

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Svetlana L. Trifunović

**ODGOVOR HIPOTALAMO-HIPOFIZNOG  
SISTEMA PACOVA NA IZOFLAVONE  
SOJE: MORFOFUNKCIONALNA  
STUDIJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Svetlana L. Trifunović

**EFFECTS OF SOY ISOFLAVONES ON  
THE HYPOTHALAMIC–PITUITARY  
SYSTEM IN RATS: A  
MORPHOFUNCTIONAL STUDY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentori i članovi komisije:

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

viši naučni saradnik dr Milica Manojlović-Stojanoski Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković".

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

viši naučni saradnik dr Branka Šošić-Jurjević Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",

naučni saradnik dr Vladimir Ajdžanović Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković".

Datum odbrane: \_\_\_\_\_ 2012. god

Ova teza urađena je u Odeljenju za citologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, pod neposrednim rukovodstvom dr Milice Manojlović-Stojanoski, u okviru projekta 173009 pod nazivom “Odgovor neuroendokrinog sistema na odabrane biljne ekstrakte, fitoestrogene, steroidne i peptidne hormone“, čiji je rukovodilac dr Verica Milošević.

Zahvaljujem se Prof. dr Vesni Koko, redovnom profesoru Biološkog fakulteta na srdačnom i otvorenom pristupu, predusretljivosti, a pre svega na izuzetno korisnim savetima prilikom čitanja rada i ispravkama.

Ovom prilikom želim da se zahvalim mentoru, dr Milici Manojlović-Stojanoski, na ukazanom poverenju u realizaciji ove teze, na savetima, diskusjama i pomoći kad god je to bilo potrebno.

Neizmernu zahvalnost iskazujem i dr Verici Milošević, koja mi je širom otvorila vrata i omogućila da radim u laboratoriji i na projektu kojim ona rukovodi. Ona je čovek koji za mene predstavlja sve ono što istinski učitelj treba da bude u ljudskom i profesionalnom smislu.

Najsrdanije se zahvaljujem dr Vladimiru Ajdžanović, koji je bio od neizmerne pomoći počevši od uspostavljanja prvih kontakata, tokom svih eksperimentalnih procedura, pa sve do ispisivanja poslednjeg slova ove teze i vedrom duhu, koji je unosio u naš rad.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Branki Šošić-Jurjević na sugestijama i konstruktivnim savetima, kao i za mnogogodišnju podršku i razumevanje.

Imala sam i tu sreću da radim sa osobama koje, osim što raspolažu velikim znanjem i umećem, tu svoju veštinu nesebično dele sa drugima. Osobe koje su mi od samog početka mog rada pružale pravu prijateljsku podršku i oslonac su dr Milka Sekulić, dr Nataša Nestorović, , dr Branko Filipović, mr Nataša Ristić, Jasmina Pantelić i Ivana Medigović, a ovaj niz dragih i sjajnih osoba proširen je dolaskom najmlađeg kolege Marka Milera, kome se takođe zahvaljujem na pomoći u radu.

Konačno, želim da se zahvalim onima koji su podneli najveći teret mog rada, mom tati, kao i mojim istinskim prijateljima Ireni, Vesni i Violeti.

Na kraju, zahvaljujem se svim kolegama koji su mi na bilo koji način pomogli u realizaciji ovog rada.

# Odgovor hipotalamo-hipofiznog sistema pacova na izoflavone soje: morfofunkcionalna studija

## Rezime

Izoflavoni soje, genistein i daidzein, se sve više koriste u preventivi i alternativnoj terapiji različitih patoloških stanja. Uticaj izoflavona soje na neuroendokrini sistem bio je, a i danas je, predmet istraživanja različitih studija. Veliki broj literaturnih podataka govori o uticaju izoflavona soje na reproduktivni sistem, s obzirom na njihovu estrogensku i anti-estrogensku aktivnost. Ipak, podaci o njihovom uticaju na somatotropni i adrenokortikotropni sistem oskudni su, a neophodni, imajuću u vidu značaj ovih sistema za normalan razvoj i funkcionisanje organizma. Takođe, mnogobrojne *in vitro* studije obezbeđuju samo limitirane informacije o potencijalnim efektima *in vivo*.

Cilj ove studije je bio da se ispita uticaj hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom i daidzeinom na histološke, stereološke i biohemijske parametre somatotropnog i adrenokortikotropnog sistema orhidektomisanih adultnih pacova.

Na početku eksperimenta adultni pacovi Wistar soja, stari 3 meseca, su podeljeni u dve eksperimentalne grupe: lažno orhidektomisanu (Sham) i orhidektomisanu (Orx) grupu. Dve nedelje nakon sham operacije ili orhidektomije pacovi su podeljeni u sedam eksperimentalnih grupa. Prvu (Sham1) grupu su sačinjavale sham operisane životinje subkutano (s.c.) tretirane odgovarajućom zapreminom sterilnog maslinovog ulja, medijumom estradiol-dipropionata (medijum I). Drugu (Orx1) grupu su sačinjavale orhidektomisane životinje s.c. tretirane odgovarajućom zapreminom medijuma I. U trećoj (Orx1+E) grupi orhidektomisane životinje su s.c. tretirane estradiol-dipropionatom u medijumu I (0,6 mg/kg t.m.). Četvrta (sham operisana - Sham2) i peta (orhidektomisana - Orx2) grupa s.c. su tretirane odgovarajućom zapreminom mešavine alkohola i sterilnog maslinovog ulja, medijumom genisteina i daidzeina (u odnosu 1:2; medijum II). Šestu (Orx2+G) grupu su sačinjavale orhidektomisane životinje s.c.

tretirane genisteinom u medijumu II (30 mg/kg t.m.), dok je sedma (Orx2+D) grupa orhidektomisanih pacova s.c. tretirana daidzeinom u istom medijumu (30 mg/kg t.m.). Sve grupe životinja su dobijale tretman tokom tri nedelje (hroničan tretman), a žrtvovane su 24 h nakon poslednje primljene doze. Pre početka i nakon završenog tretmana izmerene su telesne mase životinja svih eksperimentalnih grupa, dok su mase hipofiza izmerene nakon žrtvovanja. Za lokalizaciju arkuatnog (Arc) i periventrikularnog (Pe) jedra, paravenrikularnog jedra (PVN) i eminencije medijane (ME) korišćeno je histološko bojenje krezil-ljubičastom bojom. Za obeležavanje oslobađajućih hormona hipotalamusa (oslobađajućeg hormona hormona rasta-GHRH, somatostatina-SS, kortikotropnog oslobađajućeg hormona-CRH) i ćelija adenohipofize (somatotropnih-GH i adrenokortikotropnih-ACTH) korišćeno je imunohistohemijsko bojenje. Histološki i imunohistohemijski obojeni preseci hipotalamusa, kao i imunohistohemijski obojeni preseci hipofiza stereološki su analizirani, uz pomoć newCAST stereološkog softverskog paketa. Dobijene su vrednosti: volumena Arc i Pe jedra i PVN, volumenske gustine SS neurona, volumena hipofize, volumenske i numeričke gustine GH i ACTH ćelija, apsolutnog broja i volumena GH i ACTH ćelija. Koncentracija GH i ACTH u cirkulaciji određena je biohemijskim metodama. Dobijeni podaci su statistički obrađeni.

Orhidektomija je dovela do značajnog smanjenja ( $p < 0.05$ ) telesne mase adultnih pacova u odnosu na Sham grupu pacova. Hroničan tretman estradiol-dipropionatom je doveo do značajnog smanjenja ( $p < 0.05$ ) telesne mase u odnosu na Orx1 grupu pacova. Hroničan tretman genisteinom ili daidzeinom nije doveo do promene telesnih masa u odnosu na Orx2 grupu pacova. Orhidektomija adultnih pacova je dovela do smanjenja ( $p < 0.05$ ) apsolutne mase hipofize, dok je volumen hipofize ostao nepromenjen u odnosu na Sham grupu pacova. Tretman estradiol-dipropionatom je doveo do povećanja ( $p < 0.05$ ) apsolutne mase i volumena hipofize u odnosu na Orx1 grupu pacova. Tretman genisteinom je povećao ( $p < 0.05$ ) apsolutnu masu i volumen hipofize u odnosu na Orx2 grupu pacova. Tretman daidzeinom nije doveo do promena mase i volumena hipofize u odnosu na Orx2 grupu pacova.

