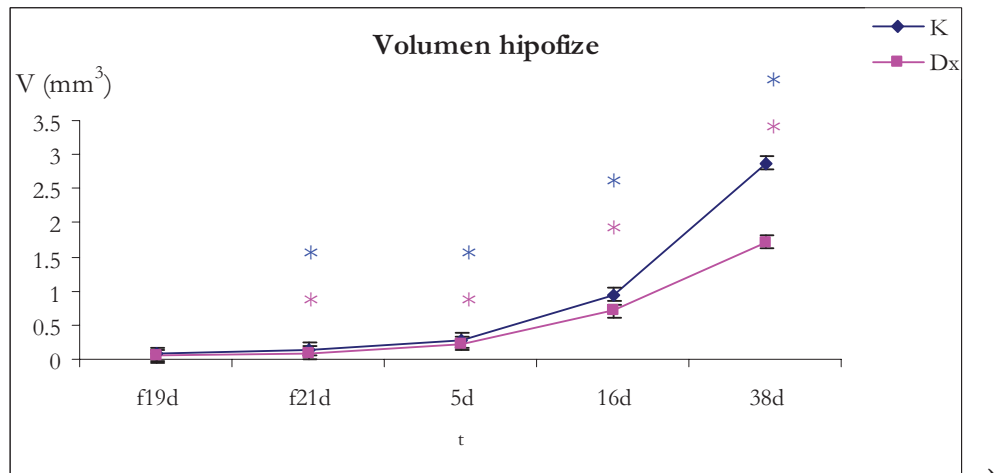
#### 4.3.1. Volumen hipofize i adenohipofize kontrolnih ženki pacova

Sa rastom i razvićem ženki pacova povećava se i volumen hipofize i adenohipofize. Rezultati su prikazani u Tabeli 2 i Grafikonu 2.

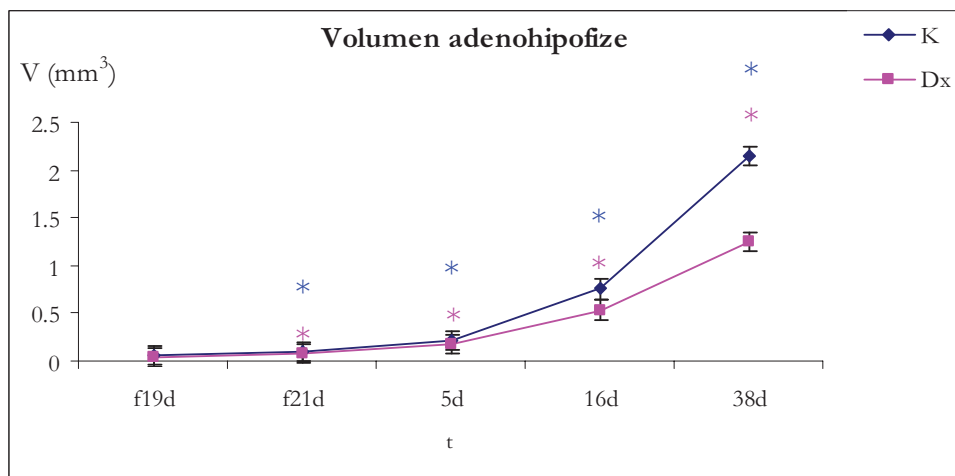
**Tabela 2.** Volumeni hipofize i adenohipofize kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u fetalnom (19. i 21. dan), neonatalnom (5. dan), infantilnom (16. dan) i peripubertalnom (38. dan) periodu života.

Vhy (mm <sup>3</sup> )	19. dan (f)	21. dan (f)	5. dan	16. dan	38. dan
K	0.07 ± 0.01	0.15 ± 0.02 *	0.3 ± 0.003 *	0.9 ± 0.08 *	2.9 ± 0.4 *
Dx	0.04 ± 0.004 *	0.09 ± 0.004 * *	0.2 ± 0.008 * *	0.7 ± 0.04 * *	1.7 ± 0.07 * *
Va (mm <sup>3</sup> )					
K	0.06 ± 0.007	0.1 ± 0.01 *	0.2 ± 0.005 *	0.8 ± 0.08 *	2.1 ± 0.2 *
Dx	0.03 ± 0.008 *	0.07 ± 0.0 * *	0.2 ± 0.007 * *	0.5 ± 0.03 * *	1.26 ± 0.02 * *

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne i eksperimentalne grupe, \* između kontrolnih grupa, \* između eksperimentalnih grupa.



a)

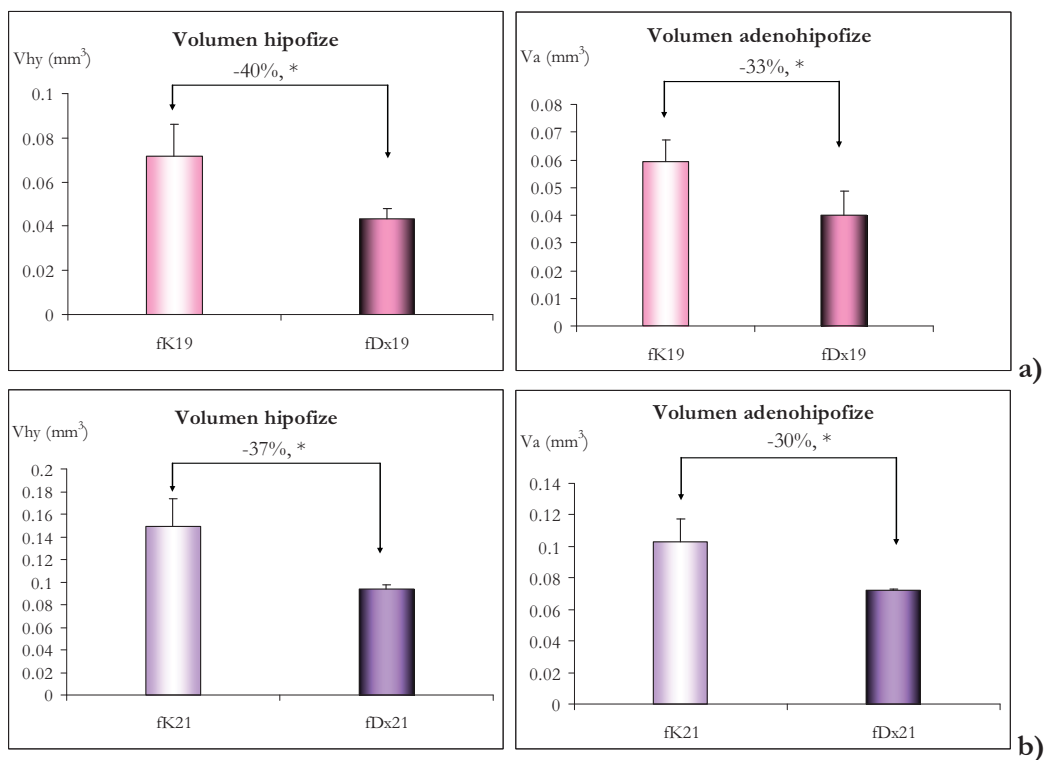


b)

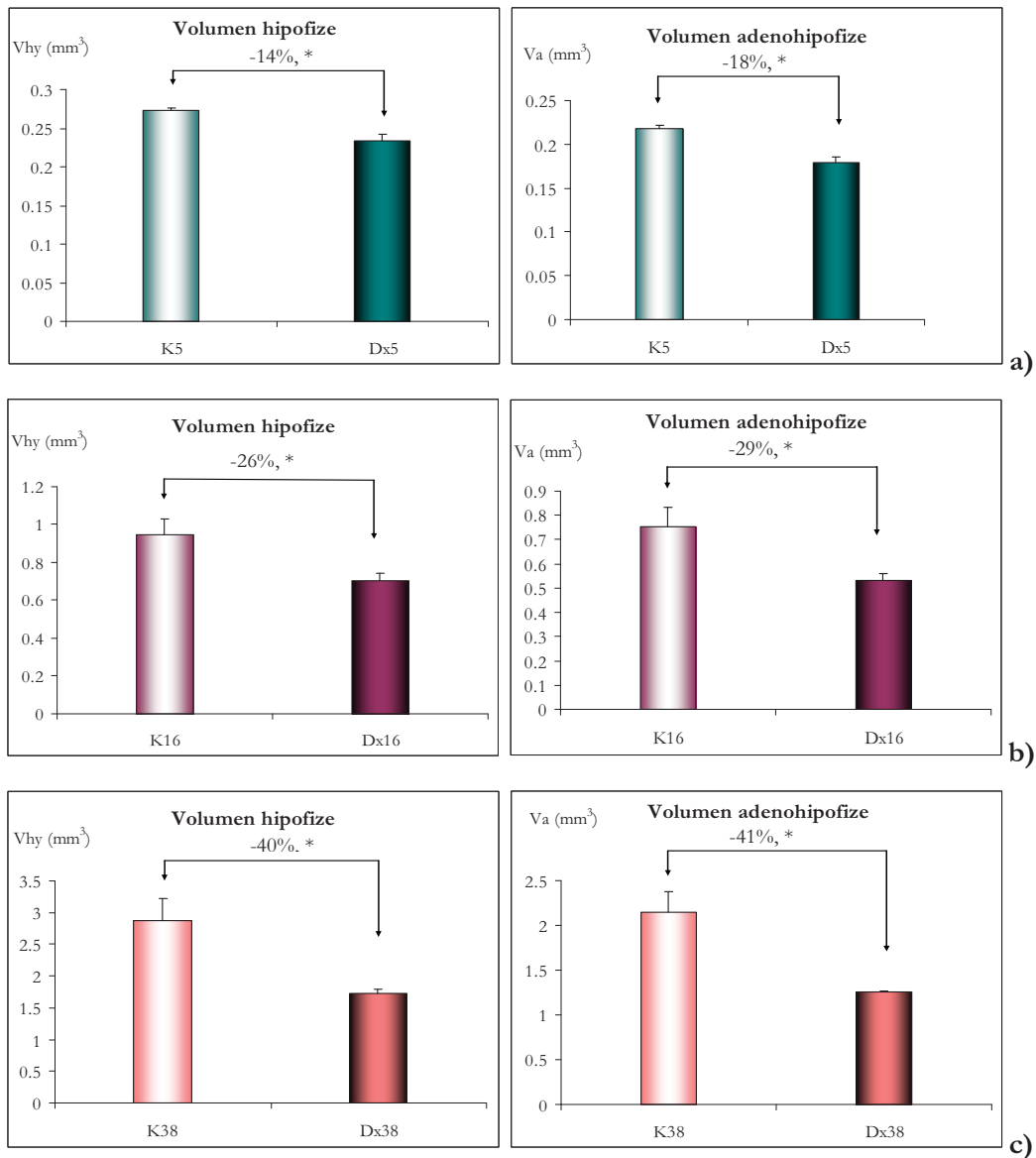
**Grafikon 2.** Volumeni hipofize (a) i adenohipofize (b) kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u fetalnom (19. i 21. dan), neonatalnom (5. dan), infantilnom (16. dan) i peripubertalnom (38. dan) periodu života. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolnih grupa, \* između odgovarajućih eksperimentalnih grupa.

### 4.3.2. Volumen hipofize i adenohipofize ženki pacova nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu

Intrauterino izlaganje deksametazonu statistički je značajno ( $p < 0.05$ ) smanjilo volumen hipofize i adenohipofize ženki pacova u svakom od ispitivanih perioda života u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti (Histogrami 3 i 4).



**Histogram 3.** Volumeni hipofize i adenohipofize (mm<sup>3</sup>) kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) 19. (a) i 21. (b) fetalnog dana. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.



**Histogram 4.** Volumeni hipofize i adenohipofize (mm<sup>3</sup>) kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u neonatalnom (a), infantilnom (b) i peripubertalnom periodu života (c). Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Volumen hipofize kod fetusa izloženih deksametazonu povećao se 2.3 puta ( $p < 0.05$ ) od 19. do 21. fetalnog dana, dok je kod kontrolnih fetusa povećan 2 puta ( $p < 0.05$ ). Volumen adenohipofize u ovom periodu kod ženki iz eksperimentalne grupe povećan je 2.3 puta ( $p < 0.05$ ), a kod kontrolnih 1.6 puta ( $p < 0.05$ ). Od 21. fetalnog dana do 5. neonatalnog dana volumen hipofize kod ženki iz eksperimentalne grupe povećan je 2.2 puta ( $p < 0.05$ ), a kod kontrolnih ženki 2 puta ( $p < 0.05$ ). Volumen adenohipofize u ovom periodu kod eksperimentalnih ženki povećan je 2.9 puta ( $p < 0.05$ ), a kod kontrolnih 2 puta

( $p < 0.05$ ). Volumen hipofize od neonatalnog do infantilnog perioda života (od 5. do 16. dana) povećan je 3.5 puta ( $p < 0.05$ ) kod ženki iz eksperimentalne grupe, a kod kontrolnih ženki 3 puta ( $p < 0.05$ ). Volumen adenohipofize u ovom periodu kod eksperimentalnih ženki povećan je 2.5 puta ( $p < 0.05$ ), a kod kontrolnih 4 puta ( $p < 0.05$ ). Od infantilnog do peripubertalnog perioda života (od 16. do 38. dana) volumen hipofize kod ženki iz eksperimentalne grupe povećao se 2.4 puta ( $p < 0.05$ ), a kod kontrolnih 3.2 puta ( $p < 0.05$ ). Volumen adenohipofize ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu u ovom periodu povećan je 2.5 puta ( $p < 0.05$ ), dok je kod kontrolnih ženki povećan 2.6 puta ( $p < 0.05$ ). Volumen hipofize kod ženki pacova iz eksperimentalne grupe od 19. fetalnog dana do 38. dana života ukupno se povećao 43 puta, dok je kod kontrolnih povećan 41 put. Volumen adenohipofize kod ženki iz eksperimentalne grupe od 19. fetalnog dana do 38. dana života povećan je 42 puta, dok je kod kontrolnih ženki povećan 35 puta (Tabela 2).

#### 4.4. Stereološke karakteristike gonadotropnih ćelija hipofize

##### 4.4.1. Folikulostimulirajuće ćelije kontrolnih ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života

Stereološki parametri imunocitohemijski obeleženih FSH ćelija menjaju se sa rastom i razvićem od fetalnog, preko neonatalnog i infantilnog do peripubertalnog perioda života. Broj FSH ćelija se od 19. do 21. fetalnog dana statistički značajno povećava 2 puta ( $p < 0.05$ ). Od 21. fetalnog dana do 5. neonatalnog dana broj FSH ćelija se povećava 11 puta ( $p < 0.05$ ). Sa daljim rastom i razvićem kontrolnih ženki pacova od 5. do 16. dana broj FSH ćelija se statistički značajno povećava 2.8 puta ( $p < 0.05$ ), a od 16. do 38. dana broj imunopozitivnih FSH ćelija se statistički značajno povećava 2.5 puta ( $p < 0.05$ ). Tako da se od 19. fetalnog dana do peripubertalnog perioda života (38. dan) broj FSH ćelija povećao 146 puta (Tabela 3, Grafikon 3 a)

Volumen FSH ćelija nije statistički značajno promenjen od 19. do 21. fetalnog dana. Međutim, od 21. fetalnog dana volumen FSH ćelija počinje da se povećava, tako da se do 5. neonatalnog dana ovaj stereološki parametar statistički značajno povećava za 18% ( $p < 0.05$ ). Najizraženiji porast volumena FSH ćelija zabeležen je u periodu između 5. i 16. dana života i to za 76% ( $p < 0.05$ ). Promena u volumenu imunopozitivnih FSH ćelija između 16. i 38. dana nije statistički značajna. Ukupno povećanje volumena FSH ćelija od 19. fetalnog do 38. dana života je za 49% ( $p < 0.05$ , Tabela 3, Grafikon 3 b).

Volumenska gustina imunobebeženih FSH ćelija se ne menja od 19. do 21. fetalnog dana. U neonatalnom periodu života (5. dan), volumenska gustina FSH ćelija je 6 puta veća ( $p < 0.05$ ) nego kod 21 dan starih fetusa. Do 16. dana života volumenska gustina se povećava za još 58% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na 5. dan. Međutim volumenska gustina imunobebeženih FSH ćelija opada od infantilnog do peripubertalnog perioda života za 26% ( $p < 0.05$ ). Tako da se od fetalnog do peripubertalnog perioda života procentualna zastupljenost FSH ćelija ukupno povećava 7 puta (Tabela 3, Grafikon 4 a).

Numerička gustina FSH ćelija nije sttistički značajno promenjena u fetalnom periodu (od 19. do 21. dana). U neonatalnom periodu života numerička gustina FSH ćelija je 5.3 puta ( $p < 0.05$ ) veća nego u fetalnom periodu. Međutim, 16. dana broj FSH ćelija po jedinici zapremine je smanjen za 11% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na 5. dan, a trend smanjenja numeričke gustine se nastavlja i do 38. dana i to za 22% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na 16. dan.

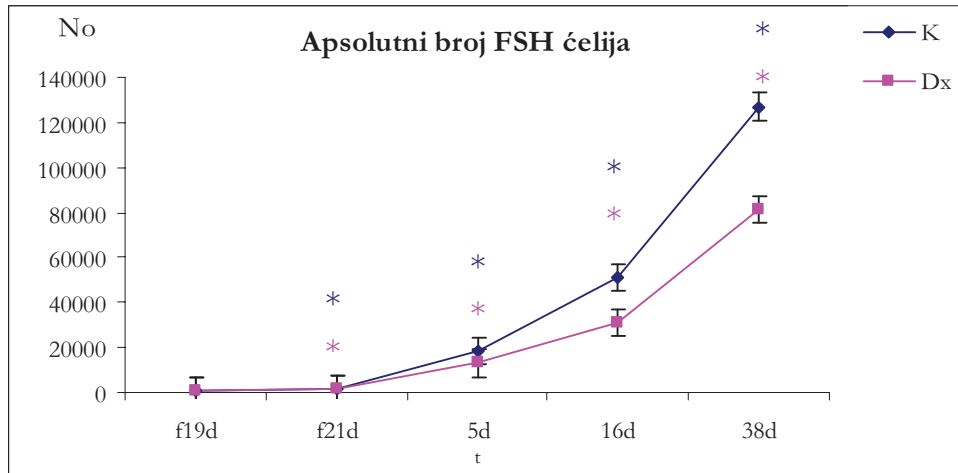
Numerička gustina je od fetalnog do peripubertalnog perioda života ukupno povećana 4 puta (Tabela 3, Grafikon 4 b).

**Tabela 3.** Stereološki parametri FSH ćelija: Apsolutan broj (No); Volumen FSH ćelija ( $V_c$ - $\mu\text{m}^3$ ); Volumenska gustina ( $V_v$  - %); Numerička gustina -  $N_v$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u fetalnom (19. i 21. dan), neonatalnom (5. dan), infantilnom (16. dan) i peripubertalnom periodu života.

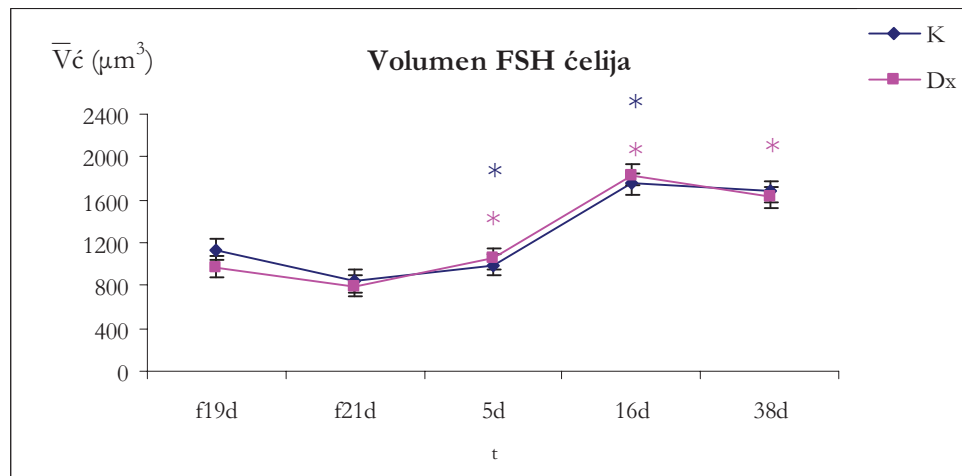
No	19. dan (f)	21. dan (f)	5. dan	16. dan	38. dan
K	868 ± 5	1632 ± 95	18567±2079 *	51267±3910 *	127000±6614 *
Dx	548 ± 63 *	1380 ± 70 **	13000±435.9 **	31000±1442 **	81333±1258 **
$\bar{V}_c$ ( $\mu\text{m}^3$ )					
K	1130 ± 210	842 ± 27	992 ± 43 *	1749 ± 125 *	1680 ± 26
Dx	975 ± 69 *	793 ± 46 *	1050 ± 71 *	1834 ± 100 *	1625 ± 70 *
$\bar{V}_v$ (%)					
K	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2	8.4 ± 0.6 *	13.3 ± 0.2 *	9.9 ± 0.6 *
Dx	1.6 ± 0.07	1.5 ± 0.3	7.6 ± 0.6 **	10.62 ± 0.05 **	10.5 ± 0.4
$N_v$ ( $\text{mm}^{-3}$ )					
K	14709±1521	15922±3000	85291±9048 *	76066±5588 *	59529±3403 *
Dx	13904±1299	17274±2636 *	72643±4134 **	58023±3175 **	64797±293

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne i eksperimentalne grupe, \* između kontrolnih grupa, \* između eksperimentalnih grupa.



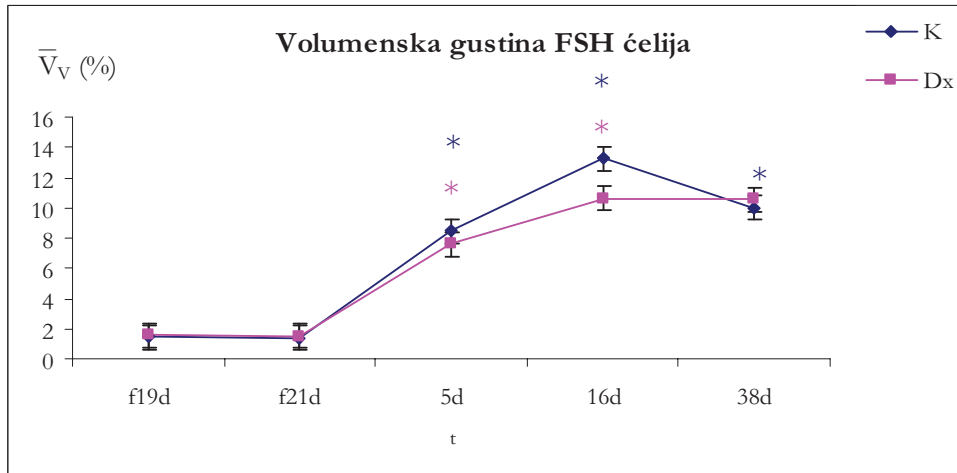


a)

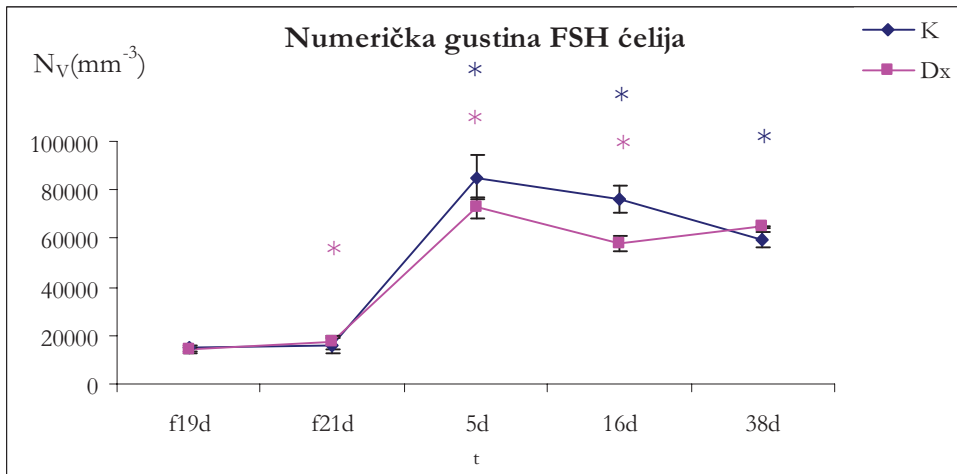


b)

**Grafikon 3.** a) Apsolutni broj FSH ćelija (No), b) Volumen FSH ćelija ( $\bar{V}_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ) kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) od fetalnog (19. i 21. dana), neonatalnog (5. dana), infantilnog (16. dana) do peripubertalnog (38. dana) perioda života. Rezultati su prikazani kao  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolnih grupa, \* između odgovarajućih eksperimentalnih grupa.



a)

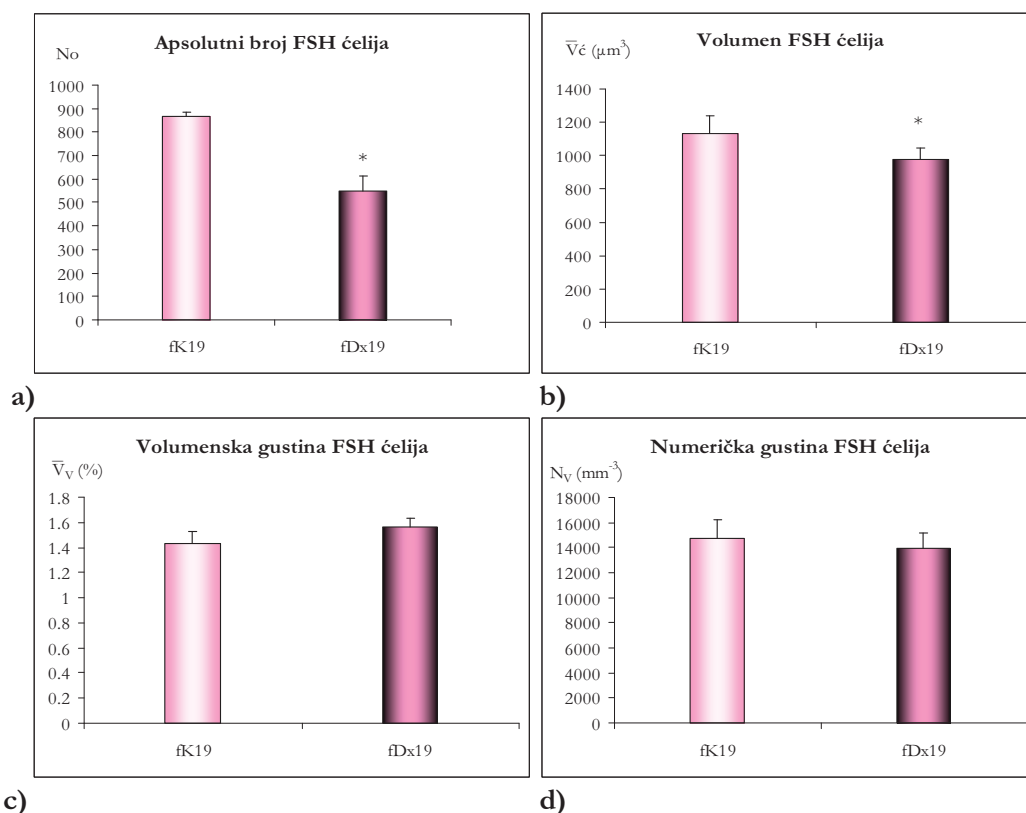


b)

**Grafikon 4.** a) Volumenska gustina FSH ćelija ( $V_V$ , %), b) Numerička gustina FSH ćelija -  $N_V$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) od fetalnog (19. i 21. dana), neonatalnog (5. dana), infantilnog (16. dana) do peripubertalnog (38. dana) perioda života. Rezultati su prikazani kao  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolnih grupa, \* između odgovarajućih eksperimentalnih grupa.

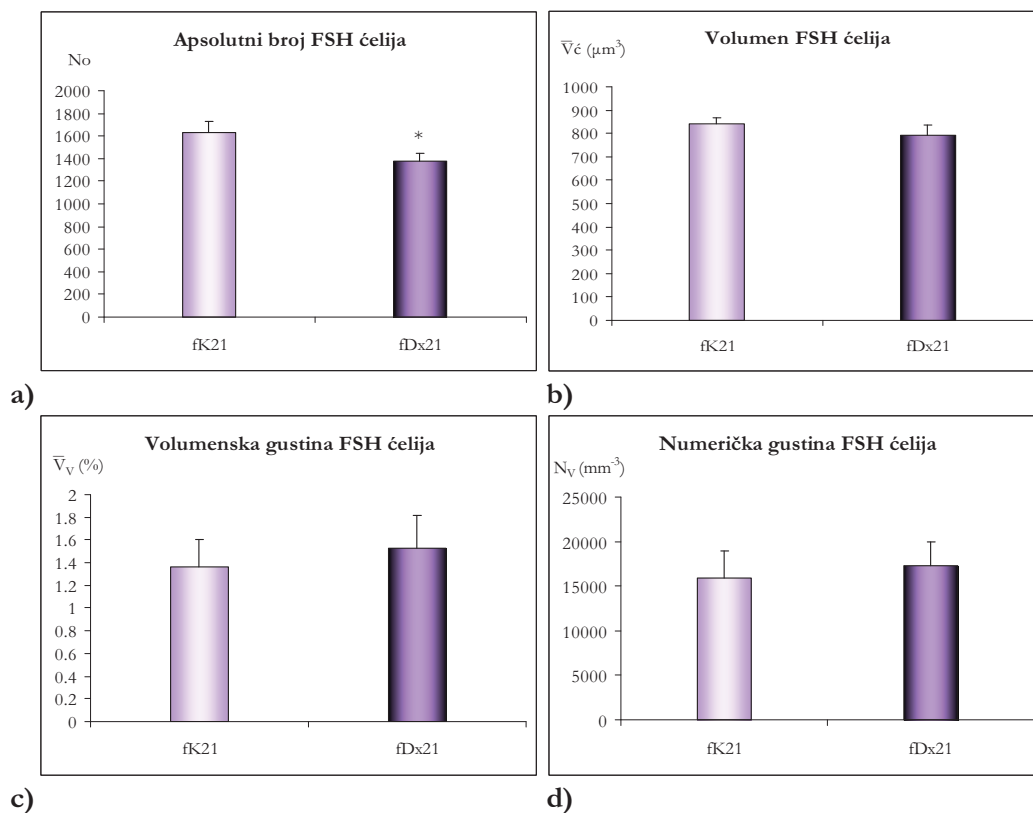
#### 4.4.2. Folikulostimulirajuće ćelije ženki pacova nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu

Izlaganje deksametazonu promenilo je ispitivane stereološke parametre imunoobeležanih folikulostimulirajućih ćelija kod fetusa iz eksperimentalne grupe starih 19 dana u odnosu na odgovarajuće parametre kod kontrolnih životinja. Tako je broj FSH ćelija u eksperimentalnoj grupi smanjen za 37% ( $p < 0.05$ ), dok je volumen FSH ćelija smanjen za 14% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti (Histogram 5 a, b). Volumenska i numerička gustina FSH ćelija u eksperimentalnoj grupi nisu statistički značajno promenjene (Histogram 5 c, d).



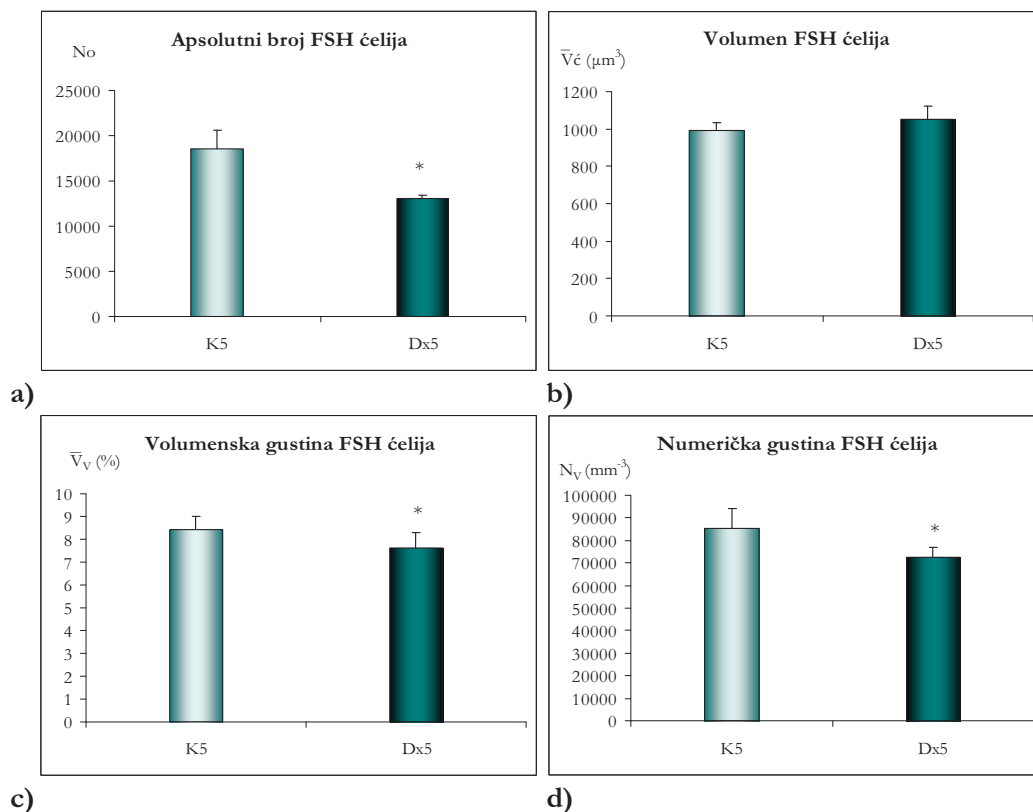
**Histogram 5.** a) Apsolutni broj FSH ćelija ( $N_o$ ), b) Volumen FSH ćelija ( $\bar{V}_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ), c) Volumenska gustina FSH ćelija ( $\bar{V}_v$ , %), Numerička gustina FSH ćelija -  $N_v$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod 19 dana starih kontrolnih (K) i fetusa iz eksperimentalne grupe (Dx).  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kod fetusa starih 21 dan izlaganje deksametazonu dovelo je do statistički značajnog smanjenja apsolutnog broja FSH ćelija za 15% ( $p < 0.05$ ; Histogram 6 a), dok volumen FSH ćelija, volumenska gustina i numerička gustina nisu statistički značajno promenjene stereološke veličine u odnosu na kontrolne vrednosti (Histogram 6 b, c, d).



