

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Dragana Ž. Petrović-Kosanović

**HISTOLOŠKE I ULTRASTRUKTURNE
PROMENE HIPOFIZE I NADBUBREŽNIH
ŽLEZDA PACOVA U USLOVIMA
AKUTNOG TOPLOTNOG STRESA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Dragana Ž. Petrović-Kosanović

**HISTOLOGICAL AND
ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE
PITUITARY AND ADRENAL GLANDS OF
RATS UNDER ACUTE HEAT STRESS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2012

Mentor: redovni profesor, dr. Vesna Koko, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

naučni savetnik, dr. Verica Milošević, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja " Siniša Stanković"

viši naučni saradnik, dr. Mirela Budeč, Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja

docent, dr. Maja Čakić Milošević, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo ove disertacije je urađen na Institutu za zoologiju i Centru za Elektronsku mikroskopiju, u okviru projekta 173023, koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

Ovu disertaciju posvećujem svojoj porodici, kojoj dugujem i najveću zahvalnost što sam uspela u izradi iste: Maši, Luki, Vladimiru, Tamari, Dušici, Mihailu, Draganu, Vesni, Stanojki i Živku.

Prof. Vesni Koko i prof. Maji Čakić-Milošević se posebno zahvaljujem na svim komentarima i savetima u nastajanju ove teze.

Dr. Mireli Budeč i dr. Verici Milošević zahvaljujem na korisnim savetima pri izradi ove disertacije.

Histološke i ultrastrukturne promene hipofize i nadbubrežnih žlezda pacova u uslovima akutnog toplotnog stresa

Rezime

Ispitivan je uticaj akutnog toplotnog stresa na histološke, imunohistohemijske, ultrastrukturne, stereološke i biohemijske karakteristike adrenokortikotropnih ćelija hipofize i ćelija nadbubrežnih žlezda pacova kao ciljnih organa hipotalamo-hipofizne-adrenalne osovine u odgovoru na dejstvo stresora. Pacovi mužjaci soja Wistar izlagani su temperaturi od 38°C u komori u trajanju od 60 minuta. Životinje su nakon tretmana žrtvovane dekapitacijom u prepodnevnim časovima, u približno isto vreme, da bi se izbegao uticaj cirkadijalnog ritma na proučavane parametre. Kortikotropne ćelije adenohipofize su analizirane na nivou svetlosne i transmisionne elektronske mikroskopije primenom imunohistohemijskih i stereoloških metoda. U nadbubrežnim žlezdama ispitivane su histološke i ultrastrukturne karakteristike ćelija kore i srži. Kvantitativne odlike nadbubrežnih žlezda određivane su primenom stereoloških i morfometrijskih metoda na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije. Peptidergički neuroni (VIP, SP i NPY) u kori i srži nadbubrežnih žlezda procenjavani su imunohistohemijskim metodama. Za prikazivanje protoka krvi u nadbubrežnim žlezdama korišćena je Noveli histološka metoda bojenja. Ćelije u proliferaciji procenjavane su preko Ki-67 antigena, dok je za detekciju apoptotskih ćelija nadbubrežnih žlezdi primenjeno bojenje propidijum-jodidom. Određivane su i koncentracije adrenokortikotropnog hormona hipofize (ACTH), kao i kortikosterona, aldosterona, adrenalina i noradrenalina nadbubrežnih žlezda pacova u cirkulaciji.

U hipofizi, primenjeni tretman doveo je do povećanog izlučivanja ACTH iz kortikotropnih ćelija. Ovo se na nivou svetlosne mikroskopije manifestovalo smanjenjem broja ćelija imunopozitivnih na ACTH, a na nivou elektronske mikroskopije smanjenjem broja granula u ACTH ćelijama. U skladu sa tim, biohemijski podaci pokazali su da je koncentracija ACTH u cirkulaciji povećana. U krvnim sudovima hipofize prisutna je agregacija krvnih pločica.

U **nadbubrežnim žlezdama** promene su bile izraženije kako na nivou svetlosne tako i na nivou elektronske mikroskopije.

U **ZG** kore nadbubrežnih žlezda došlo je do povećane sinteze i sekrecije aldosterona na šta su ukazali značajno smanjenje broja lipidnih kapljica, uvećanje broja mitohondrija i visok nivo aldosterona u cirkulaciji. Porast koncentracije aldosterona u cirkulaciji predstavlja odgovor organizma na dehidrataciju izazvanu izlaganjem životinja visokoj temperaturi spoljne sredine.

U **ZF** zapaženo je značajno povećanje površine profila i volumena ćelija, posebno citoplazmatične komponente, zajedno sa smanjenjem broja lipidnih kapi, porastom broja mitohondrija, uz značajno povećanje nivoa kortikosterona u krvi. Uvećanje ćelija uključenih u sintezu i sekreciju hormona stresa, kortikosterona, promena relativne zastupljenosti subćelijskih komponenata u pravcu koji ukazuje na veću angažovanost u sintezi hormona, kao i biohemijski podaci o povišenju nivoa kortikosterona u cirkulaciji ukazuju na aktivno učešće ćelija ZF u odgovoru na stres izazvan akutnim izlaganjem pacova povišenoj temperaturi spoljne sredine.

U **ZR** je nađeno izuzetno veliko nagomilavanje lipidnih kapljica što bi ukazivalo na zastoj u sintezi i sekreciji hormona ove zone.

U svim zonama kore nadbubrežnih žlezda, posle akutnog izlaganja toplotnom stresu, nađeni su uvećanje broja apoptotskih ćelija, proliferacija vlakana vezivnog tkiva, smanjenje NPY, VIP i SP imunoreaktivnosti nervnih vlakana i primetna agregacija krvnih pločica u kapilarima. Sve ovo upućuje na zaključak da je akutni toplotni stres, pored toga što je podstakao sintetsku i sekretnu aktivnost parenhimskih ćelija ZG i ZF, imao opšte nepovoljno dejstvo na koru nadbubrežnih žlezda. Agregacija krvnih pločica verovatno je posledica dehidratacije, dok pojava apoptoze i proliferacija vezivnog tkiva mogu biti prethodnice fibrozi parenhima.

U **srži** nadbubrežnih žlezda najveće promene nađene su na adrenalinskim ćelijama čija je površina profila bila značajno smanjena, uz smanjenje citoplazmatičnog i jedarnog dela ćelije. Značajno smanjenje punih granula, uz istovremeno značajno uvećanje druge dve kategorije mobilisanih granula (izmenjenih i praznih) i prisustvo celih adrenalinskih granula u kapilarima ukazuju na snažno izbacivanje adrenalina, što je potvrđeno njegovim

visokim nivoom u cirkulaciji. U noradrenalinskim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda došlo je do preraspodele u zastupljenosti različitih tipova granula, smanjen je broj punih granula, a povećan broj druga dva tipa granula. Koncentracija noradrenalina u sistemske cirkulaciji značajno je uvećana. S obzirom na to da su adrenalin i noradrenalin direktno uključeni u reakciju "bori se ili beži", navedeni podaci upotpunjuju sliku o stresogenom efektu primenjenog eksperimentalnog tretmana.

U različitim ganglijskim, nervnim i kateholaminskim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda, ali i u regionu kore, nađena je smanjena NPY, VIP i SP imunoreaktivnost.

Na osnovu svega navedenog, jasno je da je akutno izlaganje pacova povišenoj temperaturi spoljašnje sredine, u trajanju od 60 minuta bilo dovoljno da se pokrenu mehanizmi uključeni u odgovor na stres, i to na biohemijskom i ćelijskom nivou. Pored povećanja nivoa hormona u cirkulaciji koje može da se detektuje praktično neposredno po otpočinjanju delovanja stresogenog stimulusa, uočljivo je i prilagođavanje fine strukture ćelija koje zahteva više vremena i počiva na složenijim mehanizmima. Pored toga, na osnovu dobijenih rezultata izgleda da su nadbubrežne žlezde i posle ovako kratkotrajnog tretmana usmerene ka kompleksnijim histomorfološkim alteracijama. U okviru toga ne smeju se zanemariti moguće ozbiljne patološke posledice kao što je embolija krvnih sudova nastala usled povećane agregacije krvnih pločica.

Ključne reči: akutni toplotni stres, pacov, hipofiza, nadbubrežne žlezde, histologija, ultrastruktura

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija ćelija i tkiva

UDK broj: 591.8: [591.481.2 + 591.445]: 612.591]: 599.323.45

Histological and ultrastructural changes in the pituitary and adrenal glands of rats under acute heat stress

Summary

The aim of the study was the effect of acute heat stress on the histological, immunohistochemical, ultrastructural, stereological and biochemical characteristics of corticotroph pituitary cells and cells of the adrenal glands of rats as a target organ of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to the effects of stressors. Wistar male rats were exposed to a temperature of 38°C in the chamber for 60 minutes. Animals were sacrificed by decapitation after treatment in the morning, at about the same time, in order to avoid the influence of circadian rhythm on the studied parameters. Corticotroph pituitary cells were analyzed at the level of light and by transmission electron microscopy using immunohistochemical and stereological methods. The adrenal glands were studied by histological and ultrastructural characteristics of the cells of cortex and medulla. Quantitative characteristics of the adrenal glands were determined using stereological and morphometric methods at light and electron microscopy. Peptide neurons (VIP, SP and NPY) in the cortex and medulla of the adrenal glands were assessed by immunohistochemical methods. To show the flow of blood to the adrenal glands a Novelli histological method of staining was used. The cells in proliferation were assessed by Ki-67 antigen, whereas the detection of apoptotic cells of the adrenal gland was enabled by propidium-iodide staining. The concentration of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone, aldosterone, adrenaline and noradrenaline in the rat adrenal gland circulation were determined.

In the pituitary, the applied treatment resulted in increased secretion of ACTH from corticotroph cells. On the level of light microscopy, it was demonstrated by decreased number of immunopositive ACTH cells, and at the level of electron microscopy by reduced number of granules in the ACTH cells. Accordingly, biochemical data showed that the concentration of ACTH in the circulation increased. The blood vessels of the pituitary gland in platelet aggregation were present.

In the adrenal glands changes were evident at both light and electron microscopy level.

In the ZG, there was an increased synthesis and secretion of aldosterone what was showed by significant reduction in the number of lipid droplets, increasing the number of mitochondria and high levels of circulating aldosterone. The increase in concentration of circulating aldosterone is a response to dehydration caused by the exposure of animals to high temperature of the external environment.

In the ZF a significant increase in the surface profile and volume of the cells were observed, particularly in cytoplasmic components, together with reduction in the number of lipid droplets, increasing number of mitochondria, and significant increase in corticosterone levels in the blood at the same time. Enlargement of cells involved in the synthesis and secretion of the stress hormone corticosterone, changing of relative abundance of components in the cells in a direction which indicates a greater involvement in the synthesis of hormones, and biochemical data on the increase in circulating corticosterone levels suggested an active participation of ZF cells in response to stress caused by acute exposure of rats to elevated environmental temperatures.

In the ZR an extremely high accumulation of lipid droplets was found, which would point to a slowdown in the synthesis of hormones and secretion of this zone.

In all zones of adrenal cortex, after acute exposure to the heat stress, the increase in the number of apoptotic cells, proliferation of connective tissue fibers, the reduction of NPY, VIP and SP immunoreactive nerve fibers and the apparent aggregation of platelets in the capillaries were found. All this suggests that the acute heat stress, beside inspiring synthetic activity of parenchyma cells of ZG and ZF, had a general negative effect on the crust of the adrenal glands. Aggregation of platelets is probably the result of dehydration, while the occurrence of apoptosis and proliferation of connective tissue may be the predecessor of parenchymal fibrosis.

In the adrenal medulla the largest changes were found in the adrenaline cells of which the profile surface was significantly reduced with the decrease of cytoplasm and nuclei of cells. A significant reduction of full granules, while significantly increase in the other two categories of mobilized granules (altered and empty) and the presence of whole adrenaline granules in capillaries indicate strong ejection of adrenaline, which was confirmed by its high levels in the circulation. In noradrenaline cells of the adrenal gland there was redistribution in the presence of different types of granules, the decrease of full granules, and the increase of the number of the other two types of granules. The concentration of noradrenaline in the systemic circulation was significantly increased. Given the fact that adrenaline and noradrenaline are directly involved in the reaction of "fight or flight", the above data complete the picture of the applied stress-inducing effect of experimental treatment.

In various ganglionic, neural and catecholamine cells of the adrenal glands, as well as in the region of the cortex, reduced NPY, VIP and SP immunoreactivity were found. Based on the foregoing, it is clear that the acute exposure of rats to elevated environmental temperature for 60 minutes, it was enough to trigger the mechanisms involved in the stress response, both on the biochemical and cellular level. In addition to increased levels of circulating hormones, which can be detected almost immediately after the commencement of stress acting stimuli, adjustment of the fine structure of cells is evident, requiring more time and basing itself on more complex mechanisms. In addition, according to the obtained results it appears that the adrenal glands, even after this acute treatment aim at complex hystomorphologic alterations. In that case, it may not be possible to ignore the serious pathological consequences such as embolism of blood vessels caused by increased platelet aggregation.

Keywords: acute heat stress, rat, pituitary, adrenal glands, histology, ultrastructure

Scientific field: Biology

Special topics: Cell and tissue biology

UDC number: 591.8: [591.481.2 + 591.445]: 612.591]: 599.323.4

Sadržaj

Uvod	1
Sinteza ACTH	6
Nadbubrežne žlezde	8
Kapsula nadbubrežnih žlezda	9
Kora (<i>cortex</i>)	9
Biosinteza i sekrecija kortikosteroida	13
Mehanizam delovanja kortikosteroida	15
Srž (<i>medulla</i>)	15
Biosinteza kateholamina u ćelijama srži	18
Neuropeptidi srži nadbubrežnih žlezda	20
Stres	22
Toplotni stres	23
Cilj istraživanja	29
Materijal i metode	31
Ispitivanja na nivou svetlosne mikroskopije	31
Imunohistohemijska ispitivanja	32
Detekcija i lokalizacija kortikotropnih (ACTH) ćelija hipofize	32
Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija neuropeptida (VIP, NPY i SP) u nadbubrežnim žlezdama	33
Imunohistohemijska detekcija ćelija u proliferaciji	33
Stereološka ispitivanja	34

Ispitivanja na nivou transmisionog elektronskog mikroskopa	36
Biohemijska ispitivanja	37
Pripremanje plazme	37
Pripremanje seruma	37
Merenje koncentracije ACTH	37
Merenje koncentracije kateholamina	38
Merenje koncentracije kortikosterona	38
Merenje koncentracije aldosterona	39
Rezultati	40
Uticaj toplotnog stresa na telesnu masu i temperaturu životinja	40
Uticaj toplotnog stresa na hipofizu pacova	40
Uticaj toplotnog stresa na nivo ACTH u plazmi	41
Imunohistohemijska analiza uticaja toplotnog stresa na hipofizu - detekcija ACTH ćelija	42
Morfometrijska i stereološka analiza uticaja toplotnog stresa na hipofizu	44
Ultrastrukturna analiza uticaja toplotnog stresa na hipofizu	45
Uticaj toplotnog stresa na nadbubrežne žlezde	48
Masa nadbubrežnih žlezda	48
Uticaj toplotnog stresa na nivo hormona nadbubrežnih žlezda u cirkulaciji	49
Histološka analiza kore nadbubrežnih žlezda	50

Imunohistochemijska detekcija peptidergičkih neurona u kori nadbubrežnih žlezda	56
Uticaj toplotnog stresa na proliferativne i apoptotske procese u kori nadbubrežnih žlezda	61
Morfometrijska i stereološka analiza uticaja toplotnog stresa na koru nadbubrežnih žlezda	64
Histološka analiza srži nadbubrežnih žlezda	68
Imunohistochemijska detekcija peptidergičkih neurona u srži nadbubrežnih žlezda	69
Uticaj toplotnog stresa na apoptotske procese u srži nadbubrežnih žlezda	77
Morfometrijska i stereološka analiza uticaja toplotnog stresa na koru nadbubrežnih žlezda	78
Rezultati ultrastrukturnih ispitivanja nadbubrežnih žlezda	79
Kora nadbubrežnih žlezda	79
Stereološka analiza kore nadbubrežnih žlezda na ultrastrukturnom nivou	96
Srž nadbubrežnih žlezda	97
Stereološka analiza srži nadbubrežnih žlezda na ultrastrukturnom nivou	104
Diskusija	106
Analiza uticaja toplotnog stresa na mase i telesne temperature životinja	106
Analiza uticaja toplotnog stresa na hipofizu	107
Analiza uticaja toplotnog stresa na histološke i ultrastrukturne odlike ACTH ćelija	109
Analiza uticaja toplotnog stresa na nadbubrežne žlezde	110

Analiza uticaja toplotnog stresa na mase i relativne mase nadbubrežnih žlezda	110
Analiza dejstva toplotnog stresa na koru nadbubrežnih žlezda	110
Analiza uticaja toplotnog stresa na peptidergičku inervaciju kore nadbubrežnih žlezda	119
Analiza uticaja toplotnog stresa na proliferativne i apoptotske procese u kori nadbubrežnih žlezda	121
Analiza uticaja toplotnog stresa na srž nadbubrežnih žlezda	124
Analiza uticaja toplotnog stresa na peptidergičku inervaciju srži nadbubrežnih žlezda	127
Analiza uticaja toplotnog stresa nivo hormona nadbubrežnih žlezda u cirkulaciji	128
Zaključci	131
Literatura	134
Biografija	166
Prilozi	168

Uvod

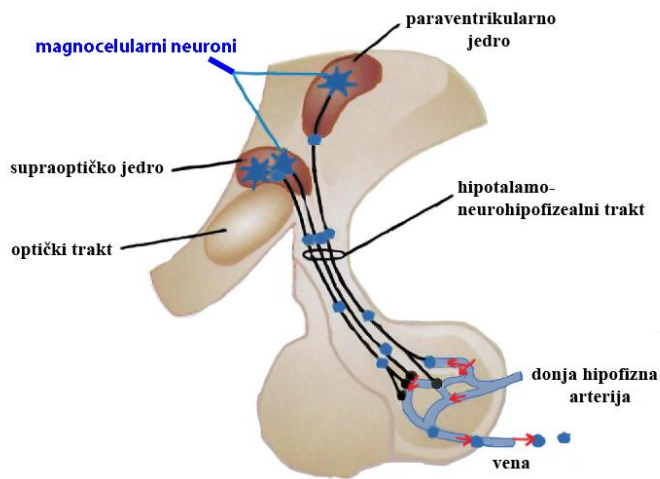
U održavanju homeostaze tela učestvuju tri integrišuća sistema: nervni, endokrini i imuni. Najbolje izučeni i najkonzistentniji neuroendokrini odgovor na stres je aktivacija hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HPA) osovine, koja se ogleda u sekreciji steroidnih hormona iz nadbubrežnih žlezda. Regulacija sekrecije glukokortikoida iz nadbubrežnih žlezda, kako su pokazali rani radovi (Selye, 1939; Harris, 1948) zavisi od veze između hipotalamusa i hipofize, što pokazuje da neuroni hipotalamusa regulišu sekreciju hormona prednjeg režnja hipofize, a oni dalje regulišu rad nadbubrežnih žlezda.

Hipotalamus (*hypothalamus*) je kontrolni centar za mnoge autonomne funkcije perifernog nervnog sistema (PNS) i njegova funkcionalna pozicioniranost između nervnog i endokrinog sistema ukazuje da ima važnu ulogu s jedne strane u održavanju stalnosti unutrašnje sredine (tj. homeostatsku funkciju), uključujući tu i regulaciju telesne temperature, a sa druge strane od njegove aktivacije zavise neki oblici ponašanja koji bi se mogli definisati kao instinktivno ili emotivno ponašanje. Pri tome treba imati u vidu da su ove dve grupe funkcija hipotalamusa međusobno tesno povezane.

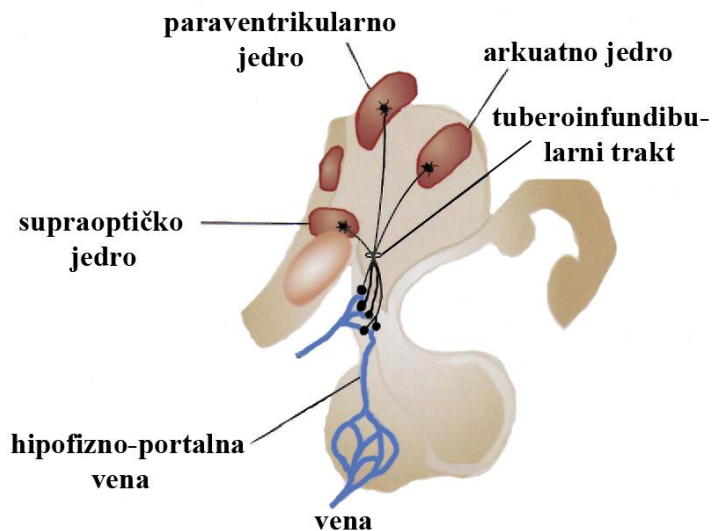
Hipotalamus je deo mozga, smešten ispod talamusa (*thalamus*), na podu treće moždane komore. Formira ventralni deo diencefalona. Pruža se sa ventralne strane do eminencije medijane (*eminencia mediana*) u oblasti drške hipofize. U hipotalamusu se nalazi veći broj jedara (grupacije tela nervnih ćelija) od kojih su sa hipofizom u funkcionalnoj vezi supraoptička i paraventrikularna jedra s jedne strane, paraventrikularna, periventrikularna, supraoptička i arkuatno, sa druge. Tela krupnih, magnocelularnih neurona, čiji se aksoni hipotalamo-neurohipofiznim traktom protežu do neurohipofize (Crtež 1), nalaze se u supraoptičkim i paraventrikularnim jedrima hipotalamusa. Ovi neuroni sintetišu vazopresin (arginin-vazopresin, AVP, antidiuretski hormon ADH) i oksitocin. Njihovi aksoni dopiru do neurohipofize gde se izlučuju u krvotok.

Aksonski terminali arkuatnog, paraventrikularnog, periventrikularnog i supraoptičkog jedra hipotalamusa sintetišu hormone koji se izlučuju u kapilarnu mrežu u oblasti *eminencia*

mediana (hipofizni portni sistem). Ovi hormoni regulišu funkciju prednjeg režnja hipofize (Crtež 2).



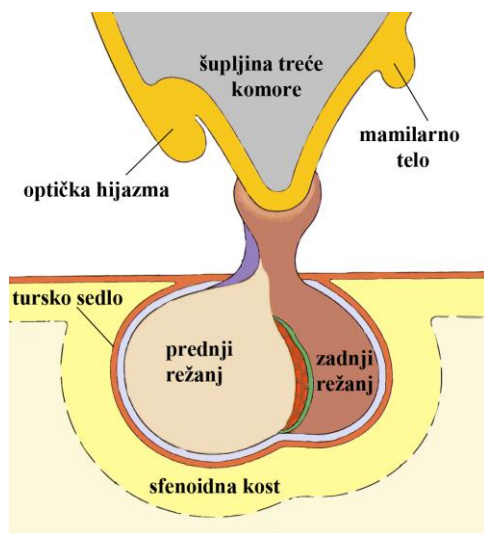
Crtež 1. Supraoptička i paraventrikularna jedra hipotalamusa sa aksonima koji dosežu do neurohipofize. (Modifikovan crtež, Dougherty, 2011)



Crtež 2. Supraoptičko, paraventrikularno i arkuatno jedro svoje proizvode izbacuju u primarni kapilarni pleksus u oblasti *eminentia mediana*. (Modifikovan crtež, Dougherty, 2011)

Kortikotropni oslobađajući hormon CRH, (ranije nazivan kortikotropnim oslobađajućim faktorom, CRF) sintetiše se u paraventrikularnim jedrima hipotalamusa, direktno stimulišući sintezu i oslobađanje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) iz kortikotropnih ćelija adenohipofize nakon delovanja stresa.

Hipofiza je endokrina žlezda smeštena u turskom sedlu (*sella turcica*), ulegnuću sfenoidne kosti (Crtež 3). Obavijena je vezivno-tkivnom kapsulom. Ova endokrina žlezda ima važnu ulogu u regulisanju funkcija drugih endokrinih žlezda, te se smatra glavnim organom endokrinog sistema. Izgrađena je od dva funkcionalno, embrionalno i morfološki različita dela: adenohipofize (prednjeg režnja) i neurohipofize (zadnjeg režnja).



Crtež 3. Hipofiza u ulegnuću sfenoidne kosti. (Modifikovan crtež, Stevens i Lowe, 2005)

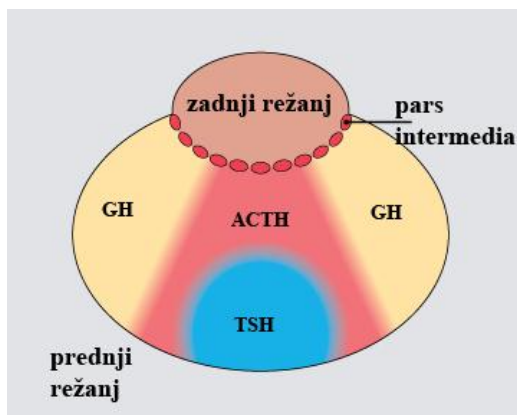
Adenohipofiza, poreklom od ektoderma primitivne usne duplje, izgrađena je od tri međusobno povezana dela : *pars distalis*, *pars tuberalis*, *pars intermedia*.

Pars distalis čine endokrine ćelije grupisane u trake ili gnezda (grupice), obavijene bazalnom laminom koja ih odvađa od kapilara sinusoidnog tipa. Ćelije ovog regiona hipofize se, u zavisnosti od afiniteta za boje, dele na hromofilne i hromofobne. Hromofilne ćelije se, zavisno od prijemčivosti za kisele ili bazne boje, dalje dele na acidofilne i bazofilne ćelije. Najveći broj udžbenika navodi da u acidofilne ćelije spadaju somatotropne

i mamotropne ćelije. Bazofilne ćelije su tireotropne, gonadotropne i kortikotropne (Ross i sar., 2003; Junkqueira i Carneiro, 2005), dok hromofobnim pripadaju folikulostelatne i prekursorske ćelije. Prema Anđelkoviću i saradnicima (2001) kortikotropne ćelije su svrstane u hromofobne ćelije, verovatno i zbog činjenice da se prema nekim autorima (Norris, 1985) smatraju intermedijarnim ćelijama između bazofilnih i hromofobnih ćelija zbog slabe bazofilije usled prisustva lipoproteina. Kao šesti tip ćelija u adenohipofizi navode se folikulostelatne ćelije (ili stelatne ćelije) koje imaju potpurnu i nutritivnu ulogu za ostale tipove ćelija. One spadaju u hromofobne, neaktivne, nediferencirane ćelije. Ove ćelije se mogu diferencirati u bazofilne ili acidofilne, u zavisnosti od eksperimentalnih procedura (manipulacija) (Yoshimura i Ishicawa, 1969).

Pokazano je da ćelije adenohipofize sintetizuju, pored osnovnog hormona, i druge hormone i aktivne supstance. Poznato je da postoji kolokalizacija dva ili više hormona kao što su folikulostimulirajući (FSH) i luteinizirajući (LH) hormoni u gonadotropnim ćelijama adenohipofize (Hirano i Shiino, 1993).

Ispitivanja hipofize čoveka i drugih sisara pokazala su da postoji odgovarajući raspored endokrinih ćelija prednjeg režnja hipofize kao i afiniteti pojedinih ćelija u odnosu na druge. Tako je pokazano da se najveći broj prolaktinskih (PRL) ćelija nalazi uz *pars intermedia*, dok su najbrojnije ćelije adenohipofize, somatotropne (GH) ćelije, koje sintetizuju hormon rasta, raspoređene u najširem delu adenohipofize (Crtež 4).



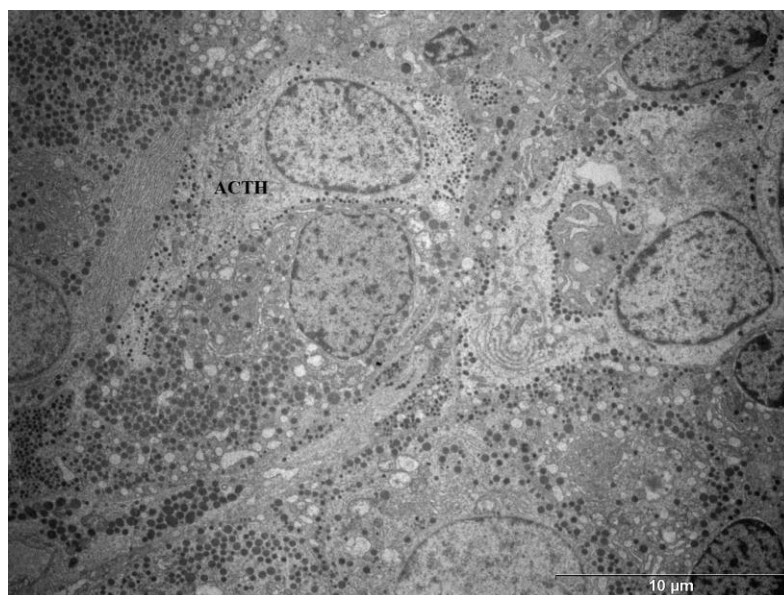
Crtež 4. Lokalizacija endokrinih ćelija u adenohipofizi. (Modifikovan crtež, Stevens i Lowe, 2005)

Takođe je pokazano da je afinitet kortikotropnih (ACTH) ćelija najveći prema GH ćelijama i da ACTH ćelije svojim procesusima obavijaju GH ćelje (Noda i sar., 2001).

U regulaciji HPA osovine kortikotropne ćelije hipofize imaju najznačajniju funkciju.

Kortikotropne (ACTH) ćelije sisara mogu biti pojedinačno raspoređene ili organizovane u male grupe i prema Pantiću (1975) najbrojnije su na periferiji adenohipofize. Ćelije su najčešće zvezdolikog oblika sa ekscentrično postavljenim jedrom i dobro razvijenim organelama. Sekretne granule, dijametra u proseku od 250 do 400 nm, sadrže ACTH i β -lipotropni hormon.

Ultrastrukturnim studijama pokazano je da ACTH ćelije imaju svetlu citoplazmu i vrlo često procesuse (Sl. 1). Poseduju slabo razvijeni granulisani endoplazmatični retikulum, kao i Goldžijev kompleks. Mitohondrije su okruglog ili cilindričnog oblika. Sekretne granule se nalaze u jednom nizu neposredno ispod ćelijske membrane i manjih su dimenzija u odnosu na granule ostalih endokrinih ćelija adenohipofize (Ozbek, 2000).



Slika 1. Kortikotropna ćelija adenohipofize pacova. Originalan snimak.

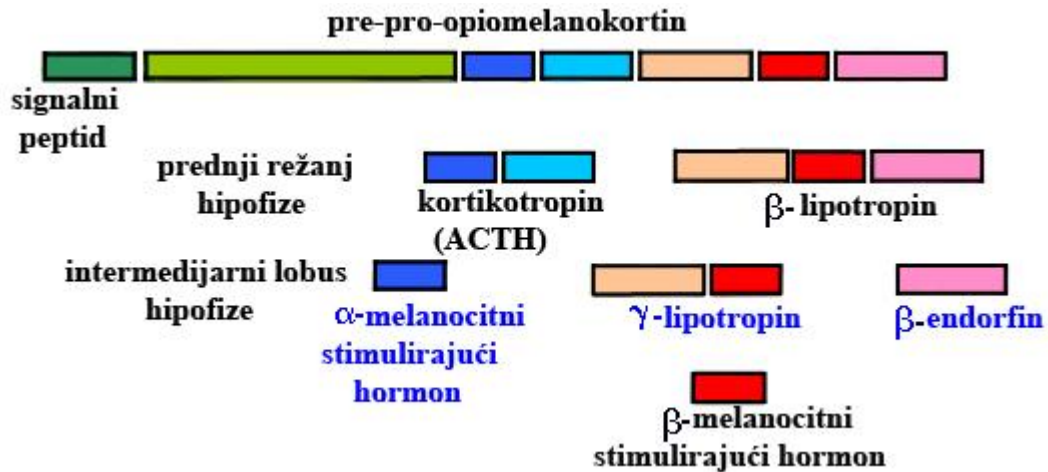
Yoshimura i Nogami (1981) opisali su, na osnovu imunocitohemijskih ispitivanja na nivou elektronskog mikroskopa, da postoji četiri tipa ACTH ćelija u adenohipofizi

pacova. Prvi tip ACTH ćelija odnosio bi se na velike zvezdolike ćelije sa granulama dijametra veličine 170 do 250 nm, koje se nalaze na periferiji i koje opkoljavaju acidofilne ćelije. Druga grupa ćelija ima izdužen vretenast oblik (Morijartijeve ćelije) sa granulama dijametra od 170 do 250 nm koje se pružaju u nizovima ili malim grupama u perifernim delovima citoplazme. Trećoj grupi ACTH ćelija pripadaju ovalne ili poligonalne ćelije sa malim sekretornim granulama dijametra 130–170 nm (Yoshimura i sar., 1974). Četvrta grupa ACTH ćelija odnosi se na poligonalne ili zvezdolike ćelije čiji dijametar granula varira od 180 do 300 nm. Prema ovim autorima, u adenohipofizi pacova najbrojniji je prvi tip ACTH ćelija. Caselitz i Saeger (1978) pokazuju u svom radu da su ACTH ćelije u mirovanju trouglastog oblika, sa ekscentrično postavljenim jedrom, brojnim ribozomima i sa granulama koje se nalaze neposredno uz ćelijsku membranu. Posle četvoronedeljnog delovanja prostaglandinom E1 ove ćelije se aktiviraju, menjaju svoj oblik iz ovalnog i trouglastog u zvezdolik. CRH analog (lizin-vazopresin) izaziva veću aktivaciju kortikotropnih ćelija, čak i njihovu proliferaciju u odnosu na delovanje prostaglandin E1.

Veliki broj različitih stresora stimuliše oslobađanje ACTH iz kortikotropnih ćelija hipofize. Dva hormona hipotalamusa imaju važnu ulogu u lučenju ACTH, to su CRH i vazopresin. Uticaj ovih hormona se menja u zavisnosti od tipa i trajanja stresora (Donald i Wittert, 1994). Slabiji regulatori su oksitocin, angiotenzin II, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), holecistokinin (CCK) i kateholamini (Beato, 1989). U uslovima aktivnog stresa lučenje ACTH zavisi od interakcije CRH i AVP (Aguilera, 1994).

Sinteza ACTH

ACTH nastaje od pre-pro-opiomelanokortina koji se sintetiše kako u ćelijama prednjeg režnja hipofize tako i u ćelijama intermedijarnog lobusa hipofize pacova. U oba slučaja, u prvom koraku se od ovog prekursora odvajaju N terminalni fragment i pro-opiomelanokortin (POMC). Dalje procesuiranje POMC je različito u ova dva dela hipofize. U prednjem režnju hipofize POMC se razdvaja na dva dela dajući ACTH i β -lipotropin, dok se u ćelijama intermedijarnog lobusa POMC razdvaja na stimulirajući hormon α -melanocita, γ -lipotropin i β -endorfin (Crtež 5).



Crtež 5. Sinteza ACTH

Pars tuberalis predstavlja supraselarni deo adenohipofize u kome se nalazi deo primarnog hipotalamo-hipofiznog kapilarnog spleta, završeci aksona pojedinih hipotalamičkih jedara, kao i pojedine gonadotropne i tireotropne ćelije (Mabuchi i sar., 2004).

Pars intermedia se nalazi između *pars nervosa* i *pars distalis*-a. Odvojena je od *pars distalis* hipofiznom pukotinom. Sadrži velike svetle ćelije koje najčešće okružuju folikule ispunjene koloidom. Ćelije sekretuju stimulišući hormon melanocita (MSH).

Neurohipofiza je neuroektodermalnog porekla i izgrađena je od tri dela: *pars neuralis*, *eminantia mediana* i *infundibulum*. Ona je nastavak hipotalamusa.

Pars neuralis je najveći deo i izgrađen je od oko 100000 neurosekretneih aksona, pituicita (izmenjenih astrocita) i sinusoidnih kapilara. Tela neurona, čiji se aksoni protežu do neurohipofize, nalaze se u supraoptičkim i paraventrikularnim jedrima hipotalamusa.

Neurosekretne vlakna hipotalamo-neurohipofiznog trakta nose neurosekretne granule, čiji sadržaj čine dva hormona, vazopresin i oksitocin. Kod sisara, ovi hormoni se sintetišu u različitim neuronima, pri čemu su tela neurona koji sintetišu vazopresin

smeštena prevashodno u supraoptičkim nukleusima, a jedra neurona koji sintetišu oksitocin, pretežno u paraventrikularnim nukleusima (Robertson, 2001)

Ovi hormoni, zajedno svaki sa svojim vezujućim proteinom neurofizinom, koji ima ulogu u njihovom transportu, putuju duž aksona do zadnjeg režnja hipofize gde se oslobađaju u kapilare. Specifičnost aksona neurohipofize je prisustvo posebnih zadebljanja (Heringova tela) u kojima se akumuliraju neurosekretorne granule, iz kojih se hormoni oslobađaju egzocitozom u perikapilarne prostore odakle difunduju u krv.

Pituiciti su izmenjene ćelije glije, tela ovalnog oblika sa citoplazmatičnim procesusima, sa dobro razvijenim organelama i lipidnim kapima u citoplazmi. Pokazano je postojanje plastične strukturno-funkcionalne interakcije pituicita i aksona neurohipofize u zavisnosti od funkcionog stanja aksona (Theodosia i sar., 2008). Pituiciti svojim procesusima u mirovanju naležu na krvne kapilare i odvajaju aksonske završetke od perikapilarnog prostora. U momentu izbacivanja vazopresina ili oksitocina iz aksona, astrociti se povlače i na taj način omogućavaju aksonima kontakt sa kapilarima. Pituiciti imaju važnu ulogu u regeneraciji zadnjeg režnja hipofize.

Nadbubrežne žlezde

Nadbubrežne žlezde su parni organi. Nalaze se u trbušnoj duplji, i naležu neposredno na gornju površinu bubrega. Zajedno sa bubrezima uronjene su u masno tkivo. Svaka žlezda je obavijena vezivnom kapsulom i izgrađena je od dva histološki, funkcionalno i embriološki različita dela. Neposredno ispod kapsule nalazi se kora (*cortex*), na koji se nadovezuje središnji deo označen kao srž (*medulla*) (Sl. 2).



Slika 2. Nadbubrežna žlezda kontrolne grupe životinja. Kapsula (K), zona glomeruloza (ZG), zona fasciculata (ZF), zona retikularis (ZR), srž (M). (Azan bojenje, originalan snimak, 5x)

Kapsula nadbubrežnih žlezda

Na površini žlezda nalazi se dobro razvijena kapsula građena od elemenata vezivnog tkiva, sa retikularnim i kolagenim vlakanima, fibroblastima i krvnim sudovima različitog dijametra. U ovoj zoni nalazi se niša kapsularnih i subkapsularnih ćelija koje predstavljaju matične ćelije za sve ćelije kore (Kim i Hammer, 2007).

Kora (*cortex*)

Kora se sastoji od tri zone, zone glomeruloze (*zona glomerulosa*, ZG), zone fascikulate (*zona fasciculata*, ZF) i zone retikularis (*zona reticularis*, ZR). Ćelije kore nadbubrežne zlezde su mezodermalnog porekla, sintetišu različite steroidne hormone.

Zona glomerulosa je izgrađena od endokrinih ćelija grupisanih u glomerule ili polulučne grupacije. Prema novijim istraživanjima, u ovoj zoni nalazi se veći broj tipova ćelija koje učestvuju u održavanju populacije ćelija kore nadbubrežne žlezde (Kim i sar., 2009). U ZG se kod pacova mogu uočiti ćelije različitog stepena diferenciranosti

(progenitorske ćelije) tako da se ZG može podeliti u tri podzone na osnovu prisustva ili nepostojanja nekih enzima. Dve unutrašnje podzone predstavljaju intermedijarnu zonu sa nediferenciranim ćelijama (Halder i sar., 1998). Sadašnja saznanja ukazuju da postoje sporoproliferišuće ćelije koje potiču iz kapsule, deobom daju ćerke ćelije koje se centripetalno pomeraju naseljavajući koru nadbubrežne žlezde (Pignatelli i sar., 2002), čime je pokazana izuzetna uloga kapsularne/subkapsularne jedinice u održanju rasta kore nadbubrežnih žlezda.

Ćelije ZG su različitog oblika, od ovalnog, gde podsećaju na fibroblaste, i sa malim brojem lipidnih kapljica, do poligonalnog sa centralno postavljenim jedrom i svetlom citoplazmom. U citoplazmi krupnijih, poligonalnih ćelija nalazi se glatki endoplazmatični retikulum, brojne mitohondrije sa pločastim kristama (Vinson i sar., 1992), malobrojne granule lipofuscina i brojne lipidne kapi koje su raspoređene u grupama ili pojedinačno po celoj citoplazmi (Domoto i sar., 1973). Između ćelija se nalaze sinusoidni kapilari.

Endokrine ćelije ove zone sintetišu mineralokortikoid aldosteron. Najveći uticaj na sintezu ovog hormona ima angiotenzin II.

Zona fascikulata (ZF) je procentualno najveća zona kore nadbubrežnih žlezda. Nadovezuje se na zonu glomerulozu. Sadrži endokrine ćelije grupisane u nizove između kojih se nalaze sinusoidni kapilari. Ćelije su poligonalnog oblika, krupne i sa centralno postavljenim jedrom. Pored glatkog endoplazminog retikuluma, mitohondrija i lizozoma, u ćelijama se nalaze izuzetno brojne lipidne kapi i retke granule lipofuscina. Mitohondrije poseduju tubulo-vezikularne kriste (Vinson i sar., 1992). Prema Ross-u i saradnicima, (2003) lipidne kapi sadrže neutralne masti (triacilglicerole), holesterol estre i fosfolipide, kao prekursore steroidnih hormona koji se sintetišu u ovim ćelijama.

U ovoj zoni ćelije sintetišu glukokortikoide, od kojih je najvažniji kortizol (čovjek) i kortikosteron (pacov). Glavni regulator sintetske aktivnosti ćelija je ACTH.

Zona retikularis (ZR) je izgrađena od endokrinih ćelija organizovanih u vidu mreže između kojih se nalaze sinusoidni kapilari. Ćelije su poligonalnog oblika, manje po veličini od ćelija ostalih zona. Imaju centralno postavljeno jedro, a u citoplazmi se nalaze manje izraženi glatki endoplazmatični retikulum, mitohondrije sa vezikularnim kristama, lizozomi i lipidne kapi. Piknotička jedra i lipofuscinske pigmentne granule dokaz su ćelijske

degradacije koja se javlja u ovoj zoni. Za ZR karakteristično je prisustvo makrofaga, kojih nema u drugim zonama kore, što potvrđuje pretpostavku o ćelijskoj degradaciji i eliminaciji oštećenih ćelijskih delova u ovoj zoni (Rodin, 1971).

Ćelije ZR pored glukokortikoida sintetišu i androgene, polne hormone koji u relativnoj maloj meri doprinose ukupnoj količini polnih hormona sintetisanih u organizmu.

Ćelije kore nadbubrežne žlezde mogu se naći i u srži žlezde, gde formiraju ostrvca okružena hromafinim ćelijama ali se i hromafine ćelije srži mogu uočiti između ćelija kore (Palacios i Lafarga, 1975; Bornstein i sar., 1991). Ovakva lokalizacija dva tipa ćelija omogućava parakrinu interakciju među zonama. Zašto je bitan blizak kontakt među ovim ćelijama? Smatra se da je integritet simpatičke inervacije potreban za održavanje diurnalnog ciklusa u steroidogenezi (Ottenweller i Meier, 1982; Muglia i sar., 1997).

U svim zonama kore endokrine ćelije poseduju mikrovile na strani gde su u bliskom kontaktu sa sinusoidnim kapilarima.

Svakako najveća razlika između ćelija kore nadbubrežnih žlezda ogleda se u prisustvu enzima koji učestvuju u sintezi steroida. Tako se enzim aldosteron-sintaza nalazi samo u ćelijama zone glomeruloze, dok se 11β -hidroksilaza nalazi u ćelijama ostalih zona nadbubrežne žlezde (ZF i ZR) (Vinson, 2003).

Ćelije kore nadbubrežnih žlezda bogate su lipidnim kapljicama (lipidnim telima) u kojima je uskladišten holesteril-estar, supstrat za sintezu steroida (Fujimoto i sar., 2008). Oko 80% holesteril-estra u ćelijama kore čoveka potiče iz cirkulacije gde je vezan za LDL (eng. low-density-lipoproteins, lipoproteini male gustine), dok se 20% holesterol-estra sintetise u ćeliji od acetil-koenzima A. Unos holesteril-estra iz cirkulacije u ćeliju moguć je i putem vezivanja za HDL (eng. high-density-lipoproteins, lipoproteini velike gustine) koji je karakterističan za ostale vrste (Jefcoate, 2002).

U ćelijama kore nadbubrežnih žlezda karakteristična je strukturno-funkcionalna veza između glatkog endoplazminog retikuluma, lipidnih kapi i mitohondrija (Ghadialy, 1997). Na osnovu ultrastrukturnih ispitivanja, klasično objašnjenje o formiranju i izbacivanju steroidnih hormona iz ćelija ZF i ZR uključuje nekoliko koraka i taj proces je jednim imenom nazvan **endoplazmokrina sekrecija** (Rodin, 1971). Ova teorija pretpostavlja da u citoplazmi steroidogene ćelije postoje najmanje dve populacije lipidnih

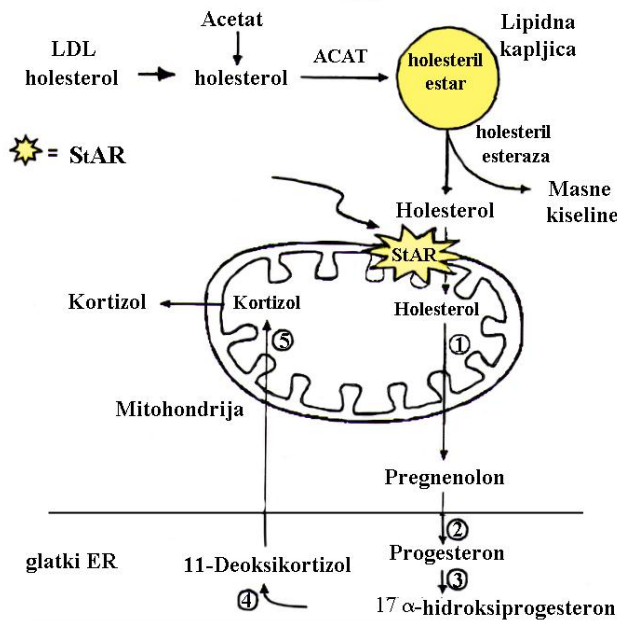
kapi, one koje predstavljaju depo sirovina za proizvodnju hormona i one koje predstavljaju uskladišteni proizvod te sinteze - steroidni hormon. Lipidne kapljice sa steroidnim hormonom koje potiču iz Goldži zone ili glatkog endoplazminog retikuluma pomeraju se ka ćelijskoj membrani. Kako lipidna kapljica postepeno raste u citoplazmi, biva zaokružena najpre kratkim profilima endoplazminog retikuluma (ER) koji se postepeno izdužuju, stvarajući jedinstven omotač. U kontaktu sa ćelijskom membranom, membrana ER-a se odvaja i omogućava lipidnoj kapljici izbacivanje iz ćelije i upućivanje ka krvnim kapilarima.

U novije vreme šire je prihvaćeno stanovište da se steroidni hormoni ne skladište u ćeliji u kojoj se proizvode, već da se odmah po sintezi iz nje izbacuju, i to difuzijom kroz membranu, s obzirom na to da su rastvorljivi u lipidima (Rosol i sar, 2001). U tom slučaju, regulacija količine hormona u cirkulaciji vršila bi se na nivou sinteze, a ne na nivou sekrecije. Nedavno je pokazano, međutim, da u uslovima akutnog stresa, koncentracija kortikosterona u cirkulaciji raste veoma rano, čak pre nego što bi ACTH uopšte stigao da deluje na svoje ciljne ćelije i stimuliše sintezu (Henry i Basset, 1985). Zbog toga se veruje da se steroidni hormoni, u ovom slučaju konkretno kortikosteron, ipak skladište u ćeliji u kojoj nastaju, ali u formi koju za sada nije moguće uočiti na ultrastrukturnom nivou (Mohn i sar., 2005).

Pokazano je da se uz površinu lipidne kapljice nalaze različiti proteini koji, u stanju mirovanja, predstavljaju zaštitu od razlaganja lipazom prisutnom u citoplazmi. U ćelijama koje sintetišu steroidne hormone, taj protein je perilipin C. Fosforilacijom perilipina enzimom protein-kinazom A, formira se vezujuće mesto za hormon-senzitivnu lipazu i to u momentu kada je aktivirana lipoliza β -adrenergičkom stimulacijom (Sztalryd i sar., 2003)

Nastanak lipidnih kapljica u ćeliji tumači se na različite načine. Najprihvatljivija hipoteza podrazumeva nekoliko koraka. Novosintetisani lipidni estar nagomilava se unutar membrane ER-a. Kada dostigne određenu veličinu, membrana se raslojava i deo sa lipidnim estrom počinje da se odvaja pupljenjem, zaokružen jednim slojem fosfolipida membrane ER-a i proteinima koji delom takođe potiču od membrane ER-a (Brown, 2001), i na kraju se odvoji kao novosintetisana lipidna kapljica. Takođe postoje mišljenja da lipidne kapi nastaju u citoplazmi, u neposrednoj blizini membrane glatkog ER, uz učešće enzima

lokalizovanih u njoj (Robenek i sar., 2006). Uvećavanje novosintetisane lipidne kapljice može se odvijati na više načina. Jedan od njih je stapanje nekoliko malih lipidnih kapljica u jednu veliku, ili pak sinteza lipidnog estera lokalno unutar već postojeće lipidne kapi (Fujimoto i sar., 2008). Funkcionalna povezanost lipidnih tela sa glatkim endoplazminim retikulumom i mitohondrijama prilikom sinteze steroidnih hormona pokazana je na crtežu 6.



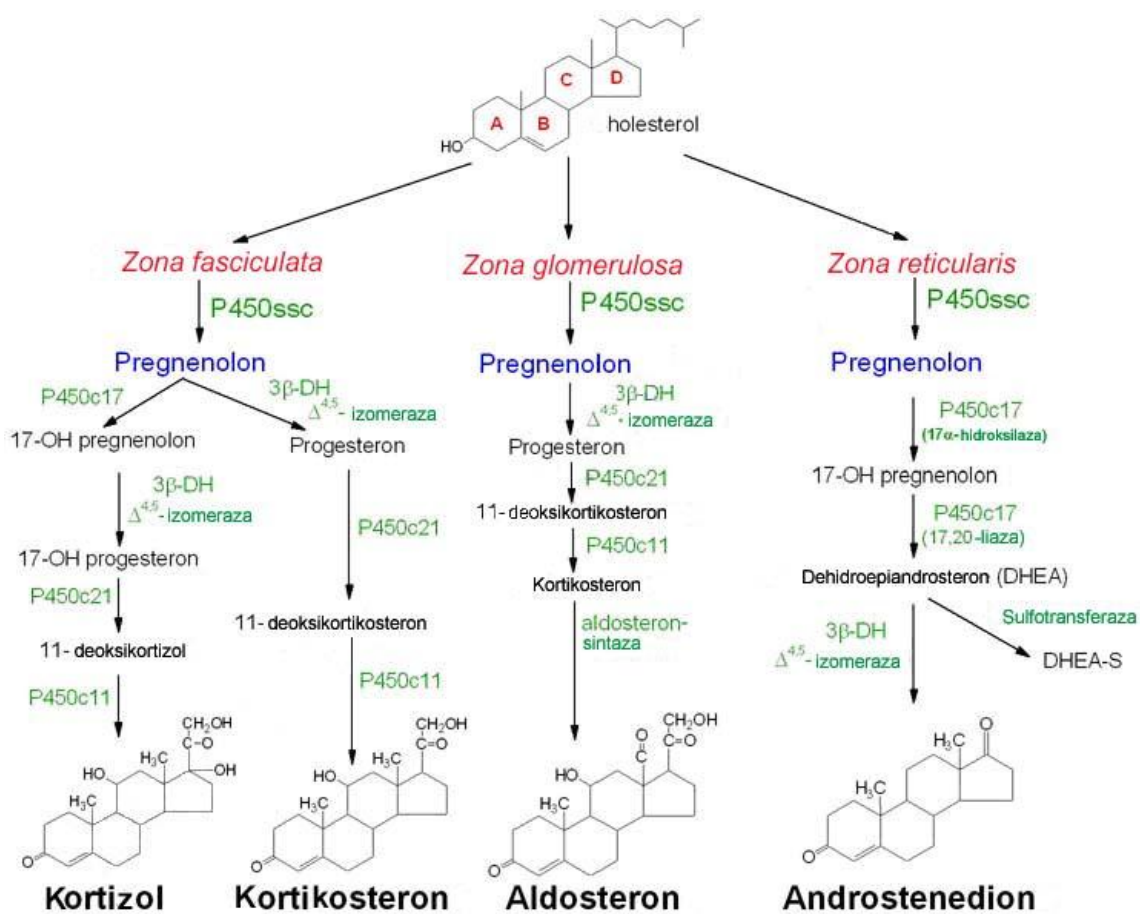
Crtež 6. Funkcionalna povezanost između lipidne kapljice, mitohondrije i glatkog endoplazmatičnog retikuluma. **1.** P-450scC/20,22-lijaza (mitohondrija); **2.** 3 β -hidroksisteroid DH i $\delta^{5,4}$ izomeraza (ER); **3.** 17 α -hidroksilaza (ER); **4.** 21-hidroksilaza (ER); **5.** 11 β -hidroksilaza (mitohondria). ACAT- Acetil Co A: holesterol aciltransferaza. StAR (steroidogenic acute regulatory protein) (Modifikovan crtež, Sturm, 2011)

Biosinteza i sekrecija kortikosteroida

Supstrat za steroidogenezu je holesterol koji se unosi u mitohondriju posredstvom proteina StAR-a (steroidogenic acute regulatory protein, steroidogeni akutni regulatorni protein). Transport holesterola iz lipidne kapljice do unutrašnje mitohondrijalne membrane

odvija se u nekoliko koraka, uz učešće aktina (Feng, i sar., 2001) i intermedijarnih filameta prisutnih oko lipidne kapi (Almahbobi i sar., 1992).