Orhidektomija je dovela do značajnog povećanja ( $p < 0.05$ ) volumena Arc jedra; i do značajnog smanjenja ( $p < 0.05$ ): imunoobojenosti GHRH neurosekreta u ME,

volumenske gustine SS neurona u Pe jedru, imunoobojenosti SS neurosekreta u ME kao i volumenske i numeričke gustine GH ćelija; a nije uticala na volumen Pe jedra, apsolutni broj, volumen i intenzitet obojenosti GH ćelija i nivo GH u cirkulaciji, u odnosu na odgovarajuće parametre Sham grupe pacova. Nakon tretmana estradiol-dipropionatom došlo je do povećanja ( $p < 0.05$ ) volumena Arc i Pe jedra, volumenske gustine SS neurona Pe jedra, intenziteta obojenosti SS neurosekreta u ME, intenziteta obojenosti GH ćelija i nivoa GH u cirkulaciji; i do smanjenja ( $p < 0.05$ ) volumenske i numeričke gustine GH ćelija; dok tretman nije uticao na intenzitet obojenosti GHRH neurosekreta u ME, apsolutni broj i volumen GH ćelija; sve u odnosu na odgovarajuće parametre Orx grupe. Hroničan tretman genisteinom je doveo do povećanja ( $p < 0.05$ ): volumena Arc jedra, intenziteta obojenosti GHRH neurosekreta u ME, volumenske gustine SS neurona Pe jedra, količine SS neurosekreta u ME, volumenske i numeričke gustine GH ćelija, apsolutnog broja i intenziteta obojenosti GH ćelija i nivoa GH u cirkulaciji; a nije uticao na volumen Pe jedra i volumen GH ćelija; sve u odnosu na odgovarajuće parametre Orx grupe. Hroničan tretman daidzeinom je doveo do povećanja ( $p < 0.05$ ): intenziteta obojenosti GHRH neurosekreta u ME, volumenske gustine GH ćelija, volumena i intenziteta obojenosti GH ćelija; do smanjenja ( $p < 0.05$ ) numeričke gustine i apsolutnog broja GH ćelija; a nije uticao na volumen Arc i Pe jedra, volumensku gustinu SS neurona Pe jedra, intenzitet obojenosti SS neurosekreta u ME i nivo GH u cirkulaciji; sve u odnosu na odgovarajuće parametre Orx2 grupe.

Orhidektomija je dovela do značajnog povećanja ( $p < 0.05$ ): volumena PVN, volumenske gustine CRH neurona i duplo obeleženih CRH/cFos neurona u PVN, intenziteta obojenosti CRH neurosekreta u ME i nivoa ACTH u cirkulaciji; do značajnog smanjenja ( $p < 0.05$ ) volumenske i numeričke gustine ACTH ćelija i intenziteta obojenosti ACTH; dok apsolutni broj i volumen ACTH ćelija nisu promenjeni; sve u odnosu na odgovarajuće parametre Sham grupe pacova. Hroničan tretman estradiol-dipropionatom doveo do značajnog povećanja ( $p < 0.05$ ) volumenske gustine CRH/cFos neurona, intenziteta obojenosti CRH neurosekreta u ME, apsolutnog broja ACTH ćelija i nivoa ACTH u cirkulaciji; do značajnog smanjenja ( $p < 0.05$ ) volumenske i numeričke gustine i intenziteta obojenosti ACTH ćelija; dok nije uticao na volumen PVN, volumensku gustinu CRH neurona i volumen ACTH ćelija; sve u odnosu na odgovarajuće parametre Orx1 grupe. Hroničan tretman genisteinom je doveo

do povećanja ( $p < 0.05$ ): volumenske gustine CRH/cFos neurona PVN, volumenske gustine i apsolutnog broja ACTH ćelija i nivoa ACTH u cirkulaciji; do smanjenja ( $p < 0.05$ ) numeričke gustine i intenziteta obojenosti ACTH ćelija; dok nije uticao na volumen PVN, volumensku gustinu CRH neurona PVN, intenzitet obojenosti CRH neurosekreta u ME i volumen ACTH ćelija; sve u odnosu na odgovarajuće parametre Orx2 grupe. Hroničan tretman daidzeinom je doveo do povećanja ( $p < 0.05$ ) volumenske gustine CRH/cFos neurona i nivoa ACTH u cirkulaciji; smanjenja ( $p < 0.05$ ) volumenske gustine CRH neurona; dok nije uticao na volumen PVN, intenzitet obojenosti CRH neurosekreta u ME, volumensku i numeričku gustinu, apsolutni broj, volumen i intenzitet obojenosti ACTH ćelija; sve u odnosu na odgovarajuće parametre Orx2 grupe.

Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju na stimulatorni efekat genisteina na histološke, stereološke i biohemijske parametre somatotropnog i adrenokortikotropnog sistema, dok daidzein pokazuje nešto manje izražen stimulatorni efekat na pomenute sisteme. Ova studija predstavlja solidnu osnovu za dalja istraživanja mehanizama delovanja genisteina, odnosno daidzeina na somatotropni i adrenokortikotropni sistem, kao i za njihovu potencijalnu terapijsku korisnost.

ključne reči: genistein, daidzein, GHRH, SS, GH ćelije, CRH, ACTH ćelije

naučna oblast: biologija

uža naučna oblast: endokrinologija

UDK broj: 577.176.6:582.3/.99]:591.481.2(043.3)



Effects of soy isoflavones on the hypothalamic-pituitary system in rats: a morphofunctional study

Summary

The soy isoflavones genistein and daidzein are being used increasingly as preventive or alternative therapeutics in various pathological conditions. The effects of soy isoflavones on the neuroendocrine system were, and still are, the subject of numerous studies. Literature data predominantly focus on their effects on the gonadotrophic axis, considering the soy isoflavones established estrogenic and antiestrogenic mode of action. However, data about their potential effects on the somatotrophic and adrenocorticotrophic systems are rather scarce, but nevertheless very meaningful, considering the importance of these systems for the normal development and function of an organism. Furthermore, *in vitro* studies provide only limited data, that cannot be fully extrapolated to *in vivo* conditions.

The aim of this study was to investigate the effects of chronically applied estradiol dipropionate, genistein and daidzein on the histological, stereological and biochemical parameters of somatotrophic and adrenocorticotrophic systems in orchidectomized adult rats.

Initially, adult (three months old) Wistar rats were divided into two groups: sham operated (Sham) and orchidectomized (Orx). Two weeks after the surgery, the rats were subdivided into seven experimental groups. The first group (Sham1) included sham operated rats subcutaneously (s.c.) treated with an adequate volume of sterile olive oil, the medium for estradiol dipropionate (medium I). In the second group (Orx1) were orchidectomized rats s.c. treated with an adequate volume of medium I. The third group (Orx1+E) was comprised of orchidectomized rats s.c. treated with estradiol dipropionate in medium I (0.6 mg/kg b.w.). The fourth (sham operated – Sham2) and fifth (orchidectomized – Orx2) group of rats were s.c. treated with adequate volumes of absolute ethanol and sterile olive oil mixture, the medium for genistein or daidzein (mixing ratio was 1:2; medium II). In the sixth group (Orx2+G) were orchidectomized rats s.c. treated with genistein in medium II (30 mg/kg b.w.), while the seventh group (Orx2+D) included orchidectomized rats s.c. treated with daidzein in the same medium

(30 mg/kg b.w.). All the groups of animals received the treatment during three weeks (chronic treatment), and were sacrificed 24 h after the last injected dose. All the animals were weighed before and after the treatment, while the pituitary weights were measured after sacrificing. For the localization of arcuate (Arc), periventricular (Pe) and paraventricular (PVN) nuclei, as well as for median eminence (ME) cresyl violet histochemical staining was used. Hypothalamic releasing hormones (growth hormone releasing hormone – GHRH, somatostatin – SS, corticotrophin releasing hormone – CRH) and pituitary cells (somatotrophic – GH and adrenocorticotrophic – ACTH) were immunohistochemically (peroxidase-antiperoxidase) labeled. Histochemically stained and immunohistochemically labeled hypothalamic sections, as well as immunohistochemically labeled pituitary sections were stereologically analysed, using newCast stereological software package. The following values were obtained: the Arc, Pe and PVN nuclei volumes, volume density of SS neurones, volumes of the pituitaries, the volume and numerical density of GH and ACTH cells, as well as the absolute numbers and volumes of GH and ACTH cells. The circulating GH and ACTH were determined biochemically. The obtained data were statistically processed.