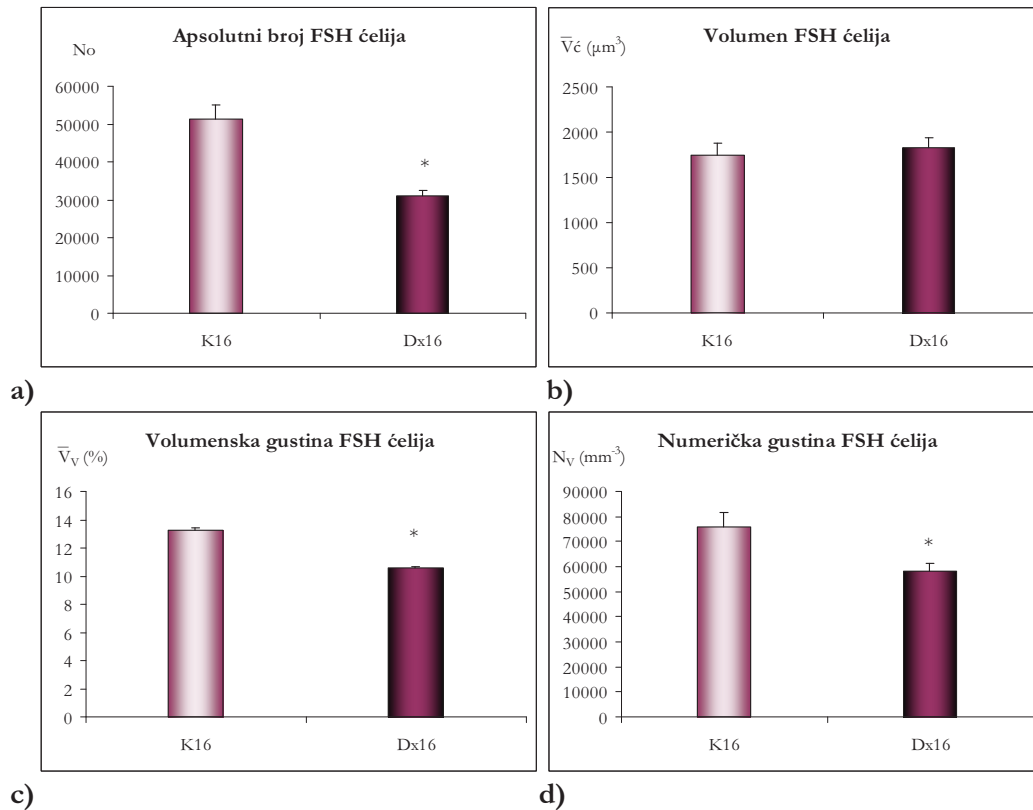
**Histogram 6.** a) Apsolutni broj FSH ćelija ( $N_o$ ), b) Volumen FSH ćelija ( $\bar{V}_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ), c) Volumenska gustina FSH ćelija ( $\bar{V}_v$ , %), Numerička gustina FSH ćelija -  $N_V$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod 21 dan starih kontrolnih (K) i fetusa iz eksperimentalne grupe (Dx).  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kod 5 dana starih ženki pacova koje su intrauterino izložene deksametazonu apsolutni broj FSH ćelija je smanjen za 30% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na vrednosti izmerene kod kontrole, dok volumen FSH ćelija nije statistički značajno promenjen (Histogram 7 a, b). Volumenska gustina FSH ćelija hipofize 5 dana starih ženki pacova iz eksperimentalne grupe je smanjena za 10% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti, a numerička gustina je takođe statistički značajno smanjena za 14% ( $p < 0.05$ , Histogram 7 c, d).



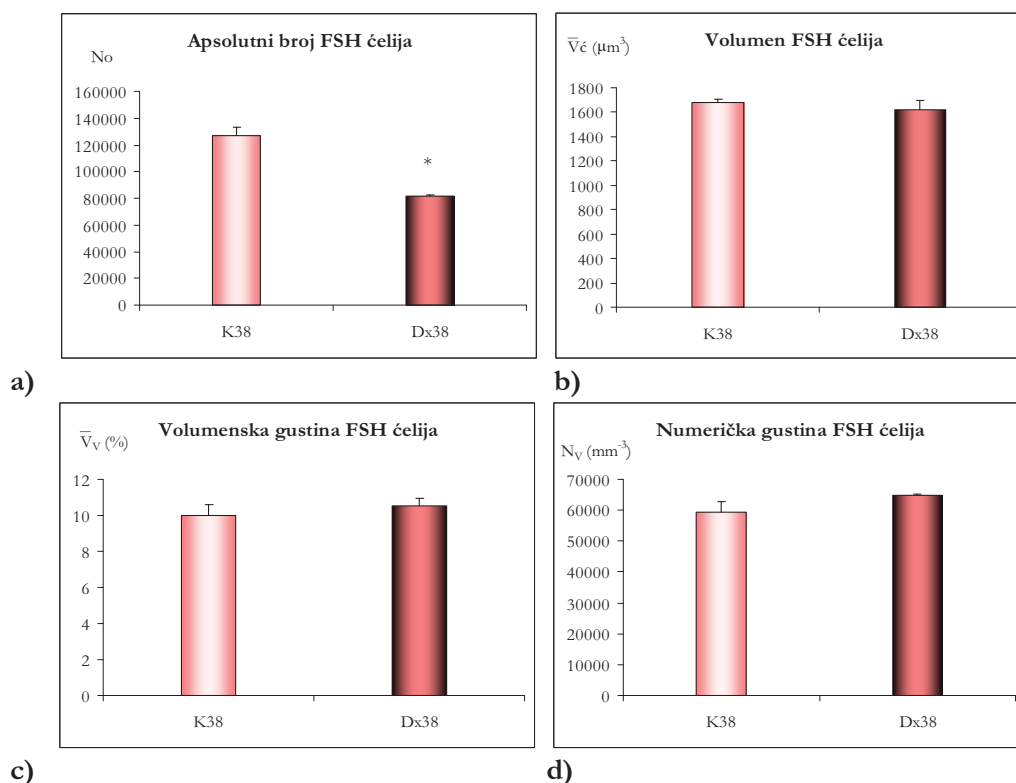
**Histogram 7.** a) Apsolutni broj FSH ćelija ( $N_o$ ), b) Volumen FSH ćelija ( $\bar{V}_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ), c) Volumenska gustina FSH ćelija ( $\bar{V}_v$ , %), Numerička gustina FSH ćelija -  $N_v$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod 5 dana starih kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx).  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kod infantilnih ženki pacova starih 16 dana, nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu apsolutni broj FSH ćelija se smanjio za 40% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti, dok se volumen FSH ćelija nije promenio (Histogram 8 a, b). Volumenska gustina imunoobeleženih FSH ćelija se smanjila za 20% ( $p < 0.05$ ), a numerička gustina za 24% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti (Histogram 8 c, d).



**Histogram 8.** a) Apsolutni broj FSH ćelija ( $N_o$ ), b) Volumen FSH ćelija ( $\bar{V}_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ), c) Volumenska gustina FSH ćelija ( $\bar{V}_v$ , %), Numerička gustina FSH ćelija -  $N_v$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod 16 dana starih kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx).  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kod 38 dana starih ženki pacova iz eksperimentalne grupe apsolutni broj imunonobeđenih FSH ćelija je jedini praćeni stereološki parametar koji je promenjen u odnosu na kontrolne vrednosti, odnosno smanjen je za 40% ( $p < 0.05$ ), (Histogram 9 a). Volumen FSH ćelija, volumenska gustina i numerička gustina nisu značajno promenjene u odnosu na kontrolne vrednosti (Histogram 9 b, c, d).



**Histogram 9.** a) Apsolutni broj FSH ćelija ( $N_o$ ), b) Volumen FSH ćelija ( $\bar{V}_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ), c) Volumenska gustina FSH ćelija ( $\bar{V}_v$ , %), Numerička gustina FSH ćelija -  $N_V$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod 38 dana starih kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx).  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Ukupan broj FSH ćelija od fetalnog (19. dan) do peripubertalnog perioda života (38. dan) kod životinja iz eksperimentalne grupe se povećao 148 puta (kod kontrola je isti parametar povećan 146 puta). Ukupno povećanje volumena FSH ćelija od 19. fetalnog do 38. dana života je za 67%, dok je kod kontrola prisutan porast od 49%. Procentualna zastupljenost FSH ćelija se u pomenutom periodu života ukupno povećava 7 puta, a numerička gustina 4 puta i u eksperimentalnoj i u kontrolnoj grupi.

#### 4.4.3. Luteinizirajuće ćelije kontrolnih ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života

Stereološki parametri imunocitohemijski obeleženih LH ćelija takođe se menjaju sa rastom i razvićem od fetalnog, preko neonatalnog i infantilnog do peripubertalnog perioda života kod kontrolnih ženki. Broj LH ćelija se od 19. do 21. fetalnog dana povećava za 50% ( $p < 0.05$ ). Od 21. fetalnog dana do 5. neonatalnog dana broj LH ćelija se povećava 13 puta ( $p < 0.05$ ). Sa daljim rastom i razvićem kontrolnih ženki pacova od 5. do 16. dana broj LH ćelija se statistički značajno povećava 3 puta ( $p < 0.05$ ), a od 16. do 38. dana života broj imunopozitivnih LH ćelija se statistički značajno povećava 2.2 puta ( $p < 0.05$ ). Tako da se od 19. fetalnog dana do peripubertalnog perioda života (38 dan) broj LH ćelija ukupno povećao 117 puta (Tabela 4, Grafikon 5 a).

Volumen LH ćelija se ne manja od 19. do 21. fetalnog dana. Međutim, od 21. fetalnog dana volumen LH ćelija počinje da se povećava, tako da je do 5. neonatalnog dana volumen LH ćelija je statistički značajno povećan za 10% ( $p < 0.05$ ). Najizraženije povećanje u volumenu LH ćelija zabeleženo je u periodu između 5. i 16. dana života i to za 76% ( $p < 0.05$ ). Promena u volumenu imunopozitivnih LH ćelija između 16. i 38. dana nije statistički značajna. Ukupno povećanje volumena LH ćelija od 19. fetalnog do 38. dana života je za 44% (Tabela 4, Grafikon 5 b).

Volumenska gustina LH ćelija nije statistički značajno promenjena od 19. do 21. fetalnog dana. Od 21. fetalnog dana do 5. dana neonatalnog života volumenska gustina LH ćelija je povećana 6 puta ( $p < 0.05$ ). Do infantilnog perioda odnosno 16. dana života, volumenska gustina se povećava za još 56% ( $p < 0.05$ ). Međutim, od 16. do 38. dana života volumenska gustina imunopozitivnih LH ćelija se smanjuje za 31% ( $p < 0.05$ ). Tako da je volumenska gustina od 19. fetalnog dana do 38. dana života ukupno povećana 6 puta (Tabela 4, Grafikon 6 a).

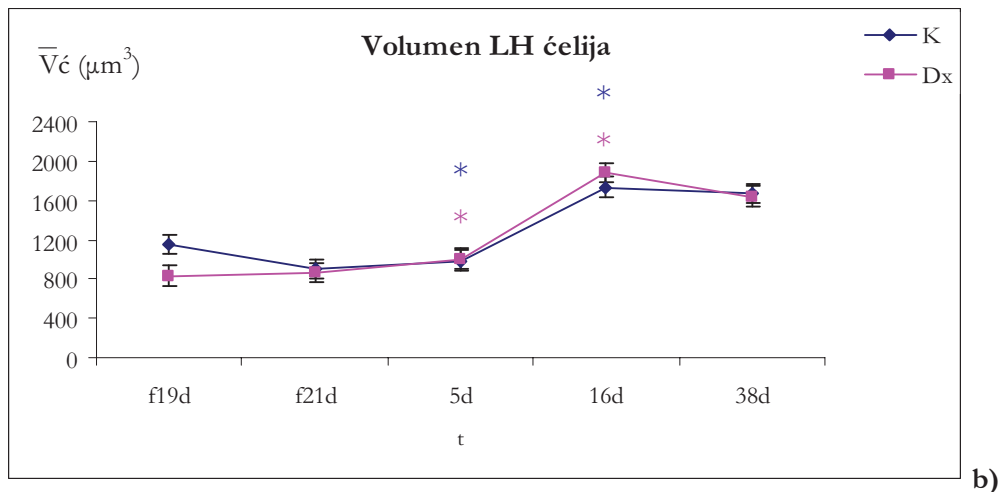
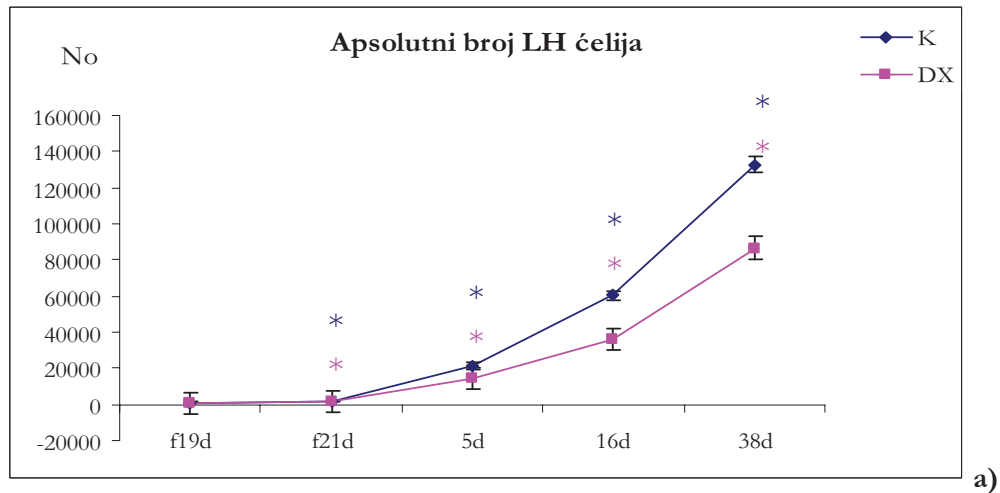
Numerička gustina LH ćelija nije promenjena od 19. do 21. fetalnog dana. Od 21. fetalnog dana do 5. dana neonatalnog života numerička gustina LH ćelija je povećana 5.8 puta ( $p < 0.05$ ). Od 5. do 16. dana života numerička gustina LH ćelija nije promenjena, ali od 16. do 38. dana života se smanjuje za 31% ( $p < 0.05$ ). Tako da se numerička gustina od 19. fetalnog dana do 38. dana života ukupno povećala 3 puta (Tabela 4, Grafikon 6 b).



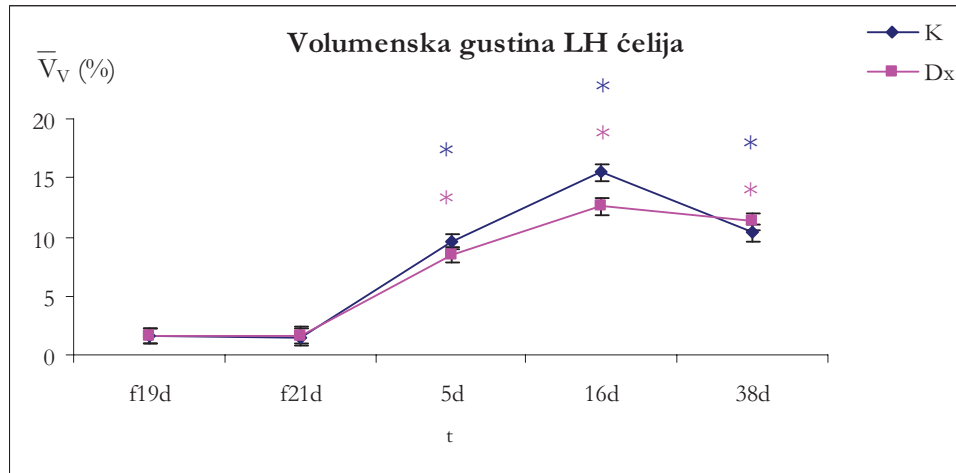
**Tabela 4.** Stereološki parametri LH ćelija: Apsolutni broj (No); Volumen LH ćelija ( $V_c$  -  $\mu\text{m}^3$ ); Volumenska gustina ( $V_V$  - %); Numerička gustina ( $N_V$  -  $\text{mm}^{-3}$ ) kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u fetalnom (19. i 21. dan), neonatalnom (5. dan), infantilnom (16. dan) i peripubertalnom periodu života.

No	19. dan (f)	21. dan (f)	5. dan	16. dan	38. dan
K	1133 ± 81	1693 ± 112 *	21200±1873 *	60200±2117 *	132833±4163 *
Dx	550 ± 28 *	1387 ± 88 **	14600±1664 **	35867 ± 945 **	86667± 2754 **
<b><math>\bar{V}_c</math> (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>					
K	1153 ± 229	900 ± 8	987 ± 60 *	1736 ± 155 *	1666 ± 41
Dx	832 ± 87 *	863 ± 93	1006 ± 114 *	1876 ± 47 *	1641 ± 40
<b><math>\bar{V}_V</math> (%)</b>					
K	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.3	9.6 ± 0.1 *	15 ± 0.6 *	10.3 ± 0.6 *
Dx	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.04	8.5 ± 0.3 **	12.6 ± 0.2 **	11.3 ± 0.4 **
<b><math>N_V</math> (<math>\text{mm}^{-3}</math>)</b>					
K	19267±3137	16777±3192	97322±6435 *	89681±10170	62354±4767 *
Dx	15803±1186 *	18932±1586	81765±11856 **	67142±2920 **	69041±1663

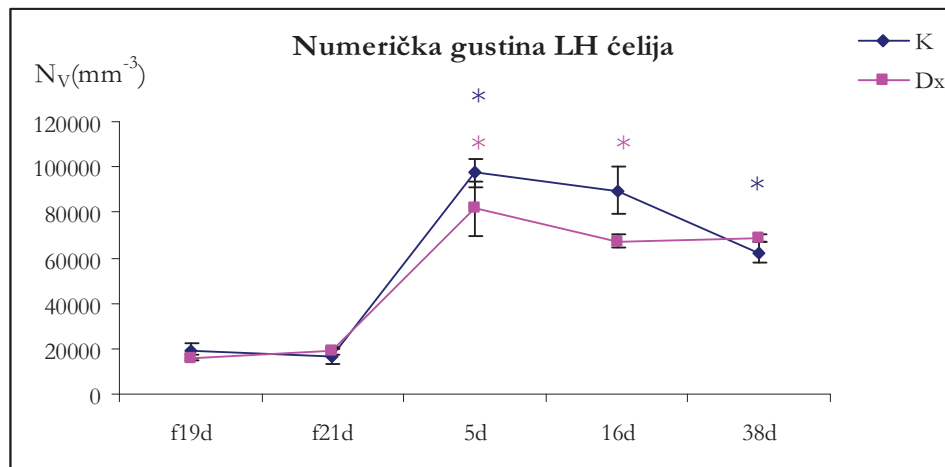
Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne i eksperimentalne grupe, \* između kontrolnih grupa, \* između eksperimentalnih grupa.



**Grafikon 5.** a) Apsolutni broj LH ćelija (No), b) Volumen LH ćelija ( $V_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ) kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) od fetalnog (19. i 21. dana), neonatalnog (5. dana), infantilnog (16. dana) do peripubertalnog (38. dana) perioda života. Rezultati su prikazani kao  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolnih grupa, \* između odgovarajućih eksperimentalnih grupa.



a)

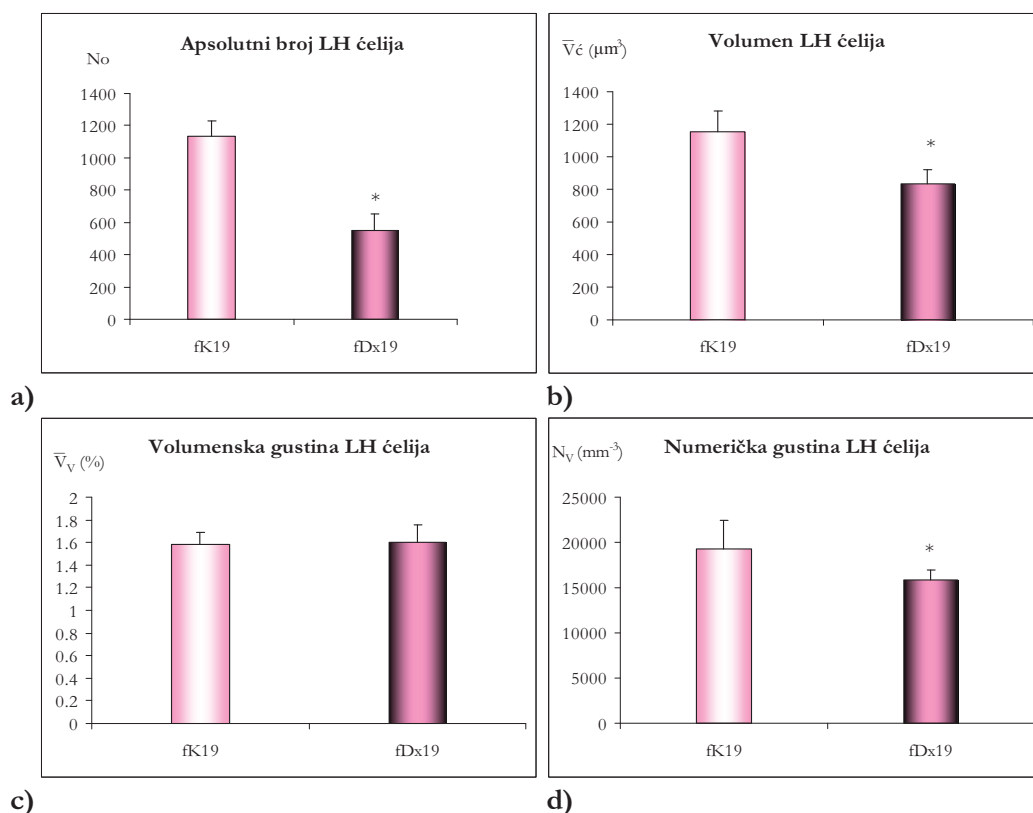


b)

**Grafikon 6.** a) Volumenska gustina LH ćelija ( $V_V$ , %), b) Numerička gustina LH ćelija -  $N_V$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) od fetalnog (19. i 21. dana), neonatalnog (5. dana), infantilnog (16. dana) do peripubertalnog (38. dana) perioda života. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolnih grupa, \* između odgovarajućih eksperimentalnih grupa.

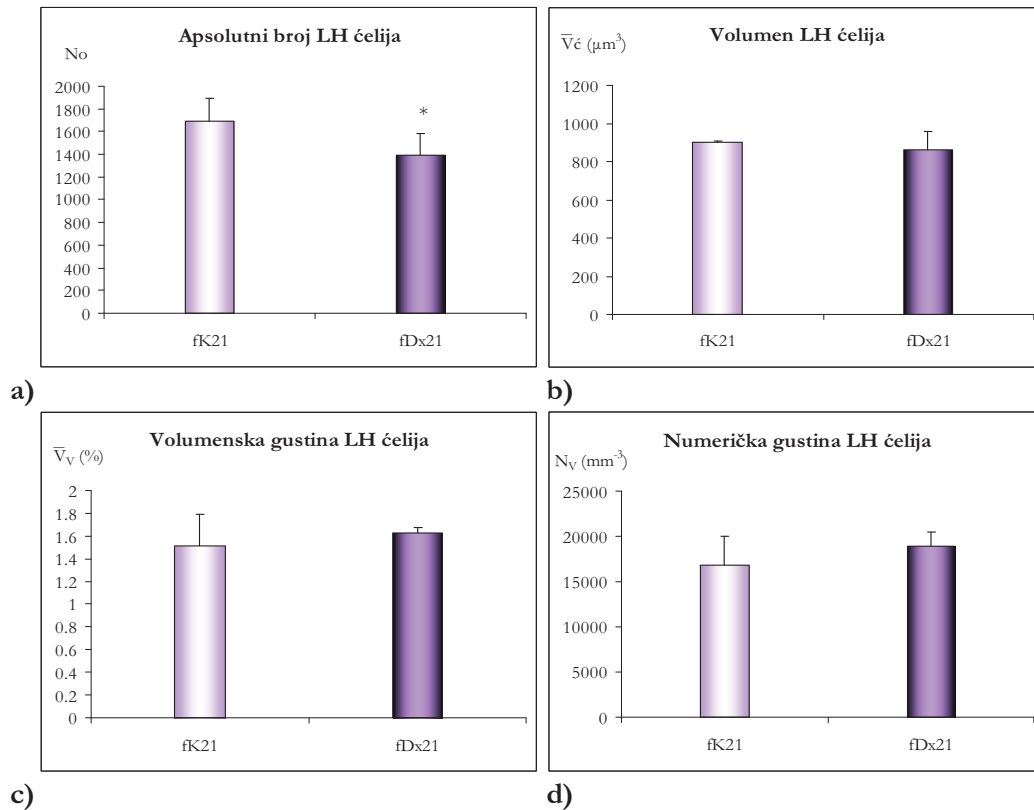
#### 4.4.4. Luteinizirajuće ćelije ženki pacova nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu

Intrauterino izlaganje deksametazonu promenilo je ispitivane stereološke parametre imunoobeležениh luteinizirajućih ćelija kod fetusa iz eksperimentalne grupe starih 19 dana u odnosu na odgovarajuće parametre kod kontrolnih životinja. Tako je broj LH ćelija u eksperimentalnoj grupi smanjen za 51% ( $p < 0.05$ ), dok je volumen LH ćelija smanjen za 28% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti (Histogram 10 a, b). Volumenska gustina imunoobeležениh LH ćelija u eksperimentalnoj grupi nije promenjena, dok je numerička gustina statistički značajno smanjena za 16% (Histogram 10 c, d).



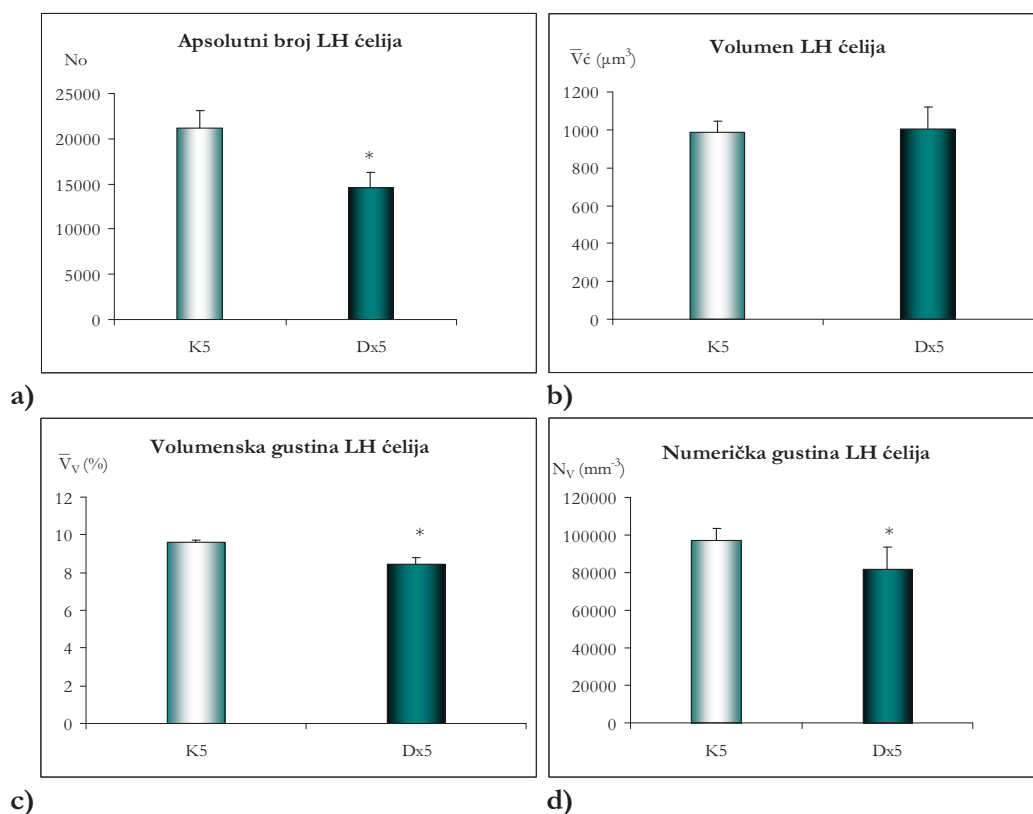
**Histogram 10.** a) Apsolutni broj LH ćelija ( $N_o$ ), b) Volumen LH ćelija ( $\bar{V}_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ), c) Volumenska gustina LH ćelija ( $\bar{V}_v$ , %), Numerička gustina LH ćelija -  $N_v$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod 19 dana starih kontrolnih (K) i fetusa iz eksperimentalne grupe (Dx).  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kod fetusa starih 21 dan intrauterino izlaganje deksametazonu dovelo je do statistički značajnog smanjenja apsolutnog broja LH ćelija za 18% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti (Histogram 11 a). Volumen LH ćelija, kao i volumenska i numerička gustina u eksperimentalnoj grupi nisu statistički značajno promenjeni u odnosu na kontrolne životinje (Histogram 11 b, c, d).



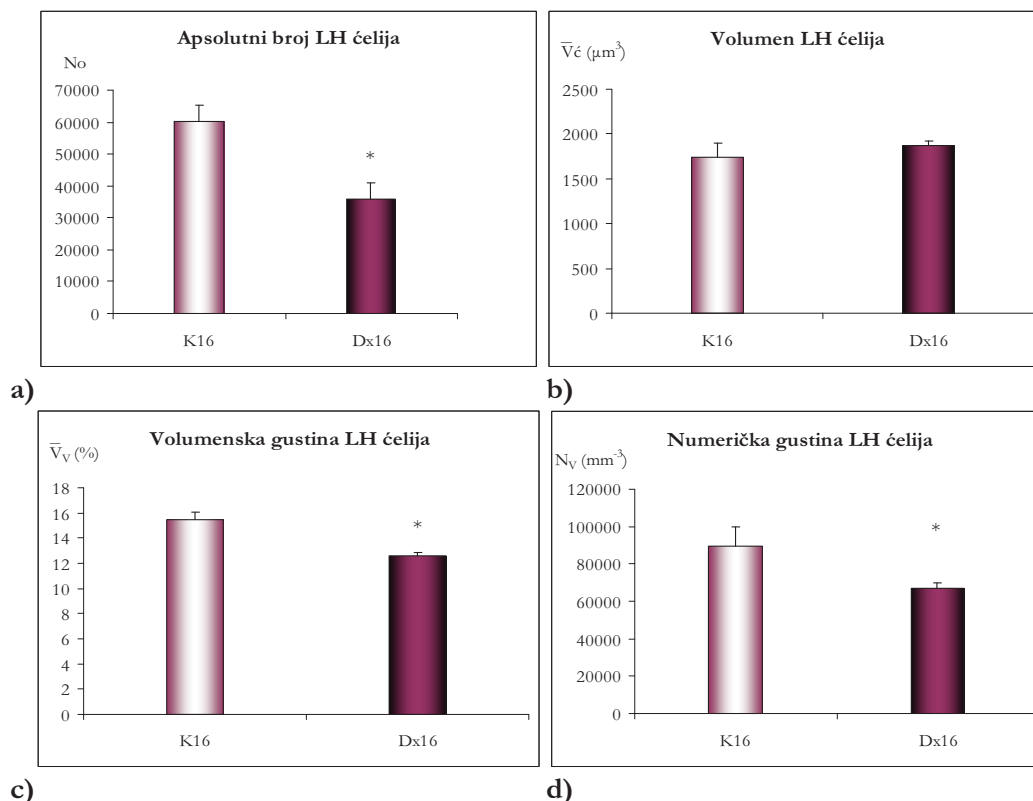
**Histogram 11.** a) Apsolutni broj LH ćelija ( $N_o$ ), b) Volumen LH ćelija ( $\bar{V}_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ), c) Volumenska gustina LH ćelija ( $\bar{V}_V$ , %), Numerička gustina LH ćelija -  $N_V$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod 21 dan starih kontrolnih (K) i fetusa iz eksperimentalne grupe (Dx).  $\bar{X} \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Apsolutni broj LH ćelija kod 5 dana starih ženki pacova iz eksperimentalne grupe je statistički značajno smanjen za 31% ( $p < 0.05$ ), u odnosu na kontrolne vrednosti, dok se volumen LH ćelija nije promenio (Histogram 12 a, b). Volumenska gustina LH ćelija smanjena je za 11% ( $p < 0.05$ ), a numerička gustina je smanjena za 15% ( $p < 0.05$ ), (Histogram 12 c, d), u odnosu na kontrolne vrednosti.



