

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET



Jelena B. Danilović Luković

UTICAJ SMANJENE FUNKCIJE ŠTITASTE
ŽLEZDE MAJKI NA RAZVOJ JAJNIKA
MLADUNACA PACOVA U RANOM
POSTNATALNOM PERIODU

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY



Jelena B. Danilović Luković

IMPACT OF REDUCED THYROID FUNCTION
OF MOTHERS ON DEVELOPMENT OF RAT
OFFSPRING OVARIES IN THE EARLY
POSTNATAL PERIOD

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

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

dr Anita Radovanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Fakultet veterinarske medicine

Članovi komisije:

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

dr Milica Kovačević Filipović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Fakultet veterinarske medicine

Datum odbrane:

Zahvalnica

Doktorska disertacija je urađena u okviru projekta „*Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja*“, #175061. Projekat je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Eksperimentalni deo je urađen na Katedri za histologiju i embriologiju, Fakulteta veterinarske medicine i Katedri za biologiju ćelija i tkiva i pri Centru za elektronsku mikroskopiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se mentoru prof. Aleksandri Korać na stručnoj pomoći i savetima u mom istraživačkom radu kao i sugestijama i smernicama u pisanju i uobličavanju doktorske disertacije, a pre svega na ukazanom poverenju i podršci u svakom trenutku.

Zahvaljujem se mentoru prof. Aniti Radovanović na stručnom vođenju u svim koracima nastanka ove teze, od planiranja i izvođenja eksperimenta do predstavljanja rezultata, na stručnoj pomoći i smernicama a posebno na tome što mi je otkrila draži i kompleksnost histologije.

Zahvaljujem se doc. Maji Čakić-Milošević za pomoć i sugestije, kao i detaljan i kritički pregled i ocenu doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. Milici Kovačević Filipović na ukazanom poverenju, bezrezervnoj podršci i pomoći u svakom trenutku, kao i tome što me je nesebično uvela u svet nauke.

Od srca se zahvaljujem dragim kolegama Ivanu Miloševiću, Tijani Lužajić i Dragutinu Roksandiću, na čiju sam nesebičnu podršku i prijateljsku pomoć uvek mogla da računam. Želim da se zahvalim dragim kolegama Igoru Goliću i Mariji Aleksić na svesrdnoj pomoći u izradi ove disertacije.

Zahvaljujem doc.dr Neli Puškaš i asistentu dr Ivanu Zaletelu na pomoći i korisnim savetima u realizaciji jednog dela imunohistohemijskih analiza, a veliku zahvalnost dugujem i stručnim saradnicima Centra za elektronsku mikroskopiju, dip. biologima Aniti Lazarević i Maji Bogdanović na pomoći pri izradi elektronskih mikrografija. Zahvalna sam doc. Svetlani Milanović i prof. Oliveri Valčić na pomoći oko analize parametara oksidativnog stresa.

Od srca se zahvaljujem i ovaj rad posvećujem svojim roditeljima i dragoj porodici, koji su mi davali vetar u leđa, i bez njih sve ovo ne bi imalo smisla i dimenziju koju ima, a u znak sećanja na baku Dobru i dedu Spasa. Najveću zahvalnost dugujem mom Ljubu, koji je uvek verovao u mene i čija je beskrajna ljubav rušila sve prepreke i krčila put mog uspeha.

REZIME

Tiroidni hormoni (TH) su od ključnog značaja za razviće sisara u prenatalnom periodu. Prethodne studije pokazuju da subklinički hipotiroidizam ima za posledicu povećanu stopu atrezije u jajnicima mladunaca u prepubertalnom i pubertalnom uzrastu. Uticaj smanjene koncentracije TH na ranu postnatalnu folikulogenezu i razviće jajnika nije do sada ispitano. Ova disertacija ima za predmet istraživanja uticaj hipotiroidizma majki indukovanog 6-n-propil-2-tiouracilom (PTU) na folikulogenezu mladunaca pacova (n=15) 0, 4. i 7. dana po rođenju. Kod mladunaca 0. dana određivani su broj karakteristike oogonija i oocita normalne i izmenjene morfologije svetlosnom i elektronskom mikroskopijom. Pomenutim metodima kod mladunaca 4. i 7. dana starosti u jajnicima je određivan broj nestova, oogonija i oocita po nestu, primordijalnih, primarnih, sekundarnih i preantralnih folikula. Prisustvo glikogena i mukopolisaharida u tkivu jajnika mladunaca 0. dana određivano je PAS (*eng. Periodic Acid Schiff*) histohemijskim bojenjem, a prisustvo kalcijuma u tkivu jajnika pacova 4. i 7. dana Alizarin Red bojenjem. Volumenska gustina nukleusa, mitohondrija i glatkog endoplazmatičnog retikuluma u oocitama primordijalnih folikula analizirana je u jajnicima pacova 4. i 7. dana starosti. Imunohistohemijskom metodom detektovana je imunoekspresija PCNA (*eng. proliferating cell nuclear antigen*) kao markera proliferacije, dva markera apoptoze (kaspaza 3 i TUNEL (*eng. terminaldeoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling*)) kao i dva markera autofagije (ATG7 i LC3I/II). Hipotiroidni pacovi na rođenju imali su smanjen broj oogonija u mitozu i u mirovanju, kao i povećan broj atipičnih oogonija/oocita. Na ultrastukturnom nivou pokazano je prisustvo degenerisanih ćelija u pahitenu (Z-ćelije), oogonija/oocita u autofagiji, apoptozu i kombinaciji ova dva tipa ćelijske smrti, kod obe grupe životinja ovog uzrasta. Najbrojniji tipovi atipičnih ćelija kod hipotiroidnih pacova 0. dana su bile oogonije/oocite u autofagiji i Z-ćelije. U prilog ubrzanoj maturaciji neizmenjenih oogonija/oocita kod ove grupe životinja ide zapaženo prisustvo prominentnih organela i ekspresija PCNA. Broj TUNEL pozitivnih oogonija/oocita je bio manji kod hipotiroidnih pacova 0. dana, dok nije bilo razlike kada je u pitanju imunoekspresija kaspaze 3, ATG7 i LC3. Kod hipotiroidnih pacova starih 4 dana smanjen je broj oogonija i oocita po nestu, primarnih i sekundarnih folikula, a povećan je broj primordijalnih folikula. Kod hipotiroidnih pacova starih 7 dana prisutan je veći broj

primarnih, sekundarnih i preantralnih folikula. Alizarin Red bojenje i elektronska mikroskopija su ukazali na prisustvo prominentnog endoplazminog retikuluma kod hipotiroidnih pacova starih 4 dana. Povećan broj mitohondrija izmenjene morfologije je uočen kod hipotiroidnih mladunaca starih 4 i 7 dana. Imunoekspresija PCNA u oocitama i granuloza ćelijama pacova starih 4 dana je bila povećana u hipotiroidnoj grupi, dok nije bilo razlike u ekspresiji ostalih markera među grupama kod pacova navedenog uzrasta kao ni kod pacova starih 7 dana. Dobijeni rezultati ukazuju da hipotiroidizam majki ima za posledicu povećanu stopu eliminacije oogonija i oocita putem autofagije i degeneracije u pahitenu (Z-ćelije) kao i intenzivniju maturaciju morfološki neizmenjenih, normalnih oogonija/oocita. Takođe, prenatalni hipotiroidizam dovodi do preranog formiranja primordijalnih folikula sa blago izmenjenim endoplazminim retikulumom i mitohondrijama kao i povišenog nivoa ekspresije PCNA. Hipotiroidizam majki u toku graviditeta ima za posledicu poremećaj folikulogeneze kod mladunaca pacova što najverovatnije može imati negativne posledice na reproduktivnu sposobnost u kasnijem životu.

Ključne reči: hipotiroidizam, profaza mejoze I, ultrastruktura oogonija/oocita, primordijalni folikul, PCNA, autofagija, apoptoza

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija ćelije i tkiva

UDK broj:[616-008.64:591.444]:611.651(043.3)

ABSTRACT

Thyroid hormones (TH) are essential for mammals' development in the prenatal period. Previous studies have shown that subclinical hypothyroidism results in an increased rate of atresia in the pups ovaries in prepubertal and pubertal age. The impact of reduced concentration of TH on the early postnatal folliculogenesis and development of ovarian cancer has not been studied until now. The aim of the current thesis is to explain the influence of maternal hypothyroidism induced by 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) on folliculogenesis of rat offspring (n = 15) of at the rat at the day of birth (0. day) and 4 and 7 days old. The number and morphological characteristics of oogonia and oocytes of normal and altered morphology was determined using light and electron microscopy. These methods were applied to determine the number of germ cell nests, oogonia and oocytes within nest, primordial, primary, secondary and preantral follicles in the ovaries of 4 and 7 days old pups. The presence of glycogen and mucopolysaccharides in the ovary tissue of the pups at the 0. day was detected using PAS (Periodic Acid Schiff) histochemical staining and the presence of calcium by Alizarin Red staining in the ovary tissue of 4 and 7 days old pups. The volume density of nucleus, mitochondria and smooth endoplasmic reticulum in oocytes of primordial follicles was obtained in the ovaries 4 and 7 days old rats. Immunohistochemistry was used to detect the expression of PCNA (proliferating cell nuclear antigen), as a marker of proliferation, two markers of apoptosis (caspase-3 and TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)) as well as two markers for autophagy (ATG7 LC3I / II). Hypothyroid rats at birth had reduced number of resting oogonia and oogonia undergoing mitosis, as well as the increased number of atypical oogonia/oocytes. Ultrastructural analyses showed the presence of degenerated cells in pachytene (Z-cell), oogonia/oocytes in autophagy, apoptosis and the combination of these two types of cell death in both groups of animals of this age. The most common types of atypical cells in hypothyroid rats at birth were oogonia/oocytes autophagy and Z-cell. In addition to the accelerated maturation morphologically unchanged oogonia/oocytes in this group of animals was the finding of the presence of prominent organelles in oocyte cytoplasm, followed with the increased expression of PCNA. Number of oogonia/oocytes labeled with TUNEL was lower in hypothyroid rats at birth, while

there was no difference when it comes to expression of caspase-3, ATG7 and LC3. In rats aged 4 days, hypothyroid group had reduced number of oogonia and oocytes and increased number of primordial, primary and secondary follicles. The higher the number of primary, secondary and preantral follicles was detected in 7 days old hypothyroid rats. Alizarin Red staining indicated the prominent endoplasmic reticulum in 4 days old hypothyroid rats. Increased number of mitochondria with altered morphology was observed in 4 and 7 days old hypothyroid pups. PCNA expression in oocytes and granulosa cells of 4 days old hypothyroid rats was increased. There was no difference in the expression of other markers between groups in the ovaries of this age, as well as in rats 7 days old rats. The results indicated that maternal hypothyroidism results in the increased rate of elimination oogonia and oocytes via autophagy and degeneration in pachytene (Z-cells) as well as the intensive maturation of morphologically normal oogonia/oocytes. Also, prenatal hypothyroidism leads to premature formation of primordial follicles with slightly altered endoplasmic reticulum and mitochondria, as well as increased expression of PCNA. Maternal hypothyroidism has an irreversible effect on folliculogenesis of rat offspring that probably could have negative impact on the reproductive ability in adult period of life.

Key words: hypothyroidism, prophase of meiosis I, oogonia/oocyte ultrastructure, primordial follicle, PCNA, autophagy, apoptosis

Scientific field: Biology

Special topic: Cell and Tissue Biology

UDC number:[616-008.64:591.444]:611.651(043.3)

SKRAĆENICE

- AIF** – apoptoza-indukujući factor (eng. apoptosis inducing factor)
- AMBRA1** – aktivirajući molekul u autofagiji regulisanoj beclinom 1 (eng. activating molecule in Beclin-1 regulated autophagy)
- AMH** – antimilerijan hormon (eng. Anti-Müllerian hormone)
- APAF-1** – aktivirajući faktor apoptotskih proteaza 1 (eng. apoptotic protease activating factor 1)
- Bak** – antagonist sličan Bcl-2 (eng. Bcl-2 homologous antagonist/killer)
- BAX** – protein 4 sličan Bcl-2 (eng. Bcl-2-like protein 4)
- Bcl-2** – B ćelijski limfom 2 (eng. B cell lymphoma 2)
- BCL2L1** – eng. BCL2 like 1
- BECN1** – beclin 1 (eng. beclin-1)
- bFGF** – osnovni factor rasta fibroblasta (eng. basic fibroblast growth factor)
- BID** – agonist smrti sa BH3 interagujućim domenom (eng. BH3 interacting-domain death agonist)
- BMP4** – morfogenietski protein kostiju 4 (eng. bone morphogenic protein 4)
- BNIP3** – BH3-only protein BCL-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
- cAMP** – ciklični adenzin monofosfat (eng. Cyclic adenosine monophosphate)
- CASP3** – kaspaza 3 (eng. caspase-3)
- CASP8** – kaspaza 8 (eng. caspase-8)
- cGMP** – ciklični guanozin monofosfat
- CXCL12** – hemokin (C-X-C motiv) ligand 12 (eng. C-X-C motif chemokine 12)
- DAPK1** – kinaza 1 povezana sa smrću ćelija (eng. death-associated protein kinase 1)
- DISC** – signalni kompleks smrti (eng. death-inducing signaling complex)
- DPP** – fragmentacioni factor DNK (eng. DNA fragmentation factor)
- eCG** – konjski horionski gonadotropin – (eng. equine chorionic gonadotropin)
- EGF** – epidermalni faktor rasta (eng. epidermal growth factor)
- ER** – endoplazmin retikulum
- FADD** – eng. FAS-associated death domain-containing protein
- FASL** – FAS ligand

FF – folikularna tečnost

Figα – transkripcijski faktor specifičan za oocite (eng. oocyte-specific transcription factor)

fT₄ – slobodni, ne vezani T₄ (eng. free T₄)

Foxl2 – Forkhead box protein L2

Foxo3 – Forkhead box O3 protein

GDF-9 – faktor rasta/diferencijacije 9 (eng. growth/differentiation factor 9)

GDNF – neurotropni faktor izolovan iz glija ćelija (eng. glial-derived neurotrophic factor)

GnRH – gonadotropin oslobađajući hormon (eng. gonadotropin releasing hormone) tj. LHRH - luteinizirajući-hormone-releasing hormone

GPx – glutation peroksidaza

GR – glutation reduktaza

GSH – glutation

GS-SG – glutation disulfid

HGF – faktor rasta hepatocita (eng. hepatocyte growth factor)

IGF-1 – insulinu sličan faktor rasta – 1 (eng. insulin-like growth factor-1)

KGF – faktor rasta keratinocita (eng. keratinocyte growth factor)

KL – kit ligand

Lamp 1, Lamp 2 – proteini lizosomalne membrane (eng. the lysosomal membrane proteins)

Lc3 – mikrotubulama pridružen protein 1A/1B lakog lanca 3 (eng. microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)

LH – luteinizirajući hormon (eng. luteinizing hormone)

LHRH – sinonim za GnRH, gonadotropin oslobađajući hormon

LIF – inhibitorski faktor leukemije (eng. leukemia inhibitory factor)

LPC – lizofosfatidilholin (eng. lysophosphatidylcholine)

MI – mejoza I

MII – mejoza II

MOF – multioocitni folikuli (eng. multioocyte follicles)

MPF – faktor promocije maturacije (eng. maturation promoting factor)

mTORC1 – kompleks 1 sisarskog rapamicina (eng. mammalian target of rapamycin complex 1)

NCCD – Komitet za nomenklaturu ćelijske smrti (eng. Nomenclature Committee on Cell Death)

NGF – faktor rasta nerava (eng. nerve growth factor)

Od gene – determinišući gen jajnika (eng. ovarian determining gene)

PARP – poli (ADP-riboza) polimeraza (eng. poly (ADP-ribose) polymerase)

PAS – preautofagozomalna struktura (eng. preautophagosomal structure)

PCNA – proliferativni ćelijski nukleusni antigen (eng. proliferating cell nuclear antigen)

PDGF – faktor rasta izveden iz trombocita (eng. platelet derived growth factor)

PGC – primordijalne germinativne ćelije (eng. primordial germ cells)

PI3K – fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaza (eng. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)

PCOS – prevremena insuficijencija jajnika (eng. premature ovarian failure)

PtdSer – fosfatidiserin

PTEN – eng. phosphatase and tensin homolog

PTU – 6n-propil-2-tiouracil

PUMA – eng. p53 upregulated modulator of apoptosis

rT₃ – reverzni trijodtironin

ROS – reaktivne vrste kiseonika (eng. reactive oxygen species)

SCF – faktor matičnih ćelija (eng. stem cell factor)

SKH – subklinički hipotiroidizam

SCP1 – protein-1 sinaptonemskog kompleksa (eng. synaptonemal complex protein -1)

SDSI – SRY zavisne SOX9 inducibilne ćelije

SRY – region Y hromozoma koji determiniše pol (eng. sex-determining region of Y chromosome)

SYCP1, SYCP3 – protein sinaptonemskog kompleksa (eng. synaptonemal complex protein)

T₃ – L-3,5,30-trijodtironin

T₄ – L-3,5,30,50-tetraodtironin

TBG – tiroksin-vezujuć globulin

TBH – tercijarni butil hidroperoksid

TBPA – tiroid-vezujuć prealbumin

TGFβ – transformišući faktor rasta – beta (eng. transforming growth factor beta)

TH – tiroidni hormoni

TNFα – faktor nekroze tumora – alfa (eng. tumor necrosis factor alpha)

TNFR1 – receptor 1 faktora tumorske nekroze (eng. tumor necrosis factor receptor 1)

TR – tiroidni receptori

TRE – T₃ odgovarajući element (eng. T₃ response element)

Trip13 – thyroid hormone receptor interactor

TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling

TSHR – receptori za TSH

TTR – transtiretin

ULK1 –Serine/threonine-protein kinase ULK1

UPR – nepravilno savijen protein (eng. unfolded protein response)

VEGF – vaskularni endotelski faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor)

Vv – volumenska gustina

5'MD – 5' monodejodinaza

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tiroidni hormoni i hipotiroidizam	1
1.1.1. Uloga i mehanizmi delovanja tiroidnih hormona.....	1
1.1.2. Tiroidni hormoni u graviditetu.....	5
1.1.3. Tiroidni status majki i njegov uticaj na potomstvo	6
1.1.4. Uticaj tiroidnog statusa na jajnike.....	8
1.2. Razviće jajnika	9
1.2.1. Genetički aspekt diferencijacije jajnika	9
1.2.2. Embrionalni i rani neonatalni razvoj jajnika.....	10
1.2.3. Poreklo granulosa ćelija.....	12
1.2.4. Rasformiranje nestova.....	13
1.2.5. Mejoza I.....	16
1.2.6. Aktivacija, rast i atrezija folikula	18
1.3. Proliferacija u jajniku u neonatalnom periodu	20
1.4. Ćelijska smrt u jajnicima	22
1.4.1. Smrt germinativnih ćelija u perinatalnom periodu.....	22
1.4.2. Apoptoza	24
1.4.3. Autofagija	27
1.4.4. Kombinovana ćelijska smrt i crosstalk autofagije i apoptoze	29
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	33
3. MATERIJAL I METODI.....	34
3.1. Životinje i eksperimentalni protokol.....	34
3.2. Analiza štitaste žlezde i tiroidni status	35
3.2.1. Analiza tiroidnog statusa majki i mladunaca	35
3.2.2. Stereološka i histološka analiza štitaste žlezde – određivanje indeksa aktivacije.....	35
3.3. Određivanje aktivnosti biomarkera oksidativnog stresa glutation peroksidaze 1 (GPx1) i 3 (GPx3).	36
3.4. Priprema i obrada tkiva jajnika za svetlosnu mikroskopiju (histohemiju i stereologiju)	36
3.4.1. PAS (<i>Periodic acid Schiff</i>) histohemijsko bojenje.....	37
3.4.2. Alizarin Red bojenje za kalcijum.....	38
3.4.3. Histohemijsko bojenje na alkalnu fosfatazu	38
3.5. Elektronska mikroskopija	38
3.5.1. Određivanje broja različitih morfoloških tipova oogonija/oocita	39

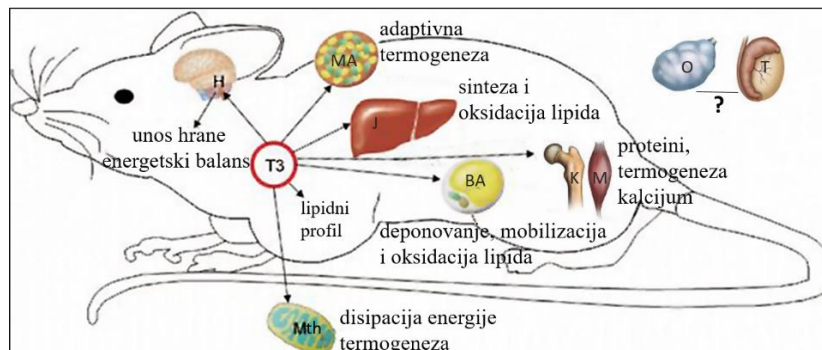
3.5.2. TEM stereologija	39
3.5.3. Određivanje broja i površine mitohondrija	39
3.6. Imunohistohemijska analiza.....	39
3.6.1. Evaluacija imunoekspresije PCNA u oogonijama/oocitama jajnika mladunaca 0. dana.....	40
3.6.2. Evaluacija imunoekspresije PCNA kaspaza 3 i TUNEL u granuloza ćelijama jajnika mladunaca starosti 4 i 7 dana	40
3.6.3. Evaluacija autofagije.....	41
3.7. Western blot analiza.....	41
3.8. Statistička analiza	43
4. REZULTATI.....	44
4.1. Tiroidni status majki i mladunaca.....	44
4.1.1. Tiroidni status kontrolnih i hipotiroidnih majki.....	44
4.1.2. Masa tela mladunaca.....	44
4.1.3. Tiroidni status mladunaca 0. dana.....	45
4.1.4. Tiroidni status mladunaca starosti 4 dana.....	46
4.1.5. Tiroidni status mladunaca starosti 7 dana.....	47
4.2. Enzimi antioksidativne zaštite (glutation peroksidaze tipa 1 i 3 (GPx1 i GPx3)	48
4.3. Svetlosno-mikroskopska analiza jajnika mladunaca 0. dana	49
4.4. Ultrastruktura jajnika mladunaca 0. dana	53
4.5. Imunohistohemija jajnika mladunaca 0. dana	58
4.6. Histohemija PAS i alkalna fosfataza jajnika mladunaca 0. dana.....	60
4.7. Svetlosno-mikroskopska analiza jajnika mladunaca 4. i 7. dana.....	60
4.8. Histohemijska, ultrastrukturna i stereološka analiza jajnika mladunaca 4. i 7. dana	65
4.9. Imunohistohemija jajnika mladunaca 4. i 7. dana.....	69
4.9.1. Imunoekspresija PCNA, kaspaze 3, TUNEL.....	69
4.9.2. Imunoekspresija ATG7 i LC3.....	72
4.10. Western blot	74
5. DISKUSIJA.....	75
6. ZAKLJUČAK	86
7. LITERATURA.....	87

1. UVOD

1.1. Tiroidni hormoni i hipotiroidizam

1.1.1. Uloga i mehanizmi delovanja tiroidnih hormona

O uticaju tiroidnih hormona (TH) na bazalni metabolizam zna se gotovo čitav vek (Thompson i sar, 1929), ali je mnogo kasnije utvrđeno da su TH neophodni kako za razvoj tako i za funkciju kardiovaskularnog, nervnog, imunskog i reproduktivnog sistema (Jannini i sar, 1995; Metz i sar, 1996; Krassas, 2000; Martinez, 2016; Lotti i sar, 2016). Takođe, tek u skorije vreme brojna istraživanja su razjasnila molekulske mehanizme regulacije metabolizma ugljenih hidrata, lipida i proteina tiroidnim hormonima (sl. 1) na ćelijskom nivou (Harvey and Williams, 2002). Neposredno učestvujući u regulaciji metabolizma i održavajući energetske balans, TH posredno pružaju podršku i/ili omogućavaju proliferaciju i diferencijaciju ćelija.

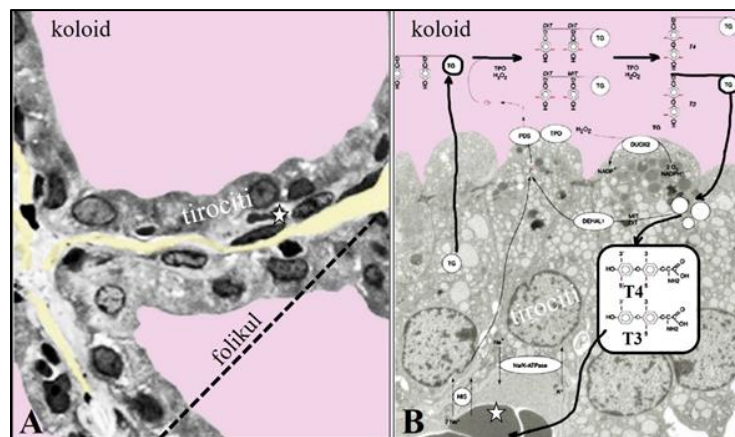


Slika 1. Ciljna tkiva glodara u regulaciji metabolizma tiroidnim hormonima. H-hipotalamus; MA-mrki adipocit; J-jetra; BA-beli adipocit; K-kosti; M-skeletni mišići; Mth-mitohondrija. Svi aspekti delovanja TH na ovarijume (O) i testise (T) do sada nisu razjašnjeni. (Preuzeto i modifikovano iz Song i sar, 2011)

Glavno mesto nastajanja TH je štitasta žlezda (sl. 2) koja sintetiše dva tiroidna hormona, tiroksin (T_4 ili L-3,5,30,50-tetraiodotironin) i trijodtironin (T_3 ili L-3,5,30 – trijodtironin). Štitasta žlezda je histološki organizovana iz folikula praćenih tankim vezivom koje je bogato prožeto kapilarnom mrežom. Folikul izgrađuje jedan sloj polarizovanih tirocita, vršnim delom ka lumenu, a bazalnim ka kapilarima i vezivu. Tirociti su svojim bočnim stranama vezani adhezivno i čine kontinuirani jednoslojni epitel. Izgled tirocita i folikula tesno prati njihovu sintetsku funkciju tako da se jasno mogu razlikovati aktivni od sintetski neaktivnih.

Sinteza prekursora TH – tiroglobulina se odigrava u tirocitima (sl. 2) nakon čega se egzocitozom izbacuje u lumen tiroidnog folikula i deponuje u formi koloida. Po potrebi organizma, regulisano tireostimulišućim hormonom (TSH), koloid se endocitozom unosi ponovo u tirocite, obrađuje u lizozomskom sistemu do T_4 i T_3 koji se oslobađaju u krvotok. U kapilarima T_4 i T_3 se vezuju za proteinske nosače, tiroksin-vezujući globulin (TBG), transtiretin (TTR; tiroid-vezujući prealbumin, TBPA), albumin i prenose do svih tkiva (Robbins, 2000). Za razliku od ljudi, kod kojih je TBG najčešći nosač TH (80% T_4 i do 90% T_3), kod adultnih pacova je to albumin (Robbins, 2000).

Poluživot T_4 i T_3 u serumu čoveka je 5-9 dana odnosno 1 dan respektivno, dok je kod pacova poluživot T_4 12h-1 dan, a T_3 samo 6h. Veća produkcija T_3 i T_4 kod pacova je, usled mnogo kraćeg poluživota, uslovljena i daleko višim bazalnim nivoom TSH. Smatra se da visok nivo TSH ima važnu ulogu u nastanku donekle različite morfologije folikula štitaste žlezde kod čoveka i pacova (Choksi i sar, 2003). Osim razlika uslovljenih pripadnošću datoj vrsti, treba naglasiti da postoje razlike uslovljene polom kada su u pitanju TH. Dok kod ljudi nema razlike u nivou TSH i rastu folikula između muškaraca i žena, ovi parametri su kod mužjaka adultnih pacova viši nego kod ženki (Capen, 1996).

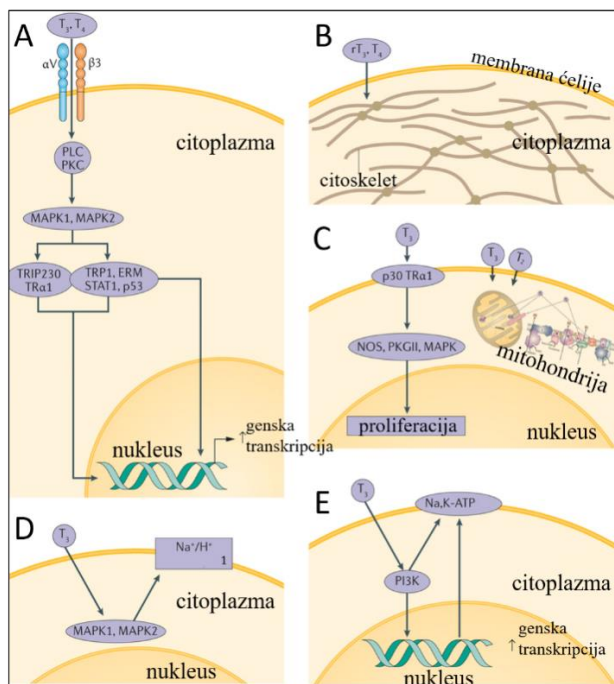


Slika 2. Građa štitaste žlezde pacova i shematski prikaz sinteze tiroidnih hormona. Žlezdana jedinica je folikul koga grade epitelne ćelije –tirociti, a unutrašnjost folikula ispunjena je koloidom. Sinteza T_4 i T_3 opisana je u tekstu. (A) Svetlosna mikroskopija; (B) transmisiona elektronska mikroskopija. Kapilar – zvezdica. (Delom preuzeto i modifikovano iz Rajab N. i sar, 2015 i Raldúa D. i sar, 2012, Rep. Toxicol)

S obzirom da je T_3 biološki aktivna forma hormona, u perifernim tkivima posredstvom dejodinaza, tkivno-specifičnih enzima, dejodinacijom T_4 nastaje T_3 . Interesantno je napomenuti da u tkivima takođe mogu postojati još dve forme tiroidnih hormona, di-jodtironin, T_2 i reverznitri-jodtironin, rT_3 ali njihova uloga nije u potpunosti razjašnjena. Pretpostavlja se da je

konverzija u rT₃, s obzirom da je biološki neaktivna forma, vrsta odbrambenog mehanizma ćelije da brzo spreči previsoku ćelijsku respiraciju, produkciju slobodnih radikala i time oštećivanje organela i same ćelije i uključivanje programa ćelijskog umiranja. Ova vrsta konverzije je favorizovana u stresu, traumi i zapaljenskim procesima. Za T₂ je pokazano da, kao i T₃, reguliše metabolizam lipida i ugljenih hidrata, ali i oksidativnu fosforilaciju.

Efekte TH koje ostvaruju putem receptora na nivou ciljnih tkiva i ćelija mogu biti genomski (sl. 3, sl. 4) i negenomski (sl. 3). Genomski se ostvaruju unutar nukleusa, a negenomski u citoplazmi ili na ćelijskoj membrani i podrazumevaju regulaciju jonskih kanala, promenu koncentracije Na, K, Ca⁺⁺ i/ili cAMP, aktivnost protein kinaza, citoskeletno remodeliranje. Tiroidni hormoni takođe deluju i na genom mitohondrija modulišući oksidativnu fosforilaciju (Psarra i sar, 2006). Vezivanje TH za TR receptore je od značaja za dalje ostvarivanje njihove uloge u transkripciji.

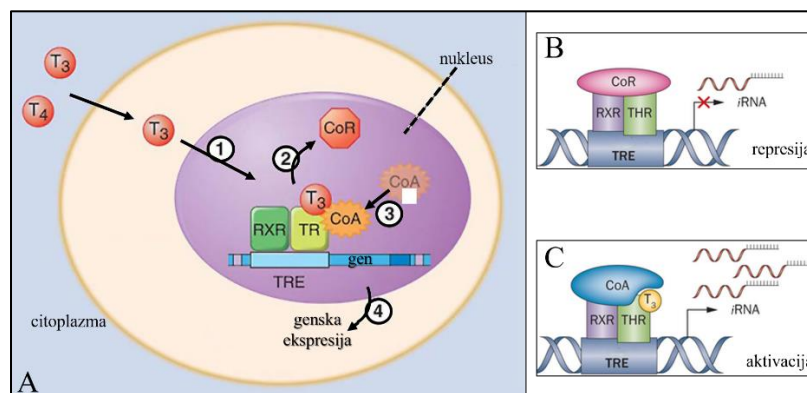


Slika 3. Genomski i negenomski efekat tiroidnih hormona u ciljnim ćelijama. I genomski (A, C, E) i negenomski (B, D) efekti TH ostvaruju se putem tiroidnih receptora (TR). Takođe, negenomski i genomski efekti mogu deliti iste receptorne puteve (E). Preuzeto i modifikovano iz Davis P.J. i sar. 2016, Nat Rev Endo

Nukleusni, a najverovatnije i mitohondrijski TR, funkcionišu kao transkripcioni faktori i regulišu gensku ekspresiju. Sisarski TR su kodirani od strane dva gena (TR α i TR β), koji se, kod ljudi, nalaze na 17 i 3 hromozomu (Lazar, 1993) i imaju devet izoforni iRNK (O'Shea i

Williams, 2002). Od toga, samo četiri izoforme se vezuju za T_3 kod ljudi i glodara (TR α 1, TR β 1, TR β 2 i TR β 3) (Harvey and Williams, 2002).

Brzina i dužina genomskog odgovora na delovanje TH varira u različitim tkivima, meri se satima ili danima (Aranda i Pascual, 2001). Za razliku od genomskog, negenomski odgovori se dešavaju u jako kratkom vremenskom periodu (Davis i Davis, 2000).



Slika 4. Genomski efekat tiroidnih hormona (A), transkripciona uloga nukleusnih tiroidnih receptora. U prisustvu ili odsustvu T_3 , nukleusni TR reprimiraju ili aktiviraju gensku transkripciju. Preuzeto i modificirano iz <http://clinicalgate.com/disorders-of-the-thyroid-gland/> i Ortiga-Carvalho et al, 2014.

Transkripciona uloga TRs se ostvaruje vezivanjem za DNK odgovarajuće elemente (TRE eng. *thyroid receptor response element*) u prisustvu ili odsustvu liganda (sl. 4). U odsustvu liganda, TRs dovode do represije bazalne transkripcije. Biološki značaj represije se ogleda u isključivanju ciljnih gena u odsustvu hormona i povećanju aktivacije transkripcije u vezivanju hormonskog liganda (Lösel i Wehling, 2003).

Osim nukleusnih TR, otkriveni su i proteini koji vezuju TH u plazminoj membrani (Maxfeld i sar, 1981), mitohondrijama (Sterling, 1991), citoplazmi (Cheng, 1991) i endoplazminom retikulumu (ER, eng. *endoplasmic retikulum*) (Cheng i sar, 1987).

TH povećavaju broj i veličinu mitohondrija, broj kristi, utiču na propustljivost mitohondrijalne membrane (Mutvei i sar, 1989) kao i na stopu transkripcije u mitohondrijama (Basset i sar, 2003). Poznat je uticaj TH na mitohondrije u hepatocitama pacova, različitih tipova mišićnih ćelija *in vivo*, mrkih adipocita (Bianco i Silva, 1987; Harper i Seifert, 2008) kao i neuralnih stem ćelije (Gothié i sar, 2016). Naime, snižena koncentracija TH dovodi do smanjenja broja mitohondrija, niže stope produkcije ATP, kao i smanjenja bazalnog protoka protona i

potrošnje kiseonika (Harper and Seifert, 2008). Takođe, u slučaju hipotiroidizma utvrđeno je da dolazi do povećanja fluidnosti mitohondrijalnih membrana usled izmenjenog sastava masnih kiselina što dovodi do promena u njihovoj morfologiji (Brookes i sar, 1998). Promene u mitohondrijalnoj morfologiji i funkciji, kao i njihova međusobna zavisnost karakteriše različite metaboličke poremećaje kao što su dijabetesna kardiomiopatija i nealkoholna steatoza jetre (Galloway i Yoon, 2013). Upravo tako izmenjena morfologija mitohondrija i dovodi do oslobađanja proapoptotskih proteina, što je i pokazano u razviću malog mozga pacova (Singh et al., 2003).

Dok je uticaj TH na mitohondrije dobro poznat, njihovo delovanje na ER nije dovoljno istraženo. TH vezujući protein (p55) i dejodinaze, locirane na ER, su od izuzetnog značaja za njihovu biološku aktivnost (Cheng i sar, 1987; Köhrle, 1995). ER ima ulogu u biosintezi proteina, fosfolipida i holesterola, kao i u degradaciji glikogena. Udružena aktivnost ER i mitohondrija je važna u održavanju homeostaze Ca^{++} , a takođe imaju ulogu i u apoptozi (Berridge, 2002). TH hormoni regulišu Ca^{++} -ATPazne pumpe na ćelijskoj membrani i ER (Davis i Davis, 2003). Iako je nedovoljno istraženo, može se pretpostaviti da snižena koncentracija TH dovodi do poremećaja protoka Ca^{++} iz ER, remete i tako različite signalne kaskade i dovodeći do apoptoze.

Kada je u pitanju uticaj ovih hormona na sintezu ATP, neke studije pokazuju da TH stimulišu sintezu ATP oksidativnom fosforilacijom (Mutvei i sar, 1989), dok druge ukazuju na njihov unutarćelijski kalorigeni efekat, odnosno povećanu potrošnju ATP. Ovo je najverovatnije usled povećane aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u cilju održanja gradijenta jona (Ismail Beigi i sar, 1979; DeLuise i Flier, 1983), kao i smanjene sinteze ATP prisustvom dekuplujućih proteina (UCP, *eng. uncoupling protein*) koji narušavaju protonski gradijent u mitohondrijama (Bianco i sar, 1988; Gong i sar, 1997).

1.1.2. Tiroidni hormoni u graviditetu

Usled fizioloških promena u trudnoći kao i povećane produkcije humanog horionskog gonadotropina (hCG), posledično dolazi do povećanja produkcije T_3 i T_4 za 50% dok je nivo TSH snižen, naročito u prvom trimestru trudnoće (Yamamoto i sar, 1979). Aktivacija TSH receptora od strane hCG stimuliše sintezu T_4 , smanjenje serumskog TSH i povećanje slobodnog T_4 (Savu i sar, 1989). Kako trudnoća odmiče, kod glodara dolazi do snižavanja nivoa T_3 i T_4 što

je u korelaciji sa rezultatima dobijenim kod žena, gde je snižen slobodan T_4 (fT_4 eng. *free T₄*) (Calvo i sar, 1990). Za razliku od ljudi, kod pacova se i upotreba joda od strane štitaste žlezde majke i fetusa smanjuje u trudnoći (Versloot i sar, 1997).

Prisustvo dejodinaze u placenti je od velike važnosti jer se upravo tu vrši konverzija majčinskog T_4 u T_3 koji je neophodan fetusu. Interesantno je da istovremeno velika količina T_4 bez konverzije prolazi kroz placentu (Chan i Kilby, 2000) koja je jako slabo propustljiva za TSH (Bajoria i Fisk, 1998). TBG poreklom od majke ima ulogu u regulaciji funkcije fetalne tiroidne žlezde preko TR izoformi u placenti (Chan i Kilby, 2000; Leonard i Koehrle, 2000). Nivo TBG tokom trudnoće je u znatnom porastu kod ljudi i pacova, dok je kod miševa zabeleženo njegovo smanjenje (Savu i sar, 1989).

Značaj TH u graviditetu je višestruk, prevashodno u sazrevanju različitih sistema organa (Göthe i sar, 1999; de Escobar i sar, 2004) tako da fetalni hipotireoidizam ostavlja značajne posledice na razvoj mozga, kardiovaskularnog sistema i reproduktivnog trakta (Pracyk i Slotkin, 1992; Hamouli-Said i sar, 2007; Williams, 2008).

1.1.3. Tiroidni status majki i njegov uticaj na potomstvo

U poređenju sa hipertiroidizmom, incidenca hipotiroidizma u trudnoći kod ljudi je daleko veća (2-3% trudnica), od čega se u 2-2,5% radi o subkliničkom hipotiroidizmu (SKH), a ostatak čini klinički hipotiroidizam (Negro i Mestman, 2011; Nazarpour et al, 2015), što predstavlja rastući problem po zdravlje ljudi.

SKH se definiše na dva načina: 1) stanje u kome je nivo TSH iznad gornje referentne vrednosti a nivo slobodnog T_3 u serumu u normalnim granicama i 2) stanje u kome su T_3 i T_4 u referentnim granicama a TSH nizak, do granice detektabilnosti (Casey i Leveno, 2006). Etiologija SKH kod ljudi je bazirana na etničkom identitetu, deficijenciji joda i načinu ishrane (Vanderpump, 2011). Posledice SKH u trudnoći su višestruke, i po nekim studijama uključuju abrupciju placente, prevremeni porođaj, spontani pobačaj, gestacionu hipertenziju, fetalni distress, izraženu preeklampsiju (Stagnaro-Green, 2005; Negro i sar, 2007; Cleary-Goldman i sar, 2008; Benhadi i sar, 2009; Stagnaro-Green, 2011; Wilson i sar, 2012).

U pokušaju objašnjenja dugotrajnih posledica SKH neke studije ukazuju na gubitak motorne funkcije i inteligencije kod odojčadi i dece dok druge opisuju očuvanost ovih

parametara (Kooistra i sar, 2006; Li i sar, 2010; Stagnaro-Green, 2011; Behrooz i sar, 2011; El Baba i Azar, 2012).

Do sada je najviše ispitan uticaj tiroidnih hormona na razviće mozga. Hipotiroidizam majki tokom graviditeta dovodi do ireverzibilnih promena u razviću mozga mladunaca jer je pokazano da su TH neophodni za normalan razvoj mozga u perinatalnom periodu (Haddow et al., 1999). I povišena i snižena koncentracija T_3 ima za posledicu smanjenje IQ, sive mase i kore velikog mozga kod dece, dok nivo TSH nema nikakvog uticaja na ove parametre (Korevaar i sar, 2016). Jedan od uzročnika autizma kod dece jeste i deficit TH majki tokom graviditeta (Barbel i sar, 2016). Nedostak T_3 u ranom razviću ljudi ima za posledicu poremećaj rasta i izrazitu mentalnu zaostalost (Oppenheimer i Schwartz, 1997).

Neonatalni hipotiroidizam kod pacova ima za posledicu smanjenje telesne mase kao i odloženo postizanje pika koncentracija TRH i TSH u serumu i hipofizi. Kao posledica toga, dolazi do značajnog i permanentnog smanjenja koncentracija serumskog TSH, T_3 i T_4 (Dussault i sar, 1982). Skorije studije pokazuju je da je odgovarajući nivo maternalnih TH od izuzetne važnosti za celovito formiranje centralnog nervnog sistema i mladunaca pacova jer nedostatak ovih hormona dovodi do značajnog poremećaja u citoarhitekturi korteksa velikog mozga, koji se mogu sprečiti ranom nadoknadom T_4 (Pathak i sar, 2010).

Pokazane su i brojne druge posledice, tako, fetalni hipotiroidizam dovodi do supresije transformacije izoformi teških lanaca miozina u skeletnim mišićima (Butler-Browne i sar, 1984) i redukovane sekrecije insulina u Langerhansovim ostrvcima pankreasa kod pacova *in vitro* (Farahani i sar, 2010).

Najveći broj studija o uticaju hipotiroidizma na animalnim modelima sprovedene su upotrebom goitera, PTU ili metimazola s obzirom da se koriste u medicini za lečenje hipertiroidizma (Narayanan i sar, 1982; Van Haaster i sar, 1992; Sala-Roca i sar, 2008; Carretero i sar, 2011). Upravo zbog sve češće incidence hipotiroidizma *per se*, ali i široke primene goitera u lečenju hipertiroidizma, veoma je važno definisati njihov efekat na reproduktivni potencijal i majki i potomstva.

1.1.4. Uticaj tiroidnog statusa na jajnike

Receptori za TSH (TSHR), i TR (TR α 1 i TR β 1) su snažno eksprimirani u površinskom epitelu jajnika, u oocitama primordijalnih, primarnih i sekundarnih folikula. Sva tri tipa receptora su eksprimirana i u granuloza ćelijama antralnih folikula, za razliku od granuloza ćelijama sekundarnih oocita gde su minimalno prisutni. Takođe, zrele granuloza ćelije eksprimiraju iRNK za dejodinaze tipa 2 i 3, ali ne i za 1, što može da ukaže na konverziju T₄ u tim ćelijama (Aghajanova i sar, 2009). U jajnicima, ove slobodne frakcije TH se nalaze u folikularnoj tečnosti (FF) u opsegu koncentracija koje su normalne za serum (Wakim i sar, 1993; Zhang i sar, 1997). Postojanje ovarijalne 5' monodejodinaze (5'MD) koja stvara T₃ unutar jajnika (*ovary-born* frakcija) omogućava jajnicima da, makar privremeno, budu nezavisni od aktivnosti štitaste žlezde ili koncentracije TH u krvotoku. Ipak treba naglasiti da medijatori aktivacije 5'MD, faktori konverzije T₄ i način održavanja T₃ u optimalnim koncentracijama u jajniku još uvek nisu razjašnjeni u ranim periodima folikulogeneze (Šlebodziński, 2005).

Utvdjeno je da SKH ima uticaj na otežano začeće (Abalovich i sar, 2002) kao i povećan broj spontanih pobačaja (Ma i sar, 2016) kod ljudi.

Kod gravidnih ženki pacova, hipotiroidizam smanjuje stopu proliferacije i apoptoze u *corpus luteum* (Silva i sar, 2014). Iako kod adultnih pacova ne dovodi do steriliteta, on se povezuje sa promenjenim, neregularnim estrusnim ciklusom (Mattheijj i sar, 1995), i ima negativan uticaj, posebno u prvoj polovini trudnoće. Povećana je resorpcija embriona, smanjena veličina legla i povećan broj mrtvorodenih, kao i smanjena reaktivnost materice na estrogen (Longcope, 2000a). Snižena koncentracija tiroidnih hormona dovodi do smanjene osetljivosti i odgovora jajnika, a povećane tendencije ka razviću sindroma policističnih jajnika (PCOS *eng. polycystic ovary syndrome*) (Bagavandoss et al., 1998; Sinha i sar, 2013). Ispitivanje uticaja hipotiroidizma, naročito njegove subkliničke forme, u toku graviditeta je od značaja i u smislu posledica na embrionalni razvoj potomaka.