Orchidectomy significantly ( $p < 0.05$ ) decreased the body weight of adult rats in comparison to Sham1 operated group. Chronic treatment with estradiol dipropionate caused a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in body weight compared to the Orx1 group of rats. There were no changes in the same parameter after chronic treatments with genistein or daidzein, in comparison to Orx2 group. Orchidectomy of adult rats led to a decrease ( $p < 0.05$ ) in absolute pituitary weight, while the pituitary volume remained unchanged compared to Sham1 group. Treatment with estradiol dipropionate increased ( $p < 0.05$ ) absolute pituitary weight and volume, in comparison to Orx1 group of rats. Genistein treatment increased ( $p < 0.05$ ) absolute pituitary weight and volume compared to Orx2 group, while the same parameters remained unchanged after daidzein treatment.

Orchidectomy provoked a statistically significant enlargement ( $p < 0.05$ ) of the Arc nucleus volume; a decrease ( $p < 0.05$ ) of: the GHRH and SS amounts in ME, the volume density of SS neurons in Pe nucleus, the volume and numerical density of GH cells, while orchidectomy did not affect: the volume of Pe nucleus, the absolute number, volume and intensity of staining of GH cells and GH level in blood, all corresponding to

the appropriate parameters of Sham group. Administration of estradiol dipropionate to orchidectomized rats provoked an enhancement ( $p < 0.05$ ) of: Arc and Pe nucleus volume, the volume density of SS neurons in Pe nucleus, the SS amount in ME, the intensity of staining of GH cells and GH level in blood; and a decrease ( $p < 0.05$ ) of the volume and numerical density of GH cells; while the treatment did not affect: the GHRH amount in ME, the absolute number and volume of GH cells, all corresponding to the appropriate parameters of Orx group. Genistein treatment caused an increase ( $p < 0.05$ ) in: Arc nucleus volume, the GHRH and SS amounts in ME, the volume density of SS neurons in Pe nucleus, the volume and numerical density of GH cells, the absolute number and intensity of staining of GH cells, GH level in blood; while the treatment did not affect: the Pe nucleus volume and volume of GH cells, all corresponding to the appropriate parameters of Orx group. Daidzein treatment caused an increase ( $p < 0.05$ ) in: the GHRH amount in ME, the volume density of GH cells, volume and intensity of staining of GH cells; and a decrease ( $p < 0.05$ ) of: numerical density and absolute number of GH cells, while the treatment did not affect: Arc and Pe nucleus volume, the volume density of SS neurons in Pe nucleus, the SS amount in ME and GH level in blood, all corresponding to the appropriate parameters of Orx group.

Orchidectomy provoked a statistically significant enlargement ( $p < 0.05$ ) of: the PVN volume, the volume density of CRH and CRH/cFos neurons in PVN, the CRH amount in ME and ACTH level in blood; a decrease ( $p < 0.05$ ) of: the volume and numerical density and intensity of staining of ACTH cells; while the treatment did not affect the absolute number and volume of ACTH cells, all corresponding to the appropriate parameters of Sham group. Administration of estradiol dipropionate to orchidectomized rats provoked an enhancement ( $p < 0.05$ ) of: the volume density of CRH/cFos neurons in PVN, the CRH amounts in ME, the number of ACTH cells and ACTH level in blood; a decrease ( $p < 0.05$ ) of : the volume and numerical density and intensity of staining of ACTH cells; while the treatment did not affect: PVN volume, the volume density of CRH neurons in PVN and volume of ACTH cells, all corresponding to the appropriate parameters of Orx group. The treatment with genistein caused an increase ( $p < 0.05$ ) in: the volume density of CRH/cFos neurons in PVN, the volume density and absolute number of ACTH cells and ACTH level in blood; a decrease ( $p < 0.05$ ) of: the numerical density and intensity of staining of ACTH cells; while the

treatment did not affect: PVN volume, the volume density of CRH neurons in PVN, the CRH amounts in ME and volume of ACTH cells, all corresponding to the appropriate parameters of Orx group. Daidzein treatment caused an increase ( $p<0.05$ ) in: the volume density of CRH/cFos neurons in PVN and ACTH level in blood; a decrease ( $p<0.05$ ) of the volume density of CRH neurons in PVN; while the treatment did not affect: PVN volume, the CRH amounts in ME, the stereological parameters of ACTH cells, all corresponding to the appropriate parameters of Orx group.

These results indicate stimulatory effects of genistein on the majority of examined histological, stereological and biochemical parameters of the somatotropic and adrenocorticotrophic systems, while daidzein has less pronounced stimulatory effects on the examined parameters. This study represents a solid basis for some further investigations aimed at establishing the precise mechanisms of genistein/daidzein actions on the somatotropic and hypothalamic–pituitary–adrenal systems and their potential therapeutic usefulness.

key words: genistein, daidzein, GHRH, SS, GH cells, CRH, ACTH cells

academic expertise: biology

major in: endocrinology

UDK number: 577.176.6:582.3/.99]:591.481.2(043.3)

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Neuroendokrini sistem.....	1
1.1.1. Hipotalamus.....	1
1.1.2. Eminencija medijana.....	5
1.1.3. Hipofiza.....	6
1.1.4. Hipofizni krvotok.....	8
1.2. Somatotropni sistem.....	9
1.2.1. Arkuatno jedro hipotalamusa i oslobađajući hormon hormona rasta.....	11
1.2.2. Periventrikularno jedro hipotalamusa i somatostatin.....	14
1.2.3. Somatotropne ćelije hipofize i hormon rasta.....	17
1.3. Adrenokortikotropni sistem .....	20
1.3.1. Paraventrikularno jedro hipotalamusa i kortikotropni oslobađajući hormon.....	20
1.3.2. Adrenokortikotropne ćelije hipofize i adrenokortikotropni hormon.....	25
1.4. Estrogeni i fitoestrogeni-izoflavoni soje.....	27
1.4.1. Estrogeni.....	27
1.4.1.1. Ćelijski mehanizmi delovanja estrogena.....	28
1.4.2. Fitoestrogeni-izoflavoni soje.....	31
1.4.2.1. Ćelijski mehanizmi delovanja fitoestrogena-izoflavona soje.....	33
1.4.2.2. Biološki efekti izoflavona soje.....	35
1.5. Delovanje estrogena i izoflavona soje na ćelije hipotalamusa.....	43
1.6. Delovanje estrogena i izoflavona soje na ćelije hipofize.....	44
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	48
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	49
3.1. Laboratorijsko održavanje životinja.....	49
3.2. Eksperimentalni protokol i tretmani.....	50
3.3. Uzimanje i priprema tkiva za analizu.....	51
3.3.1. Histološko bojenje hipotalamusa.....	51
3.3.2. Lokalizacija jedara hipotalamusa.....	51
3.3.3. Imunohistohemijsko obeležavanje oslobađajućih hormona hipotalamusa	54
3.3.3.1. Imunohistohemijsko obeležavanje oslobađajućih hormona hipotalamusa u periventrikularnom i paraventrikularnom jedru i eminenciji medijani.....	54
3.3.3.2. Imunofluorescentno obeležavanje oslobađajućih hormona paraventrikularnog jedra i eminencije medijane.....	55
3.3.4. Imunohistohemijsko obeležavanje ćelija hipofize.....	56
3.4. Stereološka merenja.....	57
3.4.1. Stereološka merenja struktura hipotalamusa.....	58
3.4.1.1. Volumen jedara hipotalamusa.....	58
3.4.1.2. Volumenska gustina somatostatinskih neurona periventrikularnog jedra hipotalamusa.....	60
3.4.1.3. Volumenska gustina imunofluorescentno obeleženih neurona hipotalamusa.....	60

3.4.1.4. Analiza fluorescentno obeleženih oslobađajućih hormona u eminenciji medija.....	60
3.4.2. Stereološka merenja hipofize.....	61
3.4.2.1. Volumen hipofize.....	61
3.4.2.2. Volumenska gustina ACTH i GH ćelija.....	62
3.4.2.3. Apsolutni broj ACTH i GH ćelija.....	62
3.4.2.4. Volumen ACTH i GH ćelija.....	63
3.5. Biohemijske analize.....	64
3.5.1. Priprema krvne plazme i seruma.....	64
3.5.2. Određivanje koncentracije GH.....	64
3.5.3. Određivanje koncentracije ACTH.....	65
3.6. Statistička analiza podataka.....	65
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>66</b>
4.1. Telesne mase adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom.....	66
4.2. Masa i volumen hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom.....	67
4.3. Somatotropni sistem adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom.....	69
4.3.1. Histološke karakteristike arkuatnog jedra, periventrikularnog jedra i eminencije medijane.....	69
4.3.1.1. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana lažno orhidektomisanih adultnih pacova.....	69
4.3.1.2. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana orhidektomisanih adultnih pacova.....	70
4.3.1.3. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana estradiol-diproprionatom orhidektomisanih adultnih pacova.....	71
4.3.1.4. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana lažno orhidektomisanih adultnih pacova.....	73
4.3.1.5. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana orhidektomisanih adultnih pacova.....	74
4.3.1.6. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana genisteinom orhidektomisanih adultnih pacova.....	75
4.3.1.7. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana daidzeinom orhidektomisanih adultnih pacova.....	76
4.3.2. Stereološke karakteristike arkuatnog jedra, periventrikularnog jedra i eminencije medijane adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom.....	77
4.3.2.1. Volumen arkuatnog i periventrikularnog jedra.....	77
4.3.2.2. Volumenska gustina SS neurona u Pe jedru.....	79
4.3.3. Histološke karakteristike somatotropnih ćelija hipofize.....	80
4.3.3.1. GH ćelije lažno orhidektomisanih adultnih pacova.....	80
4.3.3.2. GH ćelije orhidektomisanih adultnih pacova.....	81