Biosinteza kortikosteroida počinje konverzijom holesterola u pregnenolon na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani (Hall, 1997), reakcijom koju kontroliše ACTH. Od ovog jedinjenja polaze tri puta sinteze, svaki vezan za određenu zonu kore nadbubrežnih žlezda, jedan u pravcu nastanka mineralokortikoida (ZG), drugi u pravcu nastanka 17-hidroksipregnenolona od koga će nastati kortizol i kortikosteron (ZF) i treći put u kome takođe od 17-hidroksipregnenolona nastaju polni steroidi (ZR) (Crtež 7).



Crtež 7. Biosinteza steroida u ćelijama kore nadbubrežnih žlezda, preuzeto sa Interneta (<http://themedicalbiochemistrypage.com>)

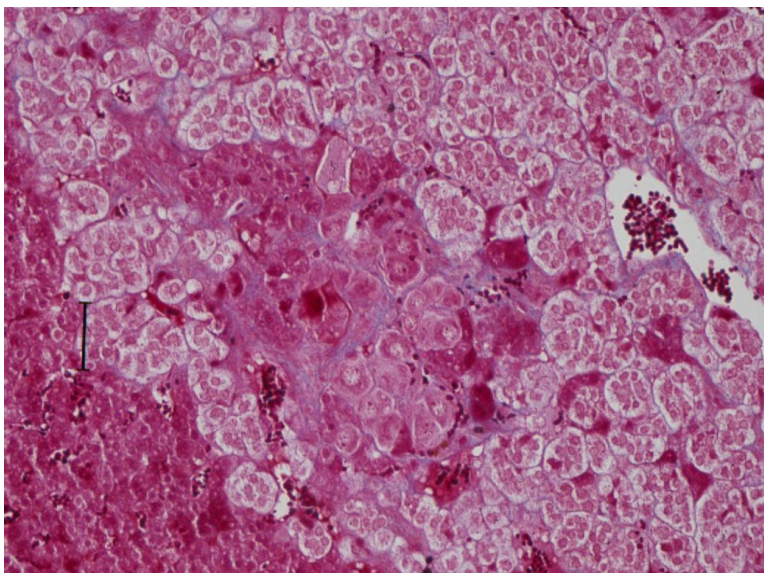
Mehanizam delovanja kortikosteroida

U efektivnim ćelijama hormoni nadbubrežnih žlezda se vezuju za receptore u citoplazmi ili u jedru. Vezivanje hormona za receptor dovodi do njihove transformacije iz neaktivne u aktivnu formu. Kompleks hormon-receptor se, kao transkripcioni faktor, vezuje za promotorske regione određenih gena, pokrećući transkripciju iRNK. Translacija iRNK se odvija na ribozomima, gde dolazi do sinteze specifičnog proteina kao fiziološkog odgovora ćelije na delovanje hormona. Aktivacija gena dovodi do promena na kompleksu hormon-receptor i receptor prelazi u neaktivnu formu, a hormon difunduje iz ćelije (Charmandari i sar., 2004).

Srž (*medulla*)

Središnji deo nadbubrežnih žlezda izgrađen je od hromafinih ćelija, malih granularnih hromafinih ćelija, ganglijskih ćelija, potpornih ćelija, nerava, krvnih sudova i pridruženih elemenata vezivnog tkiva (Diaz-Flores i sar., 2008).

Parenhim centralnog dela nadbubrežnih žlezdi izgrađen je u najvećem procentu od krupnih, bledih, epiteloidnih ćelija za koje se smatra da predstavljaju modifikovane postganglijske neurone koji su izgubili aksone. Eksperimentima je pokazano da ćelije u srži formiraju nastavke slične aksonima. Rast aksona može da se inhibira glukokortikoidima. Prema tome, hormoni kore nadbubrežnih žlezda kontrolišu morfologiju hromafinih ćelija i sprečavaju formiranje nastavaka. Hromafine ćelije tako više liče na tipične endokrine ćelije jer se njihovi sekretni produkti transportuju u krvotok (Ross i sar., 2003) (Sl. 3). Zbog visokog sadržaja kateholamina, adrenalina (A) i noradrenalina (NA) koje sintetišu i skladište u granulama, ćelije razvijaju tamnu obojenost kada se izlože vazduhu ili nekom oksidacionom sredstvu (hromatima). Na osnovu ovih karakteristika nazvane su hromafinim ćelijama (Stevens i Lowe, 2005). Takođe pripadaju i difuznom neuroendokrinom sistemu (DNES). Hromafine ćelije su organizovane u grupe i trake koje su perikapilarnim prostorom i bazalnom laminom odvojene od sinusoidnih kapilara.



Slika 3. Srž nadbubrežne žlezde. Pored svetlih ćelija srži, jasno se uočavaju ganglija i krvni sudovi. (Azan bojenje, originalan snimak, 20x)

Ćelije su poligonalnog ili nepravilnog oblika. U ćelijama se nalazi krupno, svetlo jedro, dobro razvijen granulisani endoplazmin retikulum i Goldžijev aparat, manji broj mitohondrija i lizozoma, i sekretne granule. Na osnovu načina na koji se kontrastiraju prilikom pripreme za posmatranje pod EM, moguće je razlikovati dva tipa granula, pa tako i dve grupe ćelija: noradrenalinske i adrenalinske granule, odnosno ćelije. Noradrenalinske granule su izrazito tamne, dok su adrenalinske sitnije i svetlije. Adrenalinske granule su najčešće okrugle, dijametra od 50 do 300 nm. Noradrenalinske granule su ovalne ili elipsaste, većih dimenzija sa jače kontrastiranim materijalom u centru granule (Al-Lami, 1969). Granule, pored kateholamina sadrže i enkefaline, ATP, jone Ca^{2+} , dopamin- β -hidroksilazu i hromogranine. U srži odraslog pacova, 15-20% ćelija ima noradrenalinski fenotip, dok ostalih 80-85% čine adrenalinske ćelije (Hodel, 2001). Na osnovu ovog brojčanog odnosa moglo bi se očekivati da koncentracija adrenalina u cirkulaciji bude znatno viša u odnosu na noradrenalin. Naprotiv, koncentracija noradrenalina je znatno viša u odnosu na adrenalin, što se objašnjava činjenicom da NA ne potiče samo iz hromafinih ćelija srži nadbubrežne žlezde već i iz drugih izvora u telu (simpatički nervni sistem i DOPA-dopamin autokrini/parakrini sistem) (Goldstein, 2003). Iako je uobičajeno da svaka

ćelija sadrži samo jedan tip granula, nedavno su opisane ćelija koje sadrže obe populacije granula, što može predstavljati rezultat postojanja dva zasebna puta sinteze ili, alternativno, različite stadijume jednog istog biosintetskog puta (Grabner i sar., 2005). Sekretne granule oslobađaju svoj sadržaj u perikapilarni prostor procesom egzocitoze, ali se u novije vreme, kao alternativni način oslobađanja hormona, pominje degranulacija korak po korak, u malim porcijama (engl. piecemeal) (Crivellato i sar., 2003). Sinteza i oslobađanje kateholamina najvećim delom su pod nervnom kontrolom. Stimulacija simpatičkog nervnog sistema dovodi do trenutnog porasta nivoa kateholamina u cirkulaciji.

Koval i sar. (2000), su u 4-dnevnoj kulturi ćelija srži nadbubrežne žlezde goveda, pokazali na ultrastrukturnom nivou postojanje četiri tipa kateholaminskih ćelija koje su se međusobno razlikovale po gustini citoplazme i veličini granula.

Pored navedenih tipova ćelija, opisan je još jedan tip ćelija u srži nadbubrežnih žlezda, SGC ćelije (eng. small granule chromaffin cells, hromafine ćelije sa malim granulama). Ove ćelije poseduju oba tipa granula (adrenalinskih i noradrenalinskih) i male vezikule. Kod miša dijametar malih vezikula iznosi od 100-230 nm, dijametar adrenalinskih granula je 170-350 nm, dok je dijametar noradrenalinskih granula daleko veći i iznosi od 185-495 nm (Coupland i sar., 1979). SGC ćelije mogu predstavljati prelazni oblik između simpatičkih neurona i hromafinih ćelija (Kobayashi i Coupland, 1977). Imaju mala ćelijska tela, veliko jedro u odnosu na citoplazmu i nastavke koji se pružaju između ćelija u srži i čak u kori nadbubrežne žlezde (Unsicker i sar., 1978a). Prisustvo periferina, proteinskih filamenata karakterističnih za simpatičke neurone, dokazuje da SGC ćelije mogu funkcionisati kao interneuroni ili kao endokrine ćelije (Derer i sar., 1989).

U srži nadbubrežnih žlezda, pored hromafinih ćelija, opisana su dva tipa ganglija: ganglije čiji su perikarioni krupni, i ganglije sa malim perikarionima, koji mogu predstavljati hromafine ćelije sa malim granulama ili male fluorescentne ćelije simpatičkih ganglija (Unsicker i sar., 1978b). Ganglijske ćelije pokazuju fenotip i ultrastrukturu karakterističnu za neurone, sa prisustvom granularnog ER i lipofuscinskih granula.

Dva tipa potpornih ćelija, Švanove i satelitske ćelije su glijalne komponente unutar nervne komponente srži. Švanove ćelije se nalaze oko nervnih ćelija i njihovih aksona koji se pružaju kroz vezivno tkivo u prostoru između hromafinih ćelija, dok se satelitske ćelije

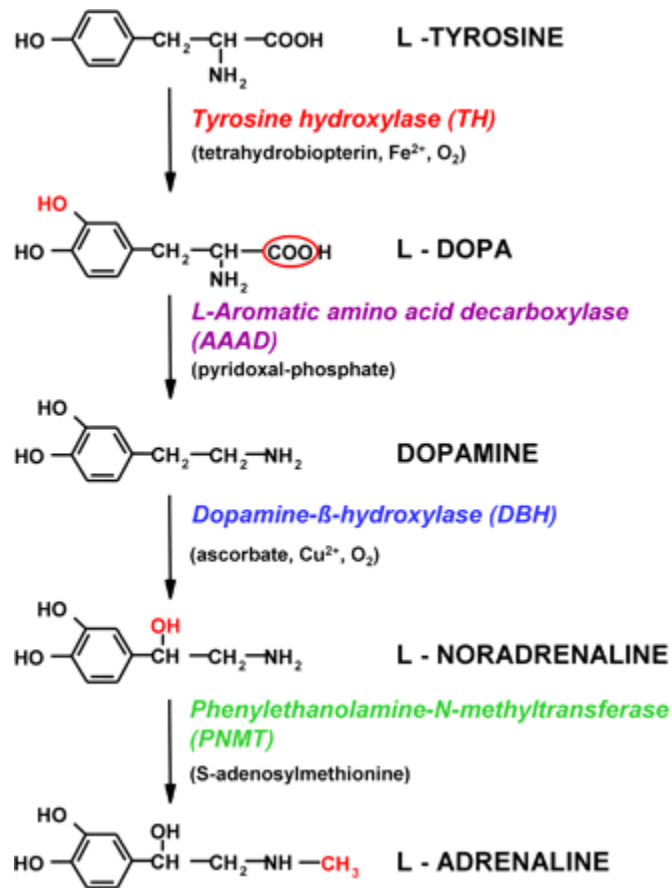
nalaze uz perikarione i između hromafinih ćelija gde svoje tanke citoplazmatične nastavke usmeravaju ka ovim ćelijama i završecima nerava. Jedro satelitskih ćelija je malih dimenzija. Njihova citoplazma nema sekretnih granula, ali u njoj se nalaze brojni filamenti citoskeleta i ponekad male lipidne kapi.

Srž nadbubrežnih žlezda ima dvojno snabdevanje krvlju. Medularna arteriola zaobilazi koru pružajući se unutar vezivnih trabekula direktno do srži izlivajući arterijsku krv u sinusoidne kapilare srži. S druge strane, venska krv iz fenestrovanih kapilara kore se sakuplja u sinusoidne kapilare srži tako da se hormoni sintetisani u kori prenose u srž i utiču na njenu aktivnost. Pokazano je da glukokortikoidi sintetisani u ćelijama kore indukuju enzime koji katalizuju metilaciju noradrenalina u adrenalin (Ross i sar., 2003).

Biosinteza kateholamina u ćelijama srži

Dopamin, noradrenalin i adrenalin su kateholamini, sintetišu se u srži nadbubrežnih žlezda od amino-kiseline tirozin. Noradrenalin (NA) je otkriven u mnogim drugim tkivima u količini koja grubo prati njihovu simpatičku inervaciju u ovim tkivima poreklom je iz simpatičkih nervih završetaka. Adrenalin (A) je glavni proizvod srži nadbubrežnih žlezda i samo se u njoj sintetiše (Crtež 8).

Koraci u sintezi:



Crtež 8. Biosinteza noradrenalina i adrenalina. (Kvetnasky i sar., 2009)

1. Prvi enzim ovog puta je tirozin-hidroksilaza koja konvertuje tirozin u L-DOPA (dihidroksifenilalanin). Tirozin-hidroksilaza je locirana u citosolu hromafinih ćelija (i u simpatičkim nervnim završecima i specifičnim ćelijama CNS-a).
2. Citosolni enzim dekarboksilaza amino-kiselina konvertuje L-DOPA u dopamin
3. Kateholamin-protonski razmenjivač (VMAT1) prebacuje dopamin u hromafine granule
4. Dopamin-β-hidroksilaza konvertuje dopamin u noradrenalin hidroksilacijom β-ugljenika. Ovaj enzim je lokalizovan na unutrašnjoj površini membrane granula (u srži i simpatičkim nervima; u nervnim završecima postganglijskih simpatičkih neurona sintetski put se ovde završava; ćelije srži nadbubrežnih žlezda konvertuju NA u A kroz još 3 koraka

5. Noradrenalin formiran u granulama premešta se u citosol
6. Citosolni enzim feniletanolamin-N-metiltransferaza (PNMT) premešta metil grupu sa S-adenozilmetionina na noradrenalin i tako nastaje adrenalin. Ovaj enzim se nalazi samo u citosolu ćelija srži nadbubrežnih žlezda.
7. Sekretne granule ćelija srži preuzimaju novosintetisani adrenalin, izgleda pomoću istog VMAT1 kao u koraku 3. (Barett, 2003).

Neuropeptidi srži nadbubrežnih žlezda

Ćelije srži sintetišu veliki broj neuropeptida među kojim su najzastupljenija tri: neuropeptid Y, supstanca P i vazoaktivni intestinalni peptid (NPY, SP i VIP). Pored regulatornih peptida pokazano je da ćelije srži sintetišu i druge aktivne supstance kao što su hormoni, neurotransmiteri i citokini pa čak i male količine ACTH i vazopresina (Hawthorn i sar., 1987).

Neuropeptid Y (NPY) se sastoji od 36 amino kiselinskih ostataka koji spada u familiju pankreasnog polipeptida (PP). Za NPY se smatra da učestvuje u regulaciji HPA osovine zbog prisustva NPY-sekretujućih nerava u kapsuli nadbubrežnih žlezda i zoni glomerulozi, kao i NPY-receptora u ZG. Kod različitih vrsta, uključujući i čoveka uočena je sinteza ovog peptida u hromafinim ćelijama srži (Cavadas i sar., 2001). Utvrđeno je da čak 50% hromafinih ćelija ispoljava imunopozitivnost na ovaj peptid (Kuramoto i sar., 1986). U novije vreme pokazana je kolokalizacija NPY sa noradrenalinskim, ali i adrenalinskim granulama (Bernet i sar., 1998). Pri perfuziji nadbubrežne žlezde sa NPY izlučeni adrenalin, kao i smanjenje protoka krvi kroz žlezdu ima jak vazokonstriktorni efekat (Hinson i sar., 1986), čime se pospešuje oslobađanje aldosterona (Hinson i sar., 1994). NPY inhibira sekreciju kortikosterona *in vitro* (Malendowicz i sar., 1990). Holzwarth i saradnici (1987) su pokazali da količina NPY u nadbubrežnoj žlezdi životinja zavisi od nivoa stresa, a ne od splanhične inervacije.

Supstanca P (SP) je peptid izgrađen od 11 amino kiselinskih ostataka koji spada u familiju tahikininskih neuropeptida. Nervi koji sadrže supstancu P nađeni su u srži nadbubrežne žlezde. Prostiru se između malih grupa hromafinih ćelija i imaju svoje

varikozne završetke u ili okolo ovih grupa ćelija. Nervi se karakterišu prisustvom velikog broja malih vezikula i malim brojem većih granula. U novije vreme je pokazano da SP nervi ostvaruju blizak kontakt sa noradrenalinskim ćelijama i da mogu uticati na njihovu sekretornu aktivnost (Murabayashi i sar., 2007). Poznato je da ćelije srži ne luče samo kateholamine, već i regulatorne peptide. Tako je utvrđeno u pacova da pri dejstvu različitih stresora dolazi do oslobađanja kateholamina i SP (šok električnom strujom), dok pri metaboličkom stresu (hipoglikemija) nema povećanog oslobađanja SP (Vaupel i sar., 1988). Studije *in vivo* su pokazale da supstanca P dovodi do povećanja sekrecije aldosterona kod pacova (Nussdorfer i sar., 1988), dok pri perfuziji nadbubrežne žlezde ovim neuropeptidom povećava se sinteza i aldosterona i kortikosterona (Hinson i sar., 1994).

Vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP) je peptidni hormon izgrađen od 28 amino kiselinskih ostataka. VIP-imunoreaktivni nervi nađeni su u kapsuli, zoni glomerulozi i u srži i pod kontrolom su splanhičnog nerva. Imunohistohemijska ispitivanja su pokazala postojanje malog broja hromafinih ćelija u kojima je ovaj peptid kolokalizovan sa adrenalinom (Holzwarth, 1984; Kondo i sar., 1986). Studije sa perfuzijom nadbubrežne žlezde ovim neuropeptidom su pokazale da VIP može delovati kao vazodilatator i da pospešuje lučenje aldosterona i kortikosterona. Vezivanjem VIP-a za receptor tumorskih ćelija glodara aktivira se adenilat ciklaza, te na taj način podseća na dejstvo ACTH (Kowal i sar., 1977). Pojedina istraživanja pokazuju da VIP ostvaruje najveći uticaj na ćelije zone glomeruloze posebno pri izmenjenom balansu elektrolita (Hinson i sar., 1996). Brojni dokazi ukazuju da se VIP oslobađa iz nervnih završetaka, ali i da ćelije srži imaju mogućnost sinteze ovog peptida (Kondo, 1985; Maubert i sar., 1990). Nowak i sar., (1994) su pokazali da endogeni VIP nema značajan uticaj na HPA osovinu u uslovima mirovanja, ali da igra važnu ulogu pri njenoj aktivaciji nastaloj usled stresa hladnoćom. Hökfelt i sar. (1981) su našli da reakcija VIP nerava ne zavisi od aktivnosti splanhičkih nerava, dok kasnija istraživanja pokazuju da se količina VIP-a u srži smanjuje nakon presecanja VIP nerava, dok se sadržaj ovog neuropeptida u kori ne menja (Hinson i sar., 1996).

STRES

Stres je kao termin prvi u naučnu i medicinsku literaturu uveo Hans Selye Deserves u 20. veku, dok je ranije Claude Bernard (1878) prvi opisao napor organizma da održi unutrašnju ravnotežu usled delovanja spoljašnjih faktora, a Walter Cannon je to stanje definisao kao homeostazu (1932). Iako je objavljen veliki broj radova na temu stresa i bolesti uzrokovanih stresom, prava definicija stresa ne postoji. Smatra se da stres aktivira hipotalamo-hipofizno-adrenalnu (HPA, engl. Hypothalamo-pituitary-adrenal) osovину usled povećane koncentracije adrenokortikotropnog hormona (ACTH) u cirkulaciji (Ganong, 1995). Drugi autori smatraju da aktivacija ostalih sistema, sa ili bez povećanja nivoa ACTH, nastaje usled stresom poremećene homeostaze (Pacak i sar., 1998). Stres se definiše i kao stanje disharmonije nastalo kao posledica specifičnih i nespecifičnih odgovora (Chrousos i Gold, 1992).

Stresori se označavaju kao stimulusi koji narušavaju homeostazu. Stresori izazivaju kompleksne endokrine i autonomne odgovore koji su različiti i specifični u zavisnosti od tipa i prirode stresora (Kvetnansky i sar., 2009).

Mogu se podeliti u četiri velike grupe:

1. fizički stresori
2. fiziološki stresori
3. socijalni stresori i
4. stresori koji menjaju kardiovaskularnu i metaboličku homeostazu.

Fizički stresori uključuju hladnoću, toplotu, radijaciju, buku, vibraciju i druge. Fiziološki stresori utiču na ponašanje i izazivaju anksioznost, strah i frustracije. Socijalni stresori su npr. kod ljudi nezaposlenost i razvod. U poslednju grupu stresora spadaju hipoglikemija, hemoragija i izlaganje toploti.

U zavisnosti od trajanja stresori se dele na akutne (kratkotrajne) i hronične (dugotrajne).

Dejstvo stresora je zapaženo u različitim delovima mozga, koji dalje šalje signal u hipotalamus uzrokujući izlučivanje kortikotropnog oslobađajućeg hormona (CRH) i vazopresina (VP). CRH se sintetiše u paraventrikularnom nukleusu, a vazopresin u

magnocelularnim neuronima koji se završavaju u posteriornom delu hipofize (Sapolsky i sar., 2000). CRH utiče na oslobađanje ACTH u krvotok, koji deluje na nadbubrežne žlezde i dovodi do lučenja hormona stresa, kortizola (čovjek) i kortikosterona (CORT, ostale vrste). Ovaj hormon negativnom povratnom spregom utiče na hipotalamus i hipofizu i zaustavlja dalju sintezu CRH i ACTH kada ona više nije neophodna (Chrousos i Gold, 1998; Dallman i sar., 1992).

Drugi sistem koji se aktivira u stresu je simpato-adrenomedularni sistem.

Reakcija ovog sistema se dešava kada izlaganje stresu aktivira preganglijske simpatičke neurone u intermediolateralnim ćelijama torakolumbalnog dela kičmene moždine. Aksoni ovih neurona informaciju prenose do prevertebralne ili paravertebralne ganglije koja aktivira hromafine ćelije nadbubrežne žlezde (Ulrich-Lai i Herman, 2009). Na taj način, stresom aktivirani simpatički nervni sistem oslobađa noradrenalin iz većine nervnih završetaka, što daljom aktivacijom simpatičkih nerava u nadbubrežnoj srži dovodi do oslobađanja adrenalina.

I pored brojnih radova na temu stresa i dalje se ne zna šta je okidač aktivnosti HPA osovine i sinteze ACTH. Postoje kateholaminergički putevi od baze mozga pa do sekretujućih CRH aksona, kao i nekateholaminergički neuroni koji sintetišu neuropeptid Y i enkefalin (Palkovits i sar., 1992). Brojni serotoninergički aksoni, koji polaze od mezencefalona, takođe utiču na oslobađanje CRH (Sawchenko i sar., 1990).

Toplotni stres

Termoregulatorni sistem je najsloženije razvijen kod ptica i sisara. Centri termoregulacije centralnog nervnog sistema (CNS) su smešteni u preoptičkom i prednjem regionu hipotalamusa gde se obrađuju sve informacije dospеле iz kože, a njihovi efektorski odgovori dovode do stvaranja, očuvanja ili potrošnje toplote (Gordon, 2009). Medijalni preoptički neuroni dobijaju informacije sa periferije preko termosenzitivnih puteva unutar kičmene i produžene moždine (Pacak i Palkovits, 2001). Pacovi kod kojih je preoptički i prednji region hipotalamusa uništen ili nepovezan sa moždanim stablom izgubili su mogućnost regulacije telesne temperature pri izlaganju toplotnom stresu (Lipton i sar.,

1974). Oni su pokazali da komunikacija između preoptičkog i prednjeg regiona hipotalamusa (najverovatnije paraventricularnog) je neophodna za regulaciju telesne temperature u slučaju izlaganja toploti ili hladnoći. Unutar preoptičkog regiona se nalazi tri tipa neurona, jedni osetljivi na toplotu, drugi osetljivi na hladnoću i neuroni neosetljivi na promenu temperature (Boulant, 2000). Oko 30% neurona je osetljivo na toplotu, 5% je osetljivo na hladnoću, dok preostali neuroni su tolerantni na promenu temperature. Uzlazni putevi koji prenose somatosenzorne informacije iz kože i spinalnih termoreceptora donose signale do preoptičkog regiona, od kojih većina dospeva do neurona osetljivih na toplotu. Dendriti neurona osetljivih na toplotu su raspoređeni medijalno i bočno oko treće komore. Ovakav položaj im omogućava da prikupljaju i upoređuju uzlazne senzorne signale, dok neuroni tolerantni na toplotu ne reaguju na promene periferne temperature (Boulant i Hardy, 1974). Hamell i sar., (1960) smatraju da upoređivanje inhibitornih i ekscitatornih sinaptičkih signala među neuronima osetljivim na toplotu i neuronima tolerantnim na promenu temperature, omogućava održavanje temperature preko gubitka, zadržavanja ili proizvodnje toplote.

Kiyohara i sar., (1995) su pri izlaganju pacova toplotnom stresu putem *c-fos* ekspresije, ustanovili da se u tom slučaju aktiviraju neuroni u lateralnom septalnom nukleusu, preoptičkom delu hipotalamusa, paraventricularnom talamičkom nukleusu i supramamilarnom nukleusu. Slične rezultate dobili su i Harikai i sar., (2003) pri izlaganju miševa hipertermiji. Tako na temperaturi od 34°C aktivirali su se neuroni u preoptičkoj i anteriornoj oblasti, i dorzomedijalni nukleus hipotalamusa. Pri višoj temperaturi, pored navedenih regiona zapažena je aktivnost u lateralnom septalnom nukleusu, zoni incerti, paraventricularnom nukleusu i supraoptičkom nukleusu. Toplotni stres aktivira C nociceptore na periferiji i stimuliše neurone lamine I i II u dorzalnom rogu kičmene moždine (Scammell i sar., 1993).

Regioni mozga gde stres hladnoćom izaziva snažnu *c-fos* ekspresiju su medijalni preoptički neuroni, koji su takođe osetljivi i na toplotu (Patronas i sar., 1998). Scammell (1993) je istraživao *c-fos* ekspresiju u mozgu i uočio da su promene nastale nakon toplotnog stresa slične promenama nastalim nakon stresa hladnoćom. Medijalno preoptičko jedro prenosi informacije do paraventricularnog jedra hipotalamusa koje reguliše gubitak

toplote neurohumoralnim i neuronalnim mehanizmima (Pacak i Palkovits, 2001). Paraventricularno jedro sadrži magnocelularne neurosekretorne ćelije, čiji se aksoni pružaju do neurohipofize, i parvocelularne neurosekretorne ćelije, sa aksonima koji se pružaju do eminencije medijane. Na taj način neuro i adenohipofiza reaguju na temperaturne promene.

Stres dovodi do sinteze CRH, koji dospeva do anteriornog regiona hipofize gde zaustavlja sintezu hormona rasta, prolaktina i gonadotropnog-rilizing hormona (GRH), a sa druge strane podstiče sintezu β -endorfina, ACTH, interleukina 1 (IL-1) i faktora nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor, TNF) (Black, 1994). Poznato je da toplotni stres stimuliše limbičke delove mozga, kao i puteve koji od ove oblasti polaze do hipotalamusa gde stimulišu sintezu CRH. Ovaj hormon, pored delovanja na kortikotropne ćelije hipofize, povećava simpatički uticaj na nadbubrežne žlezde i dovodi do oslobađanja hormona kore i srži žlezde (Monteiro i sar., 1989).

Pokazano je da reakcija pacova na termalne stresore u prvi mah vezana za simpatoadrenomedularni sistem. Međutim, ukoliko reakcija na stimulus ne može biti kontrolisana na ovaj način, organizam aktivira HPA osovину (Jasnić i sar., 2010).

Uticaj toplotnog stresa na hipofizu, posebno na njen prednji lobus nije dovoljno ispitan. Studija na miševima je pokazala povećanje nivoa kortikosterona i vazopresina u krvi, ali i nivoa kateholamina i serotonina hipotalamusa nakon izlaganja toplotnom stresu (Harikai i sar., 2003). Izlaganje pacova toplotnom stresu dovodi do povećanja koncentracija ACTH i CORT, uvećanja volumena hipofize nastalog usled uvećanja volumena posteriornog i intermedijalnog lobusa, dok je volumen anteriornog lobusa smanjen (Koko i sar., 2006; Jasnić i sar., 2010). Smanjenje lobusa nastaje kao posledica pražnjenja granula ACTH nakon CRH i AVP stimulacije (Aguilera i sar., 1996; Bornstein i Chrousos, 1999). Do povećanja koncentracije ACTH i CORT dolazi nakon izlaganja pacova toplotnom stresu u trajanju od 20 i 60 minuta (Jasnić i sar., 2010). Tretman toplotom je izazivao hiperemiju usled dilatacije malih krvnih sudova u anteriornom i posteriornom lobusu hipofize (Koko i sar., 2006; Jasnić i sar., 2010).

Istraživanja su pokazala da stres hladnoćom takođe dovodi do povećanja koncentracije ACTH. Posmatrano na nivou elektronske mikroskopije, u kortikotropnim

ćelijama broj nizova granula, kao i njihova veličina bio je uvećan (Sasaki i sar., 1990) za razliku od dejstva povećane ambijentalne temperature gde je broj granula bio smanjen.

Lechin i sar., (1996) akutno izlaganje toploti definišu kao stres praćen povećanim nivoom kortikosterona u plazmi i promenjenim odnosom noradrenalina i adrenalina. Studije o toplotnom stresu opisuju da fiziološki odgovor na termalni stres varira među vrstama, ali i u okviru istih (Sinha, 2007). Drugi bitan faktor koji utiče na odgovor na stres jeste starost organizma (Sharma, 2006) i studije pokazuju da su mladi pacovi manje osetljivi na promene nastale nakon izlaganja toplotnom stresu u poređenju sa starijim (Sharma i sar., 1998).

Efekat temperature okoline na brzinu metabolizma kod homeotermnih životinja je dosta proučavan. Postoji opseg temperatura okoline koji je označen kao termo-neutralna zona (TNZ) gde je nivo metabolizma minimalan i telesna temperature se reguliše prvenstveno modulacijom perifernog vazomotornog tona i kontrolom gubitka toplote (Romanovsky i sar., 2002). Unutar vrsta TNZ varira i zavisi od različitih bioloških faktora, kao što su zdravlje, starost, aklimatizacija, itd.. Temperatura okoline je jedan od fizičkih faktora, koji određuje razmenu toplote sa okolinom, koja se ostvaruje preko "suvih" (zračenje) ili "vlažnih" (evaporacija) mehanizama (Werner, 1998). Svaki od ovih mehanizama zavisi od jednog ili više faktora, a to su: vlažnost, brzina i pritisak vazduha (Romanovsky i sar., 2002). U zavisnosti od ovih faktora izlaganje životinja se kvalifikuje ili kao izlaganje toploti, ili kao izlaganje hladnoći. Ekstremne temperature okoline menjaju fiziologiju svih sistema u telu (Gaffin i Hubbard, 2001). Pri temperaturama između 37 i 40.4°C, dve najbitnije funkcije ćelije se menjaju, a to su povećanje kretanja jona kroz membranu i zaustavljanje sinteze proteina. Stres toplotom dovodi do propadanja citoskeleta, bubrenja mitohondrija i endoplazmatičnog retikulima (Borelli, 1984) i razdvajanja poliribozoma (McCormick i Penman, 1969; Cervera, 1978). Kada su ćelije izložene višim temperaturama dolazi do proizvodnje heat shock proteina koji omogućavaju ćelijama veću toleranciju na toplotu (Burel i sar., 1992). Mehanizam pomoću koga ovi proteini štite ćeliju odnosi se na njihovo vezivanje za pogrešno formirane proteine, čime se sprečava njihova denaturacija (Welch, 1992). Hipertermija od 41.5 do 42°C za nekoliko

minuta do par sati, u zavisnosti od tipa ćelija, dovodi do njihove apoptoze (Cummings, 1995; Sakaguchi i sar., 1995).

Istražujući efekte različitih tipova stresora (gladovanje, socijalni stres, toplotu ili hladnoću) na HPA sistem, Đorđević i sar., (2003) su potvrdili hipotezu da je odgovor HPA sistema specifičan, zavisi od tipa stresora kao i od njegovog trajanja, i takođe da uključuje različite centralne i periferne puteve i mehanizme regulacije. Tada je utvrđeno da je izlaganje pacova temperaturi od 38°C u trajanju od 60 minuta najjači od primenjenih stresora u aktivaciji HPA sistema, koji uzrokuje značajne promene u sadržaju holesterola i koncentracijama ACTH i kortikosterona.

Koko i sar., (2004) su pokazali da stres toplotom dovodi do redukcije kore nadbubrežne žlezde, naročito ZF, kao rezultat pražnjenja lipidnih kapi. Izlaganje pacova toplotnom stresu je pokazalo promene u kapilarnom sistemu nadbubrežne žlezde, dovodeći do znatnih vaskularnih dilatacija naročito u srži ove žlezde (Vlad i sar., 2010). Poznato je da ACTH ima veliki uticaj na protok krvi u nadbubrežnoj žlezdi tako što uzrokuje konstrikciju arterija srži, usmeravajući krv u koru (Harrison, 1960). Studije sa perfuzijom nadbubrežne žlezde dale su suprotne rezultate i pokazale da ACTH povećava protok u oba dela žlezde, smanjujući vaskularni otpor unutar žlezde (Hinson i sar., 1986). Ova pojava se objašnjava delovanjem mastocita koje se nalaze u kapsuli nadbubrežne žlezde na mestu penetracije arterija. Mastociti sadrže histamin i serotonin, koji se otpuštaju pri delovanju ACTH i dovode do vazodilatacije. U lokalnoj regulaciji protoka krvi utiču i azot monoksid, endotelin-1 i adrenomedulin. Tako smanjena sinteza azot monoksida, nastala usled blokade azot monoksid sintaze delovanjem inhibitora L-NAME, utiče na smanjen protok krvi pri perfuziji nadbubrežne žlezde (Cameron i Hinson, 1993). Poznato je da endotelini dovode do oslobađanja azot monoksida koji zauzvrat izaziva akutnu vazodilataciju (Cooke i Tsao, 1996). Ovakav uticaj na protok krvi kroz žlezdu azot monoksid ostvaruje putem aktiviranja cGMP sintaze (Hinson i sar., 1996). Povećan protok krvi može delovati kao stimulator steroidogeneze, a kao jedan od posrednika ovog efekta javlja se endotelin-1 (Yoshizumi i sar., 1989). Adrenomedulin stimuliše sintezu aldosterona u ćelijama zone glomeruloze putem specifičnih adrenomedulinskih receptora (Kapas i sar., 1998), dok se inhibicija ostvaruje preko CGRP receptora (Mazzocchi i sar., 1996).

I druge studije su pokazale promene u strukturi i funkciji nadbubrežne žlezde nakon akutnog ili hroničnog delovanja stresora (Pellegrini i sar., 1997; Dronjak i sar., 2004; Koldysheva i Lushnikova, 2008). Pri imobilizacionom stresu pokazano je da ACTH stimuliše ćelije kore nadbubrežne žlezde da sintetišu i oslobađaju kortikosteroide, dok CRH utiče na simpatičke nervne centre i dovodi do sinteze i oslobađanja kateholamina iz periferne ganglije i srži nadbubrežne žlezde (Rokutan i sar., 1998).

Cilj istraživanja

Dejstvo visokih temperatura na hipotalamo-hipofizno-adrenalnu osovinu predmet je mnogobrojnih fizioloških, neuroloških, biohemijskih i histoloških ispitivanja. Mali je broj literaturnih podataka o akutnom (kratkotrajnom) dejstvu visoke temperature na histološke, ultrastrukturne i stereološke karakteristike hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine pacova kao i na imunohistohemijske karakteristike peptidergičkih neurona nadbubrežnih žlezda u ovim eksperimentalnim uslovima. Uticaj kratkotrajnog delovanja visoke temperature na apoptotske i proliferativne karakteristike ćelija nadbubrežnih žlezda nije do sada ispitivan.

Velike i brze promene temperature (nagli skokovi i padovi) predstavljaju stres za organizam. Iznenadno i kratkotrajno (akutno) dejstvo visoke temperature može biti okidač za različite poremećaje na nivou hipofize i nadbubrežnih žlezda. Histološka i ultrastrukturna ispitivanja hipofize i nadbubrežnih žlezda omogućiće otkrivanje finih promena u strukturi ovih organa koji mogu ukazati na moguće patološke procese.

Zbog svega navedenog predmet ove disertacije biće ispitivanje delovanja akutnog toplotnog stresa na histološke, imunohistohemijske, ultrastrukturne, stereološke i biohemijske karakteristike adrenokortikotropnih ćelija hipofize i ćelija nadbubrežnih žlezda pacova kao ciljnih organa hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine u odgovoru na dejstvo stresora.

Imajući u vidu navedene činjenice, naučni cilj ove disertacije je ispitivanje i rasvetljavanje dejstva akutnog toplotnog stresa na:

1. histološke, imunohistohemijske i ultrastrukturne karakteristike adrenokortikotropnih ćelija hipofize,
2. histološke i ultrastrukturne karakteristike nadbubrežnih žlezda pacova,
3. kvantitativne odlike nadbubrežnih žlezda, određivane primenom stereoloških i morfometrijskih metoda na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije,
4. imunohistohemijske karakteristike peptidergičkih neurona koji su bogato zastupljeni u nadbubrežnim žlezdama pacova,
5. pojavu mogućih razlika u proliferativnim i apoptotskim procesima ćelija nadbubrežnih žlezda,

6. koncentraciju adrenokortikotropnog hormona hipofize, kao i kortikosterona, aldosterona, adrenalina i noradrenalina nadbubrežnih žlezda pacova u cirkulaciji.

Materijal i metode

Za ova istraživanja korišćeni su pacovi, mužjaci *Rattus norvegicus* Wistar soja, telesne mase 320 ± 30 g. Životinje su aklimatizovane na $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, uzgajane pod kontrolisanim uslovima osvetljenja (12 sati dan sa početkom u 6.00č- 12 sati noć sa početkom u 18.00č) sa slobodnim pristupom hrani i vodi tokom 24 časa. Životinje su raspoređene u dve grupe. Prva grupa životinja (10 pacova) korišćena je kao kontrolna, a druga grupa (takođe 10 pacova) je pre žrtvovanja bila izložena stresoru povišene ambijentalne temperature u toplotnoj komori od 38°C akutno, tokom 60 minuta. Životinje su nakon tretmana žrtvovane dekapitacijom u prepodnevnom časovima, u približno isto vreme, da bi se izbegao uticaj cirkadijalnog ritma na proučavane parametre.

Eksperimenti su sprovedeni u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja i Pravilnikom o laboratorijskim životinjama Republike Srbije, i uz odobrenje Etičkog komiteta Biološkog fakulteta. 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)“

Ispitivanja na nivou svetlosne mikroskopije

Za histološka ispitivanja su izvađene leve nadbubrežne žlezde i hipofiza. Nadbubrežne žlezde su brzo oslobođene od masnog tkiva na ledu, izmerene i fiksirane u 4% neutralnom rastvoru formalina. Po fiksaciji (24 sata) tkivo je ispirano tekućom vodom preko noći kako bi se isprali kristali formaldehida. Nakon sprovođenja kroz seriju alkohola rastućih koncentracija i ksilola, nadbubrežne žlezde su ukalupljene u paraplatsu. Hipofiza je izmerena i na isti način sprovedena do paraplasta. Nadbubrežne žlezde i hipofiza su sečeni na rotacionom mikrotomu marke „Reichert“ (Austrija). Debljina preseka je bila 5 mikrometra. Preseci nadbubrežnih žlezda su bojeni Azan trihromnim bojenjem (Heidenhain, 1968) i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom marke „Leica“ (Nemačka). U hipofizi su imunocitohemijski detektovane kortikotropne (ACTH) ćelije.

Za prikazivanje protoka krvi u nadbubrežnim žlezdama korišćena je Noveli metoda (Thomson, 1966). Preseci su stavljeni u zagrejanu 1N HCl (60⁰ C) tri minuta, ispirani u destilivanoj vodi i bojeni najpre 1% kiselim fuksinom, a zatim 1% rastvorom svetlo zelenim. Nakon dehidracije kroz alkohole rastuće koncentracije i sprovođenja kroz ksilol, preseci su montirani u DPX.

Za detekciju apoptotskih ćelija u nadbubrežnoj žlezdi korišćeno je bojenje propidijum-jodidom (Telford i sar., 1992). Preseci su najpre deparafinizovani, a zatim u kivetu bojeni propidijum-jodidom u trajanju od pola sata. Nakon dehidracije i sprovođenja kroz ksilol preseci su prekriveni glicerolom i montirani. Ovako dobijeni preparati su posmatrani na fluorescentnom mikroskopu "Leica" (Nemačka). Apoptotska jedra se razlikuju od neapoptotskih po jasno crvenoj, jakoj fluorescenciji.

Imunohistohemijska ispitivanja

Detekcija i lokalizacija kortikotropnih (ACTH) ćelija hipofize

Preseci hipofize su korišćeni za detekciju i lokalizaciju kortikotropnih (ACTH) ćelija imunohistohemijskom avidin-biotin metodom. Početni korak u ovoj metodi je blokiranje endogene peroksidaze u 3% vodonik-peroksidu. Nakon toga se preseci najpre inkubiraju sa blokirajućim serumom u trajanju od jednog sata kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje, a zatim sa primarnim antitelom (razblaženje 1:500, ABCAM UK) preko noći na 4°C. Potom su preseci inkubirani sa sekundarnim antitelom (biotinizovanim imunoglobulinima, razblaženje 1:200 Santa Cruz), a zatim sa avidin-biotin kompleksom. Biotin je obeležen sa enzimom peroksidaze rena HRP (engl. Horst Readish Peroxidase-HRP). Vizualizacija obeleženih antitela je vršena pomoću DAB-a (3,3'-diaminobenzidin). Kontrastiranje je rađeno Majerovim hematoksilinom. Nakon dehidracije preseci su kalupljeni u DPX.

Imunohistohemijaska detekcija i lokalizacija neuropeptida (VIP, NPY i SP) u nadbubrežnim žlezdama

Za detekciju i lokalizaciju neuropeptida u nadbubrežnim žlezdama korišćena je avidin-biotin metoda. Nakon procesa deparafinizacije, blokirana je endogena peroksidaza 3% vodonik-peroksidom. Zatim je demaskiranje antigena u mikrotalasnoj pećnici vršeno u citratnom puferu u trajanju od 21 minut. U sledećem koraku preseći su inkubirani jedan sat sa blokirajućim serumom, a zatim sa primarnim antitelom (razblaženje 1:500 za VIP, ABCAM UK, 1:800 za NPY, ABCAM UK i 1:250 za SP, Dako, Denmark) preko noći na 4°C. Nakon toga su preseći inkubirani sa sekundarnim antitelom (biotinizovanim imunoglobulinima, razblaženja 1:200 (Santa Cruz, CA, USA), i na kraju sa avidin-biotin kompleksom. Vizualizacija neuropeptida je rađena pomoću DAB-a (3,3'-diaminobenzedin). Kontrastiranje je izvršeno Majerovim hematoksilinom i nakon dehidratacije preseći su kalupljeni u DPX.

Imunohistohemijaska detekcija ćelija u proliferaciji

Za detekciju ćelija u proliferaciji korišćen je Ki-67 antigen. Ki-67 antigen je nukleusni protein koji se prevashodno eksprimira u G₁, S, G₂ i M fazi ćelijskog ciklusa dok ćelije u interfazi ne ekspimiraju Ki-67. Primenjeno monoklonsko antitelo miša (razblaženje 1:40, Dako, Denmark) prepoznaje epitope u jedrima ćelija u proliferaciji, tj. dva proteinska lanca povezana sa ćelijskim ciklusom od 345 kDa i 395 kDa koja su identična sa Ki-67 antigenom. Jedra ćelija u proliferaciji su se razlikovala od neproliferativnih jedara svojom tamnijom obojenošću.

Stereološka ispitivanja

Stereologija, kao metoda, ima široku primenu kako na nivou svetlosne, tako i na nivou elektronske mikroskopije. Stereološke metode u biomedicini, kao i u biologiji, omogućavaju povezivanje ćelijske strukture na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije sa biohemijskim funkcijama. Pri ispitivanju akutnog dejstva povećane ambijentalne temperature na hipofizu i nadbubrežne žlezde stereološke metode su primenjene na nivou kako svetlosne tako i elektronske mikroskopije.

Za izračunavanje volumenske i numeričke gustine, površine ćelija, dijametra i dužine krvnih sudova na presecima hipofize i nadbubrežnih žlezda korišćen je testni sistem M_{42} (Weibel, 1979). Merenja su vršena na najširim presecima tkiva na svetlosnom mikroskopu "Leica" (Nemačka).

Volumenska gustina (V_v ; mm^0) pokazuje koji deo prostora zauzima proučavana faza (struktura). Volumenska gustina (V_v) je određivana po formuli:

$$V_{vf} = P_f / P_t$$

V_{vf} = volumenska gustina ispitivane strukture

P_f = broj tačaka koje pogađaju ispitivanu strukturu

P_t = ukupan broj tačaka testnog sistema

Numerička gustina (N_v ; mm^{-3}) je izračunavana po formuli Weibel i Gomez (1962):

$$N_v = k / \beta \times ((N_a)^3 / V_v)^{1/2}$$

N_v = numerička gustina

k = korekcionni faktor za raspodelu čestica po veličini, u slučaju razmatranih ćelija iznosi 1

β = oblikovni koeficijent koji je funkcija cilindra ili elipse (za lopte $\beta=1.382$, a za elipse $\beta=1.500$)

Broj profila čestica (strukture) u ravni preseka (N_A) određivan je po formuli

$$N_a = N / A_t$$

N = ukupan broj ispitivane strukture u ravni preseka

A_t = površina analizirane strukture koja se, upotrebom mnogonamenske Weibel-ove testne mrežice, izračunavana putem obrasca:

$$A = P_t \times \sqrt{2/3} \times d^2$$

P_t = broj tačaka koje pogađaju presek

d = dužina testne linije pri odgovarajućem uvećanju

Putem istog obrazca izračunava se i **površina ćelije, odnosno jedra.**

Volumen ćelija i jedara (Rebufrrat i sar., 1987) je određivan primenom sledećih formula:

$$V_{\acute{c}j} = V_{v\acute{c}j} / N_v$$

$V_{\acute{c}j}$ (μm^3) = volumen ćelija, jedara

$V_{v\acute{c}j}$ (mm^3/mm^3) = volumenska gustina ćelija, jedara

N_v = numerička gustina ćelija, odnosno jedara

Dijametar krvnih sudova (D) za ZF i ZR je određivan po formuli:

$$D = V_{vks} / S_{vks}$$

V_{vks} (mm^3/mm^3) = volumenska gustina krvnih sudova

S_{vks} = površinska gustina krvnih sudova

$$S_{vks} = 2I / L_t$$

I = broj intersekcija na krvnim sudovima

L_t (μm) = ukupna dužina testnih linija

Dužina krvnih sudova (L) je izračunavana po formuli:

$$L = 4/\pi \times V_{vks} / D$$

Volumenska gustina analizirane strukture na elektronskom nivou je izračunavan po formuli:

$$V_{vf} = P_f / P_t$$

V_{vf} = volumenska gustina ispitivane strukture

P_f = broj tačaka koje pogađaju ispitivanu strukturu

P_t = ukupan broj tačaka testnog sistema

Površina analizirane strukture na elektronskom nivou je određivana po formuli:

$$A_t = P_t \times d^2$$

P_t = broj tačaka koje pogađaju presek

d = dužina testne linije pri odgovarajućem uvećanju

Broj profila čestica (strukture) u ravni preseka (N_A) na elektronskom nivou izračunavan je po formuli:

$$N_a = \Sigma N / \Sigma A_t$$

ΣN = ukupan broj ispitivane strukture u ravni preseka

A_t = površina analizirane strukture

Ispitivanja na nivou transmisionog elektronskog mikroskopa

Za ultrastrukturalna ispitivanja hipofiza i desne nadbubrežne žlezde su fiksirane u 4% glutaraldehidu u 0.1 M fosfatnom puferu. Postfiksacija je vršena u 1% OsO_4 u istom fosfatnom puferu, zatim su tkiva kontrastirana u 0.25% vodenom rastvoru uranil-acetata preko noći na 4°C. Nakon sprovođenja kroz seriju alkohola uzlazne koncentracije i propilen oksida, tkiva su ukalupljena u EPON smole. Preseci od 1 mikrometra su sečeni na UC6 ultramikrotomu (Nemačka) i bojeni toluidin plavim za posmatranja pod svetlosnim mikroskopom. Za ultrastrukturalna ispitivanja preseci debljine 50-80 nm kontrastirani su olovo-citratom i posmatrani na elektronskom mikroskopu Philips CM 12 (Holandija).

Biohemijska ispitivanja

Za merenje koncentracija ACTH, adrenalina i noradrenalina korišćena je plazma, a za nivoe kortikosterona i aldosterona serum.

Pripremanje plazme

U ohlađene epruvete sakupljani su uzorci krvi zajedno sa EDTA. Odvajanje plazme je vršeno centrifugiranjem na 3000 obrtaja u trajanju od 5 minuta. Izdvojena plazma je odvajana u male ependorfe i zamrzavana na -80°C sve do upotrebe.

Pripremanje seruma

U staklenim epruvetama prikupljani su pojedinačni uzorci krvi koji su ostavljeni na sobnoj temperaturi. Nakon koagulacije izdvojen je serum i ostavljen u malim ependorfima na -80°C do upotrebe.

Merenje koncentracije ACTH

Koncentracija ACTH je određivana u plazmi pomoću IMMULATE 1000 ACTH hemiluminiscentne imunometričke probe (DPC, Los Angeles, USA). Osetljivost probe je na 9 pg/ml. U ovom postupku monoklonska mišija ACTH antitela se inkubiraju sa uzorcima nepoznate koncentracije. Tom prilikom dolazi do vezivanja ACTH iz uzorka za monoklonska anti-ACTH antitela. Centrifugiranjem se ispira nevezani višak. Nakon toga se uvode poliklonska zečija anti-ACTH antitela obeležena alkalnom fosfatazom. Tada dolazi do specifičnog vezivanja za već formirane antigen-antitelo komplekse. Ponovo se višak enzimskog konjugata odstranjuje. U sledećem koraku dodaje se hemiluminiscentni supstrat (fosfatni estar adamantil dioksetana) koji u prisustvu alkalne fosfataze podleže hidrolizi, formirajući nestabilni intermedijarni produkt. Stalno stvaranje ovog produkta rezultuje

kontinuiranom emisijom svetla. Fotonska emisija se beleži luminometrom i proporcionalna je koncentraciji ACTH u plazmi.

Konstrukcijom standardne krive (zavisnosti koncentracije ACTH standarda i emisije fotona) i upoređivanjem vrednosti dobijenih za uzorak očitava se nepoznata koncentracija ACTH u plazmi.