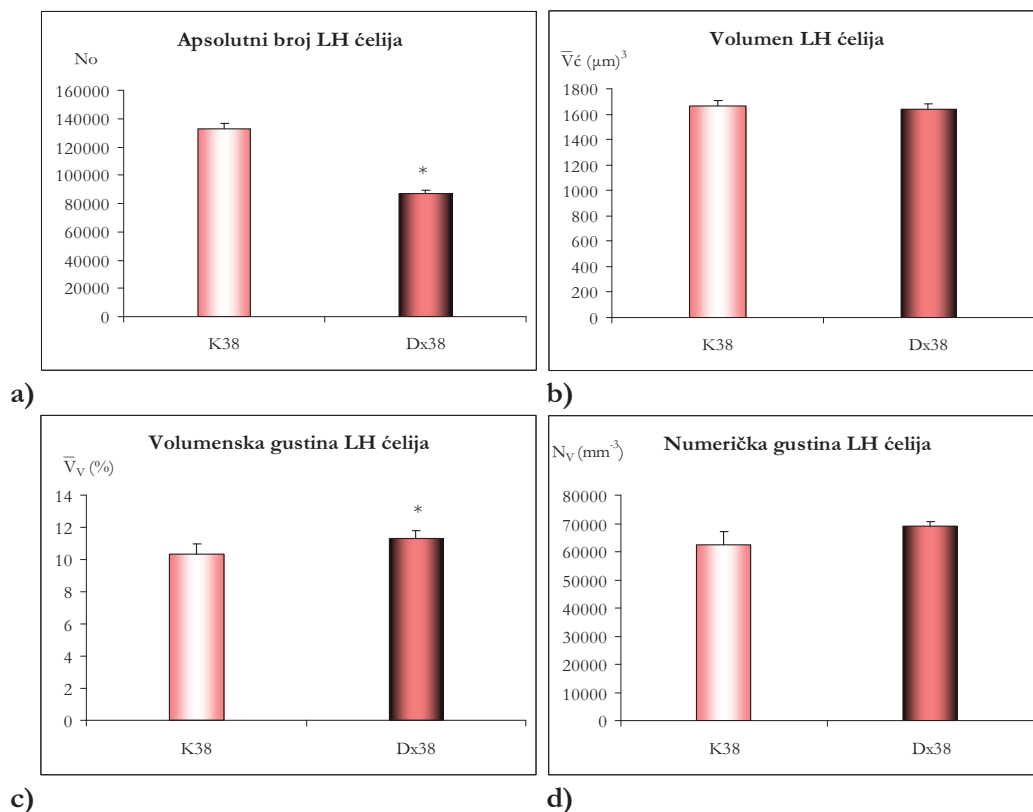
**Histogram 12.** a) Apsolutni broj LH ćelija ( $N_o$ ), b) Volumen LH ćelija ( $\bar{V}_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ), c) Volumenska gustina LH ćelija ( $\bar{V}_v$ , %), Numerička gustina LH ćelija -  $N_v$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod 5 dana starih kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx).  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kod infantilnih ženki pacova starih 16 dana, nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu apsolutni broj LH ćelija se smanjio za 40% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti, dok se volumen LH ćelija nije promenio (Histogram 13 a, b). Volumenska gustina imunoobeleženih LH ćelija se smanjila za 16% ( $p < 0.05$ ), a numerička gustina za 26% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti (Histogram 13 c, d).



**Histogram 13.** a) Apsolutni broj LH ćelija ( $N_o$ ), b) Volumen LH ćelija ( $\bar{V}_c$ ,  $\mu\text{m}^3$ ), c) Volumenska gustina LH ćelija ( $\bar{V}_v$ , %), Numerička gustina LH ćelija -  $N_v$  ( $\text{mm}^{-3}$ ) kod 16 dana starih kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx).  $\bar{X} \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kod 38 dana starih ženki pacova iz eksperimentalne grupe apsolutni broj LH ćelija je smanjen za 35% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti, a volumen LH ćelija nije promenjen (Histogram 14 a, b). Volumenska gustina je povećana za 10% ( $p < 0.05$ ), a numerička gustina nije značajno promenjena u odnosu na vrednosti izmerene kod kontrolne grupe (Histogram 14 c, d).



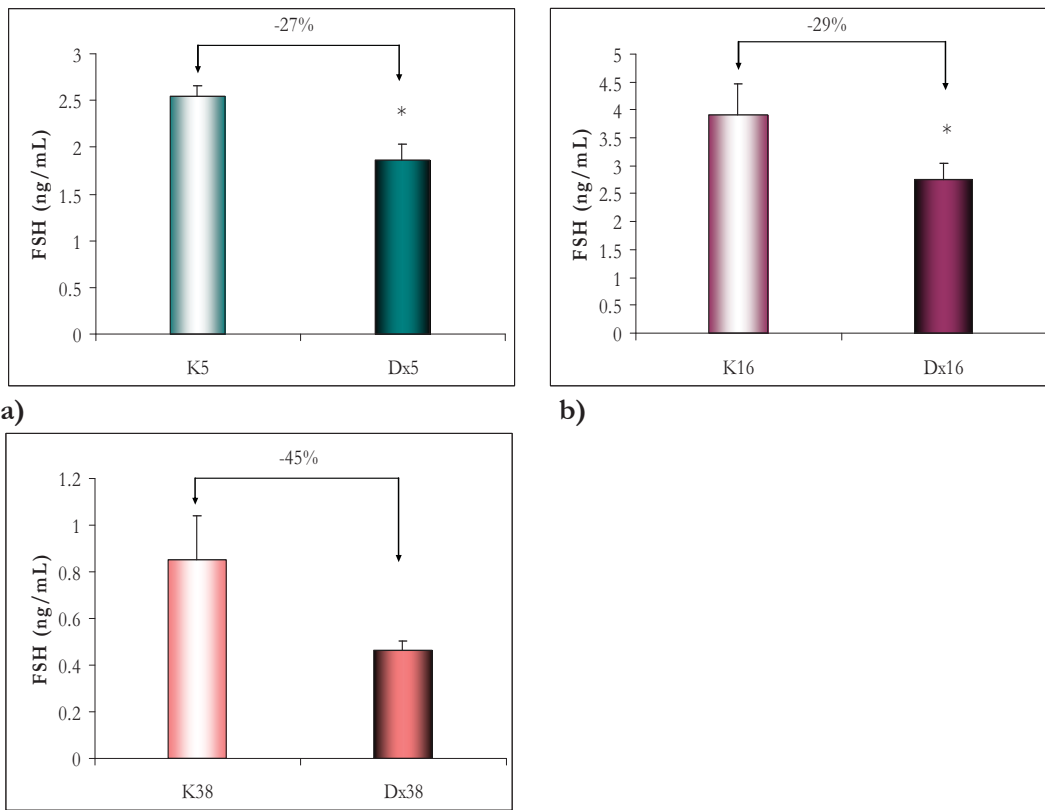
**Histogram 14.** a) Apsolutni broj LH ćelija ( $N_o$ ), b) Volumen LH ćelija ( $\bar{V}_c, \mu\text{m}^3$ ), c) Volumenska gustina LH ćelija ( $\bar{V}_v, \%$ ), Numerička gustina LH ćelija -  $N_v (\text{mm}^{-3})$  kod 38 dana starih kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx).  $X \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Ukupan broj LH ćelija od fetalnog (19. dan) do peripubertalnog perioda života (38. dan) kod životinja iz eksperimentalne grupe se povećao 158 puta (kod kontrola je isti parametar uvećan 117 puta). Volumen LH ćelija od 19. fetalnog do 38. dana života povećan je za 97%, dok je kod kontrola prisutan porast od 44%. Procentualna zastupljenost LH ćelija se u pomenutom periodu života ukupno povećava 7 puta, a numerička gustina 3 puta i u eksperimentalnoj i u kontrolnoj grupi.

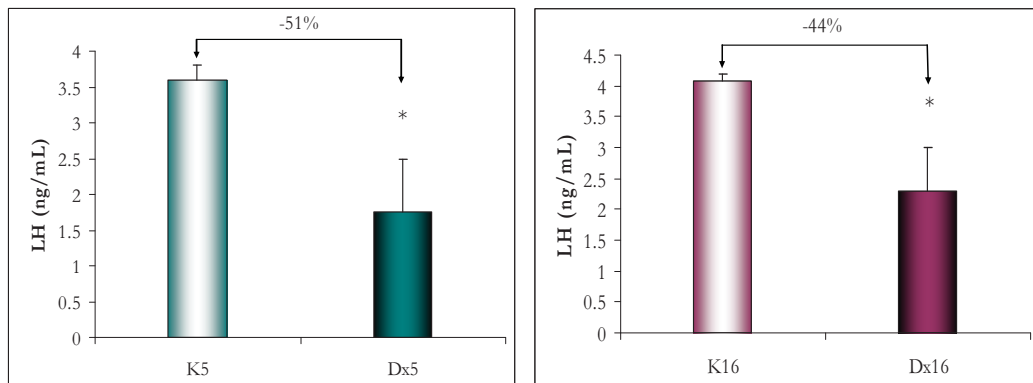


#### 4.5. Koncentracije FSH i LH u serumu pacova

Intrauterino izlaganje deksametazonu dovelo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije FSH i LH u serumu ženki pacova od neonatalnog (5. dan) do peripubertalnog (38. dan) perioda života u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti (Histogrami 15 a-c, 16 a-c).

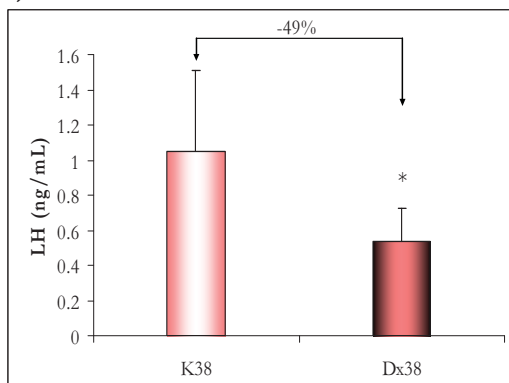


**c)**  
**Histogram 15.** Koncentracija FSH u serumu kontrolnih (K) i eksperimentalnih (Dx) ženki pacova u neonatalnom (a), infantilnom (b) i peripubertalnom (c) periodu života. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.



a)

b)



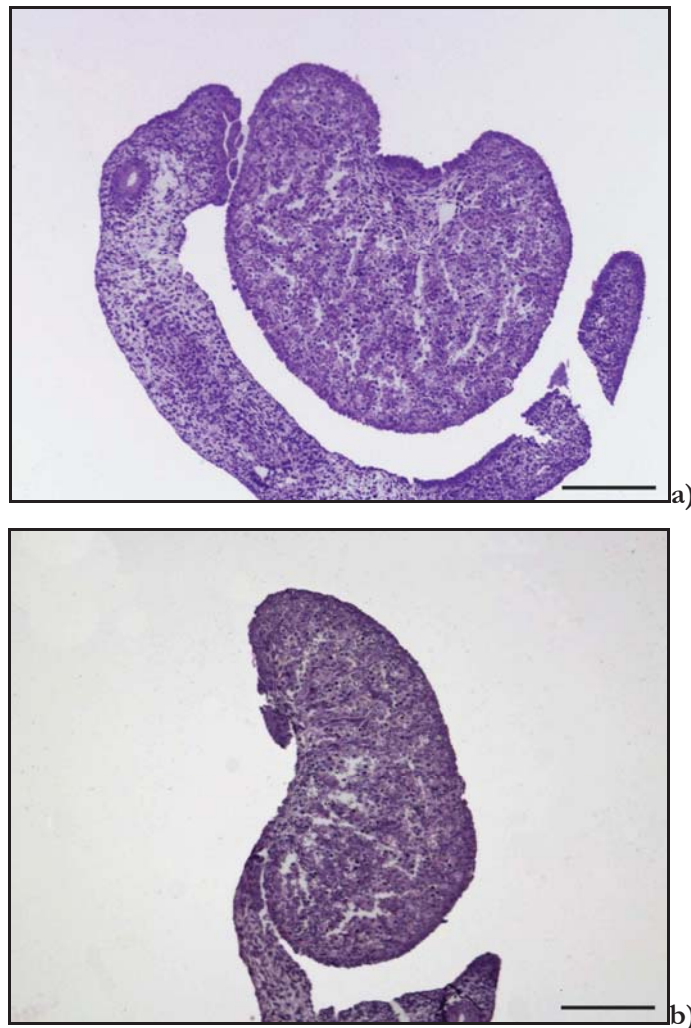
c)

**Histogram 16.** Koncentracija LH u serumu kontrolnih (K) i eksperimentalnih (Dx) ženki pacova u neonatalnom (a), infantilnom (b) i peripubertalnom (c) periodu života. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

#### 4.6. Histološke karakteristike fetalnog jajnika

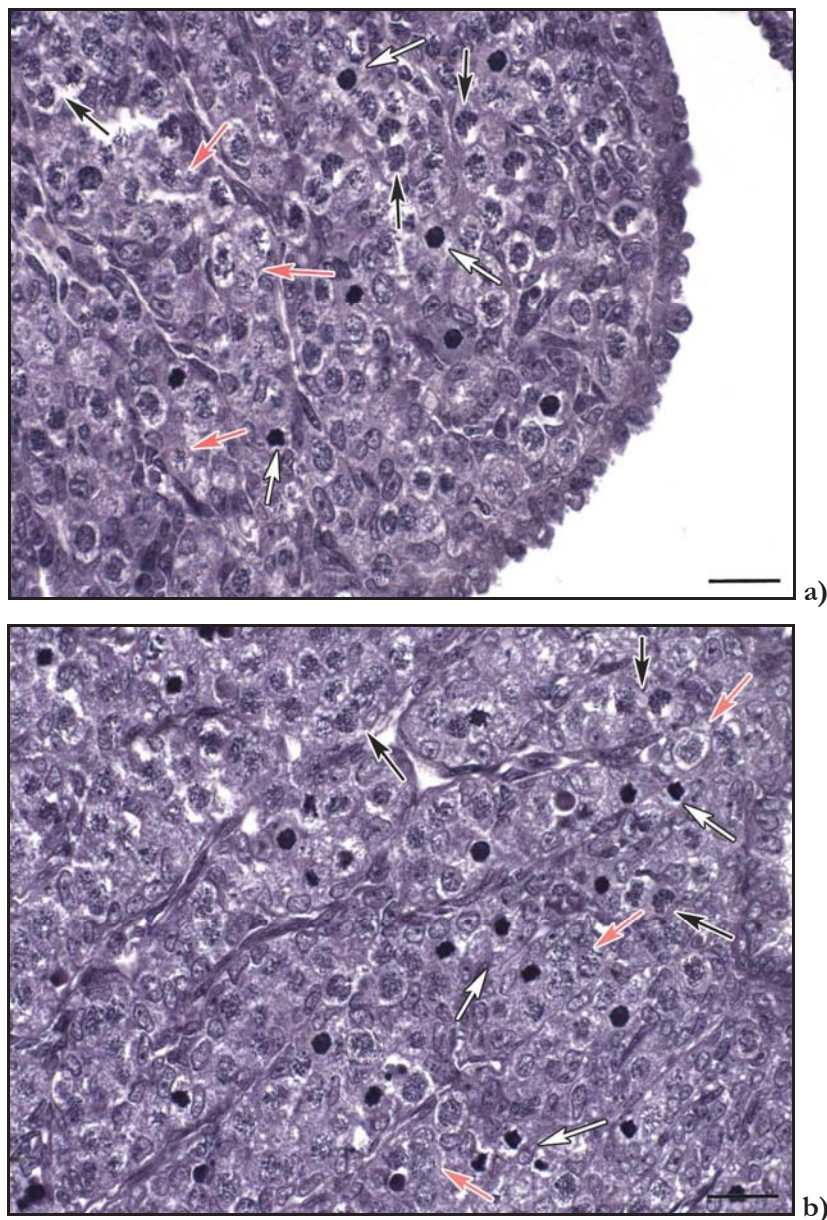
##### 4.6.1. Jajnik fetusa pacova 19. fetalnog dana

Na površini jajnika kontrolnih fetusa 19. fetalnog dana nalazi se površinski epitel, koji nastaje od celomskog epitela za vreme formiranja genitalnih nabora. Jajnici još uvek nemaju definitivnu histološku organizaciju, a u njima se uočava prisustvo brojnih zdravih germinativnih ćelija (GĆ), koje su uglavnom u zigotenu profaze I mejoze. One su znatno veće od okolnih somatskih ćelija sa kojima su u neposrednom kontaktu i sa kojima formiraju grozdove ili klustere. Klasteri su između sebe odvojeni nizovima mezenhimskih ćelija. Mitotsko deljenje, i progresivno umnožavanje germinativnih ćelija do 19. fetalnog dana je uglavnom završeno (Slika 25 a).

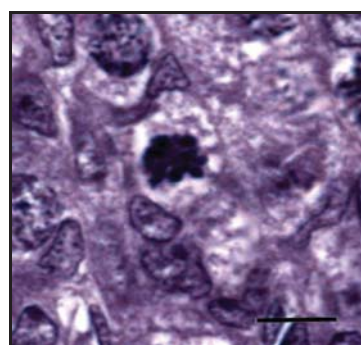
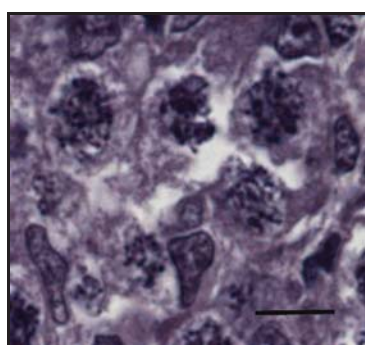
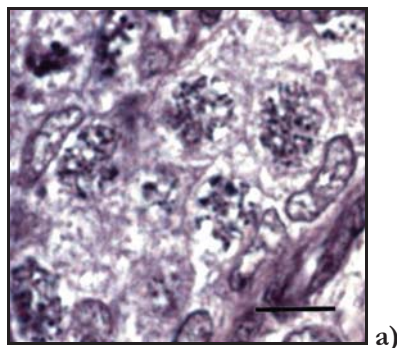


**Slika 25.** Jajnici pacova 19. fetalnog dana a) kontrolnog fetusa; b) fetusa izloženog deksametazonu; bar 200  $\mu$ m.

U jajnicima fetusa 19. fetalnog dana u velikom procentu prisutne su i germinativne ćelije koje se nalaze u određenim fazama degeneracije, tačnije one koje su „zarobljene” u mitozu i ostale kod kojih se procesi degeneracije javljaju tek nakon otpočinjanja mejoze. (Slike 26 a i 27 a, b, c).



**Slika 26.** Jajnici pacova 19. fetalnog dana a) kontrolnog fetusa, b) fetusa izloženog deksametazonu; narandžaste strelice – zdrave oocite u fazi zigotena; bele strelice – oogonije zahvaćene degeneracijom u fazi mitoze; crne strelice – oocite zahvaćene degeneracijom u fazi zigotena; bar 20  $\mu\text{m}$ .



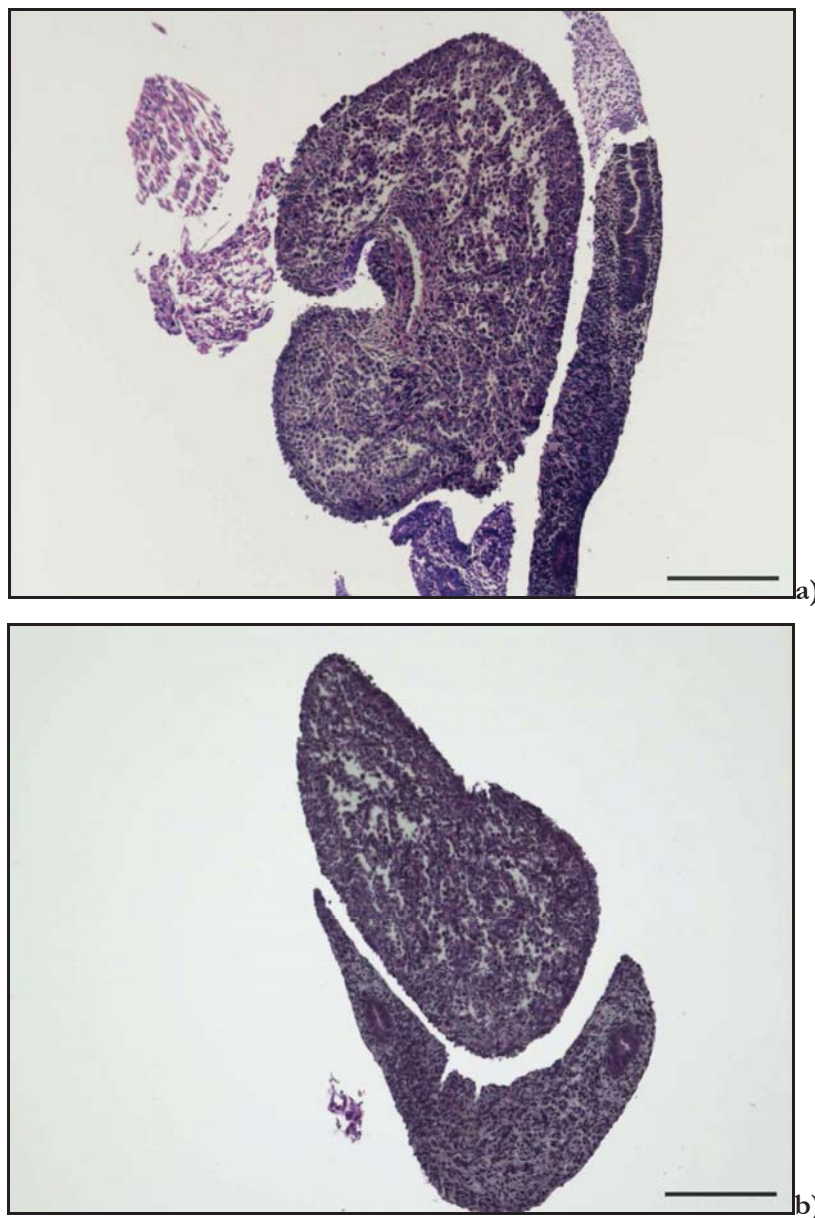
**Slika 27.** Zdrave i degenerisane germinativne ćelije u jajniku 19. fetalnog dana a) zdrave oocite u fazi zigotena, b) oocite u zigotenu zahvaćene degenerativnim promjenama, c) degenerisana oogonija “zarobljena u mitozu”; bar 10  $\mu\text{m}$ .

Jajnik fetusa 19. fetalnog dana koji su izloženi deksametazonu znatno je manje veličine u odnosu na kontrolni jajnik (Slike 25 a i b). Izlaganje deksametazonu nije uticalo na promenu histološke organizacije jajnika, ali je povećalo broj degenerisanih, a smanjilo broj zdravih germinativnih ćelija u odnosu na kontrolni jajnik (Slike 26 a i b).

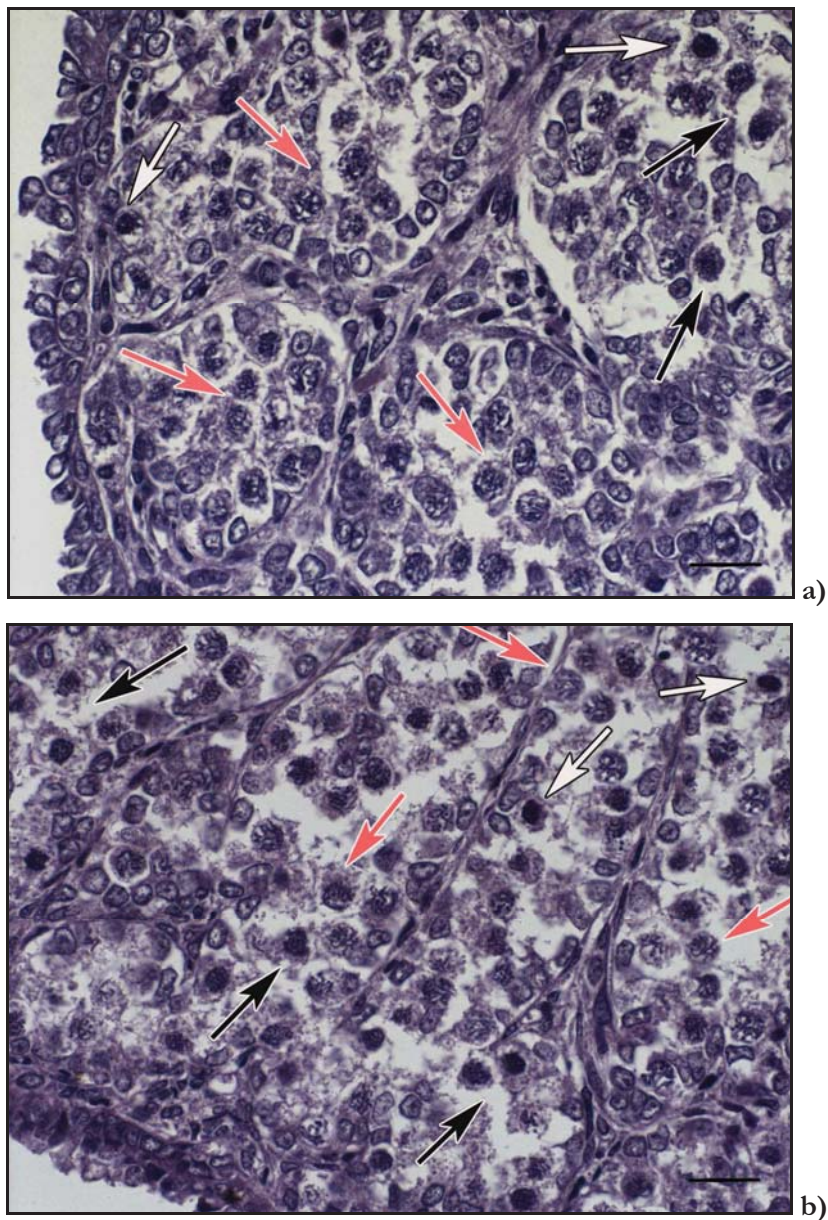
#### 4.6.2. Jajnik fetusa pacova 21. fetalnog dana

Jajnik fetusa pacova 21. fetalnog dana ima sličnu histološku organizaciju kao i 19. fetalnog dana. Germinativne i somatske ćelije su organizovane u klustere, odvojene nizovima mezenhimskih ćelija, u kojima uočavamo izdužena jedra. Dominiraju zdrave oocite, koje su na prelazu iz zigotena u pahiten u profazi I. U malom broju su prisutne oogonije “zarobljene u mitozu”, kao i oocite zahvaćene degeneracijom u fazi pahitena (Slike 28 a, 29 a i 30 a i b).

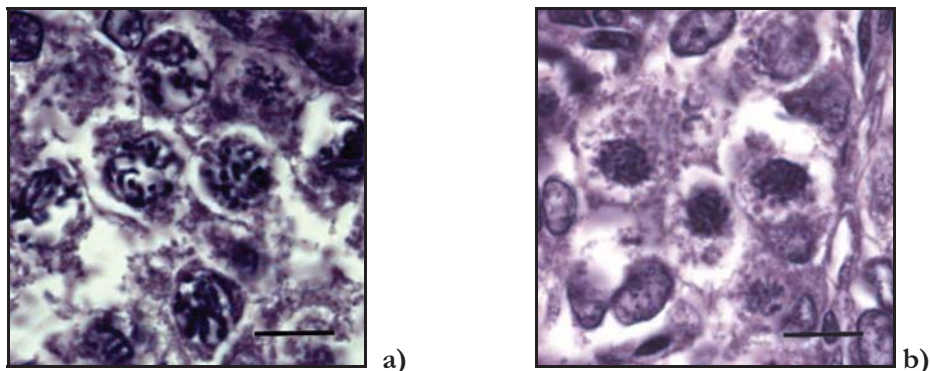
Veličina jajnika pacova 21. fetalnog dana je povećana u odnosu na veličinu 19. fetalnog dana. Zdrave germinativne ćelije su zastupljene u znatno većoj meri, a prisustvo degenerisanih je smanjeno. Ovakva histološka slika prati fiziološka dešavanja u završnoj fazi fetalnog razvoja jajnika.



**Slika 28.** Jajnici pacova 21. fetalnog dana a) kontrolnog fetusa, b) fetusa izloženog deksametazonu; bar 200 µm.



**Slika 29.** Jajnik pacova 21. fetalnog dana a) kontrolnog fetusa, b) fetusa izloženog deksametazonu; narandžaste strelice – zdrave oocite u fazi pahitena; bele strelice – oogonije zahvaćene degeneracijom u fazi mitoze; crne strelice – oocite zahvaćene degeneracijom u fazi pahitena; bar 20  $\mu\text{m}$ .



**Slika 30.** Zdrave i degenerisane germinativne ćelije u jajniku 21. fetalnog dana a) zdrave oocite u fazi pahitena, b) oocite u pahitenu zahvaćene degenerativnim promenama; bar 10  $\mu\text{m}$ .

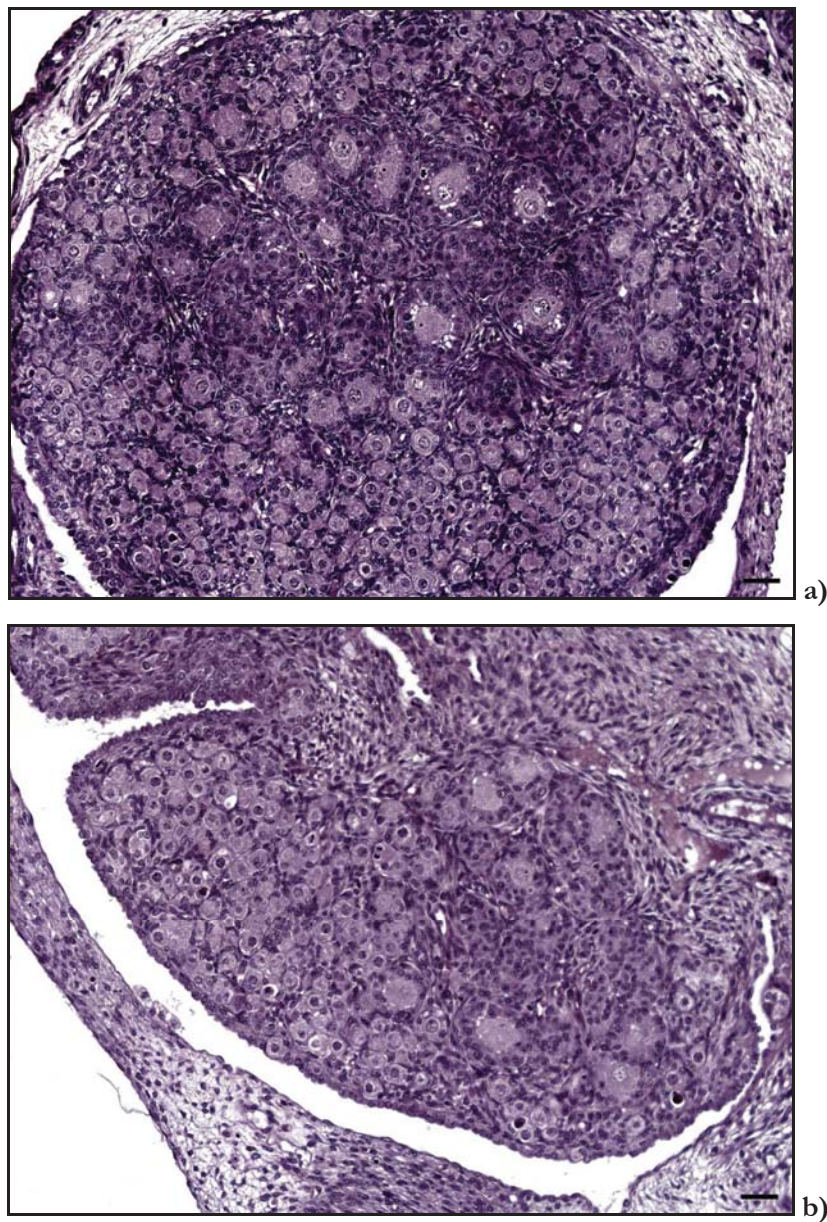
Jajnik fetusa 21. fetalnog dana koji su izloženi deksametazonu manje je veličine u odnosu na kontrolni jajnik (Slike 28 a i b). Izlaganje deksametazonu nije uticalo na promenu histološke organizacije jajnika, ali je povećalo broj degenerisanih, a smanjilo broj zdravih germinativnih ćelija u odnosu na kontrolni jajnik (Slike 29 a i b).