4.3.3.3. GH ćelije nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom orhidektomisanih adultnih pacova.....	81
4.3.3.4. GH ćelije lažno orhidektomisanih adultnih pacova.....	82
4.3.3.5. GH ćelije orhidektomisanih adultnih pacova.....	83
4.3.3.6. GH ćelije nakon hroničnog tretmana genisteinom orhidektomisanih adultnih pacova.....	83
4.3.3.7. GH ćelije nakon hroničnog tretmana daidzeinom orhidektomisanih adultnih pacova.....	84
4.3.4. Stereološke karakteristike GH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom.....	85
4.3.4.1. Volumenska gustina GH ćelija.....	85
4.3.4.2. Numerička gustina GH ćelija.....	86
4.3.4.3. Apsolutni broj GH ćelija.....	86
4.3.4.4. Volumen GH ćelija.....	87
4.3.5. Koncentracija GH u cirkulaciji.....	88
4.4. Adrenokortikotropni sistem adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom.....	89
4.4.1. Histološke karakteristike paraventrikularnog jedra i eminencije medijane.....	89
4.4.1.1. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana lažno orhidektomisanih adultnih pacova.....	89
4.4.1.2. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana orhidektomisanih adultnih pacova.....	90
4.4.1.3. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom orhidektomisanih adultnih pacova...	92
4.4.1.4. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana lažno orhidektomisanih adultnih pacova.....	93
4.4.1.5. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana orhidektomisanih adultnih pacova.....	95
4.4.1.6. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana genisteinom orhidektomisanih adultnih pacova.....	96
4.4.1.7. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana daidzeinom orhidektomisanih adultnih pacova.....	97
4.4.2. Stereološke karakteristike paraventrikularnog jedra hipotalamusa adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol- dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom.....	99
4.4.2.1. Volumen paraventrikularnog jedra.....	99
4.4.2.2. Volumenska gustina CRH neurona u PVN.....	99
4.4.2.3. Volumenska gustina duplo- imunoobeleženih CRH/cFos u PVN.....	100
4.4.3. Histološke karakteristike adrenokortikotropnih ćelija hipofiza.....	101
4.4.3.1. ACTH ćelije lažno operisanih adultnih pacova.....	101
4.4.3.2. ACTH ćelije orhidektomisanih adultnih pacova.....	102
4.4.3.3. ACTH ćelije nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom orhidektomisanih adultnih pacova.....	102
4.4.3.4. ACTH ćelije lažno operisanih adultnih pacova.....	103
4.4.3.5. ACTH ćelije orhidektomisanih adulta pacova.....	104

4.4.3.6. ACTH ćelije nakon hroničnog tretmana genisteinom orhidektomisanih adultnih pacova.....	104
4.4.3.7. ACTH ćelije nakon hroničnog tretmana daidzeinom orhidektomisanih adultnih pacova.....	105
4.4.4. Stereološke karakteristike ACTH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom.....	105
4.4.4.1. Volumenska gustina ACTH ćelija.....	105
4.4.4.2. Numerička gustina ACTH ćelija.....	106
4.4.4.3. Apsolutni broj ACTH ćelija.....	107
4.4.4.4. Volumen ACTH ćelija.....	108
4.4.5. Koncentracija ACTH u cirkulaciji.....	109
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>111</b>
5.1. Efekti orhidektomije, tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom na telesnu masu adultnih pacova.....	111
5.2. Efekti orhidektomije, tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom na masu i volumen hipofize orhidektomisanih adultnih pacova.....	113
5.3. Efekti orhidektomije, tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom na somatotropni sistem adultnih pacova.....	114
5.3.1. Efekti orhidektomije na somatotropni sistem adultnih pacova.....	114
5.3.2. Efekti tretmana estradiol-diproprionata na somatotropni sistem orhidektomisanih adultnih pacova.....	118
5.3.3. Efekti tretmana genisteinom ili daidzeinom na somatotropni sistem orhidektomisanih adultnih pacova.....	120
5.4. Efekti orhidektomije, tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom na adrenokortikotropni sistem adultnih pacova.....	123
5.4.1. Efekti orhidektomije na adrenokortikotropni sistem adultnih pacova.....	123
5.4.2. Efekti tretmana estradiol-diproprionato na adrenokortikotropni sistem orhidektomisanih adultnih pacova.....	124
5.4.3. Efekti tretmana genisteinom ili daidzeinom na adrenokortikotropni sistem orhidektomisanih adultnih pacova.....	125
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>128</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>132</b>



# 1. UVOD

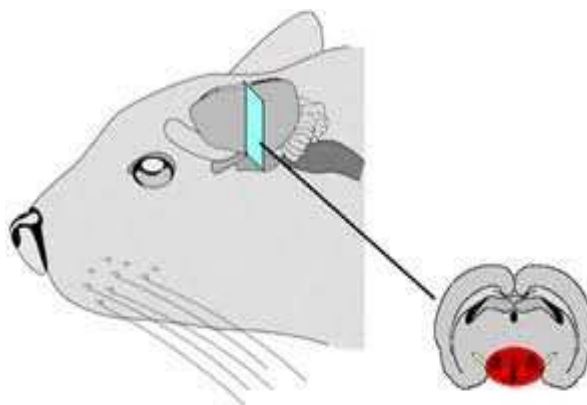
## 1.1. Neuroendokrini sistem

Interakcija nervnog i endokrinog sistema obezbeđuje efikasno funkcionisanje homeostatskih i regulatornih procesa jedinke i održanje vrste. Međusobno povezivanje pomenutih sistema ostvareno je na nivou hipotalamusa, jednog od filogenetski najstarih delova centralnog nervnog sistema.

### 1.1.1. Hipotalamus

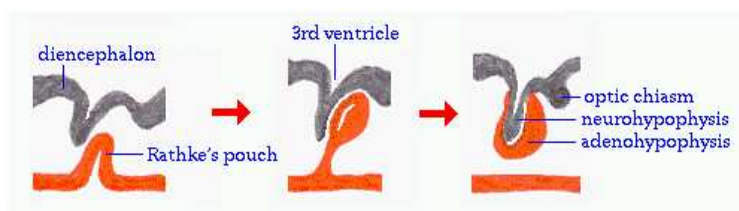
Hipotalamus (od grčkih reči *ὑπό*-ispod', *θάλαμος*-bračna ložnica, spavaća soba) zauzima svega 1% ukupnog volumena mozga, ali njegova uloga značajno prevazilazi njegovu veličinu. On igra ključnu ulogu u integrisanju širokog spektra odgovora na zahteve kako spoljašne, tako i unutrašnje sredine, a sve u cilju održanja homeostaze i reprodukcije.

Odgovori hipotalamusa su uključeni u regulaciju: metabolizma, telesne temperature, srčanog rada, krvnog pritiska, dnevno-noćnog ritma, unosa hrane i tečnosti, odbranu od predatora i drugih pretnji, kao i brigu o potomstvu. Gotovo svaki region centralnog (CNS) i perifernog (PNS) nervnog sistema komunicira sa hipotalamusom, tako da on predstavlja centar autonomnog nervnog, neuroendokrinog i limbičkog sistema (Soderman 2006).