Hipotiroidizam u detinjstvu dovodi do odloženog polnog sazrevanja. Rezultati o uticaju hipotiroidizma u ranom pubertetu su nekonzistentni. Naime, s jedne strane, pokazano je da ima za posledicu odlaganje početka puberteta i anovulatorne cikluse, a s druge strane, prevremeni pubertet i galaktoreju (Krassas, 2000).

Kod polno nezrelih pacova utvrđeno je da hipotiroidizam ima uticaja na odlaganje polnog sazrevanja i slabog razvoja materice i vagine, smanjenja jajnika i folikula (Longcope, 2000b) kao

i poremećaj folikulogeneze (Dijkstra i sar, 1996). Osim sekrecije gonadotropina i maturacija folikula u jajnicima je u velikoj meri kompromitovana (Bruni i sar, 1975; Maruo i sar, 1987), gde se pojavljuju atrofija sa smanjenjem mase jajnika u adultnom dobu kao i povećana atrezija folikula (Meng et al. 2016). Tiroidektomija pre puberteta dovodi do blokiranja prve ovulacije indukovane konjskim horionskim gonadotropinom (eCG, *eng. equine chorionic gonadotropin*) usled redukcije preovulatornog talasa luteinizirajući hormon (LH, *eng. luteinizing hormone*) (Tamura i sar, 1998a; Tamura i sar, 1998b). Ovo je objašnjeno hiperprolaktinemijom usled hipotiroidizma kod eksperimentalnih životinja (Reymond i sar, 1987). Naime, povišena koncentracija prolaktina inhibira normalno stvaranje LH kod ljudi (Cheung, 1983) i smanjuje sposobnost hipofize da reaguje na gonadotropin oslobadajući hormon (LHRH *eng. luteinizing-hormone-releasing hormone*) kod pacova (Stradtman, 1993).

Istraživanja prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji su incirana rezultatima prethodnih studija kojima je korišćenjem goitrogena propiltiouracila (PTU), indukovani hipotiroidizam kod majki pacova tokom graviditeta i laktacije. Tada je kao rezultat, kod ženskih potomaka, dobijena prerana aktivacija folikula praćena atrezijom 15, 30 i 60 dana po rođenju (Radovanović i sar, 2012). U istoj studiji je pokazano da je posledica maternalnog hipotiroidizma i redukovan broj folikula i žutih tela, kao i hiperplazija i hipertrofija ćelija strome (Radovanović i sar, 2012). Interesantna studija neonatalnog hipotiroidizma pokazala je da on dovodi do poremećaja diferencijacije u jajnicima pacova, dok nema uticaja na proliferaciju granulosa ćelija (Dijkstra i sar, 1996). Takođe je pokazano da postnatalni hipotiroidizam kod prepubertalnih pacova dovodi do povećanja apoptoze granulosa ćelija, ali da oocyte su ostaju intaktne (Chan i Ng, 1995). Navedene studije ukazuju na neosporan negativan uticaj perinatalnog hipotiroidizma na jajnike prepubertalnih, pubertalnih i adultnih pacova.

1.2. Razviće jajnika

1.2.1. Genetički aspekt diferencijacije jajnika

Gonade su na početku embrionalnog razvića polno neutralne, bipotentne, iako su naseljene germinativnim ćelijama koje nose hromozomsku odrednicu XX ili XY. Tek sa aktiviranjem ekspresije gena polnih hromozoma određuje razvoj gonade u jajnik ili testis. Usled ekspresije SRY gena, 10.5 dana počinje determinacija pola kod miševa, pri čemu se somatska

linija ćelija diferencira u Sertolijeve ćelije (Sinclair i sar, 1990; Koopman i sar, 1991; Albrecht i Eicher, 2001). Odsustvo SRY (*eng. sex-determining region of Y chromosome*) pak, kod normalnih XX jedinki vodi formiranju jajnika (Sinclair i sar, 1990; Koopman i sar, 1991; Albrecht i Eicher, 2001). Dalju diferencijaciju jajnika određuje *Od* (ovarian determining) gen koji je negativno regulisan od strane testis–determinišućeg gena na XY gonadama (Eicher i Washburn, 1983). Ipak, identifikacija osoba XX genoma kod kojih se razvijaju testisi u odsustvu SRY gena dovela je u pitanje tu postavku (McElreavey i sar, 1993; Vaiman i sar, 1996). Zapravo, SRY gene suprimira dejstvo Z gena, što dovodi do razvoja testisa. Dakle, Z gen inhibira testis-determinišući signalni put, a dovodi do diferencijacije jajnika (McElreavey i sar, 1993). Identifikovano je nekoliko gena koji bi mogli da imaju funkciju Z gena i to su WNT4 (Vainio i sar, 1999; Biason-Lauber i sar, 2007), RSPO1 (Tomizuka i sar, 2008) i FOXL2 (Pailhoux i sar, 2002). Svi navedeni geni se ekspimiraju u jajnicima i pre bilo kakvih morfoloških promena (Nef i sar, 2005). Espresija WNT4 i RSPO1 je specifična za jajnike od 11.5 dana razvića, jer se prethodno ekspimiraju i u nediferenciranim (bipotentnim) gonadama (Parma i sar, 2006). Bez WNT4 i RSPO1 fetalni ovarijumi miševa pokazuju znake reverzije pola jer se ekspimiraju Sox9 i Amh, markeri testisa (Maatouk i sar, 2008; Manuylov i sar, 2008). Ovi geni su važan deo signalnog puta u koji je uključen β -catenin, zaslužan i za diferencijaciju jajnika kod WNT4 i RSPO1 *knockout* miševa (Liu i sar, 2010) jer deluje inhibitorno na Sox9, marker testisa (Bernard i sar, 2011). Fst sprečava vaskularizaciju specifičnu za testise, kao i smrt germinativnih ćelija aktivacijom aktivina B, dok je transkripcioni faktor FOXL2 neophodan za održavanje identiteta somatskih ćelija (Yao i sar, 2004; Ottolenghi i sar, 2005). Mada inaktivacija Fox2 ne utiče na ranu diferencijaciju jajnika, kod *knockout* miševa za ovaj gen folikuli ostaju „zarobljeni“ u primordijalnom stadijumu jer granuloza ćelije ne prelaze iz pločastih u funkciono kockaste (Uda i sar, 2004), a kod jajnika adultnih životinja, ablacija ovog gena ima za posledicu transdiferencijaciju granuloza ćelija u Sertolijeve ćelije (Uhlenhaut i sar, 2009).

1.2.2. Embrionalni i rani neonatalni razvoj jajnika

Adultni jajnik organizovan je u dva regiona, spoljašnji, koji zauzima veći deo – kora (*cortex ovarii*) i unutrašnji koji čini srž (*medulla ovarii*) i prekriven slojem niskoprizmatičnog epitela ispod kojeg se nalazi sloj iregularnog rastresitog veziva.

Tokom embriogeneze, primordijalne germinativne ćelije (PGC) migriraju iz žumancetne kese preko dorzalnog mezenterijuma praveći u genitalne nabore, zadebljanja duž ventralne strane mezonefrosa, što se kod pacova dešava posle 13,5 dana gestacije (Satoh, 1985). PGC vode poreklo od posteriornih ćelija epiblasta, pod uticajem signala morfogena iz porodice BMP proteina (*BMP, eng. bone morphogenetic proteins*) (De Felici, 2010). Ovaj nabor je anteriorno-posteriorno izdužen i od njega nastaje primordijum jajnika, kod ljudi u ranoj gestaciji (6. nedelja) (Kurilo, 1981), a sredinom gestacije kod ostalih vrsta (kod miševa 11-12 dana) (Everett, 1943; Snow i Monk, 1983). Valja naglasiti da je mezonefros prelazni organ u toku embriogeneze sisara koji obiluje različitim tipovima ćelija (epitelne, endotelne, ćelije strome). Iz tog razloga se čak donedavno smatralo da granulosa ćelije vode poreklo od mezonefrosa ili klicinog epitela na površini jajnika (Wilhelm i sar, 2007; Maheshwari i Fowler, 2008).

PGC tu podležu intenzivnoj proliferaciji i gube pokretljivost, a somatske ćelije se organizuju u primitivne trake koje obuhvataju oogonije od kojih će se formirati populacija primordijalnih folikula (Hirshfield, 1991). Po završetku mitotičkih deoba PGC, u jajniku pacova nastaje veliki broj oogonija koji 17. dana gestacije dostiže svoj maksimum i iznosi 71.000 da bi drugog dana po rođenju opao na 12.000 (Beaumont i Mandl, 1962).

Oogonije pacova ulaze u mejozu I (MI) 17,5 dana gestacije (Mauleon i Mariana, 1969), koja se zaustavlja u diplotenu profaze I do preovulatornog talasa gonadotropina. MI se nastavlja u preovulatornom folikulu, počev od dijakineze. Taj period mirovanja oocite između diplotena i dijakineze se označava kao diktioten. Pre završetka mitoze PGC, mezonefrički tubuli (Volfovi kanali) postaju diskontinuirani i nastaju grupe epitelnih ćelija koje se označavaju kao *rete ovarii* (Byskov i Hoyer, 1994). Ovo se dešava 15. embrionalnog dana kod pacova (Stein i Anderson, 1979) i 15. nedelje kod ljudi (Konishi i sar, 1986). Kod pacova, od 17. dana embrionalnog razvića, na osnovu mesta gde se nalaze razlikuju se tri tipa reta: ekstraovarijalne, povezujuće i intraovarijalne. Prema ranijim istraživanjima, granulosa ćelije vode poreklo od intraovarijalnih reta (Byskov i Litern-Morre, 1973; Stein i Anderson, 1979). Iako folikula nema u prvih 24 sata po rođenju, oko 500 njih se formira u sledećih 12 sati i duplira u sledećih 12 sati. Kod ljudi, ovaj proces je uočen 11-12 nedelje gestacije (Kurilo, 1981). Za razliku od ljudi i većine životinja, kod pacova i miševa se formiranje folikula ne završava tokom graviditeta već u neonatalnom periodu (Malamed i sar, 1992; Rajah i sar, 1992; Eppig i O'Brien, 1996), a ubrzano stvaranje folikula dostiže pik između 24. i 72. sata posle rođenja, odnosno najčešće oko 3-4 dana postnatalno.

Oocite koje se ne inkorporiraju u folikul do tog perioda propadaju (Ohno i Smith, 1964). U ovom procesu učestvuju nekoliko tipova ćelija: oocite, granulosa ćelije i prekursori teka ćelija.

1.2.3. Poreklo granulosa ćelija

Ranije se smatralo da su mezenhim gonada (Pinkerton i sar, 1961), mezonefros (Byskov i Rasmussen, 1973) ili površinski epitel izvori prekursora granulosa ćelija (Gondos, 1975; Sawyer i sar, 2002). Novija istraživanja jajnika goveda su ukazala na posebnu liniju ćelija poreklom od površinskog epitela mezonefrosa od koje se diferenciraju i granulosa ćelije i površinski epitel jajnika (Hummitzsch i sar, 2013). Serija eksperimenata na embrionima himernih miševa dovela je do pretpostavke da Sertolijeve ćelije testisa i granulosa ćelije potiču od iste prekursorske linije ćelija (Palmer i Burgoyne, 1991) na šta ukazuju i kasnije studije na transgenim miševima o EGFP genu koji je pod kontrolom SRY promotora (Sry-EGFP) (Albrecht i sar, 2003). U primordijumu gonada kod oba pola Sry-EGFP pozitivne ćelije su detektovane odmah ispod celomskog epitela i protežu se do centra gonade u blizini mezonefrosa. U jajniku fetusa Sry-EGFP pozitivne ćelije postaju granulosa ćelije u primordijalnim folikulima i u njima se eksprimira FOXL2 (Mork i sar, 2012). Ovi rezultati ukazuju na zajedničko poreklo somatskih ćelija u jajniku i testisu, kao i to da ove ćelije poseduju molekulske mehanizme neophodne za indukciju ekspresije Sry gena.

Iako potiču od iste ćelijske linije, granulosa ćelije odlikuje heterogenost. Naime, Mork i sar. (2012), su otkrili da ćelije površinskog epitela jajnika (celomskog epitela) migriraju u unutrašnjost i postaju Sry-EGFP i FOXL2 pozitivne dok neke FOXL2 pozitivne su istovremeno Sry-negativne ćelije, što ukazuje na činjenicu da potiču iz različitih izvora. To implicira novi model specifikacije granulosa ćelija, da u bipotentnim gonadama neke ćelije iz celomskog epitela migriraju u mezenhim u centru gonade i daju prvi set granulosa ćelija. Ove pregranulosa ćelije ekspimiraju FOXL2 i učestvuju u formiranju primordijalnih folikula u meduli odmah po rođenju. Tokom kasnijeg fetalnog života i neposredno po rođenju (E14.5 do 4.dana postnatalno) neke ćelije površinskog epitela nastavljaju da migriraju u unutrašnjost i daju drugi talas granulosa ćelija. Ove ćelije će formirati folikule u kori koji se aktiviraju tokom zrelog doba života. Takav rezultat je nešto kasnije potvrđen i od strane Zheng i saradnika (2013). Ova istraživanja ne isključuju da je bipotentna gonada takođe izvor granulosa ćelija. Zapravo studija Auguste i sar, (2011) je pokazala postojanje dva tipa ćelija u fetalnom jajniku: jedne, koje

ekspimiraju Foxl2 na Rspo-1 nezavisan način i smeštene su ispod površinskog epitela i druge, blizu mezonefrosa, koje ekspimiraju Foxl2 na Rspo-1 zavisan način. Heterogenost populacije granulosa ćelija je dalje potvrđena identifikovanjem subpopulacije „SRY-zavisnih SOX-9 inducibilnih“ (SDSI) ćelija. Ove ćelije su locirane blizu mezonefrosa i učestvuju u formiranju primordijalnih folikula u srži, nakon rođenja, što je slično FOXL2 pozitivnim ćelijama koje su identifikovali Mork sa sar, (2012) i Harikae i sar, (2013).

Sve ovo ide u prilog činjenici da u jajniku prvi talas granulosa ćelija doprinosi folikulogenezi u srži a drugi talas učestvuje u formiranju folikula u kori.

1.2.4. Rasformiranje nestova

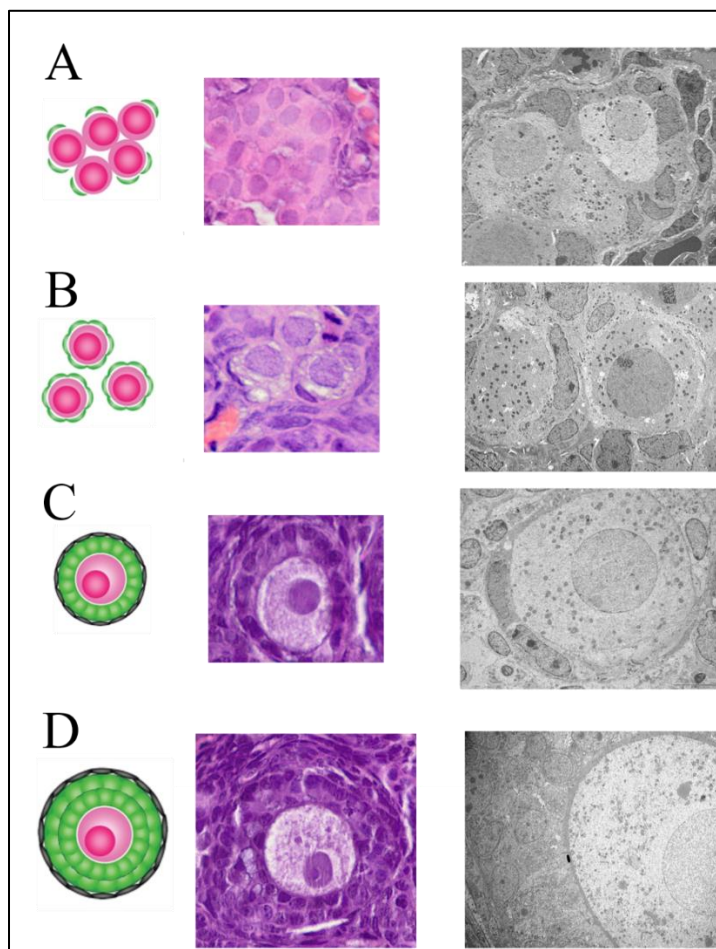
Pre formiranja primordijalnih folikula, PGC su organizovane u nestove (sl. 5), gde se sinhronizovano dele bez kompletiranja citokineze tako da su između sebe povezane citoplazmatskim (međučelijskim) mostovima (Gondos et al., 1986; Pepling and Spradling, 1998). Kod miševa oogonije ulaze u premejotičko stanje 12,5 dana od gestacije (kod ljudi je to u 13. nedelji) (Motta i sar, 1997) kada je detektovana ekspresija mejotičkog gena Scp3 (Chuma i Nakatsuji, 2001). Ulazak u mejozu kod miševa traje 4 dana (Menke i sar, 2003; Bullejos i Koopman, 2004). Kada je završeno formiranje nesta, jajnik čine uglavnom sincicijumi oocita u diktiotenu profaze I mejoze organizovani u duge ovigerne vrpce okružene pregranuloza ćelijama i ćelijama strome (Rajah i sar, 1992; Pepling i Spradling, 2001).

Rasformiranje nestova se dešava kod miševa neposredno po rođenju, a kod ljudi u drugom trimestru gestacije (Konishi i sar, 1986; Pepling i Spradling, 2001), kada propada veliki broj germinativnih ćelija, a preostale se okružuju pre-granuloza ćelijama (Pepling i Spradling, 2001). Pretpostavlja se da delovanje proteaza okolnih somatskih ćelija ima ključnu ulogu u uklanjanju međučelijskim mostova. Primordijalni folikul je formiran kada su preostale oocite u potpunosti okružene folikularnim ćelijama (prekursori granulosa ćelija) (Rajah i sar, 1992).

Tokom procesa rasformiranja nestova kod miševa i ljudi veliki broj oogonija i oocita, kao i PGC tokom migracije i proliferacije pre toga, biva eliminisan apoptozom (Pepling i Spradling, 2001; Jefferson i sar, 2006; Ghafari i sar, 2007; Lobascio i sar, 2007; Albamonte i sar, 2008; De Felici i sar, 2008).

Mutacije gena u početku MI, naročito onih koje su nastale u pahitenu, okidač su za eliminaciju oocita, što je opisano kod nekoliko vrsta životinja i kod ljudi (Roeder i Bailis, 2000).

Defekti hromozoma, broja i genoma mitohondrija mogu biti okidači apoptoze (Perez i sar, 2000). Kod miševa su detektovane mitohondrije u međucelijskim mostovima (Pepling i Spradling, 2001), što može da znači da, slično kao i *nurse* ćelije kod *Drosophila melanogaster* (de Cuevas i sar, 1997), služe za proizvodnju hranljivih materija i organela za buduće oocite.



Slika. 5. Histološke i citološke promene uključene u proces rasformiranja nestova (A) i formiranje primordijalnih folikula. (B), primarnih (C) i sekundarnih (D) folikula

Verovatno je ovaj transfer okidač za apoptozu nekih germinativnih ćelija, a uočena je i reorganizacija mitohondrija i endoplazmatičnog retikuluma neposredno pre rasformiranja nestova (Pepling i Spradling, 2001). Pojava folikula sa više oocita (sl. 6 multioocitni folikuli) (MOF *eng. multi-oocyte follicles*) ukazuje na značaj uklanjanja defektnih oocita kroz potpuno i pravilno realizovan proces rasformiranja nestova (Iguchi i sar, 1990a; Iguchi i sar, 1990b; Hahn i sar, 2005; Kipp i sar, 2007).

Iako apoptoza predstavlja dominantan vid uklanjanja PGC i oocita u fetalnom periodu, mora se naglasiti da u ovom procesu učestvuju i autofagija i nekroza, što je pokazano u jajnicima

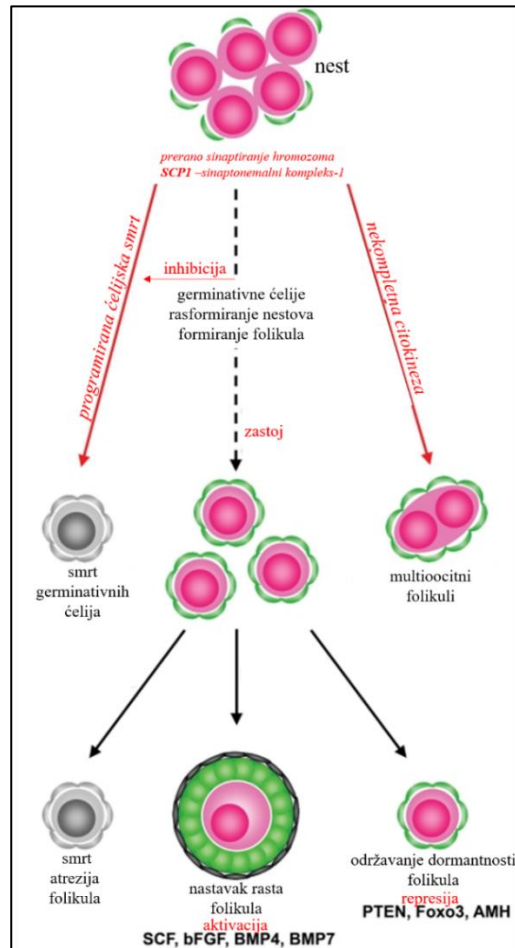
fetusa miševa u kulturi (De Felici i sar, 2008). Takođe je potvrđeno i postojanje signalnih puteva koji vode u ćelijsku smrt, a koji su nezavisni od apoptoze.

Interesantno je da rasformiranje nestova nije samo praćeno mejozom već ga ona i uzrokuje, na šta ukazuje prisustvo protein sinaptonemskog kompleksa-I (SCP-I, *eng. synaptonematal complex protein I*) koji se eksprimira u prvih 24h i neophodan je za pravovremeni početak mejoze I oocita (Paredes i sar, 2005).

Pravilno i pravovremeno rasformiranje nestova kontroliše više različitih gena. Foxl2 gene kodira transkripcioni faktor u pre-granuloza ćelijama i njegov nedostatak dovodi do poremećaja diferencijacije ovih ćelija i njihove pozicije na bazalnoj lamini folikula (Crisponi i sar, 2001; Uda i sar, 2004). Nobox je homeboks-gen specifičan za germinativne ćelije koji je takođe neophodan za formiranje nestova i razvoj oocita u folikulu (Suzumori i sar, 2002; Rajkovic i sar, 2004). Transmembranski proteini Notch signalnog puta su neophodni za pravovremenu razgradnju nestova, a njegov nedostatak dovodi do formiranja MOF (Hahn i sar, 2005; Trombly i sar, 2009), koji se javlja i u slučaju istovremene mutacije u BMP 15 i faktora diferencijacije rasta 9 (GDF9, *eng. growth differentiation factor 9*) (Yan i sar, 2001). Knock-out gena Wnt-4 (*eng. Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 4*) i mutacija Figa (*eng. Factor In the Germline alpha*) kod miševa imaju sličan fenotip – dovoljan broj germinativnih ćelija tokom gestacije koje naglo propadaju kada rasformiranje nestova otpočne, tako da ne dolazi do formiranja zdravih primordijalnih folikula (Vainio i sar, 1999; Soyol i sar, 2000). Iako je veliki broj gena uključen u proces razgradnje nestova i formiranje folikula, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni signalni putevi u realizaciji ovih procesa.

Osim navedenih faktora i hormoni, kao što su estrogen, estradiol i progesteron imaju bitnu ulogu u pravovremenom rasformiranju nestova kod miševa (Iguchi i sar, 1990a; Kezele i Skinner, 2003; Chen i sar, 2007; Kipp i sar, 2007). Upravo se smatra da je nagli pad estrogena i progesterona na rođenju okidač za rasformiranje nestova (Chen i sar, 2007). Jedno od mogućih objašnjenja jeste da progesteron i estrogen ostvaruju svoju aktivnost preko aktivina, člana TGF β familije proteina, čiji je signalni put u jajnicima fetusa suprimiran estrogenom (Kipp i sar, 2007). Egzogeno stimulacija neonatalnog jajnika ovim proteinom dovodi do povećanja broja formiranih primordijalnih folikula (Bristol-Gould i sar, 2006). Istovremeno, stimulacija jajnika aktivinom suprimira ekspresiju Kit liganda u kulturi jajnika što posledično dovodi do smanjenja ekspresije

izoforme *c-kit* liganda koji je vezana za membranu (Childs i Anderson, 2009). Ovo rezultira blokiranjem mejotičkog zastoja i smanjenom aktivacijom primordijalnih folikula.



Slika. 6. Molekulski faktori uključeni u proces rasformiranja nestova i formiranje primordijalnih folikula. Aberantno rasformiranje nestova može dovesti do gubitka germinativnih ćelija ili stvaranje multiocitnih folikula. Sudbina primordijalnih folikula je trojaka: atrezija, nastavak rasta i održavanje dormantnosti. SCP1 – sinaptonemski kompleks-I; BMP- morfogenetski protein kosti; SCF – faktor matičnih ćelija; bFGF – bazni faktor rasta fibroblasta; AMH – antimilerijan hormon; Foxo3, forkhead box transkripcioni faktor; PTEN, homolog fosfataze i tenzina, supresor tumora. (Preuzeto i modifikovano iz Tingen i sar, 2009b)

1.2.5. Mejoza I

Sinhrono mitotičke deobe PGC karakterišu se nekompletnom citokinezom i završavaju se formiranjem klastera kloniranih ćelija. Nakon toga, germinativne ćelije ulaze u mejozu 13.5 dana gestacije kod miševa (Tingen i sar, 2009b; Pepling, 2012), 11-12 nedelje kod ljudi (Gondos i sar, 1986; Motta i sar, 1997; Cohen i Holloway, 2010) i 17,5 dana kod pacova (Mauleon i Mariana, 1969). To je tranzicioni momenat oogonija u oocite, nakon koga se one zaustavljaju u diktiotenu profaze I, okružuju slojem somatskih ćelija (pregranuloza ili folikularne ćelije) i formiraju

primordijalne folikule (Motta i sar, 1997). Ulazak u mejozu I, označava kraj produkcije germinativnih ćelija u jajniku, a oocite ostaju „zarobljene“ u diktiotenu mejoze I sve do ovulacije i oplodnje, kada se mejoza završava (Buehr, 1997). Oocite u diktiotenu profaze I mejoze I (MI) karakterišu se intaktnim nukleusnim ovojem, a nukleus je označen kao germinativna vezikula (GV). Najočigledniji znak da oocite nastavljaju mejozu I jeste nestajanje GV (*eng. germinal vesicle breakdown-GVB*), kondenzacija hromatina i formiranje deobnog vretena, karakterističnog za metafazu I mejoze. Tokom prve mejotičke deobe, homologe hromozomi se odvajaju i jedan set se uklanja u vidu prvog polarnog tela, što za posledicu ima haploidni genom. Mejoza I se nastavlja u mejozu II (MII) i tu biva zaustavljena, do oplodjenja. Kod većine sisara, mejotička maturacija oocite se poklapa sa ovulacijom, ali to nije slučaj sa psima i lisicama, kod kojih se ovulacija dešava u fazi GV (Van der Stricht, 1923; Pearson i Enders, 1943; Hyttel i sar, 1990) kao i kod nekih sojeva miševa kod kojih postoje defekti u odvijanju mejoze (Eppig i sar, 1977).

U održavanju oocite u diktiotenu jako važnu ulogu ima ciklični adenzin 3',5' monofosfat (cAMP) (Vaccari i sar, 2008), čija povišena koncentracija u oocitama dovodi do inaktivacije MPF putem PKA/Cdc25B/CDK I signalnog puta (Tripathi i sar, 2010). Važan inhibicioni signal za oocitu je i ciklični guanozin 3',5' monofosfat (cGMP), koji se sintetise u granulozama ćelijama i putem pukotinastih veza dospeva u oocitu, gde inhibira hidrolizu cAMP fosfodiesterazom 3A (PDE3A). Ova inhibicija održava koncentracije cAMP u oocitama visokim i inhibira progresiju mejoze I (Norris i sar, 2009; Sun i sar, 2009). Konstantni kontakt između granulozama ćelija i oocite je neophodan radi transfera cAMP, cGMP i azot monoksida (NO) u oocitu (Jablonka-Shariff i Olson, 2000; Norris i sar, 2009; Vaccari i sar, 2009; Rose i sar, 2013). Redukcija ovih signala može da aktivira generisanje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) (Pandey i Chaube, 2014). Azot monoksid (NO) sintetisan inducibilnom NO sintazom (iNOS) (Chaube i sar, 2009; Tripathi i sar, 2009) u niskim koncentracijama ima ulogu u održavanju oocite u diktiotenu, ali svako povišenje nivoa i NO, ali i iNOS dovode do apoptoze (Chaube i sar, 2005a; Tripathi i sar, 2011).

Kao jedan od osnovnih uslova koji je neophodan za održavanje fiziološkog stanja oocite je visok nivo intracelularnog kalcijuma (Ca^{++}) (Berridge i sar, 1998; Gordo i sar, 2002) koji je neophodan za očuvanje oocite u mejotičkom zastoju (Vincent i sar, 1992). U uslovima *in vitro*, na oocitama pacova, pokazano je da povišen nivo Ca^{++} indukuje stvaranje ROS i posledično dovodi do apoptoze (Chaube i sar, 2008; Tripathi i Chaube, 2012).

Iako se zaustavljanje mejoze I u diplotenu i formiranje primordijalnih folikula dešava u približno isto vreme, nije u potpunosti jasna veza između navedenih procesa. Proteini sinaptonemskog kompleksa 1 i 3 su neophodni za normalan razvoj oocite i eksprimiraju se u pahitenu mejoze I. Ako se ima u vidu da inhibicija SYCP1 dovodi do preuranjenog ulaska oocite u diploten i formiranja primordijalnih folikula, onda je jasna veza između faze ćelijskog ciklusa i formiranja folikula (Paredes i sar, 2005). Takvi miševi su sterilni jer nema formiranja oocita (de Vries i sar, 2005). Kod SYCP3 mutanata pak, oocite su normalno formirane ali se segregacija hromozoma ne odvija normalno (Yuan i sar, 2002). Kod goveda, estrogen može blokirati aktivaciju folikula usled inhibicije mejotičke progresije a počinje da se sintetiše u periodu formiranja folikula (Yang i Fortune, 2008). Navedeni proteini su značajni za odvijanje procesa MI kao i održavanje mejotičkog zastoja, ali dalja istraživanja su neophodna u smislu njihove interakcije sa drugim regulatornim putevima.

1.2.6. Aktivacija, rast i atrezija folikula

Sudbina mirujućih primordijalnih folikula zavisi od njihove prostorne distribucije i načina grupisanja u jajnicima, koja određuje njihovu aktivaciju ili represiju (Gaytan i sar, 2015).

Kritičan korak u razvoju jajnika jeste prelazak oocite „zarobljene“ u primordijalnom folikulu u rastući primarni folikul. Morfološki, podrazumeva povećanje dijametra oocite (~20 μ m) i prelazak pločastog u prizmatični epitel, a sam proces je nezavisan od uticaja gonadotropina (Mason u sar, 1986). Grupe primordijalnih folikula periodično ulaze u fazu rasta (Lintern-Moore i Moore, 1979) što se označava kao proces inicijalnog odabira primordijalnih folikula (McGee i Hsueh, 2000). U inicijalnom odabiru prepliću se tri procesa: aktivacija i atrezija primordijalnih i formiranje primarnih folikula. Ubikvitarni PI3K-AKT-mTORC1 se navodi kao značajan regulator ovog procesa (John i sar, 2008; Adhikari i sar, 2010) jer mTORC1 indukuje sintezu kit-liganda (KL) u pregranuloza ćelijama i inicira aktivaciju folikula (Zhang i sar, 2014).

Za razliku od sekundarnih, preantralnih i antralnih folikula, u primordijalnim folikulima granuloza ćelije su nezavisne od gonadotropina i steroidnih hormona i u njima se ne sintetišu hormoni (Richards i Midgley, 1976; Oktay i sar, 1997). Uopšte, aktivacija primordijalnih folikula je nezavisna od delovanja hormona (Balla i sar, 2003; Campbell i sar, 2004; Silva i sar, 2004; Braw-Tal i Roth, 2005). Dalja cito diferencijacija granuloza ćelija je neophodna za razvoj

folikula i pod uticajem je hormona (FSH i LH) kao i faktora rasta (EGF, IGF, AMH) i počinje od stadijuma sekundarnog folikula (Richards i Midgley, 1976; Wandji i sar, 1992; Peng i sar, 1996; Adashi, 1998).

Mirujući pul folikula se tokom reproduktivne faze života aktivira zahvaljujući velikom broju citokina, faktora rasta i neutrofina, kao što su bFGF, BMP, KL, KGF, HGF, PDGF, VEGF, NGF, GDNF (Adhikari i Liu, 2009; Edson i sar, 2009; Monget i sar, 2012). Treba napomenuti i represivne faktore, kao što je PTEN (Reddy i sar, 2008), ali i estrogen i progesteron (Zachos i sar, 2002; Kezele i Skinner, 2003). Kao inhibitori ovog procesa navode se CXCL12, AMH i somatostatin (Monget i sar, 2012). Količina aktiviranih folikula iz mirujućeg pula je obrnuto srazmerna njegovoj veličini (Hirshfield, 1994), a kod neonatalnih miševa je utvrđeno postojanje lokalnih inhibitora u susednim mirujućim folikulima kao i u površinskom epitelu jajnika (Da Silva-Buttkus i sar, 2009).

Prvi stadijum rasta folikula jeste veliki primarni folikul, koji je okružen slojem prizmatičnih granuloza ćelija povezanih adherentnim i pukotinastim vezama. Granuloza ćelije ovakvih folikula se karakterišu visokom stopom sinteze proteina što se može zaključiti po dobro razvijenom gER (Amsterdam i Rotmensch, 1987). Neposredno po početku rasta folikula formira se *zona pellucida*, sloj između oocite i granuloza ćelija sastavljen od tri tipa glikoproteina (ZP1, ZP2 i ZP3) (Wassarman i sar, 1996), a od stadijuma primordijalnog folikula, granuloza ćelije su od strome odvojene i bazalnom laminom (Irving-Rodgers i Rodgers, 2000). Već od stadijuma sekundarnog folikula formira se anastomozirajuća mreža u vidu korpice oko samih folikula, nastala grananjem 1-2 arteriole (Hirshfield, 1991). Prethodni stadijumi nemaju sopstvenu mrežu kapilara što znači da nisu izloženi uticaju faktora poreklom iz cirkulacije. Sekundarni folikul se odlikuje uvećanjem broja slojeva granuloza ćelija; sekundarni folikuli sa 3-6 slojeva granuloza ćelija se karakterišu formiranjem teke, koja se sastoji iz dva sloja, spoljašnjeg *theca externa* i unutrašnjeg, *theca interna*. Kada se formira sloj epiteloidnih ćelija teke interne, folikul se klasifikuje kao preantralni (Gougeon, 1996). Smatra se da ćelije teke vode poreklo od dve progenitorske linije, od kojih jednu čine ćelije površinskog epitela, a drugu ćelije lokalizovane u blizini mezonefroza (Nicol i Yao, 2014).

Tokom fetalnog razvoja čoveka (Peters i sar, 1978) i ranog postnatalnog razvoja kod glodara (Hirshfield i De Santi, 1995; Byskov i sar, 1997) primordijalni folikuli koji su smešteni u budućoj srži započinju rast neposredno posle formiranja dok oni u kortikalnom delu inicijalno

ostaju u mirovanju što ukazuje na različitu dinamiku u razvoju ovih delova jajnika kada je u pitanju razvoj folikula (Zheng i sar, 2014). Kod miševa je pokazano da prvi talas primordijalnih folikula dostiže fazu sekundarnog folikula već 15.dana, a ranog antralnog folikula 21.dana postnatalno (Hirshfield i De Santi, 1995). Ovi folikuli su zaduženi za prvu ovulaciju prilikom postizanja polne zrelosti, da bi se već od 2-3 meseca postnatalno aktivirao drugi talas, odnosno post-pubertalni folikuli. Ovaj pul mirujućih folikula predstavlja rezervu koja se troši tokom reproduktivne faze života (Zheng i sar, 2013). Upravo je proces iscrpljivanja pula primordijalnih folikula u prepubertalnom periodu neophodan u smislu postizanja optimalnog broja njihove mirujuće frakcije koji će biti aktiviran tokom reproduktivnog života (Anderson i sar, 2014).

Inicijalni pul primordijalnih folikula takođe podleže i masivnoj atreziji i to je sudbina najvećeg broja primordijalnih folikula. Istraživanja na miševima su pokazala da, gotovo dvostruko veći broj ovih folikula, podleže atreziji u odnosu na broj folikula koji se aktivira u primarne folikule. Mehanizmi još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni, ali se za razliku od smrti germinativnih ćelija u fetalnom periodu i razgradnje nestova, ovaj vid smrti ne povezuje sa klasičnom apoptozom (Tingen i sar, 2009a). Proces eliminacije germinativnih ćelija traje nekoliko nedelja (Flaws i sar, 2001; Bristol-Gould i sar, 2006), tako da i one koje dospeju do stadijuma enkapsulacije nakon rasformiranja nestova bivaju eliminisane u stadijumu primordijalnih folikula ukoliko: oocite ne dobiju odgovarajuću populaciju mitohondrija, ili dovoljno citoplazme, zatim neadekvatno se odvoje od sestrinskog nukleusa ili ne uspostave odgovarajuće veze sa folikularnim ćelijama. Ovo je važan mehanizam uklanjanja neadekvatnih, odnosno nezdravih, germinativnih ćelija što je od izuzetnog značaja za kasniju realizaciju ovulacije, fertilizacije i dobijanje zdravog potomstva.

1.3. Proliferacija u jajniku u neonatalnom periodu

Najraniji stadijumi rasta folikula se karakterišu niskom stopom proliferacije granulosa ćelija (Hirshfield, 1981) u odnosu na kasniji period, kada se pod uticajem gonadotropina i estradiola intenzivira njihova proliferacija (Rao i sar, 1978; Britt i sar, 2004). Najintenzivnija proliferacija se kod pacova i miševa odvija u procesu formiranja antruma dok završna faza sazrevanja folikula podrazumeva značajno umanjenje njenog intenziteta (Hirshfield, 1986). Međutim, folikuli u atreziji su izloženi znatnom smanjenju sinteze DNK kao i nivoa proliferacije granulosa ćelija (Greenwald, 1989; Manabe i sar, 2004).

Nukleusni antigen proliferacije ćelija (PCNA *eng. proliferating cell nuclear antigen*) je esencijalni regulator ćelijskog ciklusa, koji služi kao kofaktor DNK polimeraze delta u S fazi i učestvuje u reparaciji oštećenja DNK tokom njene sinteze (Bravo i McDonald-Bravo, 1987; Tan i sar, 1987). U ćeliji, PCNA počinje da se akumulira u G1 fazi, dostiže svoj maksimum tokom S faze i opada tokom G2/M faze (Kurki i sar, 1988).

PCNA je uključen u veći broj esencijalnih bioloških procesa u ćeliji, od replikacije do spečavanja oštećenja i reparacije DNK. Ovaj protein je uključen i u proces kohezije sestrinskih hromatida, održavanje strukture hromozoma i njihovu segregaciju, kontrolu ćelijskog ciklusa i njeno preživljavanje (Prakash et al, 2005; Stoimenov i Helleday, 2009). PCNA oslikava proliferativnu aktivnost ćelije i to je pokazano kod pacova (Oktay et al, 1995), miševa (Xu i sar, 2011) i ljudi (Steger i sar, 1998). Jedan je od ključnih faktora u razvoju jajnika (Langerak i sar, 2007). Zapravo, delecija gena za PCNA kod miševa dovodi do smrti oocita pre ulaska u mejozu (Roa i sar, 2008). Inhibicija povećane ekspresije PCNA u periodu formiranja primordijalnih folikula ublažava apoptozu oocita i povećava broj formiranih folikula. To ukazuje na njegovu esencijalnu ulogu u procesu gubitka oocita u ovom periodu, jer se povećan intenzitet ekspresije PCNA (Xu i sar, 2011) poklapa sa periodom kada nestaje oko 2/3 od ukupnog broja oocita (Pepling i Spradling, 2001; Pepling, 2006).

PCNA nije detektovan u oocitama i granulosa ćelijama u mirujućim primordijalnim folikulima u jajnicima odraslih svinja i goveda (Wandji i sar, 1996; Tománeki Chronowska, 2006). Njegova ekspresija je zabeležena u oocitama folikula u svim stadijumima rasta (Muskhelishvili i sar, 2005), ali dinamika njegove ekspresije se menja tokom fetalnog perioda i odmah po rođenju tako da je povećana tokom većeg dela fetalnog perioda i kod tek rođenih pacova, 1.dana po rođenju, zatim opada i opet raste u periodu formiranja primordijalnih folikula (Balla i sar, 2008).

Povećana imunoekspresija PCNA je u korelaciji sa najranijim znacima rasta granulosa ćelija. Oocite takođe eksprimiraju ovaj protein u najranijim fazama rasta, pre i nego počnu da se uvećavaju (Oktay i sar, 1995).

PCNA u jajnicima može biti važan pokazatelj kako proliferativne aktivnosti njegovih komponenti, tako i reparativne mogućnosti tkiva.

1.4. Ćelijska smrt u jajnicima

Proučavanje ćelijske smrti je u stalnoj ekspanziji u istraživanjima poslednjih godina, pa se kriterijimi za definisanje njenih tipova vrlo često dopunjavaju i menjaju (Galluzzi i sar, 2012; Galuzzi i sar, 2012). Način uklanjanja germinativnih i somatskih ćelija u periodu prenatalnog i postnatalnog razvoja jajnika još uvek nije u potpunosti razjašnjen, tako da se trenutno navode tri vodeća tipa ćelijske smrti u jajniku, apoptoza, autofagija i nekroza (Galluzzi i sar, 2012) ali se pominje i kombinacija prva dva tipa (Escobar i sar, 2010).

Najveći procenat oocita u jajnicima pacova između 16,5 dana *post coitus* i dana rođenja se nalazi u pahitenu MI, dok je najveći broj njih na rodjenju u fazi ranog diplotena. Već petog dana dominantne su oocite u dijakinezi, odnosno diktiotenu (McClellan i sar, 2003). Apoptoza predstavlja najčešći način uklanjanja oocita u ranom diplotenu kod pacova starih 1 dan, dok je veoma malo zastupljena kod pacova starosti 5 dana kod kojih je uglavnom zastupljena autofagna ćelijska smrt (Ghafari i sar, 2007; Escobar i sar, 2010). Ghafari i sar. (2007) su postulirali da razlike u tipovima ćelijske smrti oocite u različitim fazama profaze mejoze I potiču od nesavršenosti same mejoze neposredno nakon rođenja.

Nezavisno od toga koji je tip ćelijske smrti zastupljen, u procesu atrezije folikula uloga okolnih somatskih ćelija, granulosa ćelija miševa i pacova (Inoue i sar, 2000; Devine i sar, 2000), kao i folikularnih ćelija insekata (Mazzalupo i Cooley, 2006), jeste u uklanjanju, fagocitovanju umirućih ćelija, uz minimalan doprinos fagocitnih ćelija imunskog sistema (Shimada i sar, 2006). Stoga je važno da granulosa ćelije ostanu funkcione u procesu atrezije radi efikasnog uklanjanja oocite (Thomson i Johnson, 2010). Kod *Drosophila melanogaster* je pokazano da folikularne ćelije prvo fagocituju oocitu pa tek onda podležu apoptozi (Mazzalupo i Cooley, 2006).

1.4.1. Smrt germinativnih ćelija u perinatalnom periodu

Tokom oogeneze redukuje se broj germinativnih ćelija, da bi pre ili ubrzo po rođenju, broj oocita bio smanjen za dve trećine (Morita i Tilly, 1999). U humanim jajnicima od oko 7 miliona germinativnih ćelija u fetalnom stadijumu, u ranom neonatalnom periodu preostane 1-2 miliona oocita (Baker, 1963). Oko 85% ukupnog broja oocita nestaje tokom gestacije a taj trend se nastavlja i u pubertetu, da bi od 400.000 germinativnih ćelija, čak 95% njih podleglo

uklanjanju. Kod pacova, od početka mejoze do 48h po rođenju, čak dve trećine germinativnih ćelija nestaje (Hirshfield, 1991) dok kod miševa taj procenat iznosi 66% do kraja gestacije (Flaws i sar, 2001). Neki autori smatraju da su oocite u zigotenu i pahitenu najpodložnije ćelijskoj smrti (Bakken i McClahan, 1978) dok drugi smatraju da je najosetljiviji stadijum diploten MI (Ghafrari i sar, 2007). Osnovni mehanizam uklanjanja ovih ćelija je apoptoza (Tilly i sar, 1997) odnosno savršeno izbalansirana ekspresija anti- i proapoptotskih gena iz BCL2 familije, a naročito BCL2, BAX i BCL2L2 (BCL-X) gena (Albamonte i sar, 2008). Zahvaljujući visokom nivou ekspresije pro-apoptotskog BAX gena u fetalnim jajnicima postoji visok nivo apoptoze dok je nivo BCL2 jako nizak (De Felici i sar, 2005). To je pokazano na *knockout* miševima za Bax i Bcl2 gene, gde dolazi do smanjenja odnosno povećanja pula primordijalnih folikula (Knudson i sar, 1995; Ratts i sar, 1995).