Merenje koncentracije kateholamina

Određivanje koncentracije kateholamina u plazmi je vršeno pomoću 3 CAT EIA kita.

Adrenalin i noradrenalin se izoluju koristeći gel koji ih prevodi u acilisane forme, N-aciladrenalin i N-acilnoradrenalin. Nakon toga se pomoću enzima prevode u N-acilmetanefrin i N-acilnormetanefrin. Acilisani kateholamini iz uzorka i čvrste faze vezuju kateholamine pri kompeticiji za određeni broj antiserumskih-vezujućih mesta. Nevezani antigeni i antigen-antiserum kompleksi se ispiraju. Antitela se vezuju za kateholamine pri čemu se detekcija vrši pomoću anti-zečjeg IgG-peroksidaznog konjugata koristeći TMB (3', 5'-tetrametilbenzidin) kao supstrat.

Reakcija se očitava preko broja vezanih antitela za kateholamine koji je obrnuto proporcionalan koncentraciji kateholamina u uzorku.

Merenje koncentracije kortikosterona

Koncentracija kortikosterona je određivana u serumu putem kortikosteron ELISA testa.

Najpre se vrši inkubacija standarda, kontrole i razblaženih uzoraka sa enzimom peroksidaze rena preko noći na 28°C. Nakon toga se vrši ispiranje i boja se razvija koristeći TMB (3', 5'-tetrametilbenzidin) kao hromogeni substrat. Merenje apsorbance se vrši na 450 nm. Koristeći standardnu krivu preko izmerene apsorbance određuju se nepoznate koncentracije kortikosterona. Koncentracija kortikosterona je obrnuto proporcionalna izmerenoj apsorbanci.

Merenje koncentracije aldosterona

Koncentracija aldosterona je određivana u serumu putem aldosteron ELISA testa.

Najpre se vrši inkubacija standarda, kontrole i razređenih uzoraka sa enzimom peroksidaze rena u trajanju od jednog sata na 28°C. Zatim se vrši ispiranje i boja se razvija koristeći TMB (3-3', 5-5'-tetrametilbenzidin) kao hromogeni supstrat. Merenje apsorbance se vrši na 450 nm. Nepoznate koncentracije aldosterona određuju se preko izmerene apsorbance koristeći standardnu krivu. Koncentracija aldosterona je obrnuto proporcionalna izmerenoj apsorbanci.

Statistika. Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška. Student-ov t-test je korišćen za procenu statističke značajnosti između grupa.

Rezultati

Uticaj toplotnog stresa na telesnu masu i temperaturu životinja

Pre izlaganja toplotnom stresu, telesne mase i temperature pacova iz kontrolne i eksperimentalne grupe bile su približno jednakih vrednosti. Kratkotrajno izlaganje povišenoj ambijentalnoj temperaturi (38°C, 60 min) dovelo je do blagog sniženja mase životinja, uz značajno povećanje temperature tela (Tabela 1).

Tabela 1. Uticaj tretmana na telesnu masu i temperaturu životinja

	Kontrola	Tretman
Masa tela (g)		
pre tretmana	304.0 ± 6.3	313.0 ± 8.4
posle tretmana		302.0 ± 8.1
Temperatura tela (°C)		
pre tretmana	38.2 ± 0.1	38.1 ± 0.1
posle tretmana		41.8 ± 0.1***

*** statistička značajnost $p < 0.001$.

Uticaj toplotnog stresa na hipofizu pacova

Uticaj kratkotrajnog izlaganja povišenoj temperaturi spoljne sredine na hipofizu ispitan je primenom biohemijskih, histoloških, imunohistohemijskih metoda i metoda elektronske mikroskopije. Zapažene promene kvantifikovane su primenom morfometrijskih i stereoloških metoda, na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije.

U Tabeli 2. prikazane se apsolutna i relativana masa hipofize.

Tabela 2. Uticaj toplotnog stresa na masu hipofize

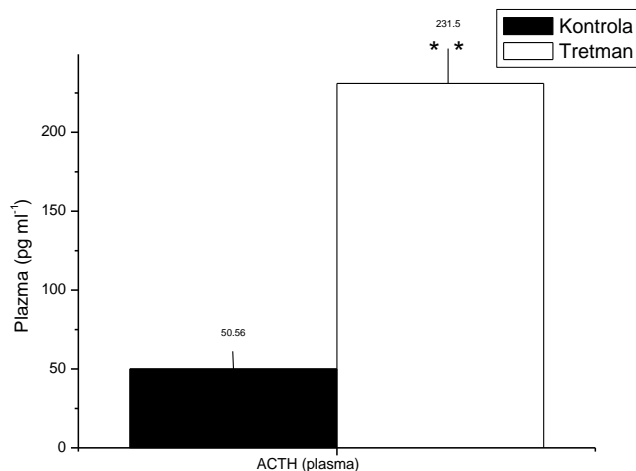
	Kontrola	Tretman
Apsolutna masa hipofize (mg)	12.5 ± 0.3	14.1 ± 0.8
Relativna masa hipofize (g/100g telesne mase)	4.1 ± 0.1	4.8 ± 0.4

Rezultati pokazuju da je akutni toplotni stres doveo do neznatnog povećanja apsolutne i relativne mase hipofize, bez statističke značajnosti.

Uticaj toplotnog stresa na nivo ACTH u plazmi

Histogram 1. prikazuje koncentraciju ACTH u plazmi pacova iz kontrolne i eksperimentalne grupe životinja. Sa histograma se jasno vidi značajno uvećanje koncentracije ACTH nakon izlaganja pacova povišenoj temperaturi.

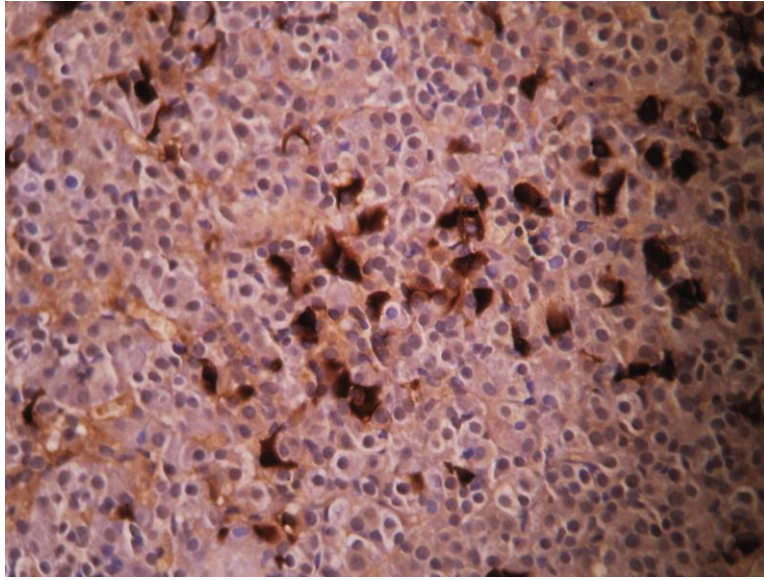
Histogram 1. Uticaja toplotnog stresa na nivo ACTH u plazmi



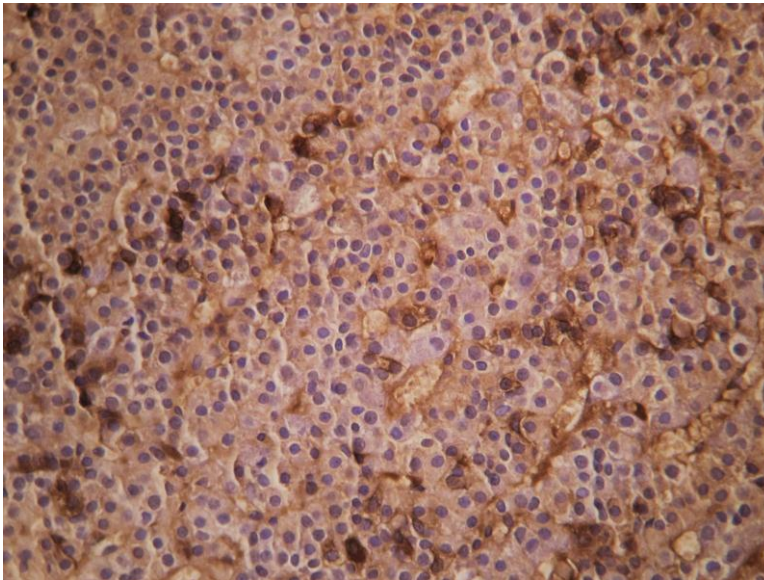
**** statistička značajnost $p < 0.01$**

Imunohistohemijska analiza uticaja toplotnog stresa na hipofizu - detekcija ACTH ćelija

Kortikotropne ćelije odlikuju se nepravilnim oblikom: ovalnim, zvezdastim ili poligonalnim. Često se uočava prisustvo jednog ili više citoplazmatičnih nastavaka različite dužine i debljine. Oni se pružaju između ostalih ćelija hipofize ili obuhvataju susedne ćelije. U kontrolnoj grupi, ACTH ćelije su brojne, sa dosta hromogenog depozita u citoplazmi (Sl. 4). Posle tretmana toplotom ACTH ćelije su manje brojne, a imunopozitivnost je blaža (Sl. 5).



Slika 4. Imunohistohemijski obeležene ACTH ćelije hipofize kontrolne grupe pacova (avidin-biotin metoda, uvećanje 400x)



Slika 5. Imunohistohemijski obeležene ACTH ćelije hipofize pacova posle toplotnog stresa (avidin-biotin metoda, uvećanje 400x)

Morfometrijska i stereološka analiza uticaja toplotnog stresa na hipofizu

Rezultati morfometrijske i stereološke analize hipofize i ACTH ćelija dobijeni na nivou svetlosne mikroskopije prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Rezultati morfometrijske i stereološke analize hipofize i ACTH ćelija pacova iz kontrolne i eksperimentalne grupe

	Kontrola	Tretman
Volumen hipofize (mm³)	11.88 ± 0.3	13.40 ± 0.9
Volumenske gustine (mm⁰)		
ACTH ćelija	0.04±0.004	0.04±0.007
ACTH jedara	0.018 ± 0.001	0.02 ± 0.001***
Volumen (µm³)		
ACTH ćelija	551 ± 24.4	568 ± 50.4
jedara	215 ± 23.7	263 ± 27.6
N_A ćelija (N/mm²)	452 ± 22.4	414 ± 34.8
N_V ćelija (N/mm³)	885 ± 21.1	773 ± 47.3
Površina profila ćelije (µm²)	112 ± 7.0	110 ± 8.0

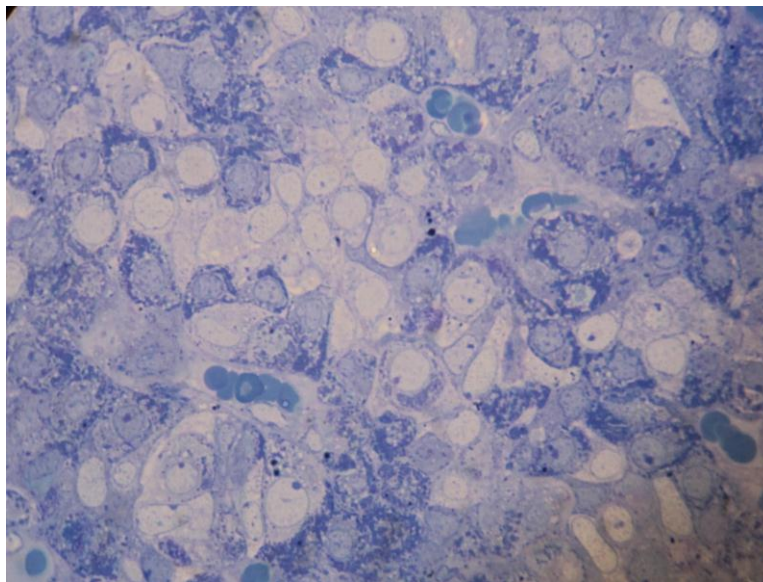
*** statistička značajnost $p < 0.001$

Primenjeni tretman doveo je do statistički značajnog uvećanja volumenske gustine jedara ACTH ćelija. Vrednosti ostalih ispitivanih parametara nisu značajno promenjene mada je uočeno blago uvećanje volumena hipofize i volumena ACTH ćelija i njihovih jedara, kao i smanjenje broja ACTH ćelija po jedinici površine i zapremine.

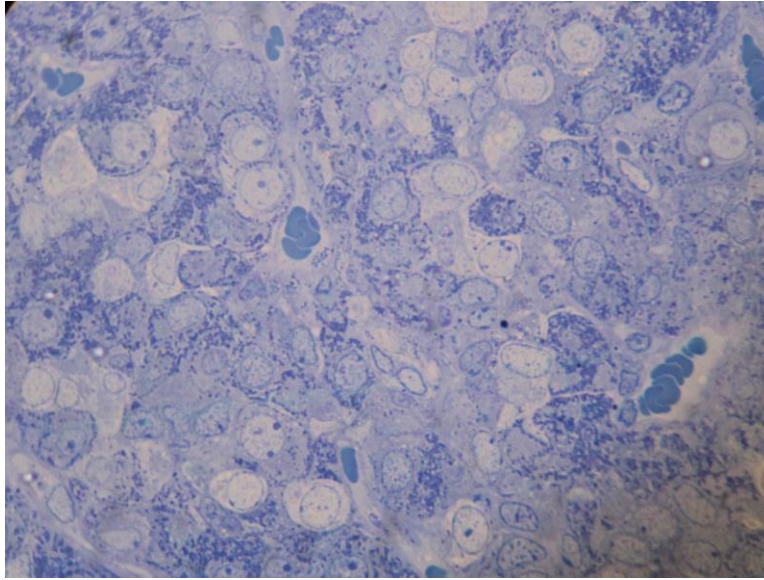
Ultrastruktorna analiza uticaja toplotnog stresa na hipofizu

Na polutankim presecima obojenim toluidinskim plavim lokalizovane su ACTH ćelije (Sl. 6 i 7), a zatim je odabrani deo tkiva sečen i pripremljen za posmatranje pod elektronskim mikroskopom.

Na polutankim presecima se u obe grupe pacova uočavaju svetlije obojene ACTH ćelije nepravilnog oblika koje svojim procesusima "grle" susedne ćelije.

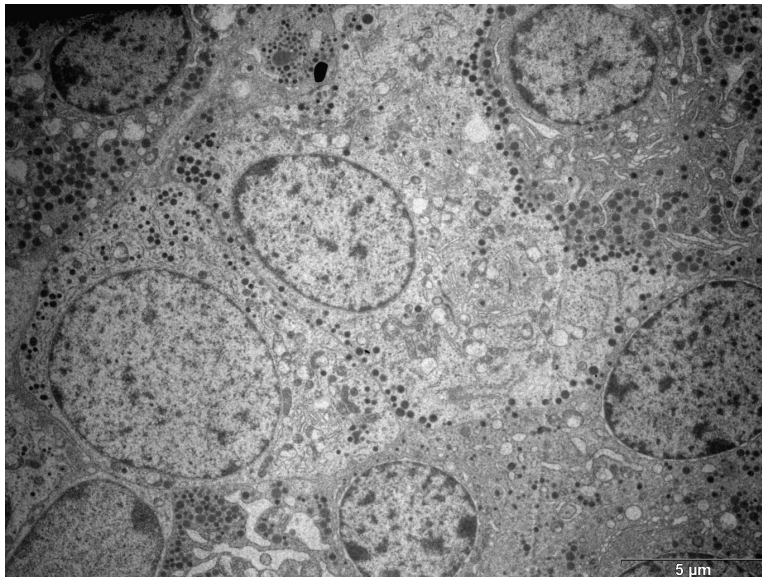


Slika 6. Polutanki preseki ACTH ćelija kontrolnih pacova (toluidin plavo, uvećanje 1000 x)

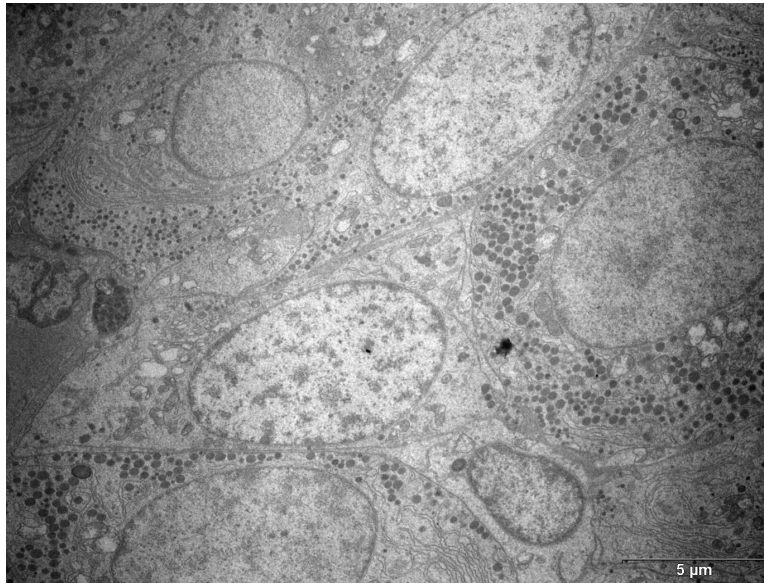


Slika 7. Polutanki preseći ACTH ćelija pacova posle toplotnog stresa (toluidin plavo, uvećanje 1000 x)

ACTH ćelije kontrolne i eksperimentalne grupe pacova nepravilnog su oblika sa brojnim procesusima (Sl. 8 i 9). U neposrednoj blizini ćelijske membrane, u sloju, nalaze se sekretne granule čija je zastupljenost manja posle toplotnog stresa (Sl. 9).

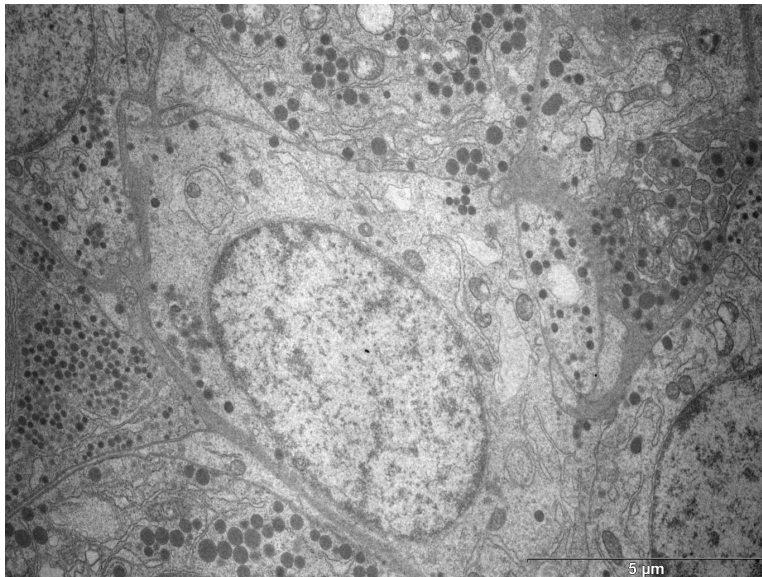


Slika 8. Ultrastruktura ACTH ćelija kod pacova iz kontrolne grupe (uranil-acetat, olovocitrat, uvećanje 3400x)

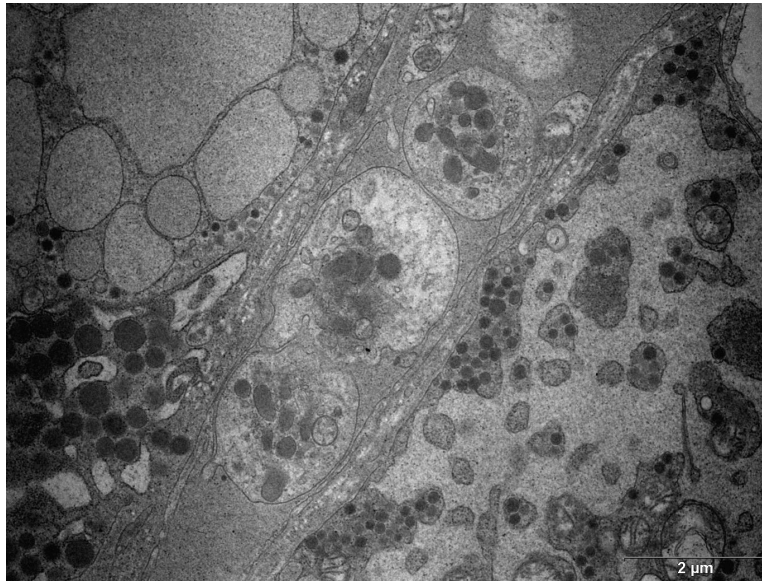


Slika 9. Ultrastruktura ACTH ćelija kod pacova posle toplotnog stresa (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)

U ACTH ćelijama pacova akutno izloženih visokoj temperaturi, zapažena je dilatacija cisterni endoplazminog retikuluma i Goldžijevog aparata (Sl. 10). Pored toga, u krvnim sudovima primećena je agregacija krvnih pločica (Sl. 11).



Slika 10. Dilatacija cisterni endoplazmatičnog retikuluma i Goldžijevog aparata (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 5400x)



Slika 11. Agregacija krvnih pločica u kapilarima (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 8800x).

Uticaj toplotnog stresa na nadbubrežne žlezde

Uticaj kratkotrajnog izlaganja povišenoj temperaturi spoljne sredine na nadbubrežne žlezde ispitivan je primenom biohemijskih, histoloških, imunohistohemijskih metoda i metoda elektronske mikroskopije. Zapažene promene kvantifikovane su primenom morfometrijskih i stereoloških metoda, na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije.

Masa nadbubrežnih žlezda

Tabela 4. prikazuje uticaj izlaganja toplotnom stresu na masu nadbubrežnih žlezda.

Tabela 4. Uticaj tretmana na masu nadbubrežnih žlezda

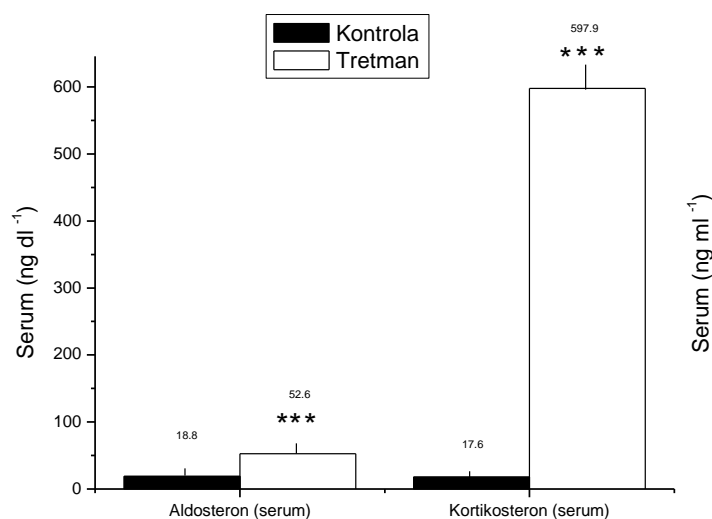
	Kontrola	Tretman
Apsolutna masa nadbubrežne žlezde (mg)	30.6 ± 2.2	31.8 ± 3.1
Relativna masa nadbubrežne žlezde (g/ 100g telesne mase)	10.0 ± 0.7	10.6 ± 1.1

Akutno izlaganje povišenoj temperaturi spoljne sredine nije značajno uticalo na promenu apsolutne i relativne mase nadbubrežnih žlezda, u poređenju sa kontrolnim vrednostima.

Uticaj toplotnog stresa na nivo hormona nadbubrežnih žlezda u cirkulaciji

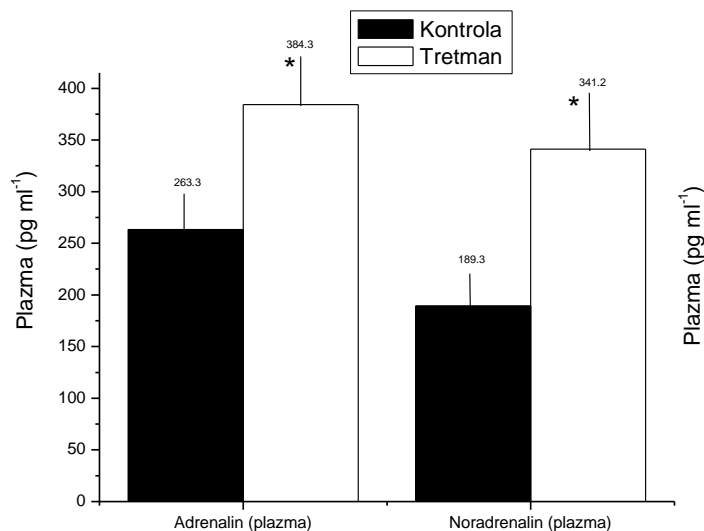
Histogrami 2. i 3. prikazuju koncentracije hormona kore i srži nadbubrežnih žlezda pre i posle stresa.

Histogram 2. Uticaj toplotnog stresa na koncentracije aldosterona i kortikosterona u serumu



*** statistička značajnost $p < 0.001$

Histogram 3. Uticaj toplotnog stresa na koncentracije adrenalina i noradrenalina u plazmi pre i posle stresa

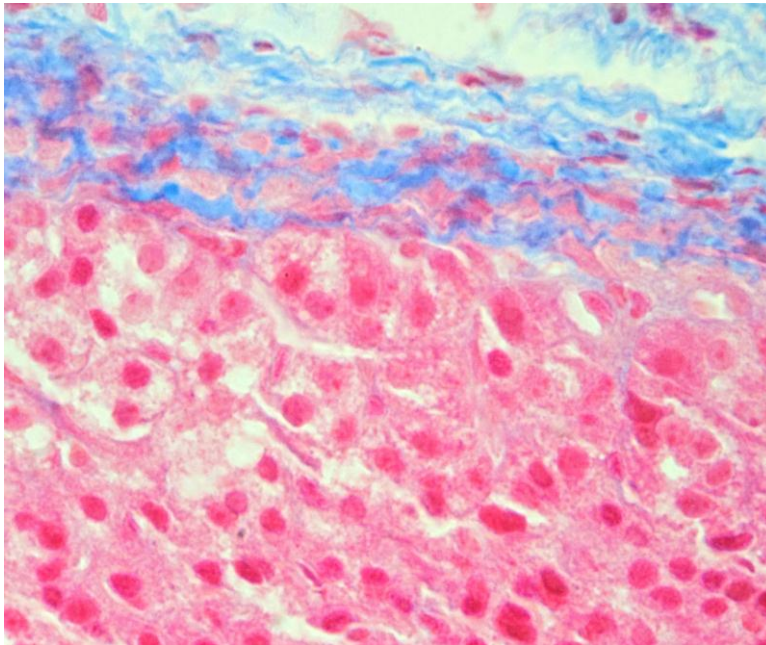


* statistička značajnost $p < 0.05$

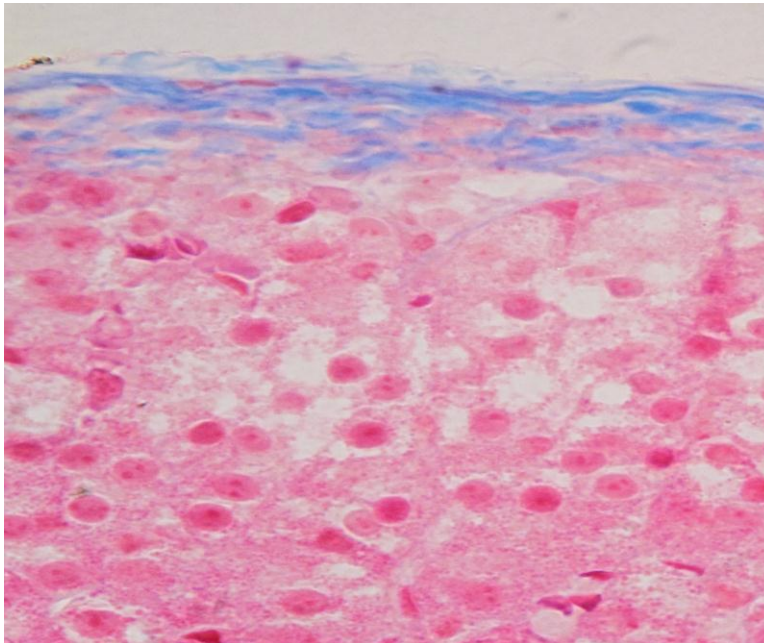
Primenjeni tretman doveo je do statistički značajnog povećanja nivoa svih ispitivanih hormona u cirkulaciji.

Histološka analiza kore nadbubrežnih žlezda

Ćelije zone glomeruloze (ZG) su višegaonog oblika, sa centralno postavljenim jedrom i svetlom citoplazmom ispunjenom lipidnim kapima (Sl. 12). Nakon toplotnog stresa, na nivou svetlosne mikroskopije, ZG ne pokazuje bitnije histološke promene u odnosu na kontrolnu grupu. Ćelije ove zone imaju svetlu citoplazmu, sa malo lipidnih kapi. Većina jedara je euhromatska, a u pojedinim jedrima uočavaju se dva nukleolusa (Sl. 13). Može se zapaziti sa histoloških slika da je kapsula nadbubrežne žlezde izrazito smanjena u životinja izlaganih toplotnom stresu.

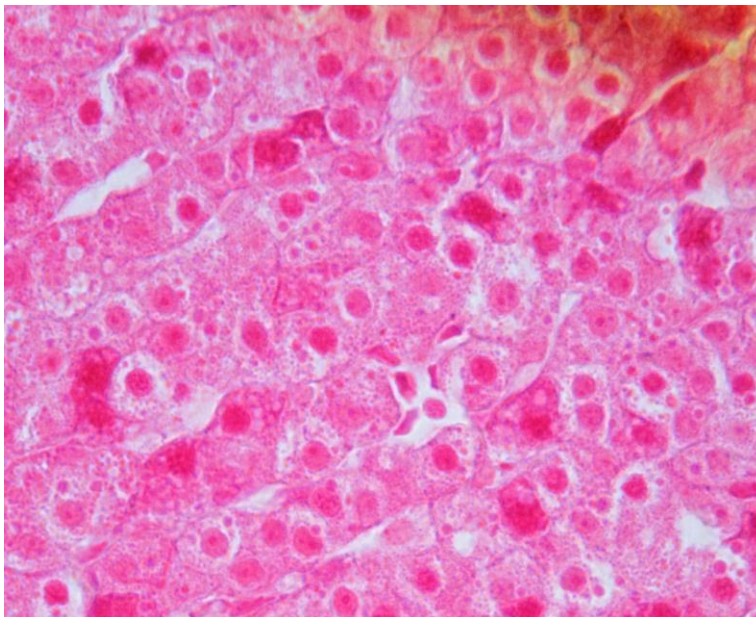


Slika 12. Izgled ćelija ZG u kontrolnoj grupi pacova (Azan bojenje, uvećanje 1000x)

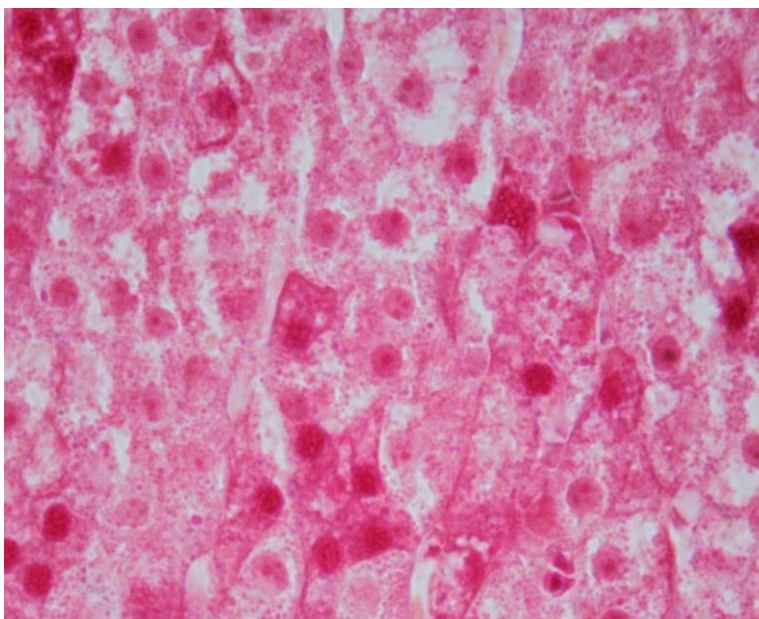


Slika 13. Izgled ćelija ZG u eksperimentalnoj grupi pacova (Azan bojenje, uvećanje 1000x)

Zonu fascikulatu (ZF) čine ćelije ispunjene brojnim lipidnim kapljicama (Sl. 14). Nakon tretmana toplotom u ZF uočavaju se svetle i tamne ćelije. Svetle ćelije su veće od tamnih, sa brojnim lipidnim kapima, a jedra su im euhromatska (Sl. 15).

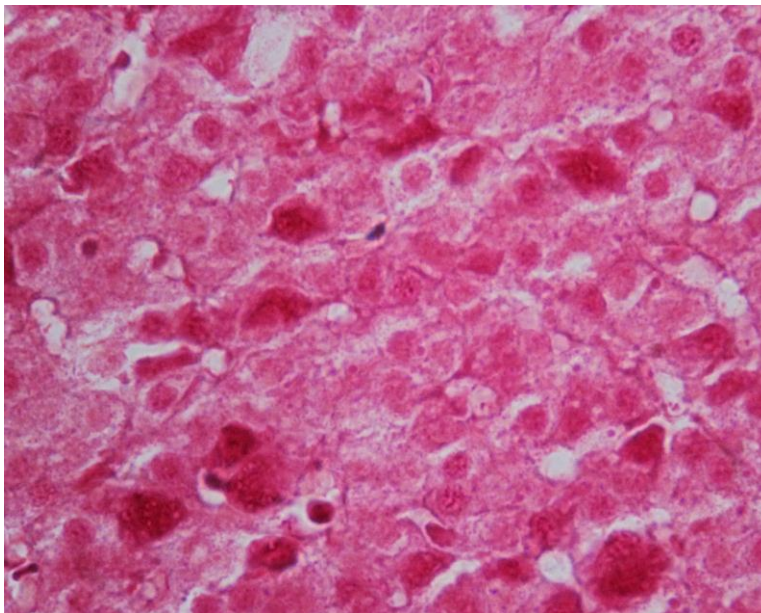


Slika 14. Izgled ćelija ZF u kontrolnoj grupi pacova (Azan bojenje, uvećanje 1000x)

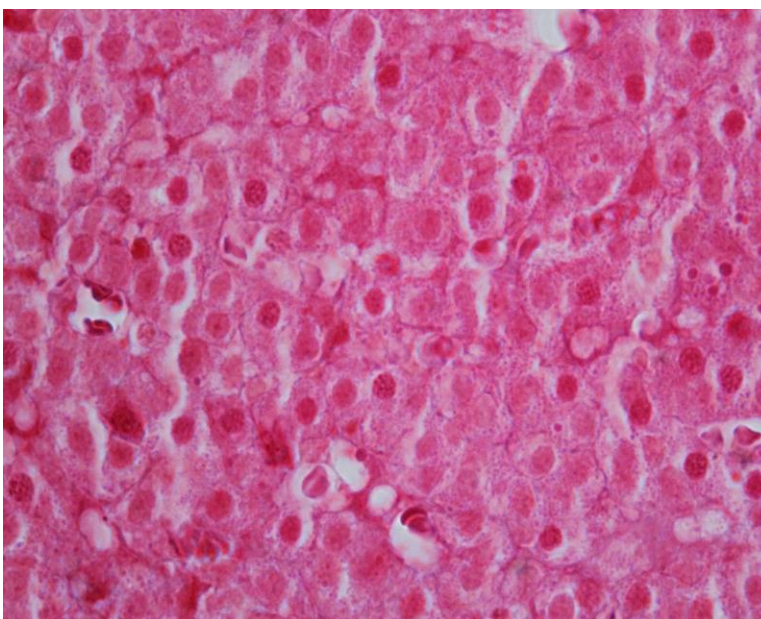


Slika 15. Izgled ćelija ZF u eksperimentalnoj grupi pacova (Azan bojenje, uvećanje 1000x)

Ćelije zone retikularis (ZR) su višougaoznog oblika i manje po veličini od ćelija ostalih zona (Sl. 16). Nakon toplotnog stresa u ZR se ne uočavaju bitnije histološke promene (Sl. 17).

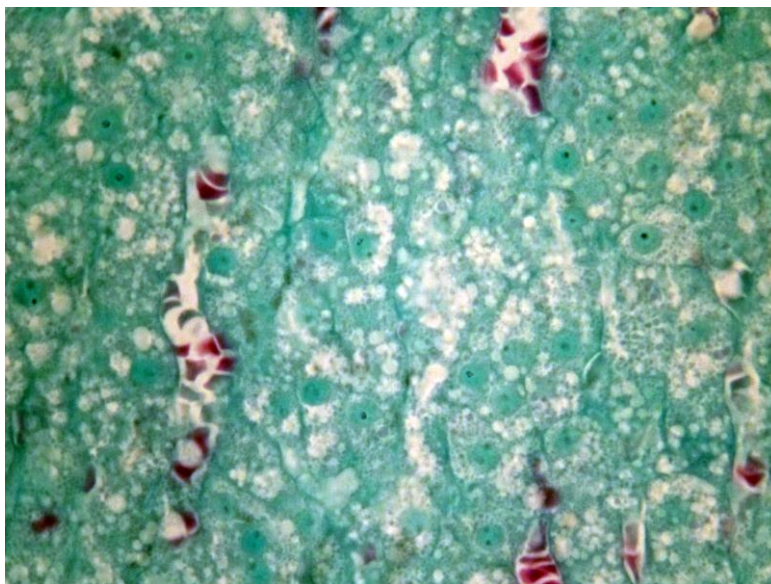


Slika 16. Ćelije ZR u kontrolnoj grupi životinja (Azan bojenje, uvećanje 1000x)

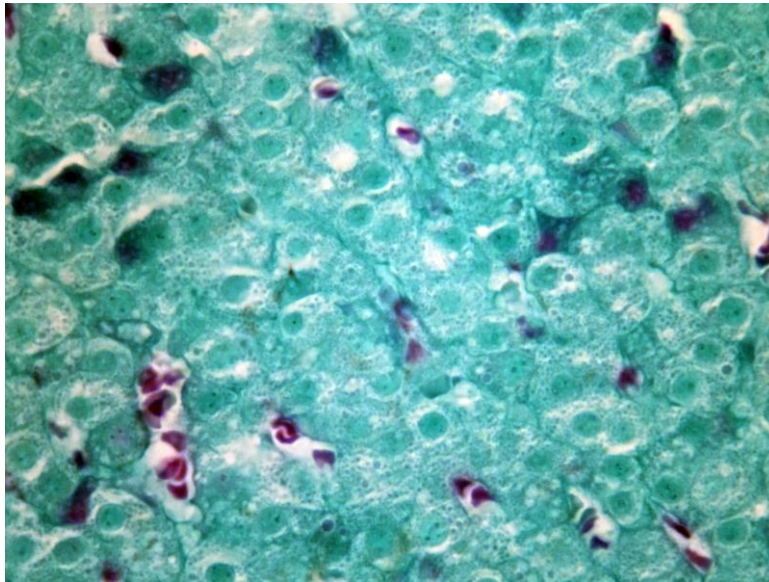


Slika 17. Ćelije ZR kore nadbubrežne žlezde u eksperimentalnoj grupi životinja (Azan bojenje, uvećanje 1000x)

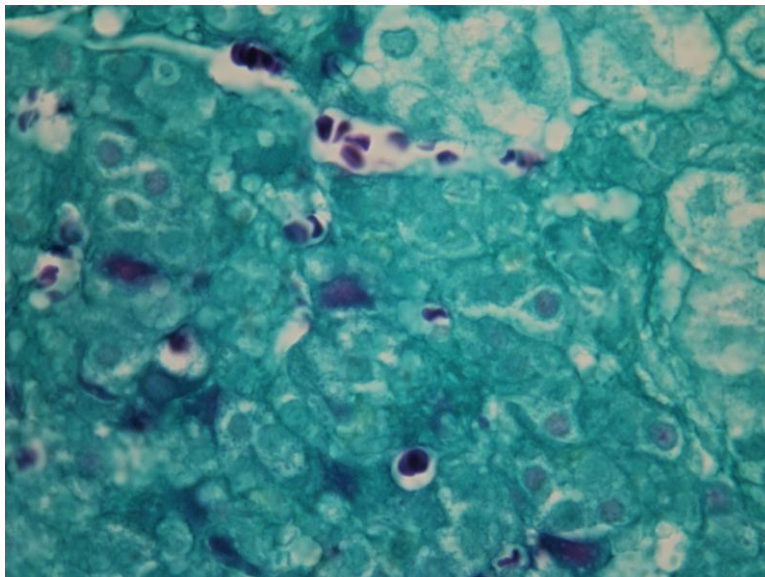
Prokrvljenost tkiva procenjivana je Novelijevim metodom na osnovu brojnosti i prisustva eritrocita u krvnim sudovima ispitivanog tkiva. U ZF i ZR nadbubrežnih žlezda roze-crveni profili eritrocita se jasno uočavaju na svetlozelenoj podlozi tkiva. Prisustvo eritrocita u krvnim sudovima u ZF i ZR pacova kontrolne grupe prikazano je na slikama 18 i 20. Zapaža se izuzetno dobra prokrvljenost ove dve zone u kori nadbubrežne žlezde. Nakon toplotnog stresa u ZF uočeno je da su kapilari suženi (Sl. 19 i 21).



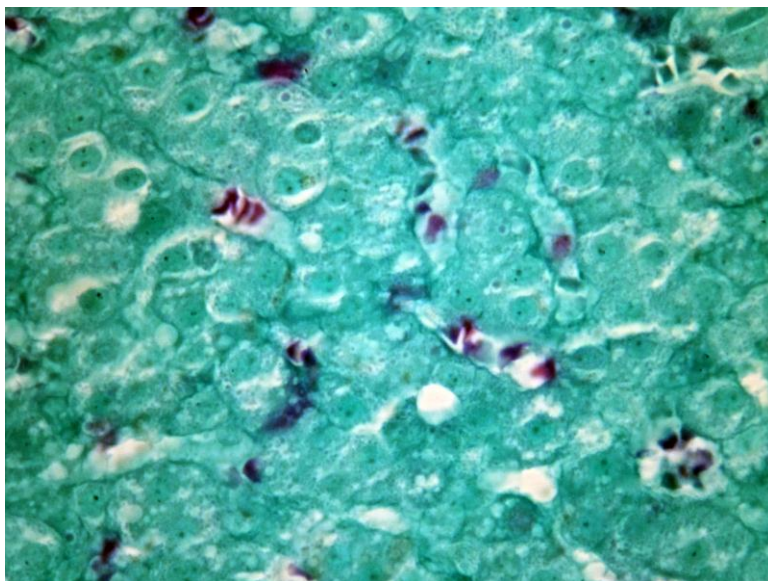
Slika 18. Protok krvi u ZF kontrolne grupe životinja (Noveli bojenje, uvećanje 1000x)



Slika 19. Protok krvi u ZF eksperimentalne grupe životinja (Noveli bojenje, uvećanje 1000x)



Slika 20. Krvni sudovi u ZR kontrolne grupe pacova (Noveli bojenje, uvećanje 1000x)

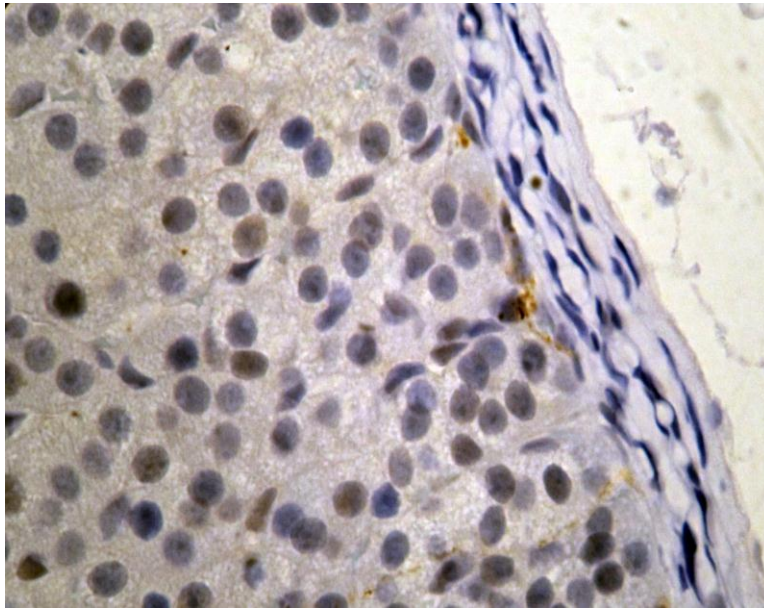


Slika 21. Krvni sudovi u ZR eksperimentalne grupe pacova (Noveli bojenje, uvećanje 1000x)

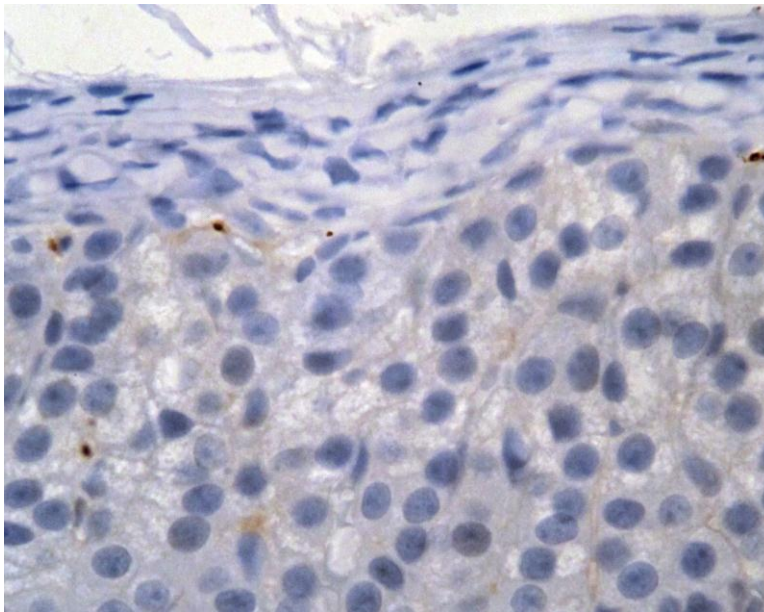
Imunohistohemijska detekcija peptidergičkih neurona u kori nadbubrežnih žlezda

U kori nadbubrežnih žlezda pacova bogato su zastupljeni peptidergički neuroni. Primenom imunohistohemijskih metoda ispitivan je uticaj toplotnog stresa na prisustvo VIP, NPY i SP regulatornih peptida u njima.

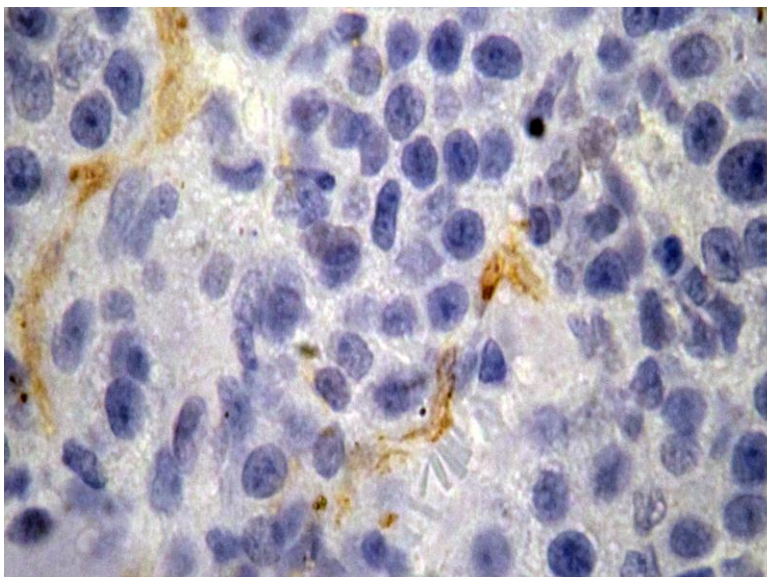
VIP imunoreaktivnost pokazana je u nervima koji prolaze kroz kapsulu i koru nadbubrežnih žlezda životinja kontrolne grupe (Sl. 22 i 24). Posle toplotnog stresa, imunopozitivnost na VIP je slabija, a nervna vlakna su tanja, što ukazuje na njihovo povećano izlučivanje (Sl. 23 i 25).



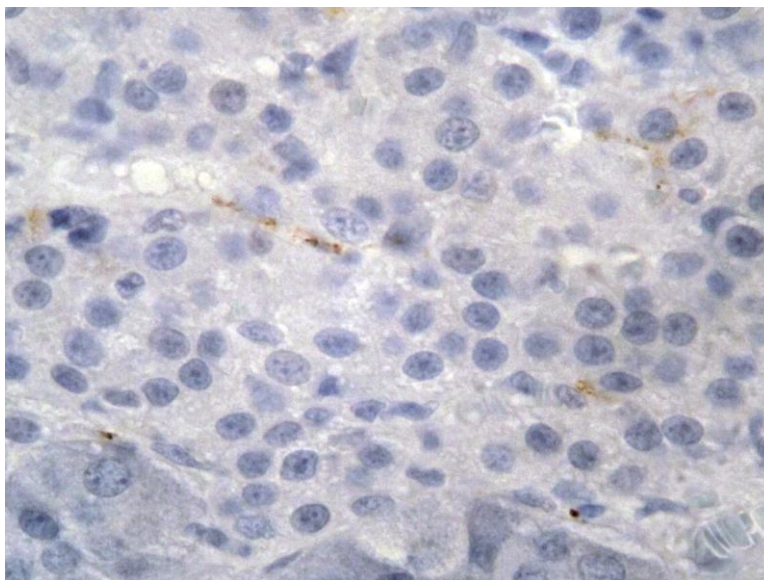
Slika 22. VIP nervna vlakna u kapsuli kontrolne grupe pacova (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)



Slika 23. VIP nervna vlakna u kapsuli eksperimentalne grupe pacova (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

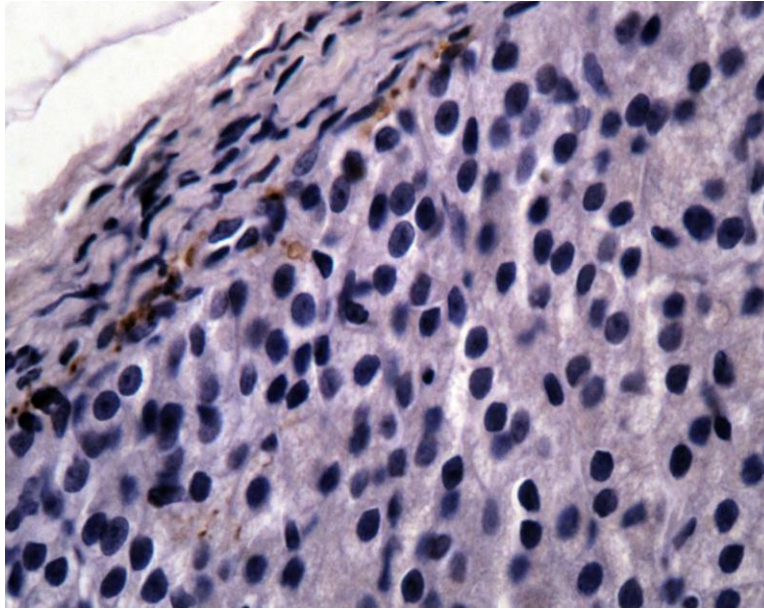


Slika 24. VIP nervna vlakna u kori nadbubrežne žlezde kontrolnih pacova (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

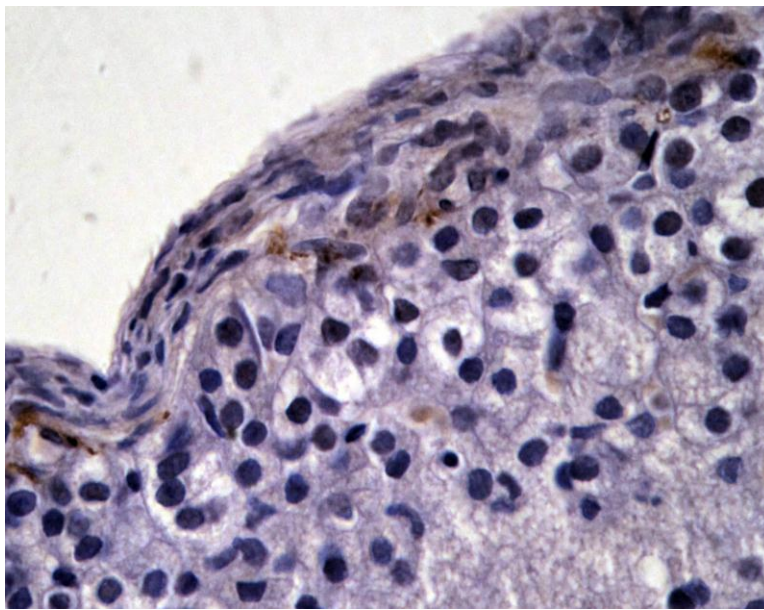


Slika 25. VIP nervna vlakna u kori nadbubrežne žlezde nakon toplotnog stresa (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

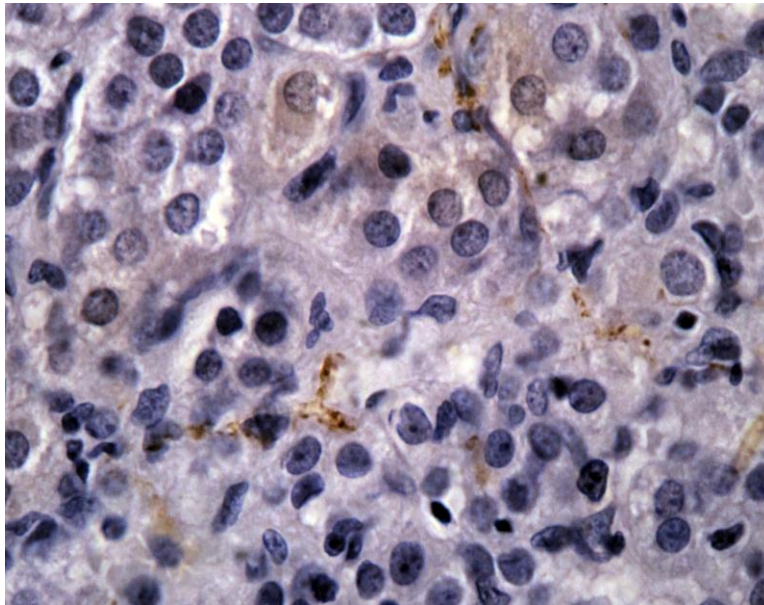
NPY imunoreaktivnost se uočava u nervnim vlaknima kapsule i kore nadbubrežnih žlezda pacova kontrolne grupe (Sl. 26 i 28). Nakon toplotnog stresa, NPY imunoreaktivnost je bila slabije izražena, a nervna vlakna su bila tanja (Sl. 27 i 29).