#### **4.7. Histološke karakteristike jajnika pacova od neonatalnog do peripubertalnog perioda života**

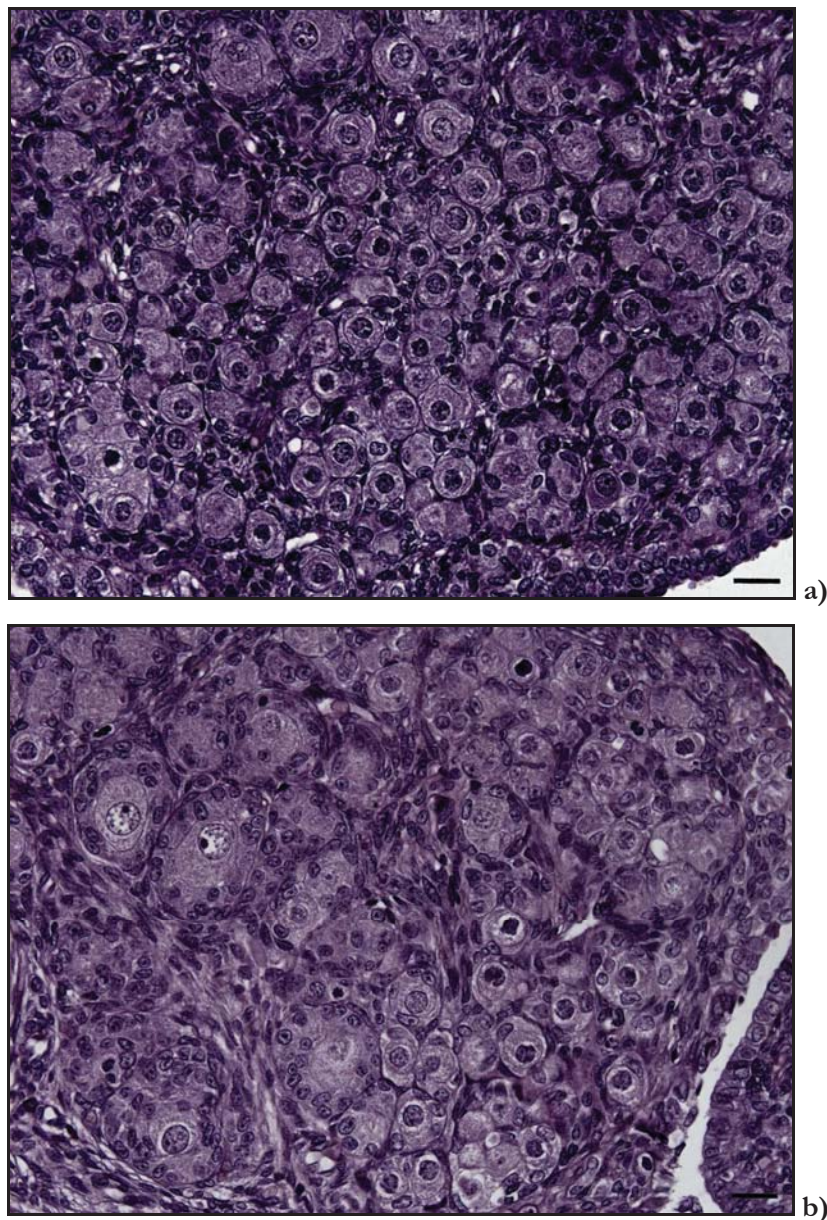
##### **4.7.1. Jajnik fetusa pacova u neonatalnom periodu života**

Jajnik kontrolnih ženki pacova u neonatalnom periodu života (5. dan) ima definitivnu histološku organizaciju, koja podrazumeva prisustvo zdravih i atretičnih folikula u različitim fazama folikulogeneze. Na centralnim poprečnim presecima jajnika kontrolnih neonatalnih ženki folikuli se uočavaju u perifernom regionu, neposredno ispod germinativnog epitela, gde su u najvećoj meri zastupljeni primordijalni i primarni folikuli, i u centralnim delovima preseka jajnika gde uočavamo brojne višeslojne folikule (Slika 31 a i 32 a).





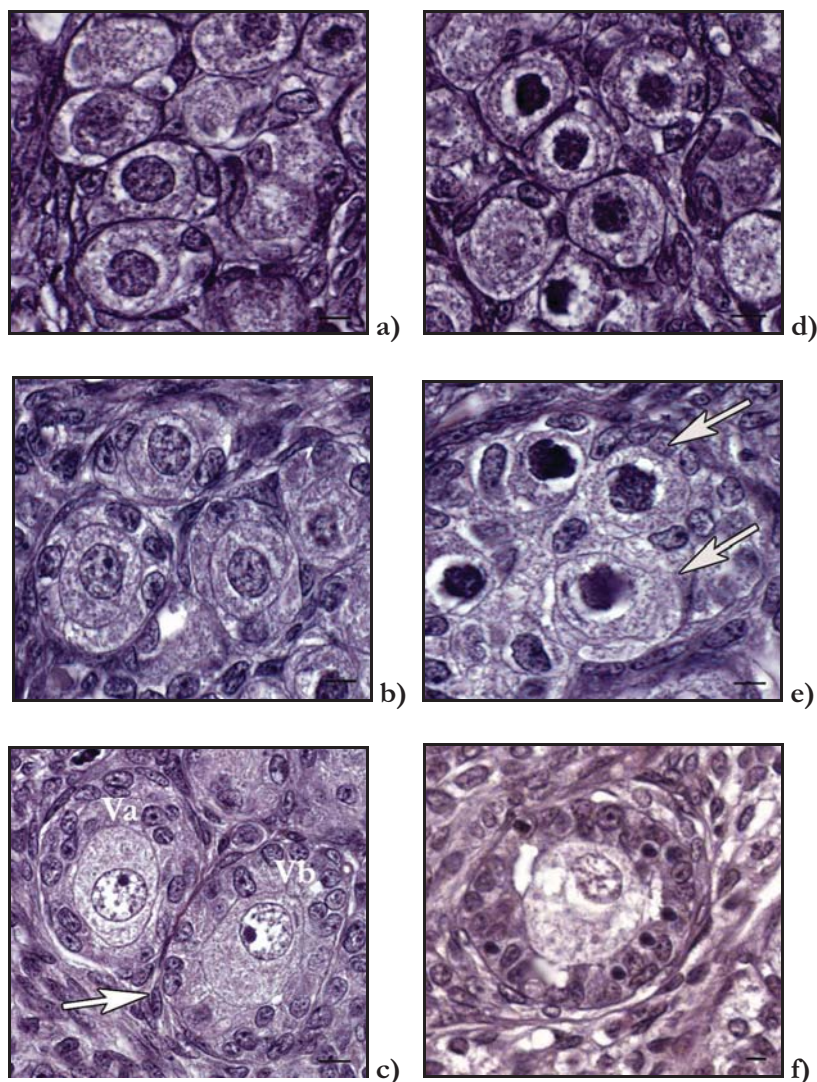
**Slika 31.** Jajnici ženke pacova u neonatalnom periodu a) jajnik kontrolne ženke, b) jajnik ženke intrauterino izložene deksametazonu; bar 20  $\mu\text{m}$ .



**Slika 32.** Jajnici ženke pacova u neonatalnom periodu a) jajnik kontrolne ženke, b) jajnik ženke intrauterino izložene deksametazonu; bar 20  $\mu\text{m}$ .

Primordijalni ili mirujući folikuli karakterišu se krupnom sferičnom oocitom u kojoj se nalazi krupno, okruglo jedro. Oko oocite se nalazi tri do pet pločastih, niskoprizmatičnih folikularnih ćelija raspoređenih u jednom sloju (Slika 33 a). Otpočinjanjem rasta i razvoja, primordijalni folikuli prelaze u primarne, koje karakteriše povećanje oocite oko koje se nalazi jedan sloj prizmatičnih, kuboidalnih folikularnih ćelija (Slika 33 b). Nastavljanjem rasta, folikularne ćelije se dele, a primarni folikul prelazi u višeslojni a folikul ( $< 75 \mu\text{m}$ , Slika 33 c). Oko primordijalnog, primarnog i višeslojnog a folikula nalaze se ćelije strome.

Daljom deobom granulosa ćelija i uvećanjem oocite, višeslojni a folikuli prelaze u višeslojne b folikule (76 - 150  $\mu\text{m}$ ). Oko višeslojnih b folikula formira se sloj teka ćelija (Slika 33 c).



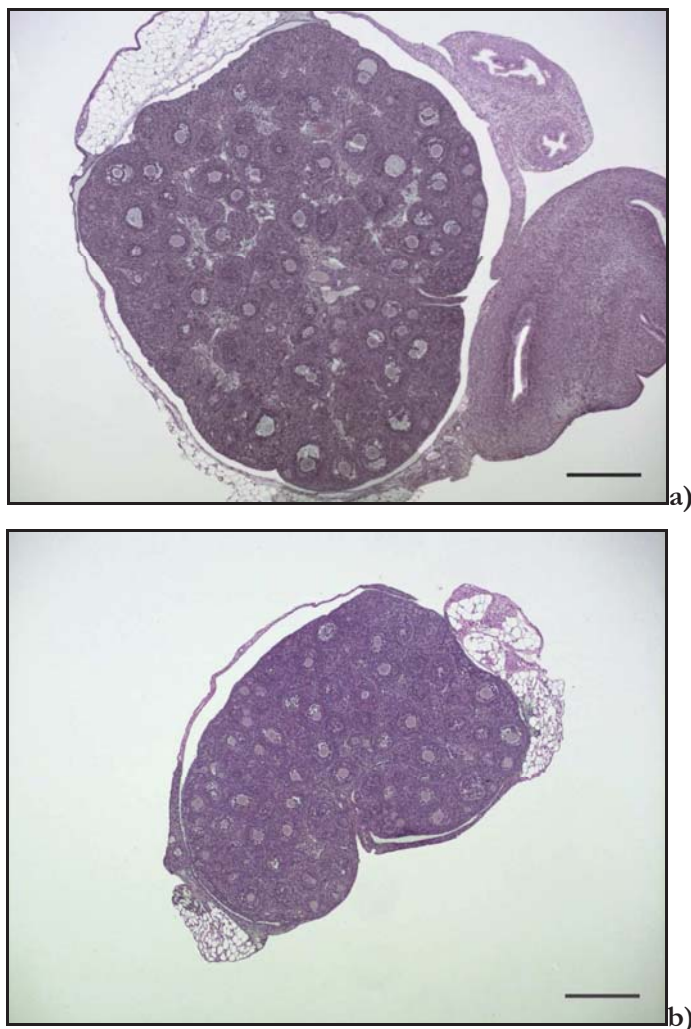
**Slika 33.** Folikuli u različitim fazama folikulogeneze i atrezije prisutni u jajnicima neonatalnih ženki. a) Primordijalni folikul, b) primarni folikul, c) višeslojni folikuli a i b, strelica – ćelije teka sloja, d) atretični primordijalni folikuli, e) atretični primarni folikuli i f) atretični višeslojni folikuli; bar 20  $\mu\text{m}$ .

Na poprečnim presecima jajnika 5 dana starih kontrolnih ženki pacova uočavaju se i atretični folikuli u svim opisanim fazama folikulogeneze. Atretični primordijalni i primarni folikuli imaju oocite sa piknotičnim jedrima izmenjenog oblika (Slika 33 d i e). Atretične višeslojne folikule karakteriše propadanje granulosa ćelija i gubitak kontakta između oocite i granulosa sloja (Slika 33 f).

Intrauterino izlaganje deksametazonu nije izmenilo opštu histološku sliku jajnika 5 dana starih ženki pacova. Veličina jajnika je smanjena, kao i broj zdravih i atretičnih folikula u svim opisanim fazama folikulogeneze karakterističnim za 5 dana stare ženke (Slika 31 b i 32 b).

#### 4.7.2. Jajnik pacova u infantilnom periodu života

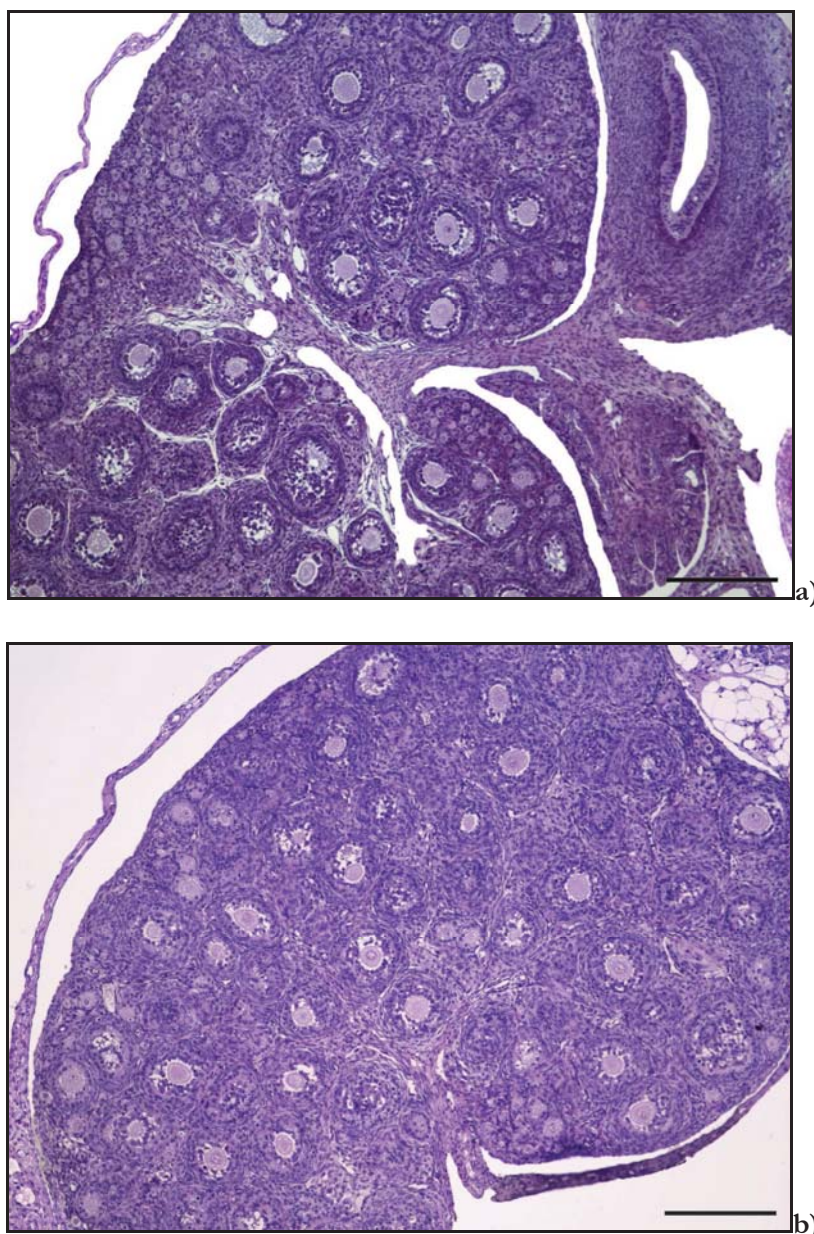
Na poprečnom preseku centralnog dela jajnika kontrolnih ženki pacova u infantilnom periodu života (16. dan) uočava se veliki broj malih zdravih, ali i malih atretičnih folikula. U jajnicima 16 dana starih ženki pacova ne uočava se odvajanja korteksa i medule, pa se folikuli nalaze kako na periferiji, tako i u centralnoj zoni jajnika (Slika 34 a).



**Slika 34.** Jajnik ženke pacova u infantilnom periodu. a) jajnik kontrolne ženke; b) jajnik ženke intrauterino izložene deksametazonu; bar 200  $\mu\text{m}$ .

Pored primordijalnih, primarnih, višeslojnih a ( $< 75 \mu\text{m}$ ) i višeslojnih b (76-150  $\mu\text{m}$ ) folikula, koji su prisutni i u jajnicima 5 dana starih ženki, u jajnicima infantilnih ženki pacova prisutni su i višeslojni folikuli klase c (151-200  $\mu\text{m}$ , Slika 35 a i 36a).

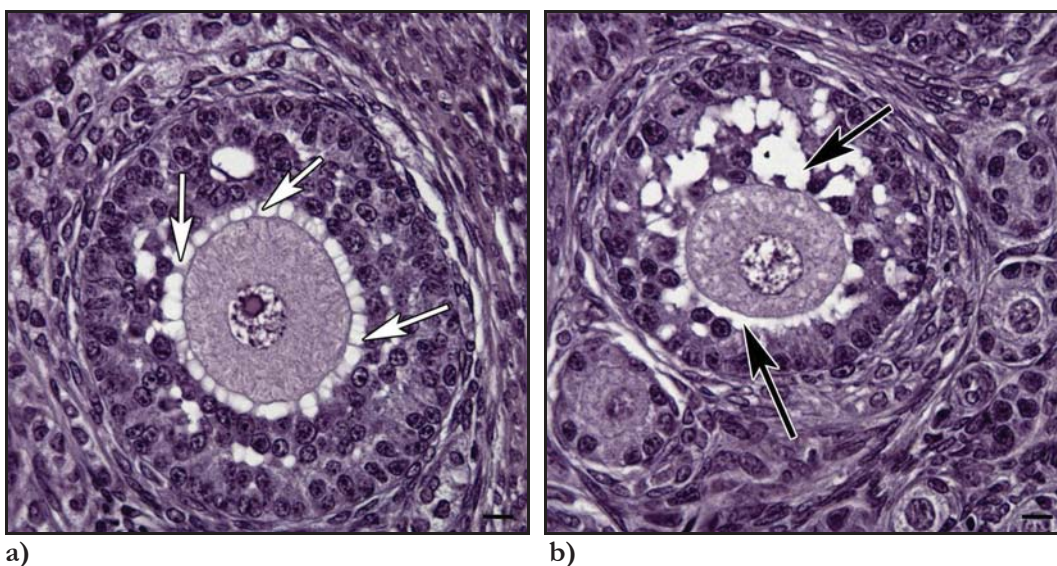
Brojni primordijalni i primarni folikuli kod infantilnih ženki pacova nalaze se na periferiji jajnika, ispod germinativnog epitela, kao i u hilusnom regionu, dok su višeslojni folikuli prisutni kako na periferiji, tako i u centralnom delu preseka (Slika 36 a).



**Slika 35.** Jajnici ženke pacova u infantilnom periodu. a) jajnik kontrolne ženke, b) jajnik ženke intrauterino izložene deksametazonu; bar 200  $\mu\text{m}$ .

Višeslojni folikuli klase c prvi put su uočeni u infantilnom kontrolnom jajniku, i karakteriše ih velika oocita, okružena sa nekoliko slojeva granuloza ćelija (Slika 37 a).

U višeslojnim folikulima klase c, oocita je razdvojena od okolnih granuloza ćelija zonom pelucidom (*zona pellucida*). Zona pelucida je uzan prostor između jajne ćelije i najbližih folikularnih ćelija. Na parafinskim presecima debljine 3  $\mu\text{m}$  mogu se uočiti citoplazmatični nastavci granuloza ćelija koji dosežu do oocite (Slika 36 a).



**Slika 36. a)** Zdrav višeslojni folikul klase c, **b)** atretičan višeslojni folikul klase c u jajniku kontrolnih infantilnih čenki pacova, bele strelice-citoplazmatični nastavci granuloza ćelija, crne strelice-gubitak kontakta granuloza ćelija i oocite; bar 20  $\mu\text{m}$ .

Atretične promene na folikulima u različitim fazama folikulogeneze prisutne su i u jajniku kontrolnih infantilnih ženki pacova. Višeslojni folikuli klase c najčešće propadaju degeneracijom granuloza ćelija, pri čemu se gubi kontakt sa oocitom (Slika 36 b).

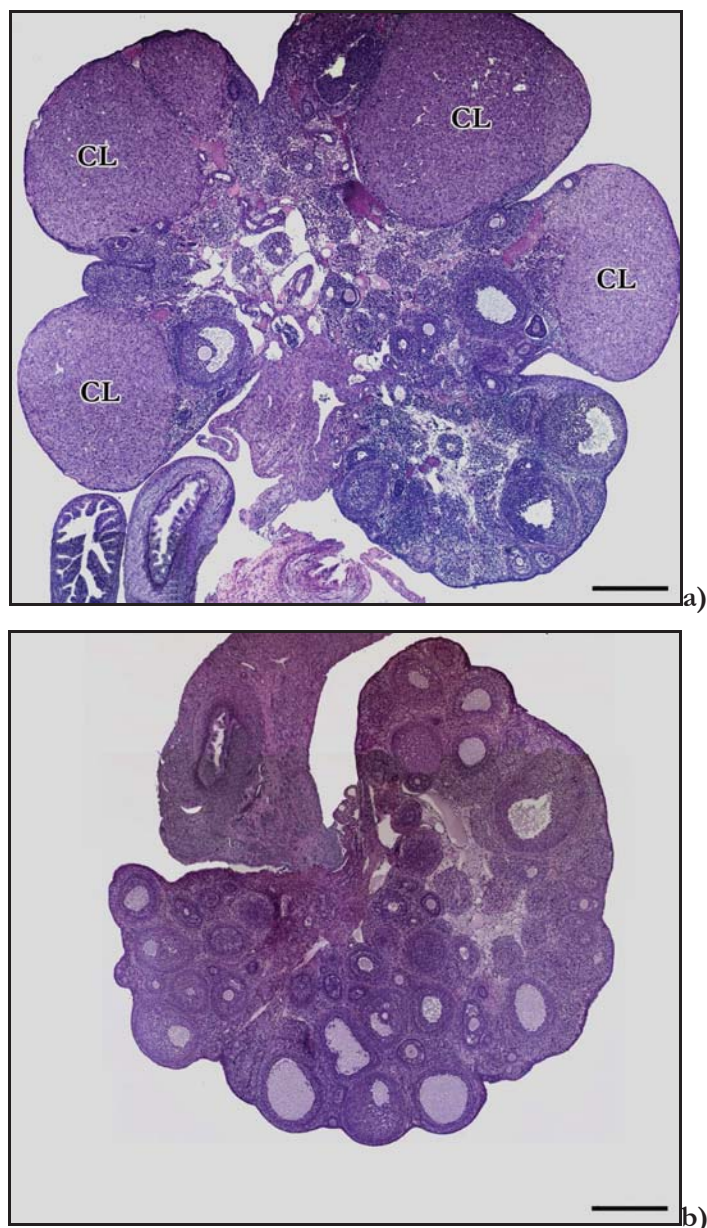
Intrauterino izlaganje deksametazonu nije promenilo opštu histološku sliku jajnika 16 dana starih ženki pacova, u kojima su prisutni zdravi i atretični primordijalni, primarni i višeslojni folikuli klase a, b i c. Veličina jajnika je smanjena, kao i broj zdravih i atretičnih folikula u svim fazama folikulogeneze karakterističnih za infantilni period života (Slike 34 b i 35 b).

#### 4.7.3. Jajnik pacova u peripubertalnom periodu života

Na poprečnom preseku jajnika kontrolnih peripubertalnih ženki (38. dan) uočavaju se dva regiona, koja međusobno nisu jasno odvojena: srž (medula) i kora (korteks). Centralni deo jajnika čini medula, izgrađena od rastresitog vezivnog tkiva i intersticijalnih

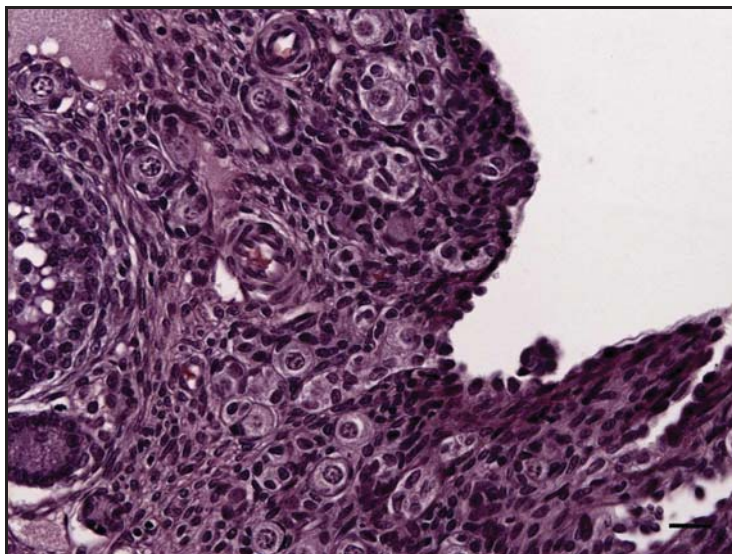
ćelija, i u njoj se uočavaju veliki krvni i limfni sudovi. Korteks obavija medulu i u njemu se nalaze folikuli u različitim stadijumima rasta i razvića, atretični folikuli i žuta tela. U interfolikularnim prostorima nalaze se intersticijalne žlezde, kao i ćelijski elementi strome jajnika (Slika 37 a).

U jajniku kontrolnih ženki pacova starih 38 dana, pored malih folikula, nalaze se i veliki antralni folikuli i žuta tela, koja ukazuju na prve ovulacije (Slika 37 a).



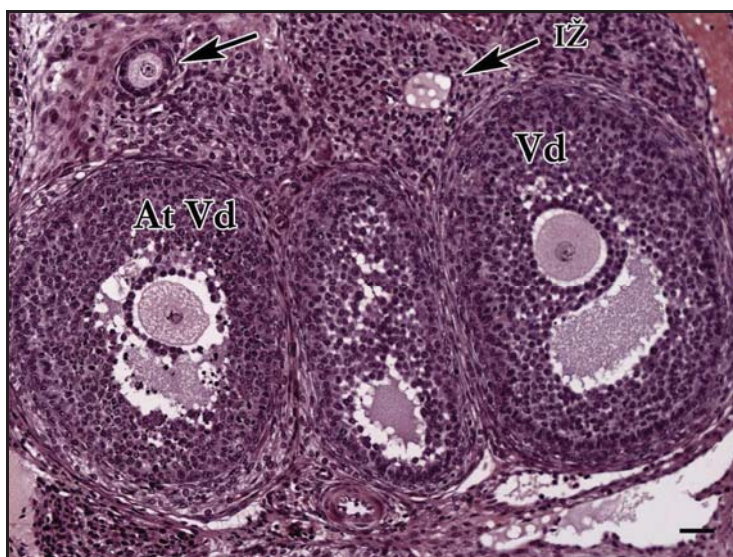
**Slika 37.** Jajnici ženke pacova u peripubertalnom periodu. a) jajnik kontrolne ženke; b) jajnik ženke intrauterino izložene deksametazonu; bar 200  $\mu\text{m}$ .

Primordijalni i primarni folikuli su brojni, lokalizovani najvećim delom na periferiji jajnika ispod germinativnog epitela (Slika 38).



**Slika 38.** Primordijalni i primarni folikuli u jajniku kontrolne peripubertalne ženke pacova; bar 20  $\mu\text{m}$ .

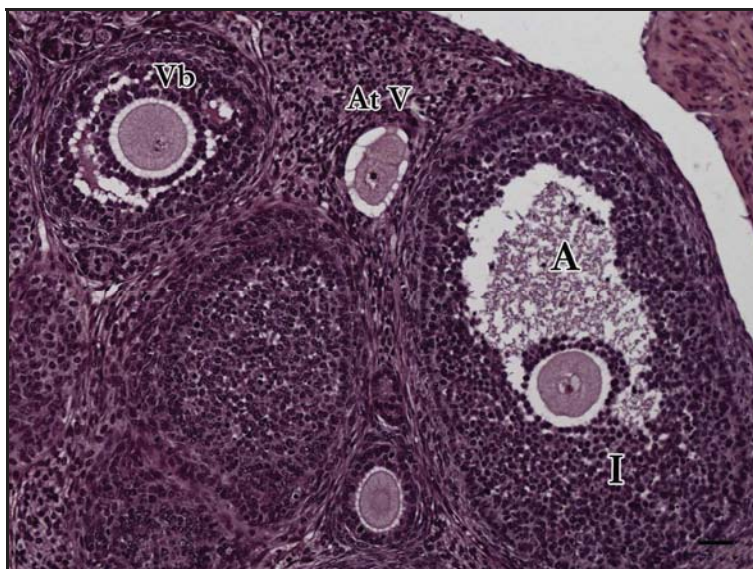
Pored višeslojnih folikula klase a, b i c koji su prisutni u jajniku infantilnih ženki, kod peripubertalnih ženki prisutni su i višeslojni folikuli klase d u kojima se uočava razmicanje granuloza ćelija i početak stvaranja antruma, koji je ispunjen folikularnom tečnošću. Najzastupljeniji način propadanja ove klase folikula je degeneracijom granuloza sloja u kome se vide piknotične granuloza ćelije (Slika 39).



**Slika 39.** Deo jajnika kontrolne peripubertalne ženke pacova. Vd – višeslojni d folikul, At Vd – atretičan Vd folikul, strelice primarni folikul i intersticijalna žlezda; bar 20  $\mu\text{m}$ .



Histološkom analizom jajnika peripubertalnih kontrolnih ženki (38. dan) utvrđeno je da su pored brojnih malih folikula, prisutni i veliki antralni folikuli (Slika 40). Antralni folikuli su prema veličini prečnika na najširem preseku, podeljeni na pet klasa. Klasa I (276-350  $\mu\text{m}$ ), klasa II (351-400  $\mu\text{m}$ ), klasa III (401-450  $\mu\text{m}$ ), klasa IV (451-575  $\mu\text{m}$ ) i klasa V ili preovulatorni folikuli (> 575  $\mu\text{m}$ ).



**Slika 40.** Deo jajnika kontrolne peripubertalne ženke pacova. Vb – višeslojni b folikul, At V atretičan folikul u kasnom atadijumu atrezije, I – veliki folikul klase I, A – antrum; bar 20  $\mu\text{m}$ .

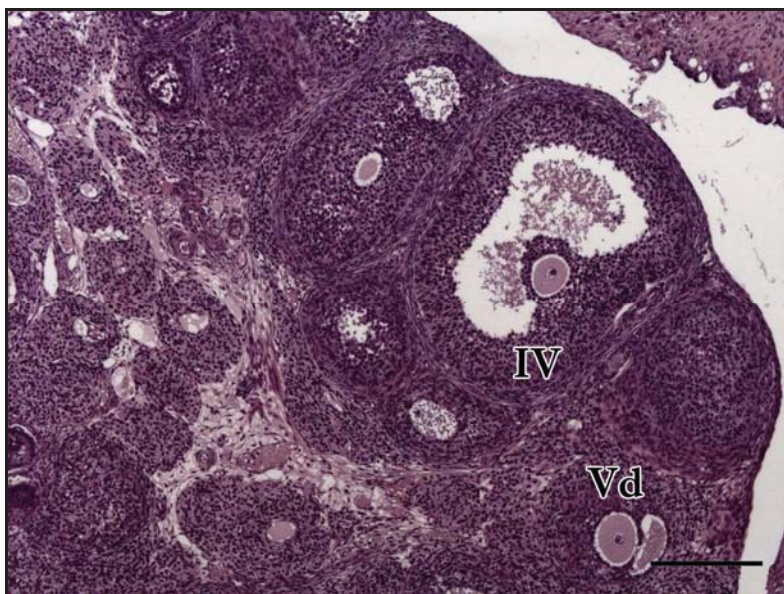
Veliki folikuli se nalaze isključivo u korteksu jajnika i karakteriše ih antralna šupljina, koja je ispunjena folikularnom tečnošću. U ovoj fazi folikulogeneze, folikuli rastu povećanjem antruma, dok je oocita dostigla svoje maksimalne dimenzije. Granuloza ćelije se i dalje dele, ali su deobe uglavnom lokalizovane na deo oko oocite. Teka sloj je diferenciran na spoljašnji i unutrašnji, ali je granica između njih nejasna.

Folikuli su veoma brojni u korteksu jajnika kontrolnih peripubertalnih ženki i vrlo često su prislonjeni jedan uz drugi (Slika 39 i 40). Između njih se najčešće nalaze elementi veziva i intersticijalne ćelije.

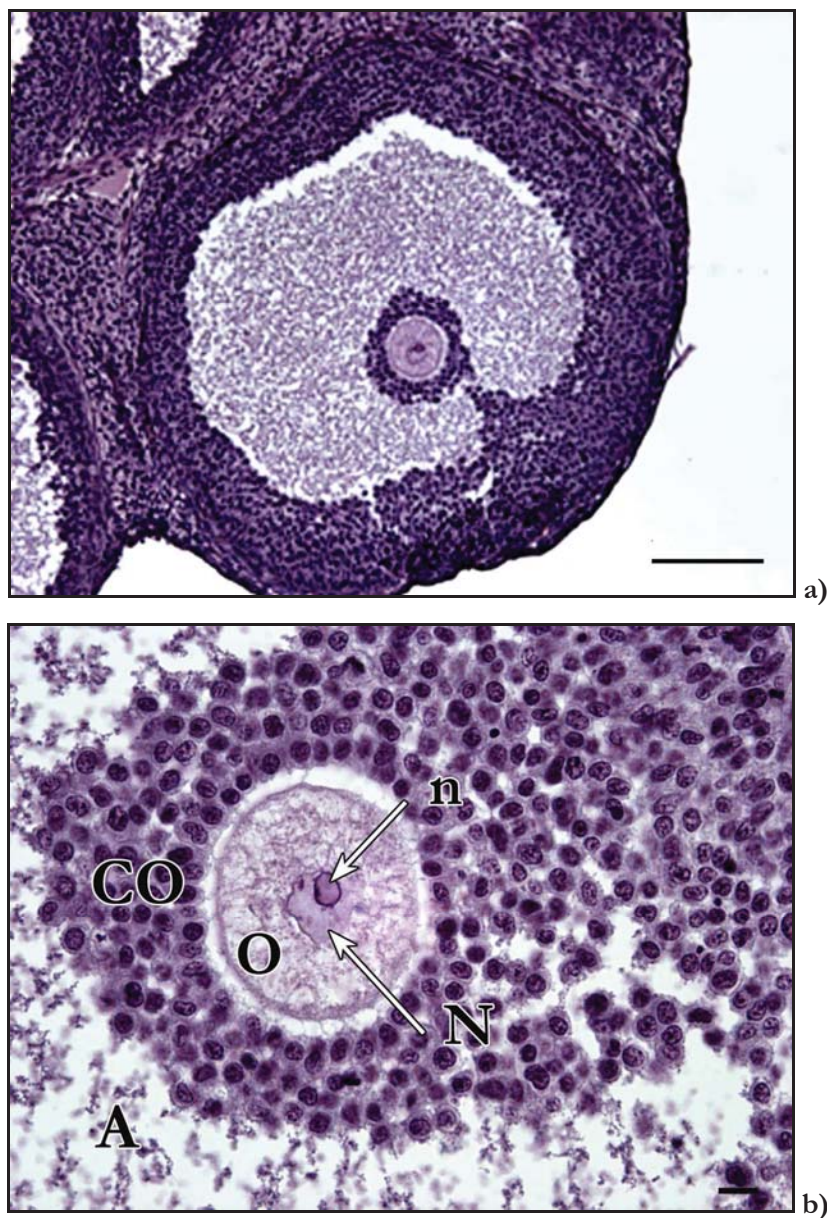
Kod antralnih folikula klase I i II oocita još uvek zadržava centralni položaj u folikulu (Slika 40 i 41). Međutim, daljim rastom antralne šupljine i nagomilavanjem folikularne tečnosti, oocita biva potisnuta i zauzima ekcentričan položaj (Slika 42 i 43 a). Deo granuloza ćelija neposredno uz oocitu se sada naziva *cumulus oophorus* (Slika 43 b).