Postoje tri hipoteze zašto se dešava tako masivan gubitak germinativnih ćelija u jajnicima. Prva pretpostavka je da germinativne ćelije nestaju usled tzv. zanemarivanja. Zapravo eksperimenti na mutiranim miševima *in vitro* su pokazali da usled nedostatka faktora preživljavanja (SCF, interleukin-1 α/β , serum, citokini) dolazi do masivne apoptoze germinativnih ćelija (Mintz i Rasel, 1957; Morita et al, 1999; Morita et al, 2001). Ipak, inaktivacija gena za kaspazu 2 može sprečiti ovu pojavu kod miševa deficijentnih za faktore preživljavanja germinativnih ćelija (Morita et al, 2001). Druga hipoteza se odnosi na uklanjanje defektnih germinativnih ćelija, odnosno onih kod kojih je došlo do greške u mejotičkom uparivanju hromozoma ili rekombinaciji. Ovaj način uklanjanja germinativnih ćelija je nezavisan od kaspaze 2 i njenog aktivatora Bax, što ukazuje da je u ovaj proces uključeno više signalnih puteva (Morita et al, 2001). Ipak ove dve pretpostavke se ne mogu primeniti u fiziološkim uslovima. Treće, možda najinteresantnije, objašnjenje je postojanje germinativnih cisti u jajniku. Radi se o klasterima međusobno povezanih germinativnih ćelija koje su nastale nekompletnom citokinezom progenitorske ćelije (Pepling i sar, 1999; Pepling i Spradling, 2001). Ove ćelije su povezane kružnim kanalima i tokom oogeneze kod *Drosophila melanogaster* jedna ćelija se razvije u oocitu, dok 15 njih postaju *nurse* ćelije. Njihova prevashodna uloga je u obezbeđivanju hranjivih materija dok se oocita ne okruži pregranuloza ćelijama. Na kraju oogeneze, po završenoj funkcije one prebacuju svoju citoplazmu u oocitu i odumiru (de Cuevas i sar, 1997). Prisustvo mitohondrija u kružnim kanalima među ćelijama klastera može da ukaže da je apoptoza način uklanjanja oocita sa izmenjenim i defektnim mitohondrijama, tako da samo

najkvalitetnije budu prenete sa majki na potomstvo u cilju održavanja genoma mitohondrija (Perez i sar, 2000; Pepling i Spradling, 2001).

1.4.2. Apoptoza

Apoptoza podrazumeva niz fizioloških procesa tokom razvoja jajnika, počev od smrti germinativnih ćelija u prenatalnom periodu (Morita i Tilly, 1999), eliminacije granulosa ćelija u toku postnatalne atrezije folikula (Tilly i Robles, 1999), uklanjanja ćelija površinskog epitela (Murdoch, 2000) do luteolize (Rueda i sar, 1997).

U ranim stadijumima folikulogeneze (primordijalni, primarni i mali, preantralni folikuli), atrezija je inicirana apoptozom oocite koju prati smrt granulosa ćelija (Gougeon, 1996; Morita i Tilly, 1999). Apoptoza je najčešći vid ćelijske smrti u granulosa ćelijama kod sisara (Hughes i Gecospe, 1991). Zapravo, kod *knockout* miševa za kaspazu 3, proces ćelijske smrti granulosa ćelija je znatno izmenjen dok oocite ostaju intaktne (Matikainen i sar, 2001). Upravo apoptoza oocita u nestovima dovodi do toga da „izabrane“ oocite nastavljaju svoj razvoj u smislu da bivaju okružene folikularnim ćelijama i formiraju primordijalne folikule (McNatty i sar, 2000). Od 1-2 miliona oocita na rođenju kod ljudi, oko trista hiljada njih ostaje do postizanja polne zrelosti (Faddy i sar, 1992). Od puberteta, čak 95% pula biva izgubljeno, tako da samo oko 400 oocita dostigne ovulaciju (Morita i Tilly, 1999). Smatra se da u realizaciji procesa apoptoze važnu ulogu imaju proteini B-ćelije limfoma/leukemia-2 (Bcl-2) (Ratts i sar, 1995; Rucker i sar, 2000; Flaws i sar, 2001; Greenfeld i sar, 2007). Proapoptotski faktori Bcl-2 familije i Bax su odgovorni za ćelijsku smrt oocita (Pru i Tilly, 2001). Bax-deficijentni miševi imaju istu količinu oocita na rođenju kao i *wild-type*, ali je kod njih znatno smanjena stopa eliminacije oocita tokom života (Perez et al, 1999).

Upravo je apoptoza oocita slučajnim odabirom neophodna za formiranje pula primordijalnih folikula (McNatty i sar, 2000; Hussein, 2005). Dok TNF α promoviše ovaj proces (Morrison i Marcinkiewicz, 2002), smatra se da ga progesteron suprimira deluju i negativno na ekspresiju TNF α u oocitama.

U cilju odabira najkvalitetnijih oocita koje su neophodne za uspešnu fertilizaciju i rani embrionalni razvoj, apoptoza predstavlja efikasan način eliminacije ćelija i prisutna je u svim stadijumima oogeneze čak i posle ovulacije (Tilly, 2001; Hutt, 2015). Neke studije ukazuju da čak i do 99% germinativnih ćelija biva eliminisano putem atrezije folikula, a samo 1% njih

dospeva do stadijuma ovulacije (Morita i Tilly, 1999; Tilly, 2001; Matsuda i sar, 2012; Liew i sar, 2014).

Komunikacija izmedju oocita zarobljenih u diktiotenu mejoze I i okolnih granuloza ćelija je od izuzetnog značaja za preživljavanje oba tipa ćelija (Albertini, 2011). Apoptoza granuloza ćelija dovodi do apoptoze oocita u folikulima pacova (Tripathi i sar, 2013; Chaube i sar, 2014a; Chaube i sar, 2014b;) dok intaktnost ovog sloja štiti oocitu od oksidativnog stresa u uslovima *in vitro* (Tatemoto i sar, 2000; Chaube i sar, 2005a; Chaube i sar, 2005b). Odnos promotora apoptoze (kao što je Bax) i supresora (Bcl-2) odlučujući je kada je u pitanju ostvarivanje apoptoze ili preživljavanje ćelije (Terranova i Tayler, 1999).

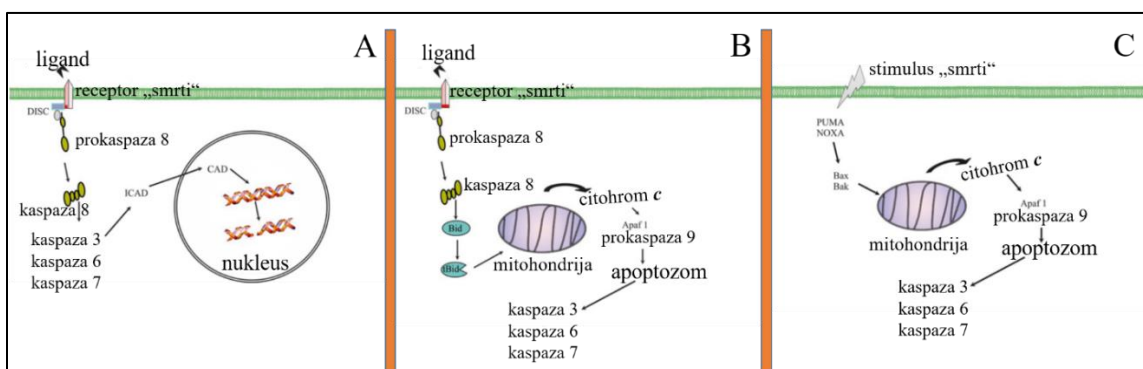
Previsok nivo unutarćelijskog Ca^{++} u oociti može biti okidač za apoptozu. U uslovima *in vitro* pokazano je da jonofore kalcijuma povećavaju količinu kalcijumovih jona u citoplazmi oocite remodeliranjem mitohondrija (Tan i sar, 2011) i depolarizacijom mitohondrijske membrane (Lemasters et al, 1998) dovodeći tako do apoptoze oocita okruženih kumulusnim ćelijama pacova (Chaube i sar, 2008), svinja (Ma i sar, 2005) i goveda (Sergeev i Norman, 2003; Wang i sar, 2008).

Signalni putevi apoptoze u oociti (Sl. 7) podrazumevaju one koji su kontrolisani mitohondrijama (unutrašnji) i receptorima ćelijske smrti u ćelijskoj membrani (spoljašnji) (Aitken i Koopers, 2011). Povišen nivo oksidativnog stresa je jedan od glavnih pokretača apoptoze oocite koji se odvija putem unutrašnjeg (mitohondrijalnog) signalnog puta (Chaube i sar, 2005a; Chaube i sar, 2005b). Proapoptotski ligandi (TNF α i FASL) vezuju se za svoje receptore i aktiviraju receptore ćelijske smrti na površini ćelije. To dalje vodi u aktivaciju kaspazne kaskade i aktivira spoljašnji signalni put (Kelkar i sar, 2003).

Spoljašnji signalni put otpočinje aktivacijom proteina iz porodice faktora nekroze tumora (TNFR1 i FAS *eng. tumor necrosis factor family*) koji se vezuju za sopstvene ligande (TNF α i FASL) i tako aktiviraju receptore smrti (DR *eng. death receptors*) (Hutt, 2015). Povišena koncentracija FasL i TNF α rezultira aktivacijom FADD (*eng. fass-associated death domain-containing protein*) i TRADD (*TNF receptor-1-associated protein*) proteina. Ovi proteini aktiviraju kaspazu 8 i 10 putem signalnog kompleksa koji indukuje smrt (DISC *eng. death-inducing signaling complex*) (Kelkar i sar, 2003). DISC vrši aktivaciju navedenih kaspaza oligomerizacijom njihovih neaktivnih formi, prokaspaze 8 i 10. Dalja aktivacija kaskade kaspaza dovodi do fragmentacije DNK kao ključne karakteristike apoptoze (Jurisicova i Acton, 2004).

Za odvijanje unutrašnjeg puta apoptoze, ključna je uloga mitohondrija. U interakciji sa proteinima grupe Bcl-2 (naročito proapoptotskim Bax i Bak), dolazi do permeabilizacije spoljašnje membrane i oslobađanja apoptogenih faktora, kao što su citohrom *c*, Smac/DIABLO i indukujući faktor apoptoze (AIF) u citosol. Citohrom *c* dovodi do oligomerizacije Apaf-1 (*eng. apoptotic protease inducing factor 1*) i formira se apoptozom koji aktivira prokaspazu 9 i posledično, kaspazu 3 i 7 (Gross i sar, 1999).

Ključnu ulogu u regulaciji apoptoze, u smislu povezivanja spoljašnjeg i unutrašnjeg signalnog puta, u jajniku imaju BH3-only proteini (Hutt, 2015). BID, jedan od proteina ove grupe, predstavlja most koji povezuje unutrašnji i spoljašnji signalni put apoptoze. Naime, skraćeni BID (*eng. truncated - tBID*) je uzrok povišene ekspresije Bax i oslobađanja citohroma *c* u citoplazmu. Dalje, za citohrom *c* se vezuje aktivirajući faktor apoptotske proteaze 1, koji aktivira kaspazu 9 i kaspazu 3. Potonja dovodi do uklanjanja ključnih strukturnih i regulatornih proteina što se manifestuje biohemijskim i morfološkim promena u oociti karakterističnim za apoptozu (Jurisicova i Acton, 2004; Tripathi i Chaube, 2012).



Slika 7. Molekulski mehanizama apoptoze u oociti. Spoljašnji signalni put (A), „crosstalk“ oba signalna puta (B) i unutrašnji signalni put (C). (Preuzeto i modifikovano iz Vázquez-Nin i sar, 2011).

Uočena je veza između kaspaze 3 i DNK fragmentacije, u vidu faktora fragmentacije DNK (DPP *eng. DNA fragmentation factor*), čijim se „cepanjem“ realizuje fragmentacija DNK (Liu i sar, 1997). Nameće se zaključak da aktivacija kaspaze 3 nije jedini način degradacije DNK tokom apoptoze u oocitama (Matikainen i sar, 2001). Fragmentacija DNK može biti pokazana i TUNEL (*eng. terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling*) imunohistohemijskim bojenjem granulosa ćelija, kao što je to urađeno kod mnogih vrsta životinja (Matikainen i sar, 2001) i kod ljudi (Vaskivuo i sar, 2001; Depalo i sar, 2003).

Neaktivna forma kaspaze 3 (prokaspaza) je u granulozna ćelijama nađena u svim stadijuma razvoja folikula kod ljudi, dok aktivna kaspaza nije registrovana u primordijalnim, primarnim i sekundarnim folikulima već samo u antralnim, a TUNEL je detektovan samo u atretičnim folikulima (Hurst i sar, 2006). U istom istraživanju konfokalnom mikroskopijom je utvrđeno prisustvo TUNEL i kaspaze u granulozna ćelijama ali samo u velikim atretičnim folikulima. Apoptotska tela nisu detektovana u malim folikulima (Hurst i sar, 2006). I kod miševa je aktivni oblik kaspaze registrovan samo u antralnim folikulima (Matikainen et al., 2001; Fenwick and Hurst, 2002). Kolokalizacija kaspaze 3 i TUNEL potvrđena je u izolovanim atretičnim folikulima kod svinja, s tim da se aktiviranje kaspaze 3 dešava mnogo pre nego se pojave TUNEL pozitivni agregati piknotičnog nukleusa (Berardinelli i sar, 2004).

Morfološke promene u ćeliji su specifične: kondenzacija i fragmentacija nukleusa, fragmentacija hromozomalne DNK na polinukleozomalne fragmente i stvaranje apoptotskih tela bez oštećenja ćelijske membrane. Histološki kriterijumi za detekciju apoptoze u granulozna ćelijama podrazumevaju observaciju kondenzacije hromatina i piknozu nukleusa (Kerr i sar, 1972). Ultrastrukturne promene su male granularne mase na periferiji nukleusa i diskretni nukleusni fragmenti (Wyllie i sar, 1980; Yuste i sar, 2005). Takve promene su uočene u granulozna ćelijama antralnih folikula kod ljudi (Makrigiannakis et al., 1999) i mnogih drugih vrsta životinja (Inoue et al., 2000). U primordijalnim i primarnim folikulima ljudi nisu uočene tipične morfološke promene karakteristične za apoptozu (marginalizacija heterohromatina i fragmentacija nukleusa, sa bubrenjem ćelijske membrane).

Za razliku od ranog neonatalnog, u juvenilnom periodu ključni proces za atreziju jajnika je apoptotska smrt ćelije. Ovaj proces je hormonski regulisan, gde su estrogini i faktori rasta prepoznati kao faktori preživljavanja a androgeni i GnRH podstiču apoptozu (Haanen i Vermes, 1996).

1.4.3. Autofagija

Autofagija, kao vid programirane ćelijske smrti, predstavlja temu intenzivnih istraživanja u poslednjih nekoliko godina. Neke od najvećih nedoumica su utvrđivanje u kom stepenu je autofagija uznapredovala u odnosu na bazalni nivo u ćeliji kao i način pouzdane detekcije autofagne ćelijske smrti (Galluzzi i sar, 2012). Značaj autofagije se objašnjava održavanjem ćelijske homeostaze, kao primaran odgovor na gladovanje u nedostatku hrane (Mizushima i sar,

2004; Gawriluk i sar, 2011). Iako je u osnovi citoprotektivan mehanizam, u slučaju kada je oštećenje ćelije nepopravljivo a odvijanje apoptoze poremećeno, autofagija je ta koja dovodi do smrti ćelije (Schweichel i Merker, 1973; Clarke, 1990; Boya i sar, 2005). Autofagija je uključena i u druge fiziološke procese kao što su remodeliranje tkiva tokom razvića i diferencijacije kao i uklanjanje oštećenih organela i molekula. Poslednje navedena funkcija autofagije je svrstava u važne mehanizme za odlaganje procesa starenja (Bergamini i sar, 2003), što je takođe važno za oocyte.

Autofagna ćelijska smrt podrazumeva značajnu reorganizaciju membrana i vezikula u ćeliji kao i porast lizozomske aktivnosti (Klionsky i Emr, 2000; Bursch, 2001). U morfološkom smislu, ona podrazumeva sekvencijalnu sekvestraciju citosola ili ćelijskih organela unutar dvostruke membrane što rezultira stvaranjem autofagozoma. Sadržaj ovih vezikula se zatim razlaže delovanjem lizozomalnih hidrolaza (kao što je kiselna fosfataza) (Klionsky i Emr, 2000; Yu i sar, 2004). Prema preporukama Komiteta za nomenklaturu ćelijske smrti (NCCD *eng. Nomenclature Committee on Cell Death*), termin autofagna ćelijska smrt se može koristiti samo u slučaju da je farmakološki ili genetički kontrolisana (Galluzi i sar, 2015). Detekcija autofagije se vrši markiranjem lamp1 i lamp2 transmembranskih glikoproteina tipa 1 koji su vezani za membranu lizozoma (Chang i sar, 2002), upotrebom monodansilkadaverina, substance koja se inkorporira unutar lizozoma i autofagozoma (Biederbick i sar, 1995; Niemann i sar, 2000) kao i gena koji su uključeni u ovaj proces. Ovi geni su prvi put opisani kod kvasaca (Klionsky i Emr, 2000; Mizushima i sar, 2001; Yorimitsu i Klionsky, 2005) i označeni kao Atg a homolozi su nađeni kod kičmenjaka, uključujući sisare i čoveka (Rajawat i Bossis, 2008). Funkcija grupe Atg gena je u formiranju strukture sa dve membrane (autofagozom).

U inicijalnoj fazi autofagije (nukleacija vezikule), ULK/Atg1 kompleks aktivira kompleks PI3-kinaza (*eng. class III phosphatidylinositol 3 kinase complex*), koji aktivira seriju Atg proteina u formiranju izolacione membrane (fagofora) koja nastaje ili od postojećih organela (Liu i Levine, 2015) ili u *de novo* sintezi lipida (Simonsen i Tooze, 2009). U sledećoj fazi elongacije vezikule i njenog potpunog formiranja dva konjugaciona sistema koja su slična ubikvitinu dovode do kovalentnog vezivanja Atg5 za Atg12 i konverzije LC3-I u LC3-II (Ohsumi, 2001). LC3 je kod sisara jedan od tri homologa gena za Atg8 kod kvasaca (Fader i sar, 2008) i lokalizovan je u zrelih autofagozomima pa se koristi kao njihov marker (Ohsumi, 2001). Uz pomoć gena Atg4 nastaje LC3-I (Kabeya i sar, 2000) lokalizovan u citosolu. LC3-I podleže

seriji reakcija sličnih ubikvitaciji za koje su potrebni Atg7 i Atg3 (Tanida i sar, 2004), i nastaje LC3-II konjugovan sa fosfatidiletanolaminom koji se vezuje za membranu autofagozoma. Količina LC3-II je u korelaciji sa brojem autofagozoma što ga čini idealnim za detekciju istih (Ohsumi, 2001).

Ultrastruktorno, početak autofagije je označen formiranjem fagofore (Klionsky i Emr, 2000) koja se drugačije označava 'preautofagozomalnom strukturom' – PAS (*eng. preautophagosomal structure*) (Suzuki i Ohsumi, 2007). Rastom fagofore nastaje vezikula koja se označava kao autofagozom a nakon spajanja sa lizozomom nastaje jednomembranska struktura – autofagolizozom (Mizushima 2007; Tooze i Yoshimori, 2010).

Kombinovana detekcija ultrastukturnih odlika autofagije zajedno sa utvrđivanjem ekspresije Atg, LC3-I, LC3-II, Lamp-1 i Lamp-2, može pokazati stepen realizacije autofagije ali kada je u pitanju autofagna ćelijska smrt, uglavnom se smatra da umiruće ćelije mogu imati izražene osobine autofagije, ali da je to retko način njihovog uklanjanja (Kroemer i Levine, 2008).

U literaturnim podacima o autofagiji u jajniku uglavnom se ističe njen značaj smislu preživljavanja germinativnih i somatskih ćelija u uslovima gladovanja (Hwang i Lee, 2008; Barth i sar, 2011), a u slučaju kancera jajnika, može biti aktivirana tumor-supresivnim genima (Lu i sar, 2008). Ističe se i njena uloga u atreziji folikula kičmenjaka (Thomé i sar, 2009; Choi i sar, 2010). U neonatalnom jajniku sisara, prema studijama nekoliko autora, apoptoza predstavlja dominantan oblik ukljanjanja ćelija, ali autofagija preuzima primat u jajnicima pacova starosti 5 dana (Ghafari i sar, 2007; Escobar i sar, 2008).

1.4.4. Kombinovana ćelijska smrt i crosstalk autofagije i apoptoze

Autofagija pomaže apoptoza-deficijentnim ćelijama da se adaptiraju na stres, a ukoliko se prolongira, dovodi do ćelijske smrti.

Interakcija između proautofagnog gena BECN1 i antiapoptotskog BCL2 predstavlja okosnicu komunikacije (*eng. cross-talk*) apoptoze i autofagije (Shimizu i sar, 2004; Pattingre i sar, 2005; Maiuri i sar, 2010). Ovo se ostvaruje vezivanjem Beclin 1, kao esencijalnog za indukciju autofagije, za BH1 i BH2 domene Bcl-2 proteina (Liang i sar, 1999; Yue i sar, 2003; Pattingre i sar, 2005). Oni su antagonisti, jer vezivanjem BCL2 za BH3 domen na BECN1 ima za posledicu aktivaciju PrdIns3K kompleksa i indukciju autofagije (Maiuri i sar, 2007a).

Vezivanjem frakcije BECL2 i BECL2L1 lokalizovane na ER za BECN1, oni gube anti-apoptotska svojstva što se objašnjava činjenicom da se aktivacija unutrašnjeg signalnog puta odvija na mitohondrijama (Ciechomska i sar, 2009). Ipak, još uvek se ne zna da li će BCL2 i BCL2L1 biti raspoređeni na mitohondrijama ili ER i da li zavisi od uslova gladovanja kao funkcijske veze apoptoze i autofagije (Hale i sar, 2013). AMBRA1 je pozitivni regulator BECN1 i autofagije, sa važnom ulogom povezivanju ova dva vida ćelijske smrti. On se prevashodno vezuje za mitohondrijsku frakciju BCL2 dok pod dejstvom autofagnih stimulusa ulazi u kompeticiju sa frakcijom BECL2 na ER u pogledu vezivanja za BECN1 (Strappazzon i sar, 2011). BH3 domen BECN1 omogućava formiranje BCL2-BECN1-BCL-XL kompleksa na ER što inhibira autofagiju, dok njegova interakcija sa BNIP3 i fosforilacija od strane DAPK1, razlaže ovaj kompleks dovodi do realizacije autofagije (Fuchs i Steller, 2015).

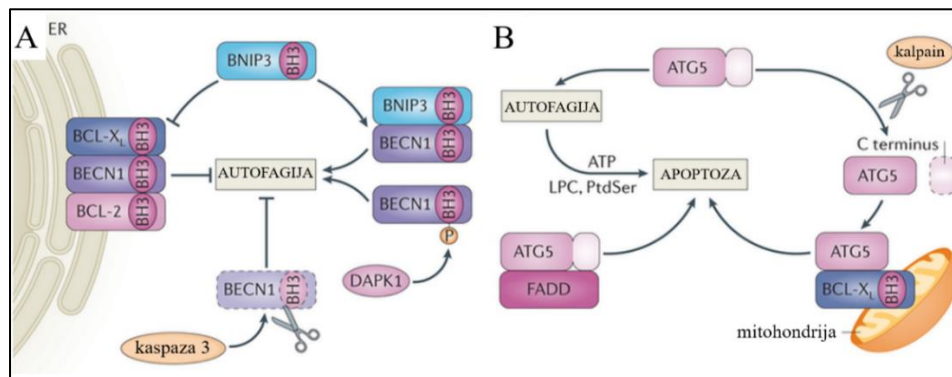
U povezivanju spoljašnjeg signalnog puta autofagije i apoptoze (sl. 8) signalni kompleks koji indukuje smrt ćelije (DISC *eng. death-inducing signaling complex*), koji je preko adaptornih proteina vezan za citoplazmatski domen receptora smrti, vezuje kaspazu 8. Nakon njene degradacije, aktivira se kaspaza 3 i kaskada odgovorna za apoptozu (Hale i sar, 2013). Kompleksna veza ATG5 i CASP8 se ogleda u tome da, nakon aktiviranja apoptoze, dolazi do snižene aktivnosti ovog proautofagnog gena koja vodi u smanjenu aktivnost kaspaze 8 (Young i sar, 2012). Zapravo, ATG5 može imati proapoptotsku ulogu u organizmu na dvojak način. Ukoliko podlegne kalpain-zavisnom razlaganju, čime se u potpunosti menja njegova funkcija u proapoptotsku, vezuje se za BCL-XL u mitohondrijama, i dovodi do apoptoze. Njegovo vezivanje za FADD i PtdSer, dovodi do otpuštanja LPC i za apoptozu tipičnog pupljenja ćelijske membrane (Fuchs i Steller, 2015).

Komunikacija između apoptoze i autofagije je pokazana na dvostrukim *knock-out* fibroblastima miša (za proapoptotske gene Bak i Bax) i ćelijama kancera, gde je u oba slučaja favorizovan proces autofagne ćelijske smrti (Fleury i sar, 2002; Hara i sar, 2006). Takođe, vodonik peroksid i 2-metoksiestradiol (inhibitor mangan-supeoksid dizmutaze) indukuju podjednako oba vida ćelijskog umiranja (Chen i sar, 2008). Studije na pljuvačnim žlezdama *Drosophila melanogaster* ukazuju da autofagnoj ćelijskoj smrti prethodi aktivacija kaspaze 3 kao i Atg gena (Lee i sar, 2003; Martin i Baehrecke, 2004). Takođe, aktivacija nekoliko tipova signalnih puteva uobičajenim ćelijskim stresom ili ROS može aktivirati i apoptozu i autofagiju (Maiuri i sar, 2007b).

Iako je apoptoza tradicionalno najčešći vid ćelijske smrti u procesu atrezije folikula (Hsueh i sar, 1995; Tilly, 1998), kod ptica su podjednako zastupljene autofagija i nekroza (Kovacs i sar, 1992; D'Herde i sar, 1996). Takođe, kod polno nezrelih pacova *in situ* je pokazano da su apoptoza i autofagija podjednako zastupljeni u uklanjanju oocita (Ortiz i sar, 2006), pa čak i istovremeno (Escobar i sar, 2008). Isto je pokazano i u uslovima *in vitro* (Escobar i sar, 2010). Dakle, uklanjanje oocita u ovom periodu kod pacova se odvija kroz tri procesa: apoptozu, autofagiju i mešavinom ova dva procesa, dok nekroza nije zastupljena. Istovremeno prisustvo autofagije i apoptoze u oocitama se može objasniti na dva načina. Prvi je da su oba procesa zastupljena od početka, ali je samo jedan od procesa zastupljen u finalnom uklanjanju oocita. Drugi je da su oba procesa prisutna u svim fazama eliminacije (Escobar i sar, 2010). Pokazano je da autofagija može biti aktivirana kada se apoptoza ne može realizovati (Yousefi i sar, 2006), kao i da blokiranje apoptoze vodi u ćelijsku smrt sličnu autofagiji (Shimizu i sar, 2004; Maycotte i sar, 2010). Interesantno je da kaspaza 3, kao apoptotski marker, češće koegzistira sa autofagnim markerima nego sa pozitivnom TUNEL reakcijom što ukazuje na činjenicu da, u ranim stadijumima eliminacije oocita, najčešće su prisutna oba vida ćelijske smrti. Zapravo, morfološki se mogu uočiti brojni autofagozomi kao i fragmentacija ali ne i kondenzacija hromatina, osim u oocitama koje bivaju uklonjene u pahitenu mejoze I (Escobar i sar, 2008). Istovremena realizacija apoptoze i autofagije u oociti je objašnjena međusobnom interakcijom proapoptotskih gena kao što su PUMA, Bax i Bak (Yee i sar, 2009) kao i proautofagnog Beclin 1 sa antiapoptotskim Bcl-2 genom (Patingre i sar, 2005). Proapoptotski geni BNIP3 i Bad mogu indukovati autofagiju (Maiuri i sar, 2007a; Zhang i sar, 2008). Prisustvo BH3 domena u proapoptoskim i proautofagnom Beclin 1 proteinima, može ukazati da je suštinska aktivacija apoptoze i autofagije ista. Takođe, Atg proteini, za koje je smatrano da učestvuju isključivo u formiranju autofagozoma u toku autofagije, su važni medijatori apoptoze. Degradacija Atg 5 proteina posledično vodi u apoptozu posredovanu mitohondrijama. Ako se ima u vidu činjenica da su oocite znatno veće u odnosu na somatske ćelije, onda se donekle može razumeti da je za njihovu eliminaciju potrebno kombinovano angažovanje ova dva vida ćelijske smrti koji su tako efikasniji u odnosu na samostalno delovanje (Luo i Rubinsztein, 2007). Zapravo, predloženo je stanovište da ćelijska smrt oocite započinje autofagnom degradacijom sadržaja citoplazme oocita (uključujući mitohondrije) što dovodi do aktivacije kaspaza, i netipične ćelijske smrti. Escobar i sar. (2008) smatraju da proteolitički mehanizmi aktivirani kaspazama dovode do fragmentacije

DNK bez kompaktnosti hromatina i u kombinaciji sa aktivnim autofagolizozomima dolazi do destrukcije citoplazme.

Još raniji radovi u uslovima *in vitro* su pokazali postojanje dva signalna puta koja imaju za posledicu kondenzaciju hromatina i njegovu degradaciju tokom apoptoze. Naime, pokazano je da unutrašnja apoptoza podrazumeva i kaspaza-zavisnu i kaspaza-nezavisnu fazu kao i da mehanizmi koji isključuju uticaj kaspaza (kaspaza-nezavisni), prevladavaju inhibiciju kaspaza i dovode do apoptoze (Kroemer i Levine, 2008). Jedan uključuje APAF-1, CAD i kaspaze, a drugi, u koji je uključen i AIF, a koji je nezavisan od kaspaza, rezultira kondenzacijom perifernog hromatina i masivnom DNK fragmentacijom (Susin i sar, 2000). Za apoptozu netipične morfološke promene i odložena fragmentacija DNK, koja se ipak završava smrću ćelije, pokazane su na kaspaza 3-deficijentnim hepatocitima i timocitima (Zheng i sar, 1998). Nedostatak funkcionalne kaspaze 3 u granulosa ćelijama *in vitro* i *in vivo* nema za posledicu prevenciju ćelijske smrti, što ukazuje na kaspaza-nezavisne mehanizme ćelijske smrti koje bivaju aktivirani tom prilikom (Susin i sar, 2000) ili na aktivaciju drugih članova kaskade, kao što su kaspaza 2 i kaspaza 7 (Matikainen i sar, 2001). Zapravo, utvrđeno je da oocite i granulosa ćelije podležu programiranoj ćelijskoj smrti kroz dva genetički različita puta, jedan zavisan od kaspaze 2 a drugi od kaspaze 3 (Matikainen i sar, 2001).



Slika 8. Komunikacija između apoptoze i autofagije. Endoplazmin retikulum (ER), beclin 1(BECN1). (Preuzeto i modifikovano iz Fuchs i Steller, 2015).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Poznato je da hipotiroidizam majki u toku graviditeta može imati brojne posledice po potomstvo u smislu razvoja organa i organskih sistema, naročito nervnog, mišićnog i kardiovaskularnog sistema, ali su saznanja o njegovom uticaju na reproduktivni sistem nepotpuna. Naime, dosadašnja istraživanja su pokazala da dolazi do promena u sazrevanju reproduktivnog sistema od juvenilnog do adultnog perioda, ali nije razjašnjeno da li su te promene posledice poremećaja nastalih pre i/ili u toku formiranja folikula.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje uticaja maternalnog hipotiroidizma na ključne aspekte ranog razvoja jajnika u neonatalnom periodu kao što su ulazak oogonija u mejozu I, rasformiranje nestova i formiranje primordijalnih folikula, koji su od esencijalnog značaja za očuvanje normalne funkcije reproduktivnog trakta u adultnom dobu.

Iz tog cilja proistekli su i konkretni zadaci ovog rada:

1. analiza tiroidnog statusa majki i mladunacanakon tretmana sa PTU određivanjem koncentracije tiroidnih hormona upotrebom RIA metoda i indeksa aktivacije štitaste žlezde mladunaca;
2. određivanje nivoa oksidativnog stresa u jajnicima hipotiroidnih mladunaca merenjem aktivnosti glutacion peroksidaza 1 (GPx1) i 3 (GPx3);
3. analiza histo-morfoloških promena u jajnicima na nivou svetlosne mikroskopije rutinskim histološkim, histohemijskim i imunohistohemijskim bojenjem oogonija, oocita i granulosa ćelija;
4. analiza ultrastrukturnih karakteristika oogonija i oocita na nivou elektronske mikroskopije;
5. morfometrijsko-stereološka analiza jajnika na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije.

3. MATERIJAL I METODI

3.1. Životinje i eksperimentalni protokol

U eksperimentu su korišćeni Albino Oksford (AO) pacovi po dobijenoj saglasnosti od strane Etičkog komiteta Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, broj dozvole (01-19/8). Sve eksperimentalne procedure su sprovedene pod nadležnošću licenciranog veterinara, specijalizovanog za brigu o laboratorijskim životinjama. Životinje su držane u prostoriji za smeštaj laboratorijskih životinja pod standardnim laboratorijskim uslovima sa dvanaestočasovnom smenom svetlosti i mraka, a hrana i voda su bile dostupne *ad libitum*.

Osamnaest polno zrelih ženki (majke) koje prethodno nisu parene razvrstano je u tri grupe, po šest ženki u svakoj. Prva grupa (A) majki je tretirana sa 1,5 mg/l 6-n-propil-2-tiouracila (PTU) u pijaćoj vodi tokom graviditeta i laktacije (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), druga grupa (B) je tretirana sa 150 mg/l 6-n-propil-2-tiouracila (PTU) u pijaćoj vodi tokom graviditeta i laktacije, a treću grupu (K) su činile netretirane, kontrolne životinje. Faza polnog ciklusa određivana je analizom vaginalnih razmaza. Po utvrđivanju regularnog polnog ciklusa, ženke su parene, a nultim danom začeća smatran je dan kada su u vaginalnom razmazu nadjeni spermatozoidi.

Od majki iz grupe A i K uzeto je ukupno po 15 mladunaca, koji su žrtvovani u prvih 24 sata po rođenju, 4 dana i 7 dana nakon rođenja (po 5 mladunaca u svakoj od navedenih uzrasnih kategorija).

U eksperimentalnoj grupi B, kod majki (n=6) koje su tokom graviditeta dobijale visoke doze PTU (150 mg/l) zabeležen je smanjen broj mladunaca po leglu (u proseku 1-3 mladunca), kao i povećana smrtnost, tako da nijedan mladunac nije preživio do 7 dana starosti. Takođe, jedno celo leglo je uginulo na dan rođenja. S obzirom da su ovom eksperimentu potrebni samo ženski mladunci, a odnos polova u normalnoj populaciji je 50:50, zbog nemogućnosti sprovođenja statistički validne analize ispitivanih parametara jajnika, a zbog dobrobiti životinja, ova grupa je isključena iz dalje obrade podataka.

Masa mladunaca je merena neposredno pre žrtvovanja koje je sprovedeno uvođenjem životinja u duboku anesteziju. Uzorkovanje krvi je sprovedeno tokom trajanja anestezije.

3.2. Analiza štitaste žlezde i tiroidni status

3.2.1. Analiza tiroidnog statusa majki i mladunaca

Tiroidni status majki i mladunaca je utvrđen određivanjem nivoa T₃ i T₄ u krvnoj plazmi majki i mladunaca starosti 4 i 7 dana, a kod novorođenih mladunaca nivoa T₄. Koncentracije tiroidnih hormona određene su radioimunoesej testom (INEP, Zemun, Srbija) prema uputstvu proizvođača.

3.2.2. Stereološka i histološka analiza štitaste žlezde – određivanje indeksa aktivacije

Štitaste žlezde su nakon uzorkovanja fiksirane u 10% neutralnom formalinu (pH 6,8) tokom 24h na sobnoj temperaturi, zatim dehidratirane kroz seriju alkohola rastućih koncentracija, prosvetljene u ksilolu i ukalupljene u parafin. Serijski preseki debljine 5 μm bojani rutinski hematoksilin-eozin (H&E) i montirani u DPX-u korišćeni su za stereološku i histološku analizu. Korišćena je višenamenska stereološka mrežica M42 (M42 testni sistem koji se sastoji iz 42 testne tačke i 21 testne duži u na površini koja iznosi 36,36 d², gde je d dužina jedne testne duži) (Weibel, 1979). Volumenska gustina komponenti štitaste žlezde je određivana pomoću klasične stereološke metode za određivanje volumenske gustine (Kališnik, 1981). Broj polja po uzorku je određivan na osnovu formule (Kališnik, 1981):

$$"n" = \left(20 \frac{SD}{x}\right)^2$$

gde je SD standardna devijacija, a x je aritmetička sredina probnog uzorka.

Određivana je volumenska gustina (Vv) intersticijuma (Vvi), epitelnog tkiva (Vve) i koloida (Vvc), a indeks aktivacije (Ia) određivan je prema sledećoj formuli:

$$Ia = Vve / Vvc$$

Veličina folikula u deskriptivnoj histološkoj analizi štitaste žlezde određivana je arbitrarno.

3.3. Određivanje aktivnosti biomarkera oksidativnog stresa glutation peroksidaze 1 (GPx1) i 3 (GPx3)

Za utvrđivanje aktivnosti GPx1 i GPx3 korišćena je puna krv i plazma mladunaca pacova primenom kuplovanog testa (Günzler i sar, 1974). Sve hemikalije su bile od proizvođača Sigma Aldrich (Munich, Germany). Uzorci krvi su hemolizovani upotrebom Drapkinovog reagensa (1.6 mM KCN, 1.2 mM $K_2Fe(CN)_6$ and 0.023 M $NaHCO_3$). GPx prisutan u uzorcima redukuje tercijarni butil hidroperoksid (TBH). Glutation (GSH) kao donor vodonika se oksiduje do glutation disulfid (GS-SG). U drugoj fazi, njega redukuje NADPH i glutation reduktaza (GR) do GSH. Konačne koncentracije korišćenih reagenasa su bile: 100 mM fosfatni pufer (pH 7.4), 4 mM EDTA, 6 mM GSH, 0.375 IU/mL GR, 0.3 mM NADPH and 1.575 mM TBH. Niske koncentracije TBH (ispod 2.32 mM) koje su korišćene u ovom postupku, određuju aktivnost Se-zavisnih GPx. Redukcija NADPH je beležena tokom 3 minuta na 366 nm Cecil Ce2021 (UK) spektrofotometru sa Peltier termostatskom jedinicom. Vrednosti absorbance (A) su praćene u intervalima od 30 sekundi i rezultati su izraženi u mikrokatalima na litar ($\mu\text{kat/l}$).

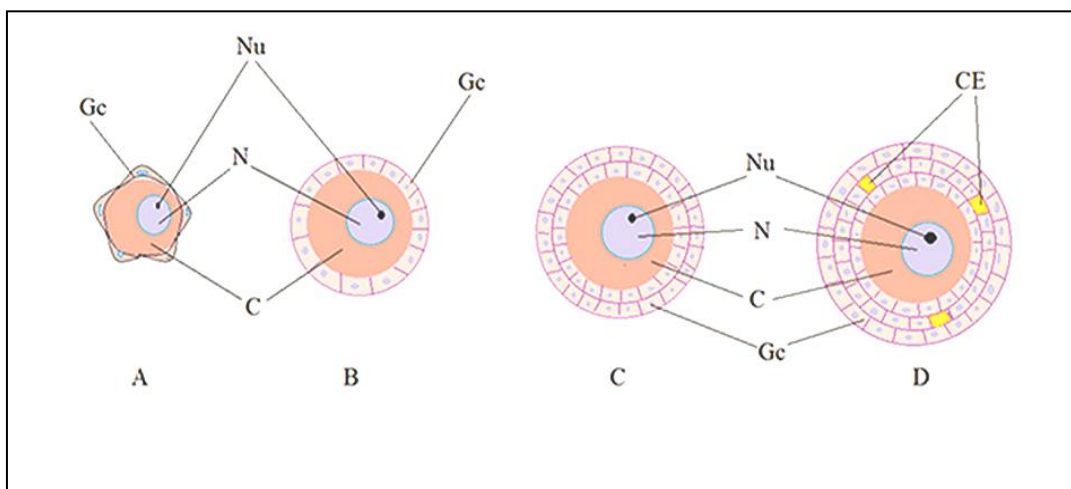
3.4. Priprema i obrada tkiva jajnika za svetlosnu mikroskopiju (histohemiju i stereologiju)

Jajnik je pripremljen za analizu na nivou svetlosne mikroskopije na identičan, prethodno opisan način kao i štitasta žlezda. Za brojanje oocita, oogonija i folikula, svaki peti isečak jajnika je korišćen, kao što je preporučeno u relevantnoj literaturi (Tilly, 2003). Tipovi germinativnih ćelija i folikula su klasifikovani prema Inserra i sar (2014) i Mazaud i sar. (2002). U jajniku tek rođenih životinja (0. dan), utvrđivan je broj nestova u budućoj srži i kori jajnika, prosečan broj oogonija i oocita po nestu, kao i broj tipova germinativnih ćelija: oogonije u interfazi, oogonije u mitozu, oocite u pre-diplotenskim fazama profaze mejoze I (leptoten, zigoten i pahiten), oocite u diplotenu kao i izmenjene oocite.

U jajniku mladunaca starosti 4 dana određen je broj nestova u budućoj srži i kori, kao i prosečan broj oogonija i oocita po nestu. Takođe, određen je i broj oogonija u interfazi, oogonija u mitozu, oocita u pre-diplotenu, primordijalnih, primarnih i sekundarnih folikula. Kod pacova starih 7 dana u jajniku je definisan broj primordijalnih, primarnih, sekundarnih i preantralnih

folikula. Tipovi folikula su definisani na sledeći način (modifikovano prema Mazaud i sar, (2002) i prikazani na slici 9:

- 1) primordijalni folikul – oocita je delimično ili u potpunosti okružena pločastim granuloza ćelijama (sl. 9A)
- 2) primarni folikul – oocita je okružena jednim slojem kockastih ćelija, ili je barem jedna ćelija niskoprizmatična u jednom sloju pločastih granuloza ćelija (sl. 9B)
- 3) sekundarni folikul – oocita je okružena sa dva ili više slojeva kockastih ćelija ili jedan sloj ćelija i još jedna ćelija (sl. 9C)
- 4) preantralni folikul – oocita koja je okružena sa više od dva sloja kockastih ćelija i Kol-Eksner (*eng. Call-Exner bodies*) telašcima (malim prostorima ispunjenim folikularnom tečnošću) između njih (sl. 9D)



Slika 9. Tipovi folikula. A. Primordijalni. B. Primarni. C. Sekundarni. D. Preantralni. N-nukleus, Nu-nukleolus, C-citoplazma, Gc-granuloza ćelije, CE-Kol-Eksner telašca.

3.4.1. PAS (*Periodic acid Schiff*) histohemijsko bojenje

Posle standardne deparafinizacije i hidratacije tkiva, parafinski preseci su isprani u destilovanoj vodi, tretirani 1% rastvorom perjodne kiseline (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) na sobnoj temperaturi 5 minuta i ispirani u tekućoj vodi 3 minuta. Nakon ispiranja u destilovanoj vodi, preseci su bojeni Schiff-ovim reagensom (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 15 minuta na sobnoj temperaturi, isprani u tekućoj vodi 3 minuta, a zatim i u destilovanoj vodi.

Kontrastiranje je sprovedeno Gill-ovim hematoksilinom (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) tokom 2 minuta i nakon toga preseći su isprani u tekućoj vodi. Preseći su zatim rutinski dehidratirani i montirani u DPX-u.

3.4.2. Alizarin Red bojenje za kalcijum

Bojenje je sprovedeno u rastvoru Alizarin Red (C.I. 58005, 2 gm u 100 ml destilovane vode). Nakon podešavanja pH rastvora na 4.1-4.3 pomoću 10% amonijum hidroksida, preseći su bojeni u trajanju od 1 minute. Dehidracija preseka je sprovedena tako što su po 20 puta potopljeni u 100% acetonu a zatim i u smeši acetona i ksilola (1:1). Preseći su zatim rutinski montirani u DPX-u.

3.4.3. Histoheмиjsko bojenje na alkalnu fosfatazu

Histoheмиjsko bojenje parafinskih preparata na alkalnu fosfatazu je vršeno komercijalnim kitom za detekciju alkalne fosfataze Sigma-Aldrich, prema uputstvu proizvođača. U 48 ml destilovane vode rastvorena je jedna kapsula Fast blue RR Salt i nakon toga je dodato 2 ml Naphtol AS-MX. Deparafinisani preseći su bojeni 30 minuta, nakon čega su isprani u destilovanoj boji, montirani u DPX-u.

3.5. Elektronska mikroskopija

Nakon fiksacije u 4% glutaraldehidu (pH 7.2) tokom 24h, jajnici su ispirani u Milloning puferu tri puta i postfiksirani u 1% osmijum tetroksidu (OsO_4 , pH 7.2) tokom 1h. Posle dehidracije u seriji acetona rastućih koncentracija, tkivo je ukalupljeno u smolu araldit. Polutanki preseći su obojeni toluidin plavim i korišćeni za definisanje površina koje su analizirane. Ultratanki preseći odabranih površina su dobijeni na ultramikrotomu Leica EM UC6 (Leicamicrosystem, Wetzlar, Germany), zatim montirani na bakarne mrežice i kontrastirani uranil acetatom i olovo acetatom pomoću Leica EM STAIN (Leica Microsystems). Ultrastruktorna analiza je sprovedena na transmisionom elektronskom mikroskopu Philips CM12 (Philips/FEI, Eindhoven, The Netherlands) opremljenim digitalnom kamerom SIS MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany).

3.5.1. Određivanje broja različitih morfoloških tipova oogonija/oocita

Broj morfološki normalnih oogonija/oocita, Z-ćelija, oogonija/oocita koje podležu autofagiji, kombinovanoj autofagiji/apoptozi, i apoptozi je određivan unutar nestova, na elektronskim mikrografijama (uvećanje x1800), na uzorku od 200 germinativnih ćelija. Broj je dat kao procenat određenog tipa oogonija/oocita u odnosu na ukupan broj oogonija/oocita u nestu.