Crtež 1.1. Šematski prikaz položaja hipotalamusa ([www.bcs.worthpublishers.com](http://www.bcs.worthpublishers.com))

Tokom embrionalnog razvića hipotalamus nastaje od prednjeg dela embrionalnog *prosencefalon-a*, označenog kao embrionalni *diencefalon* (međumozak). Pojavljuje se kao najniže od tri zadebljanja bočnog zida treće moždane komore, odvojen od epitalamusa i talamusa (druga dva zadebljanja) logitudinalnim (uzdužnim) žljebom, tj. hipotalamusnim sulkusom. Hipotalamus i talamus se razvijaju u lateralne zidove međumozga, sa tom razlikom što se talamus razvija u tesnoj saradnji sa korteksom, a hipotalamus ne. Potom se centralna šupljina između njih postepeno transformiše u treću moždanu komoru. Krov treće moždane komore formira jedan sloj endodermalnih ćelija pokrivenih mezenhimom, koji je bogat kapilarima. Lokalna invaginacija kapilara zajedno sa endodermalnim ćelijama formira horoidni pleksus treće moždane komore (Soderman 2006).



Crtež 1.2. Šematski prikaz razvoja hipotalamusa i hipofize (Soderman 2006)

Razvojna perspektiva određuje kasniji položaj hipotalamusa tj. on se nalazi u bazi međumozga, ispod talamusa od koga je razdvojen hipotalamusnim sulkusom, koji ograničava dorzalni deo hipotalamusa sa obe strane treće moždane komore. Konvencionalno uzeta rostralna granica hipotalamusa je *lamina terminalis*, dok kaudalnu granicu predstavlja zamišljena linija koja se prostire ispod kaudalne granice *corpus mammilaris* (mamilarnih tela), a iznad *commissure*. Kaudalne i rostralne granice hipotalamusa nisu jasno definisane te se na mikroskopskim presecima hipotalamusa čini da je on spojen sa okolnim delovima CNS. Tako se rostralni deo hipotalamusa produžava u preoptički prostor (*septal area* i *substantia perforata anterior*). Prednja zona lateralnog (bočnog) hipotalamusa spaja se sa *substantia innominata*, dok se kaudalno naslanja na *internal capsule* (dorzolateralno) i *globus pallidus* (lateralno i ventralno). Kaudalno se hipotalamus nastavlja na centralnu sivu masu i *tegmentum mezencefalona*. Bazalna površina hipotalamusa definisana je rostralno optičkom hijazmom, a kaudalno mamilarnim telima. Na sagitalnom preseku mozga hipotalamus je lokalizovan iza i iznad optičke hijazme. Između je siva masa (*tuber cinereum*, deo

hipotalamusa) koja zajedno sa infundibulumom hipofize formira hipofiznu dršku. Eminencija medijana (ME) leži u osnovi hipotalamusa i veoma je važna u komunikaciji hipotalamusa i hipofize (Soderman 2006).

U komunikaciji između nervnog i endokrinog sistema učestvuju dva tipa neurosekretornih ćelija hipotalamusa. Neuroendokrini magnocelularni neuroni, oslobađaju vazopresin (arginin-vazopresin, AVP) i oksitocin iz neurohipofize u krvne sudove, dok parvocelularni neuroni oslobađaju neurosekret u hipotalamo-hipofizni portalni krvotok i tako kontrolišu oslobađanje hormona adenohipofize.

Grupe ćelija u hipotalamusu nisu jasno diferencirane već su odvojene difuznim vlaknima nervnog sistema. Crosby i Woodburne (1940) predložili su podelu hipotalamusa na periventrikularnu, medijalnu i lateralnu zonu. U sastav periventrikularne zone ulazi većina neurona koji hormone oslobađaju u hipotalamo-hipofizni portalni krvotok i tako učestvuju u regulaciju sekrecije hipofiznih hormona. Medijalnu zonu čine rostro-kaudalno organizovani nizovi različitih neuronskih grupa koje dobijaju informacije, najvećim delom, iz limbičkih struktura telencefalona (prednji mozak) kao što je *septum* i *amigdala*, dok su neuroni laterarne zone hipotalamusa rasuti između vlakna prednjeg mozga (Paxinos 2004). S druge strane, Le Gros Clark (1938) predlaže rostro-kaudalnu podelu hipotalamusa na: preoptičku, supraoptičku (ili anteriornu), tuberalnu i mamilarnu zonu.

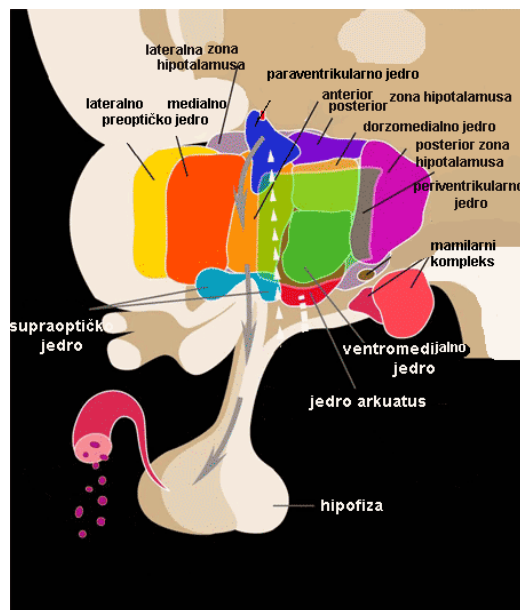
Već je pomenuto da gotovo čitava kontrola sinteze i sekrecije hormona hipofize zavisi od sekrecije neurona periventrikularne zone (Markakis i Swanson 1997), koji su označenih kao motoneuroni neuroendokrog sistema, po analogiji sa motoneuronima kičmene moždine. Izuzetak su supraoptičko jedro koga čine magnocelularni neuroni koji tokom razvića migriraju iz periventrikularne zone, kao i gonadotropin (GnRH) oslobađajući neuroni koji su poreklom iz olfaktornog epitela.

Periventrikularna zona hipotalamusa obuhvata 4 regiona: preoptički, anteriorni, tuberalni i posteriorni (mamilarni). Preoptički region obuhvata medijalno preoptičko jedro (MnPo), koje kontroliše kardiovaskularne funkcije, odnosno homeostazu telesnih tečnosti. S obzirom na svoju ulogu ovo jedro dobija snažne inpute iz subforniksa i parabranihijalnog jedra, a projektuje se na paraventrikularno (PVN) i dorzomedijalno jedro (Saper i Levisohn 1983; Saper 2003). Anteroventralno periventrikularno (AVPV) jedro okupira ventralni deo periventrikularne zone i kontroliše sekreciju GnRH

(Wiegand i Terasawa 1982) kao i cirkadijalni ritam. Anteriorno periventrikularno (PeA) jedro predstavlja kaudalnu ekstenziju periventrikularnog preoptičkog jedra sa kojim je i morfološki sličano i nalazi se u anteriornom regionu periventrikularne zone hipotalamusa. U ovom regionu nalaze se i dva najbolje uočljiva jedra hipotalamusa, suprahijazmatično jedro (SCh) i PVN. SCh jedro podeljeno je na dorzomedijalni i ventrolateralni region, i ima ulogu u kontroli cirkadijalnog ritma glodara. PVN ima centralnu ulogu u odgovoru organizma na stres, ali i na unos hrane i tečnosti. Najveći deo tuberalne zone zauzima intermedijalno periventrikularno (Pe) jedro koje se nastavlja na anteriorno periventrikularno jedro i prostire do arkuatnog (Arc) jedra, između ostalog odgovorno za kontrolu sekrecije somatostatina (SS). Posteriorni deo periventrikularne zone okupiran je posteriornim periventrikularnim jedrom koje okružuje donji kraj treće moždane komore. Ova difuzna ćelijska masa dorzalno je ograničena dorzomedijalnim jedrom, a ventralno Arc jedrom. Kako njegove ćelije podsećaju na ćelije Arc jedra često je predstavljen kao deo ovog jedra, dok posmatrano neurohemijski više podseća na grupu periventrikularnih jedara. Arc jedro se prostire čitavom dužinom infundibularnog udubljenja. Između ostalog ćelije Arc jedra sintetišu oslobađajući hormon hormona rasta (GHRH) (Simerly 2004).

Medijalna zona hipotalamusa obuhvata grupe velikih jedara koji imaju ulogu u inicijaciji motivacionog ponašanja (kopulatornog, agresivnog, apetita). Iako je funkcionalni značaj lateralne zone hipotalamusa najmanje poznat, istraživanja upućuju na ulogu ove zone hipotalamusa u motivacionom ponašanju (Simerly 2004).

Veze hipotalamusa ostvaraju se najčešće pomoću nemijeliniziranih ili polumijeliniziranih nervnih vlakana. Pomoću svojih aferentnih i eferentnih projekcija hipotalamus je u prvom redu povezan sa filogenetski starim delovima kore velikog mozga i sa amigdaloidnim jedrima. Tako aferentne veze hipotalamusa potiču iz kore prednjeg mozga, subkortikalnih jedara, talamusa, retikularne formacije, jedara kranijalnih živaca i kičmene moždine. Eferentne veze hipotalamusa se ostvaruju preko nishodnih i ushodnih mamilotalamičkih projekcija (Pašić 1993).