**Slika 41.** Deo jajnika kontrolne peripubertalne ženke pacova. II – veliki folikul klase II, Vc – višeslojni folikul klase c; bar 20  $\mu\text{m}$ .



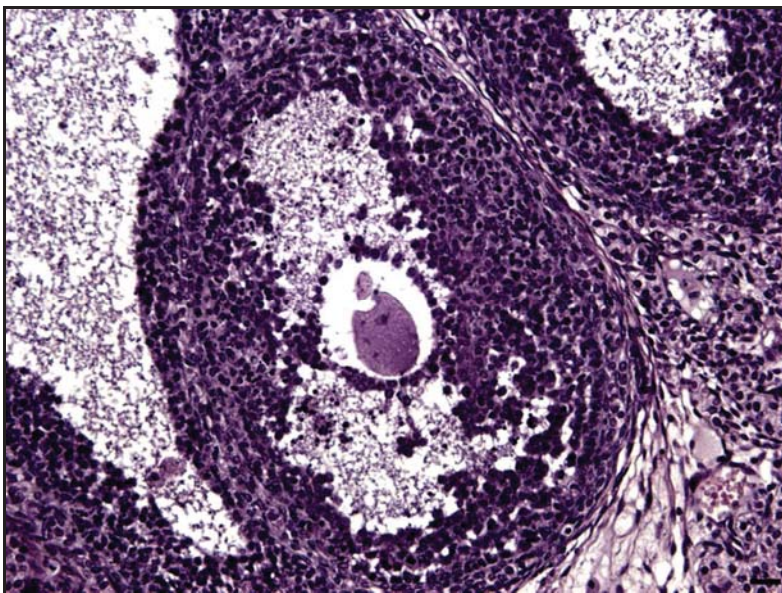
**Slika 42.** Deo jajnika kontrolne peripubertalne ženke pacova. IV – veliki folikul klase IV, Vd – višeslojni folikul klase d; bar 200  $\mu\text{m}$ .



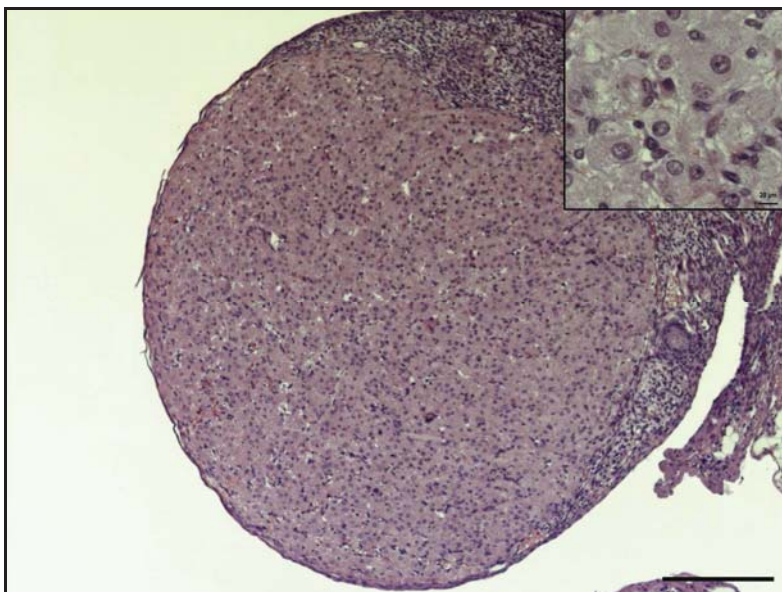
**Slika 43.** a) Veliki preovulatorni folikul (klasa V) u jajniku kontrolne ženke stare 38 dana, b) oocita u preovulatornom folikulu, O – oocita, N – nukleus oocite, n – nukleolus oocite, CO – cumulus oophorus, A – antrum; a) bar 200  $\mu\text{m}$ , b) bar 20  $\mu\text{m}$ .

Atretične promene prisutne su u folikulima u svim fazama folikulogeneze. Najzastupljeniji vid atrezije kod malih folikula je propadanjem granulosa sloja u kome se uočavaju brojne piknotične ćelije (Slika 44). Veliki folikuli propadaju prvo degeneracijom granulosa sloja, a zatim u zadnjim stadijumima atrezije, proces propadanja zahvata i oocitu. Na slici 44 prikazan je veliki folikul klase I kod koga uočavamo veliki broj piknotičnih

granuloza ćelija, kroz ceo granuloza sloj, i početak propadanja oocite, odnosno njena segmentacija. Sloj granuloza ćelija se još uvek nalazi oko degenerisane oocite.



**Slika 44.** Atretičan veliki folikul klase I u jajniku kontrolne peripubertalne ženke ; bar 20  $\mu\text{m}$ .



**Slika 45.** Mlado žuto telo u korteksu jajnika kontrolne peripubertalne ženke; bar 200  $\mu\text{m}$ . Detalj – steroidogene ćelije u mladom žutom telu; bar 20  $\mu\text{m}$ .

U jajniku kontrolnih ženki pacova starih 38 dana prisutna su i mlada žuta tela (*Corpus Luteum*). Po jajniku prosečno ima po 4 mlada žuta tela, koja nastaju nakon ovulacije u tekućem estrusnom ciklusu. Žuto telo obrazuju steroidogene ćelije poreklom od granuloza i teka ćelija ovuliranog folikula, koje formiraju parenhim žutog tela. Pored

parenhima, u mladom žutom telu prisutne su i nesteroidogene ćelije, koje obrazuju stromu (Slika 45).

Intrauterino izlaganje deksametazonu uticalo je na promenu histološke slike jajnika kod ženki pacova starih 38 dana u odnosu na kontrolne životinje. Veličina jajnika ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu je smanjena, čemu u velikoj meri doprinosi odsustvo žutih tela. Broj višeslojnih i antralnih folikula je povećan u odnosu na jajnik kontrolne životinje (Slika 37 a i b).

#### 4.8. Stereološke i morfometrijske karakteristike jajnika

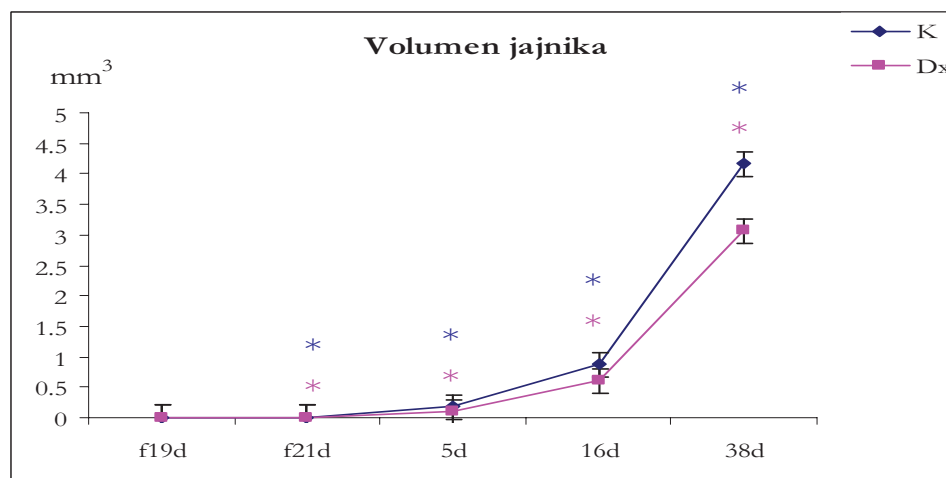
##### 4.8.1. Volumen jajnika kontrolnih ženki pacova od fetalnog do peripubertalnog perioda života

Sa rastom i razvićem ženki pacova povećava se i volumen jajnika. Rezultati su prikazani u Tabeli 5 i Grafikonu 5.

**Tabela 5.** Volumen jajnika kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u fetalnom (19. i 21. dan), neonatalnom (5. dan), infantilnom (16. dan) i peripubertalnom (38. dan) periodu života.

Volumen jajnika (mm <sup>3</sup> )	19. dan (f)	21. dan (f)	5. dan	16. dan	38. dan
K	0.005 ± 0.0001	0.0064 ± 0.0004 *	0.18 ± 0.03 *	0.87 ± 0.07 *	4.20 ± 0.09 *
Dx	0.0035 ± 0.00011 *	0.0045 ± 0.00035 **	0.09 ± 0.03 **	0.61 ± 0.03 **	3.07 ± 0.28 **

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne i eksperimentalne grupe, \* između kontrolnih grupa, \* između eksperimentalnih grupa.



**Grafikon 5.** Volumen jajnika kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u fetalnom (19. i 21. dan), neonatalnom (5. dan), infantilnom (16. dan) i peripubertalnom (38. dan) periodu života. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolnih grupa, \* između odgovarajućih eksperimentalnih grupa.

Promene u histološkoj organizaciji jajnika koje prate rast i razviće ženki podrazumevaju i jasnu odvojenost folikularnog parenhima (fp) od ovarijalne strome (os) kod infantilnih ženki, i žutih tela (CL) kod peripubertalnih ženki. Mereni su volumeni svake

od navedenih faza u jajniku pojedinačno, a volumen jajnika izražen je kao zbir volumena svake faze prisutne u jajniku ženke određene životne dobi (Tabela 6).

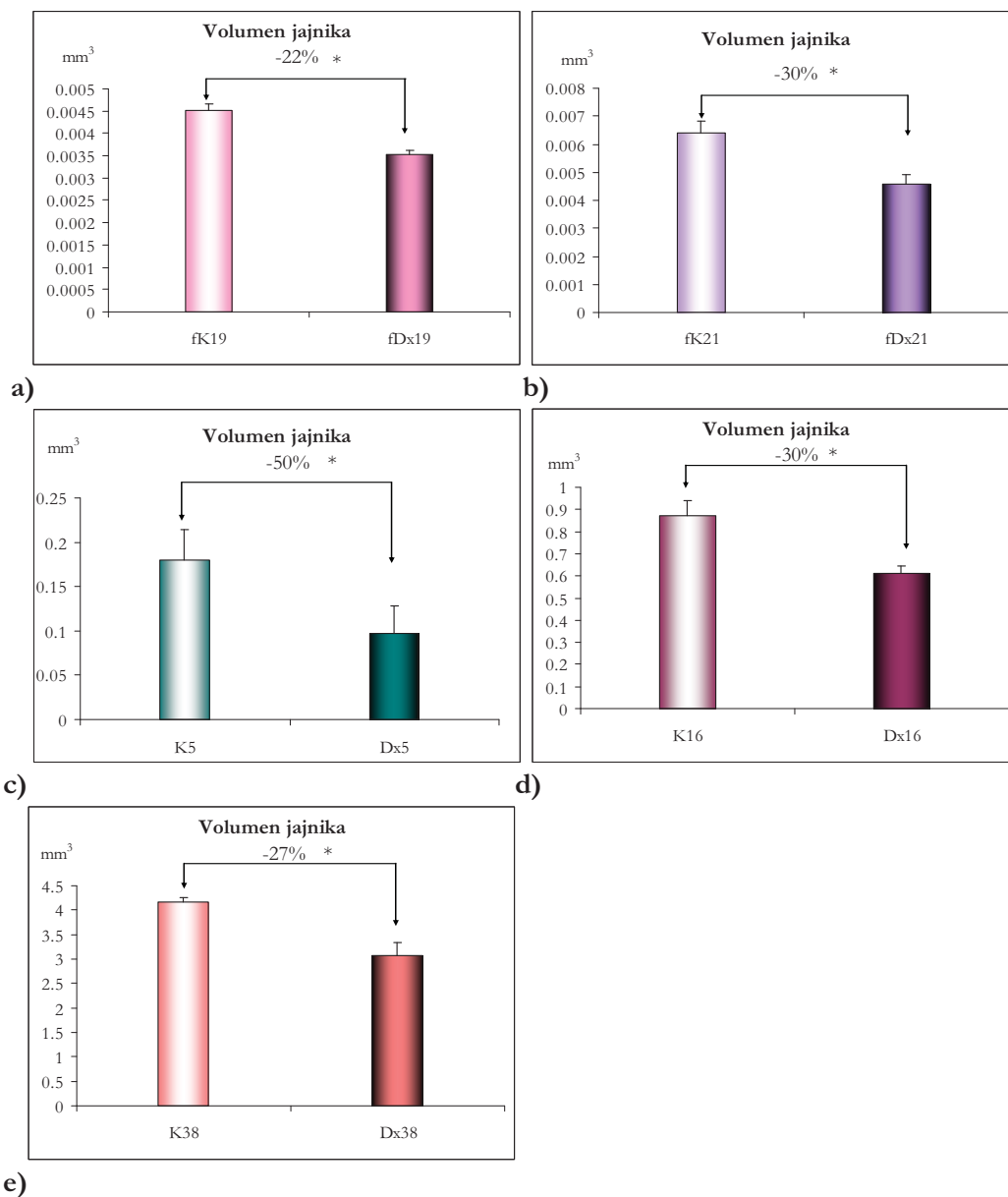
**Tabela 6.** Volumeni folikularnog parenhima, ovarijalne strome i žutih tela kod kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u infantilnom (16. dan) i peripubertalnom (38. dan) periodu života.

mm <sup>3</sup>	16. dan		38. dan		
	Volumen folikularnog parenhima	Volumen ovarijalne strome	Volumen žutih tela	Volumen folikularnog parenhima	Volumen ovarijalne strome
K	0.59 ± 0.05	0.28 ± 0.02	1.85 ± 0.18	1.38 ± 0.17*	0.97 ± 0.05*
Dx	0.39 ± 0.04*	0.22 ± 0.03	/	2.0 ± 0.19*	1.07 ± 0.11

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolnih grupa, \* između kontrolne i eksperimentalne grupe.

#### 4.8.2. Volumen jajnika ženki pacova nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu

Intrauterino izlaganje deksametazonu dovelo je do statistički značajnog smanjenja volumena jajnika kod ženki pacova od fetalnog (19. dan gestacije) do peripubertalnog (38. dan) perioda života u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti (Histogram 15 a-e).

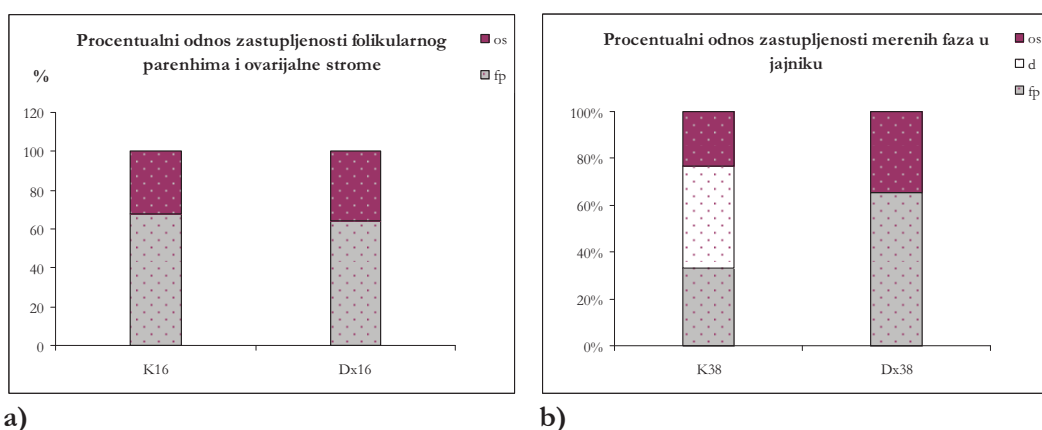


**Histogram 15.** Volumen jajnika (mm<sup>3</sup>) kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u fetalnom (a i b), neonatalnom (c), infantilnom (d) i peripubertalnom periodu života (e). Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.



Kod ženki pacova starih 16 dana koje su intrauterino izložene deksametazonu volumen folikularnog parenhima je smanjen za 34% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrole, dok volumen ovarijalne strome nije statistički značajno promjenjen (Tabela 6). Udeo ovih faza u volumenu jajnika ženki iz eksperimentalne grupe nije promjenjen u odnosu na kontrolni jajnik (Histogram 16 a).

Kod ženki starih 38 dana koje su intrauterino izložene deksametazonu primećeno je odsustvo žutih tela, na račun kojih je volumen folikularnog parenhima povećan za 45% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne ženke, a volumen ovarijalne strome nije značajno promjenjen (Tabela 6, Histogram 16 b).



**Histogram 16.** Procentualni odnosi zastupljenosti folikularnog parenhima, ovarijalne strome i žutih tela u jajnicima kontrolnih (K) i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu (Dx) u infantilnom (16. dan) i peripubertalnom (38. dan) periodu života.

Volumen jajnika kod fetusa izloženih deksametazonu povećao se 1.3 puta ( $p < 0.05$ ) od 19. do 21. fetalnog dana, kao i kod kontrolnih fetusa. Od 21. fetalnog dana do 5. neonatalnog dana volumen jajnika kod ženki iz eksperimentalne grupe povećan je 20 puta ( $p < 0.05$ ), a kod kontrolnih ženki 28 puta ( $p < 0.05$ ). Volumen jajnika od neonatalnog do infantilnog perioda života (od 5. do 16. dana) povećan je 7 puta ( $p < 0.05$ ) kod ženki iz eksperimentalne grupe, a kod kontrolnih ženki 5 puta ( $p < 0.05$ ). Od infantilnog do peripubertalnog perioda života (od 16. do 38. dana) volumen jajnika kod ženki iz eksperimentalne grupe povećao se 5 puta ( $p < 0.05$ ), kao i kod kontrolnih ženki. Volumen jajnika kod ženki pacova iz eksperimentalne grupe od 19. fetalnog dana do 38. dana života ukupno se povećao 877 puta, dok je kod kontrolnih povećan 840 puta. (Tabela 5).

#### 4.8.3. Broj germinativnih ćelija u jajnicima kontrolnih fetusa

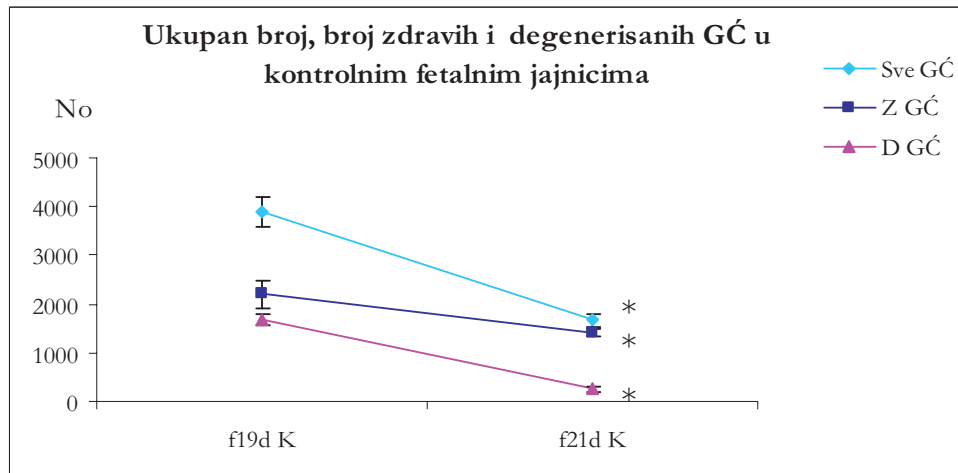
U jajnicima kontrolnih fetusa starih 19 i 21 dan uočavamo prisustvo zdravih (Z) germinativnih ćelija, koje su uglavnom u profazi mejoze. U velikom procentu prisutne su i germinativne ćelije koje se nalaze u određenim fazama degeneracije, tačnije one koje su „zarobljene” u mitozu (D1) i ostale kod kojih se procesi degeneracije javljaju tek nakon otpočinjanja mejoze (D2), (Tabela 7).

**Tabela 7.** Apsolutan broj zdravih i degenerisanih germinativnih ćelija, kao i njihov procentualni udeo u jajnicima kontrolnih (K) i fetusa izloženih deksametazonu (Dx) 19. i 21. dana gestacije.

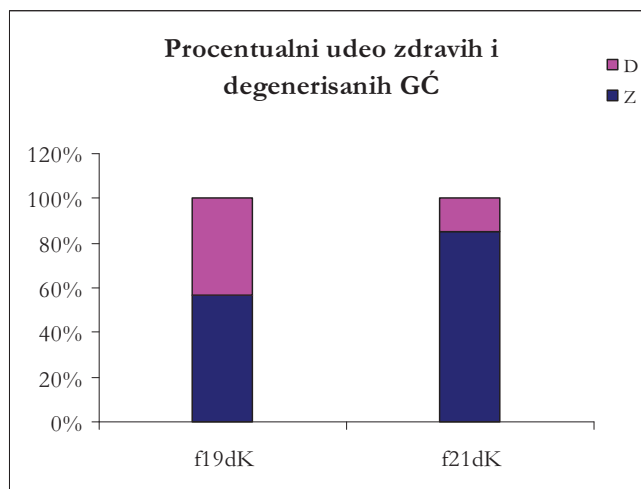
	f K 19	f Dx 19	f K 21	f Dx 21
zdrave GĆ	2209±285	1266±41*	1404±82*	764±36*
<i>degenerisane</i>	zarobljene u mitozu - D1	754±38	1193±41*	143±24*
	ostale - D2	929±104	1404±123*	114±32*
	$\sum$ D	1683±117	2597±83*	257±52*
	ukupan broj GĆ	3892±305	3863±100	1661±126*
	% zdravih GĆ	57%	33%*	85%*
	% degenerisanih GĆ	43%	67%*	15%*

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolnih grupa, \* između kontrolne i odgovarajuće eksperimentalne grupe.

Kod kontrolnih fetusa starih 21 dan ukupan broj germinativnih ćelija u jajniku smanjen je za 57% ( $p < 0.05$ ), u odnosu na isti stereološki parametar kod 19 dana starih kontrolnih fetusa. Broj zdravih germinativnih ćelija smanjen je za 36% ( $p < 0.05$ ), a ukupan broj degenerisanih za 85% ( $p < 0.05$ ). Udeo zdravih GĆ u ukupnom broju povećan je u jajniku 21 dan starih fetusa, dok je udeo degenerisanih smanjen u odnosu na procenat zabeležene kod kontrolnih fetusa starih 19 dana (Grafikon 6, Histogram 17). Navedeni rezultati u potpunosti oslikavaju fiziološke promene koje se dešavaju u fetalnom jajniku između 19. i 21. dana.



**Grafikon 6.** Ukupan broj, broj zdravih i degenerisanih germinativnih ćelija u jajnicima kontrolnih fetusa starih 19 i 21 dan. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između fetalnih kontrolnih grupa.

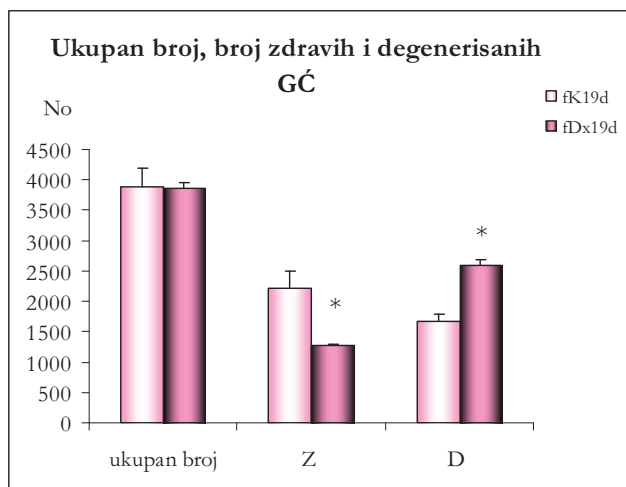


**Histogram 17.** Procentualni udeo zdravih i degenerisanih germinativnih ćelija u jajnicima kontrolnih fetusa starih 19 i 21 dan.

#### 4.8.4. Broj germinativnih ćelija u jajnicima fetusa izloženih deksametazonu

Intrauterino izlaganje deksametazonu izazvalo je promene u broju ispitivanih kategorija oocita kod fetusa iz eksperimentalne grupe starih 19 dana u odnosu na odgovarajuće parametre kod kontrolnih životinja. Ukupan broj oocita nije promenjen u eksperimentalnoj grupi, međutim broj zdravih oocita je smanjen za 43% ( $p < 0.05$ ), a broj svih degenerisanih oocita je povećan za 54% ( $p < 0.05$ ), (Histogram 18), tako da je promenjen i procentualni udeo zdravih i degenerisanih oocita u ukupnom broju oocita u

jajnicima fetusa iz eksperimentalne grupe u odnosu na vrednosti izmerene kod kontrola (Tabela 7, Histogram 20 a).



**Histogram 18.** Ukupan broj oocita i broj zdravih i degenerisanih oocita u jajniku 19 dana starih kontrolnih (K) i fetusa iz eksperimentalne grupe (Dx). Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

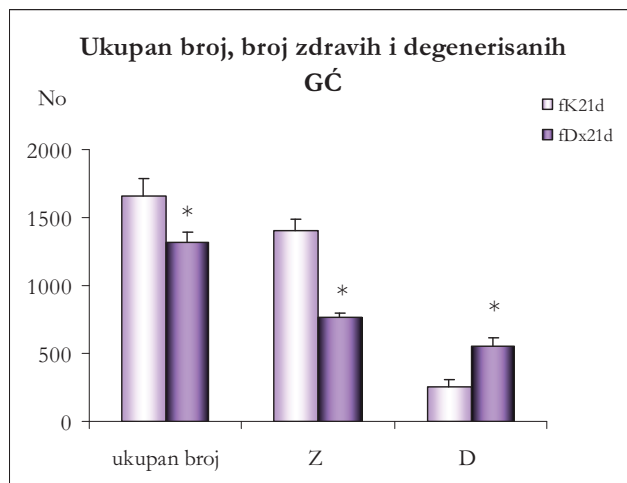
Numerička gustina zdravih germinativnih ćelija (broj zdravih germinativnih ćelija po jedinici volumena jajnika) kod fetusa starih 19 dana je značajno smanjena za 26% ( $p < 0.05$ ) nakon izlaganja deksametazonu. Numerička gustina degenerisanih germinativnih ćelija nakon izlaganja deksametazonu značajno je povećana za 98% ( $p < 0.05$ , Tabela 8).

**Tabela 8.** Numerička gustina zdravih i degenerisanih germinativnih ćelija po volumenu jajnika kontrolnih (K) i fetusa iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 19. dana.

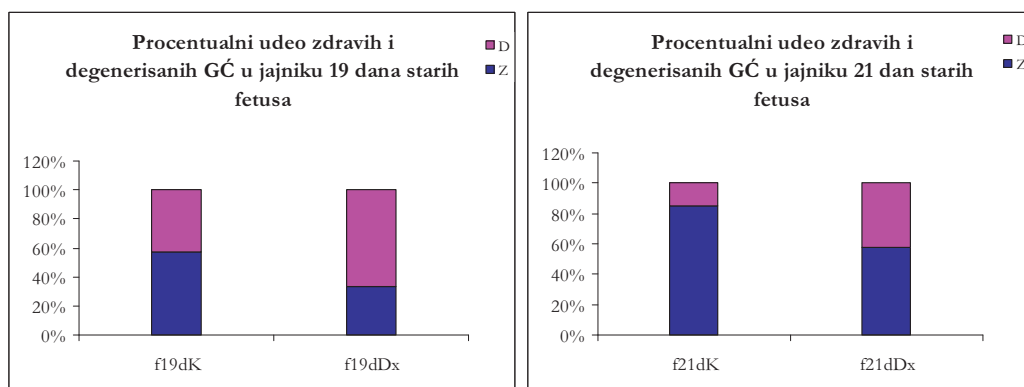
Nv (mm <sup>-3</sup> )	fK19	fDx19
zdrave GĆ	489198±71176	360306±19455 *
degenerisane GĆ	372676±34917	738346±20697 *

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne i eksperimentalne grupe.

Kod fetusa starih 21 dan intrauterino izlaganje deksametazonu smanjilo je ukupan broj oocita u jajniku za 21% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti. Broj zdravih oocita u jajnicima fetusa iz eksperimentalne grupe smanjen je za 46% ( $p < 0.05$ ), a broj svih degenerisanih oocita povećan je 2 puta u odnosu na kontrolne vrednosti (Histogram 19). Procentualni udeo zdravih i degenerisanih oocita u ukupnom broju oocita takođe je promenjen u eksperimentalnoj grupi u korist degenerisanih oocita (Tabela 7, Histogram 20 b).



**Histogram 19.** Ukupan broj oocita i broj zdravih i degenerisanih oocita u jajniku 21 dan starih kontrolnih (K) i fetusa iz eksperimentalne grupe (Dx). Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.



**a) b)**  
**Histogram 20.** Procentualni udeo zdravih i degenerisanih oocita u jajnicima kontrolnih (K) i fetusa iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 19 (a) i 21 (b) dan.

Numerička gustina zdravih germinativnih ćelija kod fetusa starih 21 dan je značajno smanjena za 23% ( $p < 0.05$ ) nakon izlaganja deksametazonu. Numerička gustina degenerisanih germinativnih ćelija nakon izlaganja deksametazonu značajno je povećana 3 puta ( $p < 0.05$ , Tabela 9).

**Tabela 9.** Numerička gustina zdravih i degenerisanih germinativnih ćelija u jajniku kontrolnih (K) i fetusa iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 21 dan.

Nv ( $\text{mm}^{-3}$ )	fK21	fDx21
zdrave GĆ	219690±20766	168513±16377 *
degenerisane GĆ	40367±9253	122434±15371*

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne i eksperimentalne grupe.

#### 4.8.5. Broj folikula u jajnicima kontrolnih i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu u neonatalnom periodu života

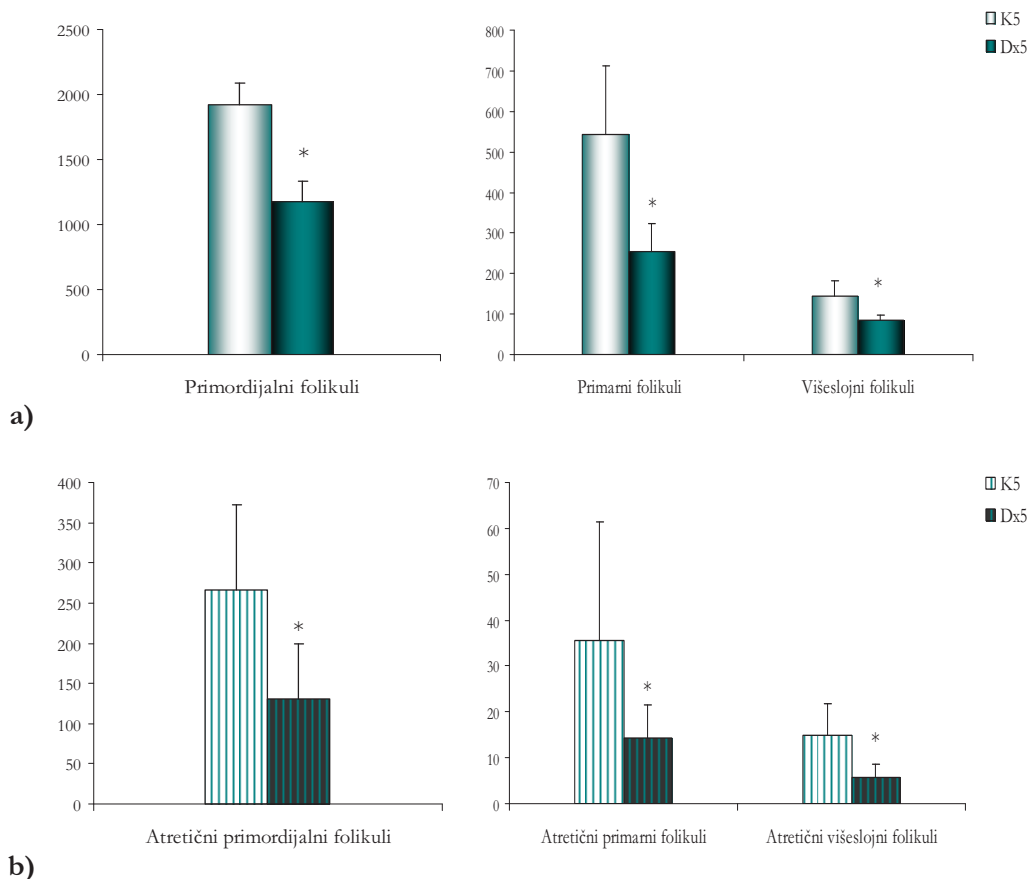
U jajniku 5 dana starih kontrolnih ženki pacova prisutni su zdravi i atretični primordijalni, primarni i višeslojni folikuli (Tabela 10).

**Tabela 10.** Broj primordijalnih, primarnih i višeslojnih zdravih i atretičnih folikula u jajnicima kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 5 dana.