3.5.2. TEM stereologija

Stereološka kvantifikacija citoplazme i ćelijskih komponenti (nukleus, mitohondrije, aGER, Goldži kompleks) oocita primordijalnih folikula jajnika mladunaca starosti 4 i 7 dana je sprovedena na elektronomikrografijama (uvećanje x3000) pomoću softvera Adobe Photoshop CS6. U obzir su uzimane samo mikrografije oocita presečene u nivou nukleusa. Metodom slučajnih tačaka, određivana je volumenska gustina navedenih komponenti ćelije prema formuli $V_v = P_c/P_{total}$, gde je P_c broj tačaka koje padaju na odgovarajuće ćelijske komponente oocite (citoplazma, organele), a P_{total} je ukupan broj tačaka na oociti (Weibel et al, 1966). V_v je izražena u procentima.

3.5.3. Određivanje broja i površine mitohondrija

Broj određenih tipova mitohondrija M1, M2 i M3 (detaljno opisanih u poglavlju Rezultati) kao i njihova površina određeni su sa nasumično odabranih elektromikrografija (uvećanje 3000 puta), za jajnike mladunaca starosti 4 i 7 dana. Broj mitohondrija je određivan u primordijalnim folikulima tako da je uzorak za svaki tip iznosio najmanje 100 mitohondrija. Broj mitohondrija je izražavan u procentima, a površina kao μm^2 .

3.6. Imunohistohemijska analiza

Na parafinskim presecima je utvrđivana imunoekspresija PCNA (sc-7907), Atg7(sc-33211) (Santa Cruz, Biotech, USA), aktivnog oblika kaspaze 3 (Asp 175) i LC3 a/b (ab58610) (Cell Signaling Technology, USA i Abcam, UK) i TUNEL (FragEL DNA fragmentation Detection kit with colorimetric TdT enzyme (QIA33, Merck)).

Za sva antitela, osim TUNEL, imunohistohemijsko bojenje je sprovedeno prema sledećoj proceduri a kao vizuelizacioni sistem korišćen je Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (ab64261, Abcam, UK).

Za uklanjanje antigena je korišćen 0,1M citratni pufer (pH 6), u kome su parafinski preseci zagrevani u mikrotalasnoj pećnici 20 minuta nakon postizanja tačke ključanja pufera. Nakon hlađenja pufera na sobnoj temperaturi, preseci su ispirani u PBS-u dva puta, a blokiranje endogenih peroksidaza je urađeno Hydrogen Peroxide Block tokom deset minuta. Posle ponovnog ispiranja u PBS-u tri puta, za blokiranje je korišćen Protein Block tokom 1 sata na sobnoj temperaturi. Inkubacija preseka primarnim antitelima u datim koncentracijama (anti-PCNA (1:1000), anti-caspase3 (1:300), anti-Atg7 (1:300), anti - LC3 (1:300) sprovedena je tokom noći na 4°C. Kao negativna kontrola služili su preseci koji nisu tretirani primarnim antitelom. Nakon ispiranja u PBS-u tri puta, preseci su inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi sekundarnim antitelom (1:200), ispirani u PBS-u tri puta i tretirani streptavidin-peroksidazom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja PBS-om, reakcija je razvijena diaminobenzidin-H₂O₂ medijumom (DAB) (Novocastra Peroxidase Detection System, Leica, UK) a kontrastiranje preseka Majer-ovim hematoksilinom. Preseci su nakon toga montirani u DPX-u.

Protokol TUNEL imunohistohemijskog bojenja je sproveden prema preporuci proizvođača (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

3.6.1. Evaluacija imunoekspresije PCNA u oogonijama/oocitama jajnika mladunaca 0. dana

Imunoekspresija PCNA u oogonijama/oocitama jajnika mladunaca 0. dana određivana je brojanjem PCNA pozitivnih oogonija/oocita u odnosu na ukupan broj oogonija/oocita u na celom preseku jajnika. Ukupan broj oogonija/oocita je bio 200. Broj PCNA pozitivnih oogonija/oocita je izražen u procentima u odnosu na ukupan broj oogonija/oocita.

3.6.2. Evaluacija imunoekspresije PCNA kaspaza 3 i TUNEL u granuloza ćelijama jajnika mladunaca starosti 4 i 7 dana

Imunoekspresija PCNA, kaspaze 3 i TUNEL u granuloza ćelijama jajnika životinja starosti 4 i 7 dana određivana je po formuli $A \times B \times 100 / C \times D$ Moggadham-Dorafshani i sar,

(2013), gde je A-broj folikula sa pozitivnim ćelijama; B-broj pozitivnih ćelija u svakom folikulu; C-ukupan broj folikula; D-ukupan broj ćelija u svakom folikulu.

Imunoekspresija kaspaze 3 i TUNEL u oocitama primordijalnih folikula u jajnicima životinja starosti 4 i 7 dana procenjena je semikvantitativno. Jačina signala je definisana prema Fedail i sar, (2013) kao: (-) bez signala, (+) slab, (++) umeren i (+++) jak signal. Imunoekspresija PCNA utvrđena je kao ukupan broj pozitivnih odnosno negativnih oogonija i oocita i izražena kao njihov procenat po preseku celog jajnika.

3.6.3. Evaluacija autofagije

U cilju imunohistohemijske procene ekspresije Atg7 i LC3 urađena je deskriptivna histološka analiza.

Sve navedene stereološke i histološke analize su urađene na mikroskopu Olympus CX43, opremljenom odgovarajućom kamerom (Olympus Digital Camera C7070).

3.7. Western blot analiza

Količina proteina iz uzoraka jajnika je određivana po standardnom metodu Bradforda (1976). Metoda se zasniva na nespecifičnom vezivanju anjonskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazne i aromatične grupe proteina, usled čega dolazi do stvaranja kompleksa protein-boja, koji u kiseloj sredini ima maksimum apsorpcije na 595 nm. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji proteina koja se očitava sa standardne krive, konstruisane merenjem apsorbanca rastvora albumina (rastućih, poznatih koncentracija) na 595 nm. Koncentracija proteina se izražava u mg/ml.

Proteini su razdvajani po molekulskim masama natrijum-dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS) – poliakrilamidnom elektroforezom (SDS-PAGE) u BioRad mini-Protean III sistemu. Korišćeni gelovi za razdvajanje su bili različite procentnosti, zavisno od molekulske mase traženog proteina, dok su gelovi za koncentrovanje uvek bili 5% (5% akrilamid/bisakrilamid; 0.1% SDS, 0.125 M Tris, pH 6,8). Polimerizacija gelova je omogućena dodavanjem 0.05% amonijum-persulfata i 0.033% N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina (TEMED). Puffer za rezervoare se sastojao od 0.192 M glicina, 0.1% SDS i 0.025 M Tris, pH 8,3. U određenu zapreminu proteinskog rastvora dodata je ista zapremina pufera za uzorke (4% SDS,

20% glicerol, 10% β -merkaptotanol; 0.125 M Tris, pH 6,8; 0.025% brom-fenol plavo). Uzorci su pre nalivanja denaturisani kuvanjem 5 min, na 95 °C. Za sve ispitivane proteine nanošeno je 5 μ g proteina iz uzorka. Na gelove je nanošen i proteinski marker u cilju određivanja molekulskih masa (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waitharm, MA, USA). Elektroforeza je trajala 60-90 min pri konstantnom naponu od 120 V. Nakon elektroforeze, gelovi su korišćeni za Western blot.

Proteini su sa gelova preneseni na membrane (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). Membrane su aktivirane u metanolu (10 sekundi), a potom su sa gelovima pakovane i smeštane u rezervoare sa transfer puferom (0.192 M glicin, 20% metanol, 0.025 M Tris, pH 8,3). Prenos proteina sa gelova na membrane se odvijao pri konstantnom naponu od 100 V, 60 min. Uspešnost transfera je proveravana 5% Ponceau S bojom rastvorenom u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Membrane su potom obezbojavane ispiranjem u destilovanoj vodi i inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u serumu za blokiranje slobodnih mesta na membrani – 5% BSA (*engl. bovine serum albumine*) u Tris-boratnom puferu sa dodatkom deterdženta Tween 20 (TBS-T: 0.2 M Tris, 1.5 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,4) ili alternativno – 5% rastvorom obranog mleka u TBST. Nakon blokiranja membrane su inkubirane sa primarnim antitelom. Korišćena su antitela kao za imunohistohemijski metod, samo je koncentracija bila po preporuci proizvođača za Western blot. Po blokiranju, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima rastvorenim u 5% BSA, preko noći, na 4 °C. Nakon inkubacije i ispiranja viška primarnog antitela, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima dobijenim imunizacijom kože na IgG zeca, odnosno miša (*engl. goat-anti rabbit HRP*, Santa Cruz Biotechnology, Inc. i *goat-anti mouse HRP*, BD Bioscience Pharmingen), u razblaženju 1:2000 (antitelo: 5% BSA) 2 h, na sobnoj temperaturi. Po inkubaciji, membrane su ispirane TBS rastvorom, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju proteina, membrane su inkubirane u hemiluminiscentnom supstratu – luminolu, uz dodatak H₂O₂ (3 minuta). Nakon toga, rentgen filmovi (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech) su izlagani ekscitovanom luminolu sa membrana (1-3 min). Razvijani i skenirani filmovi bi bili i korišćeni za kvantifikaciju proteinskih traka.

3.8. Statistička analiza

Sve vrednosti dobijene stereološkom i morfometrijskom analizom jajnika iznad i ispod intervala poverenja (5-95%) smatrane su irelevantnim i kao takve, isključene su iz statističke obrade rezultata.

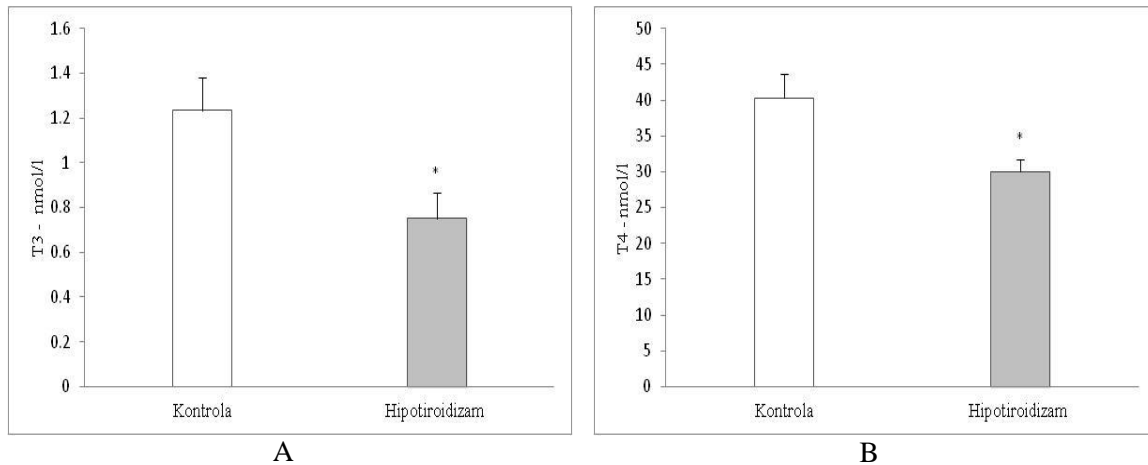
Rezultati dobijeni stereološkim, morfometrijskim i semikvantitativnim analizama prikazani su kao srednja vrednost \pm standardna greška. Statistička analiza i grafičko prikazivanje rezultata je izvedena pomoću programa Excel (Microsoft Office). Studentov t-test je korišćen za utvrđivanje razlika između grupa, sa sledećim nivoima značajnosti * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4. REZULTATI

4.1. Tiroidni status majki i mladunaca

4.1.1. Tiroidni status kontrolnih i hipotiroidnih majki

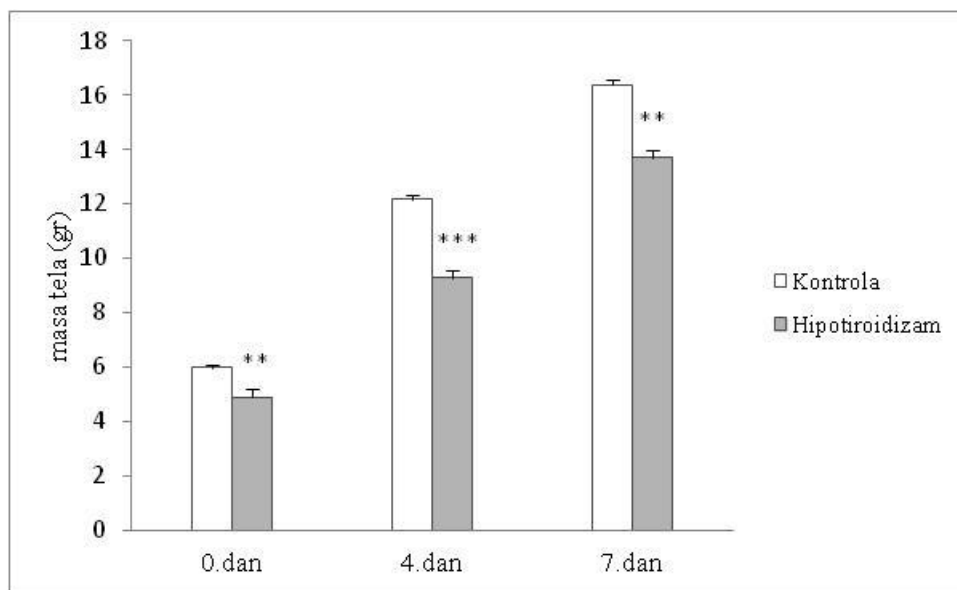
Koncentracije tiroidnih hormona kod hipotiroidnih majki su značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu. Naime, nivo T_3 u krvnoj plazmi je niži za 39,02% dok je T_4 snižen za 25,61%. (slika 10A, 10B).



Slika 10. Koncentracije T_3 (A) i T_4 (B) u krvnoj plazmi kontrolnih i hipotiroidnih majki. * $p < 0.05$

4.1.2. Masa tela mladunaca

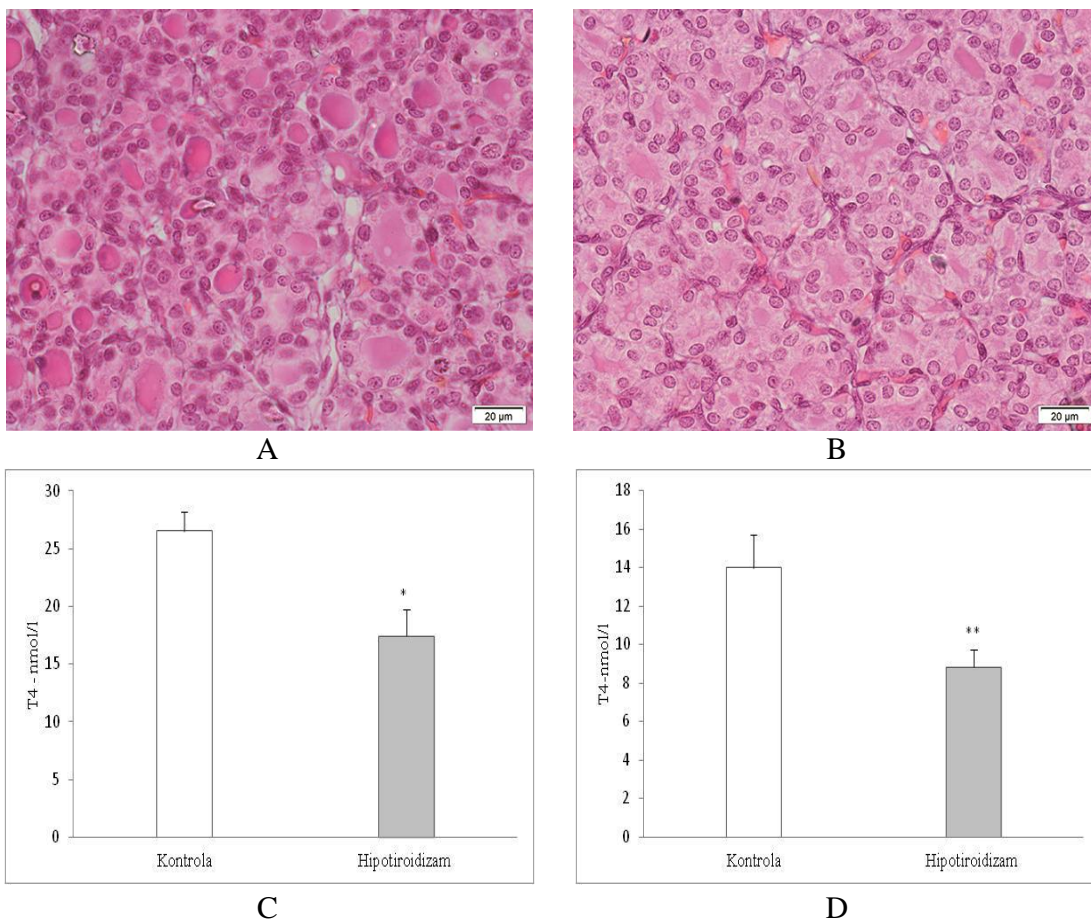
Masa tela mladunaca majki koje su u toku graviditeta i laktacije dobijale PTU i odgovarajućih kontrola je prikazana na slici 11. U sve tri uzrasne kategorije masa tela hipotiroidnih mladunaca bila je značajno niža u odnosu na kontrole, sa izrazitom značajnošću od $p < 0.001$, kada su u pitanju mladunci starosti 4 dana i nešto nižom značajnošću od $p < 0.01$ kada govorimo o mladuncima starim 0 i 7 dana. Masa tela mladunaca 0 dana starosti u slučaju hipotiroidne grupe je manja za 18,23%, dok je kod mladunaca 4. i 7. dana starosti ta vrednost iznosila 23,79% i 16,36%, respektivno (sl.11).



Slika 11. Masa tela mladunaca starosti 0, 4 i 7 dana. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.1.3. Tiroidni status mladunaca 0. dana

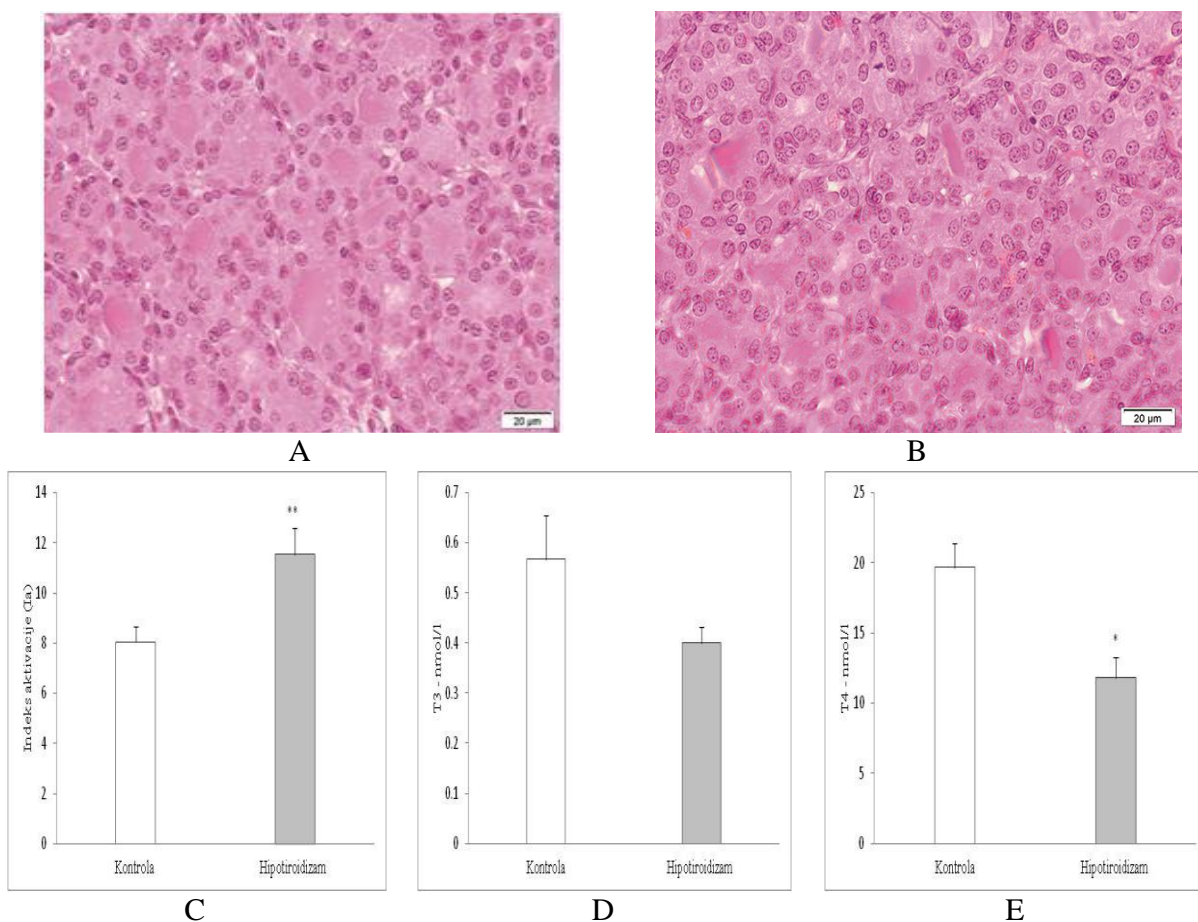
Histološka analiza štitaste žlezde mladunaca odmah posle rođenja pokazuje da su mikrofolikuli dominantni u obe eksperimentalne grupe s tim da su makrofolikuli, uglavnom locirani na periferiji žlezde, u većoj meri zastupljeni kod hipotiroidnih mladunaca. Epitel folikula u kontrolnoj grupi je kockast i cilindričan, s tim da je potonji zastupljeniji (sl. 12A). Kod hipotiroidnih mladunaca folikuli su sa cilindričnim epitelom i manjom količinom koloida u lumenutiro (sl. 12B). Vrednost indeksa aktivacije (Ia) štitaste žlezde hipotiroidnih mladunaca iznosi 10,14 i dvostruko je veća ($p < 0.01$) u odnosu na kontrolnu grupu gde je Ia 5,5 (sl. 12C). Koncentracija T_4 u krvnoj plazmi hipotiroidnih mladunaca je za 36,93% niža u odnosu na kontrolu (sl. 12D).



Slika 12. Štitasta žlezda kontrolnih (A) i hipotiroidnih (B) mladunaca 0. dana. Indeks aktivacije štitaste žlezde obe grupe mladunaca (C). Koncentracija T4 u krvnoj plazmi (D) kontrolnih i hipotiroidnih mladunaca 0. dana. H&E bojenje, bar 20 μ m. ** $p < 0.01$

4.1.4. Tiroidni status mladunaca starosti 4 dana

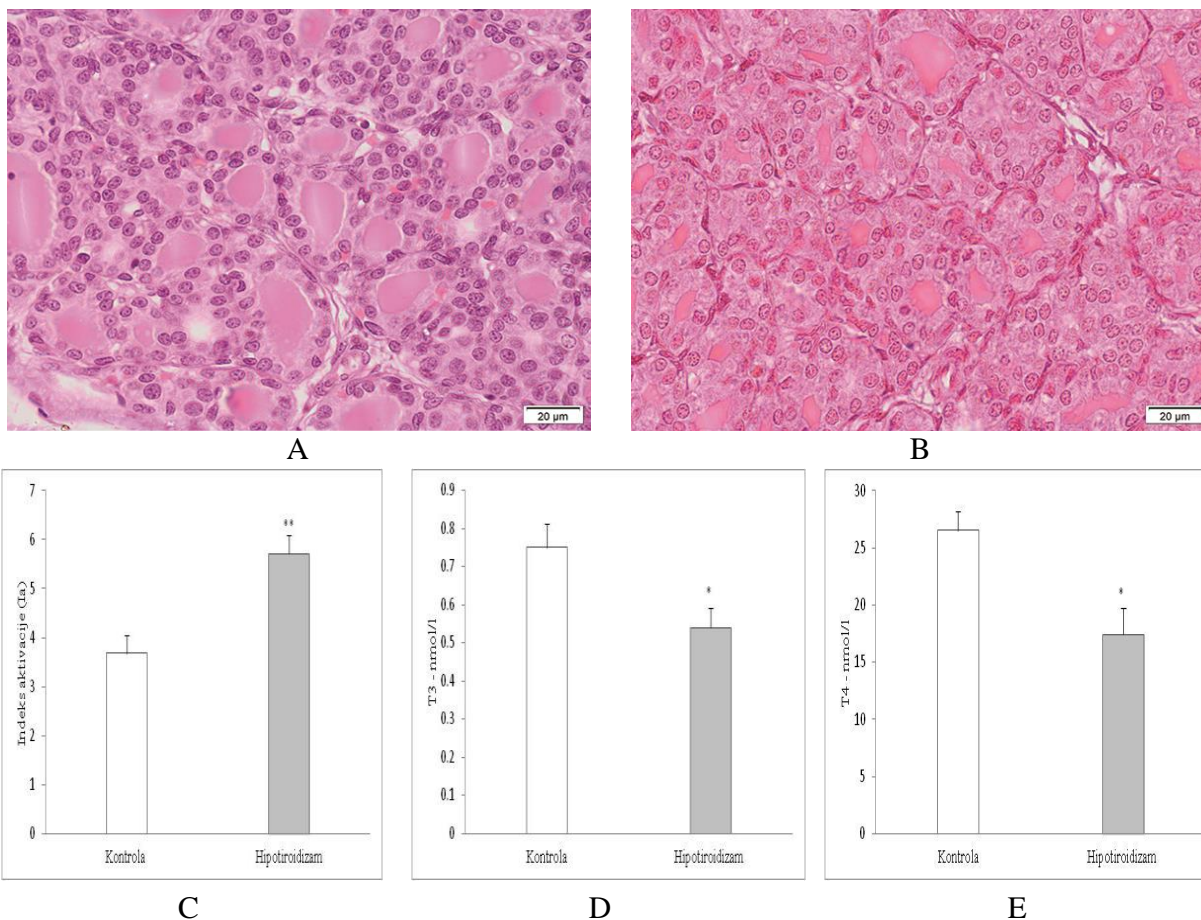
Histološka analiza štitaste žlezde pokazala je prisustvo mikro- i makrofolikula sa kockastim ili cilindričnim epitelom u kontrolnoj grupi (sl. 13A). Mikrofolikuli, sa cilindričnim epitelom i manjom količinom koloida su zastupljeni kod hipotiroidnih mladunaca. Mitotičke figure u epitelu su česte, naročito kod tretirane grupe (sl. 13B). Indeks aktivacije je za 27,96% veći ($p < 0.01$) kod hipotiroidnih mladunaca u odnosu na kontrolnu grupu (sl. 13C). Koncentracije T₃ i T₄ u krvnoj plazmi hipotiroidnih mladunaca (sl. 13D, 13E) su za 29,82% odnosno 40% niže, s tim da samo u slučaju koncentracije T₄ postoji statistički značajna razlika ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolu (sl. 13E).



Slika 13. Štitasta žlezda kontrolnih (A) i hipotiroidnih (B) mladunaca starosti 4 dana. Indeks aktivacije štitaste žlezde obe grupe mladunaca (C). Koncentracija T₃ (D) i T₄ (E) u krvnoj plazmi kontrolnih i hipotiroidnih mladunaca starosti 4 dana. H&E bojenje, bar 20 µm. *p<0.05, **p<0.01.

4.1.5. Tiroidni status mladunaca starosti 7 dana

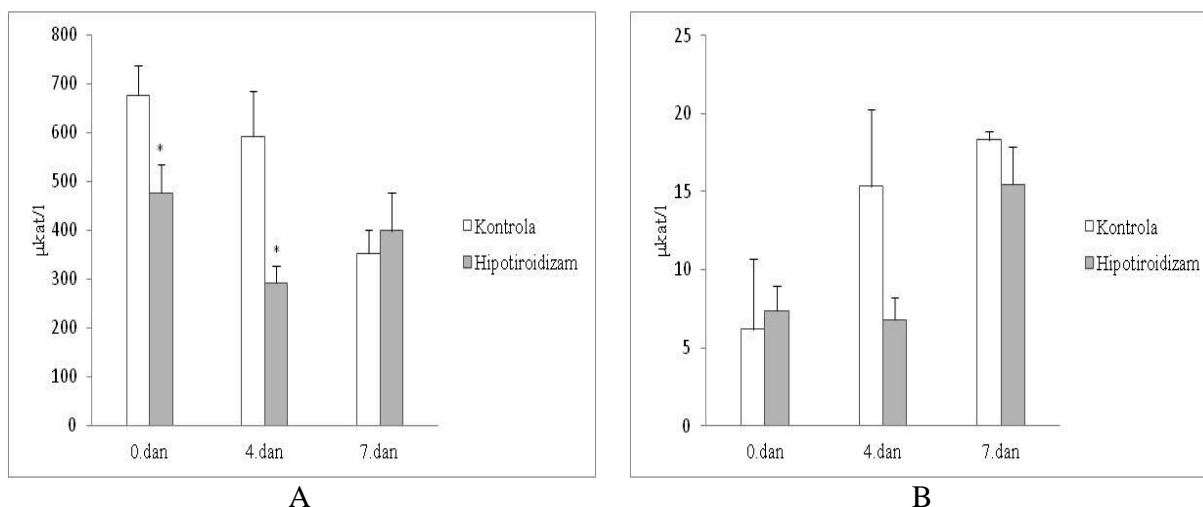
Histologija štitaste žlezde mladunaca ovog uzrasta se ne razlikuje u velikoj meri u odnosu na prethodne uzrasne kategorije. Povećan broj makrofolikula na periferiji štitaste žlezde je uočen kod mladunaca ovog uzrasta u kontrolnoj grupi u odnosu na hipotiroidnu istog uzrasta, ali i u odnosu na štitastu žlezdu kontrolne grupe mladunaca 0. i 4. dana (sl. 14A). Cilindričan epitel je uglavnom zastupljen u folikulima tretirane grupe, uz manju količinu koloida i brojne mitotske figure u odnosu na kontrolnu grupu (sl. 14B). Indeks aktivacije je 35,66% veći (p<0.01) (sl. 14C) a koncentracije T₃ i T₄ u krvnoj plazmi hipotiroidnih mladunaca su niže za 28%, odnosno 34,34% (p<0.05) u odnosu na kontrolu (sl. 14D, 14E).



Slika 14. Štitasta žlezda kontrolnih (A) i hipotiroidnih (B) mladunaca starosti 7 dana. Indeks aktivacije štitaste žlezde obe grupe mladunaca 0.dana (C). Koncentracija T3 (D) i T4 (E) u krvnoj plazmi kontrolnih i hipotiroidnih mladunaca starosti 7 dana. H&E bojenje, bar 20 µm. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.2. Enzimi antioksidativne zaštite (glutation peroksidaze tipa 1 i 3 (GPx1 i GPx3))

Aktivnost GPx1 u punoj krvi mladunaca 0. i 4. dana je značajno niža u hipotiroidnoj grupi u odnosu na kontrolnu, dok kod mladunaca starosti 7 dana je povećana, ali ne statistički značajno (sl. 15A). Kada je u pitanju aktivnost GPx3, nisu zabeležene statistički značajne razlike među mladuncima obe grupe svih uzrasnih kategorija (sl. 15B).

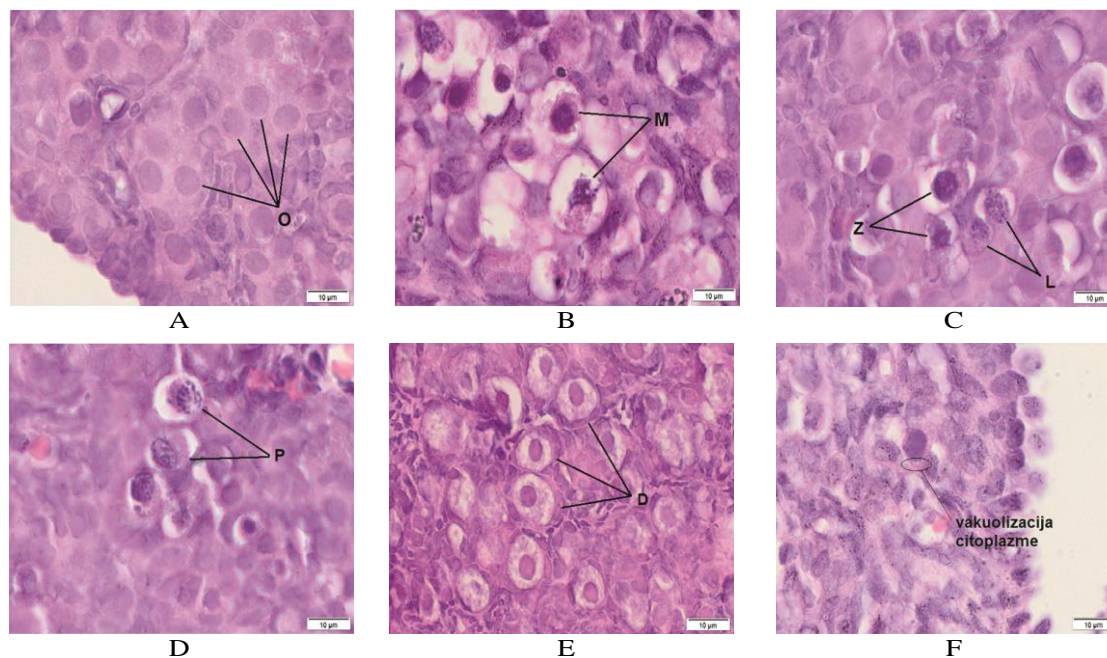


Slika 15. Aktivnost GPx1(A) i GPx3 (B) u punoj krvi i plazmi mladunaca kontrolne i tretirane grupe 0, 4. i 7. dana.
* $p < 0.05$.

4.3. Svetlosno-mikroskopska analiza jajnika mladunaca 0. dana

U jajnicima životinja ovog uzrasta definisano je sedam tipova (prema Insa i sar, 2014) oogonija i oocita čiji je broj određivan. Oogonije u interfazi (sl. 16A) su definisane kao ćelije sa jasno oivičenom citoplazmom i euhromatskim nukleusom jasnih granica. Ove ćelije su kompaktno povezane u okviru nestova. Oogonije u mitozu (sl. 16B) se odlikuju dobro uočljivim, kondenzovanim i kompaktnim hromatinom. Citoplazma je blago acidofilnija u odnosu na oogonije u interfazi, često nejasno definisanih granica ili su pak, vidljive ćerke ćelije čije su membrane još uvek delimično spojene. U jajniku mladunaca 0. dana jasno se uočavaju oocite u prve četiri podfaze mejoze I (sl.16). One u leptotenu (L) (sl.16C) se karakterišu heterogenim hromatinom, sa započetom kondenzacijom u vidu globula koje se intenzivno boje hematoksilinom. U zigotenu (Z) (sl.16C) je kondenzacija hromatina uznapredovala, sa jasno uočljivim hromozomima koji su tipično locirani lateralno unutar nukleusa. Bivalenti, sa skraćenim hromatidama, su karakteristični za pahitenu (P) (sl.16D). U oocitama u diplotenu (D) uočljiv je centralno postavljen nukleus sa bivalentima povezanim hijazmama, okružen tankim slojem citoplazme (sl.16E). Već u ovoj fazi, oocite se okružuju pločastim folikularnim ćelijama formirajući primordijalne folikule.

Morfološki izmenjenim (u daljem tekstu atipične ćelije) su označene ćelije u kojima je uočena izrazita vakuolizacija citoplazme praćena znatno acidofilnijom citoplazmom i/ili kondenzacijom nukleusa (sl.16F).



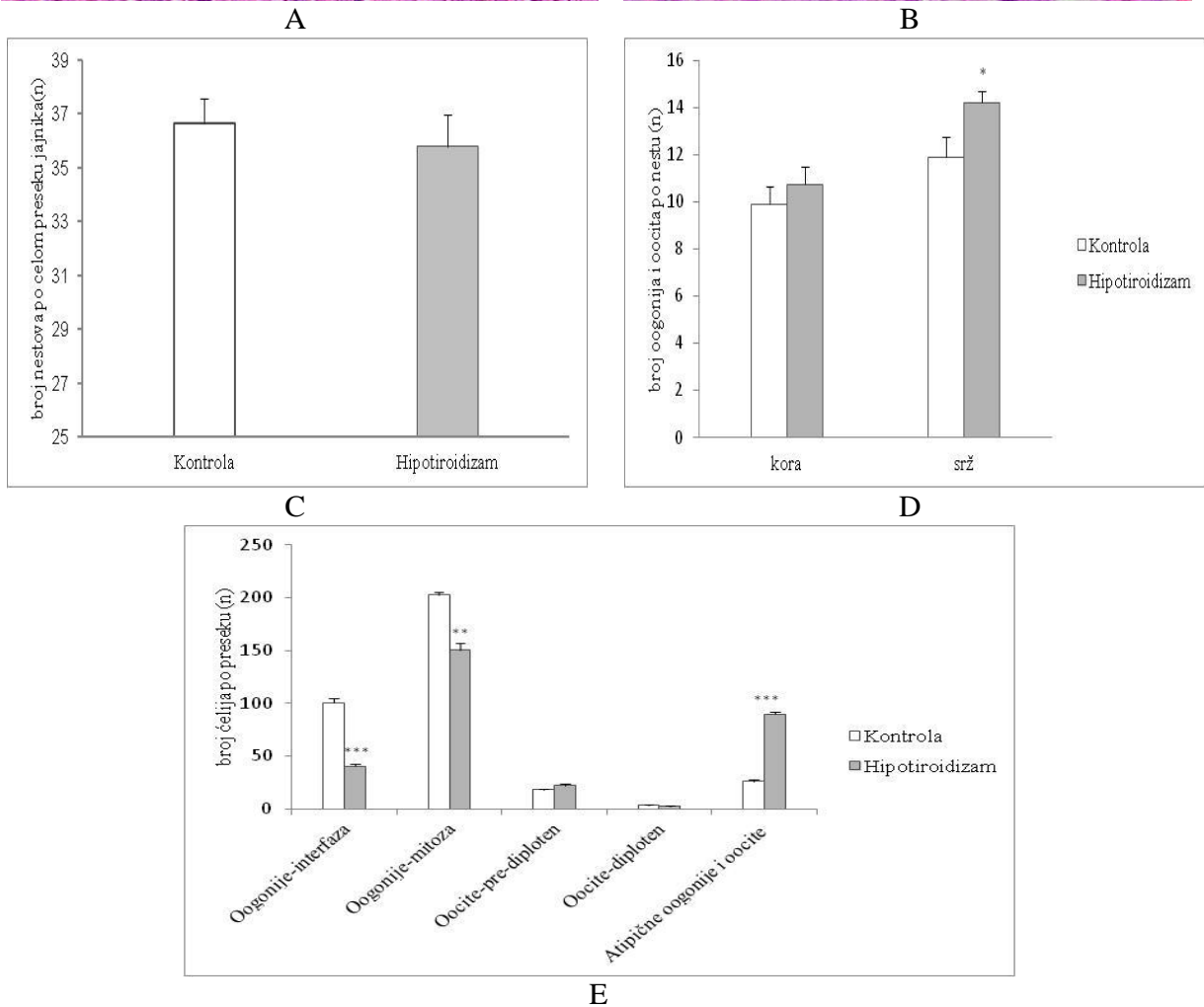
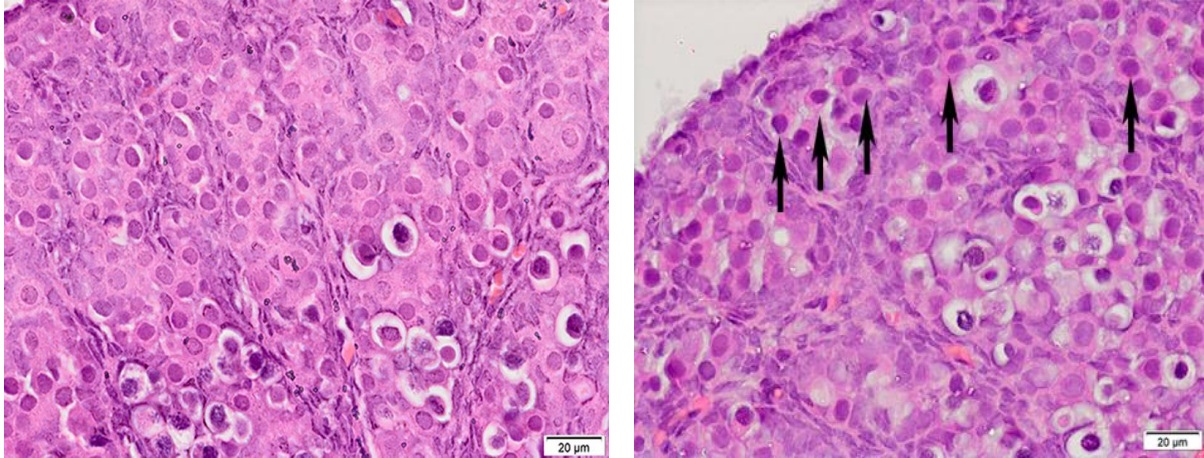
Slika 16. Tipovi ćelija u jajnicima mladunaca 0. dana. A. Oogonije u interfazi. B. Oogonije u mitozu. C, D. Oocyte u pre-diplotenu mejoze I (leptoten, zigoten i pahiten). E. Oocyte u diplotenu. F. Atipične oocyte i oogonije. H&E bojenje, bar 10 µm.

U jajnicima mladunaca 0.dana nema jasno odvojenih regiona kore i srži. U ovom uzrastu površinski epitel je pseudoslojevit, ispod koga se ne uočava sloj veziva – *tunica albuginea* (sl. 17).

Nestovi predstavljaju dominantne strukture u jajnicima ovog uzrasta, sastavljene od oogonija i oocita omeđenih stromom (sl. 17A, 17B). Ćelije strome su postavljene u nekoliko nizova (oko 3-5) i formiraju trake. Dobro razvijena vaskularna mreža je uočena između ćelija strome koje okružuju nestove. Kod obe grupe životinja, nestovi koji su lokalizovani ispod površinskog epitela nisu u potpunosti zatvoreni. U svom bazalnom i lateralnom delu su jasno omeđeni ćelijama strome ali nemaju jasnu granicu u delu koji je okrenut ka površini jajnika, već su oogonije i oocyte u direktnom kontaktu sa površinskim epitelom (sl. 17A, 17B). U njima su uglavnom zastupljene oogonije u interfazi i mitozu, dok su oocyte ređe nego kada su u pitanju nestovi u budućoj srži (sl. 17A, 17B). Mora se naglasiti i da su oocyte u nestovima budućeg kore

kontrolne grupe znatno kompaktnije međusobno vezane, dok kod tretiranih životinja nestovi deluju „rastresitije“ u smislu postojanja praznog prostora među oocitama. Kada su u pitanju nestovi u centralnom delu jajnika, oni su u potpunosti okruženi ćelijama strome i u njima su mahom zastupljene oocite u pre-diplotenu i diplotenu kod obe grupe (sl. 17A, 17B). Pojedinačne pločaste ćelije (pre-granuloza) koje se priljubljuju uz mali broj oocita u diplotenu (1-3 po preseku) uočavaju se kod obe grupe (sl. 17A, 17B). Iako se manji broj nestova uočava kod hipotiroidnih mladunaca (sl. 17C) njihov ukupan broj u budućoj srži je veći u odnosu na koru kod obe grupe (sl. 17D). Takođe, kod hipotiroidnih jedinki uočen je i veći broj oogonija i oocita u nestovima oba regiona (sl. 17D), što je statistički značajno u slučaju buduće srži ($p < 0.05$). Kod hipotiroidnih životinja je prosečan broj oogonija u interfazi i mitozu značajno manji u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$ i $p < 0.01$) (sl. 17E) dok je broj oocita u leptotenu, zigotenu i pahitenu nešto veći (sl. 17E). Broj atipičnih ćelija je značajno veći u tretmanu ($p < 0.001$) (sl. 17E).

Hipotiroidizam povećava broj morfološki izmenjenih (atipičnih) oogonija i oocita.



Slika 17. Jajnici mladunaca 0. dana kontrolne (A) i hipotiroidne (B) grupe (strelice pokazuju oogonije/oocite sa acidofilnim citoplazmama). H&E bojenje, bar 20 μ m. Prosečan broj nestova u jajniku kod kontrolnih i hipotiroidnih mladunaca 0. dana (C). Prosečan broj oogonija i oocita po nestu u budućoj kori i srži jajnika kod kontrolnih i hipotiroidnih mladunaca 0. dana (D). Prosečan broj različitih tipova ćelija (oogonija i oocita) po preseku u jajnicima kontrolnih i hipotiroidnih mladunaca 0. dana. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.4. Ultrastruktura jajnika mladunaca 0. dana

Ultrastrukturalna analiza pokazala je da su nestovi kontrolne grupe kompaktni (sl. 13A) sadominantno zastupljenim oogonijama/oocitama normalne morfologije. U jajnicima hipotiroidne grupe prisutni su nestovi „rastresitijeg“ izgleda (sl. 18B, 18H) sa povećanim brojem atipičnih oogonija/oocita. Osmiofilne granule se uočavaju u citoplazmi oogonija i oocita, kao i ćelijama strome u jajnicima obe grupe životinja (sl. 18B, 18F).

U nestovima jajnika obe grupe mladunaca uočena su 4 tipa atipičnih ćelija.

1. Z-ćelije (degenerisane oocite u pahitenu, morfologija ovog tipa ćelija definisana prema Baker i Franchi, 1967) – ove ćelije karakteriše nekompletnost ćelijske membrane i delimično očuvan kontinuitet nukleusnog ovoja. Hromatin je organizovan u grupice, uglavnom duž nukleusnog ovoja, a sporadično i oko sinaptonemskog kompleksa. Masa pahuljastog materijala se uočava i u nukleusu i citoplazmi. Zapaža se intenzivna vakuolizacija citoplazme sa brojnim vezikulama uspostavljenim jednom ili sa dve membrane, koje su u potpunosti ili delimično zatvorene. Brojna su multilamelarna i multivezikularna tela u citoplazmi. Mitohondrije se karakterišu znatno smanjenim brojem kristi i centralno prosvetljenim matriksom. Glatki endoplazmin retikulum je proširen, nepravilnog oblika. Goldži kompleks nije uočen (sl. 138, 18F).