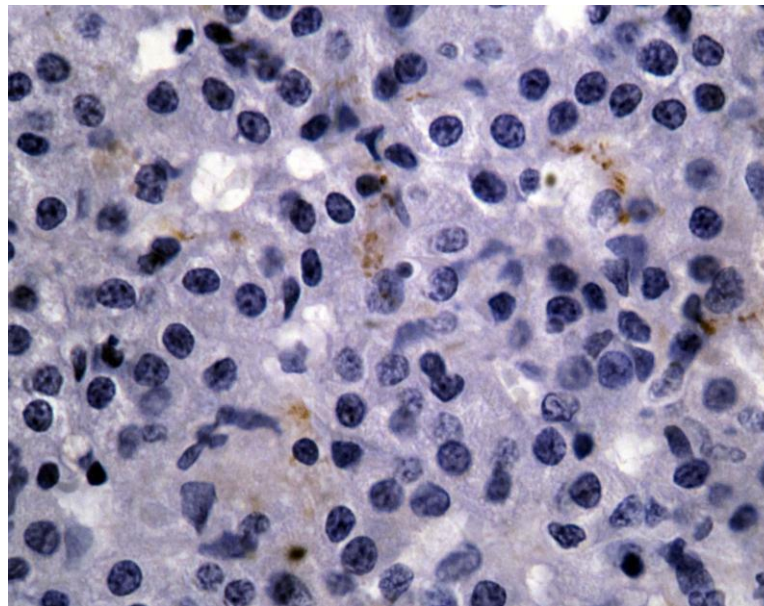
Slika 26. NPY nervna vlakna u kapsuli nadbubrežne žlezde pacova kontrolne grupe (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)



Slika 27. NPY nervna vlakna u kapsuli nadbubrežne žlezde pacova eksperimentalne grupe (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)



Slika 28. NPY reaktivna nervna vlakna u kori nadbubrežne žlezde kontrolne životinje (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

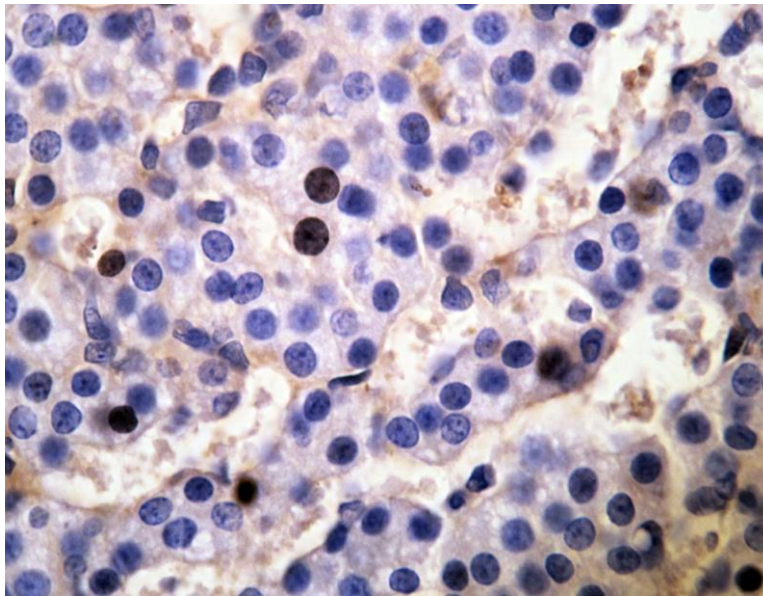


Slika 29. NPY reaktivna nervna vlakna u kori nadbubrežne žlezde posle toplotnog stresa (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

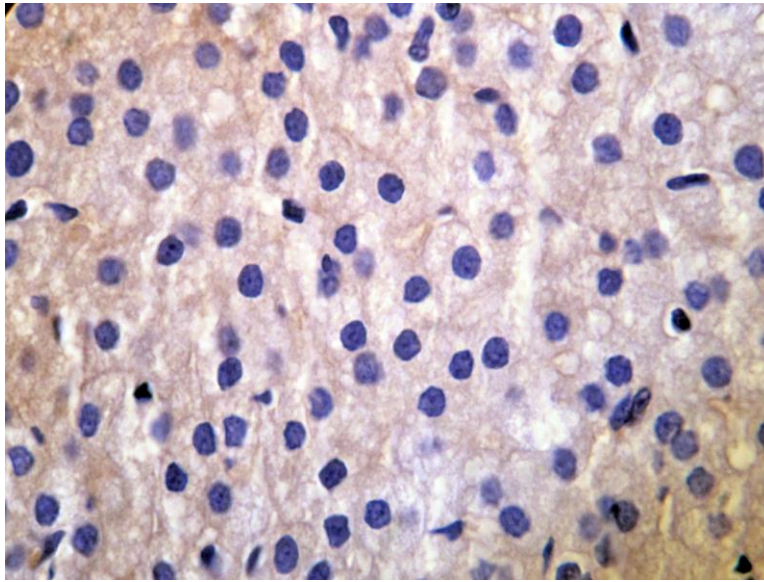
U kori nadbubrežnih žlezda nisu uočena SP reaktivna vlakna.

Uticaj toplotnog stresa na proliferativne i apoptotske procese u kori nadbubrežnih žlezda

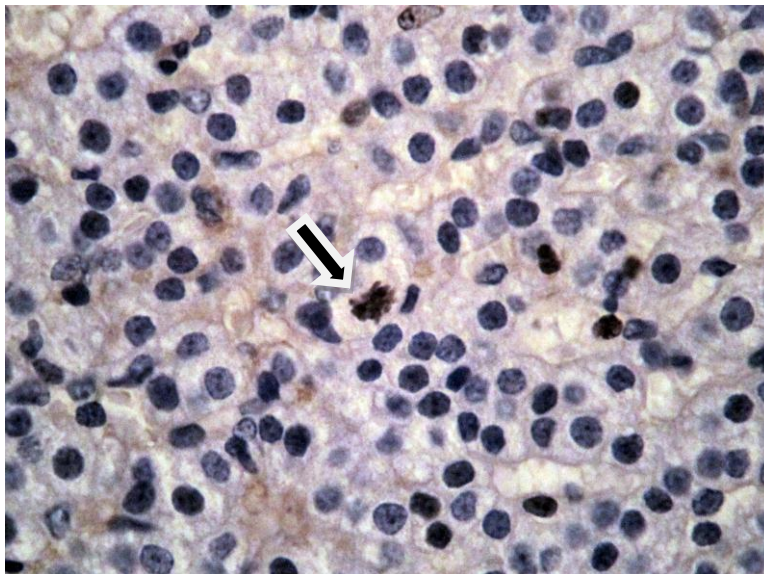
Proliferativni procesi u kori nadbubrežnih žlezda u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi životinja ispitivani su imunocitohemijski, upotrebom anti-Ki-67 antitela koje se vezuje za jedra koja će ući u mitozu ili se već nalaze u fazi deobe. U kori nadbubrežne žlezde životinja iz kontrolne grupe, najveći broj jedara imunopozitivnih na Ki-67 zapažen je u ZR (Sl. 30), dok su druge dve zone sadržale mali broj markiranih jedara. U ZR moguće je bilo zapaziti mitotičke hromozome (Sl. 32). Nakon toplotnog stresa, u ćelijama kore nadbubrežnih žlezda se ne opažaju jedra obeležena anti-Ki-67 antitelom, što ukazuje na izostanak proliferativnih procesa (Sl. 31).



Slika 30. Jedra ćelija kore nadbubrežnih žlezda obeležena anti-Ki-67 antitelom pre toplotnog stresa (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

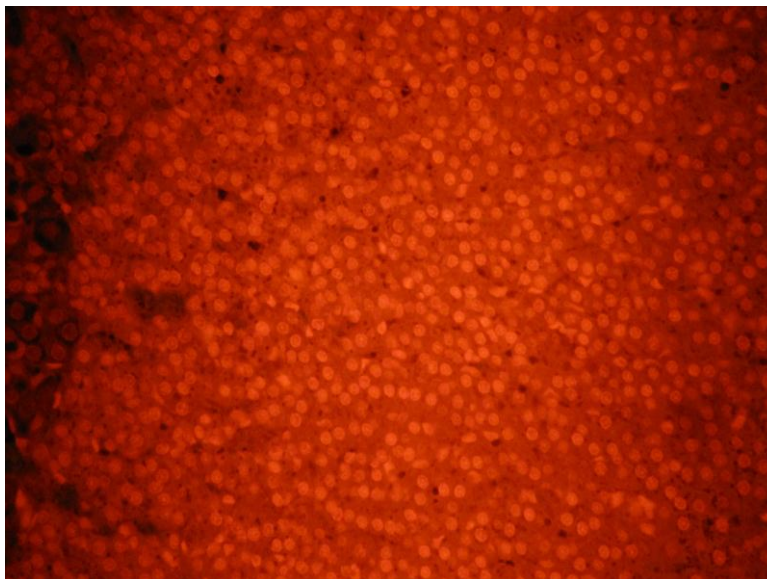


Slika 31. Jedra ćelija kore nadbubrežnih žlezda obeležena anti-Ki-67 antitelom posle toplotnog stresa (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

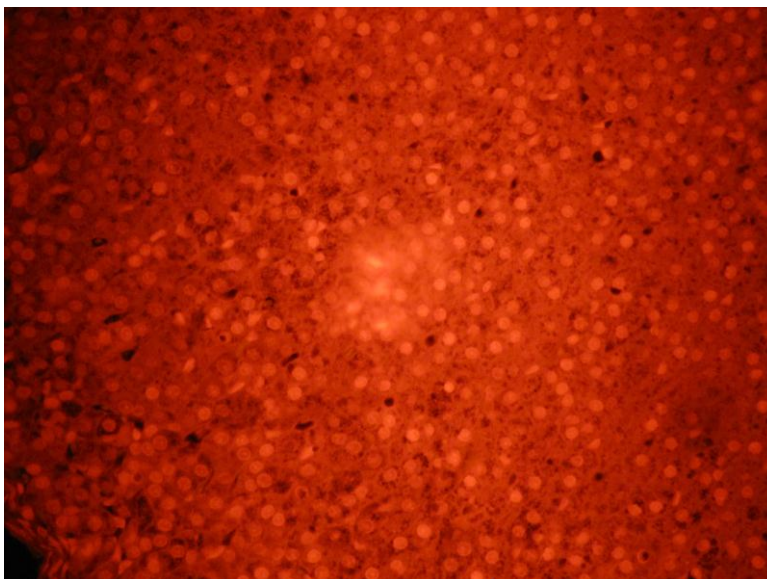


Slika 32. Jedra ZR obeležena anti-Ki-67 antitelom i hromozomi u mitozu (obeleženo strelicom) kontrolne grupe životinja (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

Za detekciju apoptotskih procesa u ćelijama kore nadbubrežnih žlezda korišćeno je bojenje propidijum-jodidom. Apoptotska jedra se razlikuju od neapoptotskih po jakoj fluorescentnoj crvenoj boji. Dok je u kontrolnoj grupi fluorescencija prisutna samo u pojedinačnim jedrima (Sl. 33), nakon toplotnog stresa broj jako fluorescentnih jedara u kori je povećan (Sl. 34).



Slika 33. Ćelije kore nadbubrežne žlezde kontrolne grupe pacova (propidijum-jodid, uvećanje 400x)

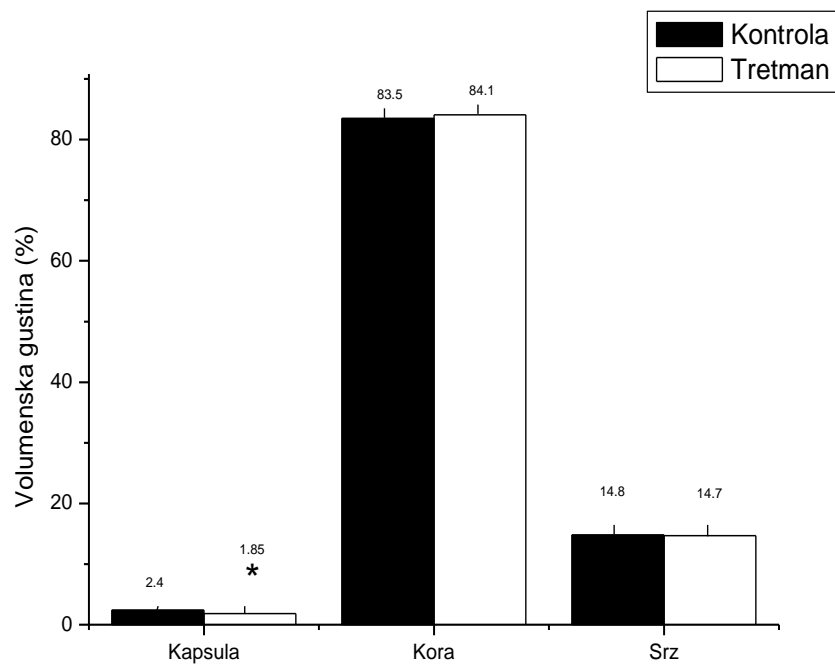


Slika 34. Čelije kore nadbubrežne žlezde eksperimentalne grupe pacova (propidijum-jodid, uvećanje 400x)

Morfometrijska i stereološka analiza uticaja toplotnog stresa na koru nadbubrežnih žlezda

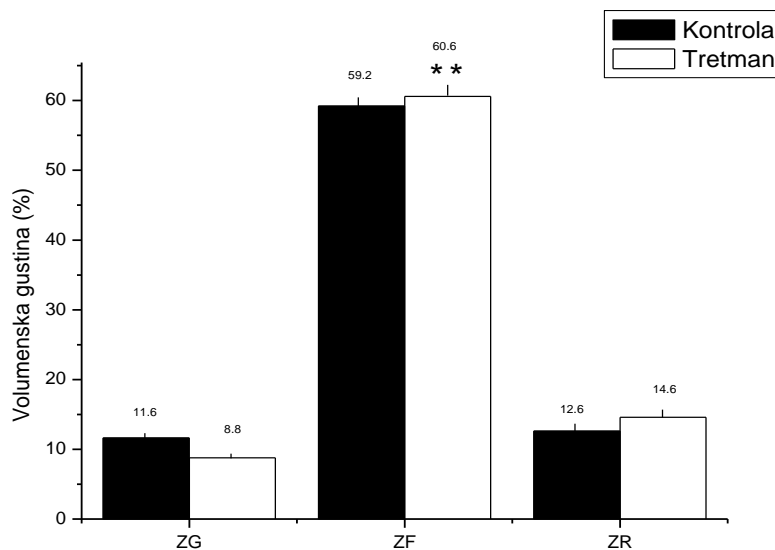
Rezultati stereološke analize pokazali su da je akutno izlaganje toplotnom stresu dovelo do statistički značajnog smanjenja volumenske gustine kapsule, dok su volumenske gustine kore i srži ostale nepromenjene (Histogram 4). U okviru kore nadbubrežnih žlezda, posle primenjenog tretmana došlo je do značajnog smanjenja relativne zastupljenosti ZG. Volumenske gustine ZF i ZR su blago povećane, ali bez statističke značajnosti (Histogram 5).

Histogram 4. Uticaj tretmana toplotom na volumenske gustine komponenata nadbubrežnih žlezda



* statistička značajnost $p < 0.05$

Histogram 5. Uticaj tretmana toplotom na volumenske gustine komponenata kore nadbubrežnih žlezda



*** statistička značajnost $p < 0.01$

U Tabeli 5. prikazani su rezultati stereoloških i morfometrijskih ispitivanja kore nadbubrežnih žlezda pacova.

Rezultati stereoloških i morfometrijskih ispitivanja kore nadbubrežnih žlezda pokazuju da su statistički značajno uvećane volumenska gustina ćelija, površine i volumen ćelija u ZF nakon tretmana toplotom. Nađeno je statistički značajno smanjenje vrednosti sledećih parametara: numeričke gustine ćelija i dijametara krvnih sudova u ZF.

Tabela 5. Morfometrijska i stereološka analiza kore nadbubrežnih žlezda pacova na nivou svetlosne mikroskopije

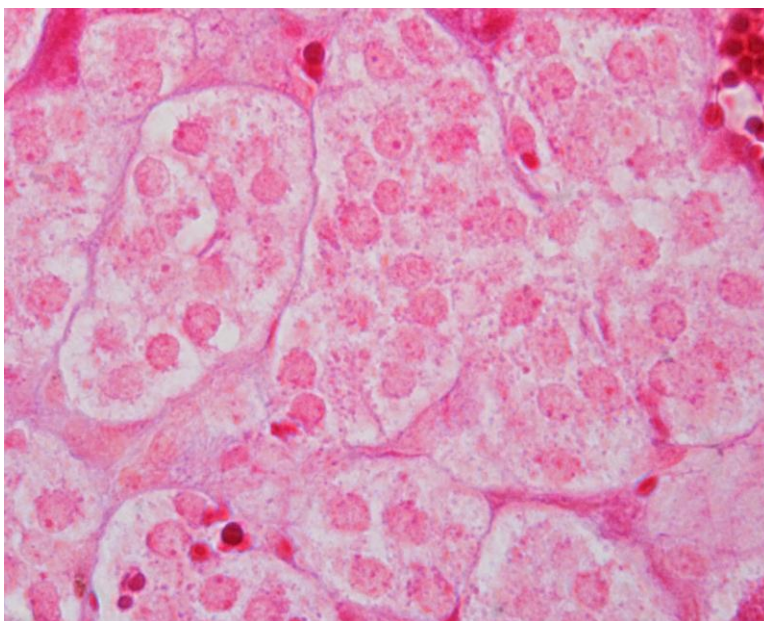
	Kontrola	Temperatura
Volumen nadbubrega (ml)	29.12 ± 2.27	30.25 ± 3.16
Volumenska gustina (Vv) ćelija (mm⁰)		
ZG	0.63 ± 0.01	0.65 ± 0.01
ZF	0.68 ± 0.01	0.71 ± 0.01 *
ZR	0.58 ± 0.01	0.58 ± 0.01
Volumenska gustina (Vv) jedara (mm⁰)		
ZG	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02
ZF	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
ZR	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.03
Površina ćelija (µm²)		
ZG	84.9 ± 3.4	87.9 ± 5.8
ZF	169.1 ± 5	193.7 ± 8.3*
ZR	98.1 ± 5.2	98.7 ± 4.9
Numerička gustina ćelija (N/mm³)		
ZG	1209 ± 46.0	1279 ± 115.4
ZF	433 ± 18.7	373 ± 21.4 *
ZR	839 ± 45.4	844 ± 46.3
Volumeni ćelija (µm³)		
ZG	553 ± 28.4	556 ± 54.9
ZF	1623 ± 72.7	1974 ± 121.2*
ZR	711 ± 61.5	714 ± 55.04
Volumeni jedara (µm³)		
ZG	75 ± 8.4	63 ± 5.6
ZF	112 ± 26.2	77 ± 5.4
ZR	62 ± 4.4	66 ± 7.5
Volumenske gustine (V_v) krvnih sudova (mm⁰)		
ZG	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.05
ZF	0.22 ± 0.04	0.20 ± 0.04
ZR	0.30 ± 0.04	0.29 ± 0.04
Dužina krvnih sudova (µm)		
ZF	0.442 ± 0.02	0.453 ± 0.016
ZR	0.503 ± 0.007	0.502 ± 0.012
Dijametar krvnih sudova (µm)		
ZF	6.06 ± 0.2	5.34 ± 0.3*
ZR	8.03 ± 0.45	7.9 ± 0.41

*statistička značajnost p<0.05

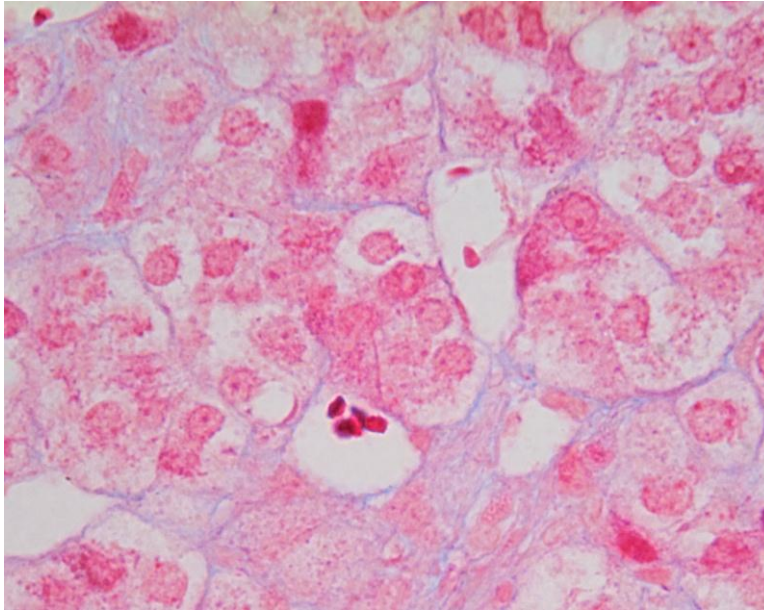
Histološka analiza srži nadbubrežnih žlezda

Hromafine ćelije srži nadbubrežnih žlezda su okruglog ili poligonalnog oblika, sa okruglim, centralno postavljenim jedrom (Sl. 35). Raspoređene su u obliku kružnih grupacija, obavijenih kolagenim i retikularnim vlaknima. U srži nadbubrežnih žlezda se uočavaju brojne ganglijske ćelije, što svedoči o postojanju unutrašnje inervacije ove žlezde. Nervi prolaze kroz kapsulu, pružaju se kroz koru i dalje se prostiru unutar srži nadbubrežne žlezde.

Nakon toplotnog stresa u srži nadbubrežnih žlezda uočene su svetle i tamne ćelije. Između ćelija značajno su zastupljena vlakna vezivnog tkiva, koja su Azan tehnikom obojena plavo (Sl. 36).



Slika 35. Hromafine ćelije srži nadbubrežne žlezde kontrolnih pacova (Azan bojenje, uvećanje 1000x)

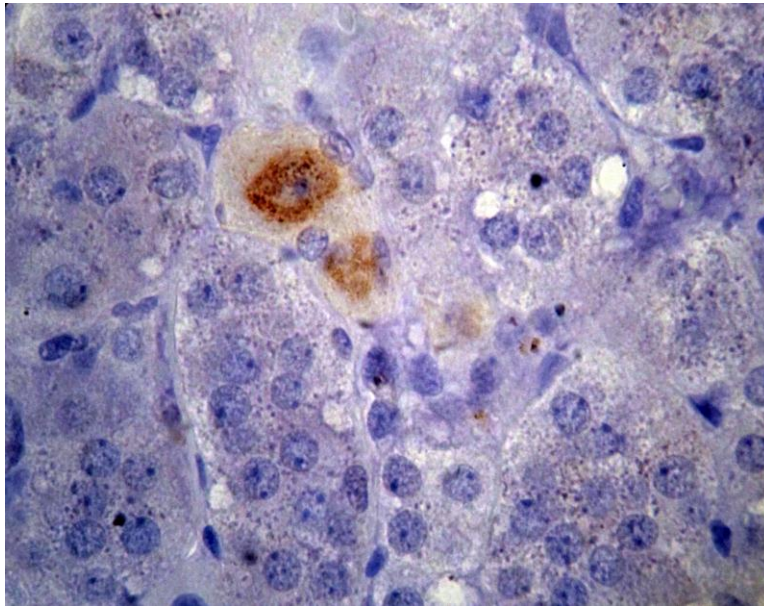


Slika 36. Hromafine ćelije srži nadbubrežne žlezde nakon stresa (Azan bojenje, uvećanje 1000x)

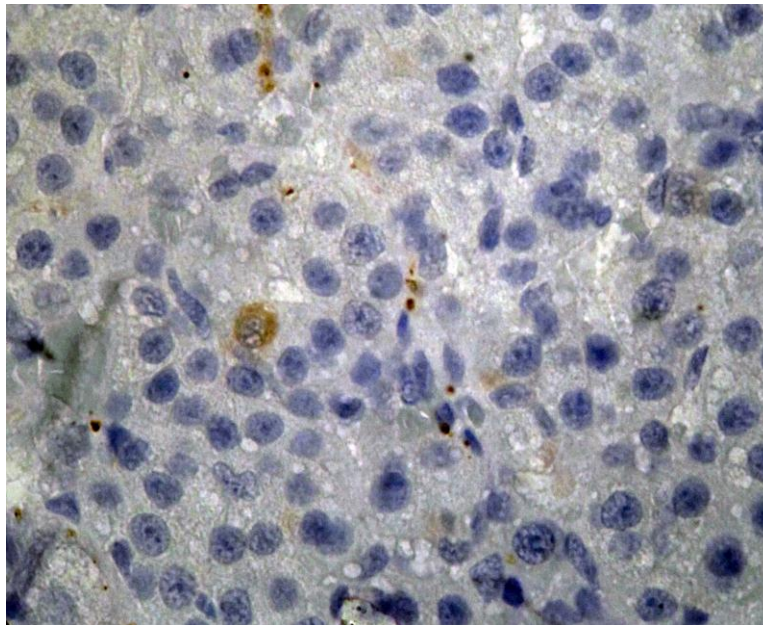
Imunohistohemijaska detekcija peptidergičkih neurona u srži nadbubrežnih žlezda

Srž nadbubrežnih žlezda je izuzetno dobro inervisna. U njoj su prisutne ganglijske ćelije i nervi u kojima se nalaze VIP, NPY i SP regulatorni peptidi.

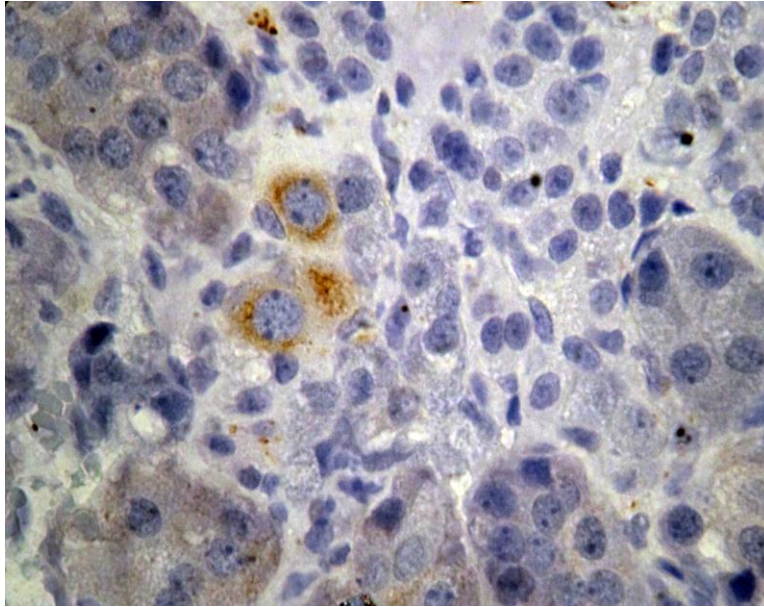
VIP imunoreaktivnost se uočava u hromafinim i ganglijskim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda životinja kontrolne grupe pacova (Sl. 37 i 39). VIP imunoreaktivnost je uočena u pojedinačnim ćelijama i u ćelijama organizovanim u male grupe. U perikarionima ganglijskih neurona imunoreaktivni materijal je difuzno raspoređen u citoplazmi. VIP imunopozitivnost nakon toplotnog stresa u hromafinim i ganglijskim ćelijama je manje izražena (Sl. 38 i 40).



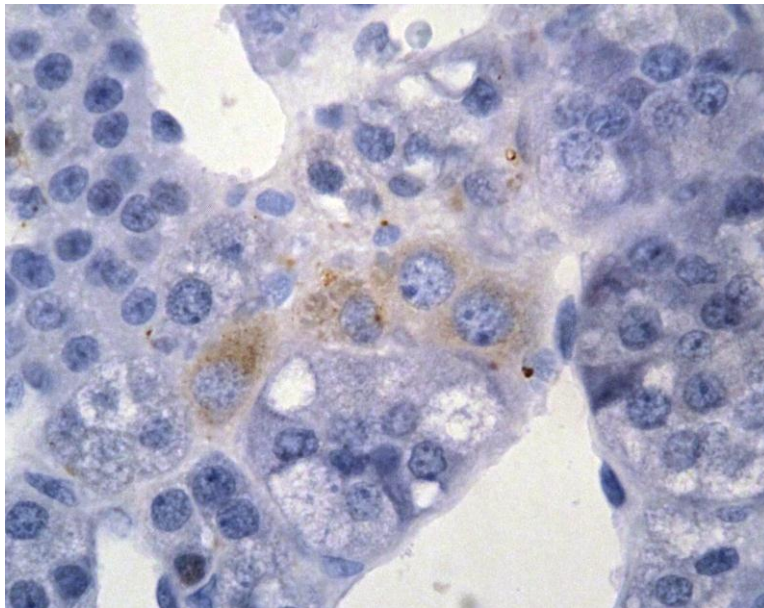
Slika 37. VIP imunoreaktivnost u hromafinim ćelijama pre toplotnog stresa (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)



Slika 38. VIP imunoreaktivnost u hromafinim ćelijama posle toplotnog stresa (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

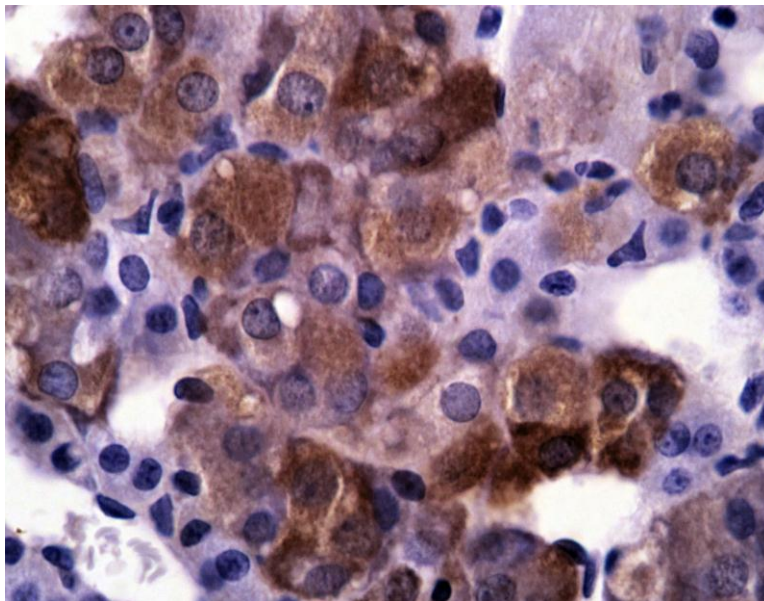


Slika 39. VIP imunoreaktivnost u ganglijskim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda kontrolnih pacova (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

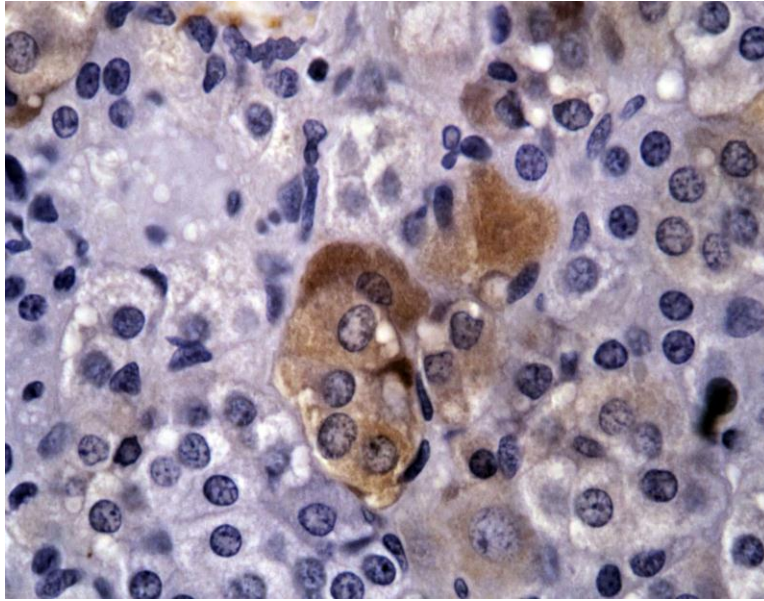


Slika 40. VIP imunoreaktivnost u ganglijskim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda eksperimentalnih pacova (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

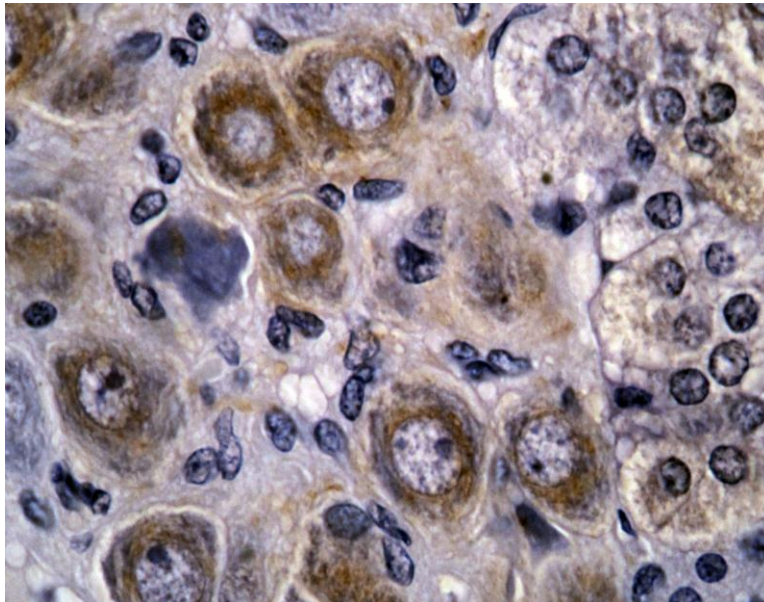
NPY imunoreaktivnost se uočava kako u hromafinim tako i u ganglijskim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda životinja kontrolne grupe (Sl. 41 i 43). Hromafine NPY reaktivne ćelije se nalaze u manjim grupama i pojedinačno raspoređene unutar srži. Imunoreaktivni materijal je raspoređen difuzno po citoplazmi perikariona ganglijskih neurona kao i u aksoplazmi. Nakon toplotnog stresa NPY imunoreaktivnost u hromafinim i ganglijskim ćelijama je bila smanjena (Sl. 42 i 44).



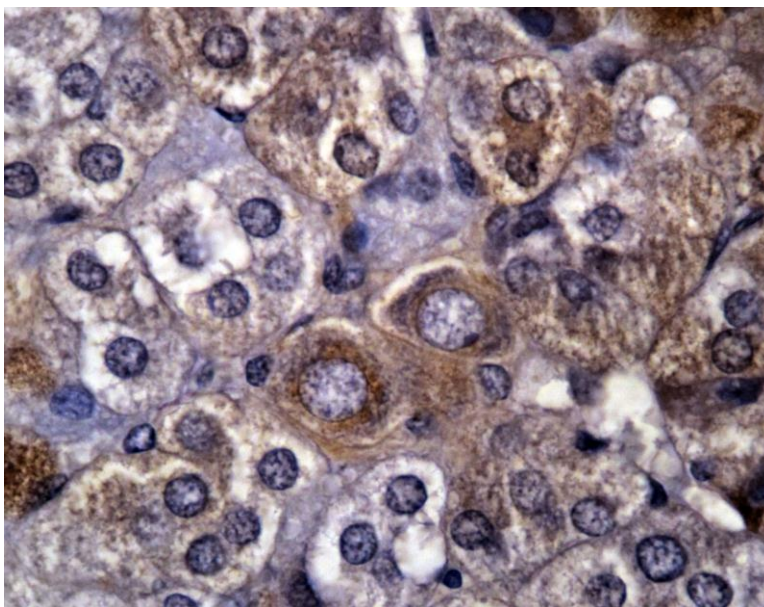
Slika 41. NPY imunoreakcija u hromafinim ćelijama srži pre toplotnog stresa (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)



Slika 42. NPY imunoreakcija u hromafinim ćelijama srži posle toplotnog stresa (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

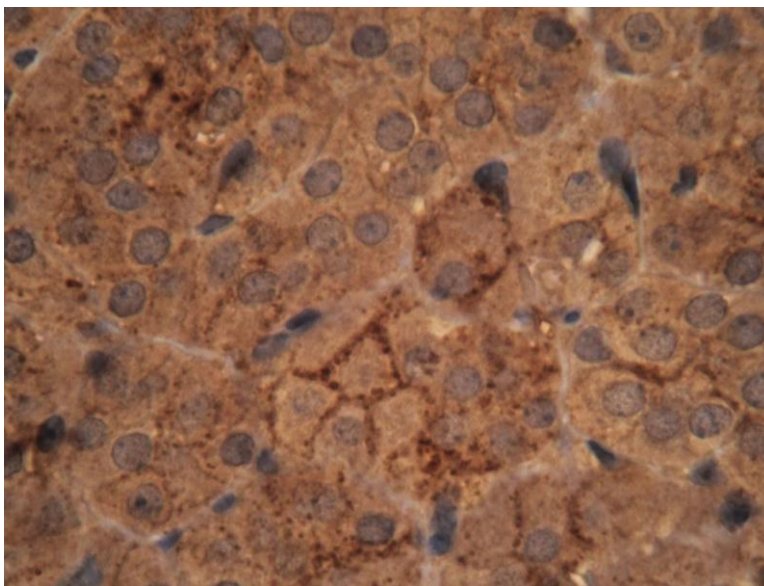


Slika 43. NPY imunoreaktivnost u ganglijskim ćelijama kontrolne grupe pacova (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

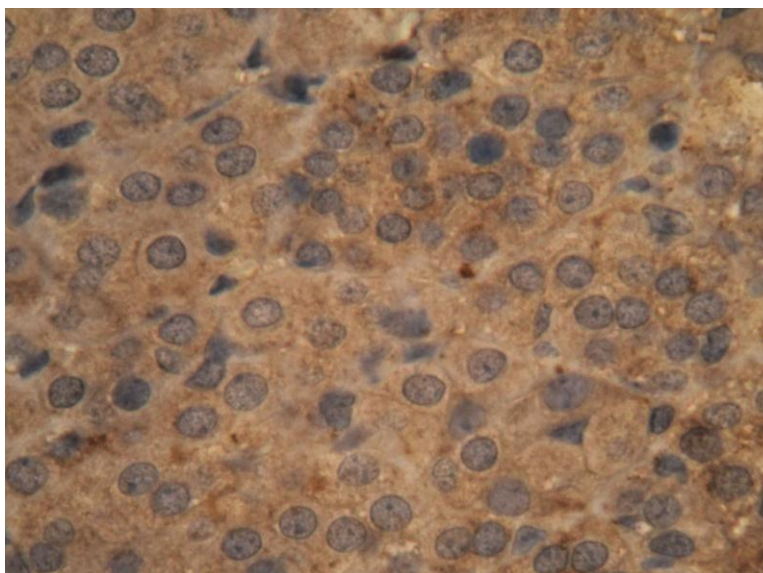


Slika 44. NPY imunoreaktivnost u ganglijskim ćelijama eksperimentalne grupe pacova (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

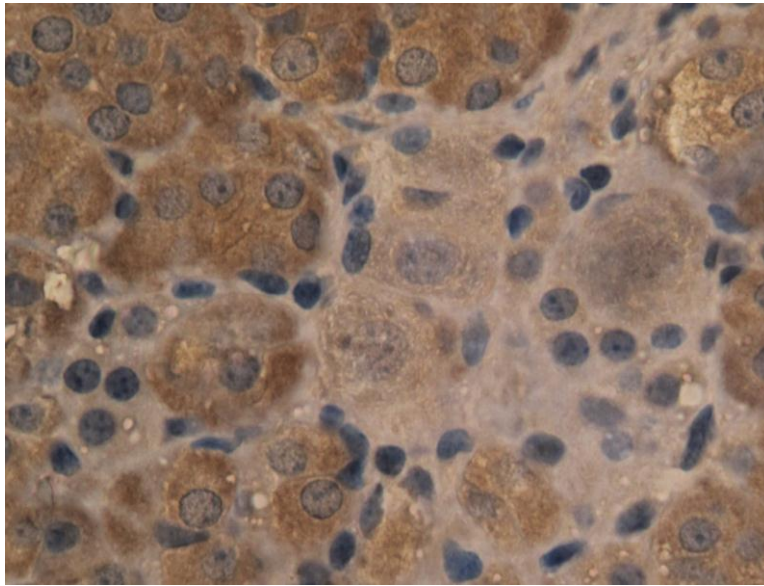
U kontrolnih pacova, SP imunopozitivnost se uočava samo u hromafinim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda, dok ganglijski neuroni ne pokazuju imunoreaktivnost na ovo antitelo (Sl. 45 i 47). SP imunoreaktivnost lokalizovana je u sekretnim granulama smeštenim uz ćelijsku membranu (Sl. 45). Nakon toplotnog stresa, SP-imunopozitivnost se detektuje u hromafinim ćelijama, ali je reakcija slabija nego u kontrolnoj grupi (Sl. 46). Ganglijske ćelije ne pokazuju imunoreaktivnost na ovo antitelo ni nakon izlaganja toploti (Sl. 48).



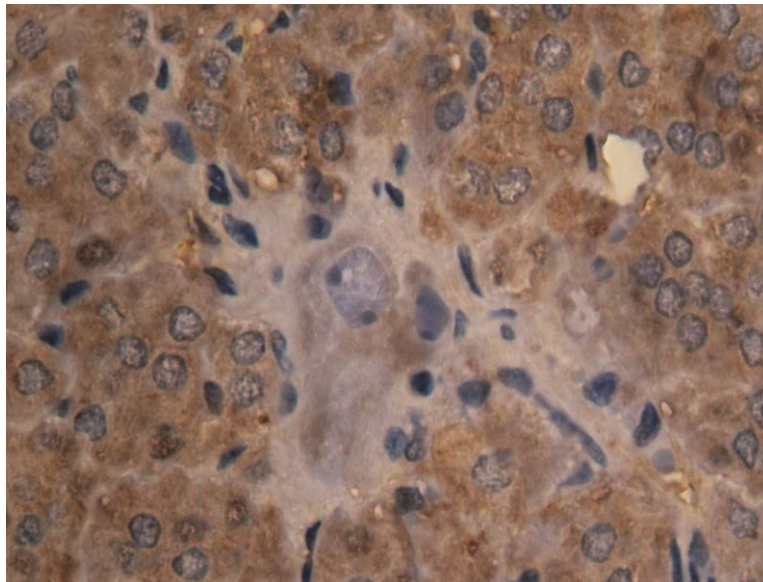
Slika 45. SP imunopozitivnost u ćelijama srži kontrolne grupe životinja (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)



Slika 46. SP imunopozitivnost u ćelijama srži eksperimentalne grupe životinja (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x).



Slika 47. Odsustvo reakcije u perikarionima ganglijskih neurona kontrolne grupe životinja (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)



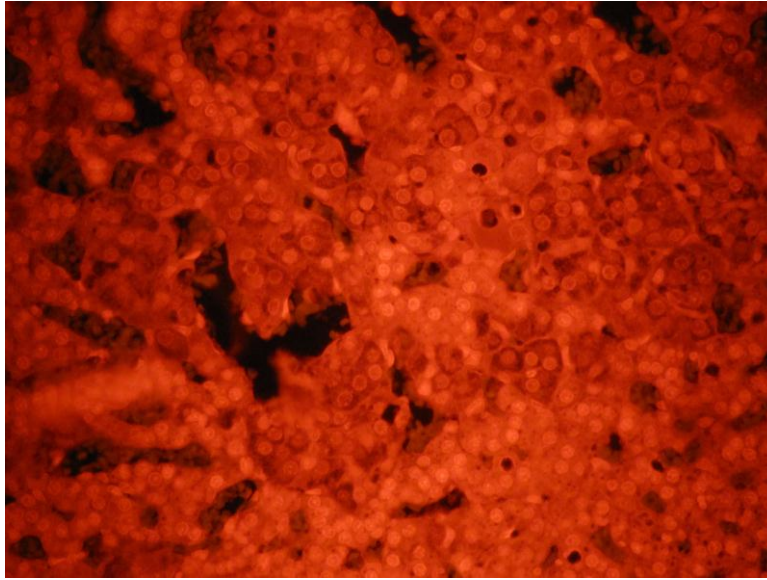
Slika 48. Odsustvo reakcije u perikarionima ganglijskih neurona eksperimentalne grupe životinja (avidin-biotin metoda, uvećanje 1000x)

Uticaj toplotnog stresa na apoptotske procese u srži nadbubrežnih žlezda

Za detekciju apoptotskih procesa u ćelijama srži nadbubrežnih žlezda korišćeno je bojenje propidijum-jodidom. Jedra ćelija srži nadbubrežnih žlezda ne pokazuju fluorescentnost u kontroli (Sl. 49), dok je broj fluorescentnih jedara u eksperimentalnoj grupi povećan (Sl. 50).



Slika 49. Ćelije srži nadbubrežnih žlezda kontrolne grupe pacova (propidijum-jodid, uvećanje 400x)



Slika 50. Čelije srži nadbubrežnih žlezda eksperimentalne grupe pacova (propidijum-jodid, uvećanje 400x)

Morfometrijska i stereološka analiza uticaja toplotnog stresa na srž nadbubrežnih žlezda

U Tabeli 6. prikazani su rezultati stereoloških i morfometrijskih ispitivanja srži nadbubrežnih žlezda pacova.

Rezultati stereoloških i morfometrijskih ispitivanja pokazuju da su statistički značajno bile smanjene vrednosti sledećih parametara: volumenske gustine ćelija i nervnih elemenata. Volumen i površina ćelija srži pokazuju tendenciju smanjenja nakon toplotnog stresa, dok je volumenska gustina krvnih sudova u ovoj zoni blago uvećana. Nađeno je statistički značajno uvećanje volumena jedara.

Tabela 6. Rezultati stereoloških i morfometrijskih ispitivanja srži nadbubrežnih žlezda pacova na nivou svetlosne mikroskopije

	Kontrola	Tretman
Volumenska gustina hromafinih ćelija (mm⁰)	0.59 ± 0.01	0.53 ± 0.01***
Volumenska gustina jedara (mm⁰)	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.03
Površina ćelija (µm²)	129.3 ± 6.2	121.9 ± 5.7
Numerička gustina (N/mm³)	591 ± 13.4	558 ± 30.5
Volumen ćelija (µm³)	1021 ± 46.1	982 ± 71.6
Volumen jedara (µm³)	116 ± 9.2	170 ± 13.4**
V_v krvnih sudova (mm⁰)	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.04
Volumenska gustina (mm⁰)		
Hromafine ćelije	0.79 ± 0.014	0.77 ± 0.012
Nervni elementi	0.033 ± 0.007	0.019 ± 0.004*
Kapilari	0.18 ± 0.015	0.19 ± 0.013

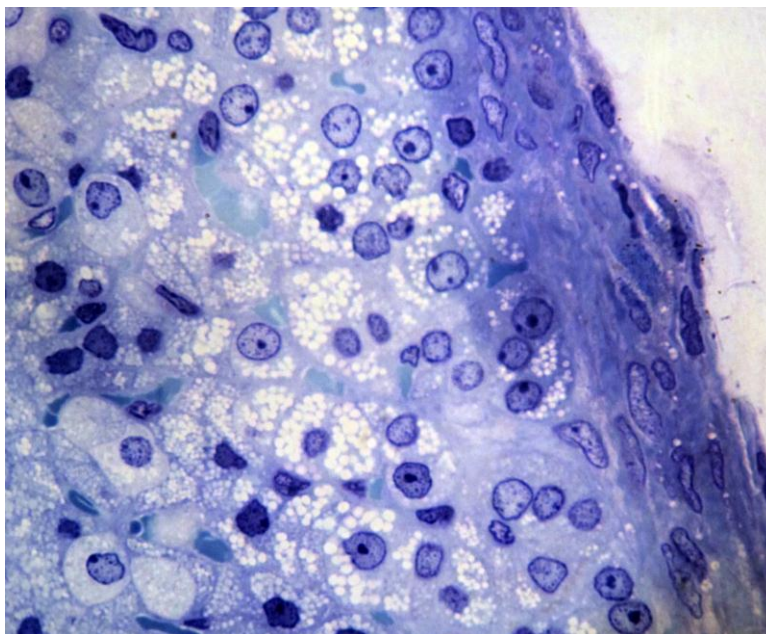
*statistička značajnost $p < 0.05$, **statistička značajnost $p < 0.01$, ***statistička značajnost $p < 0.001$

Rezultati ultrastrukturnih ispitivanja nadbubrežnih žlezda

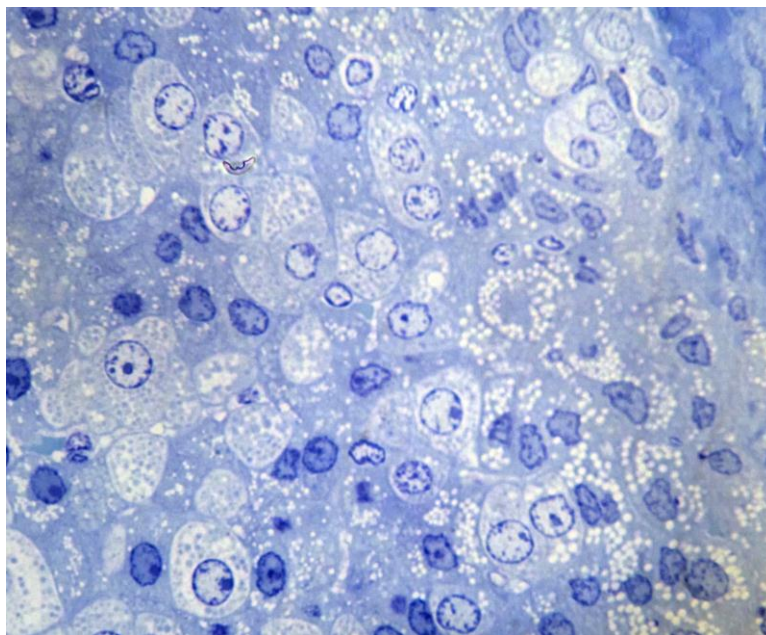
Kora nadbubrežnih žlezda

Promene nastale u ćelijama kore nakon izlaganja toplotnom stresu su dalje proučavane na nivou elektronske mikroskopije. Na polutankim presecima obojenim toluidinskim plavim lokalizovane su ćelije zona kore nadbubrežnih žlezda, a zatim je odabrani deo tkiva sečen i pripremljen za posmatranje pod elektronskim mikroskopom.

Ćelije ZG kontrolne grupe imaju euhromatsko jedro i bogate su lipidnim kapima (Sl. 51). U kontrolnih pacova kapsula je dobro razvijena, izgrađena od vezivnog tkiva sa nekoliko ćelijskih tipova. Nakon toplotnog stresa, u ćelijama ZG smanjen je broj lipidnih kapi (Sl. 52).