	Primordijalni folikuli	Primarni folikuli	Višeslojni folikuli	Atretični primordijalni folikuli	Atretični primarni folikuli	Atretični višeslojni folikuli
K5	1924 ± 271	544 ± 169	144 ± 38	267 ± 106	36 ± 26	15 ± 7
Dx5	1177 ± 161 *	254 ± 68 *	84 ± 14 *	131 ± 69 *	14 ± 7 *	6 ± 2 *

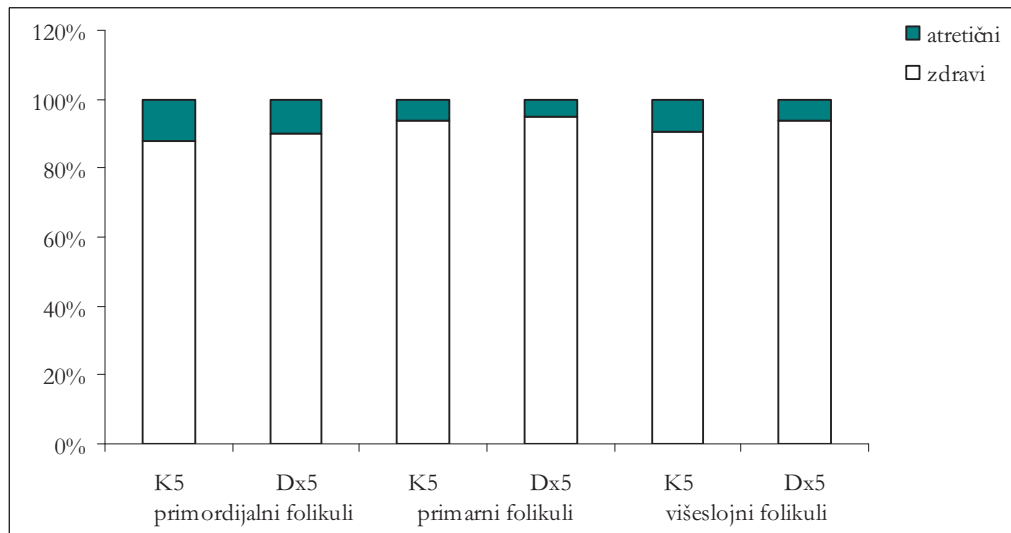
Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kod ženki pacova u neonatalnom periodu (5. dan) koje su intrauterino izložene deksametazonu prisutne su iste klase i zdravih i atretičnih folikula kao i kod ženki iz kontrolne grupe, ali u značajno manjem broju. Tako je kod ženki iz eksperimentalne grupe broj primordijalnih folikula smanjen za 39% ( $p < 0.05$ ), broj primarnih folikula za 53% ( $p < 0.05$ ), a broj višeslojnih folikula takođe se smanjuje za 42% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti (Tabela 10, Histogram 21 a). Među atretičnim folikulima zapaženo je smanjenje u odnosu na kontrolne vrednosti. Broj atretičnih primordijalnih folikula smanjen je za 51% ( $p < 0.05$ ), atretičnih primarnih za 61% ( $p < 0.05$ ), a atretičnih višeslojnih folikula za 60% ( $p < 0.05$ ) (Tabela 10, Histogram 21 b).



**Histogram 21.** Broj zdravih (a) i atretičnih (b) primordijalnih, primarnih i višeslojnih folikula u jajnicima 5 dana starih ženki pacova iz kontrolne (K) i eksperimentalne grupe (Dx). Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

U jajnicima kontrolnih ženki, atretični primordijalni folikuli čine 12%, a u jajnicima ženki iz eksperimentalne grupe 10% svih primordijalnih folikula (zdravi + atretični). U jajnicima kontrolnih ženki atretični primarni i višeslojni folikuli čine 6%, odnosno 9% svih primarnih i višeslojnih folikula. Sličan udeo atretičnih u ukupnom broju ovih klasa folikula uočen je i kod ženki iz eksperimentalne grupe (5%, odnosno 6%, Histogram 22).



**Histogram 22.** Procenat zdravih i atretičnih primordijalnih, primarnih i višeslojnih folikula u jajnicima 5 dana starih ženki iz kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Numerička gustina primordijalnih, primarnih i višeslojnih zdravih i atretičnih folikula u jajnicima ženki starih 5 dana koje su intrauterino izložene deksametazonu nije statistički značajno promjenjena u odnosu na kontrolne životinje (Tabela 11).

**Tabela 11.** Numerička gustina primordijalnih, primarnih i višeslojnih zdravih i atretičnih folikula po volumenu jajnika kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 5 dana.

Nv (mm <sup>-3</sup> )	K5	Dx5
primordijalni folikuli	10806±1568	12656±3368
primarni folikuli	3061±895	2704±827
višeslojni folikuli	704±224	888±173
atretični primordijalni folikuli	1458±504	1419±901
atretični primarni folikuli	127±152	67±84
atretični višeslojni folikuli	88±47	62±27

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.



#### 4.8.6. Broj folikula u jajnicima kontrolnih i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu u infantilnom periodu života

U jajniku 16 dana starih ženki pacova prisutni su primordijalni i primarni folikuli, kao i višeslojni folikuli - klase a (**Va**; <75  $\mu\text{m}$ ), klase b (**Vb**; 76-150  $\mu\text{m}$ ) i klase c (**Vc**; 151-200  $\mu\text{m}$ ). Veliki višeslojni ili mali preantralni folikuli (**Vd**; 200-275  $\mu\text{m}$ ) nisu prisutni u jajnicima infantilnih ženki ni kontrolne ni eksperimentalne grupe (Tabela 12).

**Tabela 12.** Broj primordijalnih i primarnih zdravih i atretičnih folikula (a) i višeslojnih zdravih i atretičnih folikula (b) u jajnicima kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 16 dana.

	Primordijalni folikuli	Primarni folikuli	Atretični primordijalni folikuli	Atretični primarni folikuli
K16	3228 $\pm$ 145	684 $\pm$ 106	61 $\pm$ 11	20 $\pm$ 4
Dx16	1909 $\pm$ 156 *	379 $\pm$ 31 *	43 $\pm$ 11 *	9 $\pm$ 4 *

a)

	Va	Vb	Vc	$\Sigma V$	Atretični višeslojni folikuli
K16	105 $\pm$ 6	223 $\pm$ 7	32 $\pm$ 4	360 $\pm$ 7	24 $\pm$ 3
Dx16	77 $\pm$ 7 *	173 $\pm$ 14 *	22 $\pm$ 4 *	271 $\pm$ 16 *	10 $\pm$ 3 *

b)

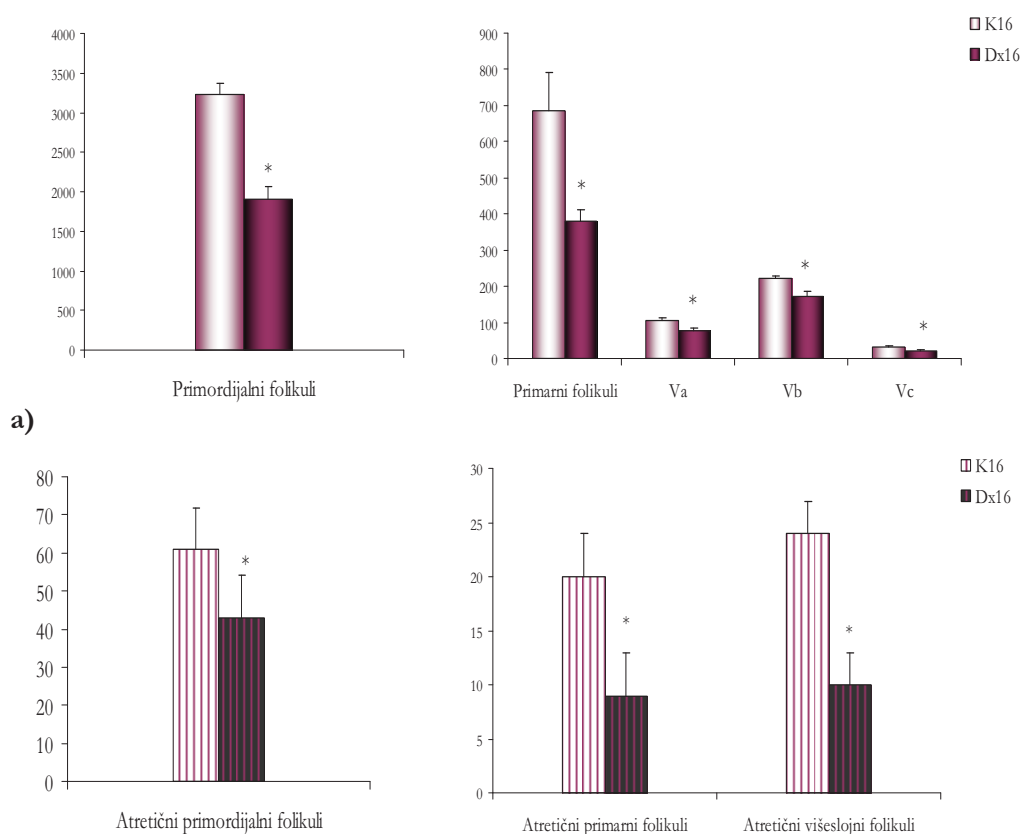
Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kod ženki pacova starih 16 dana, koje su intrauterino izložene deksametazonu prisutne su iste klase i zdravih i atretičnih folikula kao i kod ženki iz kontrolne grupe, ali u značajno manjem broju. Tako je kod ženki iz eksperimentalne grupe broj primordijalnih folikula smanjen za 41% ( $p < 0.05$ ), a broj primarnih za 45% ( $p < 0.05$ ). Broj višeslojnih folikula klase **a** smanjen je za 27% ( $p < 0.05$ ), klase **b** za 23% ( $p < 0.05$ ), a klase **c** za 31% ( $p < 0.05$ ). Ukupan broj višeslojnih folikula smanjen je za 25% ( $p < 0.05$ ). (Tabela 12 a i b, Histogram 23 a).

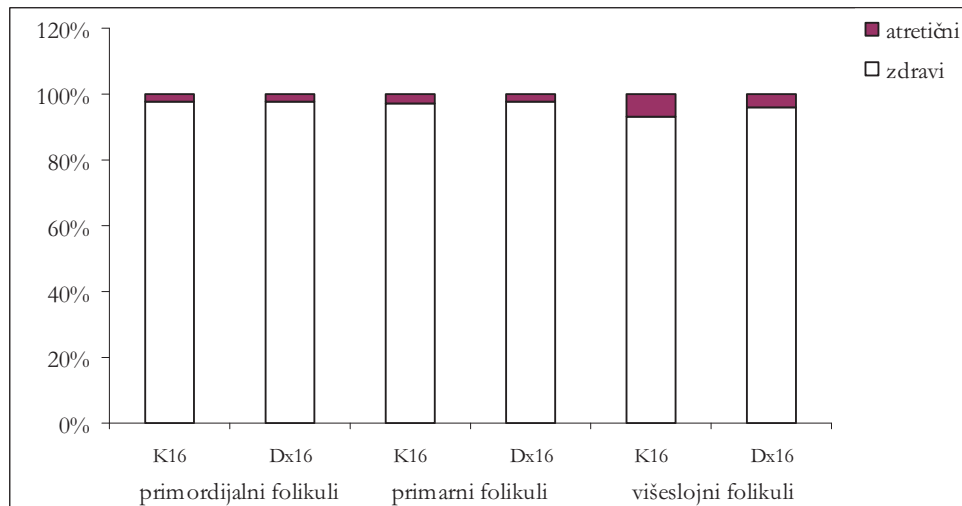
Broj atretičnih folikula, u svim analiziranim klasama takođe je smanjen u odnosu na kontrolne vrednosti. Broj atretičnih primordijalnih folikula smanjen je za 30% ( $p < 0.05$ ), a atretičnih primarnih za 55% ( $p < 0.05$ ). Sve klase višeslojnih atretičnih folikula su sumirane, i

kod ženki iz eksperimentalne grupe, njihov broj je smanjen za 60% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti (Tabela 12 a i b, Histogram 23 b).

U jajnicima i kontrolnih i ženki iz eksperimentalne grupe, atretični primordijalni folikuli čine 2% svih primordijalnih folikula (zdravi + atretični). U jajnicima kontrolnih ženki primarni čine 3% svih primarnih folikula (zdravi + atretični), a višeslojni folikuli čine 7% svih višeslojnih folikula (zdravi + atretični). Sličan udeo atretičnih primarnih i višeslojnih folikula u ukupnom broju ovih klasa folikula (zdravi + atretični) uočen je i kod ženki iz eksperimentalne grupe (2%, odnosno 4%, Histogram 24).



**b)**  
**Histogram 23.** Broj zdravih (a) i atretičnih (b) primordijalnih, primarnih i višeslojnih folikula u jajnicima 16 dana starih ženki pacova iz kontrolne (K) i eksperimentalne grupe (Dx). Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.



**Histogram 24.** Procenat zdravih i atretičnih primordijalnih, primarnih i višeslojnih folikula u jajnicima 16 dana starih ženki iz kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Numerička gustina primordijalnih folikula u jajnicima 16 dana starih ženki pacova koje su intrauterino izložene deksametazonu značajno je smanjena za 16% ( $p < 0.05$ ), a primarnih folikula za 27% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrole. Numerička gustina atretičnih primordijalnih folikula u jajnicima ženki iz eksperimentalne grupe značajno je smanjena za 37% ( $p < 0.05$ ), a atretičnih višeslojnih folikula za 38% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti (Tabela 13 a).

**Tabela 13.** Numerička gustina (po volumenu jajnika) primordijalnih, primarnih i višeslojnih zdravih i atretičnih folikula u jajnicima kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 16 dana.

Nv ( $\text{mm}^{-3}$ ) - po volumenu jajnika	K16	Dx16
primordijalni folikuli	3714±290	3126±147*
primarni folikuli	789±146	622±71*
višeslojni folikuli	413±27	444±9
atretični primordijalni folikuli	55±39	53±39
atretični primarni folikuli	22±5	14±5*
atretični višeslojni folikuli	27±5	17±5*

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kada se broj analiziranih klasa zdravih i atretičnih folikula izrazi po volumenu folikularnog parenhima jajnika infantilnih ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu uočava se da je statistički značajno smanjen u odnosu na kontrolne

vrednosti broj atretičnih primarnih folikula za 33% ( $p < 0.05$ ), i broj atretičnih višeslojnih folikula za 35% ( $p < 0.05$ , Tabela 14).

**Tabela 14.** Numerička gustina primordijalnih, primarnih i višeslojnih zdravih i atretičnih folikula po volumenu folikularnog parenhima u jajnicima kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 16 dana.

Nv ( $\text{mm}^3$ ) - po volumenu folikularnog parenhima	K16	Dx16
primordijalni folikuli	5478±530	4891±438
primarni folikuli	1165±230	980±199
višeslojni folikuli	609±47	695±67
atretični primordijalni folikuli	81±57	86±68
atretični primarni folikuli	34±8	22±7*
atretični višeslojni folikuli	40±7	26±6*

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

#### 4.8.7. Broj folikula u jajnicima kontrolnih i ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu u peripubertalnom periodu života

U kori jajnika kontrolnih ženki pacova starih 38 dana prisutni su zdravi i atretični folikuli u svim fazama folikulogeneze, kao i mlada žuta tela, koja ukazuju na prve ovulacije i otpočinjanje puberteta (Tabela 15 a, b, c).

**Tabela 15.** Broj primordijalnih i primarnih zdravih i atretičnih folikula (a), višeslojnih zdravih i atretičnih folikula (b) i antralnih zdravih i atretičnih folikula u jajnicima kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 38 dana.

	Primordijalni folikuli	Primarni folikuli	Atretični primordijalni folikuli	Atretični primarni folikuli
K38	2926±132	745±21	69±9	20±3.6
Dx38	2161±95 *	489±38 *	64±11	18±4

a)

	Va	Vb	Vc	Vd	ΣV	Atretični višeslojni folikuli
K38	4±1.8	54±4	28±4	19±5	105±12	44±6
Dx38	12±4 *	74±11 *	39±10 *	29±7 *	154±23 *	49±5

b)

	Klasa I	Klasa II	Klasa III	Klasa IV	Klasa V	Atretični antralni folikuli
K38	8 ± 3	9 ± 3	3 ± 1	2 ± 0.9	0.25 ± 0.5	11 ± 4
Dx38	24 ± 10 *	12 ± 9	4 ± 1.5	8 ± 3 *	3 ± 4	28 ± 3 *

c)

Rezultati su prikazani kao  $X \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

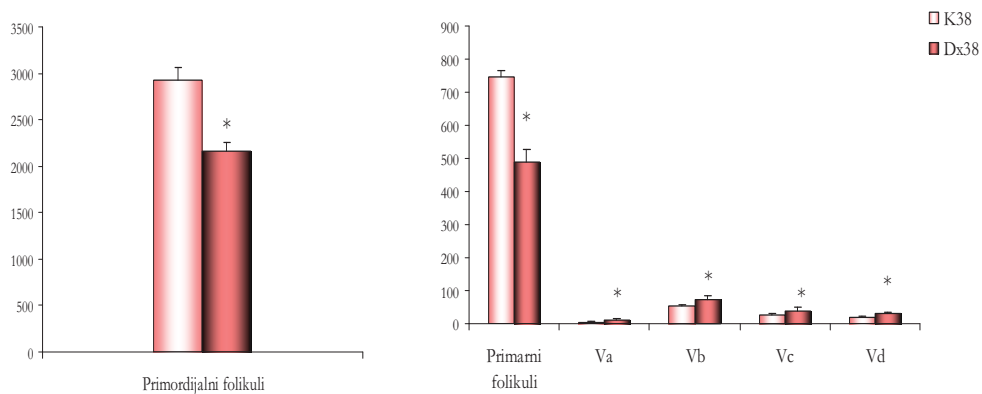
Kod ženki pacova starih 38 dana, koje su intrauterino izložene deksametazonu prisutne su iste klase i zdravih i atretičnih folikula kao i kod ženki iz kontrolne grupe, ali nisu prisutna žuta tela. Odsustvo žutih tela ukazuje na izostanak ovulacija i odloženo nastupanje puberteta u odnosu na kontrolne ženke. Kod ženki iz eksperimentalne grupe broj primordijalnih folikula smanjen za 26% ( $p < 0.05$ ), a broj primarnih za 34% ( $p < 0.05$ ). Međutim, broj svih ostalih klasa folikula (višeslojnih i antralnih) u jajnicima ženki iz eksperimentalne grupe je povećan u odnosu na kontrolne vrednosti. Broj višeslojnih

folikula klase **a** povećan je 3 puta ( $p < 0.05$ ), klase **b** za 37% ( $p < 0.05$ ), klase **c** za 39% ( $p < 0.05$ ), a klase **d** za 53% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti. Ukupan broj višeslojnih folikula povećan je za 47% ( $p < 0.05$ ). Intrauterino izlaganje deksametazonu dovelo je do povećanja broja svih klasa antralnih folikula u odnosu na kontrolne vrednosti. Broj folikula klase I povećan je 3 puta ( $p < 0.05$ ), a klase IV 4 puta ( $p < 0.05$ ). Broj folikula klase II, III i V nije statistički značajno povećan u odnosu na kontrolne vrednosti (Tabela 15 a, b i c, Histogram 24 a i 25 a).

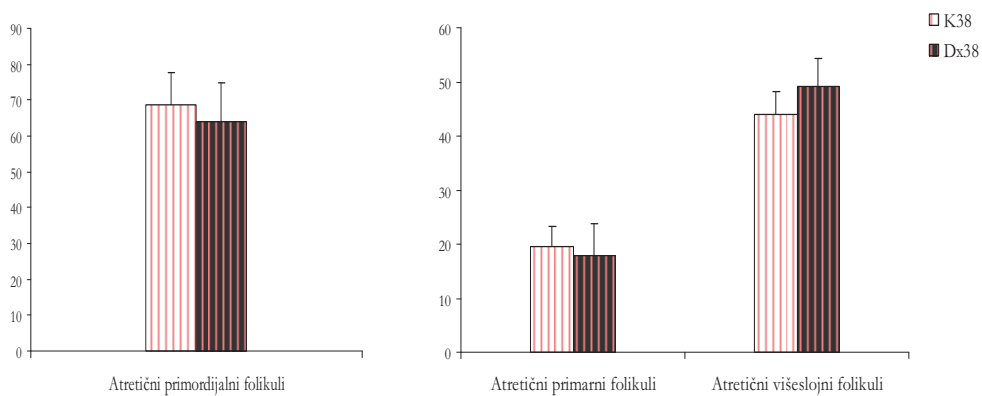
Broj atretičnih primordijalnih, primarnih i višeslojnih folikula nije statistički značajno promenjen u jajnicima ženki iz eksperimentalnih u odnosu na kontrolne vrednosti (Tabela 15 a i b, Histogram 24 b).

Ukupan broj atretičnih folikula svih stadijuma atrezije nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu povećan je 2.5 puta ( $p < 0.05$ ), (Histogram 25 b).

U jajnicima i kontrolnih i ženki iz eksperimentalne grupe, atretični primordijalni folikuli čine 2% svih primordijalnih folikula (zdravi + atretični). U jajnicima kontrolnih ženki atretični primarni folikuli čine 3%, a atretični višeslojni folikuli 30% svih primarnih i višeslojni folikula (zdravi + atretični). Sličan udeo atretičnih u ukupnom broju ovih klasa folikula uočen je i kod ženki iz eksperimentalne grupe (4%, odnosno 24%). Antralni atretični folikuli čine 33% svih velikih folikula (zdravi + atretični) u jajnicima kontrolnih ženki, a 35% u jajnicima ženki iz eksperimentalne grupe (Histogram 26).

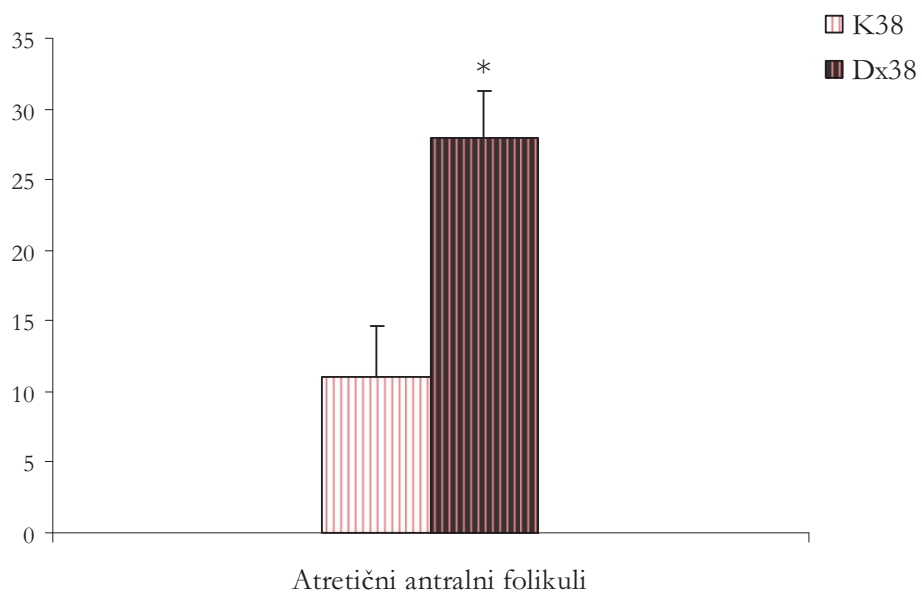
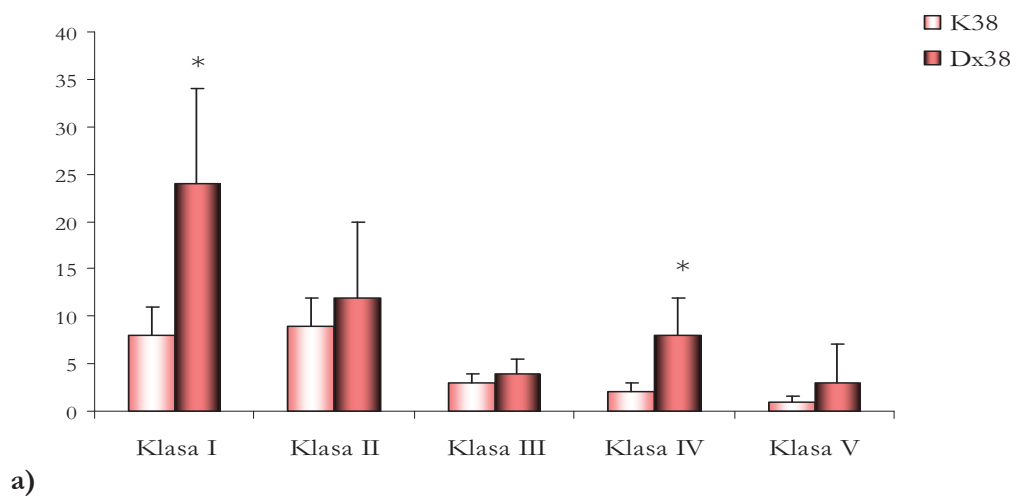


a)



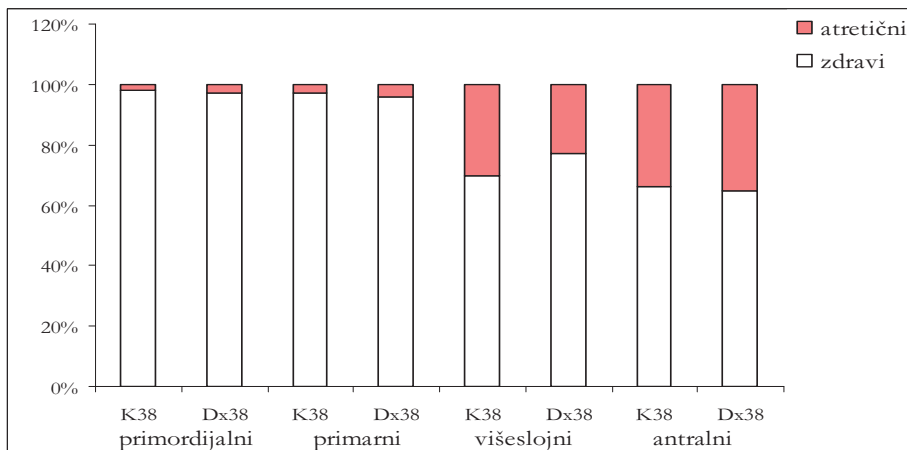
b)

**Histogram 24.** Broj zdravih (a) i atretičnih (b) primordijalnih, primarnih i višeslojnih folikula u jajnicima 38 dana starih ženki pacova iz kontrolne (K) i eksperimentalne grupe (Dx). Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.



**b)**  
**Histogram 25.** Broj zdravih (a) i atretičnih (b) antralnih folikula u jajnicima 38 dana starih ženki pacova iz kontrolne (K) i eksperimentalne grupe (Dx). Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.





**Histogram 26.** Procenat zdravih i atretičnih primordijalnih, primarnih, višeslojnih i antralnih folikula u jajnicima 38 dana starih ženki iz kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

U jajnicima 38 dana starih ženki pacova koje su intrauterino izložene deksametazonu značajno su povećane numeričke gustine zdravih višeslojnih (za 97%,  $p < 0.05$ ) i antralnih folikula (3 puta,  $p < 0.05$ ), u odnosu na kontrolne vrednosti. Numerička gustina atretičnih višeslojnih folikula u jajnicima ženki iz eksperimentalne grupe značajno je povećana za 52% ( $p < 0.05$ ), a atretičnih antralnih folikula 17 puta ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti (Tabela 16).

**Tabela 16.** a) Numerička gustina primordijalnih, primarnih i višeslojnih zdravih i atretičnih folikula po volumenu jajnika kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 38 dana.

Nv po volumenu jajnika ( $\text{mm}^{-3}$ )	K38	Dx38
primordijalni folikuli	704±33	708±66
primarni folikuli	179±5	161±22
višeslojni folikuli	25±3	50±4*
antralni folikuli	5±1	16±4*
atretični primordijalni folikuli	17±2	21±3
atretični primarni folikuli	5±1	6±2
atretični višeslojni folikuli	11±2	16±1*
atretični antralni folikuli	3±1	50±4*

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SD}$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe.

Kada se broj analiziranih klasa zdravih i atretičnih folikula izrazi po volumenu folikularnog parenhima jajnika peripubertalnih ženki intrauterino izloženih deksametazonu uočava se da je u odnosu na kontrolne vrednosti statistički značajno smanjen broj zdravih primordijalnih folikula za 49% ( $p < 0.05$ ) i zdravih primarnih folikula za 55% ( $p < 0.05$ ), a

broj zdravih antralnih folikula je povećan za 58% ( $p < 0.05$ ). Broj atretičnih primordijalnih folikula značajno je smanjen za 37% ( $p < 0.05$ ), atretičnih primarnih za 38% ( $p < 0.05$ ), a atretičnih višeslojnih za 24 % ( $p < 0.05$ ), dok je broj atretičnih antralnih folikula značajno povećan 9.5 puta ( $p < 0.05$ , Tabela 17).

**Tabela 17.** Numerička gustina primordijalnih, primarnih, višeslojnih i antralnih zdravih i atretičnih folikula po volumenu folikularnog parenhima u jajnicima kontrolnih (K) i ženki pacova iz eksperimentalne grupe (Dx) starih 38 dana.

Nv po volumenu folikularnog parenhima (mm <sup>-3</sup> )	K38	Dx38
primordijalni folikuli	2136±202	1083±117*
primarni folikuli	545±68	245±32*
višeslojni folikuli	77±15	76±7
antralni folikuli	16±4	25±6*
atretični primordijalni folikuli	51±12	32±4 *
atretični primarni folikuli	15±4	9±3 *
atretični višeslojni folikuli	32±6	25±1*
atretični antralni folikuli	8±3	76±7*

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ ;  $p < 0.05$ , \* između kontrolne (K) i eksperimentalne (Dx) grupe

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Uticaj deksametazona na telesnu masu

Telesna masa je rezultat kompleksnih fizioloških procesa, koji su određeni specifičnim interakcijama između nutricijenata, hormona i faktora rasta. Završni period graviditeta je karakterističan po intenzivnom rastu fetusa, a samim tim i povećanju njegove telesne mase. Izlaganje sintetičkom glukokortikoidu deksametazonu, hormonu koji utiče na gotovo sva tkiva, organe i organske sisteme, u ovom kritičnom periodu razvoja dovelo je do IUGR, koji se ogleda u drastičnom smanjenju telesne mase fetusa. Ovo smanjenje se održava i postnatalno, sve do peripubertalnog perioda života, odnosno početka reproduktivnog sazrevanja.

Završnu fazu gestacije karakteriše fiziološko povećanje koncentracije glukokortikoida majke i fetusa, i smanjenje aktivnosti placentalnog enzima  $11\beta$ -HSD2. Glukokortikoidi stimulišu, u tom periodu veoma intenzivne, morfološke i funkcionalne promene u fetalnim tkivima, i aktiviraju mnoge biohemijske procese koji u intrauterinom životu nisu od vitalnog značaja, ali su esencijalni za postnatalno preživljavanje (Fowden i sar., 1998). Nakon izlaganja deksametazonu koncentracija glukokortikoida kojima je izložen fetus dodatno se povećava, a samim tim i intenzitet svih onih procesa koje oni regulišu. Smanjenje telesne mase u takvim okolnostima je odraz kataboličkog delovanja ovih steroida (Seckl, 1997). Inhibitoran uticaj glukokortikoida na replikaciju ćelija uopšte, kao i stimulacija procesa programirane ćelijske smrti – apoptoze, (Schmidt i sar., 2004) takođe se odražavaju na smanjenje telesne mase fetusa 24 h pred porođaj. Trodnevni tretman deksametazonom zapravo je onemogućio brz prirast telesne mase fetusa u završnom periodu graviditeta koji je karakterističan za normalan razvoj.

Najznačajnija endokrina determinanta fetalnog rasta je IGF sistem (*eng.* Insulin-like Growth Factor, Gluckman i Harding, 1997), a njegovo funkcionisanje je u uslovima

povećane koncentracije glukokortikoida promenjeno (Fowden., 2003). IGF-1 i IGF-2 imaju ključnu ulogu u regulaciji fetoplacentalnog rasta tokom gestacije. Oni ispoljavaju metaboličke i mitogene efekte, a utiču i na regulaciju procesa diferencijacije u skoro svim fetalnim tkivima, uključujući i placentu (Jones i Clemmons, 1995). Ekspresija *Igf1* i *Igf2* gena dešava se u fetalnim tkivima od najranijih faza fetalnog razvoja, pa sve do finalne faze sazrevanja tkiva i organa neposredno pred rođenje (Fowden i sar., 1998). Oba IGFa su prisutna u fetalnoj cirkulaciji vrlo rano, ali koncentracija IGF-2 u plazmi je 3-10 puta veća, nego koncentracija IGF-1 pri kraju gestacije (Daughaday i sar., 1982). Tkivna koncentracija IGF-2 je mnogo viša u fetalnom nego u neonatalnom i adultnom dobu (Gluckman i Butler, 1983). Glavna uloga IGF-2 je u regulaciji placentalnog rasta i funkcije, što ukazuje na njegov značaj u procesu fetalnog rasta. IGF-1 sintetisan u fibroblastima, ili drugim fetalnim ćelijama mezenhimalnog porekla, iako kod fetusa prisutan u manjoj meri u odnosu na IGF-2, ispoljava brojne mitogene efekte, koji podrazumevaju stimulaciju ćelijskih deoba, rasta i diferencijacije preko specifičnih receptora koji se nalaze na površini ciljnih ćelija (Sara i Hall, 1990). Delujući anabolički, povećava iskorišćavanje glukoze i amino kiselina, a inhibira razlaganje proteina što ga čini esencijalnim faktorom fetalnog rasta (Turkalj i sar., 1992). U krvnom serumu i ostalim vanćelijskim tečnostima ovi faktori rasta vezani su za visoko specifične vezujuće proteine (*eng.* IGF binding proteins- IGFbps), koji kontrolišu i regulišu biološke funkcije IGF-1 i IGF-2, a predominantno se sintetišu u jetri (Straus i sar., 1991). Kontrola IGF sistema tokom fetalnog perioda nezavisna je od hipofiznog hormona rasta (*eng.* Growth Hormone-GH), verovatno zbog nedostatka receptora za GH u većini fetalnih tkiva (Fowden i sar., 1998).

Glukokortikoidi utiču na ekspresiju oba *Igf* gena, mada je njihov uticaj i tkivno i IGF specifičan (Fowden i sar., 1998). Kortizol aplikovan u kasnoj trudnoći, u jetri i sleetnim mišićima fetusa ovaca može i povećati i smanjiti ekspresiju *Igf1* gena, a ekspresija

*Igf2* gena u takvim uslovima je uvek smanjena. Kao posledica uočava se smanjenje koncentracije IGF-1, a sa približavanjem termina porođaja smanjenje koncentracije IGF-2 u plazmi (Gluckman i sar., 1983; Fowden i sar., 1996), što direktno vodi smanjenom protoku nutrijenata i kiseonika, i redukciji fetalnog rasta (Constancia i sar., 2002).