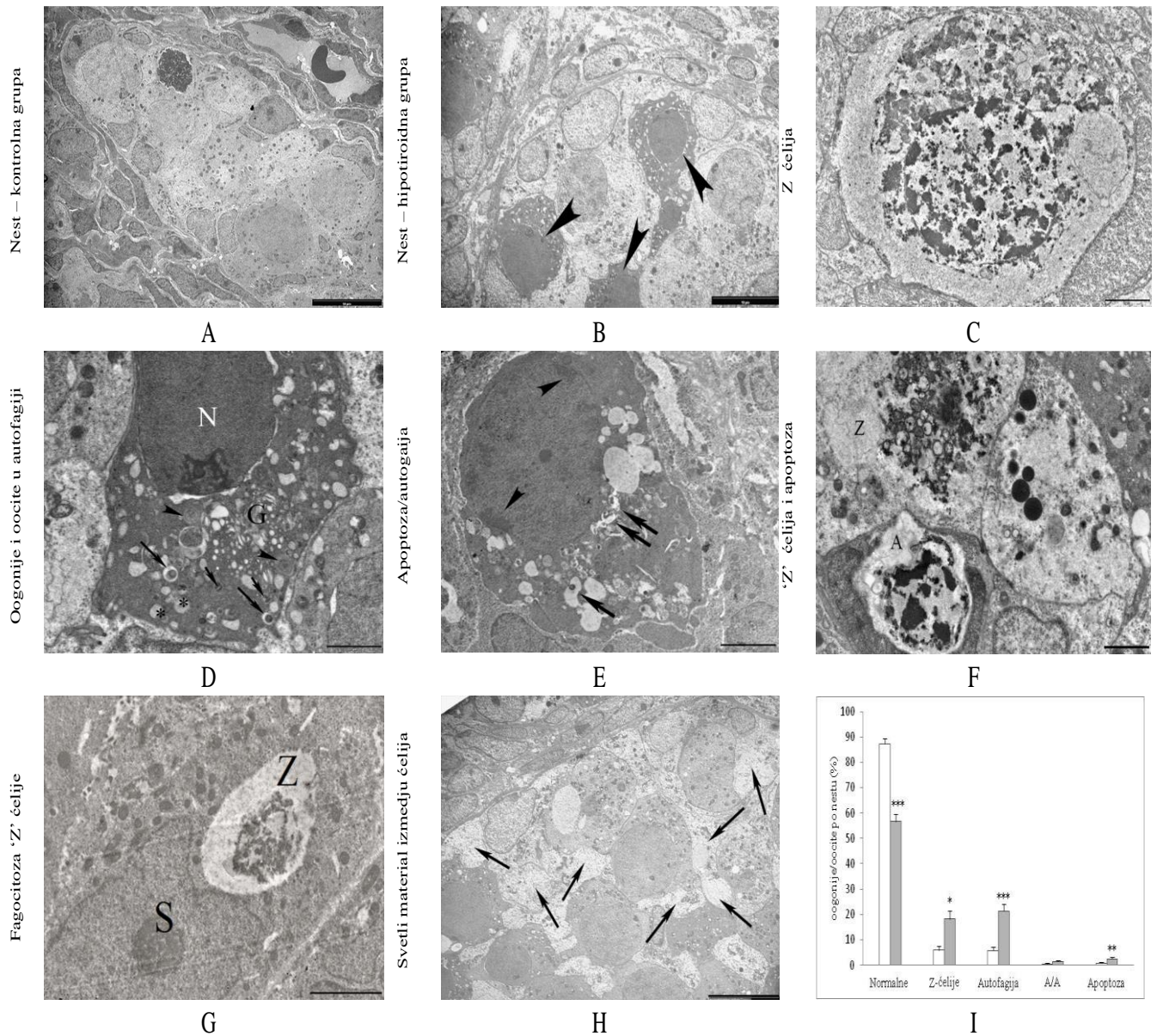
2. Oogonije i oocite u autofagiji – kondenzacija nukleusa nije uočena, dok je kontinuitet ćelijske membrane očuvan. Brojni su autofagni profili u citoplazmi, u različitim fazama diferencijacije: inicijalna (formiranje autofagozoma), prelazna (multivezikularna tela) i završna faza (prozirne vezikule). Multilamelarna tela u većem broju su prisutna u citoplazmi (sl. 18D).

3. Oogonije i oocite koje podležu kombinovanoj apoptozi i autofagiji – ove ćelije se karakterišu kondenzacijom hromatina u nukleusu (hiperhromatizam) kao i obrazovanjem izvratna membrane u vidu mehurova (pupljenje membrane) karakteristične za apoptozu. Uočena je i izražena vakuolizacija citoplazme što predstavlja osnovnu karakteristiku autofagije (sl. 18E).

4. Oogonije i oocite u apoptozi – uočene su ćelije sa ranim znacima apoptoze, tipičnom intenzivnom kondenzacijom hromatina i evaginacijom plazmine membrane (sl. 18F).

U jajnicima obe grupe životinja uočena je fagocitoza atipičnih oogonija i oocita od strane somatskih ćelija (sl. 18G). U većini nestova u jajnicima hipotiroidnih životinja, oogonije i oocite su delimično ili u potpunosti odvojene nedefinisanim svetlim strukturama sa materijalom koji podseća na onaj u unutrašnjosti autofagolizozoma u kasnim fazama (sl. 18H).

Zastupljenost različitih tipova germinativnih ćelija je sledeća: oogonije i oocite normalne morfologije su najzastupljenije u jajnicima obe grupe životinja; među atipičnim ćelijama, u kontrolnoj grupi su najbrojnije Z-ćelije dok najveći broj oogonija i oocita u hipotiroidnoj grupi umire autofagnom ćelijskom smrću; oogonije i oocite u apoptozi su najmanje zastupljene kod obe grupe mladunaca (sl. 18I).



Slika 18. Nest u jajniku mladunaca 0. dana kontrolne (A) i hipotiroidne grupe (B); vrhovi strelice označavaju atipične ćelije. C. 'Z' ćelija. D. Oogonija ili oocita u autofagiji, N-nukleus, G-Goldži kompleks, multilamelarna tela (vrh strelice), autofagni profili (duge strelice – autofagozomi, kratke strelice – multivezikularna tela, zvezdice –

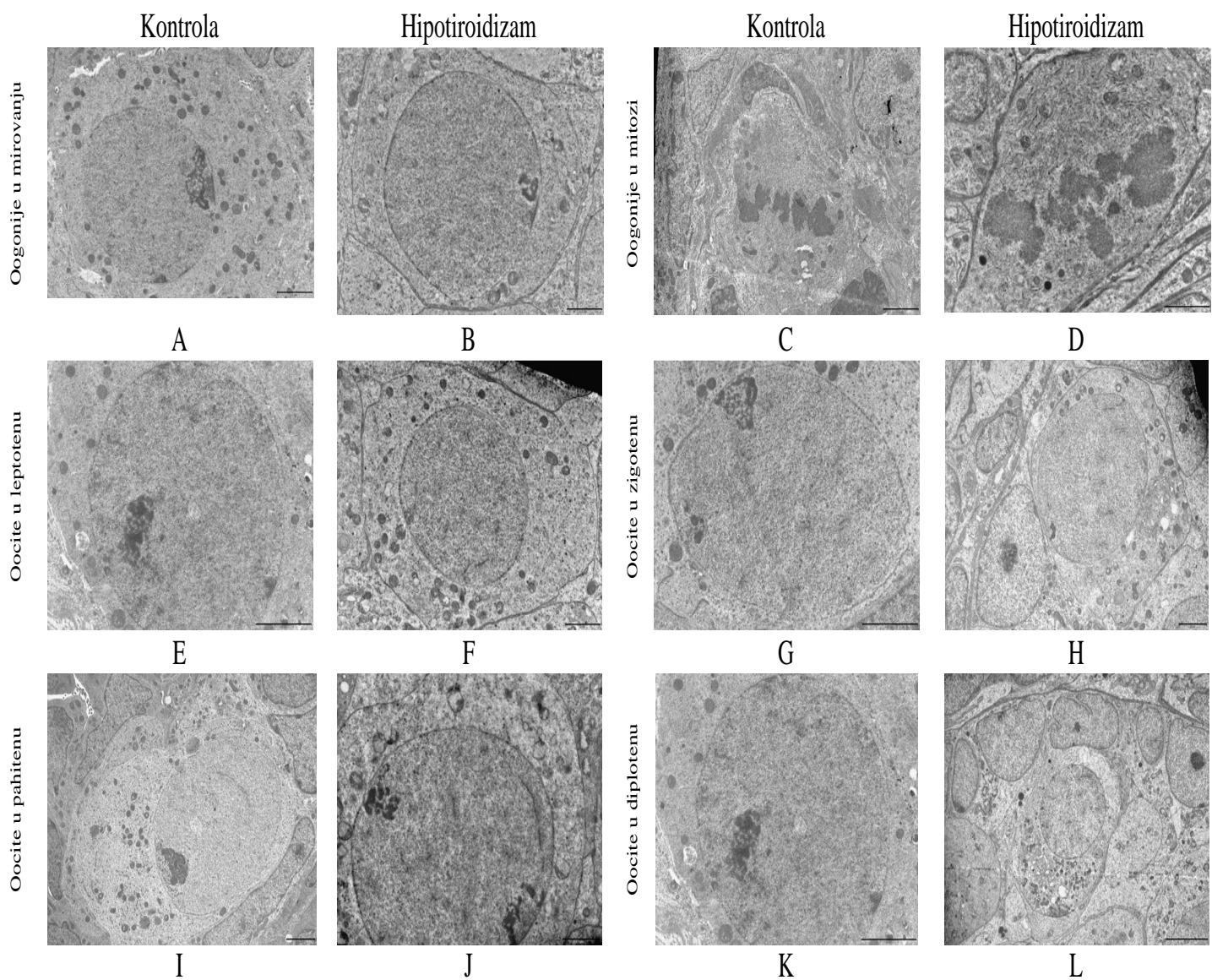
prozirne vezikule). E. Oogonije ili oocite koje podležu kombinovanoj apoptozi i autofagiji. Jasno se uočava smanjenje i kondenzacija nukleusa (vrhovi strelica), invaginacije ćelijske membrane i izrazita vakuolizacija citoplazme, sa brojnim autofagozomima (strelice) i vezikulama različite veličine. F. 'Z' ćelija (Z) i apoptotična oogonija ili oocita (A). G. Z-ćelija (Z) fagocitovana od strane somatske ćelije (S). H. Svetli materijal između oogonija i oocita u nestu jajnika hipotiroidnih mladunaca (strelice). I. Procentualna zastupljenost različitih tipova oogonija i oocita u jajnicima kontrolne i hipotiroidne grupe. A/A-kombinovana apoptoza i autofagija. Bar: 10 μm za A, B i I, 2 μm za C, D, E, F, G.

Iako je uobičajeno da se faza diferencijacije oogonije/oocite određuje na osnovu morfologije nukleusa, ultrastrukturalna analiza jajnika mladunaca 0. dana pokazala je da postoji neusaglašenost u morfologiji nukleusa i citoplazme germinativnih ćelija (sl. 19, tabela 1). Naime, citoplazma ćelija u ranim fazama diferencijacije odgovara onima u kasnijim stadijumima mejoze, pahitenu i diplotenu (sl. 19, tabela 1). Zigoten veoma kratko traje pa se stoga veoma često uočava istovremeno prisustvo hromozoma sa sinaptonemskim kompleksima i nesparenih hromozoma. Interesantno je da se u nukleusima hipotiroidne grupe u pahitenu sporadično pojavljuju nespareni hromozomi. Uporedni pregled tipova germinativnih ćelija ukazuje da je najistaknutija razlika u brojnosti organela u citoplazmi i u odnosu nukleusa i citoplazme kod hipotiroidne grupe (sl. 19, tabela 1). Hipotiroidizam dovodi do akumuliranja organela u citoplazmi što ukazuje na ubrzanu maturaciju.

Tabela 1. Uporedni prikaz ultrastrukture različitih tipova oogonija i oocita.

Tip ćelije	Zajedničke karakteristike germinativnih ćelija	Kontrolna grupa – karakteristike germinativnih ćelija	Hipotiroidna grupa – karakteristike germinativnih ćelija
Oogonije u mirovanju	Očuvan kontinuitet ćelijske membrane i nukleoleme; Nukleus – ekcentrično postavljen, ispunjen granularnim matriksom; Nukleolus – jedan ili dva – oblika nepravilne mreže; Goldži kompleks – jukstanuklearno postavljen, sastavljen od pljosnatih cisterni	Mitohondrije – velike, ovalnog ili okruglog oblika, retko izdužene, sa paralelno postavljenim kristama; sER – nije proširen;	Mitohondrije – uglavnom sa kratkim kristama i centralno prosvetljenim matriksom; sER-brojniji, blago proširen; nekoliko <i>lamellae annulatae</i>
Oogonije u mitozu	Bez uočljive jedrove membrane u metafazi; Mase homogenog hromatina – hromozomi, sa vidljivim nitima deobnog vretena	Mitohondrije – velike, ovalnog ili okruglog oblika, retko izdužene, sa paralelno postavljenim kristama; sER – nije proširen;	Mitohondrije – uglavnom sa kratkim kristama i centralnom svetlom površinom; sER - blago proširen
Oocite u leptotenu	Hromozomi oblika pojedinačnih traka, rasuti po nukleusu, često u kontaktu sa unutrašnjom membranom nukleusa; Nukleusne pore - prominentne; Nukleolema – blago nepravilnog oblika; Nukleolus – jedan ili dva – oblika nepravilne mreže;	Mitohondrije – velike, ovalnog ili okruglog oblika, retko izdužene, sa paralelno postavljenim kristama; sER i Goldži kompleks – prominentniji u odnosu na prethodne tipove germinativnih ćelija; Multivezikularna tela u citoplazmi	Mitohondrije – uglavnom sa kratkim kristama i centralnom svetlom površinom; Goldži kompleks – prominentniji u odnosu na prethodne tipove germinativnih ćelija; sER – prošireniji u odnosu na prethodne tipove germinativnih ćelija; Multivezikularna tela – veći broj u citoplazmi
Oocite u zigotenu	Nukleoplazma – hromozomi sparni u vidu paralelno postavljenih traka; retki nesparni hromozomi *; Nucleolus – jedan ili dva – oblika nepravilne mreže; sER i Goldži kompleks – slični kao kod oocita u leptotenu	Mitohondrije – velike, ovalnog ili okruglog oblika, retko izdužene, sa paralelno postavljenim kristama; Multivezikularna i multitalmelarna tela u citoplazmi; Nukleusne pore - prominentne	Mitohondrije – uglavnom sa kratkim kristama i centralnom svetlom površinom; Brojna multivezikularna i multitalmelarna tela u citoplazmi; Nukleusne pore – prominentnije od onih zabeleženih kod oocita u leptotenu
Oocite u pahitenu	Hromozomi u vidu tzv. trostrukih traka (eng. tripartite ribbons) – paralelno orijentisani hromozomi sa tankom trakom između njih (sinaptonemalni kompleksi); Nukleusne pore - prominentne; Nukleolus – jedan ili dva – oblika nepravilne mreže	Mitohondrije – slične morfologije kao u prethodno navedenim tipovima ćelija ali su brojnije i smeštene u okolini nukleusa; sER - prominentan Goldži kompleks – kompleksniji sa vidljivo uvećanim vezikulama; Multivezikularna i multitalmelarna tela u citoplazmi	Mitohondrije – oštećene, sa značajno redukovanim kristama, brojnije i smeštene u okolini nukleusa ; sER – sa velikim brojem krupnih vezikula; Goldži kompleks – kompleksniji sa vidljivo uvećanim vezikulama; Brojna multivezikularna i multitalmelarna tela u citoplazmi; Sporadični uparni hromozomi, slični onima opisanim u zigotenu, sa ponekim nesparnim hromozomom u nukleoplazmi
Oocite u diplotenu	Nucleus – sličan onom koji je opisan u leptotenu, pojedinačni hromozomi razbacani po nukleoleoplazmi, neki od njih priljubljeni za nukleolemu	Mitohondrije, sER, Goldži kompleks – morfološki odgovaraju onima koji su opisani u pahitenu	Mitohondrije – slične onima u pahitenu sER and Goldži kompleks – veoma prominentni; Multivezikularna tela - brojna

*Ova podfaza profaze I mejoze veoma kratko traje pa je stoga veoma često uočeno istovremeno prisustvo hromozoma sa sinaptonemskim kompleksima i nesparnih hromozoma.

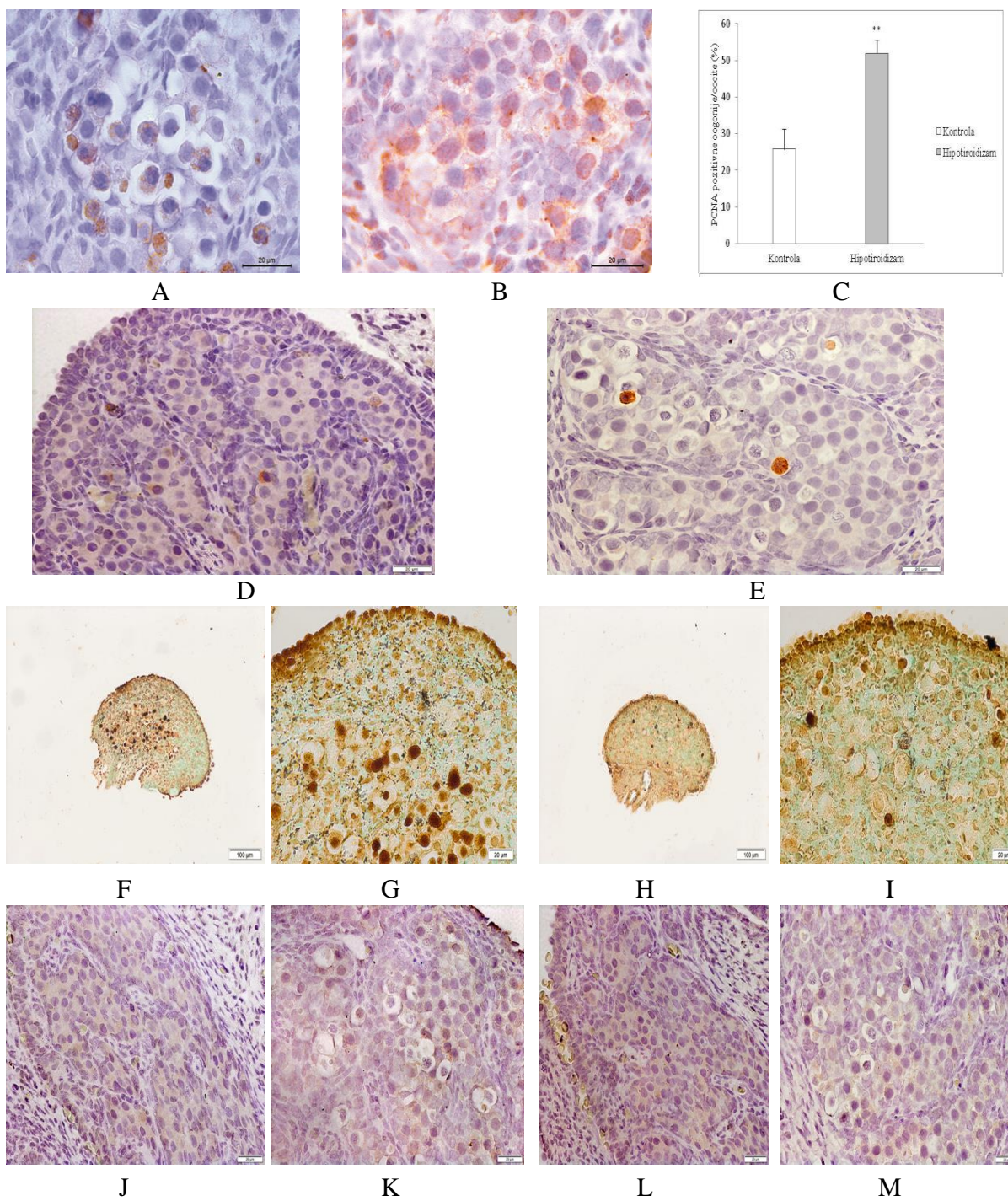


Slika 19. Usporedni prikaz ultrastrukture različitih tipova oogonija i oocita. Oogonije u mirovanju kontrolne (A) i hipotiroidne (B) grupe. Oogonije u mitozu kontrolne (C) i hipotiroidne (D) grupe. Oocite u leptotenu kontrolne (E) i hipotiroidne (F) grupe. Oocite u zigotenu kontrolne (G) i hipotiroidne (H) grupe. Oocite u pahitenu kontrolne (I) i hipotiroidne (J) grupe. Oocite u diplotenu kontrolne (K) i hipotiroidne (L) grupe. Bar 2 μ m.

4.5. Imunohistohemija jajnika mladunaca 0. dana

Imunopozitivnost na PCNA, kaspazu 3 i TUNEL zapaža se u nukleusu i perinukleusnom regionu, dok se imunopozitivnost na ATG7 i LC3 uočava u citoplazmi oogonija i oocita (sl. 20). PCNA pozitivan signal u jajnicima ženki obe grupe 0. dana je veoma izražen u površinskom epitelu, kao i u oogonijama i oocitama, dok su ćelije strome negativne (sl. 20A, 20B). Procenat PCNA pozitivnih oogonija i oocita je dvostruko veći ($p < 0.01$) u jajnicima hipotiroidne grupe (sl. 20C). Kaspaza 3 u jajnicima ovog uzrasta je podjednako eksprimirana kod obe grupe, u svega nekoliko ćelija po preseku (sl. 20D, 20E). Imunoekspresija TUNEL je uočljiva u oogonijama i oocitama u regionu buduće srži kod kontrolnih životinja, dok su pozitivne ćelije retke u budućoj kori (sl. 20F, 20G). Kod tretiranih životinja broj pozitivnih ćelija je znatno manji i one retke pozitivne germinativne ćelije nasumično su raspoređene po celom jajniku (sl. 20H, 20I). U obe grupe, većina ćelija površinskog epitela su TUNEL pozitivne kao i manji broj stromalnih ćelija (sl. 20F-I). Razlika u nivou ekspresije ATG7 i LC3 nije uočena (sl. 20J-M). Ćelije površinskog epitela su delimično pozitivne dok je u slučaju strome signal registrovan kod manjeg broja ćelija (sl. 20J-M).

Imunoekspresija TUNEL je znatno manja kod hipotiroidne grupe mladunaca dok su ekspresija kaspaze 3, ATG7 i LC3 slične u obe grupe.

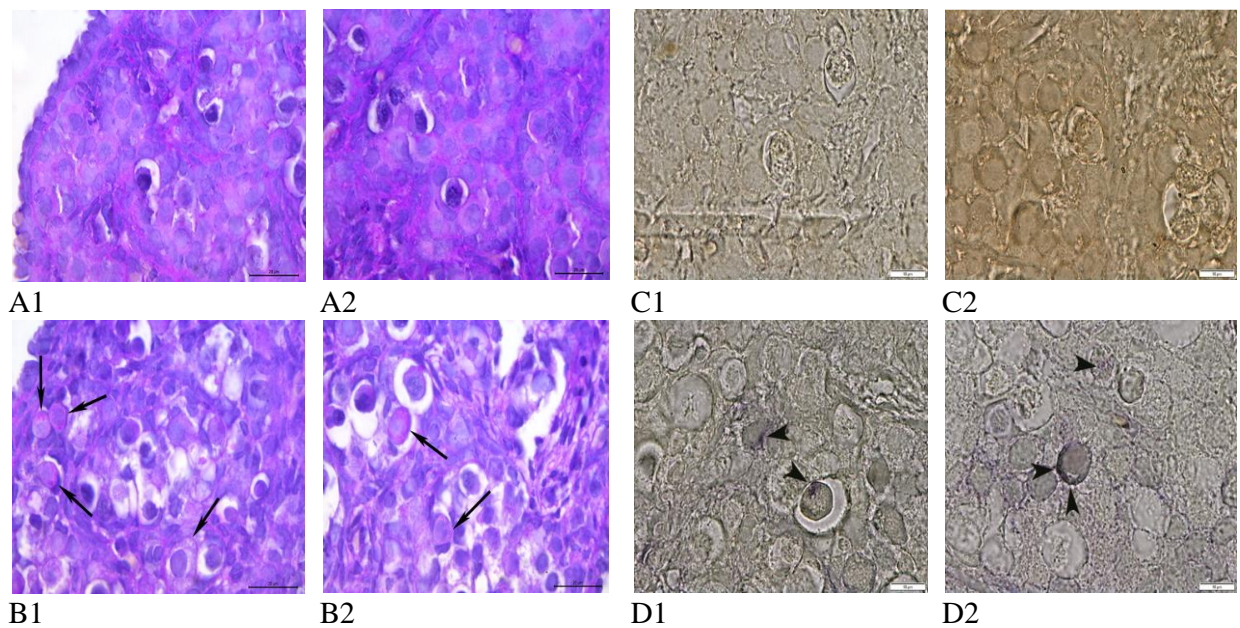


Slika 20. Imunoekspresija PCNA u jajniku mladunaca 0. dana kontrolne (A) i hipotiroidne (B) grupe. Broj PCNA pozitivnih oogonija i oocita u jajnicima kontrolne i hipotiroidne grupe mladunaca (C). Imunoekspresija kaspaze 3 u jajniku mladunaca 0. dana kontrolne (D) i hipotiroidne (E) grupe. Imunoekspresija TUNEL u jajniku mladunaca 0. dana kontrolne (F, G) i hipotiroidne (H, I) grupe. Imunoekspresija ATG7 u jajniku mladunaca 0. dana kontrolne (J) i hipotiroidne (K) grupe. Imunoekspresija LC3 u jajniku mladunaca 0. dana kontrolne (L) i hipotiroidne (M) grupe.

Bar: 20 μ m za sve osim za F i H, 100 μ m. * p <0.05

4.6. Histochemija PAS i alkalna fosfataza jajnika mladunaca 0. dana

Slab intenzitet PAS pozitivnosti citoplazme svih tipova oogonija i oocita u jajnicima uočen je u obe grupe (sl. 21A1-B2). Intenzivna PAS pozitivnost je primetna u obliku granula u citoplazmi atipičnih oogonija i oocita, kako u budućoj kori tako i u srži jajnika hipotiroidne grupe mladunaca (sl. 21B1, 21B2). Jajnici kontrolne grupe su negativni na alkalnu fosfatazu (sl. 21C1, 21C2) dok su u budućoj srži jajnika hipotiroidne grupe uočene oogonije/oocite sa pozitivnom citoplazmom (sl. 21D1, 21D2). Hipotiroidizam pojačava PAS signal u atipičnim oogonijama i oocitama i indukuje aktivnost alkalne fosfataze.



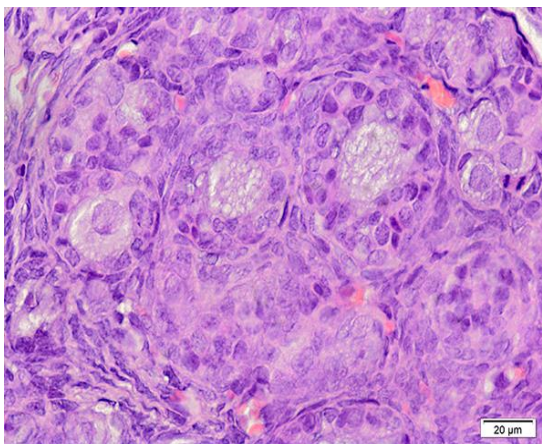
Slika 21. PAS bojenje u budućoj kori (A1) i srži (A2) jajnika kontrolne grupe mladunaca 0. dana. PAS bojenje u budućoj kori (B1) i srži (B2) jajnika hipotiroidne grupe mladunaca 0. dana. Oogonije i oocite sa brojnim PAS pozitivnim granulama u citoplazmi u jajnicima hipotiroidne grupe mladunaca (strelice). Bar: 20 μ m. Bojenje na alkalnu fosfatazu u budućoj srži jajnika kontrolne (C1, C2) i hipotiroidne (D1, D2) grupe. Citoplazma oogonija i oocita u jajnicima hipotiroidne grupe označena je vrhovima strelica. Bar: 10 μ m.

4.7. Svetlosno-mikroskopska analiza jajnika mladunaca 4. i 7. dana

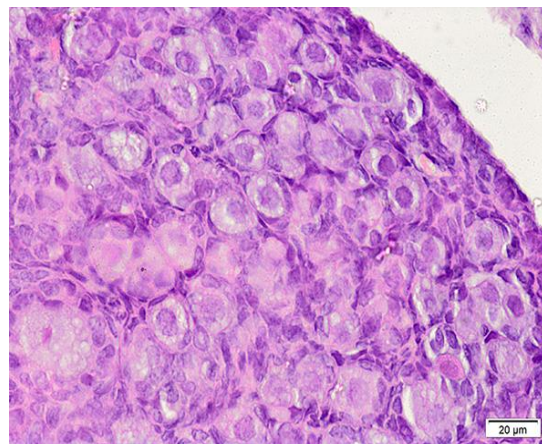
Histološka analiza jajnika mladunaca starosti 4. i 7. dana kontrolne i tretirane grupe je pokazala da ne postoje jasne granice između regiona buduće kore i srži, tipične za adultne jedinke, tako da su folikuli distribuirani po celom jajniku (sl. 22A-F). Ispod jednoslojnog

površinskog epitela jajnika mladunaca obe grupe starosti 4. dana prisutan je slabo razvijen sloj veziva – *tunica albuginea*. Ispod ovog sloja veziva kod mladunaca starih 4 dana, lokalizovani su klasteri oogonija u interfazi i mitozu i oocita u početnim fazama mejoze (pre-diploten) koji okruženi ćelijama sličnim fibroblastima formiraju nestove. Obrazac rasporeda različitih tipova folikula je takođe specifičan za svaku od ispitivanih grupa. Naime, kod jajnika kontrolne grupe mladunaca starih 4 dana, u regionu buduće kore uglavnom su zastupljeni nestovi za razliku od tretirane, gde dominiraju primordijalni folikuli (sl. 22A, 22B). U budućoj srži jajnika sekundarni folikuli predstavljaju dominantne strukture u jajnicima kontrole, dok su kod tretirane grupe u tom regionu zastupljeni uglavnom primarni folikuli (sl. 22A, 22B). Preantralni folikuli nisu registrovani u jajnicima životinja ovog uzrasta.

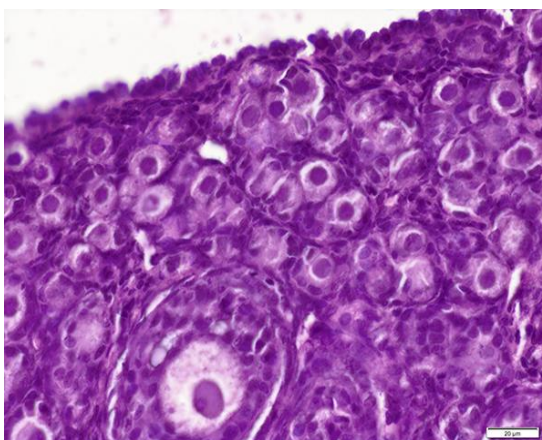
U jajnicima životinja 7. dana, sloj veziva – *tunica albuginea* koji je nešto bolje razvijen nego 4. dana još uvek je nekompletan. Takođe, ne uočavaju se nestovi sa oogonijama u interfazi i mitozu ili oocitama u prediplotenu, već su prisutni primordijalni, primarni, sekundarni i preantralni folikuli (sl. 22C-F). U morfološkom smislu, kod tretiranih životinja 7. dana su u citoplazmi nekih oocita svih tipova folikula, uočljive sitnije ili krupnije vakuole (sl. 22E, 22F). One su bez sadržaja i uglavnom zastupljene u citoplazmi primordijalnih i preantralnih folikula (sl. 22E, 22F). Kod obe grupe životinja ovog uzrasta oko sekundarnih i preantralnih folikula formiran je i sloj teke, koja je kod većine dvoslojna, iako je oko nekih sekundarnih folikula jednoslojna (sl. 22C-F). Interesantno je da kod obe grupe životinja 7. dana, počinje formiranje preantralnih folikula pojavom šupljina kod pojedinih sekundarnih folikula sa svega 3-5 slojeva granuloza ćelija (sl. 22C-F). Dobro razvijeno vezivo u stromi kao i intenzivna vaskularizacija uočljivi su kod jajnika mladunaca u ovom uzrastu (sl. 22C-F).



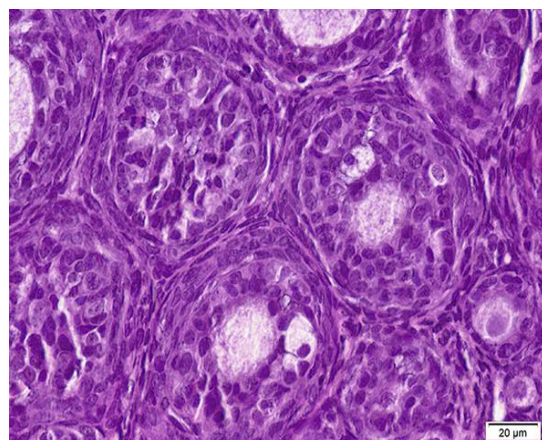
A



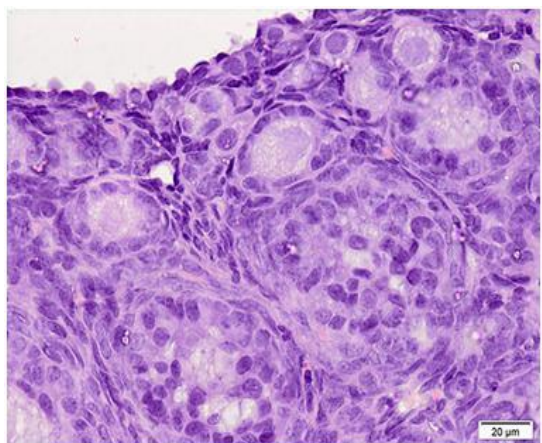
B



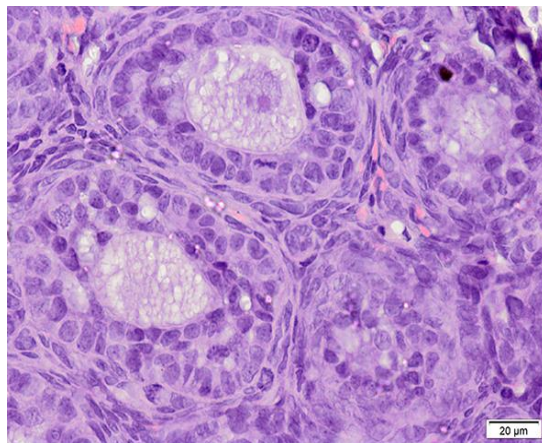
C



D



E



F

Slika 22. Presek jajnika mladunca kontrolne (A) i hipotiroidne grupe pacova (B) starosti 4 dana. Presek jajnika kontrolne grupe starosti 7 dana u regionu buduće kore (C) i srži (E). Presek kroz jajnike hipotiroidnih mladunaca starosti 7 dana u regionu buduće kore (D) i srži (F). H&E bojenje. Bar: 20 µm.

Morfometrijska analiza jajnika mladunaca 4. i 7. dana obe grupe uporedno je prikazana u tabeli 2. Broj nestova je kod hipotiroidnih pacova starih 4 dana značajno manji u odnosu na odgovarajuću kontrolu ($p < 0.01$). Prosečan broj oogonija i oocita po nestu je takođe manji u jajnicima tretiranih mladunaca ($p < 0.05$). Između grupa uočene su značajne razlike u broju pojedinačnih tipova ćelija u okviru nista. Naime, broj oogonija u interfazi i mitozu je znatno manji u jajnicima hipotiroidnih mladunaca ($p < 0.001$ i $p < 0.01$) dok je broj oocita u pre-diplotenu značajno povećan ($p < 0.01$). U budućoj kori jajnika pacova starosti 4 dana uočeni su brojni primordijalni folikuli kod obe grupe, ali je taj broj jako povećan u jajnicima tretiranih jedinki ($p < 0.001$). U budućoj srži jajnika obe grupe, prisutni su primarni i sekundarni folikuli, ali je njihov broj značajno manji u hipotiroidnoj grupi ($p < 0.05$).

U jajnicima mladunaca starosti 7 dana, u budućoj srži kod obe grupe su dominantni sekundarni i preantralni, dok se u budućoj kori mogu uočiti primarni i primordijalni folikuli. Broj primarnih i preantralnih folikula je manji kod tretiranih mladunaca ($p < 0.05$). Uporedna analiza je pokazala značajno manji broj primordijalnih ($p < 0.001$), a veći broj sekundarnih folikula ($p < 0.01$) u jajnicima hipotiroidnih mladunaca starih 7 dana u odnosu na tretiranu grupu 4. dana. U jajnicima kontrolnih životinja 7. dana uočen je veći broj primordijalnih folikula ($p < 0.001$) i manji broj primarnih folikula ($p < 0.001$) u odnosu na kontrolnu grupu mladunaca 4. dana.

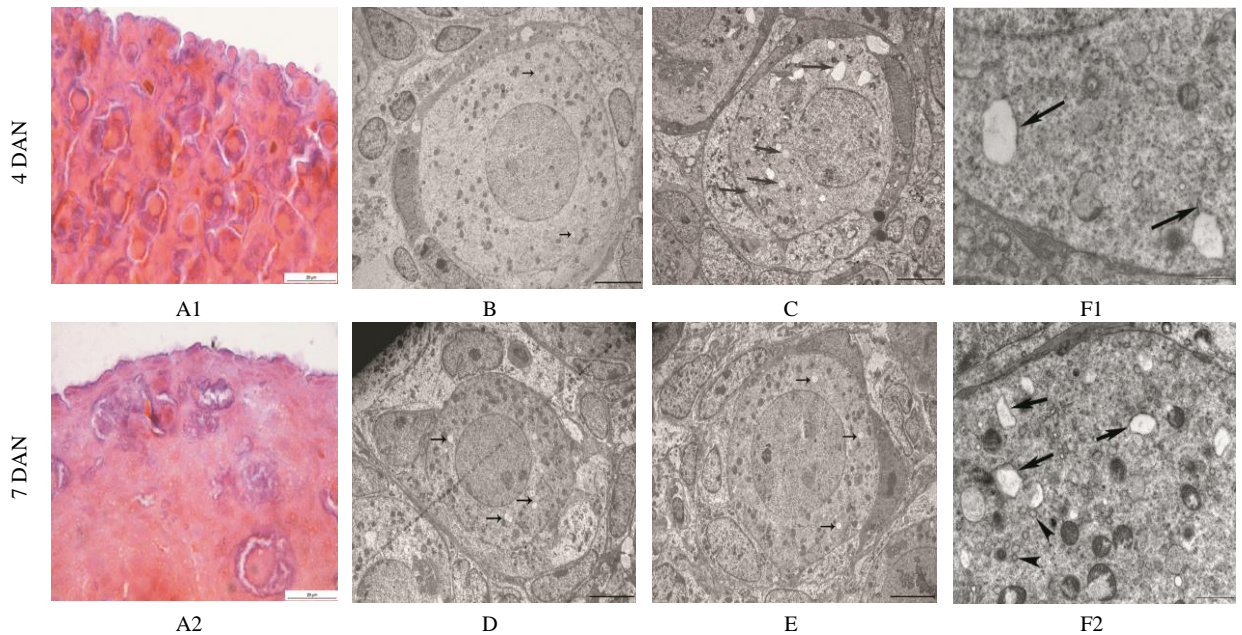
Hipotiroidizam ubrzava formiranje primordijalnih folikula.

Tabela 2. Uporedni pregled broja nestova, oogonija i oocita po nestu, oogonija u interfazi, oogonija u mitozu, oocita u prediplotenu, primordijalnih, primarnih, sekundarnih i preantralnih folikula po preseku jajnika mladunaca starosti 4 i 7 dana. # - u poređenju sa kontrolnom grupom 4. dana, § - u poređenju sa kontrolnom grupom 7. dana, □ - u poređenju sa hipotiroidnom grupom 4.dana. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Broj ćelija/folikula	4.dan		7.dan	
	Kontrola	Hipotiroidizam	Kontrola	Hipotiroidizam
Nestovi	4.98 ± 1.39	2.85 ^{#, **} ± 1.39	0	0
Oogonije i oocite po nestu	5.74 ± 0.99	4.62 ^{#, *} ± 0.69	0	0
Oogonije u interfazi	21.81 ± 3.18	10.41 ^{#, ***} ± 1.56	0	0
Oogonije u mitozu	4.25 ± 1.12	2.38 ^{#, **} ± 0.55	0	0
Oocita u prediplotenu	1.62 ± 0.23	2.92 ^{#, **} ± 0.7	0	0
Primordijalni folikuli	31.56 ± 0.46	64.69 ^{#, ***} ± 2.18	57.9 ^{#, ***} ± 5.99	54.27 ^{□, ***} ± 3.92
Primarni folikuli	48.36 ± 5.16	40.76 ^{#, *} ± 5.53	27.12 ^{#, ***} ± 4.75	35.32 ^{§, *} ± 5.55
Sekundarni folikuli	26.29 ± 3.55	21.72 ^{#, *} ± 2.95	26.82 ± 5.46	31.68 ^{□, **} ± 6.4
Preantralni folikuli	0	0	2.92 ± 0.74	5.77 ^{§, *} ± 1.36

4.8. Histochemijska, ultrastrukturna i stereološka analiza jajnika mladunaca 4. i 7. dana

Histochemijsko bojenje Alizarin Red je jačeg intenziteta kod jajnika mladunaca starosti 4 dana u odnosu na 7. dan, što ukazuje na veću količinu Ca^{++} jona u oocitama hipotiroidnih životinja 4. dana (sl. 23A1, 18A2). Ultrastrukturna analiza ovih folikula je pokazala da se u oocitama i granulosa ćelijama životinja oba uzrasta uočavaju nukleusi sa fino dispergovanim hromatinom i ekscentrično postavljenim jednim ili dva nukleolusa (sl. 23B-E). U oocitama primordijalnih folikula jajnika hipotiroidnih mladunaca 4. dana uočena je intenzivna vakuolizacija u poređenju sa kontrolnom grupom istog uzrasta (sl. 23C). Uočena vakuolizacija predstavlja proširene cisterne sER najčešće okružene cisternama sER normalne veličine (sl. 23F1, 23F2). Vakuolizacija citoplazme koja se uočava u citoplazmi oocita obe grupe pacova starih 7 dana (sl. 23D, 23E) nije izražena kao kod tretiranih mladunaca starosti 4 dana (sl. 23C) i podjednako je zastupljena kod obe grupe životinja.



Slika 23. Alizarin Red bojenje u jajnicima mladunaca starosti 4 dana (A1) i 7 dana (A2). Primordijalni folikul jajnika kontrolne grupe mladunaca starosti 4 (B) i 7 dana (D) (strelice ukazuju na vakuolizaciju citoplazme). Primordijalni folikul jajnika hipotiroidne grupe mladunaca starosti 4 dana (C) i 7 dana (E) (strelice ukazuju na vakuolizaciju citoplazme). Proširene cisterne sER (F1 i F2) (strelice). Proširene cisterne sER i njegov kontinuitet sa postojećim tubulo-retikularnim domenom označen je strelicama (F1). Nekoliko proširenih (strelice) i normalnih (vrh strelice) cisterni sER. Bar: 20 μm za A1 i A2, 5 μm za B, C, D i E, 1 μm za F1 i F2.

Stereološka analiza oocita primordijalnih folikula kod mladunaca 4. i 7. dana obe grupe uporedno je prikazana u tabeli 3. Volumenska gustina nukleusa ($p < 0.05$) i sER ($p < 0.05$) je značajno veća, dok se volumenska gustina citoplazme ($p < 0.01$) smanjuje kod hipotiroidnih životinja 4. dana u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Kod hipotiroidnih životinja starosti 7 dana, volumenska gustina sER je značajno manja u odnosu na kontrolnu grupu istog uzrasta ($p < 0.01$), kao i u odnosu na hipotiroidnu grupu starosti 4 dana ($p < 0.001$).

Takođe, hipotiroidne životinje 7. dana imaju znatno veću volumensku gustinu citoplazme u odnosu na istu grupu mladunaca starih 4 dana ($p < 0.05$). Volumenska gustina Goldži kompleksa i mitohondrija se nije bitno razlikovala među grupama ove dve uzrasne kategorije, mada je uočeno da je ona nešto veća kod hipotiroidnih životinja starosti 4 i 7 dana.

Hipotiroidizam dovodi do proširenja cisterni sER citoplazmi oocita primordijalnih folikula u jajnicima mladunaca starih 4 dana.

Tabela 3. Volumenska gustina (Vv) različitih ćelijskih komponenti u oocitama primordijalnih folikula u jajnicima kontrolnih i hipotiroidnih mladunaca starosti 4 i 7 dana. # - u poređenju sa kontrolnom grupom 4. dana, § - u poređenju sa kontrolnom grupom starosti 7 dana, □ - u poređenju sa hipotiroidnom grupom starosti 4. dana.