Crtež 1.3. Šematski prikaz hipotalamusa (www. colorado.edu)

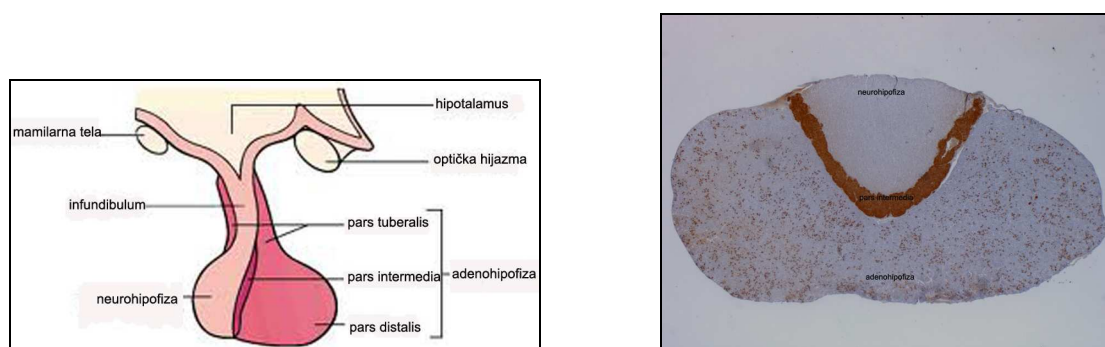
### 1.1.2. Eminencija medijana

Eminencija medijana je jedan od sedam cirkumventrikularnih organa u mozgu, tako nazvanih zato što leže izvan krvno-moždane barijera. Sastoji se od tri zone endodimske, unutrašnje (*zona interna*) i spoljašnje (*zona eksterna*) zone. Ependimska zona formira pod treće moždane komore i uglavnom se sastoji od gusto zbijenih ćelija kako bi se sprečilo mešanje sadržaja komore i ME. U okviru endodimskih ćelija izdvajaju se visoko specijalizovane ćelije tancite karakteristične po mehurastim izbočinama uronjenim u cerebrospinalnu tečnost treće moždane komore i citoplazmatičnim nastavcima koji ulaze u ME. Tancite su potporne ćelije i fagociti, a poseduju i niz drugih važnih bioloških funkcija. Tancite su bogate dejodinizom tipa-2, enzimom koji prevodi tiroksin u biološki aktivniju formu trijodtironin te postoji mogućnost da ovde nastao trijodtironin učestvuju u mehanizmu povratne regulacije sekrecije tireostimulirajućeg hormona. Unutrašnja zona ME leži ispod endodimske i prvenstveno se sastoji od nemijeliziranih aksona hipotalamus-hipofiznog sistema. Spoljašnja zona ME se sastoji od nervnih zaršetaka, pituicita (astroglija neurohipofize koja okružuje neurosekretorne aksone; one bukvalno stežu nervne završetke u bazalnim uslovima i relaksiraju kada postoji zahtev za oslobađanje neurosekreta), nastavaka tancita i kapilara. Spoljašnja zona ME podeljena je na retikularni i palisadni sloj. Retikularni sloj leži između unutrašnje zone i palisadnog sloja i čine ga endodimski i glijalni nastavci i aksoni parvicelularnog sistema. Palisadna zona leži između

retikularne i ventralne površine ME, karakteristična je po upravnom položaju glijalnih nastavaka i tanicita u odnosu na ventralnu površinu infundibularnog ulegnuća, kao i po snopovima aksona i završetaka između kapilara ME (Neill 2005).

### 1.1.3. Hipofiza

Hipofiza, koju čine neurohipofiza i adenohipofiza, razvija se u tesnoj vezi sa hipotalamusom. Neurohipofiza, nastaje kao evaginacija međumozga, dok adenohipofiza nije neuronskog porekla i nastaje od ektodermalnog divertikuluma primarne usne duplje - Ratkeovog džepa. Ovaj divertikulum se izdužuje i spaja sa infundibulumom te gubi kontakt sa primitivnom usnom dupljom. Čelije adenohipofize se grupišu duž i oko hipofizne drške i formiraju *pars tuberalis*. Tako neurohipofiza ima direktan kontakt sa hipotalamusom, dok adenohipofiza preko bogate vaskularne mreže, portalnog krvotoka, komuncira sa hipotalamusom (Hamilton and Mossman 1982; Kandel i sar. 2000).



Crtež 1.4. a) Šematski prikaz sagitalnog preseka hipofize (www. mhhe.com) b) poprečni presek hipofize

Adenohipofiza je kompleksna endokrina žlezda koja se sastoji od različitih populacija ćelija koje sintetišu hormone (hormonprodukujuće-HP ćelije) i folikulostelatnih ćelija. Zajedno sa neurohipofizom čini hipofizu, strukturu izgrađenu od epitelnih i neuralnih elemenata, smeštenu sa ventralne strane hipotalamusa, a sa kojim je povezana infundibulumom. Kao odgovor na stimulatorne i inhibitorne neuroendokrine signale koji dolaze iz hipotalamusa ćelije adenohipofize sintetišu peptidne hormone (Melmed i Kleinberg 2002).

Hipofiza je smeštena u dorzalnom udubljenju sfenoidne kosti koje je označeno kao tursko sedlo (*sella turcica*). Ima ključnu ulogu u regulisanju funkcija drugih endokrinih žlezda. Funkcija i značaj hipofize počinju da se rasvetljavaju polovinom 19.

veka, mada se za njeno postojanje zna više od 2000 godina. Klod Bernar je 1853. godine pretpostavio da produkti hipofize utiču na sve druge ćelije u telu, ali na drugačiji način od nervnog sistema.

Ćelije adenohipofize nalaze se u bliskoj vezi sa bogatom mrežom fenestriranih kapilara tako da mogu veoma brzo da oslobode sintetisane hormone u cirkulaciju. Razlikuju se tri dela adenohipofize. *Pars distalis* zauzima najveći deo adenohipofize, a nastaje od prednjeg zida Ratkeovog džepa. *Pars intermedia* nastaje od zadnjeg zida Ratkeovog džepa, a nalazi se između *pars nervosa* i *pars distalis*-a. *Pars tuberaris* predstavlja deo adenohipofize koji nepotpuno obuhvata infundibulum, a nastaje od prednjeg i bočnih zidova Ratkeovog džepa. U njemu se nalazi deo primarnog hipotalamo-hipofiznog spleta, završeci aksona pojedinih hipotalamičnih jedara i pojedine gonadotropne i tireotropne ćelije (Melmed i Kleinberg 2002).

Pokušaji da se HP ćelije adenohipofize klasifikuju su stari više od sto godina. Jedna od značajnijih je Herlant-ova klasifikacija (1964), po kojoj su ćelije na nivou svetlosne mikroskopije podeljene na one koje se ne boje histološkim bojama (hromofobne ćelije) i na one koje se boje histološkim bojama (hromofilne ćelije). Hromofilne ćelije se boje kiselim (acidofilne) ili baznim bojama (bazofilne). Adrenokortikotropne (ACTH) ćelije, tireotropne (TSH) ćelije i gonadotropne (folikulostimulirajuće i luteinizirajuće; FSH i LH) ćelije su svrstane u grupu bazofilnih ćelija, dok somatotropne (GH) i prolaktinske (PRL) ćelije pripadaju grupi acidofilnih ćelija hipofize.

Proporcija različitih tipova HP ćelija se dinamički menja u zavisnosti od endokrinih zahteva organizma (Vankelecom 2007; Vankelecom i Gremeaux 2010). Ranije se smatralo da određeni tip HP ćelija sintetiše samo jedan hormon i prema tom principu ćelije su okarakterisane kao somatotropne, mamotropne, tireotropne, gonadotropne i adrenokortikotropne. Međutim, kada je u sekretornim granulama određenog tipa HP ćelija otkriveno više hormona, prihvaćen je plurihormonalni koncept funkcionisanja HP ćelija. Pokazano je da oko 30% HP ćelija adenohipofiza pacova, miševa i majmuna eksprimiraju informacionu ribonukleinsku kiselinu (iRNK) za različite hormone (Hauspie i sar. 2003), ali iz ekspresije ovih iRNK ne proizilaze uvek funkcionalni proteini (Roudbaraki i sar. 1999). U novije vreme identifikovani su i specifični transkripcioni faktori (TF) koji određuju diferencijaciju HP ćelija u smislu da

dominantno proizvode jedan hormon, a pod određenim uslovima moguća je njihova transdiferencijacija u drugi tip ćelija (Asa i Ezzat 1999; Villalobos i sar. 2004). U somatotropnim, tireotropnim i mamotropnim ćelijama prisutan je pit-1 transkripcijski faktor. (Haugen i sar. 1994; Asa i Ezzat 1999).