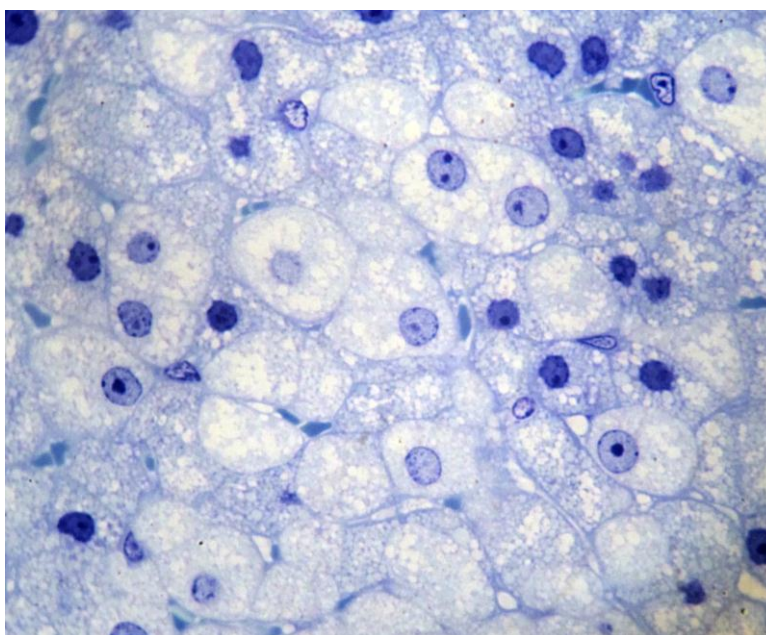


Slika 51. Čelije ZG u kontrolnoj grupi pacova (polutanki preseći, toluidin plavo, uvećanje 1000x)

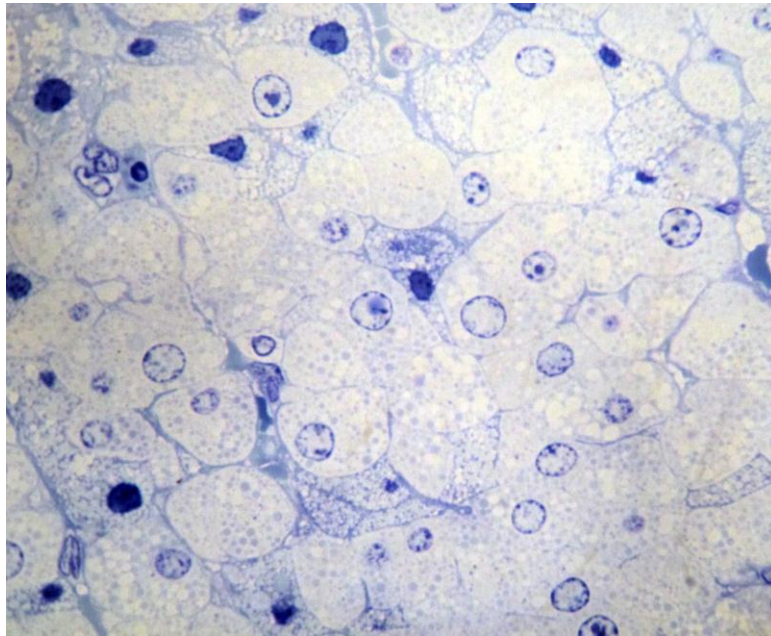


Slika 52. Čelije ZG u eksperimentalnoj grupi pacova (polutanki preseći, toluidin plavo, uvećanje 1000x)

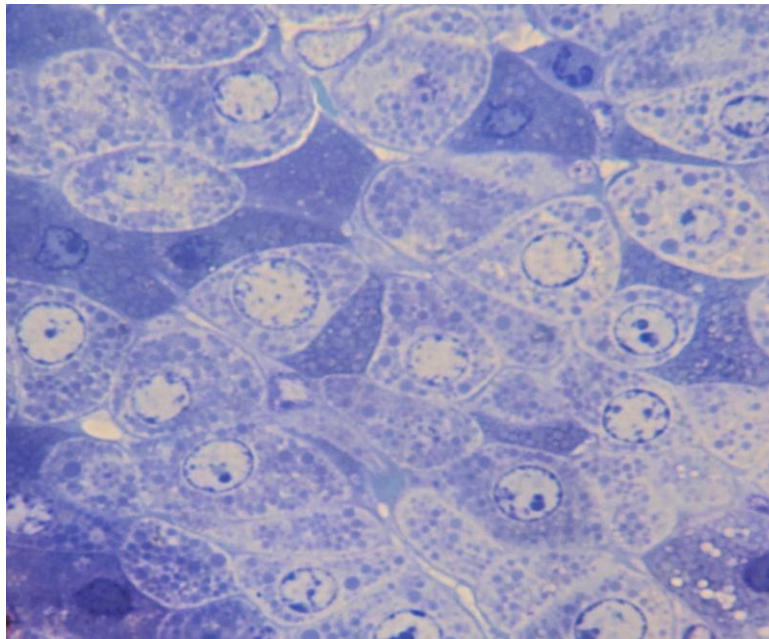
Ćelije ZF su svetle citoplazme, vrlo bogate lipidnim kapima. U nekim ćelijama se uočavaju piknotička jedra (Sl. 53). U ćelijama ZF nakon toplotnog stresa primetno je smanjenje broja lipidnih kapi, jedra su euhromatska, ali se zapažaju i ćelije sa kondenzovanim jedrima (Sl. 54). Ovakve promene na jedru mogu ukazivati da je metabolička aktivnost ćelije smanjena. Na presecima se uočavaju neobične ćelije koje su organizovane kao ćelije ZG, ali su po morfološkim karakteristikama bliže ćelijama ZF (Sl. 55).



Slika 53. Ćelije ZF kontrolne grupe pacova (polutanki preseci, toluidin plavo, uvećanje 1000x)

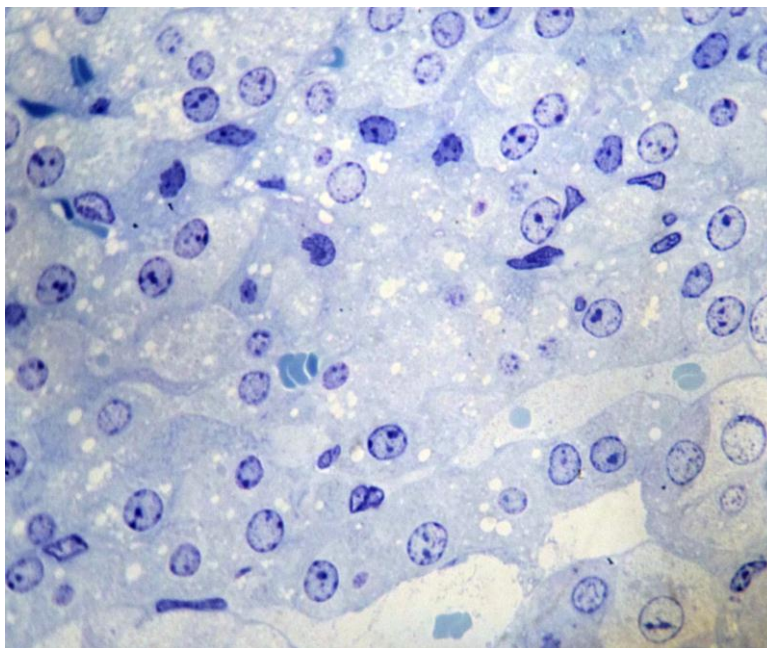


Slika 54. Čelije ZF eksperimentalne grupe pacova (polutanki presecci, toluidin plavo, uvećanje 1000x)

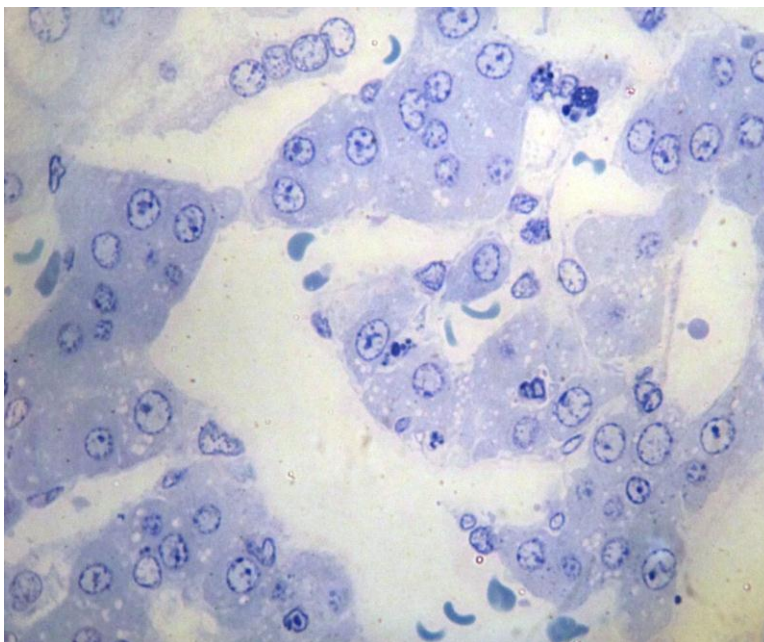


Slika 55. Neobično krupne čelije ZF u eksperimentalnoj grupi pacova (polutanki presecci, toluidin plavo, uvećanje 1200x)

Ćelije ZR su manje veličine u odnosu na ćelije prethodnih zona, i imaju euhromatska jedra (Sl. 56). U ZR nakon toplotnog stresa se u pojedinim ćelijama uočavaju piknotička jedra (Sl. 57).

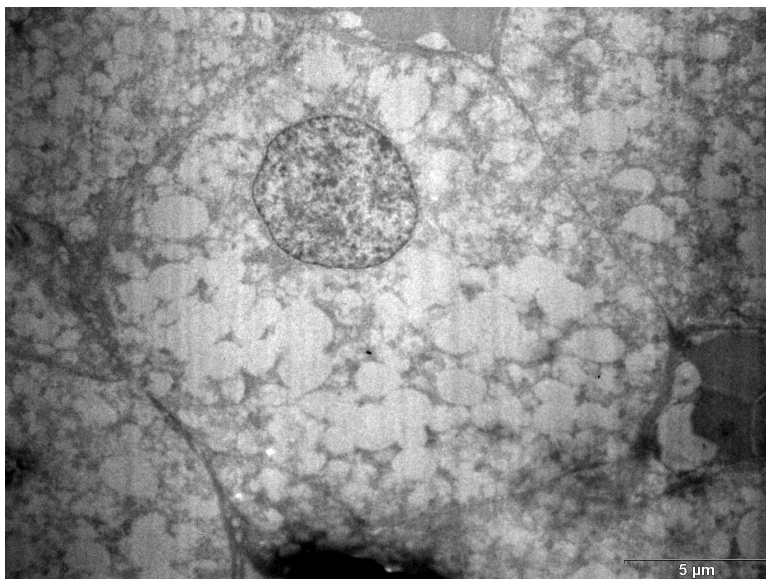


Slika 56. Ćelije ZR kontrolne grupe pacova (polutanki preseci, toluidin plavo, uvećanje 1000x)

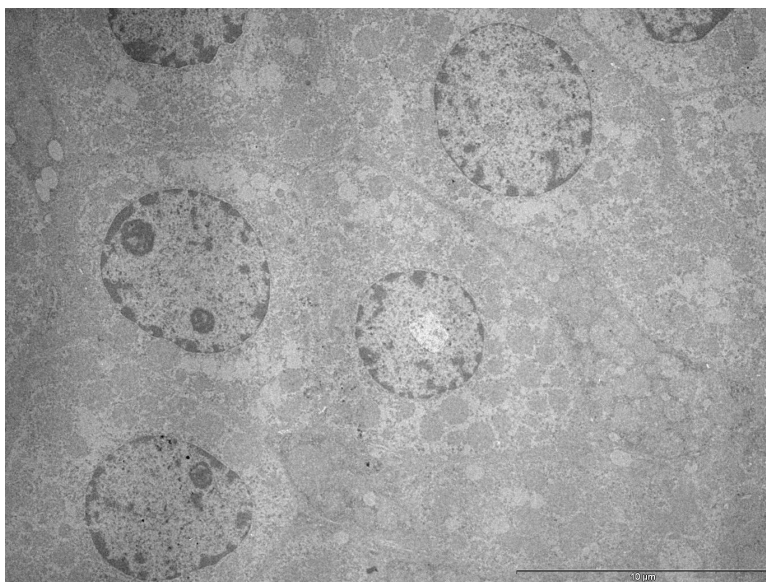


Slika 57. Čelije ZR eksperimentalne grupe pacova (polutanki preseci, toluidin plavo, uvećanje 1000x)

Rezultati ispitivanja ćelija nadbubrega kontrolnih pacova na ultrastrukturnom nivou su pokazala da su ćelije ZG višeučagaone, sa jasno izraženim jedrom euhromatskih karakteristika (Sl. 58). Sadrže veliki broj lipidnih kapi, dobro razvijen Goldžijev aparat i mitohondrije sa pločastim kristama. Nakon toplotnog stresa u ćelijama ZG broj lipidnih kapi bio je smanjen (Sl. 59). Jedro euhromatskih odlika i jasno uočljivo jedarce ukazuju na povećanu metaboličku aktivnost ćelije.

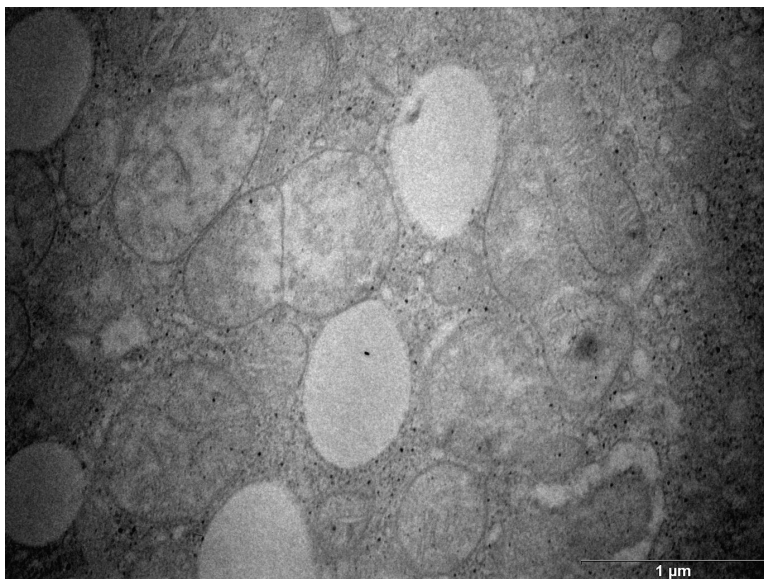


Slika 58. Čelija ZG u kontrolnoj grupi pacova (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)

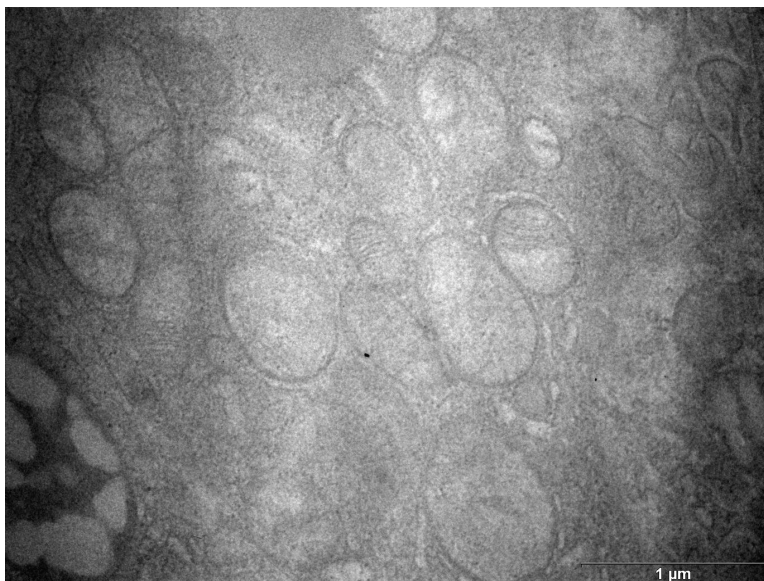


Slika 59. Čelija ZG u eksperimentalnoj grupi pacova (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)

Nakon izlaganja pacova povišenoj ambijentalnoj temperaturi uočen je povećan broj mitohondrija u ćelijama ZG koji je nastao najverovatnije deobom ovih organela, što se može uočiti sa mikrografija 60. i 61.



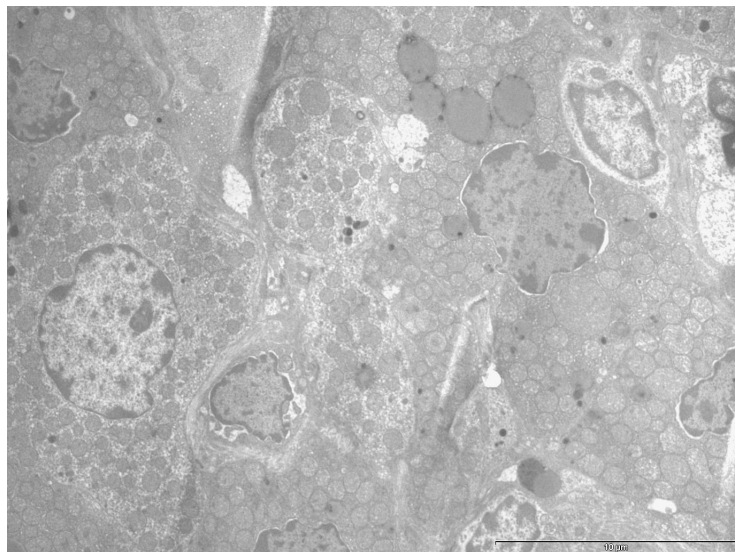
Slika 60. Deoba mitohondrija u ćelijama ZG nakon toplotnog stresa (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 25000x)



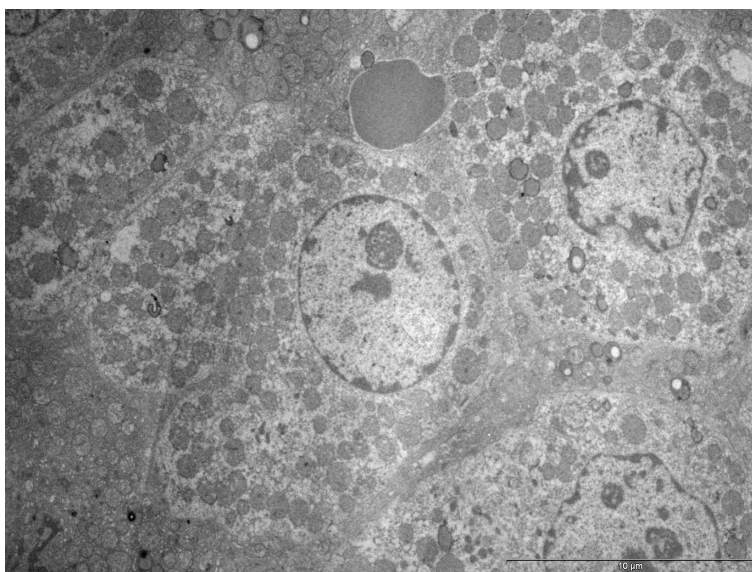
Slika 61. Povećan broj mitohondrija u ćelijama ZG nakon toplotnog stresa (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 25000)

Ćelije ZF u kontroli imaju centralno postavljeno euhromatsko jedro, bogate su lipidnim kapima i mitohondrijama (Sl. 62). Mitohondrije su sferične, i imaju vezikularne

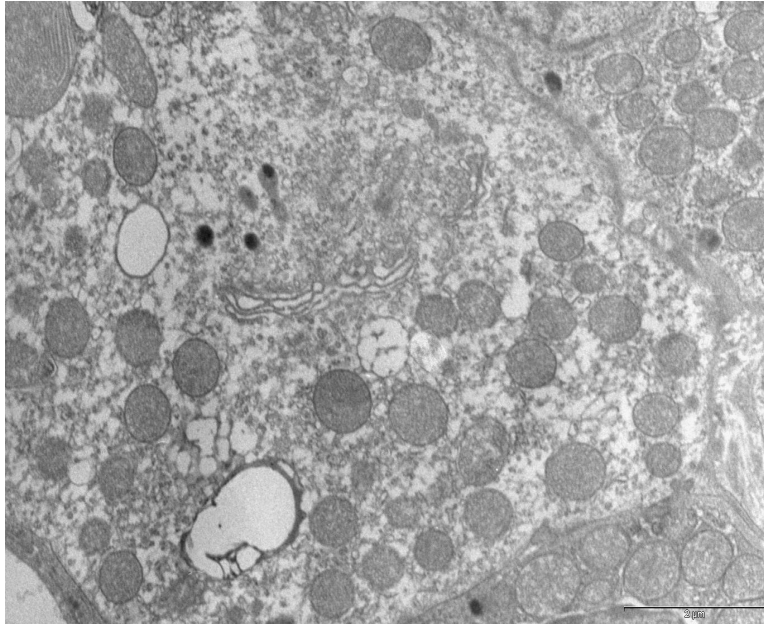
kriste. Glatki endoplazmatični retikulum i Goldžijev aparat su izuzetno dobro razvijeni (Sl. 64). Po svojoj veličini predstavljaju najveće ćelije kore nadbubrežne žlezde. Nakon toplotnog stresa u ćelijama ZF smanjen je broj lipidnih kapi (Sl. 63). Euhromatsko jedro i izraženo jedarce ukazuju na intenzivnu metaboličku aktivnost ćelije. U ćelijama se uočava povećanje veličine mitohondrija (Sl. 65), kao i njihova deoba (Sl. 66).



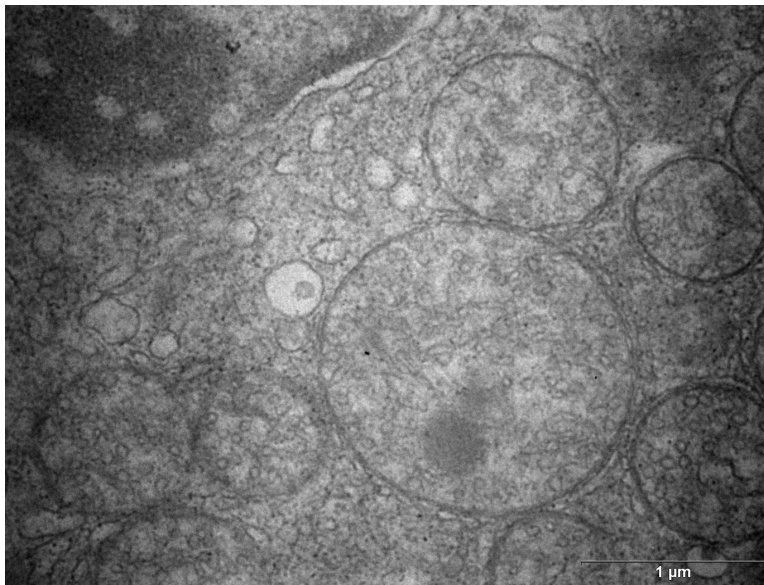
Slika 62. Ćelija ZF kontrolne životinje (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)



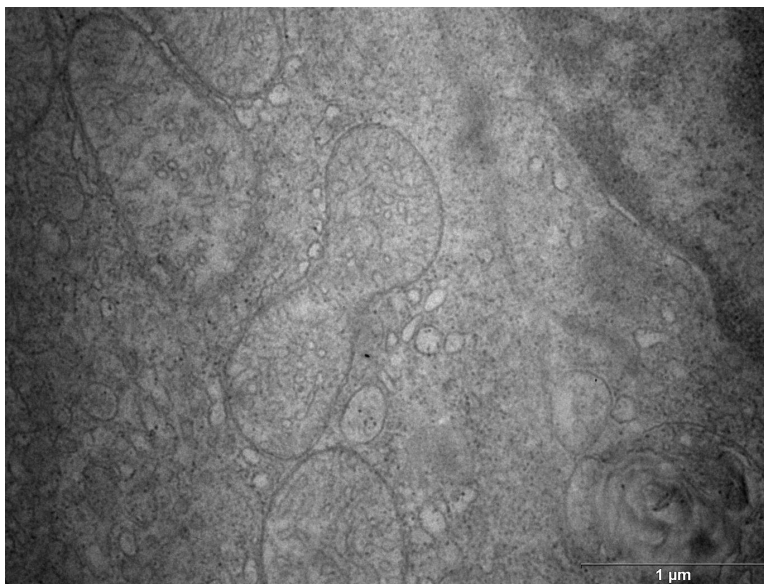
Slika 63. Ćelija ZF eksperimentalne životinje (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)



Slika 64. Mitohondrije i Goldžijev aparat u ćelijama ZF kontrolne grupe (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 8800x)

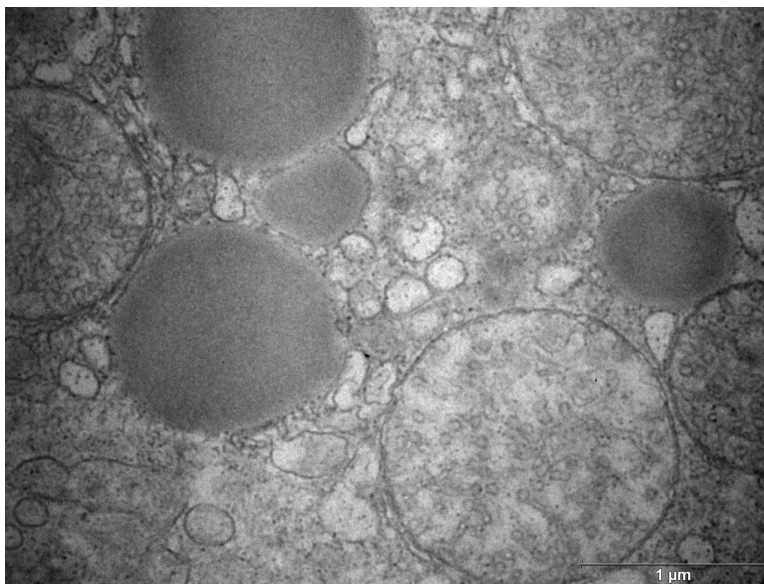


Slika 65. Uvećane mitohondrije u ćelijama ZF nakon toplotnog stresa (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 25000x)

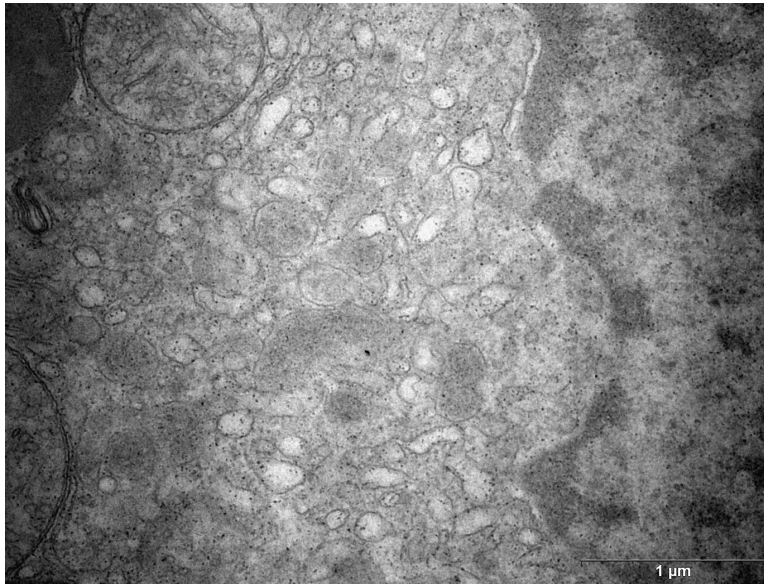


Slika 66. Deoba mitohondrija u ćelijama ZF nakon toplotnog stresa (uranil acetat, olovo citrat, uvećanje 25000x)

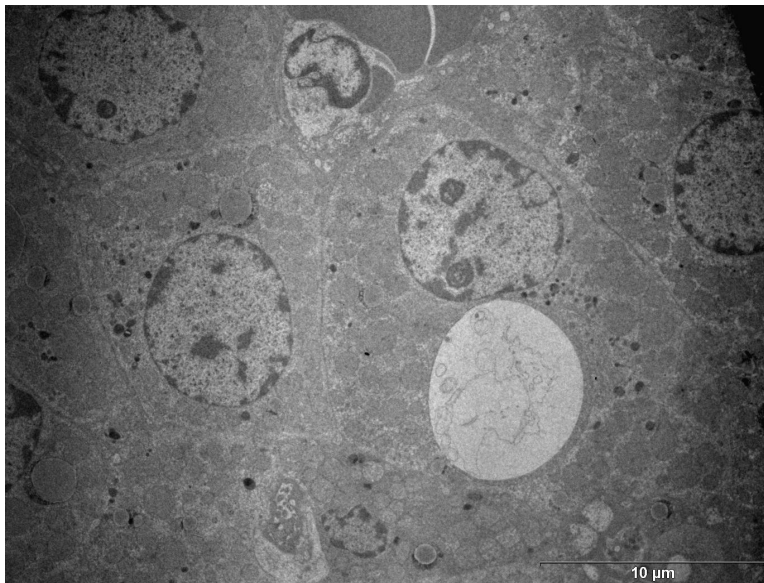
U pojedinim ćelijama ZF uočava se dilatacija cisterni glatkog endoplazmatičnog retikuluma (Sl. 67) i Goldžijevog aparata (Sl. 68), formiranje velikih lipidnih kapi (Sl. 69), komponente lizozomskog sistema (Sl. 70), mitohondrije sa kristama koje menjaju pravac pružanja (Sl. 71) i amorfnim depozitom (Sl. 72).



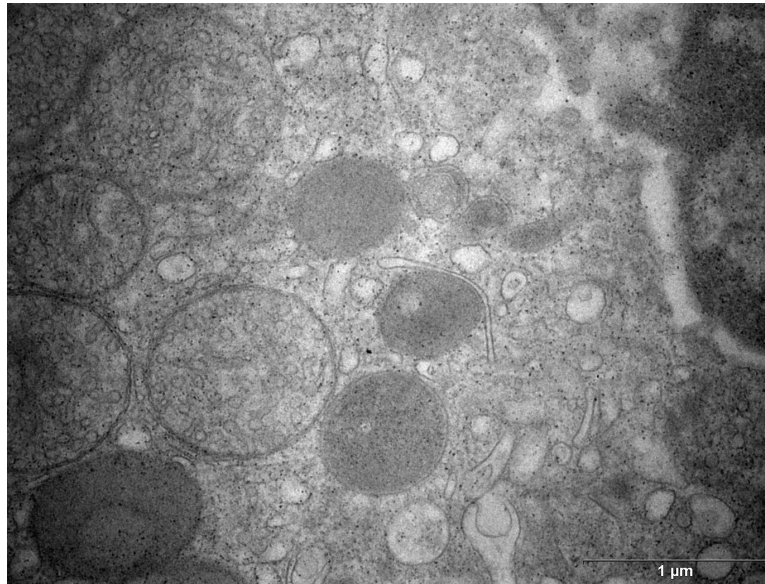
Slika 67. Dilatacija endoplazmatičnog retikuluma (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 25000x)



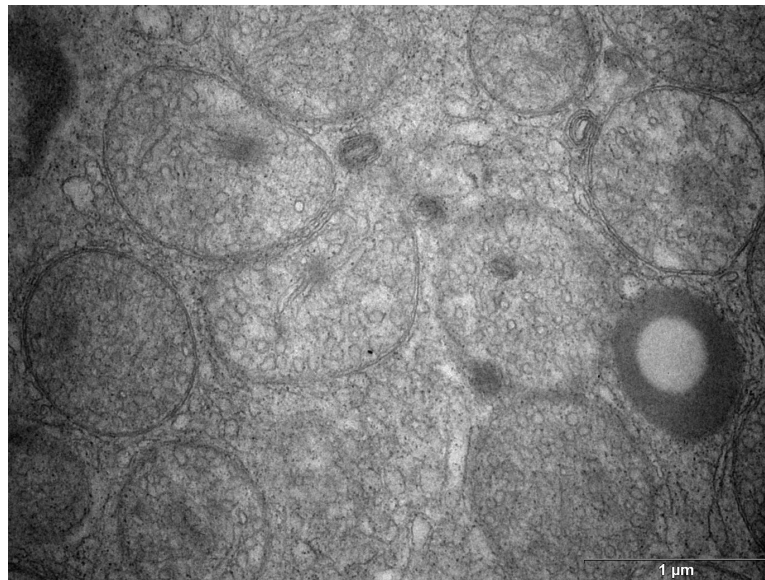
Slika 68. Dilatacija Goldžijevog aparata (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 25000x)



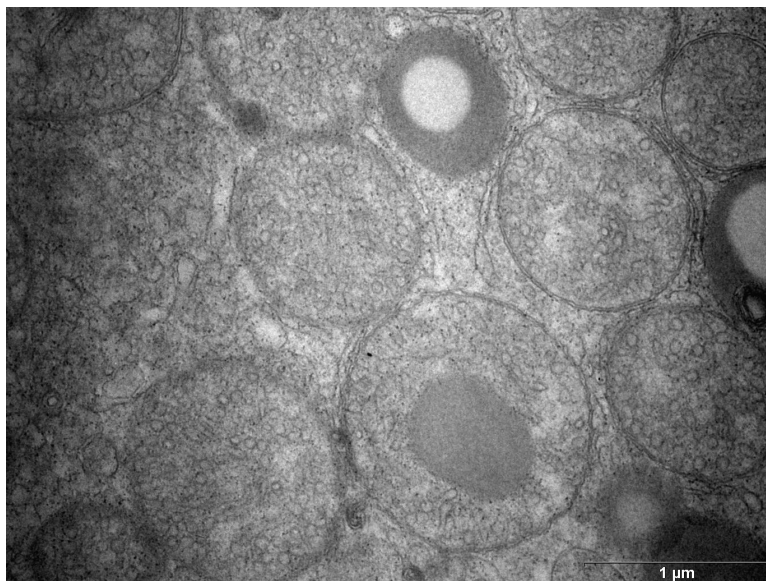
Slika 69. Velika lipidna kap i veći broj tamnih tela u ćelijama ZF (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 2650x)



Slika 70. Komponente lizozomskog sistema u ćeliji ZF (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 25000x)

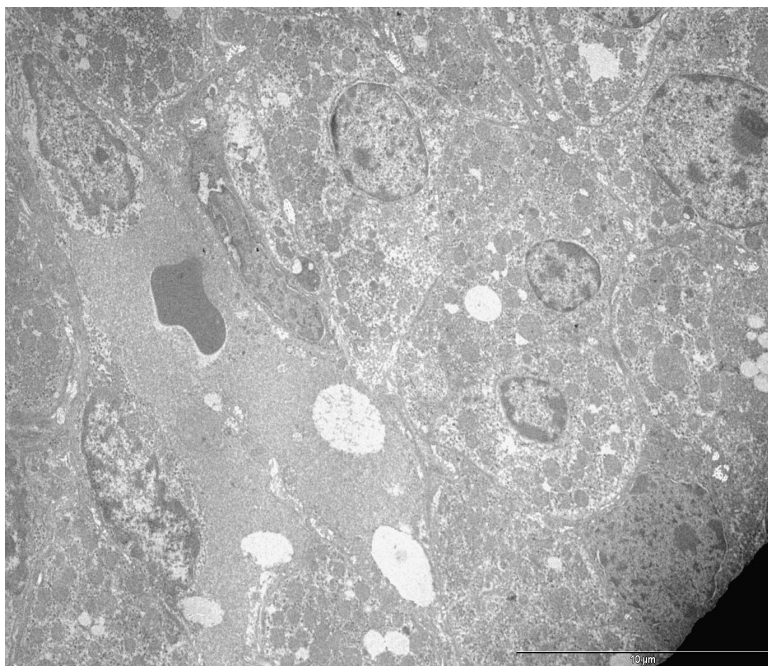


Slika 71. Mitohondrije sa kristama koje menjaju pravac pružanja i uspostavljaju kontakt sa citoplazmom. Sitna tamna tela u mitohondriji i u citoplazmi. (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 25000x)

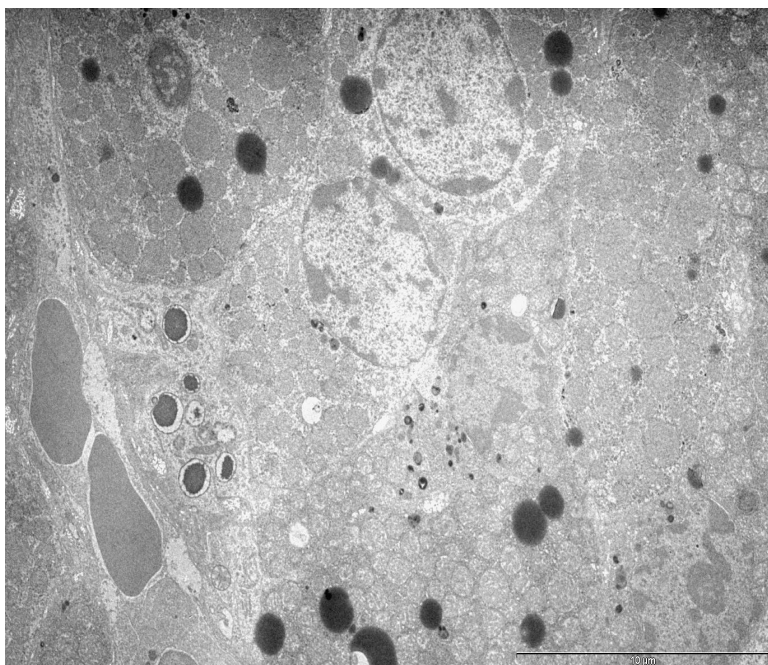


Slika 72. Intramitohondrijalni amorfni depozit u ćeliji ZF pacova izlaganog povišenoj temperaturi (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 25000)

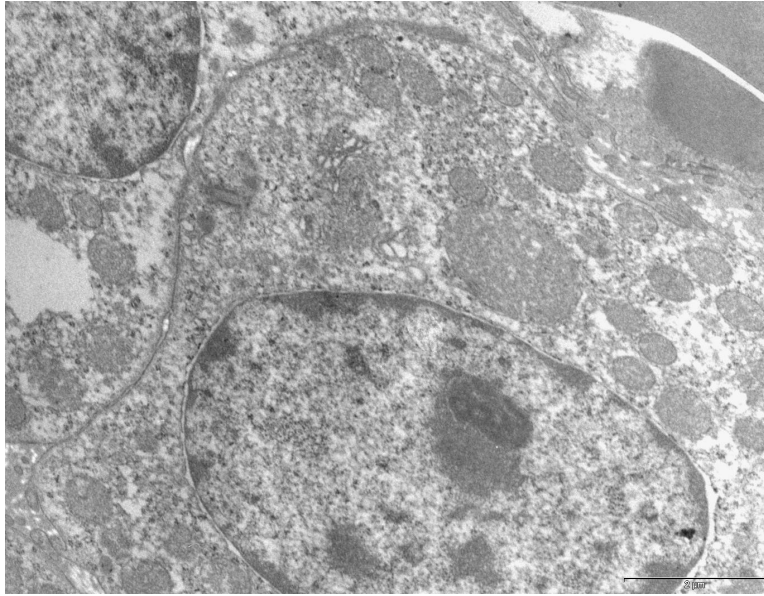
Ćelije ZR su najmanje ćelije kore nadbubrežne žlezde (Sl. 73). Poseduju centralno postavljeno jedro, mitohondrije sa tubularnim i vezikularnim kristama, dobro razvijen endoplazmatični retikulum i Goldžijev aparat (Sl. 75). Nakon toplotnog stresa, u ćelijama ZR povećan je broj lipidnih kapi (Sl. 74). U pojedinim ćelijama uočava se veći broj lipofuscinskih tela (Sl. 76). Svetla polja u lizozomima predstavljaju mesto delovanja hidrolitičkih enzima, dok su u tamnim poljima litički procesi završeni. U nekim ćelijama, jedarni ovoj formira izvrat kojim obuhvata mitohondriju (Sl. 77).



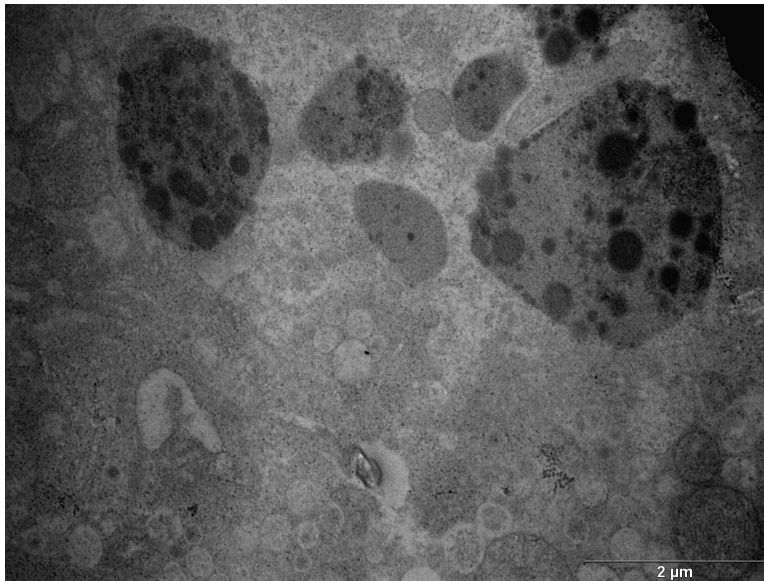
Slika 73. Čelija ZR u kontrolnoj grupi životinja (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)



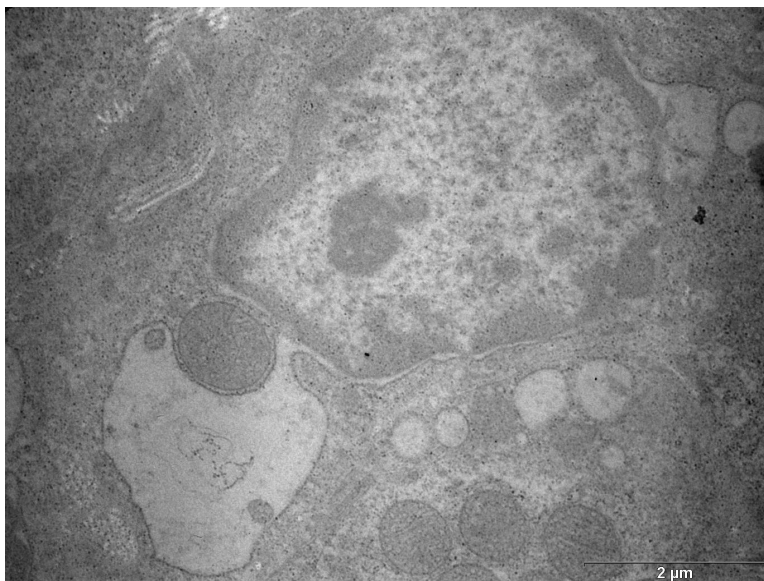
Slika 74. Čelija ZR u eksperimentalnoj grupi životinja. Brojne lipidne kapi u ćelijama ZR pacova izlaganih povišenoj temperaturi (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)



Slika 75. Mitohondrije i Goldžijev aparat u ćelijama ZR kontrolne grupe (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 8800x)

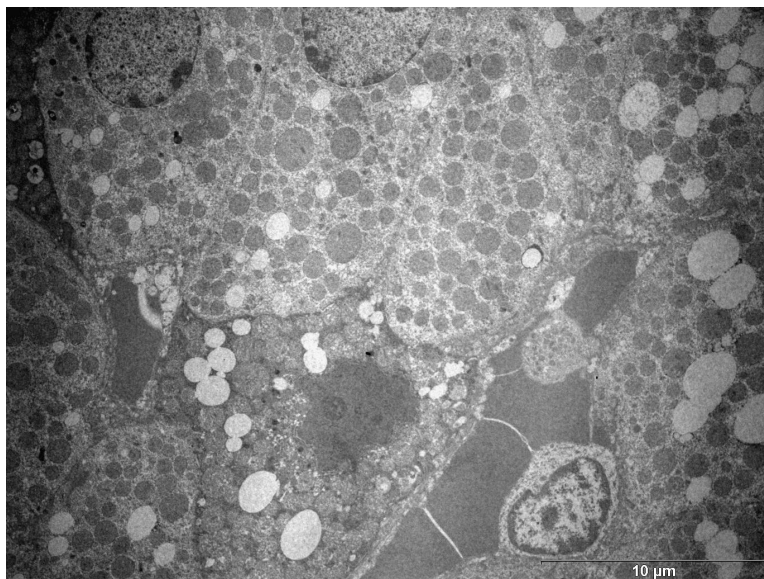


Slika 76. Lipofuscinska tela u ćelijama ZR eksperimentalne grupe pacova (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 11500x)



Slika 77. Evaginacija jedarnog ovoja u ćeliji ZR eksperimentalne grupe životinja (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 11500x)

Slično kao i u kapilarima hipofize pacova koji su bili kratkotrajno izloženi povišenoj temperaturi, u kapilarima kore nadbubrežnih žlezda pacova uočene su argegacije krvnih pločica (Sl. 78).



Slika 78. Krvne pločice u kapilarima kore nadbubrežne žlezde pacova izlaganih povišenoj temperaturi (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 2650x)

Stereološka analiza kore nadbubrežnih žlezda na ultrastrukturnom nivou

Rezultati stereoloških ispitivanja kore nadbubrežnih žlezda na ultrastrukturnom nivou prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Rezultati stereoloških ispitivanja kore nabubrežnih žlezda pacova

	Kontrola	Tretman	
Volumenska gustina (mm⁰)			
Jedara			
ZG	0.15±0.01	0.23±0.02	
ZF	0.23±0.01	0.27±0.03	
ZR	0.29±0.02	0.32±0.02	
Mitochondrija			
ZG	0.13±0.01	0.25±0.01	***
ZF	0.11±0.01	0.18±0.01	**
ZR	0.22±0.01	0.24±0.01	
Lipidne kapi			
ZG	0.31±0.02	0.11±0.01	***
ZF	0.20±0.02	0.16±0.02	
ZR	0.11±0.01	0.13±0.01	
Broj/μm² ćelije			
Mitochondrije			
ZG	0.27±0.02	0.46±0.03	**
ZF	0.79±0.12	0.79±0.09	
ZR	0.89±0.04	0.94±0.07	
Lipidne kapi			
ZG	0.44±0.03	0.18±0.02	***
ZF	1.46±0.27	0.77±0.17	*
ZR	0.41±0.05	0.86±0.05	***
Broj mitochondrija po profilu ćelije			
ZG	28.8±2.1	41.05±2.7	***
ZF	32.12±3.85	50.08±8.43	
ZR	47.5 ±4.3	41.8 ±2.3	
Broj lipidnih kapi po profilu ćelije			
ZG	53.2±4.3	18.1±2.9	***
ZF	58.04±10.01	55.16±14.72	
ZR	22.2±3.45	39.03±2.6	***

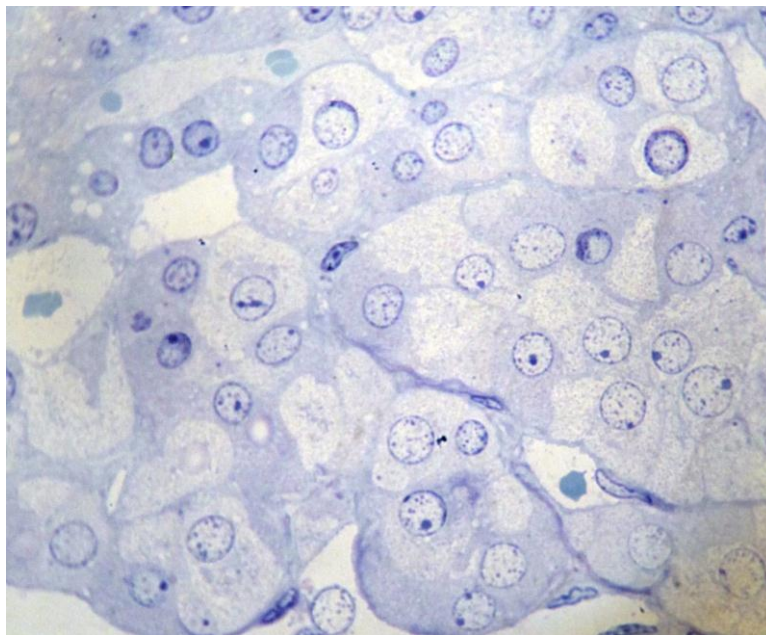
*statistička značajnost $p < 0.05$, **statistička značajnost $p < 0.01$, ***statistička značajnost $p < 0.001$

Stereološkom analizom ćelija pojedinih zona utvrđeno je da je u ćelijama ZG došlo do statistički značajnih promena gotovo svih ispitivanih parametara. Povećane su volumenska gustina mitohondrija, njihov broj po μm^2 ćelije i ukupan broj po profilu ćelije. Nasuprot tome, zapaženo je smanjenje volumenske gustine lipidnih kapi, njihovog broja po μm^2 ćelije i ukupnog broja po profilu ćelije.

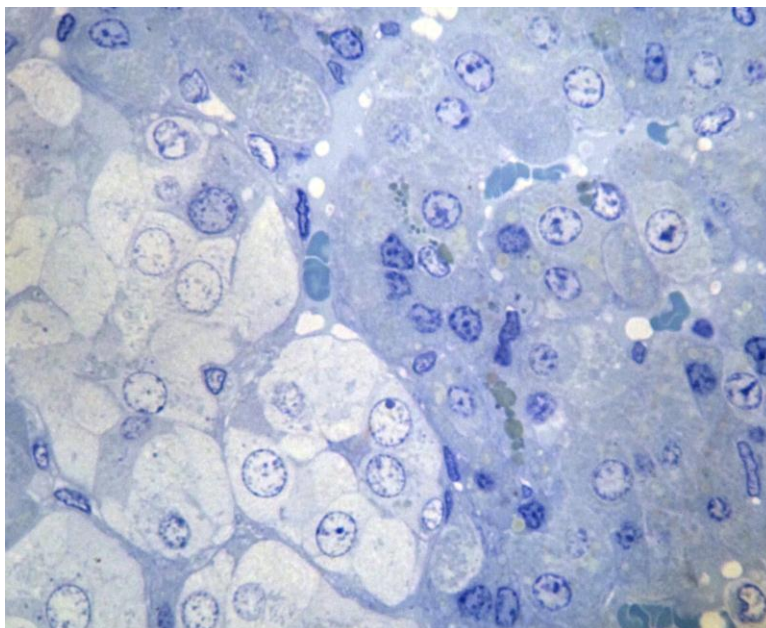
U ćelijama ZF volumenska gustina mitohondrija je značajno povećana, dok je broj lipidnih kapi smanjen. U ćelijama ZR značajno je povećan broj lipidnih kapi po μm^2 ćelije, kao i njihov ukupan broj po profilu ćelije.

Srž nadbubrežnih žlezda

Na polutankim presecima ćelije srži imaju svetlu citoplazmu i euhromatsko jedro (Sl. 79). Nakon tretmana toplotom uočava se tendencija smanjenja veličine ovih ćelija (Sl. 80).