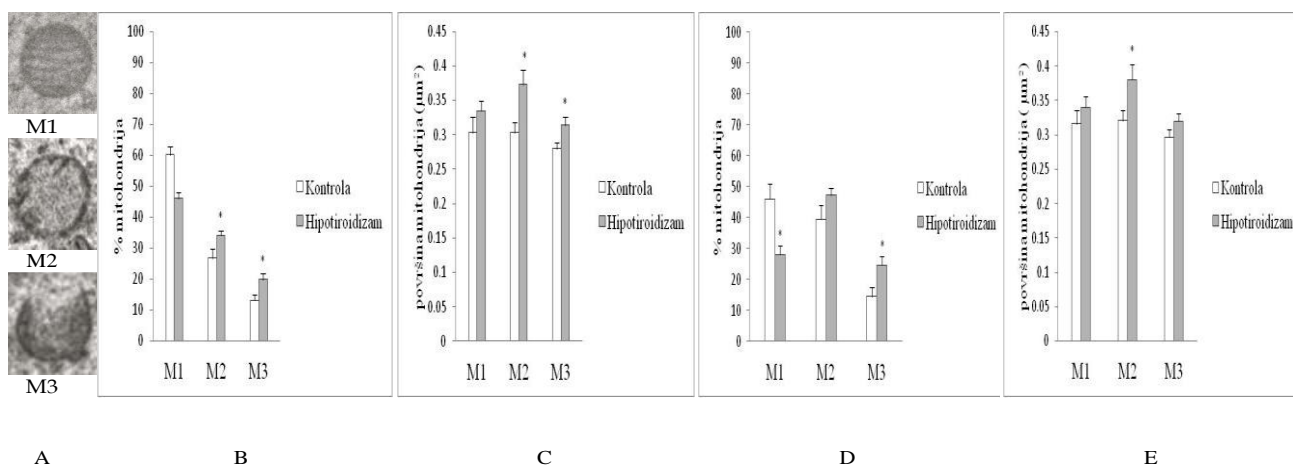
*($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

	4 dan		7 dan	
	Kontrola	Hipotiroidizam	Kontrola	Hipotiroidizam
Nukleus Vv (%)	22.41 ± 12.11	30.67 ^{#,*} ± 6.23	30.1 ± 7.22	28.53 ± 8.02
Citoplazma Vv (%)	61.23 ± 11.71	47.44 ^{#,**} ± 4.3	52.77 ± 5.8	54.04 ^{§,*} ± 8.03
Mitohondrije Vv (%)	7.3 ± 1.27	8.04 ± 1.96	7.61 ± 3.02	8.03 ± 2.28
Glatki endoplazmin retikulum Vv (%)	7.06 ± 1.95	10.02 ^{#,*} ± 3.51	8.06 ± 1.93	5.56 ^{§,**,□,***} ± 1.08
Goldži kompleks Vv (%)	2 ± 1.33	3.83 ± 2.89	1.46 ± 1.75	3.84 ± 3.74

U citoplazmi primordijalnih folikula jajnika mladunaca uzrasta 4 i 7 dana su prisutna tri morfološka tipa mitohondrija. Prvi tip mitohondrija (M1) čine one sa dugim kristama i svetlim matriksom, drugi tip (M2) su mitohondrije sa kratkim, periferno postavljenim kristama i prosvetljenim matriksom postavljenim manje ili više centralno i treći tip (M3) su one sa diskontinuiranom membranom i jako redukovanim kristama (sl. 24). Oocyte hipotiroidnih

mladunaca starosti 4 dana se karakterišu povećanim brojem kao i prosečnom površinom mitohondrija tipa M2 i M3 u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.05$), (sl.24B, 24C). Kod hipotiroidnih pacova 7. dana, broj mitohondrija tipa M1 je smanjen ($p < 0.05$), a tipa M3 povećan u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$), (sl. 24D). Istovremeno, kod ove grupe životinja prosečna površina mitohondrija tipa M2 je značajno povećana u odnosu na kontrolnu grupu istog uzrasta ($p < 0.05$), (sl. 24E).

Hipotiroidizam dovodi do promena u morfologiji mitohondrija u smislu povećanja njihove površine i prosvetljavanja centralnog dela matriksa sa redukovanjem broja kristi u primordijalnim folikulima jajnika mladunaca starih 4 i 7 dana.



Slika 24. Tri tipa mitohondrija (M1, M2, M3) u primordijalnim folikulima jajnika mladunaca starih 4 i 7 dana. Procenat zastupljenosti sva tri tipa mitohondrija kod mladunaca starosti 4 (B) i 7 (D) dana. Površina mitohondrija kod mladunaca starosti 4 (C) i 7 (E) dana. * $p < 0.05$.

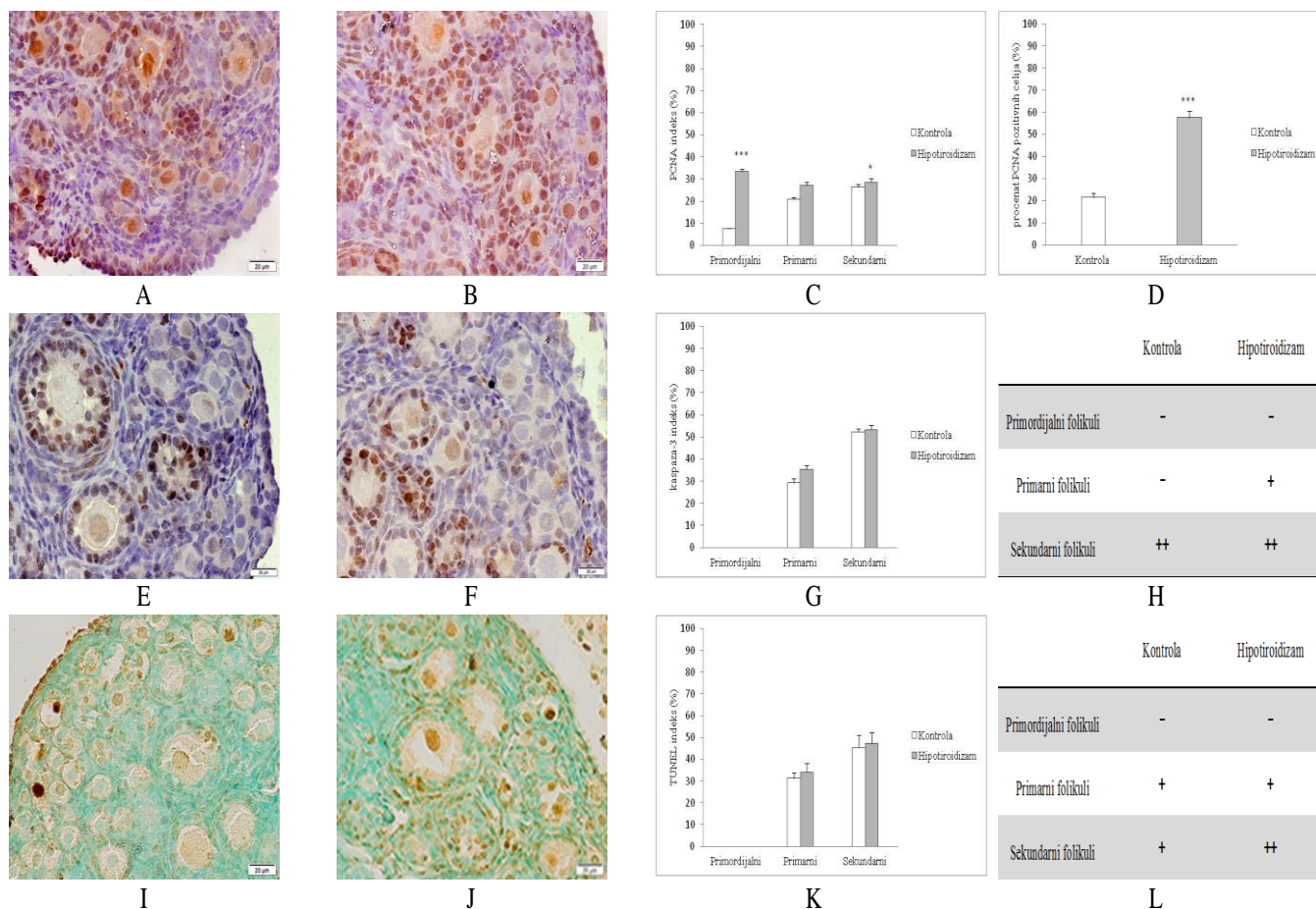
4.9. Imunohistohemija jajnika mladunaca 4. i 7. dana

4.9.1. Imunoekspresija PCNA, kaspaze 3, TUNEL

PCNA je lokalizovan u nukleusnoj i perinukleusnoj oblasti u oocitama i granuloza ćelijama u obe grupe uzrasta 4 dana po rođenju (sl. 25A, 25B). Analiza PCNA indeksa pokazuje trend porasta u svim tipovima folikula kod tretirane grupe. Značajna razlika u ovim vrednostima zabeležena je u primordijalnim ($p < 0.001$) i sekundarnim ($p < 0.05$) folikulima dok se vrednosti za primarne folikule ne razlikuju značajno (sl. 25C). Kada je u pitanju odnos PCNA pozitivnih oocita u primordijalnim folikulima, taj procenat je značajno veći kod tretiranih životinja ($p < 0.001$) (sl. 25D).

Kaspaza 3, kao marker apoptoze, detektovana je u nukleusu i perinukleusnom regionu oocita i granuloza ćelija u jajnicima jedinki obe grupe starosti 4 dana (sl. 25E, 25F). U oocitama primordijalnih folikula jajnika obe grupe ovog uzrasta nije zabeležena imunoekspresija ovog markera (sl. 25G). Granuloza ćelije primordijalnih folikula u jajnicima obe grupe 4. dana su kaspaza 3 negativne, dok je u slučaju primarnih i sekundarnih folikula oko jedna trećina, odnosno jedna polovina granuloza ćelija pozitivna na ovaj marker (sl. 25G). Kada su u pitanju primarni folikuli, dok kod kontrolne grupe nema kaspaza 3 pozitivnog signala u oocitama, u slučaju jajnika tretiranih jedinki oocite pokazuju slabu pozitivnost na ovaj apoptotski marker (sl. 25H). U sekundarnim folikulima obe grupe zabeležen je umeren signal u oocitama (sl. 25H).

Kao i u slučaju kaspaze 3, imunoekspresija TUNEL je zabeležena u nukleusu i perinukleusnom regionu oocita i granuloza ćelija u jajnicima obe grupe ženki starosti 4 dana (sl. 25I, 25J). U primordijalnim folikulima obe grupe nema TUNEL pozitivnih oocita kao ni TUNEL pozitivnih granuloza ćelija (sl. 25K, 25L). Oko trećine granuloza ćelija u primarnim folikulima i oko polovina u sekundarnim folikulima jajnika obe grupe mladunaca starosti 4 dana je TUNEL pozitivno (sl. 25K). Dok je kod oocita primarnih folikula u obe grupe, kao i sekundarnih folikula kod kontrole zabeležen slab signal ovog apoptotskog markera, u oocitama sekundarnih folikula jajnika hipotiroidnih životinja detektovana je umerena imunoekspresija TUNEL (sl. 25L).



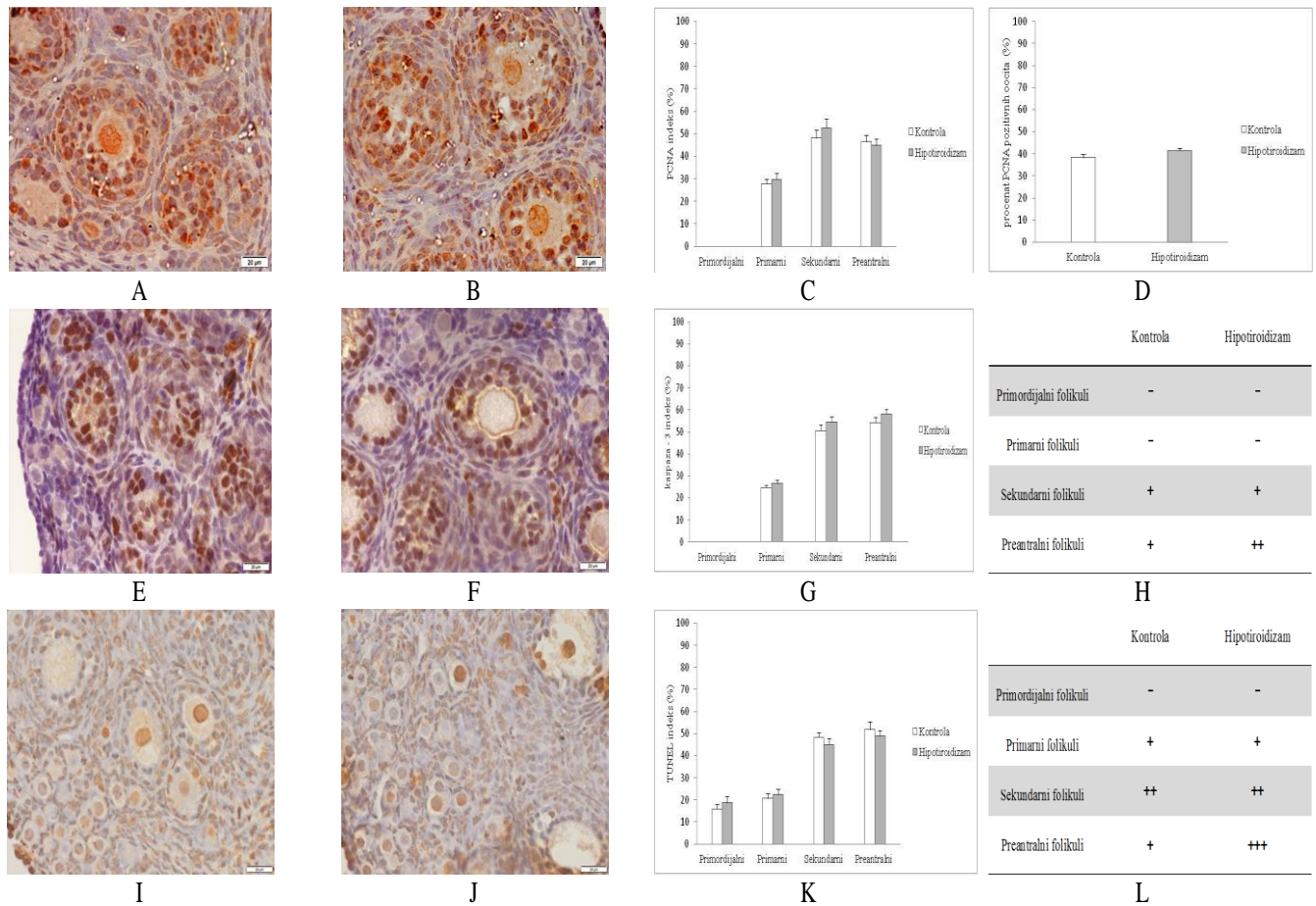
Slika 25. PCNA imunoekspresija u jajnicima kontrolnih (A) i hipotiroidnih mladunaca starosti 4 dana (B). PCNA indeks granuloza ćelija u jajnicima mladunaca kontrolne i tretirane grupe (C). Procenat PCNA pozitivnih oocita u primordijalnim folikulima u obe grupe (D). Kaspaza 3 imunoekspresija u jajnicima kontrolnih (E) i hipotiroidnih mladunaca starosti 4 dana (F). Kaspaza 3 indeks granuloza ćelija u jajnicima mladunaca kontrolne i tretirane grupe (G). Semikvantitativna procena kaspaza 3 pozitivnih oocita u primordijalnim, primarnim i sekundarnim folikulima kod obe grupe životinja (H). TUNEL imunoekspresija u jajnicima kontrolnih (I) i hipotiroidnih mladunaca starosti 4 dana (J). TUNEL indeks granuloza ćelija u jajnicima mladunaca kontrolne i tretirane grupe (K). Semikvantitativna procena TUNEL pozitivnih oocita u primordijalnim, primarnim i sekundarnim folikulima kod obe grupe mladunaca (L). Bar:20 μ m. * p <0.05, *** p <0.001

Imunoekspresija PCNA, kaspaze 3 i TUNEL u jajnicima obe grupe mladunaca uzrasta 7 dana je uočena pored granuloza ćelija i oocita i delom u ćelijama strome kao i u površinskom epitelu, koji u velikoj meri pokazuje pozitivnost na navedene markere a naročito na PCNA (sl. 26A, B, E, F, I i J). Što se tiče PCNA, slično kao i kod jedinki starosti 4 dana, ovaj marker nije eksprimiran u granuloza ćelijama primordijalnih folikula dok u ostalim tipovima folikula jeste (sl. 26C). Oko jedne trećine granuloza ćelija u primarnim i oko polovina u sekundarnim i preantralnim folikulima je PCNA pozitivna kod obe grupe životinja (sl. 26C). Broj PCNA

pozitivnih oocita u primordijalnim folikulima je veći u jajnicima tretirane grupe životinja ali bez statističke značajnosti (sl. 26D).

Kaspaza 3 pozitivan signal nije registrovan u granuloza ćelijama primordijalnih folikula obe grupe životinja dok je oko trećine ovih ćelija u primarnim folikulima pozitivna (sl. 26G). U sekundarnim i preantralnim folikulima obe grupe mladunaca ovog uzrasta zabeležena je oko polovina granuloza ćelija koje su kaspaza 3 pozitivne (sl. 26G). U primordijalnim i primarnim folikulima kod obe grupe životinja nisu uočene oocite koje su kaspaza 3 pozitivne (sl. 26H). Kod oocita sekundarnih folikula obe grupe, kao i oocita preantralnih folikula jajnika kontrolne grupe uočen je slab kaspaza 3 signal dok je kod oocita preantralnih folikula tretirane grupe kaspaza 3 umereno eksprimirana (sl. 26H).

U jajnicima istog uzrasta, kod obe grupe životinja, oko jedne petine granuloza ćelija u primordijalnim i primarnim folikulima je TUNEL pozitivna (sl. 26K). U sekundarnim i preantralnim folikulima jajnika obe grupe uočeno je da je oko polovina granuloza ćelija pozitivna na ovaj marker (sl. 26K). TUNEL pozitivne oocite nisu zapažene u primordijalnim folikulima jajnika obe grupe životinja starosti 7 dana (sl. 26L). Slab signal je uočen u oocitama primarnih, dok je umeren signal karakterističan za oocite sekundarnih folikula u jajnicima obe grupe mladunaca (sl. 26L). Preantralni folikuli jajnika kontrolnih životinja poseduju oocite koje u proseku slabo eksprimiraju TUNEL signal dok je on kod tretiranih životinja jak (sl. 26L).

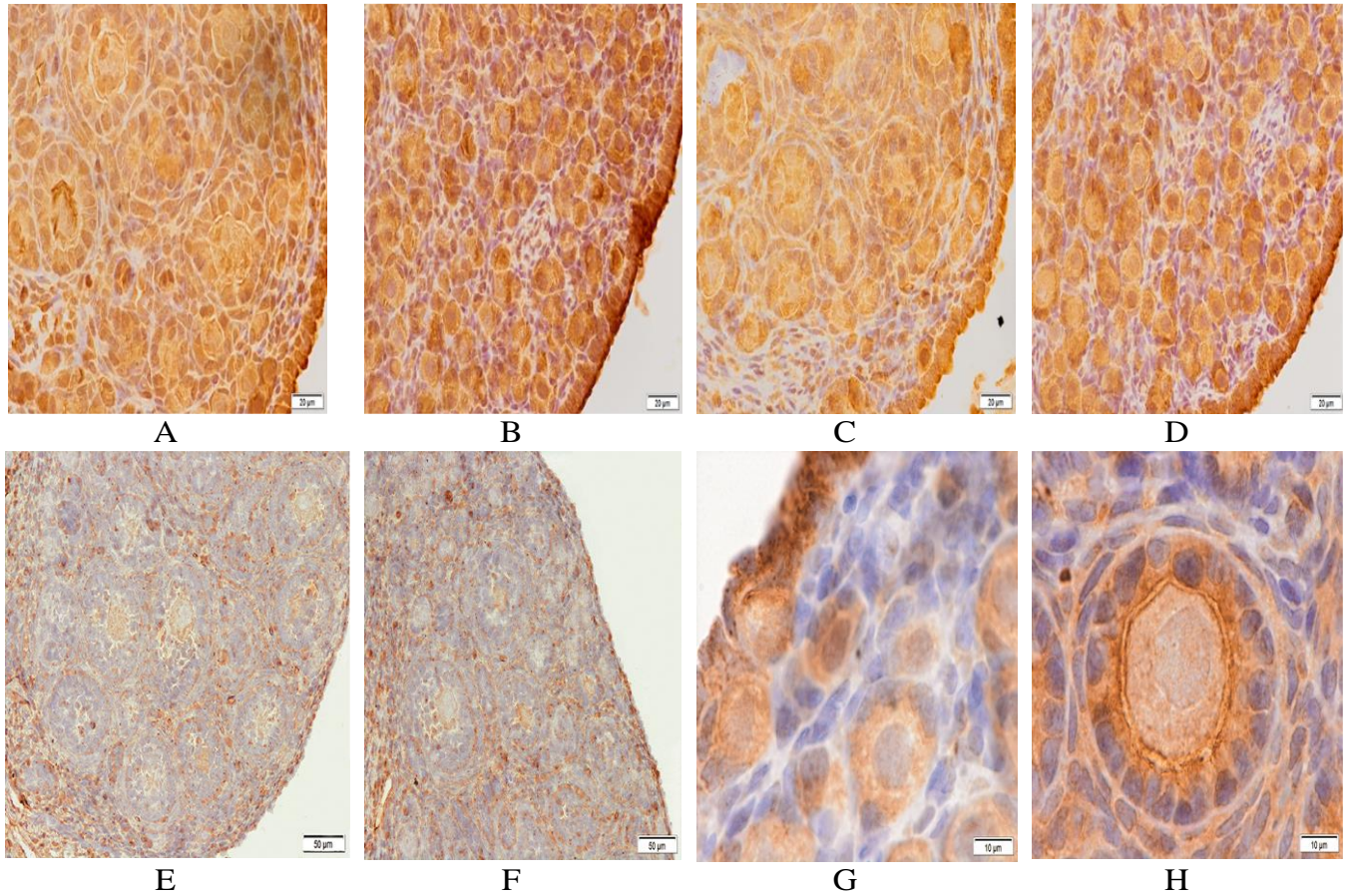


Slika 26. PCNA imunoekspresija u jajnicima kontrolnih (A) i hipotiroidnih mladunaca starosti 7 dana (B). PCNA indeks granuloza ćelija u jajnicima ženki kontrolne i tretirane grupe (C). Procenat PCNA pozitivnih oocita u primordijalnim, primarnim, sekundarnim i preantralnim folikulima u obe grupe (D). Kaspaza 3 imunoekspresija u jajnicima kontrolnih (E) i hipotiroidnih mladunaca starosti 7 dana (F). Kaspaza 3 indeks granuloza ćelija u jajnicima mladunaca kontrolne i tretirane grupe (G). Semikvantitativna procena kaspaza 3 pozitivnih oocita u primordijalnim, primarnim, sekundarnim i preantralnim folikulima u obe grupe (H). TUNEL imunoekspresija u jajnicima kontrolnih (I) i hipotiroidnih mladunaca starosti 7 dana (J). TUNEL indeks granuloza ćelija u jajnicima mladunaca kontrolne i tretirane grupe (K). Semikvantitativna procena TUNEL pozitivnih oocita u primordijalnim, primarnim, sekundarnim i preantralnim folikulima u obe eksperimentalne grupe (L). Bar: 20 μ m.

4.9.2. Imunoekspresija ATG7 i LC3

U jajnicima jedinki starosti 4 i 7 dana uočljiva je izražena imunoekspresija ispitivanih markera autofagije (APG7 i LC3) (sl. 27A-27H). Naime, imunoekspresija navedenih markera je bila izražena u toj meri da bilo kakav pokušaj kvantifikacije nije bio izvodljiv. Imunoekspresija ovih markera je uočena delom i u ćelijama strome kao i u površinskom epitelu (sl. 28A-28H).

Intenzivirana maturacija je povezana sa pojačanom ekspresijom signala PCNA, kaspaze 3 i TUNEL, a ne utiče na ekspresiju markera autofagije ATG7 i LC3 u jajnicima mladunaca starih 4 i 7 dana.



Slika 28. Imunoekspresija ATG7 u jajniku kontrolnih (A) i tretiranih (B) mladunaca 4. dana. Imunoekspresija LC3 u jajniku kontrolnih (C) i tretiranih (D) mladunaca 4. dana. Imunoekspresija ATG7 u jajniku kontrolnih (E) i tretiranih (F) mladunaca 7. dana. Imunoekspresija LC3 u jajniku kontrolnih (G) i tretiranih (H) mladunaca 7. dana. Bar: 20 μm za A, B, C, D; 50 μm za E i F; 10 μm za G i H.

4.10. Western blot

Ispitivanje markera autofagije Western blot tehnikom nije dala zadovoljavajuće rezultate. Koncentracija ispitivanog proteina je bila ispod granice za detekciju ovim metodom. U zavisnosti od korišćenog reagensa za vizualizaciju proteina prilikom izvođenja Western blot tehnike, donja granica detekcije ispitivanog proteina (Atg7) je od 0,5-1ng, tako da se koncentracija ovog markera u jajniku nije mogla detektovati jer se kretala u pikogramima.

5. DISKUSIJA

Tiroidni hormoni imaju izuzetno važnu ulogu u normalnom odvijanju procesa folikulogeneze. Iako je primetan porast neplodnosti kod ljudi kao posledica poremećaja tiroidnog hormonskog statusa (Poppe i Velkeniers, 2004), nema podataka o uticaju smanjene funkcije štitaste žlezde na navedene procese u jajniku.

Kod ljudi, ulazak oogonija u mejozu I se u jajnicima odigrava između 10. i 14. nedelje gestacije (Hartshorne i sar, 2009), a proces formiranja primordijalnih folikula se završava još tokom prenatalnog perioda, u trećem trimestru gestacije (Maheshwari i Fowler, 2008). Kod pacova, ovaj proces se odvija krajem prenatalnog i u ranom neonatalnom dobu (Beaumont i Mandl, 1962). Ukupan fond folikula formira se 3-4. dana postnatalno, kada se završava prva faza mejotičkog sazrevanja jajne ćelije i ona miruje u dihtotenu sve do preovulatornog talasa gonadotropina, a formiranje prvih sekundarnih folikula počinje 7. dana. S obzirom na ovako ranu oogenezu, u ovim istraživanjima korišćen je eksperimentalni model u kome je pacovima davan goitrogen još u toku intrauterinog razvića, sa ciljem ispitivanja uticaja subkliničkog hipotiroidizma majki na rani neonatalni razvoj jajnika potomstva. Ovo je prva, nama poznata, studija o uticaju hipotiroidizma majki na rani neonatalni razvoj jajnika kod pacova (proliferaciju/diferencijaciju oocita i folikulogenezu). Ispitivane su morfološke odlike oogonija i oocita, formiranje primordijalnih folikula i njihovo preživljavanje u jajnicima mladunaca pacova nultog, četvrtog i sedmog dana starosti. Najznačajniji rezultati do kojih se došlo diskutovani su integralno kroz proces oogeneze od nultog do sedmog dana starosti mladunaca, a pojedinačno pokazuju sledeće:

Kod mladunaca nultog dana starosti:

- 1) značajno smanjenje telesne mase hipotiroidnih mladunaca, kao i snižena koncentracija T3 u plazmi;
- 2) veliki broj atipičnih oogonija/oocita sa izraženom acidofilnošću (eozinofilijom) citoplazme u jajnicima hipotiroidnih mladunaca;
- 3) na ultrastrukturnom nivou atipične oogonije/oocite, pokazuju osobine degenerisanih ćelija usled intenzivne autofagije, apoptoze ili njihovog udruženog delovanja;

- 4) oocite u profazi mejoze I u jajnicima hipotiroidnih mladunaca ovog uzrasta intenzivno akumuliraju organele, što ukazuje na njihovu ubrzanu maturaciju;
- 5) veći broj TUNEL pozitivnih oogonija/oocita prisutan je u budućoj srži nego u kori jajnika u kontrolnoj grupi mladunaca, dok je kod hipotiroidnih mladunaca uočen manji broj ovih ćelija;
- 6) značajno veći broj oogonija/oocita je PCNA pozitivno u jajnicima hipotiroidnih mladunaca, dok je imunoekspresija kaspaze 3, ATG i LC3 slična kod kontrolnih i hipotiroidnih mladunaca.

U jajnicima mladunaca starosti 4 i 7 dana:

- 1) je ubrzano formiranje primordijalnih folikula u budućoj kori jajnika, praćeno ultrastrukturnim promenama u vidu proširenog sER i izmenjenom morfologijom mitohondrija u jajnicima hipotiroidnih mladunaca;
- 2) trostruko viši nivo ekspresije PCNA u oocitama i granuloza ćelijama primordijalnih folikula jajnika hipotiroidnih mladunaca starosti 4 dana, praćen neznatno višim nivoom apoptotskih markera;
- 3) blago povećanje broja primarnih, sekundarnih i preantralnih folikula bez razlike u ekspresiji apoptotskih i markera proliferacije.

Za potvrđivanje hipotiroidnog statusa ispitivanih životinja određivan je indeks aktivacije štitaste žlezde (Ia). Prethodno je utvrđena snažna veza između vrednosti Ia i hipotiroidizma (Rajab et al, 2015) naročito u smislu indirektnog utvrđivanja vrednosti TSH (Kališnik, 1981). Za izazivanje eksperimentalnog hipotiroidizma, PTU se koristi zbog efikasnog transfera kroz placentu (Mortimer i sar, 1997) i mleko (Kawada i sar, 1988) a dovodi do smanjenja koncentracije i T₃ i T₄ (Dijkstra i sar, 1996; Zertashia i sar, 2002; Talsness i sar, 2008). Dobijeni rezultat smanjene veličine legla tretiranih majki, kao i niskog stepena preživljavanja mladunacapotvrđen je i u studiji gde je PTU primenjivan u nižoj koncentraciji (0,1g/l) (Zertashia i sar, 2002). Jedan od uzroka povećane smrtnosti mladunaca jeste i smanjena produkcija mleka kod tretiranih majki koja ne zadovoljava nutricionere zahteve potomaka. U slučaju naše studije, značajno povećana smrtnost mladunaca je zabeležena samo pri upotrebi visoke doze PTU, što može biti objašnjeno time da je kod majki prouzrokovan jak oblik hipotiroidizma. I prethodne studije su pokazale da u ovim slučajevima dolazi do povećane apsorpcije embriona kod glodara

koja dovodi do redukovane veličine legla, smanjene stope preživljavanja novorođenih mladunaca kao i njihovog prevremenog rađanja (Choksi i sar, 2003).

Hipotiroidni mladunci, potomci majki tretiranih dozom PTU (1,5 mg/l) u našem eksperimentu su imali za više od jedne četvrtine smanjenu telesnu masu u odnosu na kontrolu, što navodi na zaključak o važnom uticaju TH na celokupan metabolizam i proliferaciju ćelija u ranom postnatalnom periodu. Dijkstra i saradnici (1986) smatraju da, usled niskog nivoa TH, dolazi do redukcije mase tela, a što dovodi do poremećaja folikulogeneze. Dosadašnje studije u kojima se analizira masa tela mladunaca hipotiroidnih majki ili onih kod kojih je hipotiroidizam izazvan u ranom neonatalnom periodu su u velikoj meri kontradiktorne i odnose se na nešto starije mladunce i više doze PTU. Trend smanjenja telesne mase mladunaca nakon tretmana majki PTU u toku graviditeta i nakon porođaja koji je pokazala naša studija zabeležen je i kod pacova Wistar soja (Talsness i sar, 2008). Naime, iako nije uočena značajna razlika u masi tela na dan rođenja, 38. dana je ta razlika značajna. Sličan trend je uočen i kod oralne primene PTU kod mladih pacova od 21. do 40. dana (Marty et al, 1999), kao i od 1. do 40 dana po rođenju (Dijkstra i sar, 1996). Ovako dobijeni rezultati su u suprotnosti sa onima dobijenim kod Sprague-Dawley pacova koji su tokom graviditeta dobijali PTU preko placente, a žrtvovani su 120. dana po rođenju (Zertashia i sar, 2002), kao i kod mužjaka pacova koji su od dana rođenja tretirani PTU i metimazolom gde je nađena značajna razlika u smislu povećanja telesne mase (Maran i sar, 1999; Sahoo i Roy, 2012). Pretpostavka je da dobijeni rezultat da je kod mladunaca starosti 7 dana razlika u masi tela između grupa manje značajna u odnosu na prethodno ispitivane uzrasne kategorije može biti posledica postepenog prilagođavanja organizma na sniženu koncentraciju TH, tako da se pomoću dejodinaza bolje iskorišćavaju postojeće količine T₄.

Iako je pokazano da je kod hipotiroidizma povišen nivo oksidativnog stresa (Sarandöl i sar, 2005), kod ispitivanih mladunaca gotovo da nema indikacija takvih promena u plazmi eksperimentalnih životinja, jer nivo GPX1 i GPX3 nismo određivali u tkivu jajnika. Dostupna literatura o seleno-nezavisnim peroksidazama u jajnicima se mahom odnosi na njihovu ulogu indikatora oksidativnog stresa u patološkim stanjima kao što je karcinom (Saga i sar, 2008). Ako se ima u vidu da maternalni hipotiroidizam ima dugotrajne posledice po jajnike (Radovanović i sar, 2012), može se pretpostaviti da u ranom neonatalnom periodu postoje mehanizmi kojima se trenutno ublažava efekat oksidativnog stresa. Dodatna istraživanja na ovu temu su neophodna i predstavljaju potpuno novo polje.

Histo-morfometrijska analiza jajnika hipotiroidnih mladunaca istog dana po rođenju, pokazala je smanjen broj oogonija u mirovanju i mitozu, dok je broj atipičnih ćelija u ovoj grupi trostruko povećan. Ova proporcija je potvrđena na ultrastrukturnom nivou, a najveći broj njih je podlegao intenzivnoj autofagiji ili predstavlja degenerisane ćelije u pahitenu mezoze I (Z-ćelije). Prethodne studije su ukazale na postojanje Z-ćelija u jajnicima normalnih miševa i pacova (Franchi i Mandl, 1962; Baker i Franchi, 1967), kao deo programa sazrevanja ćelija tokom oogeneze, ali ne u o ovom broju.

Prema nomenklaturi Komiteta za ćelijsku smrt, morfološki se razlikuju tri glavna tipa ćelijske smrti: apoptoza, autofagija i nekroza, ali je ostavljena i mogućnost njihovog udruživanja i/ili nastavljanja (Galuzzi i sar, 2012). Naime, nekroza, ali po tipu sekundarna, pokazuje morfološke odlike i apoptoze i nekroze (primarne); apoptoza se karakteriše intenzivnom kondenzacijom hromatina i fragmentacijom nukleusa, dok nekrozu odlikuju ruptura ćelijske membrane i oslobađanje citoplazmatskih komponenti izvan ćelije (Silva, 2010). Imajući u vidu da Z-ćelije poseduju karakteristike oba navedena procesa, može se reći da one podležu sekundarnoj nekrozi. U prilog tome ide i činjenica da ćelije u sekundarnoj nekrozi često bivaju fagocitovane od strane okolnih ćelija (Silva, 2010), odnosno pregranuloza ćelija u slučaju jajnika. Literatura koja se odnosi na Z-ćelije podrazumeva jako mali broj radova na ovu temu. Naime, u poslednjih tridesetak godina objavljena su samo dva rada koji ukazuju da je broj ovih ćelija povećan u slučaju Turner-ovog sindroma kod miševa i ljudi (Burgoyne i Baker, 1985; Speed, 1986). Interesantno je da je hipotiroidizam učestala pojava kod osoba sa Turner-ovim sindromom (El-Mansoury i sar, 2005). Na osnovu ovoga i naših rezultata (Danilović Luković i sar, 2017), može se zaključiti da neonatalni hipotiroidizam favorizuje nastavljanje apoptoze u sekundarnu nekrozu. Takođe, postoji mogućnost da se broj Z-ćelija povećava zato što malobrojne pregranuloza ćelije na ovom uzrastnom stupnju nemaju kapacitet da ih fagocituju.

Kada je reč o oogonijama/oocitama koje podležu apoptozi, TEM je pokazao veći broj ovakvih germinativnih ćelija u hipotiroidnoj grupi pacova 0. dana iako je njihov broj znatno manji u odnosu na broj oogonija/oocita koje podležu intenzivnoj autofagiji i Z-ćelija. Takođe, odnos apoptotskih i oogonija/oocita koje podležu autofagiji i koje mogu rezultirati ćelijskom smrću, jeste obrnut u ovoj studiji (za kontrolnu i hipotiroidnu grupu) u odnosu na prethodne podatke dobijene u fiziološkim uslovima (Escobar i sar, 2010). Jedno od mogućih objašnjenja

jeste da se u hipotiroidnom statusu većina ćelija koje započinu proces apoptoze preorijentiše na sekundarnu nekrozu dajući tako Z-ćelije.

Uočeno povećanje broja TUNEL pozitivnih ćelija u budućoj srži jajnika kontrolne grupe je jedini rezultat dominantnosti apoptotskog procesa u jajnicima pacova na rođenju. Ovaj podatak dobijen u našoj studiji (Danilović Luković i sar, 2017), kada je u pitanju imunoekspresija aktivnog oblika kaspaze 3 je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima kod miševa 2. dana posle rođenja, gde je zapažena retka pozitivnost oocita na apoptotske markere. Kada je TUNEL u pitanju, naš rezultat koji je pokazao brojne oocite u srži jajnika kod kontrolne grupe je u suprotnosti sa prethodno publikovanim, ali kod miševa. Naime, kod odraslih miševa, granulosa ćelije, ali ne i oocite atretičnih folikula su pozitivne na apoptotske markere kao što su TUNEL i kaspaza 3 (Rodrigues i sar, 2009). Ako se ima u vidu da se imunoekspresija kaspaze 3 ne razlikuje među grupama, jedno od mogućih objašnjenja jeste kaspaza 3-nezavisna apoptoza u jajnicima, što je prethodno i opisano (Lobascio i sar, 2007). Sa druge strane, iako je TUNEL u širokoj upotrebi kao marker apoptoze, neki autori navode da nije u potpunosti pouzdan u slučajevima kada je mejoza dominantna u tkivu (Ghafari i sar, 2007). Naime, ovaj tip ćelijske deobe se karakteriše intenzivnom reparacijom DNK i pojavom fragmenata nakon jednostrukih i/ili dvostrukih prekida lanaca. Ako se ima u vidu da TUNEL detektuje upravo ovakve DNK fragmente (Kumari i sar, 2008), povećan broj TUNEL pozitivnih germinativnih ćelija u jajnicima kontrolne grupe može ukazati na intenzivne procese reparacije DNK. Ovu pretpostavku podržava studija De Felici i saradnika (2008), koja je pokazala da TUNEL pozitivne fetalne oocite mogu biti morfološki nepromenjene usled mehanizama DNK reparacije ili sinteze RNK (Kockx i sar, 1998). Našezapažanje prisustva retkih apoptotskih ćelija na ultrastrukturnom nivou ide u prilog ovoj činjenici. Ipak, konačno objašnjenje obimnog prisustva TUNEL pozitivnih oogonija/oocita u budućoj srži kontrolne grupe zahteva dalje istraživanje. Sa druge strane, svetlosna i elektronska mikroskopija su dovoljan dokaz povećanog intenziteta degeneracije oogonija/oocita kao i njihove smrti kod hipotiroidnih životinja u poređenju sa odgovarajućom kontrolom.

Iako umiruće ćelije mogu pokazivati znake autofagije, one retko bivaju eliminisane autofagnom ćelijskom smrću (Kroemer i Levine, 2008). Autofagija se, pre svega navodi, kao protektivni mehanizam protiv gladovanja ćelija neposredno po rođenju (Kroemer i Levine, 2008). Autofagna ćelijska smrt je prethodno zabeležena u ćelijama kancera, indukovana inhibitorima histon-deacetilaze (HDAC) (Shao i sar, 2004) kao i u ćelijama u kojima se ne

ekspimiraju neki od ključnih gena za normalno odvijanje apoptoze i/ili autofagije (Yue i sar, 2002; Shimizu i sar, 2004). Autofagna ćelijska smrt i apoptoza, kao i njihova kombinacija, je pokazana u eliminaciji degenerisanih ćelija hranilica (*eng. nurse*) u jajniku *Drosophila virilis* (Velentzas i sar, 2007), ali postoje i podaci o zastupljenosti autofagije i apoptoze ili kombinovanja ova dva vida ćelijske smrti u oocitama kod pacova Wistar soja u neonatalnom i infantilnom periodu (Escobar et al, 2010). Naime, već neko vreme se odustalo od opšte prihvaćenog mišljenja da je apoptoza isključivi način odvijanja atrezije folikula (Quirk i sar, 2004). Osim autofagne i apoptotske smrti pokazana je i nekroza ćelija folikularnog epitela kod gusaka (Kovacs i sar, 1992). Iako oogonije i oocite uočene u jajnicima hipotiroidnih pacova na rođenju ispunjavaju sve kriterijume autofagne ćelijske smrti, nismo mogli sa sigurnošću da tvrdimo da će biti eliminisane ovim tipom ćelijske smrti, kao i da je ovaj proces reverzibilan (Galuzzi i sar, 2012). Jedan od mogućih ishoda autofagije jeste ćelijska smrt oogonija/oocita. U našem eksperimentu zapaženo prisustvo ostataka dezintegrisanih ćelija između oogonija/oocita i pregranuloza ćelija u nestu, može se povezati sa intenzivnom ćelijskom smrću germinativnih ćelija. Upravo ovi ostaci u jajnicima hipotiroidnih pacova 0. dana daju „rastresit“ izgled nestovima, odnosno germinativne ćelije deluju nepovezano. Kako je hipotiroidizam stanje negativnog energetskeg balansa, teoretski bi se moglo pretpostaviti da okolne ćelije koriste materijal dobijen od onih ćelija koje su podlegle autofagnoj ćelijskoj smrti i čija rezidualna tela mogu da budu fagocitovana.

U svetlu intenzivne ćelijske smrti oogonija/oocita u jajnicima hipotiroidnih pacova na rođenju, povećana imunoekspresija PCNA je kontradiktorna. Međutim, ovaj rezultat je u skladu sa onim koji je uočen u jajnicima hipotiroidne grupe pacova 4. i 7.dana, gde su nađene PCNA pozitivne oocite unutar formiranih primordijalnih folikula (Danilović Luković i sar, 2017). Naime, osim uloge u preživljavanju ćelija, PCNA je aktivno uključena u proces apoptoze tokom profaze mejoze I, kao i u formiranje primordijalnih folikula (Xu i sar, 2011). Ovo je u skladu sa uočenim prisustvom povećanog broja primordijalnih folikula u jajnicima hipotiroidnih pacova starosti 4 dana, kao i sa rezultatom da povećana imunoekspresija PCNA dovodi do prerane maturacije oogonija/oocita. Biogeneza i akumulacija organela u citoplazmi oocita u različitim podfazama profaze I u jajnicima hipotiroidnih pacova 0. dana veoma podseća na citoplazmu oocita pubertalnih i adultnih pacova (Danilović Luković i sar, 2017). Ovo može dovesti, iako nije utvrđeno kojim mehanizmom, do, u slučaju hipotiroidizma već zabeležene, ubrzane

folikulogeneze i atrezije folikula (Ferreira i sar, 2009). U slučaju hipotiroidizma kod novorođenih pacova, PCNA može imati dvostruku funkciju – preživljavanje zdravih ili malo oštećenih oocita, kao i uvođenje u apoptozu ili u autofagiju onih ćelija koje ne mogu da završe mitozu (usled oštećenja DNK, nedovoljno energije itd).

MPF je prisutan u zrelim oocitama (Masui i Clarke, 1979) ali ne i u onim koje su u ranoj profazi MI. Ako se ima u vidu činjenica da alkalna fosfataza inhibira aktivnost MPF u uslovima *in vitro* i *in vivo* (Hermann et al, 1984), onda se prisustvo nekolicine oogonija/oocita koje su pozitivne u jajniku hipotiroidne grupe pacova može smatrati pokušajem da se održi homeostaza. Alkalna fosfataza nije detektovana u jajnicima pacova u fiziološkim uslovima (Varma et al, 1968), što je u skladu sa našim rezultatom kada je u pitanju kontrolna grupa. Ipak, njeno prisustvo u jajnicima hipotiroidne grupe, udruženo sa rezultatom analize na nivou elektronske mikroskopije, može biti posledica ubrzanog sazrevanja oocita pošto je pokazano da je alkalna fosfataza pouzdan indikator maturacije oocita riba (Venugopalan, 1961). Sa druge strane, ona predstavlja pouzdan marker primordijalnih germinativnih ćelija (Matsui et al, 1992), a može ukazati i na prisustvo patoloških stanja kao što su neoplazme germinativnih ćelija (Epenetos et al, 1984; Epenetos et al, 1985).

Iako je na ultrastrukturnom nivou pokazano da je većina oogonija/oocita u jajnicima pacova 0. dana podleže intenzivnoj autofagiji ili umire u kombinovanoj ćelijskoj smrti (apoptoza/autofagija), imunoekspresija ATG7 i LC3 se nije razlikovala među grupama. Stoga se može pretpostaviti da ova dva markera detektuju bazalni nivo autofagije, koja je uobičajena u tom uzrastu (Schiaffino i sar, 2008; Gawriluk i sar, 2011; Han i sar, 2011). Kontradiktorni rezultati TEM i imunohistohemijskog bojenja na ATG7 i LC3 možda bi se mogli objasniti praćenjem ekspresije markera koji su indikatori kasnijih faza autofagije (LAMP1 i LAMP2). Prema gore navedenom može se zaključiti da smanjena koncentracija TH ne utiče na bazalni nivo autofagije, ali da ima uticaj na intenzivnu autofagiju oogonija/oocita koja dovodi do morfoloških promena karakterističnih za ćelijsku smrt.

Veoma važan rezultat je uočeno prisustvo nesparenih hromozoma u nukleusu hipotiroidnih pacova na rođenju, koji ukazuje na uticaj hipotiroidizma na defekte u sparivanju hromozoma. Pahiten predstavlja važnu tačku (*eng. checkpoint*) u kontroli odvijanja procesa mejoze I u smislu eliminacije ćelija sa mejotičkim greškama i izbegavanja pojave aneuploidije (Roeder i Bailis, 2000). Masovni gubitak oocita na kraju profaze I mejoze može upravo biti

rezultat grešaka u rekombinaciji hromozoma i/ili grešaka u uspostavljanju njihovih sinapsi (Cohen et al, 2006), što je pokazano da se dešava u prenatalnom periodu kod ljudi, gde oocite u pahitenu u najvećoj meri bivaju eliminisane apoptozom (De Pol i sar, 1997). Prema dostupnoj literaturi, nema podataka o uticaju TH na kontrolu odvijanja mejoze, osim podatka o tzv. interakтору receptora tiroidnih hormona (Trip13) koji je uključen u proces rekombinacije, i čije mutacije rezultiraju zaustavljanjem mejoze (Li i Schimenti, 2007). Dalja istraživanja bi trebalo da rasvetle mehanizme delovanja TH na odvijanje mejoze I, naročito na kontrolnu tačku u pahitenu, čime bi se eventualno, objasnio i naš rezultat ubrzane maturacije oocita.