Kontrola funkcije adenohipofize obuhvata tri nivoa. Prvi nivo je hipotalamska kontrola koja se odvija preko hormona, sekretovanih u portalni sistem hipofize, koji stimulišu, odnosno inhibiraju sintezu hormona adenohipofize. Oni se direktno vezuju za membranske receptore na ćelijama adenohipofize, visoko selektivne i specifične molekule za svaki od hipotalamskih hormona, i izazivaju stimulatoran ili inhibitoran uticaj na transkripciju gena i sekreciju hormona hipofize. Drugi nivo kontrole se realizuje posredstvom perifernih hormona, produkata sekrecije ciljnih tkiva adenohipofiznih hormona, koji uglavnom preko negativne povratne sprege regulišu funkciju žlezdanih epitelnih ćelija. Treći nivo kontrole su autokrini i parakrini faktori koji lokalno regulišu kako sopstvenu tako i funkciju susednih ćelija (Melmed i Kleinberg 2002).

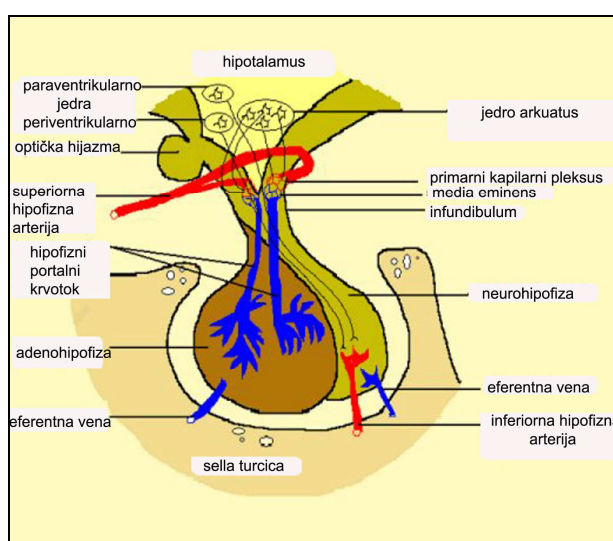
Neurohipofizu čine aksona vlakna čija su neuronska tela smeštena u nukleusima hipotalamusa. Neurohipofiza obuhvata ME, infundibulum i *pars nervosa*. Infundibulum obrazuje anatomsku i funkcionalnu vezu hipofize sa hipotalamusom. Čine ga supraoptički i tuberoinfundibularni nervni putevi. Magnocelularni neuroni PVN i supraoptičkog jedra čiji se aksoni završavaju u *pars nervosa*, sintetizuju oksitocin, vazopresin, kao i neurofizin I i II. Neurohormoni sintetisani u neuronima hipotalamusa, izlučuju se u perivaskularne prostore fenestriranih kapilara *pars nervosa*, a ne u prostore sinaptičkih pukotina između dva neurona. Organizacija neurohipofize upravo je karakteristična po tome što neurohormoni dospevaju u sistemsku cirkulaciju zaobilazeći krvno-moždanu barijeru (Melmed i Kleinberg 2002).

#### **1.1.4. Hipofizni krvotok**

Od unutrašnje karotidne arterije polazi superiorna hipofizna arterija koja snabdeva krvlju ME i infundibulum, i inferiorna hipofizna arterija koja snabdeva krvlju neurohipofizu i u manjoj meri infundibulum. Superiorna hipofizna arterija se grana čineći primarni kapilarni pleksus, koji snabdeva krvlju ME i infundibulum. Zatim kapilari primarnog kapilarnog pleksusa formiraju vene, koje se pružaju do



adenohipofize gde formiraju sekundarni kapilarni pleksus. Ovaj portalni hipofizni krvotok je od velikog značaja jer kroz njega neurohormoni iz ME dolaze do adenohipofize i kontrolišu sekreciju ćelija adenohipofize. Još jedna važna karakteristika portalnog krvotoka je struktura karakteristična za periferne, a ne za centralne krvne sudove. Endotel kapilara portalnog krvotoka je fenestriran, te se ME nalazi izvan krvno-moždane barijere. Nekoliko venskih sudova vrše drenažu hipofize i napuštaju lobanju preko jugularne vene, dok su prisutne i brojne vene koje povezuju neurohipofizu sa sinusom kavernozumom. Smatra se da glavna drenaža adenohipofize ide preko kratkih portalnih vena neurohipofiznog kapilarnog pleksusa. Protok krvi, koja je bogata

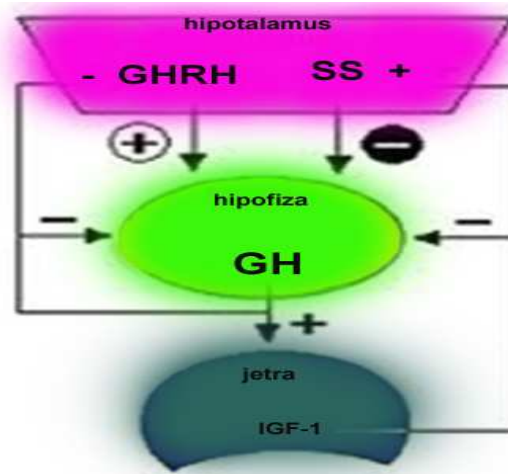


Crtež 1.5. Shematski prikaz arterija i vena hipotalamusa i hipofize (eddoctoronline.com)

hormonima adenohipofize, može biti regulisan faktorima tj. hormonima koji kontrolišu kapilarni pleksus, te pravac protoka venske krvi može da varira u različitim fiziološkim stanjima (Krieger i Hughes 1980; Palkovits 1982).

## 1.2. Somatotropni sistem

Somatotropni sistem igra vitalnu ulogu u hormonskoj regulaciji postnatalnog rasta i razvića sisara. Obuhvata regulaciju sekrecije hormona rasta (GH) iz somatotropnih (GH) ćelija hipofize, njegovu distribuciju i aktivnost u perifernim tkivima, interakciju sa specifičnim receptorima hormona rasta (GHR), kao i endokrini, parakrini i autokrini odgovor, od kojih su mnogi posredovani putem insulinskog faktora rasta (IGF).



Crtež 1.6. Shema somatotropnog sistema (www.physiciansselect.co.uk )

Somatotropnom sistemu pripadaju hipotalamusni regulatorni centri, adenohipofiza, periferni ciljni organi i zatim receptori i signalni molekuli (Giustina i Veldhuis 1998; Le Roith i sar. 2001). Brojne interakcije između komponenata somatotropnog sistema modulišu neurotransmiteri i neuropeptidi, polni steroidi, kortikosteroidi, tiroksin, i metabolički signali. GH utiče na veliki broj ciljnih tkiva i organa, kao što su jetra, bubrezi, koštano tkivo, mozak, mlečne žlezde, jajnik, testis, srce, skeletni mišići, gastrointestinalni trakt, slezina, timus, koštana srž i koža (Veldhuis i sar. 2005). Somatotropni sistem ima veoma važnu regulatornu ulogu u metabolizmu proteina, ugljenih hidrata i lipida (Daughaday 1992). Hormon rasta stimuliše biosintezu IGF-1 u jetri, preko koga se odvija najveći broj efekata ovog hormona na rast (Haymond i Mauras 1996; Le Roith i sar. 2001). Međutim, u nekim tipovima ćelija, kao što su hondrocite i zrele adipocite, GH deluje nezavisno od IGF-1, a u mnogim tkivima i organima reguliše gensku ekspresiju IGF-1 *in situ* (Hwa i sar. 1999). Na aktivnost somatotropnog sistema utiču faktori životne sredine, metabolički i hormonski faktori uključujući glad, gojaznost, bolesti, povrede, seksualnu aktivnost, glukokortikoide, aktivnost štitne žlezde. Ovi faktori ne regulišu samo sintezu i oslobađanje GH delovanjem na nivou hipotalamusa, već mogu menjati i odgovor ciljnih tkiva na GH (Giustina i Veldhuis 1998).