U uslovima povećanog nivoa glukokortikoida dolazi i do promena u koncentraciji IGFBPs, koordinatora i regulatora biološke funkcije faktora rasta. Nakon izlaganja fetusa deksametazonu, fetalna koncentracija IGFBP-1 se povećava, čime se povećava i njegov inhibitoran uticaj na parakrino delovanje IGF-1 na placentalni rast i dostupnost nutrijenata fetusu (Fant i sar., 1986), a to vodi ka IUGR (Wang i Shard, 1992). Smatra se da je IGFBP-1 najosetljiviji indikator kvaliteta fetalne ishrane. Hipoinsulinemija koja se javlja kod smanjenog intrauterinog rasta može biti odgovorna za povećanje koncentracije ovog vezujućeg proteina, a ustanovljena je i negativna korelacija između fetalne koncentracije IGFBP-1 i telesne mase na rođenju (Holt, 2002). Smanjena telesna masa na rođenju povezana je sa smanjenim IGF-1, IGF-2 i IGFBP-3, i povećanim nivoima IGFBP-1 (Boyne i sar., 2003).

Održavanje smanjene telesne mase i u postnatalnom periodu što, pokazuju naši rezultati, može biti posledica prevremene tranzicije sa IGF-2 na IGF-1 produkciju (Li i sar., 1999), kao i programiranja GH-IGF sistema (Holt i sar., 2002). Neonatalni period života inače predstavlja tranziciju sa GH nezavisnog fetalnog rasta na GH zavisan rast po rođenju. Ekspresija *Igf2* kod pacova gotovo da potpuno prestaje u skoro svim tkivima, nakon prestanka dojenja, tako da ga kod adultnih životinja nije moguće detektovati (Singh i sar., 1991). Međutim, relativno niska koncentracija IGF-1 u fetalnoj plazmi i tkivima naglo se povećava u neonatalnom periodu, usled GH stimulisane sinteze IGF-1 u jetri (Li i sar., 1999). IGF-1 ima anaboličke i metaboličke efekte u mnogim ćelijskim tipovima, delujući preko autokrinih, parakrinih i klasičnih endokrinih mehanizama. U cirkulaciji i vanćelijskom

prostoru, IGF-1 je skoro potpuno vezan (>99%) za IGF-BPs (Holt, 2002). Preokret u dominaciji faktora rasta na rođenju doprinosi uspostavljanju novih regulatornih mehanizama koji omogućavaju kontrolu procesa rasta u novom životnom okruženju (Allan i sar., 2001). Egzogeni kortizol aplikovan u kasnoj trudnoći može da inicira prelazak sa parakrine IGF produkcije *in utero* na produkciju endokrinog IGF-1 faktora u jetri, što je karakteristično za postnatalni život. Prevremen prelazak sa IGF-2 na IGF-1 produkciju ima pozitivne efekte na diferencijaciju tkiva, ako se desi prevremeni porođaj. Ali ako ne dođe do prevremenog porođaja, glukokortikoidima indukovani rani prelazak sa fetalnog na adultni način somatotropne regulacije dovodi do neadekvatnih promena u ćelijskoj proliferaciji i diferencijaciji *in utero* sa nepovoljnim posledicama na rast u fetalnom periodu i kasnije u životu (Fowden, 2003). Smanjena dužina femura i tibije kod infantilnih pacova koji su prenatalno izloženi deksametazonu može biti potvrda navedenoj tezi (Carbone i sar., 2012).

Izlaganje fetusa povećanoj koncentraciji glukokortikoida može dovesti do programiranja GH-IGF sistema kod ljudi. Smanjena telesna masa na rođenju, često se povezuje sa GH i IGF-1 rezistencijom u periodu detinjstva, što rezultira smanjenjem rasta, ali nema podataka o tome da li ovakve promene ostaju i do adultnog doba (Holt i sar., 2002).

Leptin se smatra veoma značajnim hormonskim regulatorom fetoplacentalnog rasta. (Smith i Waddell, 2003). Nivo leptina u fetalnoj plazmi raste sa približavanjem porođaja (Kawai i sar., 1997). Fetalni leptin potiče iz cirkulacije majke, a transplacentalni prolaz ostvaruje se interakcijom leptina sa jednom ili više izoformi leptinskog receptora (Ob-Rs), koji olakšavaju prolaz leptina kroz fiziološke barijere (Kastin i sar., 1999). Transport leptina od majke ka fetusu povećan je oko 10 puta u poslednjoj trećini gestacije i praćen je povećanom ekspresijom Ob-Rs proteina u placenti. U ovom periodu leptin ima

ulogu veoma značajnog faktora fetalnog rasta, u pozitivnoj je korelaciji sa masom fetusa (Hassink i sar., 1997), a svoje efekte ispoljava nezavisno od IGF sistema (Christou i sar., 2001). Leptin promoviše fetalni rast direktno, preko svojih receptora koji su prisutni u brojnim fetalnim tkivima (Matsuda i sar., 1999), ispoljavajući i mitogene (Frank i sar., 2000) i angiogene efekte (Bouloumie i sar., 1998).

Izlaganje deksametazonu u kasnoj gestaciji izaziva smanjen transplacentalni prolaz leptina od majke ka fetusu (Smith i Waddell, 2003), pri čemu nivo leptina u cirkulaciji majke raste, a u fetalnoj opada. Snižavanje nivoa leptina u plazmi fetusa u ovoj fazi gestacije povezano je sa IUGR (Smith i Waddell, 2002), u prilog čemu idu i naši rezultati.

Telesne mase ženki pacova izloženih deksametazonu tokom fetalnog razvoja smanjene su u odnosu na kontrolne životinje u svim analiziranim postnatalnim periodima. Sa procesom rasta, procenat smanjenja telesne mase kod ženki pacova iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolne ženke sve je manji. Veći prirast telesne mase zabeležen je od neonatalnog do infantilnog i od infantilnog do peripubertalnog perioda, kao i veće ukupno povećanje telesne mase kod ženki iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolne ženke. Ovakav rezultat može biti posledica kompenzatornog (eng. catch-up) rasta (Barker, 2012). Nakon izlaganja fetusa deksametazonu u poslednjoj nedelji gestacije, rođeni su potomci sa smanjenom telesnom masom, koja je kompenzatornim rastom do adultnog doba, izjednačena sa telesnim masama kontrolnih životinja (Welberg i sar., 2001)

Razvijanje fetusa u nepovoljnim uslovima života dovode do IUGR, koji je u direktnoj vezi sa čitavim nizom poremećaja i bolesti koje se ispoljavaju u adultnom dobu (Barker i sar., 1993). Ovakva zapažanja dovela su do definisanja hipoteze o štedljivom fenotipu (eng. thrifty phenotype) po kojoj se smatra da u odgovoru na neadekvatne uslove životne sredine, fetus razvija dve strategije koje mu omogućavaju preživljavanje. Prva podrazumeva favorizovanje rasta određenih organa, kao što je recimo mozak, na račun

drugih, perifernih organa. Druga strategija podrazumeva razvijanje metaboličkih adaptacija, koje obezbeđuju bolju iskorišćenost raspoloživih nutritijenata. Ove adaptacije omogućavaju preživljavanje fetusa, ali i determinišu kvalitet njegovog budućeg života (Hales i Barker, 1992). IUGR je direktna posledica suboptimalnih uslova života u intrauterinoj sredini. Prelazak iz suboptimalnih u optimalne uslove života, zahteva i nove adaptacije mladog organizma, a nosi sa sobom i velike rizike. Kod većine jedinki u takvim uslovima dolazi do intenzivnog postnatalnog rasta, koji se pozitivno odražava na visinu jedinke u adultnom periodu (Karlberg i sar., 1995) i njeno neurološko razvijanje (Lundgren i sar., 2001). Međutim, pored prednosti, kompenzatorni rast se često dovodi u vezu sa povećanim rizikom za razvijanje raznih patoloških stanja kao što su gojaznost, dijabetes tipa 2 i razna koronarna oboljenja (Victora i sar., 2001). Cena kompenzatornog rasta može biti i skraćenje životnog veka (Barker, 2011).



## **5.2. Uticaj deksametazona na hipofizu**

### **5.2.1. Uticaj deksametazona na razvoj hipofize u fetalnom periodu**

Organogeneza hipofize pacova završava se tokom fetalnog perioda. Od formiranja epitelnog i neuralnog primordijuma, koji predstavljaju začetke buduće adenohipofize i neurohipofize i njihovog kontakta koji se dešava 13. dana fetalnog razvoja pacova, do završetka razvoja fetusa i koćenja koje se odvija 22. dana gestacije, svi tipovi ćelija su diferencirani. Tokom perioda fetalnog razvoja pacova dakle, hipofiza se potpuno formira i postaje funkcionalno aktivna. Izlaganje deksametazonu u kritičnom periodu razvoja hipofize izazvalo je promene, koje pokazuju trajan karakter.

U našem eksperimentu izlaganje fetusa deksametazonu od 16. do 18. dana gestacije izazvalo je smanjenje volumena hipofize, kao i apsolutnog broja i volumena gonadotropnih ćelija u fetalnom periodu.

U poslednjoj nedelji gestacije kod pacova, hipofiza, kao i većina organa i organskih sistema se intenzivno razvija, raste, a ćelijske proliferacije, a potom i diferencijacije su na veoma visokom nivou. Povećanju volumena hipofize u kasnom fetalnom i ranom neonatalnom periodu doprinose intenzivne proliferacije već diferenciranih, a mitotski veoma aktivnih ćelija koje sintetišu hormone (Taniguchi i sar., 2001 a, b i c, 2002). U ovom periodu intenzivni su i procesi diferencijacije novih hormon produkujućih ćelija iz prekursorskih, ali je njihov udeo u rastu hipofize znatno manji (Taniguchi, 2002). Izlaganje deksametazonu, koji ima snažno antiproliferativno i apoptotsko delovanje u ovako osetljivom periodu razvoja neminovno vodi smanjenju broja skoro svih tipova hormon produkujućih ćelija hipofize kao što su ACTH i TSH (Manojlović i sar., 2004, 2010) ćelije, a naši rezultati pokazuju i gonadotropnih ćelija, što je u direktnoj vezi sa smanjenjem volumena cele žlezde.

Smanjenje broja FSH i LH ćelija u hipofizama fetusa starih 19 i 21 dan, posledica je supresivnog delovanja deksametazona na mitotsku aktivnost prekursorskih i već diferenciranih gonadotropnih ćelija. U ovako izmenjenim uslovima, i funkcija gonadotropnih ćelija je kompromitovana, na šta ukazuje smanjen ćelijski volumen 24 h nakon izlaganja deksametazonu, koji se do 21. fetalnog dana normalizuje. Međutim, s obzirom da je ukupan broj ćelija značajno smanjen, može se pretpostaviti da je smanjena i funkcionalna aktivnost cele gonadotropne ćelijske mreže.

### **5.2.2. Hipofiza pacova u neonatalnom, infantilnom i peripubertalnom periodu života, nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu**

Smanjenje volumena hipofize izazvano izlaganjem deksametazonu tokom fetalnog razvoja, zadržava se i u postnatalnom životu. Od drugog postnatalnog dana pa do adultnog doba, proliferativni potencijal ćelija hipofize postepeno opada, a broj ćelija koje se dele u hipofizi je na znatno nižem nivou. Stoga rastu hipofize u većoj meri doprinosi povećanje veličine ćelija i razvijanja bogate kapilarne mreže (Carbajo-Perez i Watanabe, 1990), nego povećanje broja ćelija. S obzirom da je intrauterino izlaganje deksametazonu smanjilo ukupnan ćelijski potencijal hipofize, a da su ćelijske deobe u postnatalnom periodu manjeg intenziteta, smanjenje volumena hipofize u fetalnom, zadržava se do peripubertalnog perioda tako da ga možemo smatrati trajnom posledicom.

Analiziranjem rezultata, u svim praćenim uzrasnim dobima uočili smo smanjenje apsolutnog broja gonadotropnih ćelija nakon izlaganja deksametazonu. Ovakav rezultat podrazumeva smanjen odgovor gonadotropne ćelijske populacije na stimulaciju sinteze i sekrecije gonadotropnih hormona, tako da su njihove koncentracije snižene u svim analiziranim postnatalnim periodima života.

Delujući direktno, preko glukokortikoidnog receptora koji je u fetalnoj hipofizi prisutan od 13. fetalnog dana (Kitraki i sar., 1997) deksametazon je izazvao smanjenje broja gonadotropnih ćelija u fetalnom dobu. Takav rezultat dobijen i u svim analiziranim postnatalnim periodima, ukazuje da nije i neće doći do oporavka, s obzirom na to da je proliferativni potencijal gonadotropnih ćelija u postnatalnom životu nizak. Deksametazon je programirao razvoj i funkciju gonadotropnih ćelija i hipofize. Iako je procentualno povećanje merenih stereoloških parametara gonadotropnih ćelija kod ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu veće nego kod kontrola, kontrolne vrednosti nisu dostignute. Tako da u infantilnom periodu života, kada su gonadotropne ćelije najaktivnije, s obzirom da se u tom periodu sintetiše i u plazmi je prisutna najveća količina gonadotropnih hormona u celom životnom ciklusu (Ojeda i Ramirez, 1972; Wilson i Handa, 1997), kod ženki izloženih deksametazonu, broj ćelija je manji, a koncentracija gonadotropnih hormona niža u odnosu na kontrolne vrednosti. To nam govori da i u uslovima kada postoje posebni zahtevi i kada se sva energija koristi za njihovo dostizanje, gonadotropne ćelije i hipofiza nemaju potencijal da adekvatno odgovore.

Smanjen volumen hipofize, kao i broj gonadotropnih ćelija, od fetalnog do peripubertalnog perioda života, nam pokazuju da je funkcija hipofize, odnosno gonadotropnih ćelija umanjena, kao posledica delovanja deksametazona u kritičnom periodu njenog razvoja. Promene u strukturi i funkciji hipofize imaju trajan karakter i u velikoj meri mogu da odrede funkcionisanje čitavog organizma.

### **5.3. Uticaj deksametazona na jajnik**

#### **5.3.1. Uticaj deksametazona na razvoj jajnika u fetalnom periodu**

Poslednja nedelja gestacije smatra se kritičnom i kada je u pitanju razvoj jajnika. U to vreme proliferacije germinativnih ćelija su intenzivne, a od 19. fetalnog dana većina germinativnih ćelija ulazi u mejozu. Paralelno sa procesom ćelijske proliferacije dešava se i propadanje, odnosno degeneracija germinativnih ćelija (Beaumont i Mandl, 1961). Ravnoteža između preživljavanja i smrti germinativnih ćelija u fetalnom jajniku je kritična tačka koja određuje pravilnu oogenezu, razvoj jajnika i obezbeđuje reproduktivni uspeh. Delovanje deksametazona u tom periodu remeti pomenutu ravnotežu u korist ćelijskog propadanja, smanjujući ukupan broj germinativnih ćelija, odnosno folikula, što vodi smanjenju reproduktivnog potencijala ženke. I na nivou jajnika, možemo govoriti o trajnim promenama, koje utiču na kvalitet reproduktivnog života.

Izlaganje fetusa deksametazonu od 16. do 18. fetalnog dana, u periodu kada su mitotske deobe oogonija najintenzivnije (Edson i sar., 2009) vodi smanjenju volumena jajnika, kao i smanjenju broja zdravih, a povećanju broja degenerisanih germinativnih ćelija i 19. i 21. fetalnog dana.

Glukokortikoidni receptor je prisutan u gonadama pacova još od 15. fetalnog dana (Kitraki i sar., 1997), tako da deksametazon može direktno da deluje na germinativne i somatske ćelije fetalnog jajnika. U humanom fetalnom jajniku, deksametazon nije uticao na procese proliferacije oogonija, ali je poremetio fiziološki tok oogeneze izazivajući apoptozu u germinativnim ćelijama (Poulain i sar., 2012). U našim eksperimentalnim uslovima apoptotsko delovanje deksametazon pojačalo je već postojeće fiziološko propadanje germinativnih ćelija i doprineo povećanju ukupnog broja degenerisanih, na račun broja zdravih germinativnih ćelija i 19. i 21. fetalnog dana. Ukupan broj germinativnih ćelija u fetalnom jajniku 19. dana nije promenjen, ali je već 21. dana značajno

smanjen. Imajući u vidu centralnu dogmu reproduktivne biologije, po kojoj je broj germinativnih ćelija na rođenju konačan i predstavlja kompletan reproduktivni potencijal jedinke, smanjenje broja germinativnih ćelija dobijeno u našim eksperimentalnim uslovima neminovno utiče na fertilitet ženki koje su intrauterino izložene deksametazonu (Poulain i sar., 2012).

### **5.3.2. Jajnik ženki pacova u neonatalnom, infantilnom i peripubertalnom periodu života nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu**

Smanjenje broja germinativnih ćelija koje je u fetalnom jajniku izazvao deksametazon, vodi smanjenju broja folikula u jajnicima ženki u postnatalnom periodu života.

U jajniku ženki starih 5 dana od prvobitnih germinativnih cisti formiraju se primordijalni folikuli. Kroz proces folikulogeneze oni dalje rastu do stupnja primarnih, odnosno višeslojnih folikula. Ova faza u folikulogenezi je nezavisna od uticaja gonadotropnih hormona.

Volumen jajnika neonatalnih ženki, intrauterino izloženih deksametazonu je smanjen. Proces folikulogeneze je stigao do iste faze kao i kod kontrolnih životinja, ali je broj folikula svih klasa i zdravih i atretičnih smanjen. Numeričke gustine svih klasa folikula nisu promenjene, što ukazuje da je smanjenje volumena jajnika direktna posledica smanjenja broja folikula. Procenat smanjenja broja u svakoj ispitivanoj klasi folikula nije promenjen, dakle tok folikulogeneze i atrezije u neonatalnom jajniku je ostao isti nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu. Dakle, smanjenje broja germinativnih ćelija, u fetalnim jajnicima, kao posledica izlaganja deksametazonu u najkritičnijem periodu razvoja, vodi smanjenom broja folikula, a samim tim i volumena jajnika u neonatalnom periodu

života, ukazujući na potencijalno trajne posledice prenatalnog izlaganja deksametazonu na reproduktivnu funkciju ženki.

Intrauterino izlaganje deksametazonu izazvalo je smanjenje volumena jajnika, kod ženki pacova starih 16 dana, usled smanjenog volumena folikularnog parenhima. Volumen ovarijalne strome nije promenjen, što znači da je deksametazon u fetalnom periodu u većoj meri uticao na germinativne ćelije, nego na prekursore stromalnih i vaskularnih elemenata jajnika. Broj svih analiziranih klasa folikula izražen po jedinici volumena jajnika je smanjen, a izražen po volumenu folikularnog parenhima nije promenjen. Smanjenje volumena jajnika kod infantilnih ženki pacova nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu direktna je posledica smanjenja volumena folikularnog parenhima, odnosno broja folikula u jajniku, dok tok folikulogeneze i atrezije nije promenjen. Dakle, posledice intrauterinog izlaganja deksametazonu traju i do infantilnog perioda.

U fetalnom, neonatalnom i infantilnom periodu života, govorimo o kvantitativnim promenama na nivou jajnika koje su posledica intrauterinog izlaganja deksametazonu. Međutim, u peripubertalnom periodu života detektovane kvantitativne promene prerastaju u funkcionalna odstupanja u odnosu na kontrole.

Intrauterino izlaganje deksametazonu promenilo je histološku sliku jajnika ženki pacova starih 38 dana. Uočavamo folikule u svim fazama folikulogeneze kao i u jajnicima kontrolnih ženki, međutim žuta tela nisu prisutna. Odsustvo žutih tela, kao i činjenica da nije došlo do vaginalnog otvaranja kod peripubertalnih ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu ukazuje na odložene ovulacije i odložen početak puberteta u odnosu na kontrolne životinje. Volumen jajnika je smanjen zbog odsustva žutih tela, iako je volumen folikularnog parenhima veći u odnosu na kontrole. Ovakav rezultat je direktna posledica odsustva ovulacija, tako da se broj zdravih i atretičnih višeslojnih i antralnih folikula nije menjao. Broj zdravih i atretičnih primordijalnih i primarnih folikula je smanjen, što je i dalje

posledica smanjenog broja germinativnih ćelija u fetalnom jajniku izazvana delovanjem deksametazona.

Odlaganje puberteta je posledica direktnog delovanja deksametazona na hipotalamo-hipofizno-ovarijalni sistem u fetalnom periodu (Smith i Waddell, 2000). GnRH neuroni hipotalamusa se razvijaju i migriraju u periodu fetalnog razvoja (Daikoku i Koide, 1998), a kako deksametazon indukuje neuronalnu apoptozu uticao je na smanjenje njihovog broja, što se zadržava do adultnog doba (Reagan i McEwen, 1997). Naši rezultati nedvosmisleno pokazuju da je nakon intrauterinog izlaganja deksametazonu broj gonadotropnih ćelija u hipofizi, kao i broj germinativnih ćelija, odnosno folikula u jajniku značajno smanjen od fetalnog do peripubertalnog perioda života. Smith i Waddell (2000) ukazuju na smanjenu osetljivost jajnika na LH u peripubertalnom periodu kao posledicu izlaganja fetusa povećanim koncentracijama glukokortikoida. Dakle, delujući na sva tri nivoa deksametazon je uticao na programiranje razvoja i funkcije hipotalamo-hipofizno-ovarijalnog sistema, što je u peripubertalnom periodu rezultiralo odlaganjem vaginalnog otvaranja i prvih ovulacija.

Rezultati savremenih istraživanja dovode u vezu smanjenu telesnu težinu na rođenju sa odloženim početkom puberteta (Iwasa i sar., 2010, 2011). U slučaju kada je smanjena telesna težina na rođenju posledica pothranjenosti majke, do odloženog početka puberteta dolazi zbog izmenjenog razvoja i funkcije hipotalamusnog kisspeptin sistema. Kisspeptin je produkt *Kiss 1* gena (Kotani i sar., 2001) i stimuliše oslobađanje GnRH (Irwing i sar., 2004), tako da je ključni regulator početka puberteta (Funes i sar., 2003). Leptin se smatra pozitivnim regulatorom hipotalamusnog kisspeptin sistema i u njegovom odsustvu kod leptin deficijentnih miševa, smanjen je i nivo *Kiss1* iRNK (Smith i sar., 2006). Kod potomaka pothranjenih majki koji na rođenju imaju smanjenu telesnu težinu, početak puberteta je odložen. *Kiss1* iRNK nivo u peripubertalnom periodu je smanjen, uprkos

povišenom nivou leptina (Iwasa, 2010). Ovakva zapažanja su posledica leptinske rezistencije hipotalamusnog *kisspeptin* sistema, koja se razvija kao posledica intenzivnog “catch up” rasta, koji se kod potomaka pothranjenih majki dešava u neonatalnom periodu (Desai i sar., 2005).

Međutim, kod potomaka čija je smanjenja telesna težina na rođenju posledica intrauterinog izlaganja deksametazonu, odložen početak puberteta javlja se nezavisno od hipotalamusnog sistema (Iwasa i sar., 2011).

Telesna masa, se takođe dovodi u vezu sa početkom puberteta. Povećana telesna masa i veći sadržaj masnog tkiva u telu su značajniji u određivanju početka puberteta, nego starost jedinke. Leptin je faktor koji povezuje telesnu masu i polno sazrevanje (Ahima i sar., 1997). Smanjena telesna masa peripubertalnih ženki intrauterino izloženih deksametazonu može biti praćena sniženim nivoima cirkulišućeg leptina, što doprinosi kašnjenju puberteta.

Pubertet je kompleksan fiziološki proces, regulisan integracijom više endokrinih sistema, kao što su gonadalni, adrenokortikotropni i somatotropni sistem i različitih mehanizama. Odlaganje njegovog početka, može biti posledica promena na nivou bilo kog regulatornog mehanizma, a često je praćeno i ubrzanim reproduktivnim starenjem (Guzman i sar., 2006). Izlaganje većim koncentracijama glukokortikoida od fizioloških tokom fetalnog razvoja, dovodi se u vezu sa čitavim nizom poremećaja u funkcionisanju jednog organizma, koji postaju očigledni tek u adultnom dobu. Naši rezultati ukazuju na kvantitativne i funkcionalne promene hipofizno-ovarijalnog sistema pacova, praćene smanjenim reproduktivnim potencijalom, što je samo jedan od aspekata koji se može odraziti na kvalitet života.



## 6. ZAKLJUČCI

Rezultati našeg istraživanja pokazali su:

- 1) da su volumen hipofize i broj gonadotropnih ćelija hipofize smanjeni u fetalnom periodu neposredno nakon izlaganja deksametazonu. Ovo smanjenje se održalo do peripubertalnog perioda života. Koncentracije gonadotropnih hormona u postnatalnim periodima života kod ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu su smanjene.
- 2) da su volumen jajnika i broj germinativnih ćelija smanjeni u fetalnom periodu života, što je rezultiralo smanjenjem broja folikula u postnatalnom jajniku. Kod ženki pacova intrauterino izloženih deksametazonu uočen je odložen početak puberteta u odnosu na kontrolne ženke.



Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da je izlaganje deksametazonu tokom fetalnog perioda, kritičnog perioda razvoja jednog organizma, uticalo na programiranje razvoja i funkcije hipofizno-ovarijalnog sistema ženki pacova. Funkcionalni potencijal hipofizno-ovarijalnog sistema je smanjen, a sami tim i reproduktivna sposobnost jedinki. Promene su trajne i u velikoj meri mogu kompromitovati fertilitet ženki i odraziti se na kvalitet njenog života. Ovakav rezultat ima veliki značaj i primenu s obzirom da su uslovi koji do njega mogu dovesti deo svakodnevnog života savremene žene i buduće majke.

## 7. LITERATURA

- Ahima R.S., Dushay J., Flier S.N., Prabakaran D., Flier J.S. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest.* 1997; 99(3):391-395.
- Ahmed C.E., Dees W.L., Ojeda S.R. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology.* 1986; 118(4):1682-1689.
- Albamonte M.S., Willis M.A., Albamonte M.I., Jensen F., Espinosa M.B., Vitullo A.D. The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ-cell-specific VASA protein, BCL-2/BAX expression balance and apoptosis. *Hum Reprod.* 2008; 23(8):1895-1901.
- Allan G.J., Flint D.J., Patel K. Insulin-Like Growth Factor Axis During Embryonic Development. *Reproduction.* 2001; 122:31-39.
- Amarant T., Fridkin M., Koch Y. Luteinizing hormone-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in human and bovine milk. *Eur. J. Biochem.* 1982; 127(3):647-650.
- Amsterdam A., Tajima K., Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64(5-6):843-850. Review.
- Andrews W.W., Ojeda S.R. A quantitative analysis of the maturation of steroid negative feedbacks controlling gonadotropin release in the female rat: the infantile-juvenile periods, transition from an androgenic to a predominantly estrogenic control. *Endocrinology.* 1981; 108(4):1313-1320.
- Armstrong D.T., Goff A.K., Dorrington J.H. In: Midgley A.R., Sadler W.A., eds. *Ovarian follicular development and function.* New York: Raven Press 1979:169-182.
- Aubert M.L., Begeot M., Winiger B.P., Morel G., Sizonenko P.C., Dubois P.M. Ontogeny of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) and pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal rats. *Endocrinology.* 1985; 116(4):1565-1576.

- Baram T., Koch Y., Hazum E., Fridkin M. Gonadotropin-releasing hormone in milk. *Science*. 1977; 198(4314):300-302.
- Barker D.J., Sir Richard Doll Lecture. Developmental origins of chronic disease. *Public Health*. 2012; 126(3):185-189.
- Barker D.J. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest*. 1995; 25: 457-463.
- Barker D.J., Hales C.N., Fall C.H., Osmond C., Phipps K., Clark P.M. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*. 1993; 36(1):62-67.
- Barker D.J.P., Kajantie E., Osmond C., Thornburg K.L., Eriksson J.G. How boys grow determines how long they live. *Am J Hum Biol*. 2011; 23(3):412-416.
- Bateman A., Singh A., Kral T., Solomon S. The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr Rev*. 1989; 10(1):92-112. Review.
- Beaumont H.M., Mandl A.M. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1961; 155:557-579.
- Bodwell J.E., Hu L.M., Hu J.M., Ortí E., Munck A. Glucocorticoid receptors: ATP-dependent cycling and hormone-dependent hyperphosphorylation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1993; 47(1-6):31-8. Review.
- Bouloumie A., Drexler H.C., Lafontan M., Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res*. 1998; 83(10):1059-1066.
- Boyne M.S., Thame M., Bennett F.I., Osmond C., Miell J.P., Forrester T.E. The Relationship among Circulating Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I, IGF-Binding Proteins-1 and -2, and Birth Anthropometry: A Prospective Study. *J. clin. endocrinol.metab*. 2003; 88:1687-1691.

- Bronson F.H. Food-restricted, prepubertal, female rats: rapid recovery of luteinizing hormone pulsing with excess food, and full recovery of pubertal development with gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 1986; 118(6):2483-2487.
- Bucholtz D.C., Chiesa A., Pappano W.N., Nagatani S., Tsukamura H., Maeda K.I., Foster D.L. Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb. *Biol. Reprod.* 2000; 62(5):1248-1255.
- Budry L., Lafont C, El Yandouzi T., Chauvet N., Conéjero G., Drouin J., Mollard P. Related pituitary cell lineages develop into interdigitated 3D cell networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(30):12515-12520.
- Burgoyne P.S., Baker T.G. Oocyte depletion in XO mice and their XX sibs from 12 to 200 days post partum. *J Reprod Fertil.* 1981; 61(1):207-212.
- Cannata M.A., Tramezzani J.H. Ultrastructural maturation of the neurohypophysis of the rat. *Acta Anat (Basel)*. 1977; 97(2):213-223.
- Carbajo-Perez E., Watanabe Y.G. Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell Tissue Res.* 1990; 261:333-338.
- Carbajo-Perez E., Motegi M., Watanabe Z.G. Cell proliferation in the anterior pituitary of mice during growth. *Biomed Res.* 1989; 10:275-281.
- Carbone D.L., Zuloaga D.G., Hiroi R., Foradori C.D., Legare M.E., Handa R.J. Prenatal Dexamethasone Exposure Potentiates Diet-Induced Hepatosteatosis and Decreases Plasma IGF-I in a Sex-Specific Fashion. *Endocrinology*. 2012; 153:295-306.
- Cattanach B.M., Iddon C.A., Charlton H.M., Chiappa S.A., Fink G. Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature*. 1977; 269(5626):338-340.
- Chan V., Clayton R.N., Knox G., Catt K.J. Ontogeny of pituitary GnRH receptors in the rat. *Endocrinology*. 1981; 108(6):2086-2092.

- Chatelain A., Dupouy J.P., Dubois M.P. Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, prolactin) in the fetal hypophysis of the rat: influence of the hypothalamus. *Cell. Tissue Res.* 1979; 196(3):409-27.
- Childs G.V. Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes. *Microsc. Res. Tech.* 1997; 39 (2):114-130.
- Childs G.V., Unabia G., Tibolt R., Lloyd J.M. Cytological factors that support nonparallel secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the estrous cycle. *Endocrinology.* 1987; 121(5):1801-1813.
- Christou H., Connors J.M., Ziotopoulou M., Hatzidakis V., Papathanassoglou E., Ringer S.A., Mantzoros C.S. Cord blood leptin and insulin-like growth factor levels are independent predictors of fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(2):935-938.
- Constancia M., Hemberger M., Hughes J., Dean W., Ferguson-Smith A., Fundele R., Stewart F., Kelsey G., Fowden A., Sibley C., Reik W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature.* 2002; 417:945-948.
- Cottrell E.C., Holmes M.C., Livingstone D.E., Kenyon C.J., Seckl J.R. Reconciling the nutritional and glucocorticoid hypotheses of fetal programming. *FASEB J.* 2012; 26(5):1866-1874.
- Craig J., Orisaka M., Wang H., Orisaka S., Thompson W., Zhu C., Kotsuji F., Tsang B.K. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Front Biosci.* 2007; 12:3628-3639. Review.
- Cunningham M.J., Clifton D.K., Steiner R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol. Reprod.* 1999; 60(2):216-222.
- Cushman L.J., Camper S.A. Molecular basis of pituitary dysfunction in mouse and human. *Mamm. Genome.* 2001; 12(7):485-94.

- Cushman L.J., Camper S.A. Molecular basis of pituitary dysfunction in mouse and human. *Mamm. Genome*. 2001; 12(7):485-94.
- Dahlman-Wright K., Almlöf T., McEwan I.J., Gustafsson J.-A., Wright A.P.H. Delineation of a small region within the major transactivation domain of the human glucocorticoid receptor that mediates transactivation of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 79:4260-4264.
- Daikoku S, Koide I. Spatiotemporal appearance of developing LHRH neurons in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1998; 393(1):34-47.
- Dalkin A.C., Bourne G.A., Pieper D.R., Regiani S., Marshall J.C. Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinology*. 1981; 108(5):1658-1664.
- Daughaday W.H., Parker K.A., Borowsky S., Trivedi B., Kapadia M. Measurement of Somatomedin-Related Peptides in Fetal, Neonatal, and Maternal Rat Serum by Insulin-Like Growth Factor (IGF) I Radioimmunoassay, IGF-II Radioreceptor Assay (Rra), and Multiplication-Stimulating Activity Rra after Acid-Ethanol Extraction. *Endocrinology*. 1982; 110:575-581.
- De Felici M, Klinger FG, Farini D, Scaldaferrri ML, Iona S, Lobascio M. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10(2):182-191. Review.
- De Felici M. Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. *Mol Hum Reprod*. 2010; 16(9):632-636. Review.
- De Felici M. Regulation of primordial germ cell development in the mouse. *Int J Dev Biol*. 2000; 44(6):575-580. Review.
- de Lima A.R., Nyengaard J.R., Jorge A.A., Balieiro J.C., Peixoto C., Fioretto E.T., Ambrósio C.E., Miglino M.A, Zatz M., Ribeiro A.A. Muscular dystrophy-related quantitative and chemical changes in adenohypophysis GH-cells in golden retrievers. *Growth Horm IGF Res*. 2007; 17(6):480-491.