Proces formiranja primordijalnih folikula počinje ulaskom oogonija u profazu I mejoze i zaustavljanjem u dihtiotenu, kada se primarna oocita okružuje pločastim granuloza ćelijama, što predstavlja pripremu samih folikula za mirujuće stanje koje sledi, do njihove selektivne aktivacije u toku i pre puberteta (Adhikari et Liu 2009; Eppig and Handel, 2012). Pravilno formirani primordijalni folikuli su u stanju da u mirovanju provedu dug vremenski period (kod pacova su u pitanju nedelje, a kod ljudi godine) do aktivacije u periodu puberteta (Adhikari i Liu 2009; Eppig i Handel, 2012). Snižen nivo inhibitornih faktora ili povišenje nivoa faktora aktivacije, dovode do dva moguća scenarija kada su u pitanju primordijalni folikuli: njihov dalji rast i diferencijacija u primarne folikule ili programirana ćelijska smrt (Reddy i sar, 2010). Trend smanjenja broja primordijalnih folikula 7. dana po rođenju verovatno je posledica njihove dalje diferencijacije u primarne folikule, odnosno ubrzanim sazrevanjem jajnika, što je potvrđeno i kod neonatalno tretiranih pacova žrtvovanih 38. dana po rođenju (Talsness i sar, 2008), kao i kod miševa koji su postnatalno, od dana rođenja, tretirani sa PTU (Chan i Ng, 1995). Povećan broj primarnih i sekundarnih folikula uočen kod hipotiroidnih mladunaca starosti 7 dana ide u prilog ubrzanoj folikulogenezi, što ima za posledicu intenzivirano uklanjanje folikula. To je potvrđeno kod tretiranih pacova starosti 15, 30 i 60 dana u istovetnom modelu maternalnog hipotiroidizma, gde je uočeno povećanje broja atretičnih folikula u svim navedenim uzrasnim kategorijama u poređenju sa odgovarajućom kontrolom (Radovanović, 2003; Radovanović, 2012). Povećan broj sekundarnih folikula u jajnicima pacova koji su dobijali PTU tokom infantilnog i juvenilnog perioda, sa svega dva do tri sloja granuloza ćelija (Dijkstra i sar, 1996) je takođe u skladu sa rezultatima dobijenim u jajnicima mladunaca 7. dana (Luković i sar, 2016). Folikuli pokazuju i ubrzano sazrevanje na šta ukazuje njihovo nepotpuno razvijanje, u smislu da se kod onih koji poseduju 3-5 slojeva granuloza ćelija već uočava začetak antralne šupljine. Prevrmena

aktivacija folikula je štetna za održavanje funkcije jajnika u reproduktivnom periodu, čemu ide u prilog intenzivna aktivacija oocita sa uklanjanjem folikula u ranom periodu maturacije, opisana kod miševa sa specifičnom delecijom *Pten* gena (Reddy i sar, 2008). Ova studija je pokazala da, u slučaju hipotiroidizma, ovaj proces započinje znatno ranije kod većeg broja folikula što navodi na zaključak da smanjenje koncentracije TH vodi u povećanu proliferaciju granulosa ćelija i diferencijaciju nestova u primordijalne folikule.

Oocite i granulosa ćelije primordijalnih folikula jajnika hipotiroidnih pacova starih 4 i 7 dana se karakterišu izmenjenom morfologijom sER i mitohondrija, dok kondenzacija nukleusa i drugi znaci apoptoze (uvrati membrane, apoptotska tela, itd), nisu uočeni na subćelijskom nivou što ukazuje da ove ultrastrukturne promene nisu povezane sa neposrednom realizacijom ćelijske smrti. U prilog tome ide i mali broj oocita u primordijalnim folikulima u jajnicima hipotiroidnih životinja koje su pozitivne na markere apoptoze, kao i minimalna razlika u njihovom broju između tretiranih i kontrolnih životinja starosti 4 i 7 dana (Luković i sar, 2016).

Povišen nivo PCNA zapažen je u oocitama i granulosa ćelijama primordijalnih folikula u jajnicima tretirane grupe mladunaca starosti 4 dana, iako je većina primordijalnih folikula u ovom periodu razvića jajnika u stanju mirovanja, u kome ostaju do početka puberteta. Izgleda da hipotiroidizam kod mladih jedinki ometa folikulogenezu, ali ne kroz remećenje proliferacije već diferencijacije granulosa ćelija (Dijkstra i sar, 1996). U prilog tome ide činjenica da granulosa ćelije tokom perioda mirovanja primordijalnih folikula ne ekspimiraju PCNA (Picut i sar, 2008), niti ugrađuju BrdU (Fenwick i Hurst, 2002). Takođe, prethodno dobijeni rezultati jasno ukazuju na odsustvo ekspresije PCNA u oocitama i granulosa ćelijama primordijalnih folikula u jajnicima prepubertalnih pacova, i početka njegove imunoekspresije u primarnim folikulima, što ga kvalifikuje da se može smatrati ranim markerom rasta folikula (Oktay et al, 1995). Upravo mirovanje granulosa ćelija, u smislu odsustva proliferativne aktivnosti, ima za posledicu održavanje primordijalnih folikula u mirujućem stanju (McGee i Hsueh, 2000), što je u skladu sa našim rezultatom kada je u pitanju kontrolna grupa mladunaca obe uzrasne kategorije. Moguće objašnjenje za eksplozivnu proliferaciju u granulosa ćelijama posle rođenja do 7. dana može biti u činjenici da oocite, za razliku od svojih prethodnika, ne sprečavaju granulosa ćelije u njihovom rastu ili ga čak podstiču (Balla i sar, 2008). Po ovoj grupi naučnika, germinativne ćelije su te čija se kintetika prvo menja u jajniku u smislu podsticanja ili odlaganja proliferacije, dok granulosa ćelije sa malim zakašnjenjem prate taj ritam. Sa druge strane, treba imati u vidu i važnu ulogu

PCNA u sintezi i reparaciji DNK, kao i u kontroli progresije ćelijskog ciklusa (Jaskulski i sar, 1988). Stoga se može pretpostaviti da je imunoekspresija PCNA indikator reparativnih procesa u granulosa ćelijama i oocitama primordijalnih folikula u jajnicima hipotiroidnih pacova starosti 4 dana.

Dilatacija sER zapažena u jajnicima hipotiroidnih pacova 4. dana ukazuje na odgovor oocita na stres u smislu izmenjenog metaboličkog statusa kao posledice nedostatka TH. U prilog ovoj pretpostavci ide i slika izmenjene morfologije mitohondrija, koje se karakterišu većom fluidnošću membrana usled izmenjenog sastava masnih kiselina (Brookes i sar, 1998). Promene u sastavu masnih kiselina i uopšte izmenjen lipidni status ER rezultira inhibicijom aktivnosti kalcijum ATP-aze sarko/endoplazminog retikuluma (*eng. SERCA, sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*), dovodi do stresa sER i dilatacije njegovih cisterni (Fu i sar, 2011). Osim promena na membranama, u cilju odgovora na stres ER, dolazi do porasta sinteze dekuplovanog proteina stresa (UPR) što dovodi do povećanja volumena ER kao posledice akumuliranja sadržaja njegovih cisterni (Schontal, 2012). Navedene morfološke promene sER se na ultrastrukturnom nivou uočavaju kao masivna vakuolizacija i prethode autofagnoj ćelijskoj smrti oocita primordijalnih folikula u jajnicima odraslih pacova (Sánchez i sar, 2012). Izmenjena funkcija sER dovodi do poremećaja funkcije mitohondrija i posledični disbalans homeostaze Ca^{++} (Báthori i sar, 2006; Sano i sar, 2009). Kalcijumovi joni (Ca^{++}) su jedni od glavnih signalnih igrača koji regulišu različite aspekte ćelijskih funkcija, uključujući progresiju ćelijskog ciklusa, zaustavljanje, i apoptozu u širokom spektru ćelija (Tiwari i sar, 2016.). U slučaju jajne ćelije sisara pokazano je da Ca^{++} ima značajnu ulogu u nastavljanju i/ili zaustavljanju mejoze koje može voditi u apoptozu.

Naši rezultati histohemijskog bojenja jajnika Alizarin Red su pokazali intenzivnu reakciju na prisustvo Ca^{++} kod hipotiroidnih pacova starosti 4 dana, a što se može dovesti u vezu sa svakom od navedenih uloga Ca^{++} u oogenezi. Naime, kako je pokazano od strane Tiwari i saradnika (2016), oslobađanje Ca^{++} iz unutrašnjih depoa ili njihov priliv iz okoloćelijske sredine u umerenim koncentracijama podstiče MPF destabilizaciju i nastavak mejoze, dok veće koncentracije vode zaustavljanju mejoze i pokretanju programa umiranja. Ovo se u potpunosti slaže i sa našim rezultatima (Luković i sar, 2016) s obzirom da smo pokazali da hipotiroidizam izaziva značajnu dilataciju i vezikulaciju sER i ukazuje da je ova organela jedan od značajnih izvora Ca^{++} . Drugi važan depo Ca^{++} jesu mitohondrije.

Iako u ovoj studiji nije eksplicitno pokazano, prethodna istraživanja su pokazala da je izmenjena morfologija mitohondrija u direktnoj vezi sa poremećajem njihove funkcije (Galloway i Yoon, 2012) i ćelije sa takvim mitohondrijama su podložnije apoptotskoj ćelijskoj smrti (Shutt i McBride, 2013). U jajnicima pacova uzrasta 4 i 7 dana po rođenju nisu uočene takve posledice izmenjene funkcije mitohondrija (Luković i sar, 2016), ali su one potvrđene u jajnicima hipotiroidnih pacova starosti 15, 30 i 60 dana, kada je uočen povećan broj atretičnih folikula (Radovanović, 2003). Moguće objašnjenje leži u činjenici da je u oocitama primordijalnih folikula ovog uzrasta, mitohondrijalna aktivnost manja u odnosu na kasnije faze folikulogeneze (Dumollard i sar, 2006), a promena u morfologiji mitohondrija prethodi aktivaciji kaskade kaspaza koje realizuju proces apoptoze (Galloway i Yoon, 2012). Takođe, može se pretpostaviti da oocyte primordijalnih folikula u jajnicima hipotiroidnih pacova starosti 4 dana, ne podležu apoptotskoj ćelijskoj smrti sve dok ne budu izložene delovanju LH i FSH, koji imaju stimulatívno delovanje na potrošnju glukoze i anabolički status folikula (Sutton-McDowall i sar, 2010). Ovo anaboličko stanje, u slučaju hipotiroidizma i promenjene morfologije sER i mitohondrija, dovodi do neizbežne apoptoze oocita i granuloza ćelija i atrezije folikula (Radovanović i sar, 2012). Izmenjen oblik mitohondrija je takođe zabeležen i u neonatalnim, infantilnim i pubertalnim neuronima malog mozga, kao posledica maternalnog hipotiroidizma, što se povezuje sa oslobađanjem pro-apoptoskih proteina u toku postnatalne neurogeneze (Singh i sar, 2003). Iz ovoga se može izvesti zaključak da promene koje nastaju na tkivima i ćelijama u ovom periodu, a uključuju alteraciju sER i mitohondrije, disbalans Ca^{++} i osetljivost ćelija na apoptozu, ne mogu biti otklonjene u kasnijem postnatalnom razviću. Takođe, dobijeni rezultati da su apoptotske promene uočljive samo na primarnim i sekundarnim folikulima koji su predodređeni za eliminaciju u prvom talasu folikulogeneze, ukazuju da hipotiroidizam ne utiče na ovaj proces.

6. ZAKLJUČAK

Osnovni zaključak ove teze jeste da indukovani maternalni hipotiroidizam dovodi do promena u jajnicima u smislu poremećaja formiranja folikula koja može imati za posledicu poremećaj njihove funkcije kod odraslih jedinki. Jajnici mladunaca na rođenju se karakterišu intenziviranom eliminacijom oogonija i oocita kroz formiranje Z-ćelija (sekundarna nekroza) kao i podsticanjem autofagije. Pretpostavka je da većina oocita u jajnicima hipotiroidnih mladunaca koje preživljavaju, a eksprimiraju PCNA, su u procesu ubrzane maturacije citoplazme. Ovakve promene u citoplazmi dovode do preranog formiranja primordijalnih folikula, što je potvrđeno u jajnicima hipotiroidnih pacova starosti 4 i 7 dana. Promene na sER i mitohondrijama u prerano formiranim primordijalnim folikulima jajnika ovih mladunaca, koje nastaju kao posledica hipotiroidizma majki, su bez kliničkih znakova u toku perioda rane postnatalne folikulogeneze ali mogu biti potencijalni uzrok reproduktivnih problema u periodu polne zrelosti. Sve to ukazuje na ubranu folikulogenezu praćenu privremenom rezistencijom na apoptozu uzrokovanu maternalnim hipotiroidizmom u ovom uzrastu.

7. LITERATURA

- Abalovich, M., Gutierrez, S., Alcaraz, G., Maccallini, G., Garcia, A., & Levalle, O. (2002). Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid*, *12*(1), 63-68.
- Adashi, E. Y. (1998). The IGF family and folliculogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, *39*(1), 13-19.
- Adhikari, D., & Liu, K. (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*, *30*(5), 438-464.
- Adhikari, D., Zheng, W., Shen, Y., Gorre, N., Hämäläinen, T., Cooney, A. J., Huhtaniemi, I., Lan, Z. J. & Liu, K. (2010). Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*, *19*(3), 397-410.
- Aghajanova, L., Lindeberg, M., Carlsson, I. B., Stavreus-Evers, A., Zhang, P., Scott, J. E., Hovatta, O. & Skjöldebrand-Sparre, L. (2009). Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue. *Reproductive Biomedicine Online*, *18*(3), 337-347.
- Aitken, R. J., & Koppers, A. J. (2011). Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, *13*(1), 36-42.
- Albamonte, M. S., Willis, M. A., Albamonte, M. I., Jensen, F., Espinosa, M. B., & Vitullo, A. D. (2008). The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ-cell-specific VASA protein, BCL-2/BAX expression balance and apoptosis. *Human Reproduction*, *23*(8), 1895-1901.
- Albertini, D. F. (2011). A cell for every season: the ovarian granulosa cell. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *28*(10), 877-878.
- Albrecht, K. H., & Eicher, E. M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental Biology*, *240*(1), 92-107.
- Albrecht, K. H., Young, M., Washburn, L. L., & Eicher, E. M. (2003). Sry expression level and protein isoform differences play a role in abnormal testis development in C57BL/6J mice carrying certain Sry alleles. *Genetics*, *164*(1), 277-288.
- Amsterdam, A., and Rotmensch, S. (1987). Structure function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocrine Reviews* *8*, 309–337.

- Anderson, R. A., McLaughlin, M., Wallace, W. H. B., Albertini, D. F., & Telfer, E. E. (2014). The immature human ovary shows loss of abnormal follicles and increasing follicle developmental competence through childhood and adolescence. *Human Reproduction*, *29*(1), 97-106.
- Aranda, A., & Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*, *81*(3), 1269-1304.
- Auguste, A., Chassot, A. A., Grégoire, E. P., Renault, L., Pannetier, M., Treier, M., Pailhoux, E. & Chaboissier, M. C. (2011). Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. *Sexual Development*, *5*(6), 304-317.
- Bagavandoss, P., England, B., Asirvatham, A., & Bruot, B. C. (1998). Transient induction of polycystic ovary-like syndrome in immature hypothyroid rats. *Experimental Biology and Medicine*, *219*(1), 77-84.
- Bajoria, R., & Fisk, N. M. (1998). Permeability of human placenta and fetal membranes to thyrotropin-stimulating hormone in vitro. *Pediatric Research*, *43*(5), 621-628.
- Baker, T. G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *158*(972), 417-433.
- Baker, T. G., & Franchi, L. L. (1967). The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *Journal of Cell Science*, *2*(2), 213-224.
- Bakken, A. H., & McClanahan, M. (1978). Patterns of RNA synthesis in early meiotic prophase oocytes from fetal mouse ovaries. *Chromosoma*, *67*(1), 21-40.
- Balla, A., Danilovich, N., Yang, Y., & Sairam, M. R. (2003). Dynamics of ovarian development in the FORKO immature mouse: structural and functional implications for ovarian reserve. *Biology of Reproduction*, *69*(4), 1281-1293.
- Balla, M., Angelopoulou, R., Lavranos, G., & Kittas, C. (2008). Follicular cells versus oocytes: cell population dynamics in the developing ovary. *Tissue and Cell*, *40*(5), 373-381.
- Barth, J. M. I., Szabad, J., Hafen, E., & Köhler, K. (2011). Autophagy in Drosophila ovaries is induced by starvation and is required for oogenesis. *Cell Death & Differentiation*, *18*(6), 915-924.

- Berbel, P., Navarro, D., & Román, G. C. (2016). An evo-devo approach to thyroid hormones in cerebral and cerebellar cortical development: etiological implications for autism. *Thyroid Hormone in Brain and Brain Cells*, 5, 8-31.
- Bassett, J. D., Harvey, C. B., & Williams, G. R. (2003). Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 213(1), 1-11.
- Báthori, G., Csordás, G., Garcia-Perez, C., Davies, E., & Hajnóczky, G. (2006). Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17347-17358.
- Beaumont, H. M., & Mandl, A. M. (1962). A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 155(961), 557-579.
- Behrooz, H. G., Tohidi, M., Mehrabi, Y., Behrooz, E. G., Tehranidoost, M., & Azizi, F. (2011). Subclinical hypothyroidism in pregnancy: intellectual development of offspring. *Thyroid*, 21(10), 1143-1147.
- Benhadi, N., Wiersinga, W. M., Reitsma, J. B., Vrijkotte, T. G. M., & Bonse, G. J. (2009). Higher maternal TSH levels in pregnancy are associated with increased risk for miscarriage, fetal or neonatal death. *European Journal of Endocrinology*, 160(6), 985-991.
- Berardinelli, P., Russo, V., Martelli, A., Nardinocchi, D., Di Giacinto, O., Barboni, B., & Mattioli, M. (2004). Colocalization of DNA fragmentation and caspase-3 activation during atresia in pig antral follicles. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 33(1), 23-27.
- Bergamini, E., Cavallini, G., Donati, A., & Gori, Z. (2003). The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(5), 203-208.
- Bernard, P., Ryan, J., Sim, H., Czech, D. P., Sinclair, A. H., Koopman, P., & Harley, V. R. (2011). Wnt signaling in ovarian development inhibits Sfl activation of Sox9 via the Tesco enhancer. *Endocrinology*, 153(2), 901-912.
- Berridge, M. J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32(5), 235-249.

- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Lipp, P. (1998). Calcium—a life and death signal. *Nature*, 395(6703), 645-648.
- Bianco, A. C., & Silva, J. E. (1987). Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 79(1), 295.
- Bianco, A. C., Sheng, X. Y., & Silva, J. E. (1988). Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18168-18175.
- Biason-Lauber, A., De Filippo, G., Konrad, D., Scarano, G., Nazzaro, A., & Schoenle, E. J. (2007). WNT4 deficiency—a clinical phenotype distinct from the classic Mayer–Rokitansky–Kuster–Hauser syndrome: a case report. *Human Reproduction*, 22(1), 224-229.
- Biederbick, A., Kern, H. F., & Elsässer, H. P. (1995). Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *European Journal of Cell Biology*, 66(1), 3-14.
- Boya, P., González-Polo, R. A., Casares, N., Perfettini, J. L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P. & Pierron, G. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and Cellular biology*, 25(3), 1025-1040.
- Bravo, R., & Macdonald-Bravo, H. (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *The Journal of Cell Biology*, 105(4), 1549-1554.
- Braw-Tal, R., & Roth, Z. (2005). Gene expression for LH receptor, 17 α -hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction*, 129(4), 453-461.
- Bristol-Gould, S. K., Kreeger, P. K., Selkirk, C. G., Kilen, S. M., Cook, R. W., Kipp, J. L., Shea, L. D., Mayo, K. E. & Woodruff, T. K. (2006). Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Developmental Biology*, 298(1), 132-148.

- Britt, K. L., Saunders, P. K., McPherson, S. J., Misso, M. L., Simpson, E. R., & Findlay, J. K. (2004). Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biology of Reproduction*, *71*(5), 1712-1723.
- Brookes, P. S., Land, J. M., Clark, J. B., & Heales, S. J. (1998). Peroxynitrite and brain mitochondria: evidence for increased proton leak. *Journal of Neurochemistry*, *70*(5), 2195-2202.
- Bruni, J. F., Dibbet, J., & Meites, J. (1975). Effects of hyper- and hypothyroidism on serum LH and FSH levels in intact and gonadectomized male and female rats. *Endocrinology*, *97*(3), 558-563.
- Buehr, M. (1997). The primordial germ cells of mammals: some current perspectives. *Experimental Cell Research*, *232*(2), 194-207.
- Bullejos, M., & Koopman, P. (2004). Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Molecular Reproduction and Development*, *68*(4), 422-428.
- Burgoyne, P. S., & Baker, T. G. (1985). Perinatal oocyte loss in XO mice and its implications for the aetiology of gonadal dysgenesis in XO women. *Journal of Reproduction and Fertility*, *75*(2), 633-645.
- Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death & Differentiation*, *8*(6).
- Butler-Browne, G. S., Herlicoviez, D., & Whalen, R. G. (1984). Effects of hypothyroidism on myosin isozyme transitions in developing rat muscle. *FEBS Letters*, *166*(1), 71-75.
- Byskov, A. G., & Lintern-Moore, S. (1973). Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovarii. *Journal of Anatomy*, *116*(Pt 2), 207.
- Byskov, A. G., & Rasmussen, G. (1973). Ultrastructural studies of the developing follicle. *The Development and Maturation of the Ovary and its Function*, 55-62.
- Byskov, A. G., & Hoyer, P. E. (1994). Embryology of mammalian gonads and ducts. *The Physiology of Reproduction*, *1*, 487-540.
- Byskov, A. G., Guoliang, X., & Andersen, C. Y. (1997). The cortex-medulla oocyte growth pattern is organized during fetal life: an in-vitro study of the mouse ovary. *Molecular Human Reproduction*, *3*(9), 795-800.

- Calvo, R., Obregon, M. J., Ruiz de Ona, C., Ferreiro, F., del Rey, E., de Escobar, G. M. (1990). Thyroid hormone economy in pregnant rats near term: A “physiological” animal model of nonthyroidal illness? *Endocrinology*, *127*(1), 10-16.
- Campbell, B. K., Telfer, E. E., Webb, R., & Baird, D. T. (2004). Evidence of a role for follicle-stimulating hormone in controlling the rate of preantral follicle development in sheep. *Endocrinology*, *145*(4), 1870-1879.
- Capen C. 1996. Toxic responses of the endocrine system. *In: Klaassen, CD editor. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, 5th ed.* New York: McGraw-Hill. p 623–624.
- Carretero, J., Sánchez, F., Torres, J. L., Blanco, E., Riesco, J. M., & Vázquez, R. (2011). Study of h-TSH immunoreactive adenohypophyseal cells following treatment with methimazole. *Histology and Histopathology: Cellular and Molecular Biology*, *4*(1), 71-76.
- Casey, B. M., & Leveno, K. J. (2006). Thyroid Disease in Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, *108*(5), 1283-1292.
- Chan, S., & Kilby, M. D. (2000). Thyroid hormone and central nervous system development. *Journal of Endocrinology*, *165*(1), 1-8.
- Chan, W. Y., & Ng, T. B. (1995). Effect of hypothyroidism induced by propylthiouracil and thiourea on male and female reproductive systems of neonatal mice. *Journal of Experimental Zoology*, *273*(2), 160-169.
- Chang, M. H., Karageorgos, L. E., & Meikle, P. J. (2002). CD107a (LAMP-1) and CD107b (LAMP-2). *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, *16*(2), 147.
- Chaube, S. K., Prasad, P. V., Thakur, S. C., & Shrivastav, T. G. (2005a). Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro. *Apoptosis*, *10*(4), 863-874.
- Chaube, S. K., Prasad, P. V., Thakur, S. C., & Shrivastav, T. G. (2005b). Estradiol protects clomiphene citrate-induced apoptosis in ovarian follicular cells and ovulated cumulus-oocyte complexes. *Fertility and Sterility*, *84*, 1163-1172.
- Chaube, S. K., Khatun, S., Misra, S. K., & Shrivastav, T. G. (2008). Calcium ionophore-induced egg activation and apoptosis are associated with the generation of intracellular hydrogen peroxide. *Free Radical Research*, *42*(3), 212-220. Chaube, S. K., Tripathi, A., Khatun, S.,

- Mishra, S. K., Prasad, P. V., & Shrivastav, T. G. (2009). Extracellular calcium protects against verapamil-induced metaphase-II arrest and initiation of apoptosis in aged rat eggs. *Cell Biology International*, 33(3), 337-343.
- Chaube, S. K., Shrivastav, T. G., Prasad, S., Tiwari, M., Tripathi, A., Pandey, A. N., & Premkumar, K. V. (2014a). Clomiphene citrate induces ROS-mediated apoptosis in mammalian oocytes. *Open Journal of Apoptosis*, 2014.
- Chaube, S. K., Shrivastav, T. G., Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., & Pandey, A. K. (2014b). Neem (*Azadirachta indica* L.) leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals. *Springer Plus*, 3(1), 1.
- Chen, Y., Jefferson, W. N., Newbold, R. R., Padilla-Banks, E., & Pepling, M. E. (2007). Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology*, 148(8), 3580-3590.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J., & Gibson, S. B. (2008). Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death & Differentiation*, 15(1), 171-182.
- Cheng, S. Y., Gong, Q. H., Parkison, C., Robinson, E. A., Appella, E., Merlino, G. T., & Pastan, I. (1987). The nucleotide sequence of a human cellular thyroid hormone binding protein present in endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 262(23), 11221-11227.
- Cheng, S. Y. (1991). Interaction of thyroid hormone with cytosol proteins. *Wu S.-Y. Thyroid Hormone Metabolism: Regulation and Clinical Implications*. (Blackwell, Boston), 145-166.
- Cheung, C. Y. (1983). Prolactin suppresses luteinizing hormone secretion and pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone by a direct action at the anterior pituitary. *Endocrinology*, 113(2), 632-638.
- Childs, A. J., & Anderson, R. A. (2009). Activin A selectively represses expression of the membrane-bound isoform of Kit ligand in human fetal ovary. *Fertility and Sterility*, 92(4), 1416-1419.

- Choksi, N. Y., Jahnke, G. D., St Hilaire, C., & Shelby, M. (2003). Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 68(6), 479-491.
- Choi, J. Y., Jo, M. W., Lee, E. Y., Yoon, B. K., & Choi, D. S. (2010). The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2532-2537.
- Chuma, S., & Nakatsuji, N. (2001). Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Developmental Biology*, 229(2), 468-479.
- Ciechomska, I. A., Goemans, G. C., Skepper, J. N., & Tolkovsky, A. M. (2009). Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene*, 28(21), 2128-2141.
- Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*, 181(3), 195-213.
- Cleary-Goldman, J., Malone, F. D., Lambert-Messerlian, G., Sullivan, L., Canick, J., Porter, T. F., Luthy, D., Gross, S., Bianchi, D. W. & D'Alton, M. E. (2008). Maternal thyroid hypofunction and pregnancy outcome. *Obstetrics & Gynecology*, 112(1), 85-92.
- Cohen, P. E., Pollack, S. E., & Pollard, J. W. (2006). Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocrine Reviews*, 27(4), 398-426.
- Cohen, P. E., & Holloway, J. K. (2010). Predicting gene networks in human oocyte meiosis. *Biology of Reproduction*, 82(3), 469-472.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Serafina Ristaldi, M., Marzella, R., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Shlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A. & Pilia, G. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics*, 27(2), 159-166.
- Danilović Luković J., Korać A., Milošević, I., Lužajić T., Milanović, Z., Kovačević Filipović, M., Radovanović, A. (2017). Z-cells and oogonia/oocytes in advanced process of autophagy are dominant altered cells in ovaries of hypothyroid newborn rats. *Acta Veterinaria Beograd*, in press. DOI:10.1515/acve-2017-0009.

- Da Silva-Buttkus, P., Marcelli, G., Franks, S., Stark, J., & Hardy, K. (2009). Inferring biological mechanisms from spatial analysis: prediction of a local inhibitor in the ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(2), 456-461.
- Davis, P. J., & Davis, F. B. (2003). Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*, *12*(6), 459-466.
- Davis, P. J., Goglia, F., & Leonard, J. L. (2016). Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nature Reviews Endocrinology*.
- De Cuevas, M., Lilly, M. A., & Spradling, A. C. (1997). Germline cyst formation in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, *31*(1), 405-428.
- de Escobar, G. M., Obregón, M. J., & del Rey, F. E. (2004). Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *18*(2), 225-248.
- De Felici, M., Klinger, F. G., Farini, D., Scaldaferrri, M. L., Iona, S., & Lobascio, M. (2005). Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reproductive Biomedicine Online*, *10*(2), 182-191.
- De Felici, M., Lobascio, A. M., & Klinger, F. G. (2008). Cell death in fetal oocytes: many players for multiple pathways. *Autophagy*, *4*(2), 240-242.
- De Felici, M. (2010). Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. *Molecular Human Reproduction*, *16*(9), 632-636.
- de Vries, F. A., de Boer, E., van den Bosch, M., Baarends, W. M., Ooms, M., Yuan, L., Liu, J. G., van Zeeland, A. A., Heyting, C. & Pastink, A. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes & Development*, *19*(11), 1376-1389.
- De Luise, M., & Flier, J. S. (1983). Status of the red cell Na, K-pump in hyper-and hypothyroidism. *Metabolism*, *32*(1), 25-30.
- Depalo, R., Nappi, L., Loverro, G., Bettocchi, S., Caruso, M. L., Valentini, A. M., & Selvaggi, L. (2003). Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Human Reproduction*, *18*(12), 2678-2682.
- De Pol, A., Marzona, L., Vaccina, F., Negro, R., Sena, P., & Forabosco, A. (1997). Apoptosis in different stages of human oogenesis. *Anticancer Research*, *18*(5A), 3457-3461.

- Devine, P. J., Payne, C. M., McCuskey, M. K., & Hoyer, P. B. (2000). Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, *63*(5), 1245-1252.
- D'Herde, K., De Prest, B., & Roels, F. (1996). Subtypes of active cell death in the granulosa of ovarian atretic follicles in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reproduction Nutrition Development*, *36*(2), 175-189.
- Dijkstra, G., de Rooij, D. G., de Jong, F. H., & van den Hurk, R. (1996). Effect of hypothyroidism on ovarian follicular development, granulosa cell proliferation and peripheral hormone levels in the prepubertal rat. *European Journal of Endocrinology*, *134*(5), 649-654.
- Dumollard, R., Duchen, M., & Sardet, C. (2006, April). Calcium signals and mitochondria at fertilisation. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 17, No. 2, pp. 314-323). Academic Press.
- Dussault, J. H., Coulombe, P., & Walker, P. (1982). Effects of neonatal hyperthyroidism on the Development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the Rat. *Endocrinology*, *110*(3), 1037-1042.
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, *30*(6), 624-712.
- Eicher, E. M., & Washburn, L. L. (1983). Inherited sex reversal in mice: Identification of a new primary sex-determining gene. *Journal of Experimental Zoology*, *228*(2), 297-304.
- El Baba, K. A., & Azar, S. T. (2012). Thyroid dysfunction in pregnancy. *International Journal of General Medicine*, *5*, 227-230.
- El-Mansoury, M., Bryman, I., Berntorp, K., Hanson, C., Wilhelmsen, L., & Landin-Wilhelmsen, K. (2005). Hypothyroidism is common in Turner syndrome: results of a five-year follow-up. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *90*(4), 2131-2135.
- Epenetos, A. A., Travers, P., Gatter, K. C., Oliver, R. D., Mason, D. Y., & Bodmer, W. F. (1984). An immunohistological study of testicular germ cell tumours using two different monoclonal antibodies against placental alkaline phosphatase. *British Journal of Cancer*, *49*(1), 11.
- Epenetos, A. A., Hooker, G., Durbin, H., Bodmer, W. F., Snook, D., Begent, R., Oliver, R. T. D. & Lavender, J. P. (1985). Indium-111 labelled monoclonal antibody to placental alkaline

- phosphatase in the detection of neoplasms of testis, ovary, and cervix. *The Lancet*, 326(8451), 350-353.
- Eppig, J. J., Kozak, L. P., Eicher, E. M., & Stevens, L. C. (1977). Ovarian teratomas in mice are derived from oocytes that have completed the first meiotic division. *Nature*, 269, 517-518.
- Eppig, J. J., & O'Brien, M. J. (1996). Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*, 54(1), 197-207.
- Eppig, J. J., & Handel, M. A. (2012). Origins of granulosa cells clarified and complexified by waves. *Biology of Reproduction*, 86(2), 34.
- Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Ortiz, R., & Vazquez-Nin, G. H. (2008). Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. *Apoptosis*, 13(10), 1253-1266.
- Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Sánchez-Sánchez, L., Méndez, C., Pedernera, E., & Vázquez-Nin, G. H. (2010). Analysis of different cell death processes of prepubertal rat oocytes in vitro. *Apoptosis*, 15(4), 511-526.
- Everett, N. B. (1943). Observational and experimental evidences relating to the origin and differentiation of the definitive germ cells in mice. *Journal of Experimental Zoology*, 92(1), 49-91.
- Faddy, M. J., Gosden, R. G., Gougeon, A., Richardson, S. J., & Nelson, J. F. (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human Reproduction*, 7(10), 1342-1346.
- Fader, C. M., Sánchez, D., Furlán, M., & Colombo, M. I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic*, 9(2), 230-250.
- Farahani, H., Ghasemi, A., Roghani, M., & Zahediasl, S. (2010). The effect of maternal hypothyroidism on the carbohydrate metabolism and insulin secretion of isolated islets in adult male offspring of rats. *Hormone and Metabolic Research*, 42(11), 792-797.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical

- modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5), 836-848.
- Fenwick, M. A., & Hurst, P. R. (2002). Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction*, 124(5), 659-665.
- Flaws, J. A., Hirshfield, A. N., Hewitt, J. A., Babus, J. K., & Furth, P. A. (2001). Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*, 64(4), 1153-1159.
- Fleury, C., Mignotte, B., & Vayssière, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84(2), 131-141.
- Franchi, L. L., & Mandl, A. M. (1962). The ultrastructure of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 157(966), 99-114.
- Fu, S., Yang, L., Li, P., Hofmann, O., Dicker, L., Hide, W., Lin, X., Watkins, S. M., Ivanov, A. R. & Hotamisligil, G. S. (2011). Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*, 473(7348), 528-531.
- Fuchs, Y., & Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(6), 329-344.
- Galloway, C. A., & Yoon, Y. (2012). What comes first, misshape or dysfunction? The view from metabolic excess. *The Journal of General Physiology*, 139(6), 455-463.
- Galloway, C. A., & Yoon, Y. (2013). Mitochondrial morphology in metabolic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(4), 415-430.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Keep, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, M., Shi, Y., Simon, H-U., Vandenabeele, P., White, E., Yaun, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. & Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 19(1), 107-120.

- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Bertrand, M. J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F. K., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K-M., Di Daniele, N., Dixit, V. M., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Fimia, G. M., Flavell, R. A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M-L., Green, D. R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Hengartner, M. O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P. J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., López-Otín, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J-C., Martin, S. J., Martinou, J-C., Medema, J. P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Muñoz-Pinedo, C., Nuñez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, M., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Ravichandran, K. S., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H-U., Stockwell, B. R., Szabadkai, G., Tait, S.W., Tang, H.L., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E. F., Walczak, H., White, E., Wood, W. G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G. & Kroemer, G. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differentiation*, 22(1), 58-73.
- Gawriluk, T. R., Hale, A. N., Flaws, J. A., Dillon, C. P., Green, D. R., & Rucker, E. B. (2011). Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reproduction*, 141(6), 759-765.
- Gaytan, F., Morales, C., Leon, S., Garcia-Galiano, D., Roa, J., & Tena-Sempere, M. (2015). Crowding and Follicular Fate: Spatial Determinants of Follicular Reserve and Activation of Follicular Growth in the Mammalian Ovary. *PloS One*, 10(12), e0144099.
- Ghafari, F., Gutierrez, C. G., & Hartshorne, G. M. (2007). Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one. *BMC Developmental Biology*, 7(1), 87.
- Gondos, B. (1975). Surface epithelium of the developing ovary. Possible correlation with ovarian neoplasia. *The American Journal of Pathology*, 81(2), 303.

- Gondos, B., Westergaard, L., & Byskov, A. G. (1986). Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *155*(1), 189-195.
- Gong, D. W., He, Y., Karas, M., & Reitman, M. (1997). Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, β 3-adrenergic agonists, and leptin. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(39), 24129-24132.
- Gordo, A. C., Rodrigues, P., Kurokawa, M., Jellerette, T., Exley, G. E., Warner, C., & Fissore, R. (2002). Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in in vitro aged mouse eggs. *Biology of Reproduction*, *66*(6), 1828-1837.
- Gothié, J. D., Perret-Jeanneret, M., Remaud, S., & Demeneix, B. (2016). Thyroid Hormones and Cell Mitochondrial Metabolism Cooperate in Determining Adult Neural Stem Cell Fate. In *Neuroendocrinology* (pp. OR05-1). Endocrine Society.
- Göthe, S., Wang, Z., Ng, L., Kindblom, J. M., Barros, A. C., Ohlsson, C., Vennstrom, B. & Forrest, D. (1999). Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary–thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes & Development*, *13*(10), 1329-1341.
- Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, *17*(2), 121-155.
- Greenfeld, C. R., Pepling, M. E., Babus, J. K., Furth, P. A., & Flaws, J. A. (2007). BAX regulates follicular endowment in mice. *Reproduction*, *133*(5), 865-876.
- Greenwald, G. S. (1989). Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biology of Reproduction*, *41*(1), 175-181.
- Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Korsmeyer, S. J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(2), 1156-1163.
- Günzler, W. A., Kremers, H., & Flohé, L. (1974). An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1.11. 1.9.) in blood. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *12*(10), 444-448.

- Haanen, C., & Vermes, I. (1996). Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *64*(1), 129-133.
- Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Allan, W. C., Williams, J. R., Knight, G. J., Gagnon, J., O'Heir, C. E., Mitchell, M. L., Hermos, R. J., Waisbren, S. E., Faix, J. D. & Klein, R. Z. (1999). Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *New England Journal of Medicine*, *341*(8), 549-555
- Hahn, K. L., Johnson, J., Beres, B. J., Howard, S., & Wilson-Rawls, J. (2005). Lunatic fringe null female mice are infertile due to defects in meiotic maturation. *Development*, *132*(4), 817-828.
- Hale, A. N., Ledbetter, D. J., Gawriluk, T. R., & Rucker, III, E. B. (2013). Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy*, *9*(7), 951-972.
- Hamouli-Said, Z., Tahari, F., Hamoudi, F., & Hadj-Bekkouche, F. (2007). Comparative study of the effects of pre and post natal administration of a thyroid drug on testicular activity in adult rat. *Folia Histochemica Cytobiologica*, *45*(Suppl 1), S51-57.
- Han, Y. K., Ha, T. K., Lee, S. J., Lee, J. S., & Lee, G. M. (2011). Autophagy and apoptosis of recombinant Chinese hamster ovary cells during fed-batch culture: Effect of nutrient supplementation. *Biotechnology and Bioengineering*, *108*(9), 2182-2192.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., & Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, *441*(7095), 885-889.
- Harikae, K., Miura, K., & Kanai, Y. (2013). Early gonadogenesis in mammals: significance of long and narrow gonadal structure. *Developmental Dynamics*, *242*(4), 330-338.
- Harper, M. E., & Seifert, E. L. (2008). Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. *Thyroid*, *18*(2), 145-156.
- Hartshorne, G. M., Lyrakou, S., Hamoda, H., Oloto, E., & Ghafari, F. (2009). Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection? *Molecular Human Reproduction*, *15*(12), 805-819.
- Harvey, C. B., & Williams, G. R. (2002). Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid*, *12*(6), 441-446.

- Hermann, J., Mulner, O., Belle, R., Marot, J., Tso, J., & Ozon, R. (1984). In vivo effects of microinjected alkaline phosphatase and its low molecular weight substrates on the first meiotic cell division in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(16), 5150-5154.
- Hirshfield, A. N. (1986). Effect of a low dose of pregnant mare's serum gonadotropin on follicular recruitment and atresia in cycling rats. *Biology of Reproduction*, *35*(1), 113-118.
- Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, *124*, 43-101.
- Hirshfield, A. N. (1994). Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biology of Reproduction*, *50*(2), 421-428.
- Hirshfield, A. N., & DeSanti, A. M. (1995). Patterns of ovarian cell proliferation in rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum. *Biology of Reproduction*, *53*(5), 1208-1221.
- Hsueh, A. J., Eisenhauer, K., Chun, S. Y., Hsu, S. Y., & Billig, H. (1995). Gonadal cell apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research*, *51*, 433-55.
- Hughes, F. M Jr., Gecospe, W. C. (1991). Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: Evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, *129*(5), 2415-2422.
- Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F., Hatzirodos, N., Bonner, W., Sabatier, L., Reinhardt, D. P., Sado, Y., Ninomiya, Y., & Rodgers, R. J. (2013). A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PLoS One*, *8*(2), e55578.
- Hurst, P. R., Mora, J. M., & Fenwick, M. A. (2006). Caspase-3, TUNEL and ultrastructural studies of small follicles in adult human ovarian biopsies. *Human Reproduction*, *21*(8), 1974-1980.
- Hussein, M. R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, *11*(2), 162-178.
- Hutt, K. J. (2015). The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. *Reproduction*, *149*(2), R81-R89.

- Hyttel, P., Farstad, W., Mondain-Monval, M., Lajord, K. B., Smith, A. J. (1990). Structural components of oocyte maturation in blue fox (*Alopex lagopus*). *Anatomy Embriology* 181, 325-331.
- Hwang, S. O., & Lee, G. M. (2008). Nutrient deprivation induces autophagy as well as apoptosis in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(3), 678-685.
- Iguchi, T., Fukazawa, Y., Uesugi, Y., Takasugi, N. (1990a). Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro. *Biology of Reproduction*, 43(3), 478-484.
- Iguchi, T., Kamiya, K., Uesugi, Y., Sayama, K., & Takasugi, N. (1990b). In vitro fertilization of oocytes from polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol. *In vivo (Athens, Greece)*, 5(4), 359-363.
- Inoue, S., Watanabe, H., Saito, H., Hiroi, M., Tonosaki, A. (2000). Elimination of atretic follicles from the mouse ovary: a TEM and immunohistochemical study in mice. *Journal of Anatomy*, 196(01), 103-110.
- Insera, P. I. F., Leopardo, N. P., Willis, M. A., Freysselinard, A. L., & Vitullo, A. D. (2014). Quantification of healthy and atretic germ cells and follicles in the developing and post-natal ovary of the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus*: evidence of continuous rise of the germinal reserve. *Reproduction*, 147(2), 199-209.
- Irving-Rodgers, H. F., and Rodgers, R. J. (2000). Ultrastructure of the basal lamina of bovine ovarian follicles and its relationship to the membrana granulosa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118, 221-228.
- Ismail-Beigi, F., Bissell, D. M., & Edelman, I. S. (1979). Thyroid thermogenesis in adult rat hepatocytes in primary monolayer culture: direct action of thyroid hormone in vitro. *The Journal of General Physiology*, 73(3), 369-383.
- Jablonka-Shariff, A., & Olson, L. M. (2000). Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 55(4), 412-421.
- Jannini, E. A., Ulisse, S., D'Armiento, M. (1995). Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocrine Reviews*, 16(4), 443-459.

- Jaskulski, D., Mercer, W. E., Calabretta, B., & Baserga, R. (1988). Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science*, *240*(4858), 1544-1546.
- Jefferson, W., Newbold, R., Padilla-Banks, E., & Pepling, M. (2006). Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biology of Reproduction*, *74*(1), 161-168.
- John, G. B., Gallardo, T. D., Shirley, L. J., & Castrillon, D. H. (2008). Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Developmental Biology*, *321*(1), 197-204.
- Juriscicova, A., & Acton, B. M. (2004). Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*, *128*(3), 281-291.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, *19*(21), 5720-5728.
- Kališnik, M. (1981). Morphometry of the thyroid gland. *Stereologia Jugoslavica*, *3* (Suppl 1), pp. 547-569.
- Kawada, J., Mino, H., Nishida, M., & Yoshimura, Y. (1988). An appropriate model for congenital hypothyroidism in the rat induced by neonatal treatment with propylthiouracil and surgical thyroidectomy: studies on learning ability and biochemical parameters. *Neuroendocrinology*, *47*(5), 424-430.
- Kelkar, R. L., Dharma, S. J., & Nandedkar, T. D. (2003). Expression of Fas and Fas ligand protein and mRNA in mouse oocytes and embryos. *Reproduction*, *126*(6), 791-799.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, *26*(4), 239.
- Kezele, P., & Skinner, M. K. (2003). Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*, *144*(8), 3329-3337.

- Kipp, J. L., Kilen, S. M., Bristol-Gould, S., Woodruff, T. K., & Mayo, K. E. (2007). Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology*, *148*(5), 1968-1976.
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, *290*(5497), 1717-1721.
- Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., & Korsmeyer, S. J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, *270*(5233), 96.
- Kockx, M. M., Muhring, J., Knaapen, M. W., & De Meyer, G. R. (1998). RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *The American Journal of Pathology*, *152*(4), 885.
- Köhrle, J. (1995). Thyroid hormone deiodinases--a selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta Medica Austriaca*, *23*(1-2), 17-30.
- Konishi, I. K. U. O., Fujii, S., Okamura, H., Parmley, T., & Mori, T. (1986). Development of interstitial cells and ovigerous cords in the human fetal ovary: an ultrastructural study. *Journal of Anatomy*, *148*, 121.
- Kooistra, L., Crawford, S., van Baar, A. L., Brouwers, E. P., & Pop, V. J. (2006). Neonatal effects of maternal hypothyroxinemia during early pregnancy. *Pediatrics*, *117*(1), 161-167.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, *351*(6322), 117-121.
- Korevaar, T. I., Muetzel, R., Medici, M., Chaker, L., Jaddoe, V. W., de Rijke, Y. B., Steegers, E. A. P., Visser, T. J., White, T., Tiemeier, H. & Peeters, R. P. (2016). Association of maternal thyroid function during early pregnancy with offspring IQ and brain morphology in childhood: a population-based prospective cohort study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *4*(1), 35-43.
- Kovasc, J., Forgó, V., & Péczely, P. (1992). The fine structure of the follicular cells in growing and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell and Tissue Research*, *267*(3), 561-569.