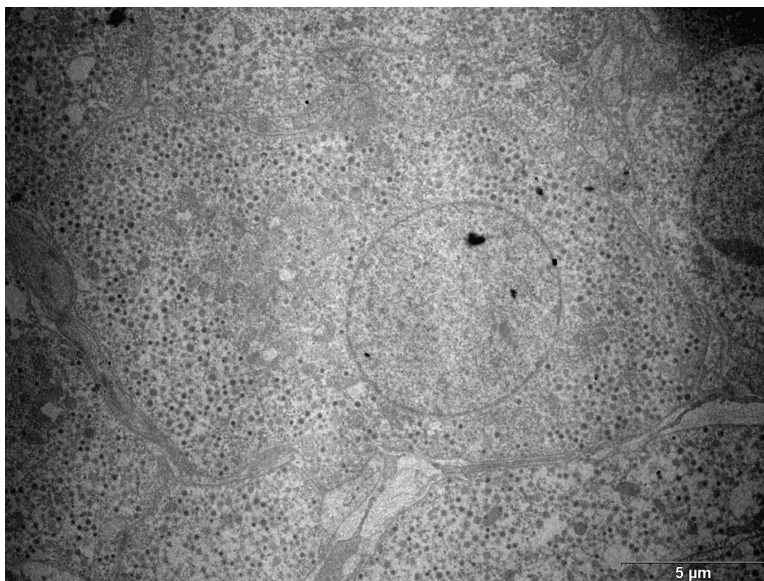
Slika 79. Hromafine ćelije u kontrolnoj grupi životinja (polutanki preseci, toluidin-plavo, uvećanje 1000x)



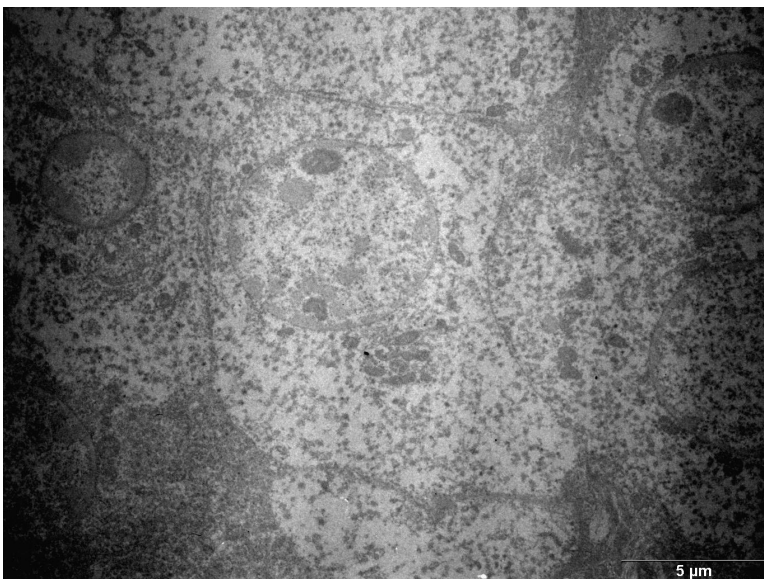
Slika 80. Hromafine ćelije u eksperimentalnoj grupi pacova (polutanki preseći, toluidinplavo, uvećanje 1000x)

Na ultrastrukturnom nivou u srži nadbubrežnih žlezda se uočavaju dva tipa ćelija, adrenalinske i noradrenalinske ćelije. Adrenalinske ćelije imaju sekretne granule umerene elektronske gustine (Sl. 81), dok su noradrenalinske granule veće elektronske gustine (Sl. 83). Na većim uvećanjima jasno se uočava da su adrenalinske granule obavijene membranom i da između membrane i sadržaja granule ne postoji prazan prostor koji je karakterističan za granule noradrenalinske ćelije (Sl. 85 i 87). U ćelijama se primećuju brojne mitohondrije.

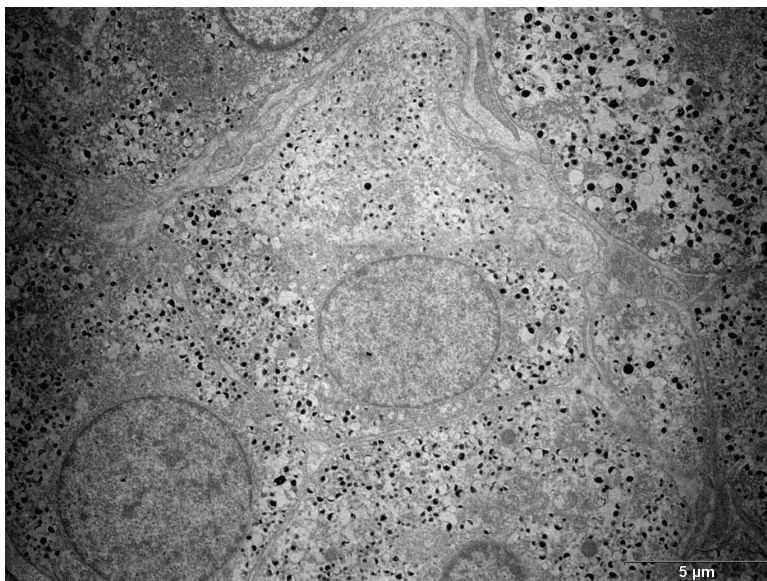
Nakon toplotnog stresa se uočava smanjenje površine profila adrenalinskih ćelija (Sl. 82). Noradrenalinske ćelije kontrolne i eksperimentalne grupe su ispunjene brojnim granulama sa karakterističnim elektron tamnim jezgrom (Sl. 83 i 84).



Slika 81. Adrenalinske ćelije u kontrolnoj grupi (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)



Slika 82. Adrenalinske ćelije u eksperimentalnoj grupi. Uočava se smanjen broj adrenalinskih granula u ćeliji pacova posle izlaganja povišenoj ambijentalnoj temperaturi (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)



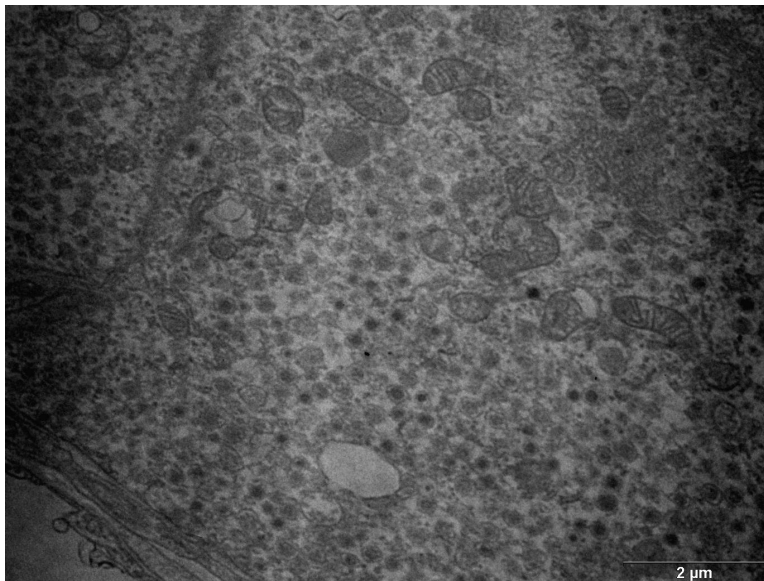
Slika 83. Noradrenalinske ćelije u kontrolnoj grupi (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)



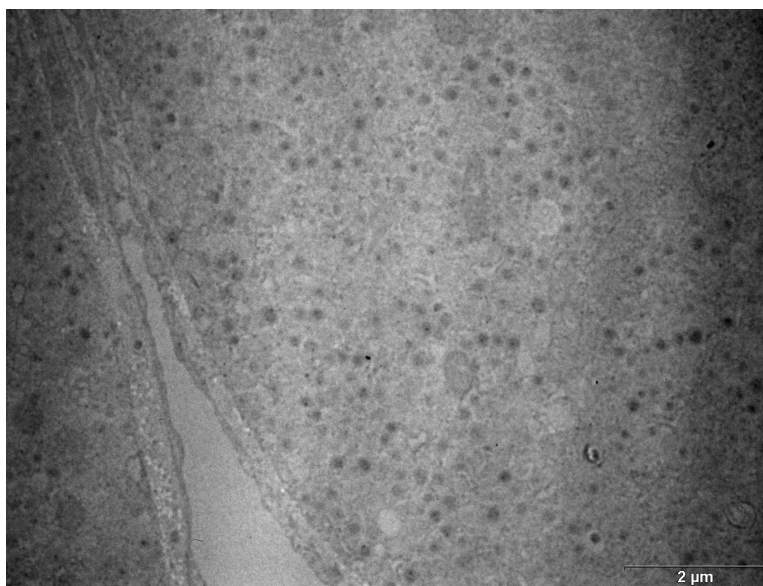
Slika 84. Noradrenalinske ćelije u eksperimentalnoj grupi (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 3400x)

Zastupljenost punih i promjenjenih granula i praznih kontejnera je značajno promjenjena u oba tipa hromafinih ćelija nakon toplotnog stresa. Uočava se smanjenje broja

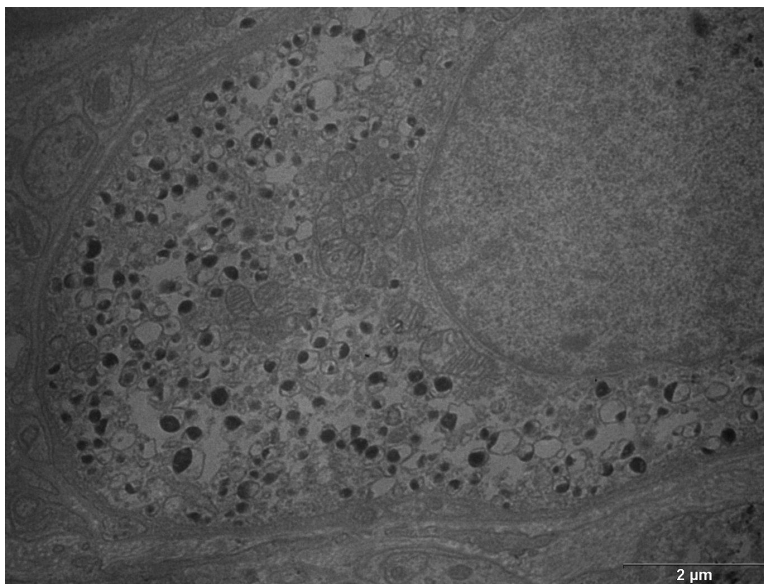
punih granula, dok se brojnost preostala dva tipa granula u adrenalinskim (Sl. 86) i noradrenalinskim ćelijama povećava (Sl. 88).



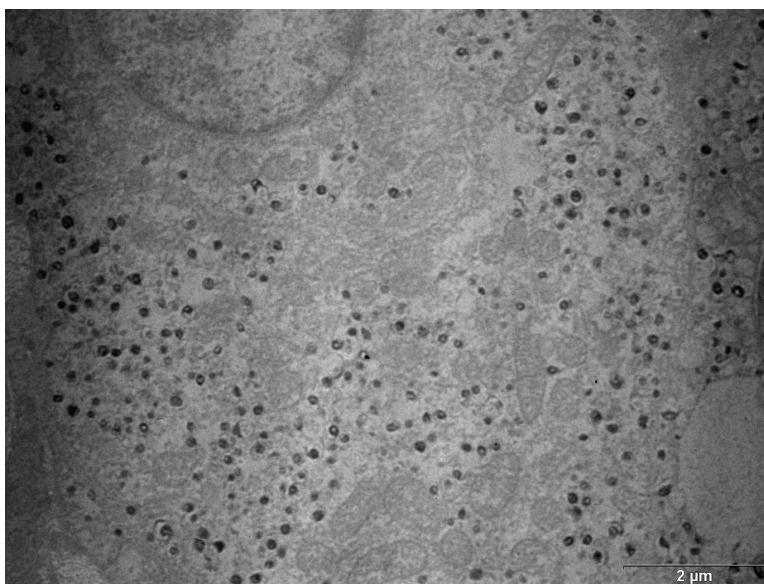
Slika 85. Adrenalinske granule u ćelijama kontrolne grupe pacova (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 8800x)



Slika 86. Adrenalinske granule u ćelijama eksperimentalne grupe pacova (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 8800x)

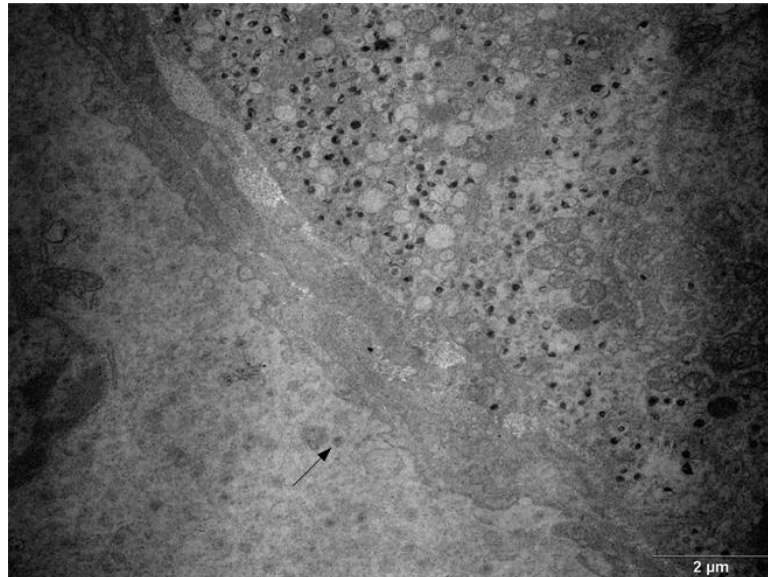


Slika 87. Noradrenalinske granule u ćelijama kontrolne grupe pacova (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 8800x)



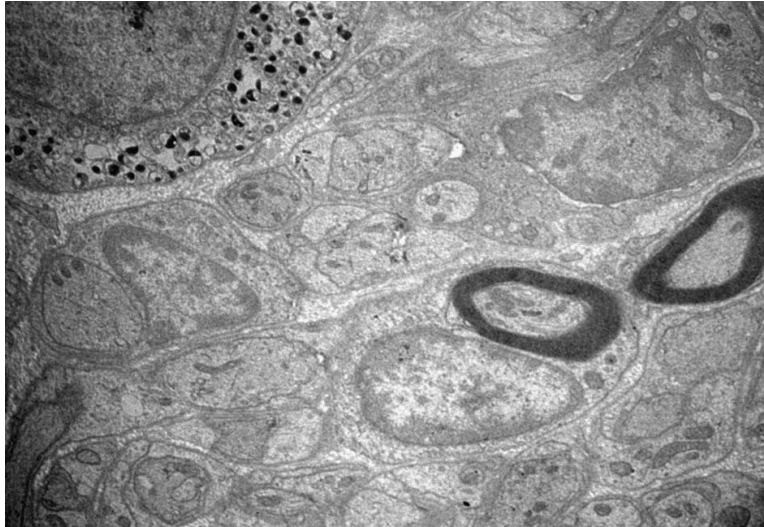
Slika 88. Noradrenalinske granule u ćelijama eksperimentalne grupe pacova (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 8800x)

U kapilarima između kateholaminskih ćelija srži nadbubrežne žlezde nakon toplotnog stresa uočene su cele adrenalinske granule sa netaknutom membranom (Sl. 89).



Slika 89. Cele adrenalinske granule u kapilarima eksperimentalne grupe pacova (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 8800x)

U srži nadbubrežne žlezde uočena su nervna vlakna. Ova vlakna ostvaruju vrlo blizak kontakt sa hromafinim ćelijama (Sl. 90). Na slici se jasno vidi nerv sa mijeliniziranim aksonima i Švanovim ćelijama, kao i brojni aksoni bez mijelinskog omotača.



Slika 90. Nervi u blizini noradrenalinske ćelije (uranil-acetat, olovo-citrat, uvećanje 5600x)

Stereološka analiza srži nadbubrežnih žlezda na ultrastrukturnom nivou

Rezultati stereoloških ispitivanja srži nadbubrežne žlezde na ultrastrukturnom nivou prikazani su u Tabeli 8.

Rezultati stereoloških ispitivanja na ultrastrukturnom nivou su u adrenalinskim ćelijama pokazala statistički značajno smanjenje sledećih parametara: površine ćelije, jedra i citoplazme. Statistički značajno je smanjen procenat punih granula, dok je procenat ostala dva tipa granula bio značajno uvećan. Kod noradrenalinskih ćelija promene su nađene samo na granulama gde je statistički značajno bio smanjen procenat punih granula, a procenat promenjenih granula i praznih kontejnera je bio statistički značajno uvećan.

Tabella 8. Stereološka analiza srži nabubrežnih žlezda pacova

	Kontrola	Tretman
Adrenalinske ćelije		
Površina profila (μm^2)		
Ćelija	156.52±9.44	96.54±4.86***
Jedara	34.86±2.42	27.3±1.44 **
Citoplazme	121.66±7.81	69.23±4.9***
Volumen (μm^3)		
Ćelija	1411 ± 176	1120 ± 135
Jedara	160 ± 18.3	159 ± 33.8
Pune granule (%)	95.8±1.5	55±5.4***
Promenjene granule (%)	2.3±0.8	20.3±3.5**
Prazni kontejneri (%)	1.9±0.7	24.7±1.8***
Noradrenalinske ćelije		
Površina profila (μm^2)		
Ćelija	110.94±7.59	109.08±8.22
Jedara	26.11±2.24	21.72±1.72
Citoplazme	84.83±6.62	87.35±7.51
Volumen (μm^3)		
Ćelija	1046 ± 167	1291 ± 151
Jedara	97.5 ± 12.5	102.0 ± 10.1
Pune granule (%)	82.9±3.2	25.9±10.2***
Promenjene granule (%)	7.6±2.5	49±7.5***
Prazni kontejneri (%)	9.5±1.1	25.1±3.2**

** statistička značajnost $p < 0.01$, *** statistička značajnost $p < 0.001$

Diskusija

U ispitivanju kratkotrajnog dejstva povišene ambijentalne temperature posebna pažnja je bila usmerena na uočavanje histoloških i ultrastrukturnih promena u hipofizi i nadbubrežnim žlezdama pacova kao organima koji direktno reaguju na stres i stimulse koji se prenose od hipotalamusa na hipofizu, a zatim sa hipofize na nadbubrežne žlezde. Dosadašnja malobrojna istraživanja nisu detaljno obuhvatala histološke, a posebno ultrastrukturne promene koje bi mogle da se ispolje posle ovakvog tretmana i zajedno sa imunohistohemijskim, stereološkim i biohemijskim ispitivanjima dopunila prazninu koja je postojala u ovakvim ispitivanjima. U tom smislu pažnja je bila usmerena na ispitivanje mogućih promena telesnih masa i telesne temperature životinja, mase i relativne mase organa, histološku i ultrastrukturnu analizu hipofize, sa posebnim osvrtom na kortikotropne (ACTH) ćelije i na histološku i ultrastrukturnu analizu nadbubrežnih žlezda, kao i imunohistohemijsko detektovanje nekoliko regulatornih peptida vezanih za nervnu komponentu nadbubrežnih žlezda. I na kraju, da bi se upotpunila slika promena koje bi nastale u ovim organima posle kratkotrajnog izlaganja pacova povišenoj ambijentalnoj temperaturi određivani su nivoi hormona u cirkulaciji ova dva organa. Sve ove analize i veliki broj primenjenih metoda trebalo je da pokažu mogućnost pojave nekih patoloških promena u hipofizi i nadbubrežnim žlezdama posle kratkotrajnog dejstva povišene temperature.

Analiza uticaja toplotnog stresa na mase i telesne temperature životinja

U ovom eksperimentu posle kratkotrajnog izlaganja životinja povišenoj ambijentalnoj temperaturi mase životinja bile su smanjene za 3.5%, što se pripisuje dehidraciji koja je uočena i kod ljudi posle izlaganja kratkotrajnom toplotnom stresu (Melin i sar., 2001). Nađeno je da i duže izlaganje životinja (6-8 sati) visokim temperaturama izaziva dehidraciju koja dovodi do smanjenja mase životinja i do 10% (Nose i sar., 1983). Gubitak tečnosti pri povišenju ambijentalne temperature, koji za posledicu ima smanjenje telesne mase, pokazan je i pri izlaganju pacova toplotnom stresu u

trajanju od 20 i 60 minuta (Jasnić i sar., 2010), od 90 minuta (Zurovski i sar., 1991; Michel i sar., 2007) i od 24 sata (Percinic-Popovska i sar., 2011).

Povišenje telesne temperature je jedna od glavnih odlika stresa, koja nastaje usled kratkotrajnog izlaganja toploti. Povišena spoljašnja temperatura dovodi do rasta telesne temperature kod pacova (Gisolfi i sar., 1991; Masset i sar., 1996), svinja (Barrand i sar., 1981), volova (Robertshaw i Whittow, 1966) i ljudi (Jezova i sar., 1994). Izlaganje toplotnom stresu izaziva hipertermiju (Koko i sar., 2004) koja je u ovom eksperimentu dovela do hiperpireksije (povećanja telesne temperature preko 41.5°C) koja se smatra bolešću nastalu gubitkom tečnosti i soli (Sriramachari, 2004). Prekomerno gubljenje vode, u uslovima povišene ambijentalne temperature, može dovesti do promene u ponašanju pacova, a sve u cilju održavanja telesne temperature i uspostavljanja temperaturene homeostaze. Intenzivna salivacija praćena lizanjem tela ima ulogu da smanji telesnu temperaturu (Jasnić i sar., 2010).

Uticao toploćnog stresa na hipofizu

U ovom eksperimentu naćeno je blago uvećanje mase hipofize nakon toploćnog stresa. Ranije studije su pokazale da ovo povećanje mase nastaje usled povećanja mase intermedijarnog lobusa i zadnjeg rećnja hipofize, dok je masa prednjeg rećnja smanjena (Koko i sar., 2006).

U ovom eksperimentu naćena je izuzetno visoka koncentracija ACTH u plazmi koja je, uporećivanjem sa kontrolnim vrednostima iznosila 400%. Razlićiti stresori dovode u većoj meri do izlućivanja ACTH iz kortikotropnih ćelija hipofize kao što je izlaganje pacova hladnoći u trajanju od 30 minuta (Sasaki i sar., 1990) ili izolacionom stresu (Gavrilović i Dronjak, 2005). Mećutim postoje razlike u intenzivnosti izlućivanja ACTH u zavisnosti od stresora.

Ukoliko se uporedi sa drugim stresorima, kao što su hladnoća, izglaćnjivanje, socijalni stres i dr., toploćni stresor je najjaći po svom intezitetu (Ćorćević i sar., 2003). Ovako znaćajno povećanje koncentracije ACTH rezultat je jaćine odgovora oćrganizma na

stres, i naročito je izraženo u njegovoj akutnoj fazi (Aguillera i sar., 1996). Povećanje koncentracije ovog hormona je uočeno nakon izlaganja toplotnom stresu (38°C) pacova u trajanju od 20 i 60 minuta (Jasnić i sar., 2010; Koko i sar., 2004), kao i prilikom izlaganja pacova toplotnom stresu (40°C) u trajanju od 90 minuta (Michel i sar., 2007).

S obzirom da je koncentracija ACTH u plazmi bila značajno povišena, povećanje volumena jedara povezuje se sa sintezom iRNK za ACTH, jer je u pojedinim ćelijama eksperimentalne grupe životinja uočen veći broj nezrelih granula u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Jasnić i sar., 2010). Povećanje volumena jedara može se dodatno objasniti i intenzivnom sintezom proteina toplotnog stresa (šoka) (engl. heat shock protein, HSP) koja započinje pri izlaganju ćelija povišenim temperaturama, kako bi se ćelije prilagodile tom stresu (Burel i sar., 1992). Signal koji dovodi do transkripcione aktivacije odgovarajućih gena je akumulacija denaturisanih proteina unutar ćelija nakon tretmana stresorom (Burel i sar., 1992). HSP se vezuju za specifične DNK domene elemenata toplotnog šoka (engl. heat shock element, HSE), unutar promotorskih regiona HSP gena kako bi povećali njihovu transkripciju (Blake i sar., 1991).

Nakon toplotnog stresa dolazi do oslobađanja ACTH iz adrenokortikotropnih ćelija (Đorđević i sar., 2003; Koko i sar., 2006; Jasnić i sar., 2010) pod uticajem CRH. U oslobađanju ACTH važnu ulogu ima i vazopresin, čija se koncentracija povećava nakon toplotnog stresa (Jasnić i sar., 2010). U fiziološkim uslovima kod nekih organizama (ovca, konj) vazopresin je glavni stimulator oslobađanja ACTH (Aleksander i sar., 1997; Engler i sar., 1989). Kod pacova važniju ulogu u oslobađanju ACTH ima CRH. Osim uticaja vazopresina, sintetisanog u parvicelularnim neuronima paraventrikularnog jedra, na oslobađanje ACTH može delovati vazopresin poreklom iz neurohipofize i to oslobađanjem preko dugih portalnih krvnih sudova koji povezuju eminenciju medijanu sa adenohipofizom (Holmes i sar., 1986), preko kratkih portalnih krvnih sudova, koji povezuju neuro- i adenohipofizu (Bergland i Page, 1978), ili pak preko sistemskog krvotoka.

Istraživanja pokazuju da na oslobađanje ACTH može da utiče i oksitocin. Ukoliko se na izolovane kortikotropne ćelije deluje oksitocinom, one oslobađaju sadržaj granula. Do egzocitoze dolazi usled povećanja koncentracije jona Ca^{2+} mobilizacijom iz unutarćelijskih depoa (Link i sar., 1992).

Važne uloge u sekreciji ACTH imaju VIP, koji se sintetise u hipofizi, i PACAP (engl.pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide). Ova dva peptida pospešuju sekreciju ACTH, na taj način što VIP izaziva oslobađanje CRH, a PACAP direktnom stimulacijom kortikotropnih ćelija (Nussdorfer i Malendowicz, 1998).

Analiza uticaja toplotnog stresa na histološke i ultrastrukturne odlike ACTH ćelija

Nakon akutnog toplotnog stresa uočeno je statistički značajno povećanje volumenske gustine jedara ACTH ćelija, ali nije bilo promena u volumenskoj gustini samih ćelija što se može pripisati razrastanjem adenohipofize usled uvećanja broja ili veličine drugih ćelija prisutnih u ovom režnju hipofize. U ovom eksperimentu, na nivou svetlosne mikroskopije, nađena je jako smanjena ACTH imunopozitivnost u kortikotropnim ćelijama pacova, ukazujući na mogućnost jakog izlučivanja ACTH, ali takođe i na poremećaj u produkciji zrelog hormona. U prilog mišljenja da se radi o oslobađanju ACTH iz ćelija je visok nivo ovog hormona u krvi posle kratkotrajnog dejstva povišene ambijentalne temperature u toku 60 minuta.

Na ultrastrukturnom nivou, veći broj zvezdolikih kortikotropnih ćelija, zajedno sa uvećanjem volumena jedra, dilatiranim cisternama ER-a i Goldži aparata ukazivali su na njihovu povećanu aktivnost što je pokazano i u radu Caselitz-a i Saeger-a (1978). Smanjeni broj zrelih granula koje su uočene u jednom sloju uz ćelijsku membranu, kao i uočavanje nezrelih granula u pojedinim kortikotropnim ćelijama u skladu je sa visokom koncentracijom ACTH u krvi i povećanoj mobilizaciji svih organela u sintezi ACTH. Takođe, pored smanjenja broja granula u ovim ćelijama, uočena dilatacija endoplazmatičnog retikuluma tumači se i kao direktna posledica izlaganja toplotnom stresu (Borelli, 1984).

U krvnim sudovima adenohipofize otkrivena je agregacija krvnih pločica samo u pacova kratkotrajno izlaganim povišenoj ambijentalnoj temperaturi i ovi naši nalazi su u skladu sa podacima Gader-a i saradnika (1990) o agregaciji i aktivaciji krvnih pločica posle izlaganja visokim temperaturama. Povrede endotelnih ćelija i mikrovaskularne tromboze su odlika toplotnog šoka (Bouchama i sar., 1996).

Analiza uticaja toplotnog stresa na nadbubrežne žlezde

Analiza uticaja toplotnog stresa na mase i relativne mase nadbubrežnih žlezda

Masa nadbubrežnih žlezda, kao i njihova relativna masa, koja odslikava odnos veličine organa i organizma, bile su neznatno uvećane što je u skladu sa ranijim ispitivanjima Koko i sar. (2004) gde su apsolutne i relativne mase nadbubrežnih žlezda pacova pod istim eksperimentalnim uslovima (38°C, 60 minuta) bile uvećane. Koldysheva i Lushnikova (2008) su našle smanjenje ovih parametara posle 30 minuta izlaganja miševa toplotnom stresu. Prema ovim autorima, apsolutne i relativne vrednosti masa nadbubrežnih žlezda su se smanjivale posle 3, 7 i 14 dana po izlaganju povišenoj ambijentalnoj temperaturi. Moguće je da ove razlike potiču od specifičnosti vrste.

Analiza dejstva toplotnog stresa na koru nadbubrežnih žlezda

Analizirajući učešće pojedinih tkivnih komponenata nadbubrežnih žlezda nakon toplotnog stresa, uočava se značajno smanjenje volumenske gustine kapsule i ZG, dok se volumenske gustine ostalih zona nisu bitnije menjale. Smanjenje učešća ZG u volumenskoj gustini kore žlezde može se objasniti blagim povećanjem volumenskih gustina ZF i ZR.

Nakon izlaganja toplotnom stresu volumenska gustina krvnih sudova u ZG bila je smanjena što se može tumačiti vazokonstrikcijom nastalom nakon povećanog izlučivanja aldosterona. Porast koncentracije aldosterona je takođe nađen i nakon dejstva drugih stresora kao što je imobilizacioni stres kod pacova (Macho i sar., 1992). Pokazano je da ovakav tip stresa dovodi do povećanja koncentracije aldosterona uslovljavajući aktivaciju renin-angiotenzin sistema, koja dovodi do vazokonstrikcije mišićnih zidova krvnih sudova. Pri toplotnom stresu životinje se nalaze u uslovima hipertermije, što se karakteriše salivacijom i povišenom telesnom temperaturom. Ovakvo stanje dovodi do gubitka vode i soli, pa je povećana koncentracija aldosterona neophodna za uspostavljanje osmotske homeostaze. U uslovima stresa, povećano izlučivanje ACTH može dovesti do oslobađanja aldosterona (Aguilera i sar., 1996; Jasnić i sar., 2010). Uočeno je da toplotni stres dovodi

do povećanja volumena ćelija zone glomeruloze (Koko i sar., 2004), što nije potvrđeno u ovom eksperimentu.

Smatra se da hormoni kore nadbubrežne žlezde difunduju kroz plazminu membranu i da ne postoji mogućnost njihovog skladištenja (Basset i Pollard, 1980). Novija istraživanja pokazuju postojanje organskih anjonskih transportera (OAT), organskih katjonskih transportera (OCT), kao i organskih anjonskih transportujućih polipeptida (OATps) koji mogu biti povezani sa oslobađanjem steroidnih hormona.

Na ultrastrukturnom nivou ćelije ZG su nepravilnog oblika, sa malim brojem mikrovila. Njihovo jedro je okruglo ili ovalno. Mitohondrije su različitog oblika sa pločastim kristama. Veličina i gustina lipidnih kapi je različita (Rhodin, 1971). Ranije studije su pokazale dva tipa ćelija na ultrastrukturnom nivou, svetle ćelije koje sadrže brojne lipidne kapi i tamne ćelije koje su manje i po veličini i po broju lipidnih kapi (Giacomelli i sar., 1965). Nepostojanje tamnih ćelija u stimulisanoj nadbubrežnoj žlezdi može ići u prilog činjenici da su ove neaktivne ili rezervne ćelije transformisane u svetle ćelije koje imaju veći kapacitet za sintezu steroida (Giacomelli i sar., 1965). U ovom eksperimentu ultrastrukturnom analizom je pokazano značajno smanjenje broja lipidnih kapi po jediničnoj površini i po citoplazmi ćelije, kao i volumenske gustine lipidnih kapi.

Smanjenje broja lipidnih kapi može se tumačiti najpre povećanom sintezom aldosterona gde se lipidne kapi kao supstrat za sintezu hormona unose u mitohondrije, ali takođe se može tumačiti i izlučivanjem iz ćelija. Istraživanja su pokazala da ACTH stimuliše oslobađanje aldosterona iz ćelija kore nadbubrežne žlezde sisara (Vinson i sar., 1980; Rocco i sar., 1994). Sintezu ovog hormona stimuliše i angiotenzin II aktivacijom angiotenzinskih receptora (Balla i sar., 1991). Studije na humanim H295R ćelijama kore nadbubrežne žlezde su pokazale da povećana sinteza aldosterona, usled delovanja angiotenzina II, dovodi do povećane sinteze StAR-a (Clark i sar., 1995). U uslovima akutnog stresa najpre dolazi do transporta holesterola do unutrašnje membrane mitohondrija, do *de novo* sinteze StAR koji olakšava transport holesterola kroz membranu mitohondrija (Li i sar., 2003). Ustanovljeno je da pri akutnom delovanju ACTH iRNK StAR-a u ćelijama ZG se povećava za 220-370% nakon samo 30 min (Lehoux i sar., 1998). Drugi protein koji učestvuje u transferu lipida do mitohondrija je protein 2 nosač sterola

(engl. sterol carrier protein-2; SCP-2) koji omogućava korišćenje holesterola dobijenog od peroksizoma (Seedorf i sar., 2000). Pored toga, utvrđeno je da ACTH povećava *de novo* sintezu diacilglicerola u kulturi ćelija zone glomeruloze teleta (Cozza i sar., i, 1990) i aktivira protein kinazu C neophodnu za indukciju fosforilacije StAR-a (Li i sar., 2003). Pokazano je da kratkotrajni tretman nadbubrežne žlezde ACTH-om dovodi do smanjenja broja lipidnih kapi u zoni glomerulozi i povećanja koncentracije aldosterona (Mazzocchi i sar., 1998). Ovakav tretman takođe pospešuje aktivnosti enzima (11 β -hidroksilaze i 18-hidroksilaze) koji učestvuju u sintezi kortiksterona i aldosterona (Mazzocchi i sar., 1985). Do smanjenja broja lipidnih kapi dolazi i pri izlaganju celog tela pacova visokim temperaturama u trajanju od 3 dana (Koldysheva i Lushnikova, 2008). Smanjenje broja lipidnih kapi uočeno je pri hroničnom tretmanu nadbubrežne žlezde sa ACTH (Andreis i sar., 1990).

Stereološke studije na ultrastrukturnom nivou su pokazale povećanje broja mitohondrija po citoplazmi ćelije i po jediničnoj površini usled povećane potrebe za sintezom aldosterona. Izlučivanje natrijuma, koje se dešava pri dehidraciji usled toplotnog stresa, može biti jak stimulus za sintezu aldosterona. Ćelije koje učestvuju u sintezi ovog hormona imaju povećanu potrebu za biosintetskim jedinicama, mitohondrijama i glatkim endoplazmatičnim retikulumom (Marušić i Mulrow, 1967). Do povećane sinteze aldosterona dolazi pri stresu hladnoćom kao i pri imobilizacionom stresu, kada se njegova koncentracija povećava od 14 do 20 puta (Stier, 2004). Na sintezu aldosterona mogu uticati noradrenalin i ATP koji do ćelija ZG dolaze difuzijom, pokazujući tako parakrino delovanje ovih molekula (Szalay i sar., 1998). Kao i u ćelijama zone fascikulate i ovde se uočava bliska povezanost mitohondrija i lipidnih kapi što može objasniti povećanu sintezu aldosterona. Pokazano je da angiotenzin II pored toga što povećava ekspresiju StAR-a i ubrzava prenos holesterola do membrana mitohondrija, može uticati na aktivnost holesterol-estar-hidrolaze koja obezbeđuje dodatne količine holesterola iz unutarćelijskih izvora u ćelijama zone glomeruloze kod goveda (Cherradi i sar., 2003). Prilikom delovanja ACTH *in vivo* na nadbubrežne žlezde pacova i hrčka nivo StAR iRNK se povećao za sat vremena u svim zonama nadbubrežne žlezde (Fleury i sar., 1998).

Važnu ulogu u sintezi aldosterona ima koncentracija Ca^{2+} u ćeliji, čije povećanje stimuliše steroidogenezu. Aktivacija angiotenzin II receptora dovodi do stimulacije protein kinaze C, kao i do otpuštanja Ca^{2+} iz unutrašnjih izvora, ali i njegovog influksa preko membrane (Burnay i sar., 1994). Ekstracelularni K^+ dovodi do otvaranja Ca^{2+} kanala i ulaska Ca^{2+} u citosol. Pokazano je da se povećanje koncentracije ovog jona u ćeliji, može preneti na mitohondrijalni matriks i da blokada mitohondrijalne $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ razmene, koja smanjuje izbacivanje Ca^{2+} iz mitohondrija, dovodi do steroidogeneze (Brandenburger i sar., 1996). Pored toga, Rossier i sar., (1996) su dokazali da Ca^{2+} koji ulazi u ćeliju preko voltažnih kanala T-tipa, zaobilazi citosol i aktivira direktno intramitohondrijalne korake u sintezi aldosterona. Cherradi i sar., (1996) su pokazali da je transfer endogenog holesterola iz spoljašnje u unutrašnju membranu stimulisan povišenom koncentracijom Ca^{2+} .

Uočeno je da pri akutnoj aplikaciji supstance P (SP) dolazi do povećanja koncentracije aldosterona (Nussdorfer i sar., 1988), dok pri hroničnom delovanju dolazi do povećanja volumena ZG, njenih ćelija i jedara. Stereološki podaci pokazuju da je hiperftrofija ćelija ZG praćena povećanjem volumena mitohondrija i njihovih kristi, volumena glatkog endoplazmatičnog retikuluma, kao i smanjenjem lipidnog sadržaja (Malendonowicz, 1993). Hronična aplikacija VIP je imala isti efekat na ćelije ZG (Mazzocchi i sar., 1987).

Treba napomenuti da se u ovom eksperimentu, unutar ćelija ove zone nalaze mitohondrije čije pločaste kriste postaju tubulo-vezikularne, sa tubularnim uvratima unutrašnjih membrana, što se objašnjava fazama u sintezi aldosterona koja se odvija u različitim mitohondrijama (Wassermann i Wassermann, 1974). Još jedna potvrda sinteze aldosterona ogleđa su u prisustvu intramitohondrijalnih depozita, koji mogu predstavljati intermedijarni kortikosteron, 18-hidroksikortikosteron i aldosteron (Giacomelli i sar., 1965; Luthman, 1971).

Povećanje broja mitohondrija u ćelijama ZG može se tumačiti deobom mitohondrija koja je jasno uočena na mikrografijama. Mitohondrije, pripremajući se za deobu, menjaju oblik, preraspodeljuju kriste i formiraju centralnu kristu koja u potpunosti deli dva buduća matriksa kada segmentacijom nastaju dve upola manje mitohondrije (Korać, 1999). Deoba mitohondrija može biti izazvana i drugim stresorima (hladnoća, vežbe, dijeta i oksidativni

stres). Deoba ovih organela je praćena varijacijama u velićini, broju i masi mitohondrija (Ventura-Clapier i sar., 2008). Pokazano je da pri stresu hladnoćom dolazi do indukcije PGC-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α) koaktivatora, koji podstiće deobu mitohondrija (Wu i sar., 1991). U ovom eksperimentu je takođe pokazano da izlaganje povišenoj temperaturi dovodi do deoba mitohondrija. Može se reći da je ovakav tretman izazvao dva procesa u ćelijama ZG, sintezu aldosterona s jedne strane i oslobađanje hormona u krv s druge strane.

Stereološke analize su pokazale da su volumenska gustina, volumen i površina ćelija zone fascikulate znaćajno bile povećane nakon tretmana toplotom što je rezultiralo znaćajnim smanjenjem numerićke gustine ćelija. Volumeni ćelija su bili uvećani razrastanjem citoplazmatićne komponente. Na ultrastrukturnom nivou, u ćelijama ove zone naćeno je smanjenje broja lipidnih kapi po citoplazmi ćelije i po jedinićnoj površini u ćelijama. S obzirom da je volumen ovih ćelija nakon toplotnog stresa povećan, a volumenska gustina lipidnih kapi je ostala nepromenjena, moće se zakljućiti da se velićina lipidnih kapi povećala. Ipak, postavljanje lipidnih kapi uz ćelijsku membranu i njihovo prisustvo u lumenu malih krvnih sudova, ukazuje na mogućnost oslobađanja lipidnih kapi iz ćelija zone fascikulate. Studije su već pokazale da toplotni stres izaziva znaćajno izbacivanje lipidnih kapi iz parenhimskih ćelija kore nadbubrećnih ųlezda miševa, naroćito iz ćelija zone fascikulate (Koldysheva i Lushnikova, 2008). Ranija ispitivanja su pokazala da se koncentracija holesterola pri izlaganju toplotnom stresu smanjila usled sinteze kortikosterona. Pri delovanju razlićitih stresora najintenzivniju sintezu kortikosterona izaziva tretman toplotom u trajanju od 60 minuta (Đorćević i sar., 2003). Smanjenje broja lipidnih kapi se uoćava i pri tretmanu nadbubrećne ųlezde sa ACTH (Rhodin, 1971). Prema Rodinovoj hipotezi, ćelije zone fascikulate poseduju lipidne kapi razlićitih sadržaja, neke sadrće holesterol kao prekursor steroidnih hormona, druge hormone ili njihove neposredne prekursore. Nakon stimulacije dolazi do oslobađanja hormona iz lipidnih kapi sa površine ćelija ka krvnim sudovima. Treba naglasiti da se nakon tretmana toplotom broj lizozoma u ćelijama povećava. Ova pojava moće biti znaćajna za oporavak ćelije i samog organizma od toplotnog stresa (Pingping i sar., 2009), jer lizozomi imaju mogućnost fagocitoze nefunkcionalnih organela.

Brojna tamna tela, uočena u ćelijama ZF posle izlaganja povišenoj ambijentalnoj temperaturi, prema nekim autorima nisu lizozomi, u sebi sadrže steroid i predstavljaju nosač za oslobađanje hormona iz ćelije (Gemmell i sar., 1977).

Važnu ulogu u sintezi kortikosterona ima ACTH, jer reguliše endocitozu lipoproteina niske gustine iz plazme do lipidnih kapi (Brown i sar., 1979), kao i hidrolizu estara holesterola u lipidnim kapima (Pedersen i Brownie, 1980). Kod izolovanih ćelija nadbubrežne žlezde u medijumu ACTH stimuliše ulazak holesterola u mitohondrije (Crivello i Jefcoate, 1980). Kada su pacovi tretirani sa aminoglutetimidom (blokatorom sinteze steroida), holesterol se akumulirao u unutrašnjoj membrani mitohondrija (Privalle i sar., 1983). U mitohondrijama ćelija nadbubrežne žlezde konverzija holesterola u pregnenolon se obnavlja za 3-4 minuta nakon odstranjivanja aminoglutetimida (Crivello i Jefcoate, 1980). Pri tretiranju pacova sa cikloheksamidom (inhibitorom sinteze proteina) premeštanje holesterola do unutrašnje membrane mitohondrija je zaustavljeno (Privalle i sar., 1983). Samo u prisustvu ACTH reakcija između holesterola i citohroma P450 se ponovo uspostavlja (Simpson i sar., 1978). Na osnovu toga se zaključuje da ACTH olakšava transport holesterola do unutrašnje membrane mitohondrija (Privalle i sar., 1983).

S obzirom da je volumenska gustina mitohondrija bila povećana, a da se broj mitohondrija po jediničnoj površini nije promenio, može se zaključiti da je došlo do hipertrofije ovih organela. Hipertrofija mitohondrija, bez promene u njihovom broju, se uočava nakon 10 minutne aplikacije ACTH na ćelije zone fascikulate (Rhodin, 1971). Kao što je ranije pokazano, hroničan tretman sa ACTH ima izuzetan efekat na populaciju mitohondrija u ćelijama zone fascikulate i u zavisnosti od dužine tretmana izaziva i hipertrofiju i proliferaciju ove organele (Nussdorfer i sar., 1974; Nussdorfer i Mazzocchi, 1983). Akutna stimulacija ACTH takođe ima uticaja na mitohondrije, usled povećane potrebe za sintezom hormona. Promene se odnose na broj, veličinu i oblik kristi, dok volumen mitohondrija pokazuje tendenciju uvećanja (Sekiyama i Yago, 1975; Boshier i sar., 1990; Isola i sar., 2010). Takođe u ćelijama zone fasciculate nakon toplotnog stresa u matriksu mitohondrija se uočavaju strukture nalik kristalima. Ovakve strukture su slične onima uočenim u lizozomima ćelija zone fasciculate nakon jedne doze primene ACTH, i objašnjavaju se nagomilavanjem holesterola, estara holesterola ili kortikosterona (Rhodin,

1971). Postojanje ovakvih struktura u matriksu mitohondrija kod tretiranih pacova može biti znak povećane sinteze steroida izazvane toplotnim stresom. Takođe pri tretiranju kultura ćelija zone fascikulate acetilholinom i pilokarpinom, dolazi do povećane fragmentacije mitohondrija koja ima važnu ulogu u steroidogenezi (Tokar i sar., 2002). U ovom eksperimentu ultrastrukturne studije su pokazale blizak kontakt između mitohondrija i lipidnih kapi. Vrlo često nekoliko mitohondrija okružuje malu lipidnu kap. U uslovima stresa male lipidne kapi mogu imati važnu ulogu u brznoj steroidogenezi, što je potvrđeno studijom u kojoj su pacovi hranjeni sa dosta masti, malo proteina i zamenom za holesterol (Matsukuma, 1981).

U pojedinim ćelijama pored tubularnih mitohondrija uočene su mitohondrije sa lamelarnim kristama. Ova pojava se smatra jedinstvenom odlikom ćelija koje sintetišu steroide (Hanaki i sar., 1985; Prince, 2002). Pretpostavlja se da lamelarne mitohondrije nisu uključene u sintezu ATP (adenozin trifosfata), već u sintezu hormona (Prince, 2002). Pojava kontakta lamelarnih kristi sa citoplazmom, koja je zapažena u ovom eksperimentu, kako u ćelijama ZG tako i ZF, upotpunjuje sliku o povećanoj aktivnosti ovih organela u sintezi hormona.

Mikrografije ćelija ove zone otkrivaju postojanje velikih lipidnih kapi okruženih glatkim endoplazmatičnim retikulumom. Ovakva pojava objašnjava se funkcionalnom povezanošću ovih organela pri sintezi hormona (Brenner, 1966; Rhodin, 1971). Takođe, pojava mijelinskih rezidualnih tela ukazuje na intenziviranje sinteze kortikosterona (Koldysheva i Lushnikova, 2008).

U ćelijama ZF uočava se dilatacija Goldžijevog aparata, i posebno glatkog endoplazmatičnog retikuluma, nastala kao posledica izlaganja organizma toplotnom stresu kao što je pokazano i u drugim istraživanjima (Koldysheva i Lushnikova, 2008).

Ultrastrukturne studije ćelija ZR su pokazale da su ove ćelije manje po svojoj veličini od ćelija zone fascikulate, kao i da su višeučugaone (Rhodin, 1971). Mitohondrije su različitog oblika i veličine, dok su kriste najčešće tubularnog vezikularnog tipa. U ćelijama ove zone značajno je uvećan broj lipidnih kapljica što predstavlja značajnu razliku u odnosu na predhodne dve zone kore nadbubrežnih žlezda. Oblik i veličina lipidnih kapi su

vrlo različiti, kao i elektronska gustina ovih organela. Čelije ZR poseduju najviše glatkog endoplazmatskog retikuluma, kao i brojne lipofuscinske granule. Autoradiografske studije su pokazale postojanje tri tipa ćelija u zoni retikularis, svetle ćelije koje su aktivne u sintezi steroida, tamne ćelije koje se nalaze u fazi mirovanja i vrlo tamne ćelije koje pokazuju znake degradacije (Nussdorfer i Mazzocchi, 1969). Naše ultrastrukturne studije su otkrile postojanje svetlih ćelija sa nagomilanim lipidnim kapima i tamnih ćelija, tj. ćelija koje se nalaze u fazi mirovanja ili možda degeneracije.

Takva fenotipska raznovrsnost se objašnjava različitom ćelijskom senzitivnošću prema destruktivnim faktorima kao i povećanjem subpopulacije novoformiranih ćelija (Koldysheva i Lushnikova, 2008). Ultrastrukturna ispitivanja pokazuju povećanje broja lipidnih kapi po citoplazmi ćelije, ali i po jediničnoj površini.

Različiti stimuli mogu dovesti do nagomilavanja lipidnih kapi u ćelijama ZR. Rodin (1971) je pokazao da takav uticaj ima deksametazon. Povećan broj lipidnih kapi u zoni retikularis se uočava nakon davanja pacovima hrane koja sadrži puno masti, malo proteina i zamenu za holesterol (Matsukuma, 1981). Na povećanje broja lipidnih kapi mogu uticati heat shock proteini koji blokiraju transkripciju StAR proteina i time sprečavaju transport holesterola od spoljašnje do unutrašnje membrane mitohondrija kako je pokazano na Lejdigovim tumorskim MA-10 ćelijama miša (Murphy i sar., 2001). Iako se ćelije zone retikularis nalaze pod uticajem ACTH, i očekivano je da lipidne kapi budu oslobođene u kapilare, njihovo nagomilavanje u ćelijama može se objasniti drugačijom regulacijom ove zone u odnosu na zonu fascikulatu (Obut, 1992). Reakcija ćelija ZR vrlo često može biti slabija na stimulaciju ACTH u odnosu na ćelije ZF (Vinson, 2003).

Različita reakcija ćelija unutar zona nadbubrežne žlezde je uočena pri primeni buke kao stresora (Pellegrini i sar., 1997). U regulaciji ZR važnu ulogu imaju ćelije srži nadbubrežne žlezde. Na oslobađanje androstenediona može da utiče adrenalin iz hromafinih ćelija srži, i oslobađanje androgena zavisi od doze adrenalina (Ehrhart-Bornstein i sar., 1994). U ovom slučaju radi se o parakrinoj regulaciji ćelija zone retikularis. Studije sa izolovanom nadbubrežnom žlezdom svinje pokazuju da na oslobađanje androstenediona može da utiče VIP (Bornstein i sar., 1993). Kako ovi nervi prolaze kroz koru, stimulacija splanhičkih nerava kod budne teladi može dovesti do

oslobađanja VIP iz nadbubrežne žlezde (Bloom i sar., 1988) i tako ostvariti uticaj na oslobađanje androstenediona. Studije na kulturama ćelija nadbubrežne žlezde čoveka su pokazale da VIP može uticati na oslobađanje kortizola, takođe u manjoj meri i na oslobađanje androstenediona (Bornstein i sar., 1996).

Ultrastrukturalna ispitivanja su otkrila postojanje autofagolizozoma, kao i autofagnih vakuola koje se formiraju oko mitohondrija u pojedinim ćelijama nakon tretmana. Ovakve promene uočavaju se u hepatocitima nakon toplotnog stresa (Oberley i sar., 2008). Kroemer i Jaattela (2005) smatraju da prisustvo autofagozoma u ćeliji ne mora biti dokaz povećane autofagije.

U pojedinim ćelijama ZR jedarni ovoj je izuzetno proširen uz bliski kontakt sa mitohondrijama. Ova pojava se objašnjava činjenicom da se mitohondrije nalaze u blizini potencijalnog potrošača energije (jedra) i da na taj način ćelija nema potrebu za transportom energije preko različitih sredina. Sem toga, ovaj blizak kontakt može omogućiti transport iRNK iz jedra u citoplazmu (Prachař, 2003).

Nakon izlaganja pacova toplotnom stresu nađeno je značajno smanjenje dijametara krvnih sudova u ovoj zoni. Ovo se može objasniti cirkulacijom i na specifičan način organizovanim krvnim sudovima u kori nadbubrežne žlezde. Ranijim studijama je pokazano da ACTH utiče na širenje krvnih sudova u zoni glomerulozi i srži, ali ne i u zoni fascikulati i zoni retikularis. Iz ovih zona, kao rezultat povećane propustljivosti kapilara, sva krv se usmerava ka parenhimu (Nakamura i Masuda, 1981). Brzina krvotoka u nadbubrežnoj žlezdi je kontrolisana brojnim nervnim i hormonskim mehanizmima (Vinson i Hinson, 1992; Breslow, 1992). Za nekoliko neuropeptida je pokazano da imaju uticaja na krvotok nadbubrežne žlezde: VIP, met-enkefalin i CGRP izazivaju vazodilataciju, a NPY vazokonstrukciju (Hinson i sar., 1994). Stres hladnoćom povećava iRNK NPY u nadbubrežnoj žlezdi pacova (Hiremagalur i sar., 1994). NPY zajedno sa noradrenalinom se nalazi u perivaskularnim simpatičkim neuronima i može imati ulogu vazokonstriktora pri povećanoj aktivnosti nadbubrežne žlezde (Wahlestedt i sar., 1990) nastaloj usled izlaganja stresorima.

Dužina i dijametar krvnih sudova u ZR nisu bili značajno smanjeni kao što je pokazano prethodnim ispitivanjima (Koko i sar., 2004). Najverovatnije je da do smanjenog

protoka krvi u ovoj zoni nadbubrežne žlezde dolazi usled delovanja neuropeptida Y koji izaziva vazokonstrikciju jer su imunopozitivna vlakna NPY u bliskom kontaktu sa krvnim sudovima (Petty i sar., 1984). Pojedina istraživanja pokazuju da regulacija NPY u zoni glomerulozi zavisi od ACTH, dok je regulacija ovog peptida u drugim zonama kore i srži nadbubrežne žlezde zavisna od glukokortikoida (Hinson i sar., 1998). Studije rađene u uslovima mirovanja, imobilizacionog stresa i stresa etrom su otkrile da NPY u cirkulaciji potiče iz izvora koji se nalaze izvan nadbubrežne žlezde (Bernet i sar., 1998). Zanimljivo je da nervi koji su imunopozitivni na NPY sadrže i kateholamine (Kuramoto i sar., 1986). Preparacija nadbubrežne žlezde perfuzijom pokazala je da adrenalin ima jak vazokonstriktivni efekat (Hinson i sar., 1986).