- Desai M., Gayle D., Babu J., Ross M.G. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288(1):R91-96.
- Dickman E.D., Thaller C., Smith S.M. Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects. *Development.* 1997; 124:3111-3121.
- Dohler K.D., Wuttke W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology.* 1975; 97(4):898-907.
- Dorph-Petersen K.A., Nyengaard J.R., Gundersen H.J. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc.* 2001; 204(Pt 3):232-246.
- Drouin J., Sun Y.L., Chamberland M., Gauthier Y., De Léan A., Nemer M., Schmidt T.J. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J.* 1993; 12(1):145-156.
- Edson M.A., Nagaraja A.K., Matzuk M.M. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev.* 2009; 30(6):624-712. Review.
- Edwards C.R., Benediktsson R., Lindsay R.S., Seckl J.R. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in determining tissue-specific glucocorticoid effects. *Steroids.* 1996; 61(4):263-269. Review.
- Edwards C.R., Benediktsson R., Lindsay R.S., Seckl J.R. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet.* 1993; 341(8841):355-357.
- Espey L.L., Richards J.S. Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat. *Biol. Reprod.* 2002; 67(6):1662-1670.

- Fant M., Munro H., Moses A.C. An autocrine/paracrine role for insulin-like growth factors in the regulation of human placental growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986; 63(2):499-505.
- Farquhar M.G., Rinehart J.F. Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats. *Endocrinology.* 1954; 54(5):516-41.
- Finn C.A., Booth J.E. The physiological effects of estrogen and progesterone. In: S. Zuckerman, B.J. Weir, eds. *The ovary.* New York, London: Academic Press 1977:151-225.
- Fowden A.L. The Insulin-Like Growth Factors and Feto-Placental Growth. *Placenta.* 2003; 24:803-812.
- Fowden A.L., Forhead A.J. Endocrine Mechanisms of Intrauterine Programming. *Reproduction.* 2004; 127:515-526.
- Fowden A.L., Li J., Forhead A.J. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? *Proc Nutr Soc.* 1998; 7(1):113-122. Review.
- Fowden A.L., Szemere J., Hughes P., Gilmour R.S., Forhead A.J. The effects of cortisol on the growth rate of the sheep fetus during late gestation. *J Endocrinol.* 1996; 151(1):97-105.
- Frank S., Stallmeyer B., Kämpfer H., Kolb N., Pfeilschifter J. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest.* 2000; 106(4):501-509.
- Funes S., Hedrick J.A., Vassileva G., Markowitz L., Abbondanzo S., Golovko A., Yang S., Monsma F.J., Gustafson E.L. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 312(4):1357-1363.
- Ginsburg M., Snow M.H., McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development.* 1990; 110(2):521-528.



- Gleiberman A.S., Fedtsova N.G., Rosenfeld M.G. Tissue interactions in the induction of anterior pituitary: role of the ventral diencephalon, mesenchyme, notochord. *Dev. Biol.* 1999; 213:340-353.
- Gluckman P.D., Butler J.H. Parturition-Related Changes in Insulin-Like Growth Factors-I and -II in the Perinatal Lamb. *J. Endocrinol.* 1983; 99:223-232.
- Gluckman P.D., Harding J.E. The physiology and pathophysiology of intrauterine growth retardation. *Horm Res.* 1997; 48 Suppl 1:11-6. Review.
- Gore A.C., Wu T.J., Rosenberg J.J., Roberts J.L. Gonadotropin-releasing hormone and NMDA receptor gene expression and colocalization change during puberty in female rats. *J. Neurosci.* 1996; 16(17):5281-5289.
- Greenwald G., Roy S.Y. Follicle development and its control. In: E. Knobil, J. Neill eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press 1994:629-724.
- Gundersen H.J. 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.* 1986; 143(Pt 1):3-45.
- Gundersen H.J., Jensen E.B., Kiêu K., Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J Microsc.* 1999; 193(Pt 3):199-211.
- Guraya S.S. Recent advances in the morphology, histochemistry, and biochemistry of the developing mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 1977; 51:49-131. Review.
- Guzmán C., Cabrera R., Cárdenas M., Larrea F., Nathanielsz P.W., Zambrano E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol.* 2006; 572(Pt 1):97-108.
- Hales C.N., Barker D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992; 35(7):595-601. Review.

- Halvorson L.M., Weiss J., Bauer-Dantoin A.C., Jameson J.L. Dynamic regulation of pituitary follistatin messenger ribonucleic acids during the rat estrous cycle. *Endocrinology*. 1994; 134(3):1247-1253.
- Harbuz M.S., Lightman S.L. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol*. 1992; 134(3):327-339. Review.
- Hassink S.G., de Lancey E., Sheslow D.V., Smith-Kirwin S.M., O'Connor D.M., Considine R.V., Opentanova I., Dostal K., Spear M.L., Leef K., Ash M., Spitzer A.R., Funanage V.L. Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics*. 1997; 100(1):E1.
- Herath C.B., Yamashita M., Watanabe G., Jin W., Tangtrongsup S., Kojima A., Groome N.P., Suzuki A.K., Taya K. Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol and dimeric inhibins in the infantile female rat. *Biol. Reprod*. 2001; 65(6): 1623-1633.
- Hiney J.K., Srivastava V., Nyberg C.L., Ojeda S.R., Dees W.L. Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology*. 1996; 137(9):3717-3728.
- Hollenberg S.M., Giguere V., Segui P., Evans R.M. Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell*. 1987; 49(1):39-46.
- Holt R.I. Fetal programming of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13(9):392-397. Review.
- Hori A., Schmidt D., Kuebber S. Immunohistochemical survey of migration of human anterior pituitary cells in developmental, pathological, and clinical aspects: a review. *Microsc Res Tech*. 1999; 46(1):59-68. Review.
- Horvath E., Kovacs K. Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and man. *J. Electron. Microsc. Tech*. 1988; 8(4):401-432.

- Howard C.V., Reed M.G. Unbiased Stereology. Second Edition. Garland Science/Bios scientific publishers, New York 1-277.
- Hsu S.Y., Lai R.J., Finegold M., Hsueh A.J. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. *Endocrinology*. 1996; 137(11):4837-4843.
- Hsueh A.J., Eisenhauer K., Chun S.Y., Hsu S.Y., Billig H. Gonadal cell apoptosis. *Recent. Prog. Horm. Res.* 1996; 51:433-455.
- Huhtaniemi I., Zhang F.P., Rannikko A., Sokka T., Pakarinen P. Ontogeny of endocrine interactions of the rat hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 1996; 7:211-218.
- Imai E., Stromstedt P.E., Quinn P.G., Carlstedt-Duke J, Gustafsson J.A., Granner D.K. Characterization of a complex glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.* 1990; 10(9):4712-4719.
- Ingram D.L. Atresia. In: Zuckerman S.S., Mandl A.M., Eckstein P. eds. *The ovary*. New York: Academic Press 1962: 247-273.
- Irwig M.S., Fraley G.S., Smith J.T., Acohido B.V., Popa S.M., Cunningham M.J, Gottsch M.L., Clifton D.K., Steiner R.A. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*. 2004; 80(4):264-272.
- Iwasa T., Matsuzaki T., Murakami M., Fujisawa S., Kinouchi R., Gereltsetseg G., Kuwahara A., Yasui T., Irahara M. Effects of intrauterine undernutrition on hypothalamic Kiss1 expression and the timing of puberty in female rats. *J Physiol.* 2010; 588(Pt 5):821-829.
- Iwasa T., Matsuzaki T., Murakami M., Kinouchi R., Gereltsetseg G., Yamamoto S., Kuwahara A., Yasui T., Irahara M. Delayed puberty in prenatally glucocorticoid administered female rats occurs independently of the hypothalamic Kiss1-Kiss1r-GnRH system. *Int J Dev Neurosci.* 2011; 29:183-188.

- Jennes L. Prenatal development of gonadotropin-releasing hormone receptors in the rat anterior pituitary. *Endocrinology*. 1990; 126(2):942-947.
- Jennes L. Prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone-containing systems in rat brain. *Brain. Res.* 1989; 482(1):97-108.
- Joels M., de Kloet E.R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol.* 1994 May; 43(1):1-36. Review.
- Johnson J., Bagley J., Skaznik-Wikiel M., Lee H.J., Adams G.B., Niikura Y., Tschudy K.S., Tilly J.C., Cortes M.L., Forkert R., Spitzer T., Iacomini J., Scadden D.T., Tilly J.L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 2005; 122(2):303-315.
- Johnson J., Canning J., Kaneko T., Pru J.K., Tilly J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004; 428(6979):145-150.
- Jones J.I., Clemmons D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995; 16(1):3-34. Review.
- Kagayama M. The follicular cell in the pars distalis of the dog pituitary gland: an electron microscope study. *Endocrinology*. 1965; 77(6):1053-1060.
- Karl J., Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol.* 1998; 203(2):323-333.
- Karlberg J., Albertsson-Wikland K. Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res.* 1995; 38(5):733-739.
- Kastin A.J., Pan W., Maness L.M., Koletsky R.J., Ernsberger P. Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides*. 1999; 20(12):1449-1453.
- Kawai M., Yamaguchi M., Murakami T., Shima K., Murata Y., Kishi K. The placenta is not the main source of leptin production in pregnant rat: gestational profile of leptin in plasma and adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 240(3):798-802.

- Kitraki E., Kittas C., Stylianopoulou F. Glucocorticoid Receptor Gene Expression During Rat Embryogenesis. An in Situ Hybridization Study. *Differentiation*. 1997; 62:21-31.
- Kneitz B., Cohen P.E., Avdievich E., Zhu L., Kane M.F., Hou H.Jr, Kolodner R.D., Kucherlapati R., Pollard J.W., Edelman W. MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev*. 2000; 14(9):1085-1097.
- Kotani M., Detheux M., Vandebogaerde A., Communi D., Vanderwinden J.M., Le Poul E., Brézillon S., Tyldesley R., Suarez-Huerta N., Vandeput F., Blanpain C., Schiffmann S.N., Vassart G., Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*. 2001; 276(37):34631-34636.
- Kurosumi K. Ultrastructural immunocytochemistry of the adenohipophysis in the rat: a review. *J. Electron. Microsc. Tech*. 1991; 19(1):42-56.
- Lamonerie T., Tremblay J.J., Lanctot C., Therrien M., Gauthier Y., Drouin J. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes&Development*. 1996; 10:1284-1295.
- Lamprecht S.A., Kohen F., Ausher J., Zor U., Lindner H.R. Hormonal stimulation of oestradiol-17 beta release from the rat ovary during early postnatal development. *J. Endocrinol*. 1976; 68(02):343-344.
- Lanuza G.M., Groome N.P., Baranao J.L., Campo S. Dimeric inhibin A and B production are differentially regulated by hormones and local factors in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1999; 140(6):2549-2554.
- Lanz R.B., Rusconi S. A conserved carboxy-terminal subdomain is important for ligand interpretation and transactivation by nuclear receptors. *Endocrinology*. 1994; 135(5):2183-2195.

- Lawson K.A., Dunn N.R., Roelen B.A., Zeinstra L.M., Davis A.M., Wright C.V., Korving J.P., Hogan B.L. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 1999; 13(4):424-436.
- Li J, Gilmour R.S., Saunders J.C, Dauncey M.J, Fowden A.L. Activation of the Adult Mode of Ovine Growth Hormone Receptor Gene Expression by Cortisol During Late Fetal Development. *FASEB J.* 1999; 13:545-552.
- Lobascio A.M., Klinger F.G., Scaldaferrri M.L., Farini D., De Felici M. Analysis of programmed cell death in mouse fetal oocytes. *Reproduction.* 2007; 134(2):241-252.
- Lovren M., Sekulić M., Milošević V., Mičić M., Radulović N. Alterations of pituitary immunohistochemical and morphometric parameters in juvenile female rats following estradiol and hCG treatment. *Jugoslov. Med. Biochem.* 1997; 16:83-88.
- Lundgren E.M., Cnattingius S., Jonsson B., Tuvemo T. Intellectual and psychological performance in males born small for gestational age with and without catch-up growth. *Pediatr Res.* 2001; 50(1):91-96.
- MacGregor G.R., Zambrowicz B.P., Soriano P. Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development.* 1995; 121(5):1487-1496.
- MacLusky N.J., Chaptal C., McEwen B.S. The development of estrogen receptor systems in the rat brain and pituitary: postnatal development. *Brain Res* 1979; 178(1):143-160.
- Manojlović-Stojanoski M., Nestorović N., Filipović B., Milosević V. ACTH-producing cells of 21-day-old rat fetuses after maternal dexamethasone exposure. *Acta Histochem.* 2004; 106(3):199-205.
- Manojlović-Stojanoski M., Nestorović N., Ristić N., Trifunović S., Filipović B., Sošić-Jurjević B., Sekulić M. Unbiased stereological estimation of the rat fetal pituitary

volume and of the total number and volume of TSH cells after maternal dexamethasone application. *Microsc Res Tech.* 2010; 73:1077-1085.

Markström E., Svensson E.Ch., Shao R, Svanberg B., Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle differentiation. *Reproduction.* 2002; 123(1):23-30. Review

Matsuda J., Yokota I., Tsuruo Y., Murakami T., Ishimura K., Shima K., Kuroda Y. Development changes in long-form leptin receptor expression and localization in rat brain. *Endocrinology.* 1999; 140(11):5233-5238.

McClellan K.A., Gosden R., Taketo T. Continuous loss of oocytes throughout meiotic prophase in the normal mouse ovary. *Dev Biol.* 2003; 258(2):334-348.

McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 163(1-2):3-9. Review.

Medina C., Nagatani S., Darling T., Bucholtz D., Tsukamura H., Maeda K., Foster D. Glucose availability modulates the timing of the luteinizing hormone surge in the ewe. *J. Neuroendocrinol.* 1998; 10:785–792.

Meijs-Roelofs H.M., Kramer P. 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.* 1979; 81(2):199-208.

Melmed S., Kleinberg D. Anterior pituitary. In: Larsen P.R., Kronenberg H.M., Melmed S., Plonsky K.S., eds. *Williams, Text Book of Endocrinology.* Philadelphia: W.B. Saunders Company 2002:177-279.

Meyer J.S. Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol Rev.* 1985; 65(4):946-1020. Review.

Michael S.D., Kaplan S.B., Macmillan B.T. Peripheral plasma concentrations of LH, FSH, prolactin and GH from birth to puberty in male and female mice. *J. Reprod. Fertil.* 1980; 59(1):217-222.

- Miller P.B., Charleston J.S., Battaglia D.E., Klein N.A., Soules M.R. An accurate, simple method for unbiased determination of primordial follicle number in the primate ovary. *Biol Reprod.* 1997; 56(4):909-915.
- Miller P.B., Charleston J.S., Battaglia D.E., Klein N.A., Soules M.R. Morphometric analysis of primordial follicle number in pigtailed monkey ovaries: symmetry and relationship with age. *Biol Reprod.* 1999; 61(2):553-556.
- Miller W.L. Steroid Hormone Biosynthesis and Actions in the Materno-Feto-Placental Unit. *Clin. perinatol.* 1998; 25:799-817.
- Mitani F., Mukai K., Miyamoto H., Suematsu M., Ishimura Y. Development of Functional Zonation in the Rat Adrenal Cortex. *Endocrinology.* 1999; 140:3342-3353.
- Modi D.N., Sane S., Bhartiya D. Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9(4):219-225.
- Moriarty G.C. Electron microscopic-immunocytochemical studies of rat pituitary gonadotrophs: a sex difference in morphology and cytochemistry of LH cells. *Endocrinology.* 1975; 97(5):1215-1225.
- Morita Y., Tilly J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol.* 1999; 213(1):1-17. Review.
- Munck A., Brinck-Johnsen T. Specific and nonspecific physicochemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells in vitro. *J Biol Chem.* 1968; 243(21):5556-5565.
- Myers M., Britt K.L., Wreford N.G., Ebling F.J., Kerr J.B. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction.* 2004; 127(5):569-580.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997; 88(3):355-365. Review.
- Nakane P.K. Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 1970; 18(1):9-20.



- Nathanielsz P.W. Animal Models That Elucidate Basic Principles of the Developmental Origins of Adult Diseases. *ILAR J.* 2006; 47:73-82.
- Nemeskeri A., Detta A., Clayton R.N. Hypothalamic GnRH and pituitary gonadotroph relationships during rat fetal life. *Exp. Clin. Endocrinol.* 1986; 88(3):275-284.
- Nicholas C.R., Haston K.M., Pera R.A. Intact fetal ovarian cord formation promotes mouse oocyte survival and development. *BMC Dev Biol.* 2010; 10:2.
- Ojeda S.R., Jameson H.E., McCann S.M. Developmental changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the female rat: ovarian-adrenal influence during the infantile period. *Endocrinology.* 1977; 100(2): 440-451.
- Ojeda S.R., Ramirez V.D. Plasma level of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinology.* 1972; 90(2):466-472.
- Ojeda S.R., Urbanski H.E. Puberty in the rat. In: Knobil E, Neill J. eds. *The Physiology of Reproduction*, 2nd Ed. New York: Raven Press 1994:363-409.
- Osman P. Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. *J. Reprod. Fertil.* 1985; 73(1): 261-270.
- Page R.B. The anatomy of the hypothalamo-hypophysial complex. *Physiology of Reproduction*. Second Edition. 1994; Raven Press, Ltd., NY 1527-1619.
- Picard D., Yamamoto K.R. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1987; 6(11):3333-3340.
- Pierce J.G., Parsons T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 1981; 50:465-495.
- Pope C., McNeilly J.R., Coutts S., Millar M., Anderson R.A., McNeilly A.S. Gonadotrope and thyrotrope development in the human and mouse anterior pituitary gland. *Dev Biol.* 2006; 297(1):172-181.

- Poulain M., Frydman N., Duquenne C., N'tumba-Byn T., Benachi A., Habert R., Rouiller-Fabre V., Livera G. Dexamethasone Induces Germ Cell Apoptosis in the Human Fetal Ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012. *In press.*
- Pratt W.B. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 1993; 268(29):21455-21458. Review.
- Purves H.D., Griesbach W.E. The site of follicle stimulating and luteinising hormone production in the rat pituitary. *Endocrinology.* 1954; 65(6):785-793.
- Reagan L.P., McEwen B.S. Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat.* 1997 Aug;13(3):149-67. Review.
- Riccardi C., Cifone M.G., Migliorati G. Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GITR and GILZ, two dexamethasone-induced genes. *Cell Death Differ.* 1999; 6(12):1182-1189. Review.
- Rinehart J.F., Farquhar M.G. Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland. *J. Histochem. Cytochem.* 1953; 1(2):93-113.
- Ristić N., Nestorović N., Manojlović-Stojanoski M., Filipović B., Sosić-Jurjević B., Milosević V., Sekulić M. Maternal dexamethasone treatment reduces ovarian follicle number in neonatal rat offspring. *J Microsc.* 2008; 232(3):549-557.
- Rivier C., Vale W. Inhibin: measurement and role in the immature female rat. *Endocrinology.* 1987; 120(4):1688-1690.
- Roche P.C., Ryan R.J. The LH/CG receptor. In: Luteinizing hormone action and receptors. Ascoli M. ed., Boca Raton: CRC Press 1985:17-56.
- Roesler W.J., Park E.A. Hormone response units: one plus one equals more than two. *Mol Cell Biochem.* 1998; 178(1-2):1-8. Review.
- Roseboom T., de Rooij S., Painter R. The Dutch Famine and Its Long-Term Consequences for Adult Health. *Early hum. dev.* 2006; 82:485-491.

- Ross J.T., Phillips I.D., Owens J.A., McMillen I.C. Cortisol differentially regulate pituitary-adrenal function in the sheep fetus after disconnection of the hypothalamus and pituitary. *J Neuroendocrinol.* 1997; **9**:663-668.
- Ryan R.J. Mechanisms of action of gonadotropins. The gonadotropins: basic science and clinical aspects in females. Serono symposium No 42, London and New York: Academic Press 1982:33-41.
- Saga Y. Mouse germ cell development during embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; **18**(4):337-341. Review.
- Sara V.R., Hall K. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev.* 1990; **70**(3):591-614. Review.
- Sarraj M.A., Drummond A.E. Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. *Reproduction.* 2012; **143**(2):151-163. Review.
- Sasaki F, Nishioka S. Fetal development of the pituitary gland in the beagle. *Anat Rec.* 1998; **251**:143-151.
- Savage J.J., Yaden B.C., Kiratipranon P., Rhodes S.J. Transcriptional control during mammalian anterior pituitary development. *Gene.* 2003; **319**:1-19.
- Schmidt S., Rainer J., Ploner C., Presul E., Riml S., Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 2004; **1**:S45-55. Review.
- Schulze-Bonhage A., Wittkowski W. Age-dependent changes of ultrastructure and thyroid-stimulating hormone immunoreactivity in the pars tuberalis of the rat. *Acta Anat. (Basel).* 1990; **139**(2):134-140.
- Schwanzel-Fukuda M., Pfaff D.W. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature.* 1989; **338**(6211):161-164.
- Seckl J.R. Glucocorticoids, feto-placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. *Steroids.* 1997; **62**(1):89-94. Review.

- Setalo G., Nakane P.K. Functional differentiation of the fetal anterior pituitary cells in the rat. *Endocrinol. Exp.* 1976; 10(3):155-166.
- Shima K., Kitayama S., Nakano R. Gonadotropin binding sites in human ovarian follicles and corpora lutea during the menstrual cycle. *Obstet. Gynecol.* 1987; 69(5):800-806.
- Shupnik M.A. Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol. Reprod.* 1996; 54(2):279-286.
- Simpson I.A., Cushman S.W. Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Annu Rev Biochem.* 1986; 55:1059-1089. Review.
- Singh J.S., Rall L.B., Styne D.M. Insulin-like growth factor I and II gene expression in Balb/C mouse liver during postnatal development. *Biol Neonate.* 1991; 60(1):7-18.
- Sisk C.L., Richardson H.N., Chappell P.E., Levine J.E. In vivo gonadotropin-releasing hormone secretion in female rats during peripubertal development and on proestrus. *Endocrinology.* 2001; 142(7):2929-2936.
- Smith J.T., Acohido B.V., Clifton D.K., Steiner R.A. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol.* 2006; 18(4):298-303.
- Smith J.T., Waddell B.J. Increased fetal glucocorticoid exposure delays puberty onset in postnatal life. *Endocrinology.* 2000; 141(7):2422-2428.
- Smith J.T., Waddell B.J. Leptin distribution and metabolism in the pregnant rat: transplacental leptin passage increases in late gestation but is reduced by excess glucocorticoids. *Endocrinology.* 2003; 44(7):3024-3030.
- Smith J.T., Waddell B.J. Leptin receptor expression in the rat placenta: changes in ob-ra, ob-rb, and ob-re with gestational age and suppression by glucocorticoids. *Biol Reprod.* 2002; 67(4):1204-1210.
- Smith S.S., Ojeda S.R. Maternal modulation of infantile ovarian development and available ovarian luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors via milk LHRH. *Endocrinology.* 1984; 115(5):1973-1983.

- Sokka T., Huhtaniemi I. Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production in the neonatal rat ovary. *J. Endocrinol.* 1990; 127(2):297-303.
- Sprengel R., Braun T., Nikolics K., Segaloff D.L., Seeburg P.H. The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol. Endocrinol.* 1990; 4(4):525-530.
- Sternberger L.A., Hardy P.H. Jr., Cuculis J.J., Meyer H.G. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 1970; 18(5):315-333.
- Straus D.S., Ooi G.T., Orlowski C.C., Rechler M.M Expression of the Genes for Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-Binding Proteins-1 and -2 in Fetal Rat under Conditions of Intrauterine Growth Retardation Caused by Maternal Fasting. *Endocrinology.* 1991; 128:518-525.
- Svalander C. Ultrastructure of the fetal rat adenohypophysis. *Acta Endocrinol* 1974; 76:1-112.
- Tam P.P., Snow M.H. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1981; 64:133-147.
- Taniguchi Y., Kominami R., Yasutaka S., and Kawarai Y. Proliferation and differentiation of pituitary corticotrophs during the fetal and postnatal period: a quantitative immunocytochemical study. *Anat Embryol.* 2000; 201:229-234.
- Taniguchi Y., Kominami R., Yasutaka S., Shinohara H. Mitoses of existing corticotrophs contribute to their proliferation in the rat pituitary during the late fetal period. *Anat Embryol.* 2001 a; 203:89-93.

- Taniguchi Y, Yasutaka S, Kominami R, Shinohara H. Proliferation and differentiation of thyrotrophs in the pars distalis of the rat pituitary gland during the fetal and postnatal period. *Anat Embryol.* 2001 b; 203:249-253.
- Taniguchi Y., Yasutaka S., Kominami R., Shinohara H. Proliferation and differentiation of pituitary somatotrophs and mammotrophs during late fetal and postnatal periods. *Anat Embryol.* 2001c; 204:469-475.
- Taniguchi Y, Yasutaka S, Kominami R, Shinohara H. Proliferation and differentiation of rat anterior pituitary cells. *Anat Embryol.* 2002; 206:1-11. Review.
- Tate S., Suganuma N., Furuhashi M., Ando T., Asada Y., Kondo I., Kikkawa F., Tomoda Y. Direct effects of estradiol and tamoxifen on gene expressions of inhibit alpha- and beta A-subunits in rat granulosa cells in vitro. *Endocr. J.* 1996; 43(6):621-628.
- Tegethoff M., Pryce C., Meinschmidt G. Effects of intrauterine exposure to synthetic glucocorticoids on fetal, newborn, and infant hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in humans: a systematic review. *Endocr Rev.* 2009; 30(7):753-89. Review
- Tilly J.L. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod.* 1996; 1(3):162-172. Review.
- Tilly J.L. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. *Toxicol. Lett.* 1998; 102-103:497-501.
- Tilly J.L. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(11):838-848. Review.
- Treier M., Gleiberman A.S., O'Connell S.M., Szeto D.P., McMahon J.A., McMahon A.P., Rosenfeld M.G. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* 1998; 12:1691-1704.
- Treier M., O'Connell S., Gleiberman A., Price J., Szeto D.P., Burgess R., Chuang P.T., McMahon A.P., Rosenfeld M.G. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development.* 2001; 128:377-386.

- Tsai M.J., O'Malley B.W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63:451-86. Review.
- Turgeon J.L., Kimura Y., Waring D.W., Mellon P.L. Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol. Endocrinol.* 1996; 10(4):439-450.
- Turkalj I., Keller U., Ninnis R., Vosmeer S., Stauffacher W. Effect of increasing doses of recombinant human insulin-like growth factor-I on glucose, lipid, and leucine metabolism in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75(5):1186-1191.
- Urbanski H.F., Urbanski D., Ojeda S.R. An automated system for the study of pulsatile hormone secretion in the immature rat. *Neuroendocrinology.* 1984; 38(5):403-406.
- Urbanski H.F., Ojeda S.R. In vitro simulation of prepubertal changes in pulsatile luteinizing hormone release enhances progesterone and 17 beta-estradiol secretion from immature rat ovaries. *Endocrinology.* 1985; 117(2):638-643.
- Urbanski H.F., Ojeda S.R. Gonadal-independent activation of enhanced afternoon luteinizing hormone release during pubertal development in the female rat. *Endocrinology.* 1987; 121(3):907-913.
- van der Velden V.H. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm.* 1998; 7(4):229-237. Review.
- Victoria C.G., Barros F.C., Horta B.L., Martorell R. Short-term benefits of catch-up growth for small-for-gestational-age infants. *Int J Epidemiol.* 2001; 30(6):1325-1330.
- Waddell B.J., Benediktsson R., Brown R.W., Seckl J.R. Tissue-specific messenger ribonucleic acid expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and the glucocorticoid receptor within rat placenta suggests exquisite local control of glucocorticoid action. *Endocrinology.* 1998; 139(4):1517-1523.
- Wang H.S., Chard T. The role of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in the control of human fetal growth. *J Endocrinol.* 1992; 132(1):11-19. Review.

- Watanabe Y.G., Daikoku S. An immunohistochemical study on the cytogenesis of adenohipophysial cells in fetal rats. *Dev. Biol.* 1979; 68(2):557-567.
- Watanabe Y.G., Haraguchi H. Immunohistochemical study of the cytogenesis of prolactin and growth hormone cells in the anterior pituitary gland of the fetal rat. *Arch. Histol. Cytol.* 1994; 57(2):161-166.
- Weinstock M., Fride E., Hertzberg R. Prenatal Stress Effects on Functional Development of the Offspring. *Prog. brain. res.* 1988; 73:319-331.
- Welberg L.A., Seckl J.R., Holmes M.C. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience.* 2001; 104(1):71-79.
- Welt C.K., Schneyer A.L. Differential regulation of inhibin B and inhibin a by follicle-stimulating hormone and local growth factors in human granulosa cells from small antral follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(1):330-336.
- White S.S., Ojeda S.R. Changes in ovarian luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the female rat. *Endocrinology.* 1981; 109(1):152-161.
- Williams M.T., Davis H.N., McCrea A.E., Hennessy M.B. Stress During Pregnancy Alters the Offspring Hypothalamic, Pituitary, Adrenal, and Testicular Response to Isolation on the Day of Weaning. *Neurotoxicol. teratol.* 1999; 21:653-659.
- Wilson M. Factors determining the onset of puberty. In: Gerall A, Moltz H, Ward I. eds. *Sexual Differentiation.* New York: Plenum Press 1992; 11:275–312.
- Wilson M.E., Handa R.J. Ontogeny of gene expression in the gonadotroph of the developing female rat. *Biol. Reprod.* 1997; 56(2):563-568.
- Wilson M.E., Handa R.J. Activin subunit, follistatin, and activin receptor gene expression in the prepubertal female rat pituitary. *Biol. Reprod.* 1998a; 59(2):278-283.



- Wilson M.E., Handa R.J. Direct actions of gonadal steroid hormones on FSH secretion and expression in the infantile female rat. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998b; 66(1-2): 71-78.
- Wilson M.E., Price R.H. Jr., Handa R.J. Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid expression in the pituitary gland. *Endocrinology* 1998c; 139(12):5151–5156.
- Wreford N.G. Theory and practice of stereological techniques applied to the estimation of cell number and nuclear volume in the testis. *Microsc Res Tech.* 1995; 32(5):423-436. Review
- Ying Y., Liu X.M., Marble A., Lawson K.A., Zhao G.Q. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol.* 2000; 14(7):1053-1063.
- Ying Y, Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol.* 2001; 232(2):484-492.
- Zelevnik A.J., Hillier S.G. The role of gonadotropins in the selection of the preovulatory follicle. *Clin. Obstet. Gynecol.* 1984; 27(4):927-940.
- Zhu X., Gleiberman A.S., Rosenfeld M.G. Molecular physiology of pituitary development: Signaling and transcriptional networks. *Physiol. Rev.* 2007; 87:933-963.

## **Biografija**

### **Opšti podaci:**

Ime i prezime: Nataša M. Ristić (rođ. Negić)  
Datum i mesto rođenja: 15. 10. 1975. godine, Obrenovac

### **Obrazovanje:**

2001. Diplomirani biolog, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

2001-2004. Posle diplomske studije, smer Endokrinologija,  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

2004. Magistar bioloških nauka

### **Zaposlenje:**

2004-2011. Asistent u Odeljenju za citologiju, Institut za biološka  
istraživanja „Siniša Stanković“

2001-2004. Asistent pripravnik u Odeljenju za citologiju, Institut za biološka  
istraživanja „Siniša Stanković“

### **Projekti:**

#### **Nacionalni projekti:**

2001-2005. 1710 – Morfofunkcionalna ispitivanja efekata hormona na  
neuroendokrini sistem tokom životnog ciklusa  
2006-2010. 143007B - Uticaj fitoestrogena, steroidnih i peptidnih hormona na ćelije  
neuroendokrinog sistema  
2011-2014. 173009 - Odgovor neuroendokrinog sistema pacova na odabrane biljne  
ekstrakte, fitoestrogene, steroidne i peptidne hormone

#### **Članstvo u naučnim društvima:**

Srpsko društvo za mikroskopiju

Evropsko društvo za mikroskopiju

#### **Strani jezici:**

Engleski, nemački

## **Bibliografija:**

1. **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*, **30**: 1-9. (M22)

2. **Negić N.**, Nestorović N., Manojlović Stojanoski M., Filipović B., Šošić-Jurjević B., Trifunović S., Milošević V., Sekulić M. (2007): Pregnancy and dexamethasone: Effects on morphometric parameters of gonadotropic cells in rats. *Acta Histochem*, **109**: 185-192. (M23)

3. **Negić N.**, Nestorović N., Manojlović Stojanoski M., Filipović B., Šošić-Jurjević B., Milošević V., Sekulić M. (2006): Multiple dexamethasone treatment affects morphometric parameters of gonadotrophic cells in adult female rats. *Folia Histochem Cytob*, **44**: 87-92.  
(M23)

Eksperimentalni deo ove doktorske teze urađen je u Odeljenju za citologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", u okviru projekta 173009, pod nazivom "Odgovor neuroendokrinog sistema na odabrane biljne ekstrakte, fitoestrogene, steroidne i peptidne hormone" koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.