- Krassas, G. E. (2000). Thyroid disease and female reproduction. *Fertility and Sterility*, 74(6), 1063-1070.
- Kroemer, G., & Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 1004-1010.
- Kumari, S., Rastogi, R. P., Singh, K. L., Singh, S. P., & Sinha, R. P. (2008). DNA damage: detection strategies. *EXCLI Journal*, 7, 44-62.
- Kurilo, L. F. (1981). Oogenesis in antenatal development in man. *Human Genetics*, 57(1), 86-92.
- Kurki, P., Ogata, K., & Tan, E. M. (1988). Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 109(1), 49-59.
- Langerak, P., Nygren, A. O., Krijger, P. H., van den Berk, P. C., & Jacobs, H. (2007). A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(8), 1989-1998.
- Lazar MA. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrinology Reviews* 14, 184-193.
- Lee, C. Y., Clough, E A., Yellon, P., Teslovich, T. M., Stephan, D. A., Bachrecke, E. H. N. (2003) Genome-wide analysis of steroid an aradiation-triggered programmed cell death in Drosophila. *Current Biology*, 13, 350-357.
- Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, Brenner, D. A. & Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366(1), 177-196.
- Leonard, J. L., & Koehrlle, J. (2000). Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. *In: Braverman LE, Utiger RD, editors. Werner and Ingbar's, the thyroid, 8th ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 136–173.
- Li, X., & Schimenti, J. C. (2007). Mouse pachytene checkpoint 2 (trip13) is required for completing meiotic recombination but not synapsis. *PLoS Genetics*, 3(8), e130.
- Li, Y., Shan, Z., Teng, W., Yu, X., Li, Y., Fan, C., Teng, X., Guo, R., Wang, H., Li, J., Chen, Y., Wang, W., Chawinga, M., Zhang, L., Yang, L., Zhao, Y., Hua, T. & Chen, Y. (2010). Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25–30 months. *Clinical Endocrinology*, 72(6), 825-829.

- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, *402*(6762), 672-676.
- Liew, S. H., Vaithyanathan, K., Cook, M., Bouillet, P., Scott, C. L., Kerr, J. B., Strasser, A., Findlay, J. K. & Hutt, K. J. (2014). Loss of the proapoptotic BH3-only protein BCL-2 modifying factor prolongs the fertile life span in female mice. *Biology of Reproduction*, *90*(4), 77.
- Lintern-Moore, S. U. E., & Moore, G. P. M. (1979). The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*, *20*(4), 773-778.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, *89*(2), 175-184.
- Liu, C. F., Parker, K., & Yao, H. H. C. (2010). WNT4/ β -catenin pathway maintains female germ cell survival by inhibiting activin β B in the mouse fetal ovary. *PLoS One*, *5*(4), e10382.
- Liu, Y., & Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death & Differentiation*, *22*(3), 367-376.
- Lobascio, A. M., Klinger, F. G., Scaldaferrri, M. L., Farini, D., & De Felici, M. (2007). Analysis of programmed cell death in mouse fetal oocytes. *Reproduction*, *134*(2), 241-252.
- Longcope C. (2000a). The male and female reproductive systems in thyrotoxicosis. In: *Braverman LE, Utiger RD, editors. Werner and Ingbar's, the thyroid, 8th ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 652-659.
- Longcope C. (2000b). The male and female reproductive systems in hypothyroidism. In: *Braverman LE, Utiger RD, editors. Werner and Ingbar's, the thyroid, 8th ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 824-828.
- Lotti, F., Maseroli, E., Fralassi, N., Degl'Innocenti, S., Baldi, E., & Maggi, M. (2016). PS-01-013 Associations between thyroid hormones, ejaculatory machinery and semen parameters: possible mechanisms. *The Journal of Sexual Medicine*, *13*(5), S80.
- López, M., Alvarez, C. V., Nogueiras, R., & Diéguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(7), 418-427.
- Lösel, R., & Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *4*(1), 46-55.

- Lu, Z., Luo, R. Z., Lu, Y., Zhang, X., Yu, Q., Khare, S., Kondo, S., Kondo, Y., Yu, Y., Mills, G. B., Liao, W. S. L. & Bast, R. C. J. (2008). The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(12), 3917-3929.
- Luković, J. D., Korać, A., Milošević, I., Lužajić, T., Puškaš, N., Filipović, M. K., & Radovanović, A. (2016). Altered state of primordial follicles in neonatal and early infantile rats due to maternal hypothyroidism: Light and electron microscopy approach. *Micron*, 90, 33-42.
- Luo, S., & Rubinsztein, D. C. (2007). Atg5 and Bcl-2 provide novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1247-1249.
- Ma, W., Zhang, D., Hou, Y., Li, Y. H., Sun, Q. Y., Sun, X. F., & Wang, W. H. (2005). Reduced expression of MAD2, BCL2, and MAP kinase activity in pig oocytes after in vitro aging are associated with defects in sister chromatid segregation during meiosis II and embryo fragmentation after activation. *Biology of Reproduction*, 72(2), 373-383.
- Ma, L., Qi, H., Chai, X., Jiang, F., Mao, S., Liu, J., Zhang, S., Lian, X, Sun, X, Wang, D., Ren, J. & Yan, Q. (2016). The effects of screening and intervention of subclinical hypothyroidism on pregnancy outcomes: a prospective multicenter single-blind, randomized, controlled study of thyroid function screening test during pregnancy. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 29(9), 1391-1394.
- Maatouk, D. M., DiNapoli, L., Alvers, A., Parker, K. L., Taketo, M. M., & Capel, B. (2008). Stabilization of β -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Human Molecular Genetics*, 17(19), 2949-2955.
- Maheshwari, A., & Fowler, P. A. (2008). Primordial follicular assembly in humans—revisited. *Zygote*, 16(04), 285-296.
- Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J. A., Geneste, O., & Kroemer, G. (2007a). Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO journal*, 26(10), 2527-2539.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007b). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 741-752.

- Maiuri, M. C., Criollo, A., & Kroemer, G. (2010). Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *The EMBO Journal*, 29(3), 515-516.
- Makrigiannakis, A., Coukos, G., Christofidou-Solomidou, M., Gour, B. J., Radice, G. L., Blaschuk, O., & Coutifaris, C. (1999). N-cadherin-mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis: a role in follicular atresia and luteolysis? *The American Journal of Pathology*, 154(5), 1391-1406.
- Malamed, S., Gibney, J. A., & Ojeda, S. R. (1992). Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell and Tissue Research*, 270(1), 87-93.
- Manabe, N., Goto, Y., Matsuda-Minehata, F., Inoue, N., Maeda, A., Sakamaki, K., Miyano, T. (2004). Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cells apoptosis during atresia. *Journal of Reproduction and Development*, 50(5), 493-514.
- Manuylov, N. L., Smagulova, F. O., Leach, L., & Tevosian, S. G. (2008). Ovarian development in mice requires the GATA4-FOG2 transcription complex. *Development*, 135(22), 3731-3743.
- Maran, R. R. M., Sivakumar, R., Arunakaran, J., Ravisankar, B., Ravichandran, K., Sidharthan, V., Jeyaraj D. A., & Aruldas, M. M. (1999). Duration-dependent effect of transient neonatal hypothyroidism on Sertoli and germ cell number, and plasma and testicular interstitial fluid androgen binding protein concentration. *Endocrine Research*, 25(3-4), 323-340.
- Martin, D. N., & Baehrecke, E. H. (2004). Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development*, 131(2), 275-284.
- Martinez, F. (2016). Thyroid hormones and heart failure. *Heart Failure Reviews*, 21(4), 361-364.
- Marty, M. S., Crissman, J. W., & Carney, E. W. (1999). Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17beta-estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor. *Toxicological Sciences*, 52(2), 269-277.
- Maruo, T., Hayashi, M., Matsuo, H., Yamamoto, T., Okada, H., Mochizuki, M. (1987). The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 121(4), 1233-1241.

- Mason, A. J., Hayflick, J. S., & Zoeller, R. T. (1986). W. S 3rd Young, HS Phillips, K. Nikolics, and PH Seeburg. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science*, *234*, 1366-1371.
- Masui, Y., & Clarke, H. J. (1979). Oocyte maturation. *International Review of Cytology*, *57*, 185-282.
- Matikainen, T., Perez, G. I., Zheng, T. S., Kluzak, T. R., Rueda, B. R., Flavell, R. A., & Tilly, J. L. (2001). Caspase-3 Gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary 1. *Endocrinology*, *142*(6), 2468-2480.
- Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., & Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, *58*(1), 44-50.
- Matsui, Y., Zsebo, K., & Hogan, B. L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, *70*(5), 841-847.
- Mattheij, J. A. M., Swarts, J. J. M., Lokerse, P., Van Kampen, J. T., & Van der Heide, D. (1995). Effect of hypothyroidism on the pituitary-gonadal axis in the adult female rat. *Journal of Endocrinology*, *146*(1), 87-94.
- Mauleon, P., & Mariana, J. C. (1969). Oogenesis and folliculogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 187-215.
- Maxfield, F. R., Willingham, M. C., Pastan, I., Dragsten, P., & Cheng, S. Y. (1981). Binding and mobility of the cell surface receptors for 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine. *Science*, *211*(4477), 63-65.
- Maycotte, P., Guemez-Gamboa, A., & Moran, J. (2010). Apoptosis and autophagy in rat cerebellar granule neuron death: Role of reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience Research*, *88*(1), 73-85.
- Mazaud, S., Guigon, C. J., Lozach, A., Coudouel, N., Forest, M. G., Coffigny, H., & Magre, S. (2002). Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal γ -irradiation. *Endocrinology*, *143*(12), 4775-4787.
- Mazzalupo, S., & Cooley, L. (2006). Illuminating the role of caspases during *Drosophila* oogenesis. *Cell Death & Differentiation*, *13*(11), 1950-1959.

- McClellan, K. A., Gosden, R., & Taketo, T. (2003). Continuous loss of oocytes throughout meiotic prophase in the normal mouse ovary. *Developmental Biology*, 258(2), 334-348.
- McElreavey, K., Vilain, E., Abbas, N., Herskowitz, I., & Fellous, M. (1993). A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8), 3368-3372.
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles 1. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200-214.
- McNatty, K. P., Fidler, A. E., Juengel, J. L., Quirke, L. D., Smith, P. R., Heath, D. A., Lundy, T., O'Connell, A., & Tisdall, D. J. (2000). Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163(1), 11-20.
- Meng, L., Rijntjes, E., Swarts, H., Bunschoten, A., van der Stelt, I., Keijer, J., & Teerds, K. J. (2016). Dietary-Induced Chronic Hypothyroidism Negatively Affects Rat Follicular Development and Ovulation Rate and Is Associated with Oxidative Stress. *Biology of Reproduction*, 94(4), 1-11.
- Menke, D. B., Koubova, J., & Page, D. C. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Developmental Biology*, 262(2), 303-312.
- Metz, L. D., Seidler, F. J., McCook, E. C., & Slotkin, T. A. (1996). Cardiac α -adrenergic receptor expression is regulated by thyroid hormone during a critical developmental period. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28(5), 1033-1044.
- Mintz, B., & Russell, E. S. (1957). Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *Journal of Experimental Zoology*, 134(2), 207-237.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of Cell Biology*, 152(4), 657-668.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1101-1111.

- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Development*, 21(22), 2861-2873.
- Moghaddam-Dorafshani, M., Jalali, M., Nikravesh, M. R., & Ebrahimzadeh, A. R. (2013). Study of the effect of hypothyroidism on the apoptotic index in rat ovarian follicles, using the TUNEL Technique. *Anatomical Sciences Journal*, 10(1), 25-36.
- Monget, P., Bobe, J., Gougeon, A., Fabre, S., Monniaux, D., & Dalbies-Tran, R. (2012). The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356(1), 2-12.
- Morita, Y., & Tilly, J. L. (1999). Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Developmental Biology*, 213(1), 1-17.
- Morita, Y., Manganaro, T. F., Tao, X. J., Martimbeau, S., Donahoe, P. K., & Tilly, J. L. (1999). Requirement for phosphatidylinositol-3'kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. *Endocrinology*, 140(2), 941-949.
- Morita, Y., Maravei, D. V., Bergeron, L., Wang, S., Perez, G. I., Tsutsumi, O., Taketani, Y., Asano, M., Horai, R., Korsmeyer, S. J., Iwakura, Y. & Tilly, J. L. (2001). Caspase-2 deficiency rescues female germ cells from death due to cytokine insufficiency but not meiotic defects caused by ataxia telangiectasia-mutated (Atm) gene inactivation. *Cell Death & Differentiation*, 8, 614-620.
- Mork, L., Maatouk, D. M., McMahon, J. A., Guo, J. J., Zhang, P., McMahon, A. P., & Capel, B. (2012). Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biology of Reproduction*, 86(2), 37.
- Morrison, L. J., & Marcinkiewicz, J. L. (2002). Tumor necrosis factor α enhances oocyte/follicle apoptosis in the neonatal rat ovary. *Biology of Reproduction*, 66(2), 450-457.
- Mortimer, R. H., Cannell, G. R., Addison, R. S., Johnson, L. P., Roberts, M. S., & Bernus, I. (1997). Methimazole and propylthiouracil equally cross the perfused human term placental lobule. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(9), 3099-3102.
- Motta, P. M., Makabe, S., & Nottola, S. A. (1997). The ultrastructure of human reproduction. 1. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update*, 3(3), 281-297.

- Murdoch, W. J. (2000). Proteolytic and cellular death mechanisms in ovulatory ovarian rupture. *Neurosignals*, 9(2), 102-114.
- Muskhelishvili, L., Wingard, S. K., & Latendresse, J. R. (2005). Proliferating cell nuclear antigen-a marker for ovarian follicle counts. *Toxicologic Pathology*, 33(3), 365-368.
- Mutvei, A., Husman, B., Andersson, G., & Nelson, B. D. (1989). Thyroid hormone and not growth hormone is the principle regulator of mammalian mitochondrial biogenesis. *Acta Endocrinologica*, 121(2), 223-228.
- Narayanan, C. H., Narayanan, Y., & Browne, R. C. (1982). Effects of induced thyroid deficiency on the development of suckling behavior in rats. *Physiology & Behavior*, 29(2), 361-370.
- Nazarpour, S., Tehrani, F. R., Simbar, M., & Azizi, F. (2015). Thyroid dysfunction and pregnancy outcomes. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 13(7), 387.
- Nef, S., Schaad, O., Stallings, N. R., Cederroth, C. R., Pitetti, J. L., Schaer, G., Malki, S., Dubois-Dauphin, M., Boizet-Bonhoure, B., Descombes, P., Parker, K. L. & Vassalli, J. D. (2005). Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Developmental Biology*, 287(2), 361-377.
- Negro, R., Formoso, G., Coppola, L., Presicce, G., Mangieri, T., Pezzarossa, A., & Dazzi, D. (2007). Euthyroid women with autoimmune disease undergoing assisted reproduction technologies: the role of autoimmunity and thyroid function. *Journal of Endocrinological Investigation*, 30(1), 3-8.
- Negro, R., & Mestman, J. H. (2011). Thyroid disease in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(6), 927-943.
- Niemann, A., Takatsuki, A., & Elsässer, H. P. (2000). The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48(2), 251-258.
- Nicol, B., & Yao, H. C. (2014). Building an ovary: insights into establishment of somatic cell lineages in the mouse. *Sexual Development*, 8(5), 243-251.
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O. & Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, 136(11), 1869-1878.

- Ohno, S., & Smith, J. B. (1964). Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. *Cytogenetic and Genome Research*, 3(5), 324-333.
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(3), 211-216.
- Oktaç, K., Briggs, D., & Gosden, R. G. (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(11), 3748-3751.
- Oktaç, K., Schenken, R. S., & Nelson, J. F. (1995). Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biology of Reproduction*, 53(2), 295-301.
- Oppenheimer, J. H., & Schwartz, H. L. (1997). Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocrine Reviews*, 18(4), 462-475.
- Ortiga-Carvalho, T. M., Sidhaye, A. R., & Wondisford, F. E. (2014). Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(10), 582-591.
- Ortiz, R., Echeverria, O. M., Salgado, R., Escobar, M. L., & Vázquez-Nin, G. H. (2006). Fine structural and cytochemical analysis of the processes of cell death of oocytes in atretic follicles in new born and prepubertal rats. *Apoptosis*, 11(1), 25-37.
- O'shea, P. J., & Williams, G. R. (2002). Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *Journal of Endocrinology*, 175(3), 553-570.
- Ottolenghi, C., Omari, S., Garcia-Ortiz, J. E., Uda, M., Crisponi, L., Forabosco, A., Pilia, G. & Schlessinger, D. (2005). Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Human Molecular Genetics*, 14(14), 2053-2062.
- Pailhoux, E., Vigier, B., Vaiman, D., Servel, N., Chaffaux, S., Crihiu, E. P., & Cotinot, C. (2002). Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Developmental Dynamics*, 224(1), 39-50.
- Palmer, S. J., & Burgoyne, P. S. (1991). XY follicle cells in the ovaries of XO/XY and XO/XY/XYY mosaic mice. *Development*, 111(4), 1017-1019.
- Pandey, A. N., & Chaube, S. K. (2014). Reduction of nitric oxide level leads to spontaneous resumption of meiosis in diplotene-arrested rat oocytes cultured in vitro. *Experimental Biology and Medicine*, 240(1), 15-25.

- Paredes, A., Garcia-Rudaz, C., Kerr, B., Tapia, V., Dissen, G. A., Costa, M. E., Cornea, A. & Ojeda, S. R. (2005). Loss of synaptonemal complex protein-1, a synaptonemal complex protein, contributes to the initiation of follicular assembly in the developing rat ovary. *Endocrinology*, *146*(12), 5267-5277.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M. C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A. & Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nature Genetics*, *38*(11), 1304-1309.
- Pathak, A., Sinha, R. A., Mohan, V., Mitra, K., & Godbole, M. M. (2010). Maternal thyroid hormone before the onset of fetal thyroid function regulates reelin and downstream signaling cascade affecting neocortical neuronal migration. *Cerebral Cortex*, *21*(1), 11-21.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. & Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, *122*(6), 927-939.
- Pearson, O. P., & Enders, R. K. (1943). Ovulation, maturation and fertilization in the fox. *The Anatomical Record*, *85*(1), 69-83.
- Peng, C., Ohno, T., Khorasheh, S., & Leung, P. C. K. (1996). Activin and follistatin as local regulators in the human ovary. *Neurosignals*, *5*(2), 81-89.
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*, *125*(17), 3323-3328.
- Pepling, M. E., de Cuevas, M., & Spradling, A. C. (1999). Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? *Trends in Cell Biology*, *9*(7), 257-262.
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology*, *234*(2), 339-351.
- Pepling, M. E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*, *44*(12), 622-632.
- Pepling, M. E. (2012). Follicular assembly: mechanisms of action. *Reproduction*, *143*(2), 139-149.
- Perez, G. I., Robles, R., Knudson, C. M., Flaws, J. A., Korsmeyer, S. J., & Tilly, J. L. (1999). Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nature Genetics*, *21*(2), 200-203.

- Perez, G. I., Trbovich, A. M., Gosden, R. G., & Tilly, J. L. (2000). Reproductive biology: mitochondria and the death of oocytes. *Nature*, *403*(6769), 500-501.
- Peters, H., Byskov, A. G., & Grinsted, J. (1978). Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, *7*(3), 469-485.
- Picut, C. A., Swanson, C. L., Scully, K. L., Roseman, V. C., Parker, R. F., & Remick, A. K. (2008). Ovarian follicle counts using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and semi-automated image analysis in rats. *Toxicologic Pathology*, *36*(5), 674-679.
- Pinkerton, J. H., McKay, D. G., Adams, E. C., & Hertig, A. T. (1961). Development of the human ovary-A study using histochemical technics. *Obstetrics & Gynecology*, *18*(2), 152-181.
- Poppe, K., & Velkeniers, B. (2004). Female infertility and the thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *18*(2), 153-165.
- Pracyk, J. B., & Slotkin, T. A. (1992). Thyroid hormone regulates ontogeny of beta adrenergic receptors and adenylate cyclase in rat heart and kidney: effects of propylthiouracil-induced perinatal hypothyroidism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *261*(3), 951-958.
- Prakash, S., Johnson, R. E., & Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, *74*, 317-353.
- Pru, J. K., & Tilly, J. L. (2001). Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. *Molecular Endocrinology*, *15*(6), 845-853.
- Psarra, A. M., Solakidi, S., & Sekeris, C. E. (2006). The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *246*(1), 21-33.
- Quirk, S. M., Cowan, R. G., & Harman, R. M. (2004). Progesterone receptor and the cell cycle modulate apoptosis in granulosa cells. *Endocrinology*, *145*(11), 5033-5043.
- Radovanović, A. (2003). Uticaj smanjene funkcije štitaste žlezde na jajnike pacova tokom polnog sazrevanja. *Doktorska disertacija*. Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.

- Radovanović, A., Rokсандić, D., Šimić, M., Marković, D., & Gledić, D. (2012). Effects of induced maternal hypothyroidism on the ovarian development of offspring rats. *Acta Veterinaria Beograd.* 62(5-6), 483-493.
- Rajab, N. M. A., Ukropina, M., & Cakic-Milosevic, M. (2015). Histological and ultrastructural alterations of rat thyroid gland after short-term treatment with high doses of thyroid hormones. *Saudi Journal of Biological Sciences.*doi: 10.1016/j.sjbs.2015.05.006.
- Rajah, R., Glaser, E. M., & Hirshfield, A. N. (1992). The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Developmental Dynamics*, 194(3), 177-192.
- Rajawat, Y. S., & Bossis, I. (2008). Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders. *Hormones-Athens-*, 7(1), 46-61.
- Rajkovic, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N., & Matzuk, M. M. (2004). NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*, 305(5687), 1157-1159.
- Raldúa, D., Thienpont, B., & Babin, P. J. (2012). Zebrafish eleutheroembryos as an alternative system for screening chemicals disrupting the mammalian thyroid gland morphogenesis and function. *Reproductive Toxicology*, 33(2), 188-197.
- Rao, M. C., Midgley, A. R., & Richards, J. S. (1978). Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. *Cell*, 14(1), 71-78.
- Ratts, V. S., Flaws, J. A., Kolp, R., Sorenson, C. M., & Tilly, J. L. (1995). Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*, 136(8), 3665-3668.
- Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hamalainen, T., Peng, S. L., Lan, Z. J., Cooney, A. J., Huhtaniemi, I. & Liu, K. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, 319(5863), 611-613.
- Reddy, P., Zheng, W., & Liu, K. (2010). Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(2), 96-103.
- Reymond, M. J., Benotto, W., & Lemarchand-Béraud, T. (1987). The secretory activity of the tuberoinfundibular dopaminergic neurons is modulated by the thyroid status in the adult rat: consequence on prolactin secretion. *Neuroendocrinology*, 46(1), 62-68.

- Ribeiro, MD, R. C., Kushner, Ph. D, P. J., & Baxter, MD, J. D. (1995). The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annual Review of Medicine*, 46(1), 443-453.
- Richards, J. S., & Midgley, A. R. (1976). Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biology of Reproduction*, 14(1), 82-94.
- Roa, S., Avdievich, E., Peled, J. U., MacCarthy, T., Werling, U., Kuang, F. L., Kan, R., Zhao, c., Bergman, A., Cohen, P. E., Edelman, W. & Scharff, M. A.(2008). Ubiquitylated PCNA plays a role in somatic hypermutation and class-switch recombination and is required for meiotic progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42), 16248-16253.
- Robbins, J. (2000). Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. *Werner & Ingbar's The Thyroid: a fundamental and clinical text. 8th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins*, 105-120.
- Rodrigues, P., Limback, D., McGinnis, L. K., Plancha, C. E., & Albertini, D. F. (2009). Multiple mechanisms of germ cell loss in the perinatal mouse ovary. *Reproduction*, 137(4), 709-720.
- Roeder, G. S., & Bailis, J. M. (2000). The pachytene checkpoint. *Trends in Genetics*, 16(9), 395-403.
- Rose, R. D., Gilchrist, R. B., Kelly, J. M., Thompson, J. G., & Sutton-McDowall, M. L. (2013). Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. *Theriogenology*, 79(1), 142-148.
- Rucker III, E. B., Dierisseau, P., Wagner, K. U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., Flaws, J. A., & Hennighausen, L. (2000). Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Molecular Endocrinology*, 14(7), 1038-1052.
- Rueda, B. R., Hamernik, D. L., Hoyer, P. B., & Tilly, J. L. (1997). Potential regulators of physiological cell death in the corpus luteum. In *Cell Death in Reproductive Physiology* (pp. 161-181). Springer New York.
- Saga, Y., Ohwada, M., Suzuki, M., Konno, R., Kigawa, J., Ueno, S., & Mano, H. (2008). Glutathione peroxidase 3 is a candidate mechanism of anticancer drug resistance of ovarian clear cell adenocarcinoma. *Oncology Reports*, 20(6), 1299.
- Sahoo, D. K., & Roy, A. (2012). Compromised rat testicular antioxidant defence system by hypothyroidism before puberty. *International Journal of Endocrinology*, 2012, 1-11.

- Sala-Roca, J., Estebanez-Perpina, E., Balada, F., Garau, A., & Martí-Carbonell, M. A. (2008). Effects of adult dysthyroidism on the morphology of hippocampal neurons. *Behavioural Brain Research*, *188*(2), 348-354.
- Sánchez, M. E., Martínez, O. E., & Vázquez-Nin, G. H. (2012). Immunohistochemical and ultrastructural visualization of different routes of oocyte elimination in adult rats. *European Journal of Histochemistry*, *56*(2), 17.
- Sano, R., Annunziata, I., Patterson, A., Moshiah, S., Gomero, E., Opferman, J., Forte, M. & d'Azzo, A. (2009). GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca²⁺-dependent mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, *36*(3), 500-511.
- Sarandöl, E., Taş, S., Dirican, M., & Serdar, Z. (2005). Oxidative stress and serum paraoxonase activity in experimental hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation. *Cell Biochemistry and Function*, *23*(1), 1-8.
- Satoh M, (1985). The histogenesis of the gonad in rat embryos. *Journal of Anatomy*, *143*, 17.
- Savu, L., Vranckx, R., Maya, M., & Nunez, E. A. (1989). A thyroxine binding globulin (TBG)-like protein in the sera of developing and adult rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *148*(3), 1165-1173.
- Sawyer, H. R., Smith, P., Heath, D. A., Juengel, J. L., & McNatty, K. P. (2002). Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*, *66*(4), 1134-1150.
- Schiaffino, S., Mammucari, C., & Sandri, M. (2008). The role of autophagy in neonatal tissues: just a response to amino acid starvation? *Autophagy*, *4*(5), 727-730.
- Schönthal, A. H. (2012). Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica*, 2012.
- Schweichel, J. U., & Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, *7*(3), 253-266.
- Sergeev, I. N., & Norman, A. W. (2003). Calcium as a mediator of apoptosis in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Endocrine*, *22*(2), 169-175.
- Shao, Y., Gao, Z., Marks, P. A., & Jiang, X. (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(52), 18030-18035.

- Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robanya, I., & Richards, J. S. (2006). Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: novel evidence for innate immune-like functions during ovulation. *Molecular Endocrinology*, *20*(12), 3228-3239.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., & Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biology*, *6*(12), 1221-1228.
- Shutt, T. E., & McBride, H. M. (2013). Staying cool in difficult times: mitochondrial dynamics, quality control and the stress response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1833*(2), 417-424.
- Silva, J. R., van den Hurk, R., de Matos, M. H., dos Santos, R. R., Pessoa, C., de Moraes, M. O., & de Figueiredo, J. R. (2004). Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, *61*(9), 1691-1704.
- Silva, M. T. (2010). Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Letters*, *584*(22), 4491-4499.
- Silva, J. F., Ocarino, N. M., & Serakides, R. (2014). Luteal activity of pregnant rats with hypo- and hyperthyroidism. *Journal of Ovarian Research*, *7*(1), 1-13.
- Simonsen A., Tooze S. A. (2009). Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *Journal of Cell Biology*, *186*, 773-782.
- Sinclair, A., Berta, P., Palmer, M., Hawkins, J., Griffiths, B., & Palmer, M. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with. *Nature*, *346*(6281), 240-4.
- Singh, R., Upadhyay, G., Kumar, S., Kapoor, A., Kumar, A., Tiwari, M., & Godbole, M. M. (2003). Hypothyroidism alters the expression of Bcl-2 family genes to induce enhanced apoptosis in the developing cerebellum. *Journal of Endocrinology*, *176*(1), 39-46.
- Sinha, U., Sinharay, K., Saha, S., Longkumer, T. A., Baul, S. N., & Pal, S. K. (2013). Thyroid disorders in polycystic ovarian syndrome subjects: A tertiary hospital based cross-sectional study from Eastern India. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, *17*(2), 304.

- Ślebodziński, A. B. (2005). Ovarian iodide uptake and triiodothyronine generation in follicular fluid: the enigma of the thyroid ovary interaction. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(1), 97-103.
- Snow, M. H. L., & Monk, M. (1983). Emergence and migration of mouse primordial germ cells. *Current Problems in Germ Cell Differentiation*, 115-135.
- Song, Y., Yao, X., & Ying, H. (2011). Thyroid hormone action in metabolic regulation. *Protein & cell*, 2(5), 358-368.
- Soyal, S. M., Amleh, A., & Dean, J. (2000). FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development Cambridge*, 127(21), 4645-4654.
- Speed, R. M. (1986). Oocyte development in XO fetuses of man and mouse: the possible role of heterologous X-chromosome pairing in germ cell survival. *Chromosoma*, 94(2), 115-124.
- Stagnaro-Green, A. (2011). Thyroid antibodies and miscarriage: where are we at a generation later? *Journal of Thyroid Research*.doi: 10.4061/2011/841949.
- Stagnaro-Green, A., Chen, X., Bogden, J. D., Davies, T. F., & Scholl, T. O. (2005). The thyroid and pregnancy: a novel risk factor for very preterm delivery. *Thyroid*, 15(4), 351-357.
- Steger, K., Aleithe, I., Behre, H., & Bergmann, M. (1998). The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Molecular Human Reproduction*, 4(3), 227-233.
- Stein, L. E., & Anderson, C. H. (1979). A qualitative and quantitative study of rete ovarii development in the fetal rat: correlation with the onset of meiosis and follicle cell appearance. *The Anatomical Record*, 193(2), 197-211.
- Sterling, K. (1991). Thyroid hormone action: identification of the mitochondrial thyroid hormone receptor as adenine nucleotide translocase. *Thyroid*, 1(2), 167-171.
- Stoimenov, I., & Helleday, T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. *Biochemical Society Transactions*, 37(3), 605-613.
- Stradtman, E.W. (1993). Thyroid dysfunction and ovulatory disorders. In: Carr, B.R., Blackwell, R.E. (Eds.), *Textbook of Reproductive Medicine*. Appleton, Norwalk, pp. 297– 321.
- Strappazon, F., Vietri-Rudan, M., Campello, S., Nazio, F., Florenzano, F., Fimia, G. M., Piacentini, M., Levine, B. & Cecconi, F. (2011). Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *The EMBO Journal*, 30(7), 1195-1208.

- Sun, Q. Y., Miao, Y. L., & Schatten, H. (2009). Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle*, 8(17), 2741-2747.
- Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Constantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M-C., Brothers, G., Mak, T. W., Penninger, J., Earnshaw, W. C. & Kroemer, G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(4), 571-580.
- Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. (2010). The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, 139(4), 685-695.
- Suzuki, K., & Ohsumi, Y. (2007). Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 581(11), 2156-2161.
- Suzumori, N., Yan, C., Matzuk, M. M., & Rajkovic, A. (2002). Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mechanisms of Development*, 111(1), 137-141.
- Talsness, C. E., Kuriyama, S. N., Sterner-Kock, A., Schnitker, P., Grande, S. W., Shakibaei, M., Andrade, A., Grote, K. & Chahoud, I. (2008). In utero and lactational exposures to low doses of polybrominated diphenyl ether-47 alter the reproductive system and thyroid gland of female rat offspring. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 308.
- Tamura, K., Hatsuta, M., Watanabe, G., Taya, K., & Kogo, H. (1998a). Inhibitory regulation of inhibin gene expression by thyroid hormone during ovarian development in immature rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242(1), 102-108.
- Tamura, K., Hatsuta, M., Watanabe, G., Taya, K., & Kogo, H. (1998b). Blockage of gonadotropin-induced first ovulation caused by thyroidectomy and its possible mechanisms in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 275(3), E380-E385.
- Tan, C. K., Sullivan, K., Li, X., Tan, E. M., Downey, K. M., & So, A. G. (1987). Autoantibody to the proliferating cell nuclear antigen neutralizes the activity of the auxiliary protein for DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Research*, 15(22), 9299-9308.
- Tan, A. R., Cai, A. Y., Deheshi, S., & Rintoul, G. L. (2011). Elevated intracellular calcium causes distinct mitochondrial remodelling and calcineurin-dependent fission in astrocytes. *Cell Calcium*, 49(2), 108-114.

- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2503-2518.
- Tatemoto, H., Sakurai, N., & Muto, N. (2000). Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*, 63(3), 805-810.
- Terranova P. F, Tayler C. C (1999). Apoptosis (cell death). In: Neil JD, Knobil E (eds) *Encyclopedia of reproduction*. Academic Press, New York, pp 261–273.
- Thomé, R. G., Santos, H. B., Arantes, F. P., Domingos, F. F., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2009). Dual roles for autophagy during follicular atresia in fish ovary. *Autophagy*, 5(1), 117-119.
- Thompson, W. O., Thompson, P. K., Brailey, A. G., & Cohen, A. C. (1929). The calorigenetic action of thyroxin at different levels of basal metabolism in myxedema. *Journal of Clinical Investigation*, 7(3), 437.
- Thomson, T. C., & Johnson, J. (2010). Inducible somatic oocyte destruction in response to rapamycin requires wild-type regulation of follicle cell epithelial polarity. *Cell Death & Differentiation*, 17(11), 1717-1727.
- Tilly, J. L., Tilly, K., & Perez, G. I. (1997). The genes of cell death and cellular susceptibility to apoptosis in the ovary: a hypothesis. *Cell Death and Differentiation*, 4(3), 180-187.
- Tilly, J. L. (1998). Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. *Toxicology Letters*, 102, 497-501.
- Tilly, J. L., & Robles, R. (1999). Apoptosis and its impact in clinical reproductive medicine. *Molecular Biology in Reproductive Medicine*, 79-101.
- Tilly, J. L. (2001). Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11), 838-848.
- Tilly, J. L. (2003). Ovarian follicle counts—not as simple as 1, 2, 3. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 1.
- Tingen, C. M., Bristol-Gould, S. K., Kiesewetter, S. E., Wellington, J. T., Shea, L., & Woodruff, T. K. (2009a). Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biology of Reproduction*, 81(1), 16-25.
- Tingen, C., Kim, A., & Woodruff, T. K. (2009b). The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Molecular Human Reproduction*, 15(12), 795-803.

- Tiwari, M., Prasad, S., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2016). Calcium Signaling During Meiotic Cell Cycle Regulation and Apoptosis in Mammalian Oocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 232(5), 976-981.
- Tománek, M., & Chronowska, E. (2006). Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44(4), 269-274.
- Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., Yoshitome, A., Yamawaki, K., Amagai, M., Inoue, A., Oshima, T & Kakitani, M. (2008). R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Human Molecular Genetics*, 17(9), 1278-1291.
- Tooze, S. A., & Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology*, 12(9), 831-835.
- Tripathi, A., Khatun, S., Pandey, A. N., Mishra, S. K., Chaube, R., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2009). Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocytes at various stages of meiotic cell cycle and apoptosis. *Free Radical Research*, 43(3), 287-294.
- Tripathi, A., Kumar, K. V., & Chaube, S. K. (2010). Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 223(3), 592-600.
- Tripathi, A., PremKumar, K. V., Pandey, A. N., Khatun, S., Mishra, S. K., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2011). Melatonin protects against clomiphene citrate-induced generation of hydrogen peroxide and morphological apoptotic changes in rat eggs. *European Journal of Pharmacology*, 667(1), 419-424.
- Tripathi, A., & Chaube, S. K. (2012). High cytosolic free calcium level signals apoptosis through mitochondria-caspase mediated pathway in rat eggs cultured in vitro. *Apoptosis*, 17(5), 439-448.
- Tripathi, A., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2013). An increase of granulosa cell apoptosis mediates aqueous neem (*Azadirachta indica*) leaf extract-induced oocyte apoptosis in rat. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 3(1), 27.
- Trombly, D. J., Woodruff, T. K., & Mayo, K. E. (2009). Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. In: *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 27, No. 01, pp. 014-023). Thieme Medical Publishers.

- Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J. E., Deiana, M., Kimber, W., Forabosco, A., Cao, A., Schlessinger, D., & Pilia, G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*, *13*(11), 1171-1181.
- Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A-C., Klugmann, C., Klasen, C., Holten, N. I., Rietmacher, D., Schutz, G., Cooney, A. J., Lovell-Badge, R. & Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, *139*(6), 1130-1142.
- Vaccari, S., Horner, K., Mehlmann, L. M., & Conti, M. (2008). Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Developmental Biology*, *316*(1), 124-134.
- Vaccari, S., Weeks, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S., & Conti, M. (2009). Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, *81*(3), 595-604.
- Vaiman, D., Koutita, O., Oustry, A., Elsen, J. M., Manfredi, E., Fellous, M., & Crihiu, E. P. (1996). Genetic mapping of the autosomal region involved in XX sex-reversal and horn development in goats. *Mammalian Genome*, *7*(2), 133-137.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, *397*(6718), 405-409.
- Van Haaster, L. H., De Jong, F. H., Docter, R. O. E. L., & De Rooij, D. G. (1992). The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology*, *131*(3), 1574-1576.
- Van der Stricht, O. (1923). Etude comparée des ovules de mammifères aux différentes périodes de l'ovogénèse. *Archives of Biological Sciences*, *33*, 229-300.
- Vanderpump, M. P. J. (2011). The epidemiology of thyroid disease. *British Medical Bulletin*, *99*, 39-51.
- Varma, S. K., & Guraya, S. S. (1968). The localization and functional significance of alkaline phosphatase in the vertebrate ovary. *Experientia*, *24*(4), 398-399.
- Vaskivuo, T. E., Anttonen, M., Herva, R., Billig, H., Dorland, M., Te Velde, E. R., Stenback, H., Heikinheimo, M., Tapanainen, J. S. (2001). Survival of human ovarian follicles from

- fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *Journal Clinical Endocrinological Metabolism*, 86, 3421–3429.
- Vázquez-Nin, G. H., Escobar, M. L., De Felici, M., Echeverría, O. M., & Klinger, F. G. (2011). *Cell Death in Mammalian Ovary*. Springer Science & Business Media.
- Velentzas, A. D., Nezis, I. P., Stravopodis, D. J., Papassideri, I. S., & Margaritis, L. H. (2007). Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed nurse cell death during *Drosophila virilis* oogenesis. *Autophagy*, 3(2), 130-132.
- Venugopalan, V. K. (1961). Localization of alkaline phosphatase in the ovary of *Notopterus notopterus* (Pallas). *Experimental Cell Research*, 24(3), 565-569.
- Versloot, P. M., Schröder-Van Der Elst, J. P., Van Der Heide, D., & Boogerd, L. (1997). Effects of marginal iodine deficiency during pregnancy: iodide uptake by the maternal and fetal thyroid. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 273(6), E1121-E1126.
- Vincent, C., Cheek, T. R., & Johnson, M. H. (1992). Cell cycle progression of parthenogenetically activated mouse oocytes to interphase is dependent on the level of internal calcium. *Journal of Cell Science*, 103(2), 389-396.
- Wakim, A. N., Polizotto, S. L., Buffo, M. J., Marrero, M. A., & Burholt, D. R. (1993). Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 59(6), 1187-1190.
- Wandji, S. A., Pelletier, G., & Sirard, M. A. (1992). Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biology of Reproduction*, 47(5), 807-813.
- Wandji, S. A., Srsen, V., Voss, A. K., Eppig, J. J., & Fortune, J. E. (1996). Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biology of Reproduction*, 55(5), 942-948.
- Wang, Z. G., Wang, W., Yu, S. D., & Xu, Z. R. (2008). Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. *Animal Reproduction Science*, 105(3), 292-301.
- Wassarman, P. M., Liu, C., & Litscher, E. S. (1996). Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *Journal of Cell Science*, 109(8), 2001-2004.

- Weibel, E. R., Kistler, G. S., & Scherle, W. F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *The Journal of Cell Biology*, 30(1), 23.
- Weibel, E. R. (1979). *Practical Methods for Biological Morphometry*. Academic Press.
- Wilhelm, D., Palmer, S., Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Review*, 87, 1–28.
- Williams, G. R. (2008). Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 784-794.
- Wilson, K. L., Casey, B. M., McIntire, D. D., Halvorson, L. M., & Cunningham, F. G. (2012). Subclinical thyroid disease and the incidence of hypertension in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 119(2, Part 1), 315-320.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. R., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, 251-306.
- Xu, B., Hua, J., Zhang, Y., Jiang, X., Zhang, H., Ma, T., Zheng, W., Sun, R., Shen, W., Sha, J., Cooke, H. J. & Shi, Q. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) regulates primordial follicle assembly by promoting apoptosis of oocytes in fetal and neonatal mouse ovaries. *PloS One*, 6(1), e16046.
- Yamamoto, T., Amino, N., Tanizawa, O., Doi, K., Ichihara, K., Azukizawa, M., Miyai, K. (1979). Longitudinal study of serum thyroid hormones, chorionic gonadotrophin and thyrotrophin during and after normal pregnancy. *Clinical Endocrinology*, 10(5), 459-468.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., Prasad, S. V., Skinner, S. S., Dunbar, B. S., Dube, J. L., Celeste, A. J. & Matzuk, M. M. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 15(6), 854-866.
- Yang, M. Y., & Fortune, J. E. (2008). The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biology of Reproduction*, 78(6), 1153-1161.
- Yao, H. H., Matzuk, M. M., Jorgez, C. J., Menke, D. B., Page, D. C., Swain, A., & Capel, B. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Developmental Dynamics*, 230(2), 210-215.

- Yee, K. S., Wilkinson, S., James, J., Ryan, K. M., & Vousden, K. H. (2009). PUMA-and Bax-induced autophagy contributes to apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, *16*(8), 1135-1145.
- Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death & Differentiation*, *12*, 1542-1552.
- Young, M. M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A. K., Amin, S., Hu, D-C., Znan, Y., Kester, M. & Wang, H. G. (2012). Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(15), 12455-12468.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T. & Simon, H. U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology*, *8*(10), 1124-1132.
- Yu, L., Lenardo, M. J., & Baehrecke, E. H. (2004). Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle*, *3*(9), 1122-1124.
- Yuan, L., Liu, J. G., Hoja, M. R., Wilbertz, J., Nordqvist, K., & Höög, C. (2002). Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science*, *296*(5570), 1115-1118.
- Yue, Z., Horton, A., Bravin, M., DeJager, P. L., Selimi, F., & Heintz, N. (2002). A novel protein complex linking the $\delta 2$ glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron*, *35*(5), 921-933.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., & Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(25), 15077-15082.
- Yuste, V. J., Sánchez-López, I., Solé, C., Moubarak, R. S., Bayascas, J. R., Dolcet, X., Encinas, M., Susin, S. A., & Comella, J. X. (2005). The contribution of apoptosis-inducing factor, caspase-activated DNase, and inhibitor of caspase-activated DNase to the nuclear phenotype and DNA degradation during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(42), 35670-35683.
- Zachos, N. C., Billiar, R. B., Albrecht, E. D., & Pepe, G. J. (2002). Developmental regulation of baboon fetal ovarian maturation by estrogen. *Biology of Reproduction*, *67*(4), 1148-1156.

- Zertashia, A., Jalali, S., Ahmad, L., & Mirza, A. (2002). Effect of hypothyroidism induced by propylthiouracil on ovarian function and structure in offspring from treated mothers (rats). *Journal of Experimental Zoology*, 293(4), 407-413.
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L. A., Tan, Y. S., Baek, J. H., Wesley, J. B., Gonzales, F. J. & Semenza, G. L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10892-10903.
- Zhang, H., Risal, S., Gorre, N., Busayavalasa, K., Li, X., Shen, Y., Bosbach, B., Bränström, M. & Liu, K. (2014). Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Current Biology*, 24(21), 2501-2508.
- Zhang, S. S., Carrillo, A. J., & Darling, D. S. (1997). Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. *Molecular Human Reproduction*, 3(7), 555-562.
- Zheng, T. S., Schlosser, S. F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I. N., Boyer, J. L., & Flavell, R. A. (1998). Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13618-13623.
- Zheng, W., Zhang, H., Gorre, N., Shen, Y., & Liu, K. (2013). Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Human Molecular Genetics*, 23(4), 920-928.
- Zheng, W., Zhang, H., & Liu, K. (2014). The two classes of primordial follicles in the mouse ovary: their development, physiological functions and implications for future research. *Molecular Human Reproduction*, 20(4), 286-292.

BIOGRAFIJA

Jelena (Borivoje) Danilović Luković je rođena 18.04.1982. godine u Baru, Crna Gora. U Vrnjačkoj Banji je završila osnovnu, a u Kraljevu srednju medicinsku školu. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Prištini sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici je završila 2008. godine, sa prosečnom ocenom 9,04. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala 2010. godine, program Biologija, modul Biologija ćelija i tkiva.

Od 2008-2010. godine je radila kao saradnik, a od 2010-2016. godine kao asistent na Državnom Univerzitetu u Novom Pazaru, na Departmanu za Biomedicinske nauke, studijski program Biologija. Samostalno ili u koautorstvu objavila je četiri naučna rada u međunarodnim časopisima, jedan u časopisu od međunarodnog značaja verifikovanim posebnom odlukom i 11 saopštenja na međunarodnim i domaćim kongresima. Osnovna oblast naučno-istraživačkog rada obuhvata reproduktivnu histologiju i endokrinologiju. Govori engleski i služi se norveškim jezikom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Б. Даниловић Луковић

број уписа Б3031/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај смањене функције штитасте жлезде мајки на развој јајника младунаца

пацова у раном постнаталном периоду

- 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, 04.02.2017. године



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Даниловић Луковић

Број уписа Б3031/2010

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада Утицај смањене функције штитасте жлезде мајки на развој јајника младунаца пацова у раном постнаталном периоду

Ментор др Александра Кораћ, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Анита Радовановић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Факултет ветеринарске медицине

Потписани Јелена Даниловић Луковић

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, 04.02.2017. године

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај смањене функције штитасте жлезде мајки на развој јајника младунаца
пацова у раном постнаталном периоду

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, 04.02.2017. године