Interesantno je zapaziti da se i u kapilarima kore nadbubrežnih žlezda, kao i u hipofizi javlja agregacija krvnih pločica u pacova kratkotrajno izlaganih povišenoj ambijentalnoj temperaturi. Postoje podaci da NPY koji se izlučuje prilikom stresa sa krajeva sinaptičkih nerava ili iz srži nadbubrežne žlezde može olakšavati agregaciju krvnih pločica (Zukowska-Grojec, 1995).

Analiza uticaja toplotnog stresa na peptidergičku inervaciju kore nadbubrežne žlezde

U ovom eksperimentu ispitivana su tri najzastupljenija neuropeptida u nadbubrežnim žlezdama, VIP, NPY i SP. Imunohistohemijske studije su pokazale postojanje VIP imunoreaktivnih nerava u ZG, ali i u kapsuli (Höckfelt i sar., 1981; Holzwarth, 1984). Oomori i sar., (1994) su na osnovu kolokalizacije tirozin hidroksilaze, NPY i VIP u nervnim vlaknima kapsule i srži nadbubrežne žlezde uočili različite tipove kolokalizacije, na osnovu čega su zaključili da se poreklo ovih nerava razlikuje. Do oslobađanja VIP-a iz nadbubrežnih žlezda kod budne teladi dolazi nakon stimulacije perifernih krajeva splanhičkih nerava (Bloom i sar., 1988). Smatra se da VIP može imati parakrino dejstvo na ćelije ZG (Bornstein i sar., 1996). U ovom eksperimentu nakon toplotnog stresa debljina nerava bila je smanjena, što se objašnjava njihovom povećanom sekretornom aktivnošću i izbacivanjem stvorenog proizvoda (Tanelian i Markin, 1997). Studije pokazuju da VIP, vezivanjem za svoje G proteinske receptore, VPAC₁-Rs i VPAC₂-

Rs, zajedno sa adenilat ciklazom i fosfolipazom C stimuliše sekreciju aldosterona iz ćelija ZG (Conconi i sar., 2006). Delovanje VIP-a na ćelije ZG potvrđeno je na nivou elektronske mikroskopije, gde se u ćelijama uočavaju euhromatska jedra, male lipidne kapi i brojne mitohondrije, što je dokaz intenzivne sintetske aktivnosti same ćelije (Rebuffat i sar., 1994). Takođe, postoje dokazi da VIP može indirektno uticati na sintezu aldosterona, jer potpomaže oslobađanje kateholamina koji mogu parakrino delovati na ćelije kore nadbubrežne žlezde preko β -adrenoceptorskih mehanizma (Nussdorfer i Malendowicz, 1998; Conconi i sar., 2006). VIP je uključen u održavanje normalnog rasta i sintezu hormona kore nadbubrežnih žlezda. Indirektni dokazi ukazuju da ovaj peptid ima važnu ulogu npr., u odgovoru HPA osovine na stres hladnoćom i inflamatorni stres (Nussdorfer i Malendowicz, 1998).

Studije su pokazale postojanje NPY i VIP imunoreaktivnih vlakana koja polaze od ZG, prolaze kroz koru i dolaze do srži nadbubrežne žlezde (Kuramoto i sar., 1986). VIP ostvaruje važnu ulogu u sintezi kortizola kod zamorčeta, gde je uočeno da se ovaj peptid vezuje za receptor ACTH, što dovodi do povećanja cAMP i aktivacije adenilat ciklaze (Fang i Ho, 1995; Fang i sar., 2001).

Imunohistohemijske analize su detektovale NPY imunoreaktivnih vlakana u subkapsularnom regionu nadbubrežne žlezde. Ova vlakna se nalaze oko kapsularne i subkapsularne mreže krvnih sudova, kao i u ZG gde mogu formirati pleksus (Kondo, 1985; Pelto-Huikko, 1989), dok kroz ZF i ZR prolaze bez grananja (Kuramoto i sar., 1986). Kod pacova se NPY nervi nalaze kolokalizovano sa VIP nervima koji inervišu ZG i krvne sudove kore nadbubrežnih žlezda (Renshaw i Hinson, 2001). Nakon toplotnog stresa ova vlakna su bila tanja, što se može tumačiti izlučivanjem ovih regulatornih peptida (Tanelian i Markin, 1997). Većina *in vivo* i *in vitro* studija pokazuje da NPY može imati indirektan stimulatorni uticaj na sekreciju aldosterona, ili preko oslobađanja kateholamina iz nervnih završetaka ili preko hromafinih ćelija koje se nalaze u ZG (Renshaw i Hinson, 2001). NPY nema značajniji uticaj na oslobađanje kortikosterona iz ćelija ZF (Renshaw i Hinson, 2001), ali ima važnu ulogu i u protoku krvi kroz nadbubrežnu žlezdu (Wahlestedt i sar., 1990).

Istraživanja kolokalizacije tirozin-hidroksilaze, dopamin β hidroksilaze, NPY i VIP nerava u kapsuli i srži nadbubrežnih žlezda su pokazala različite načine kombinovanja

unutar ovih delova nadbubrežnih žlezda, što je navelo na zaključak da se poreklo imunoreaktivnih nerava u kapsuli i srži razlikuje (Oomori i sar., 1994; Murabayashi i sar., 2007).

Imunohistohemijske analize nisu detektovale prisustvo SP imunoreaktivnih nerava u kapsuli i kori nadbubrežnih žlezda. Do sada su SP nervi identifikovani kod čoveka (Linnoila i sar., 1980) i kod pacova (Kondo, 1985; Kuramoto i sar., 1985), ali je kod obe vrste inervacija oskudna i ograničena na srž nadbubrežnih žlezda. Novija istraživanja pokazuju postojanje SP nerava u kapsuli i kori, koji se nalaze oko krvnih sudova i prolaze do srži nadbubrežne žlezde (Murabayashi i sar., 2007). S obzirom da SP nervi prolaze kroz kapsulu i koru, kao i na odsustvo SP imunoreaktivnih ganglijskih ćelija u srži nadbubrežne žlezde, može se zaključiti da je poreklo ovih nerava spoljašnje. Koristeći metodu retrogradnog praćenja otkriveno je da nervna vlakna koja inervišu srž nadbubrežne žlezde potiču od senzornih neurona dorzalne i nodozne ganglije (Mohamed i sar., 1988; Heym i sar., 1994; Dun i sar., 1996). Treba napomenuti da SP imunoreaktivna vlakna pokazuju imunoreaktivnost i za CGRP, NOS, NPY i VIP u kapsuli, dok u srži nadbubrežne žlezde ova vlakna pokazuju imunoreaktivnost za CGRP, NOS, ChAT i PACAP, što navodi na zaključak da se poreklo nerava u kori i srži nadbubrežne žlezde razlikuje (Murabayashi i sar., 2007). Studije *in vivo* su pokazale da supstanca P dovodi do povećanja sekrecije aldosterona kod pacova (Nussdorfer i sar., 1988), dok se pri perfuziji nadbubrežne žlezde povećava sinteza aldosterona i kortikosterona (Hinson i sar., 1994).

Analiza uticaja toplotnog stresa na proliferativne i apoptotske procese u kori nadbubrežnih žlezda

Iako pojedine studije pokazuju da je zona glomeruloza izvor ćelija za sve zone nadbubrežnih žlezda, kao i da se smrt ćelija odvija u zoni retikularis (Wright i Voncina, 1977; Stachowiak i sar., 1990; Miyamoto i sar., 2000), naše imunocitohemijsko obeležavanje ćelija u proliferaciji ne ide u prilog ovim podacima. U kontrolnih pacova, najveći broj ćelija obeležen sa Ki-67 antigenom koji detektuje proliferaciju, je uočen unutar zone retikularis. Ovakav rezultat ide u prilog teoriji zonacije, po kojoj se svaka zona kore

diferencira nezavisno (Deane i Greep, 1946), što znači da se ćelije stalno obnavljaju jer nove nastaju od progenitorskih ćelija i započinju diferencijaciju i na kraju umiru. U intaktnoj nadbubrežnoj žlezdi, zonska proliferacija može biti homeostatski odgovor na zahtev za sintezu specifičnog produkta te zone (Ennen i sar., 2005). Tako se proliferacija u ZG povećava sa povećanjem lučenja aldosterona usled manjka natrijuma u ishrani (McEwan i sar., 1999), dok se proliferacija u ZF kao i lučenje kortikosterona dešava usled stimulacije ACTH (Miyamoto i sar., 1999). Ispitivanja sa proliferišućim ćelijskim nuklearnim antigenom (PCNA), proteinom od 36 kDa, koji se eksprimira u S fazi ćelijskog ciklusa, su pokazala da je bojenje ćelija najjače u ZR, što navodi na zaključak da su stem ćelije prisutne u ovoj zoni (Wolkersdorfer i sar., 1996). Novija istraživanja pokazuju da proliferacija ćelija ima cirkadijalni ritam (Mitani i sar., 2003), jer je ustanovljeno da kada koncentracija ACTH dostiže svoj maksimum dešava se maksimum proliferacije (Miyamoto i sar., 1999). Ukoliko se dostizanje maksimuma nivoa ACTH vremenski pomeri, dodavanjem egzogenog ACTH, ritam replikacije ćelija se pomera na isti način (Miyamoto i sar., 1999).

Nakon toplotnog stresa u ćelijama kore nadbubrežnih žlezda nisu uočene mitoze. Uzrok ovoga je činjenica da hipertermija dovodi do kidanja mitotičkog vretena, ponovne pojave Goldžijevog aparata i dezorganizacije centrozoma (Debec i Marcaillou, 1997). Najosetljivije organele na toplotni stres su centrozomi i mikrotubule. Primećeno je da samo nakon 20 minuta izlaganja toplotnom stresu dolazi do dezorganizacije centriola, dok pojedine mikrotubule unutar vretena nestaju. Duže izlaganje toploti (50 i 120 minuta) dovodi do potpunog nestanka centrozoma, dok je mikrotubule još moguće detektovati, ali u manjem broju (Debec i Marcaillou, 1997). Pri aplikaciji ACTH uočava se smanjenje mitotske aktivnosti ćelija kore nadbubrežne žlezde, i na osnovu toga je zaključeno da što je ćelija aktivnija to je njena mitotska aktivnost manja (Alov, 1963). Regulacija ćelijskog ciklusa u situacijama toplotnog stresa uključuje brojne heat shock proteine. Tako je pokazano da je heat shock protein od 47 kDa kolagen-vezujući glikoprotein javlja pri toplotnom stresu, kao i pri malignim transformacijama (Nagata i sar., 1986; Nagata i Yamada, 1986). Zanimljiva je uloga HSP 70 za koji se pretpostavlja da može u normalnim

uslovima učestvovati u duplikaciji centriola pomažući tako formiranje ovog makromolekulskog kompleksa (Perret i sar., 1995).

Analiza polutankih preseka kao i bojenja parafinskih preseka propidijum-jodidom nakon toplotnog stresa pokazuje povećen broj apoptotskih ćelija u svim zonama. Ovakve ćelije se prepoznaju po promenama u ćelijskoj membrani, kondenzaciji hromatina, kao i fragmentaciji DNK molekula. Ove promene potvrđuju teoriju zonacije, po kojoj svaka zona ima sposobnost regulacije proliferacije i ćelijske smrti (Wolkersdorfer i Bornstein, 1998). U zavisnosti od dužine i "ozbiljnosti" stresa toplotom dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i stagnacije u rastu i proliferaciji (Zeuthen, 1971; Lindquist, 1986; Yost i Lindquist 1986) što može rezultirati ćelijskom smrću. Apoptotske promene na ćelijama pacova se uočavaju nakon izlaganja toplotnom stresu u trajanju od 30 min (Koldysheva i Lushnikova, 2008). Poznato je da visoke temperature uzrokuju apoptozu kod eksperimentalnih životinja (Feng i sar., 2009). Istraživanja na U937 ćelijskoj liniji su pokazala da hipertermija dovodi do apoptoze i da je programirana ćelijska smrt zavisna od trajanja i stepena hipertermije (Kameda i sar., 2001). Studije pokazuju da ACTH i Ang II mogu učestvovati u regulaciji ćelijskog opstanka u nadbubrežnoj žlezdi.

Smatra se da izlaganje ćelija toploti može dovesti do oksidativnog stresa i do stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) (Skibba i sar., 1991; Kim i sar., 2005). Izvor ROS može biti transport elektrona koji se dešava u lancu oksidativne fosforilacije u mitohondrijama (Turrens, 2003; Andreyev i sar., 2005). Reaktivne vrste kiseonika kao što su superoksid anjon (O^{2-}), hidroksi radikal (OH^{\cdot}) i vodonik peroksid (H_2O_2), mogu dovesti do lipidne peroksidacije i inaktivacije enzima, što uslovljava oštećenje ćelije (Ribarov i Benov, 1981). Pojedine studije otkrivaju da glukokortikoidi mogu izazvati oksidativni stres i izlazak citohroma c iz mitohondrija i na taj način uzrokovati apoptozu (Hegardt i sar., 2003; Tonomura i sar., 2003). Istraživanja pokazuju da pri aplikaciji glukokortikoida, uz inhibiciju ACTH, procenat apoptoze se povećava u kori nadbubrežne žlezde (Kiess i Gallaher, 1998). S druge strane, smatra se da glukokortikoidi inhibiraju faktore preživljavanja, kao što je nuklearni faktor kB (Amsterdam i sar., 2002).

Analiza uticaja toplotnog stresa na srž nadbubrežnih žlezda

Nakon toplotnog stresa uočava se smanjenje volumenske gustine ćelija u srži nadbubrežne žlezde, nastalo usled oslobađanja kateholamina iz ćelija srži.

Ultrastrukturna ispitivanja su pokazala različitu reakciju hromafinih ćelija na toplotni stres. Adrenalinske ćelije su posebno odreagovale na izlaganje životinja akutnom toplotnom stresu značajnim smanjenjem površina ćelija i njihovog citoplazmatskog dela, kao i snažnim oslobađanjem celih adrenalinskih granula iz ćelija. Ranija ispitivanja su pokazala da se cele adrenalinske granule mogu naći u intersticijumu neposredno uz adrenalinske ćelije čime je pokazan drugi način (apokrini) oslobađanja granula verovatno uled intenzivne stimulacije (Diaz-Flores i sar., 2008). Nije bilo promene površine profila i volumena noradrenalinskih ćelija posle izlaganja povišenoj temperaturi što bi se moglo tumačiti postojanjem drugih noradrenalinskih izvora u organizmu, te da ove ćelije srži nisu bile stimulisane da oslobađaju hormon u krv. Ipak, nađene su značajne promene na granulama.

Adrenalin u cirkulaciji potiče isključivo iz ćelija srži nadbubrežne žlezde (Axelrod, 1965; Wurtman, 2002; Kvetnansky i sar., 2009) tako da se nivo izlučenog adrenalina u krvi može smatrati isključivo njegovim oslobađanjem iz ovih ćelija, dok koncentracije noradrenalina potiču iz drugih izvora u organizmu. Carmichael i sar., (1990) smatraju da veličina molekula utiče na njihov put u toku otpuštanja iz hromafinih granula.

U hromafinim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda, kako adrenalinskim tako i noradrenalinskim, prisutna su tri tipa granula: pune, promenjene i izmenjeni kontejneri. Pune granule, karakterističnog izgleda za svaki tip ćelija, odlika su ćelija u mirovanju. Broj punih granula i kod adrenalinskih i kod noradrenalinskih ćelija nakon stresa toplotom je statistički značajno smanjen, dok je broj promenjenih granula i praznih kontejnera bio izuzetno povećan. Pokazano je da aplikacija reserpina na nadbubrežnu žlezdu pacova dovodi do smanjenja broja punih granula, praćenog povećanjem broja promenjenih granula i praznih kontejnera (Crivellato i sar., 2006). Model egzocitoze hromafinskih granula zavisi od toga da li se oslobađa celokupni sadržaj granule ili je u pitanju delimično oslobađanje sadržaja, što zavisi od aktivnosti simpatičkog nervnog sistema. Ukoliko je ćelija potpuno

stimulisana, tada dolazi do kompletnog oslobađanja sadržaja granule (Viveros i sar., 1971), što znači da su i kateholamini i neuropeptidi oslobođeni u isto vreme (Winkler i Westhead, 1980). Pri slabijoj stimulaciji kateholamini se vrlo brzo oslobađaju preko uske pore (Klyachko i Jackson, 2002), dok se deo neuropeptida ne oslobađa, već ostaje u vezikuli koja poprima omega (Ω) oblik (Fulop i sar., 2005). Sama vezikula može otpustiti svoj sadržaj putem kompletne ili delimične egzocitoze u zavisnosti od modulacije fuzione pore (Zhou i sar., 1996; Albillos i sar., 1997; Ales i sar., 1999), putem potpune fuzije ili putem zatvaranja nestalnih fuzija (An i Zenisek, 2004). Novija istraživanja Gracia i sar., (2006) pokazuju da kontrola koncentracije Ca^{2+} preko endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija omogućava hromafinim ćelijama regulaciju ranih i kasnih koraka egzocitoze. Iako je ATP potreban za prvi korak egzocitoze, Ca^{2+} aktivira kasniju ATP-zavisnu fuzionu reakciju (Bittner i Holz, 1992; Klenchin i Martin, 2000), jer uključuje Ca vezujuće proteine. I zaista u kratkom životu fuzione pore, nekoliko proteina citoplazme i membrane učestvuje u interakciji sa SNARE (soluble N-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein) receptorom (An i Zenisek, 2004). Kao alternativni model oslobađanja kateholamina pominje se "piecemeal degranulation", pri kojoj dolazi do postepenog oslobađanja hormona, što podrazumeva postojanje vezikula koje prenose materijal između membrane i granula (Crivellato i sar., 2006). Od hromafine granule odvaja se vezikula koja nosi mali deo materijala koje će nakon fuzije vezikule i plazma membrane biti oslobođen iz ćelije, što znači da granula ne dolazi u direktan kontakt sa membranom. Nakon toga se endocitotska vezikula odvaja od plazma membrane i fuzioniše sa membranom hromafine granule, što za posledicu ima stvaranje uvećanih praznih granula (Crivellato i sar., 2006).

Vrlo često se o hromafinim granulama govori kao o multifunkcionalnim organelama. Unutar ovih granula nalaze se hromogranini A, B i C, koji čine 80% intravezikularnih proteina, za koje se smatra da mogu imati ulogu sortirajućih proteina pri sekreciji (Crivellato i sar., 2008). Ovi glikoproteini pri visokim koncentracijama Ca pokazuju tendenciju međusobne agregacije, ali i mogućnost agregacije sa kateholaminima, ATP i drugim proteinima što dovodi do stvaranja karakterističnog jezgra hromafine granule. Unutar granula se još nalaze proteaze, inhibitori proteaza, opioidni proteini kao i monoamini. Varijacije u sadržaju hromafinih granula navode na zaključak postojanja

različite regulacije njihovih biosintetskih karakteristika i odgovora na stimulus. Da bi slika o hromafinim granulama bila još komplikovanija postoje saznanja o sezonskim varijacijama u oslobađanju kateholamina, Ca i enzima (Bolstad i sar., 1980). Novija otkrića ukazuju na bimodalnu distribuciju veličine i sugerišu postojanje dvostruke populacije hromafinih granula kod miša (Grabner i sar., 2005), što znači da ukoliko je ćelija slabije stimulirana oslobađaće se manje granule, dok pri jačoj stimulaciji dolazi do otpuštanja i manjih i većih granula. Novostvorena granula se brzo transportuje do membrane, gde podleže egzocitozi, dok granule koje za manje od 16 sati nisu ispraznile svoj sadržaj, odvajaju se od membrane i završavaju u delu "rezervnih" granula (Duncan i sar., 2003).

Pri delovanju fizioloških stimulusa do oslobađanja kateholamina dolazi pod uticajem acetilholina iz sinaptičkih završetaka koji dovodi do povećanja ekscitabilnosti membrane i koncentracije Ca^{2+} (Kidokoro i Ritchie, 1980; Wakade, 1981). Istraživanja pokazuju da hromafine ćelije, organizovane u grupe, mogu delovati kao nezavisne jedinice pri oslobađanju kateholamina nakon aktivacije splanhičkih nerava (Iijima i sar., 1992; Colomer i sar., 2009). Ovakva nezavisnost objašnjava se postojanjem pukotinastih (gap) veza između ćelija koje omogućavaju da se stimulacija egzocitoze prenese i na susednu ćeliju (Martin i sar., 2001; Colomer i sar., 2009). Colomer i sar. (2008) su pokazali da stres hladnoćom povećava intercelularnu komunikaciju usled povećane potrebe za hormonima.

Nakon toplotnog stresa zapaža se statistički značajno uvećanje volumenske gustine intersticijuma ovog dela nadbubrežne žlezde, što je zajedno sa proliferacijom vlakana vezivnog tkiva u korelaciji sa prethodno objavljenim ispitivanjima (Koko i sar., 2004).

Pri toplotnom stresu se uočava tendencija smanjenja volumenske gustine nervnih komponenata srži nadbubrežne žlezde, što se objašnjava njihovom povećanom aktivnošću u oslobađanju svog sadržaja. Nervne komponente u srži nadbubrežne žlezde se sastoje od različitih nervnih ćelija, ganglija i nervnih vlakana (Tomlinson i Coupland, 1990; Kobayashi i Coupland, 1993; Souvatzoglou, 2005). Srž nadbubrežne žlezde je inervisana simpatičkim vlaknima splanhičkih nerava (Aunis, 1998). Ova vlakna ulaze u srž i inervišu hromafine ćelije (Coupland, 1965; Carmichael, 1986; Tomlinson i Coupland, 1990; Souvatzoglou 2005). Pri presinaptičkoj stimulaciji za vreme stresa, ćelije srži oslobađaju svoj sadržaj u krvotok što dovodi do porasta koncentracije kateholamina u plazmi. Kod

mladih Sprague-Dawley pacova povišenje telesne temperature, nastalo usled toplotnog stresa, povećava aktivnost eferentnih simpatičkih nerava (Gisolfi i sar., 1991; Kenney i sar., 1995; Kenney i sar., 1998) i menja način simpatičkog pražnjenja (Kenney i sar., 1998; Kenney i sar., 2000). Kada su pacovi Fischer 344 izloženi toplotnom stresu, pražnjenje simpatičkih nerava nadbubrežne žlezde bilo je znatno veće kod mladih u odnosu na stare pacove (Kenney i Fels, 2002). Povećana aktivnost simpatičkih nerava se uočava nakon izlaganja pacova toplotnom stresu u trajanju od 3 sata (Gandhi i sar., 2011) uslovljavajući porast koncentracije noradrenalina u plazmi kod eksperimentalnih životinja.

Analiza uticaja toplotnog stresa na peptidergičku inervaciju srži nadbubrežne žlezde

Imunohistohemijske studije su pokazale VIP imunoreaktivnost u hromafinim ćelijama i ganglijama srži nadbubrežne žlezde, što je u skladu sa ranijim literaturnim podacima (Kondo i sar., 1986). Hromafine VIP imunoreaktivne ćelije su poligonalnog oblika, pojedinačne ili organizovane u malim grupama od nekoliko ćelija. Velike ganglijske VIP imunoreaktivne ćelije imaju okruglo euhromatsko jedro i postojanje VIP imunoreaktivnosti u ganglijama srži nadbubrežne žlezde je dokaz unutrašnje inervacije ove žlezde. Slabija imunoreakcija nakon toplotnog stresa može se objasniti zajedničkim oslobađanjem VIP-a sa adrenalinom čija je koncentracija nakon stresa povišena (Histogram 3). Rezultati pokazuju da se VIP oslobađa zajedno sa kateholaminima iz nadbubrežne žlezde psa pri stimulaciji splanhičkih nerava *in vivo* (Gaspo i sar., 1995). Kod budne teladi VIP se oslobađa iz žlezde kao rezultat stimulacije perifernih krajeva splanhičnih nerava (Bloom i sar., 1988).

NPY imunoreaktivnost je detektovana u ćelijama i ganglijama srži nadbubrežne žlezde. Postojanje NPY imunoreaktivnosti u ganglijama srži nadbubrežne žlezde je takođe dokaz o postojanju unutrašnje inervacije ove žlezde. Ranije se smatralo da se ovaj peptid nalazi u adrenalinskim ćelijama (Lundberg i sar., 1986), ali je kasnije pokazano da se nalazi i u adrenalinskim i u noradrenalinskim granulama (Ruohonen i sar., 2009). Dok se ovaj peptid u kori nadbubrežne žlezde nalazi kolokalizovan sa VIP-om, u srži ne postoji kolokalizacija ova dva peptida (Maubert i sar., 1990). Slabija imunoreakcija nakon

toplotnog stresa može se objasniti oslobađanjem NPY sa adrenalinom i noradrenalinom iz ćelija, jer su koncentracije ovih kateholamina povećane nakon stresa (Grafik 3). Istraživanja pokazuju da se NPY oslobađa sa kateholaminima posle delovanja različitih stresora, uključujući splanhičnu inervaciju, kao i aktivaciju holinergičkih receptora (Spinazzi i sar., 2005). NPY se oslobađa sa krajeva sinaptičkih nerava i iz srži nadbubrežne žlezde pri akutnom ili hroničnom stresu (Zukowska-Grojec, 1995).

Imunohistohemijske analize su pokazale postojanje hromafinih SP imunoreaktivnih ćelija kod različitih vrsta sisara (Kuramoto i sar., 1985; Heym i sar., 1995). Supstanca P može biti sintetisana i u adrenalinskim i noradrenalinskim ćelijama što je pokazalo imunohistohemijsko bojenje o kolokalizaciji sa feniletanolamin N-metiltransferaza (PNMT) reaktivnim ili PNMT nereaktivnim ćelijama (Murabayashi i sar., 2007). S obzirom da je imunoreakcija hromafinih ćelija nakon stresa bila slabija, može se zaključiti da je sa kateholaminima došlo do oslobađanja i ovog peptida. Prilikom stresa neuropeptidi se iz granula ćelija srži nadbubrežnih žlezda oslobađaju putem egzocitoze (Kuramoto i sar., 1985; Murabayashi i sar., 2007).

Analiza uticaja toplotnog stresa na koncentracije hormona nadbubrežne žlezde

Koncentracija kortikosterona u serumu nakon toplotnog stresa bila je povećana oko 35 puta što je u skladu sa prethodnim studijama izlaganja pacova toplotnom stresu (Koko i sar., 2004; Jasnić i sar., 2010). Pri delovanju većeg broja pojedinačnih stresora (izgladnjivanje, socijalni stres, hladnoća i toplota) koncentracija kortikosterona je bila statistički značajno povećana pri izlaganju toploti i hladnoći pokazujući specifičnost stresora (Đorđević i sar., 2003). Pri upoređivanju delovanja fizičkih i fizioloških stresora na koncentraciju kortikosterona, ustanovljeno je da do povećanja koncentracije ovog hormona dolazi u oba slučaja, ali je odgovor na fizički stresor izraženiji (Briski, 1996). Povećanje koncentracija kortikosterona zajedno sa ACTH predstavlja meru intenziteta odgovora na stres, naročito u njegovoj akutnoj fazi (Aguilera i sar., 1996; Pignatelli i sar., 1996), kao što je i u našem eksperimentu potvrđeno. Sličan rezultat je nađen pri izlaganju toplotnom stresu drugih životinja (ćurka) (El-Halawani i sar., 1973).

Koncentracija aldosterona u serumu nakon toplotnog stresa bila je povećana oko 270%. Ranija istraživanja su pokazala da je u uslovima stresa lučenje ACTH povećano (Aguilera i sar., 1996; Jasnić i sar., 2010), kao i da visoke koncentracije ACTH stimulišu lučenje aldosterona. Do povećanog lučenja aldosterona dolazi pri akutnom i hroničnom gubljenju tečnosti i natrijuma, kao i pri oštećenjima tkiva nastalim usled nagomilavanja kalijuma (Spat i Hunyady, 2004). Prilikom toplotnog stresa životinje su u stanju hipertermije (povišene telesne temperature), koja je praćena povećenom salivacijom, gubitkom vode i soli (Gandhi i sar., 2011). Da bi se uspostavila osmotska homeostaza neophodano je lučenje aldosterona. S obzirom da ovaj hormon reguliše homeostazu natrijuma i kalijuma značajno povećanje njegove koncentracije ukazuje na dehidraciju (nastalu usled toplotnog tretmana). Dehidracija uslovljava povećanu sintezu aldosterona, koja je neophodna radi uspostavljanja osmotske homeostaze.

Nakon toplotnog stresa koncentracija adrenalina je bila povećana oko 70%. Postoje literaturni podaci da povišenje spoljašnje temperature dovodi po povećanja koncentracije adrenalina u plazmi pacova (Gisolfi i sar., 1991), kao i da pasivna hipertermija, nastala nakon boravka u sauni ili vrućoj vodi izaziva povišenje koncentracije cirkulišućeg adrenalina (Bargiel i sar., 1981; Moller i sar., 1989; Powers i sar., 1982; Vähä-Eskeli i sar., 1992). Hipertermija kod svinja (Barrand i sar., 1981) i volova (Robertshaw i Whittow, 1966) izaziva povećanje nivoa adrenalina. Nakon adrenalektomije koncentracija adrenalina se smanjuje za 97% (Bernet i sar., 1998), na osnovu čega je utvrđeno da je srž gotovo isključivi izvor adrenalina (Axelrod, 1965; Wurtman, 2002). Ispitivanja dejstva različitih stresora (imobilizacijom, bolom, hemoragijom, hipoglikemijom i hladnoćom) pokazala su najmanje promene u koncentraciji adrenalina u plazmi posle izlaganja hladnoći, dok je najviši nivo koncentracije ovog hormona otkriven u hipoglikemiji (Pacak i Palkovits, 2001).

Koncentracija noradrenalina u plazmi nakon toplotnog stresa bila je povećana 150%. U ranijim studijama nađeno je da se prilikom izlaganja višim temperaturama koncentracija noradrenalina povećava i do 602% (Kregel, 1993). Pokazano je da povišenje spoljašnje temperature dovodi po povećanja nivoa noradrenalina kod pacova (Gisolfi i sar., 1991), golubova (Jeronen i sar., 1976), svinja (Barrand i sar., 1981) i volova (Robertshaw i

Whittow, 1966), muškaraca (Jezova i sar., 1994) i žena (Vähä-Eskeli i sar., 1992). Pacak i Palkovits (2001) su pokazali da pri delovanju većeg broja pojedinačnih stresora, imobilizacije, bola, hemoragije, hladnoće i hipoglikemije najveći uticaj na promenu koncentracije noradrenalina ima stres hladnoćom. Ova činjenica je potvrđena i drugim istraživanjima (Vollmer i sar., 1992; Dronjak i sar., 2004). Noradrenalin se oslobađa iz noradrenalinskih ćelija srži, ali se više oslobađa iz simpatičkih nerava (Folkow i von Euler, 1954; Yokotani i sar., 2005; Kvetnansky i sar., 2009). Visok nivo noradrenalina ukazuje na veliku aktivnost simpatičkog nervnog sistema (Fukuhara i sar., 1996; Kvetnansky i sar., 1998). Nakon toplotnog stresa uočava se smanjenje koncentracije fenilalanina u urinu, što ide u prilog činjenici da organizam u uslovima stresa povećava konverziju ove aminokiseline u kateholamine (Blomstrad i Newsholme, 1992).

Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem uticaja akutnog toplotnog stresa na histološke i ultrastrukturalne karakteristike hipofize i nadbubrežnih žlezda pacova mužjaka Wistar soja, uz primenu odgovarajućih mikroskopskih i biohemijskih tehnika i metoda, mogu se izvesti sledeći zaključci:

U hipofizi, primenjeni tretman doveo je do povećanog izlučivanja ACTH iz kortikotropnih ćelija. Ovo se na nivou svetlosne mikroskopije manifestovalo smanjenjem broja ćelija imunopozitivnih na ACTH, a na nivou elektronske mikroskopije smanjenjem broja granula u ACTH ćelijama. U skladu sa tim, biohemijski podaci pokazali su da je koncentracija ACTH u cirkulaciji povećana. U krvnim sudovima hipofize prisutna je agregacija krvnih pločica.

U nadbubrežnim žlezdama promene su bile izraženije kako na nivou svetlosne tako i na nivou elektronske mikroskopije.

U ZG kore nadbubrežnih žlezda došlo je do povećane sinteze i sekrecije aldosterona na šta su ukazali značajno smanjenje broja lipidnih kapljica, uvećanje broja mitohondrija i visok nivo aldosterona u cirkulaciji. Porast koncentracije aldosterona u cirkulaciji predstavlja odgovor organizma na dehidrataciju izazvanu izlaganjem životinja visokoj temperaturi spoljne sredine.

U ZF zapaženo je značajno povećanje površine profila i volumena ćelija, posebno citoplazmatične komponente, zajedno sa smanjenjem broja lipidnih kapi, porastom broja mitohondrija, uz značajno povećanje nivoa kortikosterona u krvi. Uvećanje ćelija uključenih u sintezu i sekreciju hormona stresa, kortikosterona, promena relativne zastupljenosti subćelijskih komponentata u pravcu koji ukazuje na veću angažovanost u sintezi hormona, kao i biohemijski podaci o povišenju nivoa kortikosterona u cirkulaciji ukazuju na aktivno učešće ćelija ZF u odgovoru na stres izazvan akutnim izlaganjem pacova povišenoj temperaturi spoljne sredine.

U ZR je nađeno izuzetno veliko nagomilavanje lipidnih kapljica što bi ukazivalo na zastoj u sintezi i sekreciji hormona ove zone.

U svim zonama kore nadbubrežnih žlezda, posle akutnog izlaganja toplotnom stresu, nađeni su uvećanje broja apoptotskih ćelija, proliferacija vlakana vezivnog tkiva, smanjenje NPY, VIP i SP imunoreaktivnosti nervnih vlakana i primetna agregacija krvnih pločica u kapilarima. Sve ovo upućuje na zaključak da je akutni toplotni stres, pored toga što je podstakao sintetsku i sekretnu aktivnost parenhimskih ćelija ZG i ZF, imao opšte nepovoljno dejstvo na koru nadbubrežnih žlezda. Agregacija krvnih pločica verovatno je posledica dehidracije, dok pojava apoptoze i proliferacija vezivnog tkiva mogu biti prethodnice fibrozi parenhima.

U **srži** nadbubrežnih žlezda najveće promene nađene su na adrenalinskim ćelijama čija je površina profila bila značajno smanjena, uz smanjenje citoplazmatičnog i jedarnog dela ćelije. Značajno smanjenje punih granula, uz istovremeno značajno uvećanje druge dve kategorije mobilisanih granula i prisustvo celih adrenalinskih granula u kapilarima ukazuju na snažno izbacivanje adrenalina, što je potvrđeno njegovim visokim nivoom u cirkulaciji. U noradrenalinskim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda došlo je do preraspodele u zastupljenosti različitih tipova granula, smanjen je broj punih granula, a povećan broj druga dva tipa granula. Koncentracija noradrenalina u sistemske cirkulaciji značajno je uvećana. S obzirom na to da su adrenalin i noradrenalin direktno uključeni u reakciju "bori se ili beži", navedeni podaci upotpunjuju sliku o stresogenom efektu primenjenog eksperimentalnog tretmana.

U različitim ganglijskim, nervnim i kateholaminskim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda, ali i u regionu kore, nađena je smanjena NPY, VIP i SP imunoreaktivnost. Iako u stresu nivoi nekih regulatornih peptida (NPY i VIP) rastu, izgleda da kratkotrajno izlaganje povišenoj ambijentalnoj temperaturi specifično deluje i dovodi do pražnjenja njihovih depoa, a istovremeno se sintetska mašinerija još nije prilagodila za povećanu sintezu. S obzirom na to da ovi regulatorni peptidi prevashodno deluju kao parakrini faktori značajni za komunikaciju ćelija pojedinih zona nadbubrežnih žlezda, može se zaključiti da je u uslovima eksperimenta došlo do povećane potrebe za usklađenim odgovorom parenhimskih ćelija različitih zona, pod neuralnom kontrolom.

Na osnovu svega navedenog, jasno je da je akutno izlaganje pacova povišenoj temperaturi spoljašnje sredine, u trajanju od 60 minuta bilo dovoljno da se pokrenu

mehanizmi uključeni u odgovor na stres, i to na biohemijskom i ćelijskom nivou. Pored povećanja nivoa hormona u cirkulaciji koje može da se detektuje praktično neposredno po otpočinjanju delovanja stresogenog stimulusa, uočljivo je i prilagođavanje fine strukture ćelija koje zahteva više vremena i počiva na složenijim mehanizmima. Pored toga, na osnovu dobijenih rezultata izgleda da su nadbubrežne žlezde i posle ovako kratkotrajnog tretmana usmerene ka kompleksnijim histomorfološkim alteracijama. U okviru toga ne smeju se zanemariti moguće ozbiljne patološke posledice kao što je embolija krvnih sudova nastala usled povećane agregacije krvnih pločica.

Literatura

- Aguilara, G. (1994). Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Frontiers in Neuroendocrinology* **15**: 321-50.
- Aguilara, G., Rabadan-Diehl, C., Luo, X. Kiss, A. (1996). Regulation of pituitary ACTH secretion during stress: role of corticotropin releasing hormone and vasopressin. In *Stress. Molecular Genetic and Neurobiological Advances* (ed. R. McCarty, G. Aguilara, E. Sabban and R. Kvetnansky), Gordon and Breach Science Publishers, S.A., New York. pp 385-399.
- Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G., Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* **389**: 509-512.
- Ales, E., Tabares, L., Poyato, J.M., Valero, V., Lindau, M., Alvarez de Toledo, G. (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat. Cell Biol.* **1**: 40-44.
- Alexander, S. L., Roud, H. K., Irvine, C. H. G. (1997). Effect of insulin-induced hypoglycaemia on secretion patterns and rates of corticotrophin-releasing hormone, arginine vasopressin and adrenocorticotrophin in horses. *J. Endocrinol.* **153**: 401-409.
- Al-Lami, F. (1969). Light and electron microscopy of adrenal medulla of *Macaca mulatta* monkey. *Anat. Rec.* **164**: 317-332.
- Almahbobi, G., Williams, L. J., Hall, P.F. (1992). Attachment of steroidogenic lipid droplets to intermediate filaments in adrenal cells. *J. Cell Sci.* **101**: 383-93.
- Alov, I. A. (1963). Relationship between division and functional activity of the cells of the adrenal cortex. *Bull. Exp. Biol. Med.* **54**: 1023-1026.
- Amsterdam, A., Tajima, K., Sasson, R. (2002). Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem. Pharmacol.* **64**: 843-850.
- An, S., Zenisek, D. (2004). Regulation of exocytosis in neurons and neuroendocrine cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**: 522-530.

- Andjelković Z, Somer Lj, Perović M, Avramović V, Milenkova Lj, Kostovska N, Petrović A. (2001). Endokrini sistem, Histološka građa organa. Štampa: GIP "Bonafides", Niš. 121-133.
- Andreis, P. G., Neri, G., Rebuffat, P., Gottardo, G., Mazzocchi, G., Nussdorfer, G. G. (1990). Stereological and functional investigations on isolated adrenocortical cells. III. Zona glomerulosa cells of chronically ACTH-treated rats. *J. Anat.* **168**: 199-207.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* **70**: 200-214.
- Aunis, D. (1998). Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int. Rev. Cytol.* **181**: 213-320.
- Axelrod, L. (1962). Purification and properties of phenylethanolamine- N-methyl transferase. *J. Biol. Chem.* **237**: 1657-1660.
- Balla, T., Baukal, A. J., Eng, S., Catt, K. J. (1991). Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. *Mol. Pharmacol.* **40**: 401-406.
- Barett, E. J. (2003). The adrenal gland, In: Boron and Boulpaep Medical Physiology, Elsevier, 1049-1065.
- Bargiel, Z., Nowicka, H., Wójcikowska, J. (1981). Swim-stress induced changes of rat adrenal catecholamine level depending on metabolic state and different ambient temperature. *Folia Histochem. Cytochem.* **19**: 31-7.
- Barrand, M. A., Dauncey, M. J., Ingram, D. J. (1981). Changes in plasma noradrenaline and adrenaline associated with central and peripheral thermal stimuli in the pig. *J. Physiol.* **316**: 139-152.
- Basset, J. R., Pollard, I. (1980). The involvement of coated vesicles in the secretion of corticosterone by the zona fasciculata of the adrenal cortex. *Tissue Cell Res.* **12**:101-115.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**: 335-344.
- Bergland, R. M., Page, R. B. (1978). Can the pituitary secrete directly to the brain? (Affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* **102**: 1325-38.
- Bernard, C. (1878). Nouvelle communication au sujet des notes sur le fermentation alcoolique. *C R Acad. Sci.* **87**: 185-188.

- Bernet, F., Dedieu, J. F., Laborie, C., Montel, V., Dupouy, J. P. (1998). Circulating neuropeptide Y (NPY) and catecholamines in rat under resting and stress conditions. Arguments for extra-adrenal origin of NPY, adrenal and extra-adrenal sources of catecholamines. *Neuroscience Letters* **250**: 45-48.
- Bittner, M. A., Holz, R. W. (1992). Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components. *J. Biol. Chem.* **267**: 16219-16225.
- Black, P. H. (1994). Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroimmunology of stress and its immune consequences. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **38**: 1-6.
- Blake, M. J., Udelsman, R., Feulner, J. G., Norton, D. D., Holbrook, N. J. (1991). Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: an adrenocorticotropic hormone-sensitive, age-dependent response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9873-9877.
- Blomstrand, E., Newsholme, E. (1992). Effect of branched-chain amino acid supplementation on the exercise-induced change in aromatic amino acid concentration in human muscle. *Acta Physiol. Scand.* **146**: 293-298.
- Bloom, S. R., Edwards, A. V., Jones, C. T. (1988). The adrenal contribution to neuroendocrine responses to splanchnic nerve stimulation in conscious calves. *J. Physiol.* **397**: 513-526.
- Bolstad, G., Helle, K. B., Serck-Hanssen, G. (1980). Heterogeneity in the adrenomedullary storage of catecholamines, ATP, calcium and releasable dopamine beta-hydroxylase activity. *J. Auton. Nerv. Syst.* **2**: 337-354.
- Borelli, M. J. (1984). The effects of high intensity ultrasound on the ultrastructure of mammalian central nervous tissue. Thesis, Urbana, IL. University of Illinois.
- Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, M., Usadel, H., Böckmann, M., Scherbaum, W. A. (1991). Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. *Cell Tissue Res.* **265**: 1-9.
- Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, M., Stromeyer, H. G., Adler, G., Scherbaum, W. A., Holst, J. J. (1993). Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) stimulates androstenedione release in isolated perfused pig adrenals. *Life Sciences* **52**: 135-140.

Bornstein, S. R., Haidan, A., Ehrhart-Bornstein, M. (1996). Cellular communication in the neuro-adrenocortical axis: role of vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Endocr. Res.* **22**: 819 -829.

Bornstein, S. R., Chrousos, G. P. (1999). Adrenocorticotropin(ACTH) and non-ACTH mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**: 1729-1736.

Boshier, D. P., Rebuffat, P., Nussdorfer, G. G. (1990). Cellular responses of the rat adrenal zona fasciculata to acute ACTH stimulation: a morphometric study. *Endocr. Res.* **16**: 377-389.

Bouchama, A., Bridey, F., Hammami, M. M., Lacombe, C., al-Shail, E., al-Ohali, Y., Combe, F., al-Sedairy, S., de Prost, D. (1996). Activation of coagulation and fibrinolysis in heatstroke. *Thromb. Haemost.* **76**: 909-15.

Boulant, J. A., Hardy, J. D. (1974). The effect of spinal and skin temperatures on the firing rate and thermosensitivity of preoptic neurones. *J. Physiol.* **240**: 639-660.

Boulant, J. A. (2000). Role of the Preoptic-Anterior Hypothalamus in Thermoregulation and Fever. *Clinical Infectious Diseases* **31**: 157-61.

Brandenburger, Y., Kennedy, E.D., Python, C. P., Rossier, M. F., Vallotton, M. B., Wollheim, C. B., Capponi, A. M. (1996). Possible role for mitochondrial calcium in angiotensin II- and potassium-stimulated steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **137**: 5544-5551.

Brenner, R. M. (1966). Fine structure of adrenocortical cells in adult male rhesus monkeys. *Am. J. Anat.* **119**: 429-453.

Breslow, M. J. (1992). Regulation of adrenal medullary and cortical blood flow. *Am. J. Physiol.* **262**: H1317- H1330.

Briski, K. P. (1996). Stimulatory vs. inhibitory effects of acute stress on plasma LH: Differential effects of pretreatment with dexamethasone or the steroid receptor antagonist, RU 486. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **55**: 19-26.

- Brown, D. (2001). Lipid droplets: Proteins floating on a pool of fat. *Curr. Biol.* **11**: R446-R449.
- Brown, M. S., Kovanen, P. T., Goldstein, J. L. (1979). Receptor-mediated uptake of lipoprotein cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog. Horm. Res.* **35**: 215-249.
- Burel, V., Mezger, V., Pinto, M., Rallu, M., Trigon, S., Morange, M. (1992). Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia* **48**: 629-634.
- Burnay, M. M., Python, C. P., Vallotton, M. B., Capponi, A. M., Rossier, M. F. (1994). Role of the capacitative calcium influx in the activation of steroidogenesis by angiotensin-II in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **135**: 751-758.
- Cameron, L. A., Hinson, J. P. (1993). The role of nitric oxide derived from L-arginine in the control of steroidogenesis, and perfusion medium flow rate in the isolated perfused rat adrenal gland. *J. Endocrinol.* **139**: 415-423.
- Cannon, W. B. (1932). *The wisdom of the body*. W. W. Norton & Company, New York. 24-25.
- Carmichael, S. W. (1986). Morphology and innervation of the adrenal medulla, in: *Stimulus-Secretion Coupling, 1* (Eds. K. Rosenheck and P. Lelkes), CRC Press, Boca Raton. 40-49.
- Carmichael, S. W., Stoddard, S. L., O'Connor, D. T., Yaksh, T. L., Tyce, G. M. (1990). The secretion of catecholamines, chromogranin A and neuropeptide Y from adrenal medulla of the cat via the adrenolumbar vein and thoracic duct: different anatomic routes based on size. *Neuroscience* **34**: 433-440.
- Caselitz, J, Saeger, W. (1978). Ultrastructure and morphometry of ACTH-producing cell in the rat anterior pituitary gland stimulated by lysin-vasopressin and prostaglandin E1. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.* **378**: 23-33.
- Cavadas, C., Silva, A.P., Mosimann, F., Cotrim, M. D., Ribeiro, C.A., Brunner, H. R., Grouzmann, E. (2001). NPY regulates catecholamine secretion from human adrenal chromaffin cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**: 5956-5963.

- Cervera, J. (1978). Effects of thermic shock on HEP2 cells: an ultrastructural and high resolution autoradiographic study. *J. Ultrastruct. Res.* **63**: 51-63.
- Charmandari, E., Kino, T., Chrousos, G. P. (2004). Glucocorticoids and their actions. *Annals New York Academy of Sciences* **1024**: 1-8.
- Cherradi, N., Rossier, M. F., Vallotton, M. B., Capponi, A. M. (1996). Calcium stimulates intramitochondrial cholesterol transfer in bovine adrenal glomerulosa cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 25971-25975.
- Cherradi, N., Pardo, B., Greenberg, A. S., Kraemer, F. B., Capponi, A. M. (2003). Angiotensin II activates cholesterol ester hydrolase in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **144**: 4905-15.
- Chrousos, G. P., Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. *JAMA* **267**: 1244-1252.
- Clark, B. J., Pezzi, V., Stocco, D. M., Rainey, W. E. (1995). The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K⁺ in H295R adrenocortical cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **115**: 215-219.
- Colomer, C., Lafont, C., Guérineau, N.C. (2008). Stress-induces intercellular communication remodeling in the rat adrenal medulla. *Stress, Neurotransmitters and Hormones* **1148**: 106-111.
- Colomer, C., Desarménien, M. G., Guérineau N. C. (2009). Revisiting the stimulus-secretion coupling in the adrenal medulla: role of gap junction-mediated intercellular communication. *Mol. Neurobiol.* **40**: 87-100.
- Conconi, M. T., Spinazzi, R., Nussdorfer, G. G. (2006). Endogenous Ligands of PACAP/VIP Receptors in the Autocrine–Paracrine Regulation of the Adrenal Gland. *International Review of Cytology* **249**: 1-51.
- Cooke, J. P., Tsao, P. S. (1996). Endothelium-derived relaxing factor: an overview. In: Sowers JR (ed). *Contemporary endocrinology: endocrinology of the vasculature*. Humana Press, Totowa. pp 3-19.
- Coupland, R. E. (1965). The natural history of the chromaffin cell. Longmans. London. pp 47-76.

- Coupland, R. E., Kobayashi, S., Serizawa, Y., Fujita, T. (1979). SCG cell: the third type of adrenal chromaffin cell. Catecholamines, Basic and Clinical Frontiers (ed. E. Usdin, I. J. Kopin & J. Barchas), Pergamon Press., New York. pp 313-315.
- Cozza, E. N., Vila, M. C., Acevedo-Duncan, M., Gomez-Sanchez, C. E., Farese, R. V. (1990). Acth increases *de novo* synthesis of diacylglycerol and translocates protein kinase C in primary cultures of calf adrenal glomerulosa cells. *Journal of Steroid Biochemistry* **35**: 343-351.
- Crivellato, E., Belloni, A., Nico, B., Nussdorfer, G. G., Ribatti, D. (2003). Chromaffin granules in the rat adrenal medulla release their secretory content in a particulate fashion. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **277**: 204-208.
- Crivellato, E., Nico, B., Perissin, L., Ribatti, D. (2003). Ultrastructural morphology of adrenal chromaffin cells indicative of a process of piecemeal degranulation. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **270**: 103-8.
- Crivellato, E., Belloni, A., Nico, B., Nussdorfer, G. G., Ribatti, D. (2006). In vivo administered reserpine increases piecemeal degranulation in rat adrenal chromaffin cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular and Evolutionary Biology* **288**: 286-291.
- Crivellato, E., Nico, B., Ribatti, D. (2008). The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat. Rec.* **291**: 1587-1602.
- Crivello, J. F., Jefcoate, C. R. (1980). Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. Kinetic and effect of inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **255**: 8144-8151.
- Cummings, M. (1995). Increased c-fos expression associated with hyperthermia-induced apoptosis of a Burkitt lymphoma cell line. *Int. J. Radiat. Biol.* **68**: 687-692.
- Dallman, M. F., Akana, S. F., Scribner, K. A., Bradbury, M. J., Walker, C. D., Strack, A. M., Casio, C. S. (1992). Stress, feedback and facilitation in the hypothalamus pituitary adrenal axis. *J. Neuroendocrinology* **4**: 517-26.

- Deane, H. W., Greep, R. O. (1946). A morphological and histochemical study of the rat's adrenal cortex after hypophysectomy, with comments on the liver. *Amer. J. Anat.* **79**: 117-145.
- Debec, A., Marcaillou, C. (1997). Structural alteration of the mitotic apparatus induced by the heat shock response in *Drosophila* cells. *Biol. Cell.* **89**: 19-28.
- Derer, M., Grynszpan-Winograd, O. Portier, M. M. (1989). Immunocytochemical localization of the intermediate filament protein peripherin in adult mouse adrenal chromaffin cells in culture. *Neuroscience* **31**: 471-477.
- Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Arguelles, H., Borges, R. (2008). Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol.* **192**: 145-163.
- Djordjevic, J., Cvijic, G., Davidovic, V. (2003). Different Activation of ACTH and Corticosterone Release in Response to Various Stressors in Rats. *Physiol. Res.* **52**: 67-72.
- Domoto, D. T., Boyd, J. E., Multow, P. J., Kashgarian, M. (1973). The ultrastructure of the adrenal zona glomerulosa of rats on potassium-supplemented or sodium-depleted diets. *Am. J. Pathol.* **72**: 433-446.
- Donald, R. A., Wittert, G. A. (1994). Stress and corticotrophin regulation. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* **1**: 93-99.
- Dougherty, P. (2011). Hypothalamic control of pituitary hormone neuroscience. uth.tmc.edu/s4/iv2.html
- Dronjak, S., Gavrilovic, Lj., Filipovic, D., Radojic, M. B. (2004). Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiology & Behavior.* **81**: 409-415.
- Dun, N. J., Tang, H., Dun, S. L., Huang, R., Dun, E. C., Wakade, A. R. (1996). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-immunoreactive sensory neurons innervate rat adrenal medulla. *Brain Res.* **716**: 11-21.
- Duncan, R. R., Greaves, J., Wiegand, U. K., Matskevich, I., Bodammer, G., Apps, D. K., Shipston, M. J., Chow, R. H. (2003). Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature* **422**: 176-180.

Ehrhart-Bornstein, M., Bornstein, S. R., Güse-Behling, H., Stromeier, H. G., Rasmussen, T. N., Scherbaum, W. A., Adler, G., Holst, J. J. (1994). Sympathoadrenal Regulation of Adrenal Androstenedione Release. *Neuroendocrinology* **59**: 406-412.

El-Halawani, M. E., Waibel, P. E., Appel, J. R., Good, A. L. (1973). Effects of temperature stress on catecholamines and corticosterone of male turkeys. *Am. J. Physiol.* **224**: 384-8.

Engler, D, Pham, T, Fullerton, M. J., Clarke, I. J., Funder, J. W. (1989). Evidence for an ultradian secretion of adrenocorticotropin, β -endorphin and α -melanocyte-stimulating hormone by the ovine anterior and intermediate pituitary. *Neuroendocrinology* **49**: 349-360.

Ennen, W. B., Levay-Young, B. K., Engeland, W. C. (2005). Zone-specific cell proliferation during adrenocortical regeneration after enucleation in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **289**: E883-E891.

Fang, V.S. Ho, L. T. (1995). Inhibition of cortisol production by aldosterone secretion-inhibitory factor and brain natriuretic peptides. *Chin. J. Physiol.* **38**: 247-254.

Fang, V, S., Juan, C. C., Hsu, Y., Won, J. G. S., Ho, L. T. (2001). The Stimulatory Effect of Vasoactive Intestinal Peptides on the Cortisol Production of Guinea Pig Zona Fasciculata Cells: an Extra-ACTH Regulatory Model of the Adrenocortical Function. *Chinese Journal of Physiology* **44**: 73-79.

Feng, J., Bussière, F., Hekimi, S. (2001). Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Cell* **1**: 633-644.

Feng, L., Pang, L., Guo, Y., Ke, N., Li, S., Wei, L., Li, Q., Li, Y. (2009). Hypoxia/reoxygenation up-regulates death receptor expression and enhances apoptosis in human biliary epithelial cells. *Life Sciences* **85**: 401-407.

Fleury, A., Ducharme, L., Hales, D. B., Stocco, D. M., LeHoux, J. G. (1998). Acute in vivo effects of ACTH on the expression of steroidogenic acute regulatory protein. *Endocr. Res.* **24**: 571-574.

Fleury, A., Ducharme, L., LeHoux, J-G. (1998). In vivo effects of adrenocorticotrophin on the expression of the hamster steroidogenic acute regulatory protein. *Journal of Molecular Endocrinology* **21**: 131-139.

- Folkow, B., von Euler, U. S. (1954). Selective activation of noradrenaline and adrenaline producing cells in the cat's adrenal gland by hypothalamic stimulation. *Circ. Res.* **2**: 191-195.
- Fried, V. A., Smith, H. T., Hildebrandt, E., Weiner, K. (1987). Ubiquitin has intrinsic proteolytic activity: implications for cellular regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 3685-3689.
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y. (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem. Cell Biol.* **130**:263-279.
- Fukuhara, K., Kvetnansky, R., Weise, V. K., Ohara, H., Yoneda, R., Goldstein, D. S., Kopin, I. J. (1996). Effects of continuous and intermittent cold (SART) stress on sympathoadrenal system activity in rats. *J. Neuroendocrinol.* **8**: 65-72.
- Fulop, T., Radabaugh, S., Smith, C. (2005). Activitydependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* **25**: 7324-7332.
- Gader, A. M. A., Al-Mashhadani, S. A., Al-Harthy, S. S. (1990). Direct activation of platelets by heat is the possible trigger of the coagulopathy of heat stroke. *Br. J. Haematol.* **74**: 86-92.
- Gaffin, S. L, Hubbard, D. (2001) Medical aspects of harsh environments. Borden Institute, Washington, DC., US Army falls church, Va, US Army Medical Dep Center and School Fort Sam, Houston, Tx. P. 624.
- Gandhi, S., Devi, M. M., Rana, P., Pal, S., Tripathi, R., Khushu, S. (2011). Urinary metabolic profiling in rats due to heat exposure using ¹H high resolution NMR spectroscopy. *Journal of Metabolomics and Systems Biology.* **2**: 1-9.
- Ganong, W. F. (1995). Review of medical physiology. Norwalk,CT, Appleton&Lange. pp 327-351.
- Gaspo, R., Yamaguchi, N., Champlain, J. (1995). Correlation between neural release of VIP and adrenomedullary catecholamine secretion in vivo. *Regu. Physiol.* **268**:1449-1455.
- Gavrilovic, L., Dronjak, S. (2005). Activation of rat pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullary system in response to different stressors. *Neuro. Endocrinol. Lett.* **26**: 515-20.

- Gemmell, M. A., Johnstons, P. D., Oudemans, G. (1977). The lethal effect of some benzimidazoles on *Taenia hydatigena* in dogs. *Research in Veterinary Science* **23**: 115-116.
- Ghadially, F. N. (1997). *Ultrastructural pathology of the cell and matrix*, Edward Arnold, London.
- Giacomelli, F., Wiener, J., Spiro, D. (1965). Cytological alterations related to stimulation of the zona glomerulosa of the adrenal gland. *The Journal of Cell Biology* **26**: 499-521.
- Gisolfi, C. V., Matthes, R. D., Kregel, K. C., Oppliger, R. (1991). Splanchnic sympathetic nerve activity and circulating catecholamines in the hyperthermic rat. *J. Appl. Physiol.* **70**: 1821-6.
- Goldstein D. S. (2001). Adrenaline and Noradrenaline. In: eLS, John Wiley & Sons, Ltd.
- Gordon, C. J. (2009). Autonomic Nervous System: Central Thermoregulatory Control. *Encyclopedia of Neuroscience*. pp 891-898.
- Grabner, C. P., Price, S. D., Lysakowsky, A., Fox, A. P. (2005). Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles. *J. Neurophysiol.* **94**: 2093-2104.
- Halder, G., Callaerts, P., Flister, S., Walldorf, U., Kloter, U., Gehring, W. J. (1998). Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during *Drosophila* compound eye development. *Development* **125**: 2181-2191.
- Hall, P. D. (1997). The roles of calmodulin, actin, and vimentin in steroid synthesis by adrenal cells. *Steroids* **62**:185-189.
- Hammel, H. T., Hardy, J. D., Fusco, M. M. (1960). Thermoregulatory responses to hypothalamic cooling in unanesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* **198**: 481-486.
- Hanaki, M., Tanaka, K., Kashima, Y. (1985). Scanning electron microscopic study on mitochondrial cristae in the rat adrenal cortex. *J. Electron. Microsc.* **34**: 373-380.
- Harikai, N., Tomogane, K., Miyamoto, M., Shimada, K., Onodera, S., Tashiro, S. (2003). Dynamic Responses to Acute Heat Stress between 34 °C and 38.5 °C, and Characteristics of Heat Stress Response in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 701-708.

- Harris, G. (1948). Neural control of the pituitary gland. *Physiological Reviews* **28**: 139-179.
- Harrison, R. G., Hoey, M. J. (1960). *The Adrenal Circulation*. Blackwell, Oxford, U.K.
- Hawthorn, J., Nussey, S. S., Henderson, J. R., Jenkins, J. S. (1987). Immunohistochemical localization of oxytocin and vasopressin in the adrenal glands of rat, cow, hamster and guinea pig. *Cell and Tissue Research* **250**: 1-6.
- Hegardt, C., Andersson, G., Oredsson, S. M. (2003). Spermine prevents cytochrome c release in glucocorticoid-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Cell Bio. Int.* **27**: 115-121.
- Heidenhain, M. (1968). *Manual of Histological Staining Methods*, 3rd. ed., Ed. L Luna: McGraw-Hill Publications, NY. p. 86.
- Henry, F. J., Bassett, J. R. (1985). Corticosterone storage within the adrenal cortex: evidence for a sulphate conjugate. *J. Endocrinol.* **104**: 381-385.
- Heym, C., Colombo-Benckmann, M., Mayer, B. (1994). Immunohistochemical demonstration of the synthesis enzyme for nitric oxide and of comediators in neurons and chromaffin cells of the human adrenal medulla. *Ann. Anat.* **176**:11-16.
- Hinson, J. P., Vinson, G. P., Whitehouse, B. J. (1986). The relationship between perfusion medium flow rate and steroid secretion in the isolated perfused rat adrenal gland in situ. *J. Endocrinol.* **111**: 391-396.
- Hinson, J. P., Cameron, L. A., Purbrick, A., Kapas, S. (1994). The role of neuropeptides in the regulation of adrenal zona glomerulosa function: effects of substance P, neuropeptide Y, neurotensin, Met-enkephalin, Leu-enkephalin and corticotrophin-releasing hormone on aldosterone secretion in the intact perfused rat adrenal. *J. Endocrinol.* **140**: 91-96.
- Hinson, J. P., Ho, M. M., Vinson, G. P., Kapas, S. (1996). Vasoactive intestinal peptide is a local regulator of adrenocortical function. *Endocrine Research* **22**: 831-838.
- Hinson, J. P., Cameron, L. A., Kapas, S. (1996). Regulation of adrenal vascular tone: Role of endothelin-1 and nitric oxide. *Endocr. Res.* **22**: 875-9.

Hinson, J. P., Renshaw, D., Cruchley, A. T., Kapas, S. (1998). Regulation of rat adrenal neuropeptide Y (NPY) content: effects of ACTH, dexamethasone and hypophysectomy. *Regul. Pept.* **25**: 175-80.

Hirano, N., Shiino, M. (1993) Co-existence of gonadotrophins (FSH, LH) and thyrotrophin (TSH) in single anterior pituitary cells of the musk shrew, *Suncus murinus*. *Cell Tissue Res.* **272**: 315-320.

Hiremagalur, B., Kvetnansky, R., Nankova, B., Fleischer, J., Geertman, R., Fukuhara, K., Viskupic, E., Sabban, E. L. (1994). Stress elicits trans-synaptic activation of adrenal neuropeptide Y gene expression. *Mol. Brain Res.* **27**: 138-144.

Hodel, A. (2001). Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J. Neuroendocrinol.* **13**: 217-221.

Hökfelt, T., Lundberg, J. M., Schultzberg, M., Fahrenkrug, J. (1981). Immunohistochemical evidence for a local VIP-ergic neuron system in the adrenal gland of the rat. *Acta Physiologica Scandinavica* **113**: 575-576.

Holmes, M. C., Antoni, F. A., Catt, K. J., Aguilera, G. (1986). Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin. *Nature* **319**: 326-329.

Holzwarth, M. A. (1984). The distribution of vasoactive intestinal peptide in the rat adrenal cortex and medulla. *J. Auton. Nerv. Syst.* **11**: 269-283.

Holzwarth, M. A., Cunningham, L. A., Kleitman, N. (1987). The role of adrenal nerves in the regulation of adrenocortical functions. *Ann. NY Acad. Sci.* **512**: 449-464.

Iijima, T., Matsumoto, G., Kidokoro, Y. (1992). Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye. *Neuroscience* **51**: 211-219.

Isola, R., Solines, P., Loy, F., Mariotti, S., Riva, A. (2010). 3-D structure of mitochondrial cristae in rat adrenal cortex varies after acute stimulation with ACTH and CRH. *Mitochondrion* **10**: 472-478.

Jasnic, N., Korac, A., Velickovic, K., Golic, I., Djordjevic, J., Djurasevic, S., Djordjevic, I., Vujovic, P., Cvijic, G. (2010). The effect of acute heat exposure on rat pituitary

corticotroph activation: the role of vasopressin. *FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA* **48**: 507-512.

Jefcoate, C. (2002). High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. *J. Clin. Invest.* **110**: 881-890.

Jeronen, E., Isometsä, P., Hissa, R., Pyörnilä, A. (1976). Effect of acute temperature stress on the plasma catecholamine, corticosterone and metabolite levels in the pigeon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **55**: 17-22.

Jezova, D., Kvetnansky, R., Vigas, M. (1994). Sex differences in endocrine response to hypothermia in sauna. *Acta Physiol. Scand.* **150**: 293-8.

Junkqueira, L., Carneiro, J. (2005). *Basic Histology: Text & Atlas*. Tenth edition. McGraw-Hill Medical. USA.

Kameda, K., Kondo, T., Tanabe, K., Zhao, Q.L., Seto, H. (2001). The role of intracellular Ca^{2+} in apoptosis induced by hyperthermia and its enhancement by verapamil in U937 cells. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **49**: 1369-1379.

Kapas, S., Martinez, A., Cuttitta, F., Hinson, J. P. (1998). Local production and action of adrenomedullin in the rat adrenal zona glomerulosa. *J. Endocrinol.* **156**: 477-484.

Kenney, M. J., Barney, C. C., Hirai, T., Gisolfi, C.V. (1995). Sympathetic nerve responses to hyperthermia in the anesthetized rat. *J. Appl. Physiol.* **78**: 881-889.

Kenney, M. J., Claassen, D. E., Fels, R. J., Bishop, M. R. (1998). Regulation of the sympathetic nerve discharge bursting pattern during heat stress. *Am. J. Physiol.* **275**: R1992-R2001.

Kenney, M. J., Pickar, J.G., Weiss, M.L., Saindon, C.S., Fels, R. J. (2000). Effects of midbrain and spinal cord transections on sympathetic nerve responses to heating. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **278**: R1329-R1338.

Kenney, M. J., Fels, R. J. (2002). Sympathetic nerve regulation to heating is altered in senescent rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **283**: R513-R520

Kidokoro, Y., Ritchie, A. K. (1980). Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J. Physiol. (Lond)* **307**: 199-216.

- Kiess, W., Gallaher, B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur. J. Endocrinol.* **138**: 482-491.
- Kim, H. J., Kang, B. S., Park, J. W. (2005). Cellular defense against heat shock-induced oxidative damage by mitochondrial NADP (+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *Free Radical. Res.* **39**: 441-448.
- Kim, A. C., Hammer, G. D. (2007). Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. *Mol. Cell. Endocrinol.* **265-266**: 10-16.
- Kim, A. C., Barlaskar, F. M., Heaton, J. H., Else, T., Kelly, V. R., Krill, K. T., Scheys, J. O., Simon, D. P., Trovato, A., Yang, W-H., Hammer, G. D. (2009). In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr. Rev.* **30**: 241-263.
- Kiyohara, T., Miyata, S., Nakamura, T., Shido, O., Nakashima, T., Shibata, M. (1995). Differences in Fos expression in rat brains between cold and warm ambient exposures. *Brain Res. Bull.* **38**: 193-201.
- Klenchin, V. A., Martin, T. J. F. (2000). Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie* **82**: 399-40.
- Klyachko, V. A., Jackson, M. B. (2002). Capacitance steps and fusion pores of small and large-dense-core vesicles in nerve terminals. *Nature* **418**: 89-92.
- Kobayashi, S., Coupland, R. E. (1977). Two populations of microvesicles in the SGC (small granule chromaffin) cells of the mouse adrenal medulla. *Arch. Histol. Jpn.* **40**: 251-259.
- Kobayashi, S., Coupland, R. E. (1993). Morphological aspects of chromaffin tissue: the differential fixation of adrenaline and noradrenaline. *J. Anat.* **183**: 223-235.
- Koko, V., Djordjevic, J., Cvijic, G., Davidovic, V. (2004). Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study. *J. Exsp. Bio.* **207**: 4225-4230.
- Koko, V., Djordjevic, J., Cvijic, G., Davidovic, V. (2006). Effect of acute heat stress on rat pituitary gland. Morphological and stereological study. *J. Thermal. Bio.* **31**: 394-399.
- Koldysheva, E. V., Lushnikova, E. L. (2008). Ultrastructural Reorganization of Rat Adrenal Cortex after Whole Body Hyperthermia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine, MORPHOLOGY AND PATHOMORPHOLOGY* **145**: 650-656.

- Kondo, H. (1985). Immunohistochemical analysis of localization of neuropeptides in adrenal gland . *Archivum Histologicum Japonicum* **48**: 453-481.
- Kondo, H., Kuramoto, H., Fujita, T. (1986). An immune-electron-microscopic study of the localization of VIP-like immunoreactivity in adrenal gland of rat. *Cell Tissue Res.* **245**: 531-538.
- Korać, A. (1999). Morfološke karakteristike interskapularnog mrkog masnog tkiva pacova pod delovanjem insulin. Doktorska disertacija. 48-76.
- Koval, L. M., Yavorskaya, E. N., Lukzanetz, E. A. (2000). Ultrastructural features of medullary chromaffin cell cultures. *Neuroscience.* **96**: 639-649.
- Kowal, J., Horst, I., Pensky, J., Alfonso, M. (1977). A comparison of the effects of ACTH, vasoactive intestinal peptide and cholera toxin on adrenal CAMP and steroid synthesis. *Ann. NY Acad. Sci.* **297**: 314-328.
- Kregel, K. C., Johnson, D. G, Seals, D. R. (1993). Tissue-specific noradrenergic activity during acute heat stress in rats. *J. Appl. Physiol.* **74**: 1988-1993.
- Kroemer, G., Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 886-897.
- Kuramoto, H., Kondo, H., Fujita, T. (1985). Substance P-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and intra-adrenal nerve fibers of rats. *Histochemistry* **82**: 507-512.
- Kuramoto, H., Kondo, H., Fujita, T. (1986). Neuropeptide tyrosine (NPY)-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and intra-adrenal nerve fibers of rats. *Anat. Res.* **214**: 321-328.
- Kvetnansky, R., Pacak, K., Sabban, E. L., Kopin, I. J., Goldstein, D. S. (1998). Stressor specificity of peripheral catecholaminergic activation. *Adv. Pharmacol.* **42**: 556-560.
- Kvetnansky, R., Sabban, E. L., Palkovits, M. (2009). Catecholaminergic Systems in Stress: Structural nad Molecular Genetic Approaches. *Physio. Rev.* **89**: 535-606.
- Lechin, F., Van Der Dijs, B., Mireya, B. (1996). Stress versus depression. *Prog. NeuroPsycho-pharmacol. Biol. Psychiatry.* **20**: 899-944.

- Lehoux, J. G., Fleury, A., Ducharme, L. (1998). The acute and chronic effects of adrenocorticotropin on the levels of messenger ribonucleic acid and protein of steroidogenic enzymes in rat adrenal in vivo. *Endocrinology*. **139**: 3913-22.
- Li, Y.-Y., Inoue, K., Takei, Y. (2003). Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Eels: cDNA Cloning and Effects of ACTH and Seawater Transfer on Its mRNA Expression. *Zoological Science* **20**: 211-219.
- Lindquist, S. (1986). The Heat-Shock Response. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 1151-1191.
- Link, H., Dayanithi, G., Fohr, J. K., Gratz, M. (1992). Oxytocin at Physiological Concentrations Evokes Adrenocorticotropin (ACTH) Release from Corticotrophs by Increasing Intracellular Free Calcium Mobilized Mainly from Intracellular Stores. Oxytocin Displays Synergistic or Additive Effects on ACTH-Releasing Factor or Arginine Vasopressin-Induced ACTH Secretion, Respectively. *Endocrinology* **130**: 2183-2192.
- Linnoila, R. I., Diaugustine, R. P., Hervonen, A., Miller, R. J. (1980). Distribution of [Met-51- and [leu-5]-enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide and substance-P -like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience*. **5**: 2247-2259.
- Lipton, J. M., Dwyer, P., Fossler, D. E. (1974). Effects of brainstem lesions on temperature regulation in hot and cold environments. *Am. J. Physiol.* **226**: 1356-1365.
- Lundberg, J. M., Hökfelt, T., Hemsén, A., Theodorsson-Norheim, E., Pernow, J., Hamberger B., Goldstein, M. (1986). Neuropeptide Y-like immunoreactivity in adrenaline cells of adrenal medulla and in tumors and plasma of pheochromocytoma patients. *Regul. Pept.* **13**: 169-182.
- Luthman, M. (1971). Intramitochondrial bodies in sheep adrenal zona glomerulosa cells. *Z. Zellforsch.* **121**: 244-248.
- Mabuchi, Y., Shirasawa, N., Sakuma, E., Hashimoto, Y., Kuno, M., Coombs, R. J., Herbert, D. C., Tsuyoshi, S. (2004). Intercellular communication within the rat anterior pituitary: relationship between LH-RH neurons and folliculo-stellate cells in the pars tuberalis. *Cell and Tissue Research*. **317**: 79-90.

- Macho, L., Kvetnansky, R., Fickova, M., Jezova, D., Lichardus, B., Carey, R. M. (1992). Plasma levels of catecholamines, aldosterone, arterial natriuretic peptide, and rennin activity during immobilization stress in rats. In *Stress: Neuroendocrine and Molecular Approaches*. R. Kvetnansky, R. McCarty, and J. Axelrod, editors. Gordon and Breach Science Publishers Inc., New York, pp 187-195.
- Malendowicz, L. K., Lesniewska, B., Miskowiak, B. (1990). Neuropeptide Y inhibits corticosterone secretion by isolated rat adrenocortical cells. *Experientia* **46**: 721-722.
- Malendowicz, L. K. (1993). Neuropeptides in adrenal cortex. *Histol. Histopath.* **8**: 173-186.
- Martin, A. O., Mathieu, M-N., Chevillard, C., Guérineau, N. C. (2001). Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: a role in catecholamine release. *J. Neurosci.* **21**: 5397-5405.
- Marusic, E. T., Mulrow, P. J. (1967). Stimulation of aldosterone biosynthesis in adrenal mitochondria by sodium depletion. *J. Clin. Invest.* **46**: 2101-2108.
- Masset, M. P., Johnson, D. G., Kregel, K. C. (1996). Cardiovascular and sympathoadrenal responses to heat stress following water deprivation in rats. *Regu. Physiol.* **270**: R652-R659.
- Matsukuma, H. (1981). An Ultrastructural and Stereological Study on Lipid Droplets of Adrenal Cortex of Rats Fed with High-fat, Low-protein and Cholesterol Supplements. *Acta Med. Nagasaki* **26**: 56-72.
- Maubert, E., Tramu, G., Croix, D., Beauvillain, J. C., Dupouy, J. P. (1990). Co-localization of vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y immunoreactivities in the nerve fibers of the rat adrenal gland. *Neurosci. Lett.* **113**: 121-126.
- Mazzocchi, G., Malendowicz, L. K., Rebuffat, P., Robba, C., Gottardo, G., Nussdorfer, G. G. (1985). Short- and long-term effects of ACTH on the adrenal zona glomerulosa of the rat. *Cell and Tissue Research* **243**: 303-310.

- Mazzocchi, G., Robba, C., Malendowicz, L. K., Nussdorfer, G.G. (1987). Stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *Biomed. Res.* **8**: 19-23.
- Mazzocchi, G., Rebuffat, P., Gottardo, G., Nussdorfer, G. G. (1996). Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide inhibit aldosterone secretion in rats, acting via a common receptor. *Life Sci.* **58**: 839-844.
- Mazzocchi, G., Gottardo, G., Nussdorfer, G. G. (1998a) Paracrine control of steroid hormone secretion by chromaffin cells in the adrenal gland of lower vertebrates. *Histol. Histopathol.* **13**: 209-220.
- McCormick, W., Penman, S. (1969). Regulation of protein synthesis in HeLa cells: translation at elevated temperatures. *J. Mol. Biol.* **39**:315-333.
- McEwan, P. E., Vinson, G. P., Kenyon, C. J. (1999). Control of adrenal cell proliferation by AT1 receptors in response to angiotensin II and low sodium diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **276**: E303-E309.
- Melin, B., Koulmann, N., Jimenez, C., Savourey, G., Launay, J.-C., Cottet-Emard, J. M., Pequignot, J. M., Allevard, A. M., Gharib, C. (2001). Comparison of passive heat or exercise-induced dehydration on renal water and electrolyte excretion: the hormonal involvement. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **85**: 250-258.
- Michel, V., Peinnequin, A., Alonso, A., Buguet, A., Cespuglio, R., Canini, F. (2007). Decreased heat tolerance is associated with hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis impairment. *Neuroscience* **147**: 522-531.
- Mitani, F., Mukai, K., Miyamoto, H., Suematsu, M., Ishimura, Y. (2003). The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochimica et Biophysica Acta* **1619**: 317-324.
- Miyamoto, H., Mitani, F., Mukai, K., Suematsu, M., Ishimura Y. (1999). Studies on cytogenesis in adult rat adrenal cortex: circadian and zonal variations and their modulation by adrenocorticotrophic hormone. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**: 1175-1183.

- Miyamoto, H., Mitani, F., Mukai, K., Suematsu, M., Ishimura, Y. (2000). Daily regeneration of rat adrenocortical cells: circadian and zonal variations in cytogenesis. *Endocrine Res.* **26**: 899-904.
- Mohamed, A. A., Parker, T. L., Coupland, R. E. (1988). The innervations of the adrenal gland II. The source of spinal afferent nerve fibers to the guinea-pig adrenal gland. *J. Anat.* **160**: 51-58.
- Mohn, C. E., Fernandez-Solari, J., De Laurentiis, A., Prestifilippo, J. P., Cal, C., Funk, R., Bornstein, S. R., McCann, S. M., Rettori, V. (2005). The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2. *PNAS* **102**: 6213-6218.
- Moller, N., Beckwith, R., Butler, P. C., Christensen, N. J., Orskov, H., Alberti, K. G. (1989). Metabolic and hormonal responses to exogenous hyperthermia in man, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **30**: 651-660.
- Monteiro, F., Abraham, M. E., Sahakari, S. D., Mascarenhas, J. F. (1989). Effect of immobilization stress on food intake, body weight and weights of various organs in rat. *Indian. J. Physiol. Pharmacol.* **33**: 186-190.
- Muglia, L. J., Jacobson, L., Weninger, S. C., Luedeke, C. E., Bae, D. S., Jeong, K. H., Majzoub, J. A. (1997). Impaired diurnal adrenal rhythmicity restored by constant infusion of corticotropin-releasing hormone in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **99**: 2923-2929.
- Murabayashi, H., Kuramoto, H., Kawano, H., Sasaki, M., Kitamura, N., Miyakawa, K., Tanaka, K., Oomori, Y. (2007). Immunohistochemical features of substance P-immunoreactive chromaffin cells and nerve fibers in the rat adrenal gland. *Arch. Histol. Cytol.* **70**: 183-196.
- Murphy, B. D., Lali, E., Walsh, L. P., Liu, Z., Soh, J., Stocco, D. M., Sassone-Carsi, P. (2001). Heat Shock Interferes with Steroidogenesis by Reducing Transcription of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene. *Molecular Endocrinology* **15**: 1255-1263.
- Murphy, D. J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* **40**: 325-438.

- Nagata, K., Saga, S., Yamada, K. M. (1986). A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J. Cell. Biol.* **103**: 223-229.
- Nagata, K., Yamada, K. M. (1986). Phosphorylation and transformation sensitivity of a major collagen-binding protein of fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **261**: 7531-7536.
- Nakamura, K., Masuda, T. (1981). Scanning electron microscopy of corrosion cast of rat adrenal vasculatures with emphasis on medullary artery under ACTH administration. *Tohoku J. Exp. Med.* **134**: 203-213.
- Noda, T., Kaidzu, S., Kikuchi, M., Yashiro, T. (2001). Topographic affinities of hormone-producing cells in rat anterior pituitary gland. *Acta Histochem. Cytochem.* **34**: 313-319.
- Norris, D. O. (1985). *Vertebrate endocrinology*. Second edition. Lea & Febiger (Philadelphia).
- Nose, H., Morimoto, T., Ogura, K. (1983). Distribution of water losses among fluid compartments of tissues under thermal dehydration in the rat. *Jap. J. Physiol.* **33**: 1019-1029.
- Nowak, M., Markowska, A., Nussdorfer, G. G., Tortorella, C., Malendowicz, L. K. (1994). Evidence that endogenous vasoactive intestinal peptide (VIP) is involved in the regulation of rat pituitary-adrenocortical function: in vivo studies with a VIP antagonist. *Neuropeptides* **27**: 297-303.
- Nussdorfer, G. G., Mazzocchi, G. (1969). Autoradiographic study of the incorporation of tritiated cholesterol into the zona reticularis of the rat adrenal cortex. *Cell and Tissue Res.* **102**: 205-213.
- Nussdorfer, G. G., Mazzocchi, G., Gottardo, G. (1974). Investigations on Turnover of Adrenocortical Mitochondria II Effect of Chronic Treatment with ACTH on the ³H-Thymidine Incorporation into Rat Zona fasciculata Mitochondria. *Cell Tiss Res.* **151**: 281-292.
- Nussdorfer, G. G., Mazzocchi, G. (1983). Long-term effects of ACTH on rat adrenocortical cells: a coupled stereological and enzymological study. *J. Steroid Biochem.* **19**: 1753-1756.

- Nussdorfer, G. G., Malendowicz, L. K., Belloni, A. S., Mazzocchi, G., Rebuffat, P. (1988). Effects of Substance P on the rat adrenal zona glomerulosa in vivo. *Peptides* **9**: 1145-1149.
- Nussdorfer, G. G., Malendowicz, L. K. (1998). Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides (Elmsford)* **19**: 1443-1467.
- Oberley, T. D., Swanlund, J. M., Zhang, H. J., Kregel, K. C. (2008). Aging Results in Increased Autophagy of Mitochondria and Protein Nitration in Rat Hepatocytes Following Heat Stress. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **56**: 615- 627.
- Obut, T. A. (1992). The zona reticularis and the regulation of its activity under stress exposures. *Fiziol. Zh SSSR*. **78**: 108-12.
- Oomori, Y., Okuno, S., Fujisawa, H., Iuchi, H., Ishikawa, K., Satoh, Y., Ono, K. (1994). Ganglion cells immunoreactive for catecholamine-synthesizing enzymes, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in the rat adrenal gland. *Cell Tissue Res*. **275**: 201-13.
- Otteweller, J. E., Meier, A. H. (1982). Adrenal innervation may be an extrapituitary mechanism able to regulate adrenocortical rhythmicity in rats. *Endocrinology* **111**: 1334-1338.
- Ozbek, E. (2000). Ultrastructure of the Corticotrophs from Rats Adrenalectomized Bilaterally. *T. Klin. J. Med. Res*. **18**: 134-139.
- Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I. J., Goldstein, D. S. (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am. J. Physiol*. **275**: 1247-1255.
- Pacak, K., Palkovits, M. (2001). Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related. *Endocrine Reviews* **22**: 502-548.

- Palacios, G., Lafarga, M. (1975). Chromaffin cells in the glomerular zone of adult rat adrenal cortex. *Cell and Tissue Research*. **164**: 275-278.
- Palkovits, M., Messey, E., Skirboll, L. R., Hokfelt, T. (1992). Adrenergic projection from lower brainstem to the hypothalamic paraventricular nuclei, the lateral hypothalamic area and central nucleus of the amygdale. *J. Chem. Neuroanat.* **5**: 407-15.
- Pantić, V. R. (1975). International review of cytology. **40**: 153-195.
- Patronas, P., Horowitz, M., Simon, E., Gerstberger, R. (1998). Differential stimulation of *c-fos* expression in hypothalamic nuclei of rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration. *Brain res.* **798**: 127-139.
- Pedersen, R. C., Brownie, A. C. (1980). Adrenocortical response to corticotropin is potentiated by part of the amino-terminal region of pro-corticotropin/endorphin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**: 2239-2243.
- Pellegrini, A., Soldani, P., Gesi, M., Lenzi, P., Natale G., Paparelli, A. (1997). Effect of varying noise stress duration on rat adrenal gland: an ultrastructural study. *Tissue and Cell* **29**: 597-602.
- Pelto-Huikko, M. (1989). Immunocytochemical localization of neuropeptides in the adrenal medulla. *Journal of Electron Microscopy Technique* **12**: 364-379.
- Percinic-Popovska, F., Ajdzanovic, V., Trifunovic, S., Jordanova, M., Ilieski, V., Pendovski, L., Milosevic, V. (2011). Pituitary–adrenal axis in male rats after exposure to high ambient temperature. *Med. Biochem.* **30**: 287-292.
- Perret, E., Moudjou, M., Geraud, M. L., Derancourt, J., Soyer-Gobillard, M. O., Bornens, M. (1995). Identification of an HSP70- related protein associated with the centrosome from dinoflagellates to human cells. *J. Ce.ZZ Sci.* **108**: 711-725.
- Petty, M. A., Dietrich, R., Lang, R. E. (1984). The cardiovascular effects of neuropeptide Y. *Clin. Exp. Hypertens. Theor. Pract.* **A 6**: 1889-1892.

Pignatelli, D., Pinto, P., Azevedo, M. E., Magalhaes, M. M., Magalhaes, M. C. (1996). Acute stress effects on the adrenal cortex in the rat. A biochemical and immunohistochemical study. *Endocr. Res.* **22**: 445-451.

Pignatelli, D., Pinto, P., Azevedo, M. E., Magalhaes, M. M., Magalhaes, M. C. (1996). Acute stress effects on the adrenal cortex in the rat. A biochemical and immunohistochemical study. *Endocr. Res.* **22**: 445-451.

Pignatelli, D., Ferreira, J., Vendeira, P., Magalhães, M. C., Vinson, G. P. (2002) Proliferation of capsular stem cells induced by ACTH in the rat adrenal cortex. *Endocrine Research* **28**: 685-693.

Pingping, Q. U., Tian, W., Jiang, Z., Gao, S., Li, T., Tian, Z., Wang, M. (2009). Developmental competence and ultrastructural changes of heat-stressed mouse early blastocysts produced in vitro. *Current Zoology (formerly Acta Zoologica Sinica)* **55**: 61-66.

Powers, S. K., Howley, E. T., Cox, R. (1982). A differential catecholamine response during prolonged exercise and passive heating. *Med. Sci. Sports Exerc.* **14**: 435-439.

Prachař, J. (2003). Intimate Contacts of Mitochondria with Nuclear Envelope as a Potential Energy Gateway for Nucleo-Cytoplasmic mRNA Transport *Gen. Physiol. Biophys.* **22**: 525-534.

Prince, F. P. (2002). Lamellar and tubular associations of the mitochondrial cristae: unique forms of the cristae present in steroid-producing cells. *Mitochondrion* **1**: 381-389.

Privalle, C. T., Crivello, J., Jefcoate, C. R. (1983). Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P450_{scc} in rat adrenal gland *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 702-706.

Rebuffat, P., Mazzocchi, G., Gottardo, G., Coi, A., Meneghelli, V., Nussdorfer, G. G. (1987). An ultrastructural morphometric study of the effects of chronic melatonin administration on the zona fasciculata of rat adrenal cortex. *J. Submicrosc. Cytol.* **19**: 415-421.

Rebuffat, P., Nowak, K. W., Tortorella, C., Musajo, F. G., Gottardo, G., Mazzocchi, G., Nussdorfer, G. G. (1994). Evidence that endogenous vasoactive intestinal polypeptide plays

a role in the maintenance of the growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **51**: 81-88.

Renshaw, D., Hinson, J. P. (2001). Neuropeptide Y and the adrenal gland: a review. *Peptides* **22**: 429-438.

Rhodin, J. A. (1971): The ultrastructure of the adrenal cortex of the rat under normal and experimental conditions. *J. Ultrastruct. Res.* **34**: 23-71.

Ribarov, S. R., Benov, L. C. (1981). Relationship between the Hemolytic Action of Heavy-Metals and Lipid-Peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **640**: 721-726.

Robenek, H., Hofnagel, O., Buers, I., Robenek, M. J., Troyer, D., Severs, N. J. (2006). Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J. Cell Sci.* **119**: 4215-4224.

Robertshaw, D., Whittow, G. C. (1966). The effect of hyperthermia and localized heating of the anterior hypothalamus on sympathoadrenal system of the ox (*Bos Taurus*). *J. Physiol.* **187**: 351-360.

Robertson, G. L. (2001). Physiology of oxytocin, vasopressin, and thirst. In: *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, K. L. Becker, ed. Lippincott, Williams and Wilkins, 3rd ed.

Rocco, S., Rebuffat, P., Cimolato, M., Opocher, G., Peters, J., Mazzocchi, G., Ganten, D., Mantero, F., Nussdorfer, G. G. (1994). Zona glomerulosa of the adrenal gland in a transgenic strain of rat: a morphologic and functional study. *Cell Tissue Res.* **278**: 21-8.

Rokutan, K., Hirakawa, T., Teshima, S., Nakano, Y., Miyoshi, M., Kawai, T., Konda, E., Morinaga, H., Nikawa, T., Kishi, K. (1998). Implications of heat shock / stress proteins for medicine and disease *The Journal of Medical Investigation* **44**: 137-148.

Romanovsky, A. A., Ivanov A. I., Shimansky, Y. P. (2002). Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J. Appl. Physiol.* **92**: 2667-2679.

- Rosol, T. J., Yarrington, J. T., Latendresse, J., Capen, C. C. (2001). Adrenal Gland: Structure, Function and Mechanisms of Toxicity. *TOXICOLOGIC PATHOLOGY* **29**: 41-48.
- Ross, M. H., Kaye, G. I., Pawlina, I. W. (2003). *Histology a Text and Atlas with Cell and Molecular Biology*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore. p. 254.
- Rossier, M. F., Burnay, M. M., Vallotton, M. B., Capponi, A. M. (1996). Distinct functions of T-type and L-type calcium channels during activation of bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **137**: 4817-4826.
- Ruohonen, S. T., Savontaus, E., Rinne, P., Rosmaninho-Salgado, J., Cavadas, C., Ruskoaho, H., Koulu, M., Pesonen, U. (2009). Stress-Induced Hypertension and Increased Sympathetic Activity in Mice Overexpressing Neuropeptide Y in Noradrenergic Neurons. *Neuroendocrinology* **89**: 351-360.
- Sakaguchi Y., Stephens L. C., Makino M., Kaneko T., Strebel F. R., Danhauser L. L., Jenkins, G.N, Bull, J. M. C. (1995). Apoptosis in Tumors and Normal Tissues Induced by Whole Body Hyperthermia in Rats. *Cancer Res.* **55**: 5459-5464.
- Sapolsky, S. M., Romero, L. M., Munck, A. V. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating, permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrine Rev.* **21**: 55-89.
- Sasaki, F., Wu, P., Rougeau, D., Unabia, G., Childs, G. V. (1990). Cytochemical studies of responses of corticotropes and thyrotropes to cold and novel environment stress. *Endocrinology* **127**: 285-297.
- Sawchenko, P. E., Arais, C., Bittencourt, J. C. (1990). Inhibin beta, somatostatin and enkefalin immunoreactivities coexist in caudal medullary neurons that project to the paraventricular nuclei of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* **291**: 269-80.
- Scammell, T. E., Price, K. J., Sagar, S. M. (1993). Hyperthermia induce c-fos expression in preoptic area. *Brain Res.* **618**: 303-307.
- Seasholtz, A. (2000). Regulation of adrenocorticotrophic hormone secretion: lessons from mice deficient in corticotropin-releasing hormone. *J. Clin. Invest.* **105**: 1187-1188.

Seedorf, U., Ellinghaus, P., Roch Nofer, J. (2000). Sterol carrier protein-2. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**: 45–54.

Sekiyama, S., Yago, N. (1972). A study on the correlation between function and ultrastructure in the rat adrenal cortex. *Acta Pathol. Jpn.* **22**: 77-98.

Selye, H. (1939). Morphological changes in female mice receiving large doses of testosterone. *J. Endocrinol.* **1**: 208-215.

Sharma, H. S., Westman, J., Nyberg, F. (1998). Pathophysiology of brain edema and cell changes following hyperthermic brain injury In: *Progress in Brain Research* (Sharma, H.S. and Westman, J. eds) Elsevier, Amsterdam. pp 351-412.

Sharma, H. S. (2006). Hyperthermia induced brain oedema: current status and future perspectives *Indian J. Med. Res.* **123**: 629-652.

Simpson, E. R., McCarthy, J. L., Peterson, J. A. (1978). Evidence that the cycloheximide-sensitive site of adrenocorticotrophic hormone action is in the mitochondrion. Changes in pregnenolone formation, cholesterol content, and the electron paramagnetic resonance spectra of cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **253**: 3135-3139.

Sinha, R. K. (2007). Study of Changes in Some Pathophysiological Stress Markers in Different Age Groups of an Animal Model of Acute and Chronic Heat Stress. *Iran. Biomed. J.* **11**: 101-111.

Skibba, J. L., Powers, R. H., Stadnicka, A., Cullinane, D. W., Almagro, U. A., Kalbfleisch, J. H. (1991). Oxidative Stress as a Precursor to the Irreversible Hepatocellular Injury Caused by Hyperthermia. *Int. J. Hyperther.* **7**: 749-761.

Souvatzoglou, A. (2005). The Sympathoadrenal System: Integrative Regulation of the Cortical and the Medullary Adrenal Functions, in: *Adrenal Glands: Diagnostic aspects and surgical therapy* (Eds. D. Linos, Jon A. van Heerden), Springer-Verlag, Berlin. pp 33-39.

Spat, A., Hunyady, L. (2004). Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol. Rev.* **84**: 489-539.

Spinazzi, R., Andreis, P. G., Nussdorfer, G. G. (2005). Neuropeptide-Y and Y-receptors in the autocrine-paracrine regulation of adrenal gland under physiological and pathophysiological conditions (Review). *Int. J. Mol. Med.* **15**: 3-13.

Sriramachari, S. (2004). Heat hyperpyrexia: time of act. *Indian J. Med. Res.* **119**: 7-10.

Stachowiak, A., Nussdorfer, G. G., Malendowicz, L. (1990). Proliferation and distribution of adrenocortical cells in the gland of ACTH or dexamethasone treated rats. *Histol. Histopathol.* **5**: 25-29.

Stevens, A., Lowe, J. (2005). *Human histology.* (3rd ed.). St Louis: Elsevier Mosby.

Stier, C. T., Serova, L. I. J., Singh, G., Sabban, E. L. (2004). Stress triggered rise in plasma aldosterone is lessened by chronic nicotine infusion. *European Journal of Pharmacology* **495**: 167-170.

Sturm, N. (2011). Adrenal Steroid Hormone Biosynthesis. Downloaded from the Internet.

Szalay, K. S., Orso, E., Juranyi, Z., Vinson, G. P., Vizi, E. S. (1998). Local nonsynaptic modulation of aldosterone production by catecholamines and ATP in rat: implications for a direct neuronal fine tuning. *Hormone and Metabolic Research* **30**: 323-8.

Sztalryd, C., Xu, Dorward, G. H., Tansey, J. T., Conteras, J. A., Kimmel, A. R., Londos, C. (2003). Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation *J. Cell Biol.* **161**: 1093-1103.

Tanelian, D. L., Markin, V. S. (1997). Biophysical and functional consequences of receptor-mediated nerve fiber transformation. *Biophys. J.* **72**: 1092-1108.

Telford, W. G., King, L.E., Fraker, P. J. (1992). Comparative evaluation of several DN in the detection of apoptosis- associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* **12**: 137-143.

Theodosis, D. E., Poulain, D. A., Oliet, S. H. R. (2008). Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions. *Physiol. Rev.* **88**: 983-1008.

Thomson, S. W. (1966). Selected histochemical and histopathological methods. Ed. Thomas, C. Springfield. 249-252.

Tokar, S. L., Koval, L. M., Yavorskaya, E. N., Lukyanetz, E. A. (2002). Changes in the Ultrastructure of Adrenocortical Cells Induced by Cholinergic Agonist. *Neurophysiology* **34**: 257-259.

- Tomlinson, A., Coupland, R. E. (1990). The innervation of the adrenal gland. IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats. *J. Anat.* **169**: 209-236.
- Tonomura, N., McLaughlin, K., Grimm, L., Goldsby, R. A., Osborne, B. A. (2003). Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity. *J. Immunol.* **170**: 2469- 2478.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**: 335-344.
- Ulrich-Lai, Y., Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Neuroscience* **10**: 397-409.
- Unsicker, K., Krisch, B., Otten, U., Thoenen, H. (1978a). Nerve growth factor-induced fibre outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 3498-3502.
- Unsicker, K., Habura-Fluh, O., Zwarg, U. (1978b). Different types of small granule-containing cells and neurons in the guinea-pig adrenal medulla. *Cell Tissue Res.* **189**: 109-130.
- Vaha-Eskeli K. K., Erkkola R. U., Scheinin M., Seppanen A. (1992). Effects of short-term thermal stress on plasma catecholamine concentrations and plasma renin activity in pregnant and nonpregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**: 785-789.
- Vaupel, R., Jarry, H., Schlomer, H-T., Wuttke, W. (1988). Differential Response of Substance P-Containing Subtypes of Adrenomedullary Cells to Different Stressors. *Endocrinology* **123**: 2140-2147.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular Research* **79**: 208-217.
- Vinson, G. P., Whitehouse, B. J., Dell, A., Etienne, T., Morris, H. R. (1980). Characterisation of an adrenal zona glomerulosa-stimulating component of posterior pituitary extracts as α -MSH. *Nature* **284**: 464-467.

- Vinson, G. P., Hinson, J. P. (1992). Blood flow and hormone secretion in the adrenal gland. in: The adrenal gland (ed. V.H.T. James), Raven Press, New York. pp. 71-86.
- Vinson, G. P., Whitehouse, B. J., Hinson, J. P. (1992). The adrenal cortex. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
- Vinson, G. P. (2003). Adrenocortical Zonation and ACTH. Microscopy research and technique **61**: 227-239.
- Viveros, O. H., Arqueros, L., Kirshner, N. (1971). Mechanism of secretion from the adrenal medulla. VII. Effect of insulin administration on the buoyant density, dopamine-hydroxylase,
- Vlad, M., Ionescu, N., Ispas, A. T., Giuvarasteanu, I., Ungureanu, E., Stoica, C. (2010). Morphological changes during acute experimental short-term hyperthermia. Rom. J. Morphol. Embryol. **51**: 739-744.
- Vollmer, R. R., Baruchin, A., Kolibal-Pegher, S. S., Corey, S. P., Stricker, E. M., Kaplan, B. B. (1992). Selective activation of norepinephrine- and epinephrine-secreting chromaffin cells in rat adrenal medulla. Am.J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. **263**: R716-R721.
- Wahlestedt, R., Hakanson, R., Vaz, C. A., Zukowska-Grojec, Z. (1990). Norepinephrine and neuropeptide Y: vasoconstrictor cooperation in vivo and in vitro. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **258**: R736-R742.
- Wakade, A. R. (1981). Studies on secretion of catecholamines evoked by acetylcholine or transmural stimulation of the rat adrenal gland. J. Physiol. (Lond) **313**: 463-480.
- Wassermann, D., Wassermann, M. (1974). The fine structure of adrenal zona glomerulosa in the adult rat. Cell and Tissue Research **149**: 235-243.
- Weibel, E. R., Gomez, D. M. (1962). A principle for counting tissue structures on random sections. J. Appl. Physiol. **17**: 343-348.
- Weibel, E. R. (1979). Stereological methods. I. Practical Methods for Biological Morphometry. Academic Press, London- New York- Toronto- Sydney- San Francisco **1**: 1-415.
- Welch ,W. J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/ function of stress proteins, and implications for medicine and disease. Physiol. Rev. **72**: 1063-81.

- Werner, J. (1998). Biophysics of heat exchange between body and environment. In: Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation. (Blatteis, C.M.ed.) World Scientific, Singapore. pp. 25-45.
- Winkler, H., Westhead, E. (1980). The molecular organization of the adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* **5**: 1803-1823.
- Wolkersdörfer, G. W., Ehrhart-Bornstein, M., Brauer, S., Marx, C., Scherbaum, W. A., Bornstein, S. R. (1996). Differential regulation of apoptosis in the normal human adrenal gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 4129-36.
- Wolkersdörfer, G., Bornstein, S. (1998). Tissue remodelling in the adrenal gland. *Biochemical Pharmacol* **56**: 163-171.
- Wright, N., Voncina, D. (1977). Studies on the postnatal growth of the rat adrenal cortex. *J. Anat.* **123**: 147-156.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., Spiegelman, B. M. (1991). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**: 115-124.
- Wurtman, R. J. (2002). Stress and adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Metabolism.* **51**: 11-14.
- Yokotani, K., Okada, S., Nakamura, K., Yakaguchi-Shima, N., Shimizu, T., Arai, J., Wakiguchi, H., Yokotani, K. (2005). Brain prostanoid TP receptor-mediated adrenal noradrenaline secretion and EP₃ receptor-mediated sympathetic noradrenaline release in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **512**: 29-35.
- Yoshimura, F., Ishicawa, H. (1969). Identification of the Thyrotrophs with the Gonadotrophs in the Anterior Pituitaries of Thyroidectomized Rats. *Endocrinol. Jpn.* **16**: 69-85.
- Yoshimura, F., Soji, T., Takasaki, Y., Kiguchi, Y. (1974). Pituitary acidophils with small or medium-sized granules alone in normal and adrenalectomized rats with special reference to possible ACTH secretion. *Endocrinol. Jpn.* **21**: 297-316.

- Yoshimura, F., Nogami, H. (1981). Fine structural criteria for identifying rat corticotrophs. *Cell Tissue Res.* **19**: 221-228.
- Yoshizumi, M., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T., Yazaki, Y. (1989). Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **161**: 859-864.
- Yost, H. J., Lindquist, S. (1986). Rna Splicing Is Interrupted by Heat-Shock and Is Rescued by Heat-Shock Protein-Synthesis. *Cell* **45**: 185-193.
- Zeuthen, E. (1971). Synchrony in Tetrahymena by Heat Shocks Spaced a Normal Cell Generation Apart. *Exp. Cell Res.* **68**: 49-60.
- Zhou, Z., Misler, S., Chow, R.H. (1996). Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophys. J.* **70**: 1543-1552.
- Zukowska-Grojec Z. (1995). Neuropeptide Y. A novel sympathetic stress hormone and more. *Ann. NY Acad. Sci.* **771**: 219-33.
- Zurovski, Y., Eckstein, L., Horowitz, M. (1991). Heat stress and thermal dehydration: lactatemia and plasma volume regulation. *J. Appl. Physiol.* **71**: 2434-2439.

A. Biografija:

Opšti podaci:

Ime, srednje slovo i prezime: Dragana Ž. Petrović-Kosanović

Datum i mesto rođenja: 28.09.1976, Ljubovija, Srbija

Obrazovanje:

2001. Diplomirani biolog

2003/2004. Upisana na magistarske studije, modul: Biologija ćelija i tkiva

2006. Upisana na drugu godinu doktorskih studija, modul: Biologija ćelija i tkiva

Zaposlenje:

Od 2003. godine zaposlena kao profesor biologije u O.š. "Filip Filipović" u Beogradu

Članstvo u naučnim društvima:

Srpsko društvo za mikroskopiju

Strani jezici:

Engleski

B: Bibliografija

Rad objavljen u stranom časopisu:

*Petrovic-Kosanovic, D., Cakic Milosevic, M., Budec, M., Koko, V. (2012). **Effect of acute heat stress on rat adrenal medulla- a morphological and ultrastructural study.** Central European Journal of Biology*

Rad objavljen u domaćem časopisu:

*Petrović-Kosanović, D., Koko, V. (2012). **Immunohistochemical evidence of vasoactive intestinal peptide, neuropeptide Y and substance P in rat adrenal medulla after heat stress.** ARCHIVES OF BIOLOGICAL SCIENCES 63: 7-15.*

Saopštenja na skupovima nacionalnog značaja:

1. *Petrović-Kosanović, D., Veličković, K., Koko, V., Cvijić, G., Čakić Milošević, M. **The effect of acute heat stress on rat adrenal glands - an ultrastructural study.** 4. Srpski kongres za mikroskopiju, 11-12. oktobar 2010, Beograd, Srbija, Zbornik radova, 145-146.*

2. *Petrović-Kosanović, D., Koko, V. Uticaj akutnog toplotnog stresa na mitohondrije kore nadbubrežnih žlezda pacova.* Prvi Kongres - Mitohondrije i slobodni radikali u biomedicini - perspektive. Beograd, Srbija, 24. septembar 2011. Knjiga sažetaka, P11, strana 51.

Saopštenja na skupovima međunarodnog značaja:

1. *Petrović-Kosanović, D., Veličković, K., Koko, V., Cvijić, G., Čakić Milošević, M. The effect of acute heat stress on rat adrenal medulla - an ultrastructural study.* 10th Multinational Congress on Microscopy 2011, Urbino, Italy, September 4-9, 2011. Proceedings, p. 215-21

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Драгана Ж. Петровић- Косановић
број уписа ВО 060203

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Хистолошке и ултраструктурне промене хипофизе и надбубрежних жлезда пацова
у условима акутног топлотног стреса”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 01.06.2012.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора __Драгана Ж. Петровић- Косановић

Број уписа __ВО 060203

Студијски програм __Биологија ћелија и ткива

Наслов рада __„Хистолошке и ултраструктурне промене хипофизе и надбубрежних
жлезда пацова у условима акутног топлотног стреса”

Ментор __Др Весна Коко, редовни професор,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Потписани ____ Драгана Ж. Петровић- Косановић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској
верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума
Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања
доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране
рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у
електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 01.06.2012.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Хистолошке и ултраструктурне промене хипофизе и надбубрежних жлезда пацова у условима акутног топлотног стреса”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство - некомерцијално - без прераде

4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

5. Ауторство - без прераде

6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 01.06.2012.