Koncentracija GH u krvi se menja u toku dana sa najvišom tačkom u prvih nekoliko sati sna. Pored toga, sekrecija GH je pulsatilne prirode, i neophodna je za normalan rast. Osnovni regulatori sekrecije GH su dva hipotalamusna hormona, GHRH

i SS. Prisustvo različite koncentracije GHRH i SS u portalnom krvotoku vodi ka različitoj koncentraciji GH u sistemskom krvotoku, tako da se GH oslobađa u prisustvu niske koncentracije SS i visoke koncentracije GHRH u portalnom krvotoku (Tannenbaum i Ling 1984; Plotsky i Vale 1985). Mehanizam, kojim ova dva neuropeptida regulišu oslobađanje GH, uključuje adenilat ciklaza/ciklični adenozin monofosfata (cAMP) put i promene intracelularnog  $Ca^{2+}$  (Bilezikjian i Vale 1983; Frohman i Jansson 1986; Lussier i sar. 1991a). Povećanje nivoa cAMP vodi ka otvaranju  $Na^+$  kanala, depolarizacije membrane i influksa  $Ca^{2+}$  kroz L-tip  $Ca^{2+}$  kanala (Lussier i sar. 1991b; Naumov i sar. 1994). Ovo povećanje intracelularnog  $Ca^{2+}$  vodi ka oslobađanju GH procesom egzocitoze. Produkcija cAMP i oslobađanje GH zavisi od dodatnih signalnih mehanizama uključujući protein kinazu C, tirozin kinazu (Tyr kinaza), diacilglicerol i fosfolipazu (Cronin i sar. 1986; Ogiwara i sar. 1997). Takođe, postoje podaci o uticaju GHRH na transkripciju GH gena cAMP-zavisnim procesom (Clayton i sar. 1986). Treći hormon uključen u regulaciju GH sekrecije je grelin, izgrađen od 28 amino kiselina (van der Lely i sar. 2004). Dominantno se sintetiše u želucu, dok su znatno niže koncentracije detektovane u crevima, pankreasu, bubrežima, imunom sistemu, placenti, testisima, hipofizi, plućima i hipotalamusu (Korbonits i sar. 2001; Lu i sar. 2001). Deluje sinergistički sa GHRH stimulišući sekreciju GH, posredstvom GH sekretagognog receptora (Kojima i sar. 1999). Sekrecija GH je i pod uticajem negativne povratne sprege somatomedina, naročito IGF-1, kao i kratke negativne povratne sprege samog GH (Giustina i Veldihus 1998)

### **1.2.1. Arkuatno jedro hipotalamusa i oslobađajući hormon hormona rasta**

Arc jedro okružuje ventralni deo treće moždane komore. Na histološkim presecima anteriornog dela tubelnog regiona pojavljuje se kao grupacija neurona retrohijazmatične oblasti oko srednje linije hipotalamusa, ispod treće moždane komore. Intermediajalni deo tubelnog regiona karakteriše dobro vidljivo bilateralno simetrično jedro, jasno odvojeno od ventromedijalnog i dorzomedijalnog jedra. U kaudalnom delu tubelnog regiona hipotalamusa Arc jedro se proširuje ventralno i bilateralna ćelijska agregacija se spaja, a zatim dalje u kaudalnom pravcu jedro se progresivno smanjuje. Ovakav opis anatomije Arc jedra u skladu je sa zapažanjima jedne grupe autora (van den Pol i Cassidy 1982; Chronwall 1985; Everitt i sar. 1986; Selemon i Sladek 1986),

dok druga grupa autora nastoji da na osnovu neurohemijskih karakteristika mamilarni deo Arc jedra priključiti posteriornom Pe jedru (Sawchenko i sar. 1985; Swanson 1992). U okviru Arc jedra izdvaja se populacija neuroendokrinih i centralno-projektovanih neurona. Podela Arc jedra može biti i na dorzo-medijalni region koji sadrži male neurone i veći ventro-lateralni region u kome su neuroni srednje veličine. Mnogi neuroni Arc jedra ispoljavaju specifične neuroendokrine fenotipove (Everitt i sar. 1986), kao GHRH neuroni koji zauzimaju ventro-lateralni deo Arc jedra (Fodor i sar. 1994; Ishikawa i sar. 1987; Kawano i Daikoku 1988). Najmanje 15 neurotransmitera i neuropeptida je identifikovano u Arc jedru. Između ostalih, neuroni Arc jedra sintetisaju neuropeptid Y (NPY) i inhibitorni neuropeptid GABA koji su važni u regulaciji apetita, i njihovo lučenje stimuliše grelin, a inhibira insulin i leptin (Kawano i Daikoku 1988).

Kod pacova, GHRH imunopozitivni neuroni prisutni su i u supraoptičkom (SO), PVN i dorzomedijalnom jedru hipotalamusa, medijalnom perifornikalnom regionu lateralnog hipotalamusa, bazo lateralnom hipotalamusu i u medijalnim i lateralnim granicama ventromedialnog jedra (VMN) (Muller i sar. 1999). GHRH je prisutan i u limbičkim strukturama, cerebralnom korteksu, kao i u strukturama perifernog nervnog sistema, gastrointestinalnom traktu, hipofizi, gonadama, nadbubrežnim i štitastoj žlezdi, plućima i bubrezima. Kod pacova, najveća koncentracija GHRH imunopozitivnih neuronskih tela i GHRH iRNK nalazi se u ventrolateralnom delu Arc (Muller i sar. 1999; Mayo i sar. 1995). GHRH neuroni mogu sintetisati i druga jedinjenja poput galanina, enkefalina, neurotensina,  $\alpha$  melanotropnog hormona, SS, NPY, supstance P, tirozin hidroksilaze, kao i neurotransmitere dopamin, acetilholin i  $\gamma$  aminobuternu kiselinu (GABA) (Sawchenko i sar. 1985; Meister i sar. 1986; Niimi i sar. 1990, 1991).

Prvi put izolovan 1982. godine, GHRH (Guillemin i sar. 1982; Rivier i sar. 1982) zajedno sa vazoaktivnim intestinalnim peptidom (VIP), pripada sekretin-glukagon proteinskoj familiji. Obe izolovane forme GHRH, (GHRH-[1-44]NH<sub>2</sub>; GHRH-[1-40]OH) nastaju od istog prekursorog molekula prepro-GHRH procesom post-translacione obrade (Boulanger i sar. 1992). Prvih 29 aminokiselinskih jedinica obe izolovane forme imaju punu biološku aktivnost. Treća izolovana forma GHRH-[1-37]OH prisutna je jedino u neuroendokrinim tumorima kod pacijenata obolelih od akromegalije. GHRH gen, lokalizovan na hromozomu 20 kod ljudi i 3 kod pacova, prostire se na oko 10 kilobaznih parova, a čine ga 5 egzona (egzon 1 sadrži ' region koji

se ne prevodi, egzoni 2-4 kodiraju pre-pro GHRH zajedno sa egzonom 5). Razlike između humanog i pacovskog GHRH prisutne su na intronu 4, tj. na C-terminusu humanog i pacovskog GHRH prekursora (Mayo i sar.1995) . Pacovski GHRH ima slobodan C terminus, a u ostalih vrsta prisutna je NH<sub>2</sub> grupa. Glukokortikoidi i estrogen, kao fiziološki regulatori GHRH gena, dovode do povećanja iRNK za GHRH receptor dok ovairektomija i adrenalektomija povećavaju nivo GHRH (Lam i sar. 1996).

Homeobox protein GSH-1 (kodiran homeobox sekvencom DNK, neophodan u procesu morfogeneze i razvoja) tokom embrionalnog razvića određuje formiranje GHRH neurona, te tako GSH-1 homozigot mutanti imaju oštećen razvoj GHRH neurona što se odražava i u smanjenom broju somatotropnih i laktotropnih ćelija hipofize (Li i sar. 1996). Takođe je pokazano da je GSH-1 uključen u tkivno specifičnu ekspresiju GHRH gena kod adultnih jedinki (Mutsuga i sar. 2001).

Arc jedro je organizovano tako da komunicira prvenstveno sa hipofizom, hipotalamusom, limbičkim sistemom, određenim jedrima talamusa, kao i autonomnim jedrima moždanog stabla. Inervacija GHRH neurona Arc jedra, kao i SS neurona Pe jedra većim delom realizuje se preko glutaminičnih aksona. Kiss i sar. (2006) govore o prisustvu vezikularnog glutaminičnog transportera tipa 2 u aksonima koji se završavaju na GHRH i SS neuronima Arc i Pe jedra. GHRH neuroni pored sinaptičkih kontakata ostvarenih sa ME, ostvaruju kontakte i sa dendritima i neuronskim telima drugih GHRH neurona (Horvath i Palkovits 1988), kao i SS neuronima (Daikoku i sar. 1988; Liposits i sar. 1988; Willoughby i sar. 1989,a,b). Takođe, treba pomenuti inervaciju GHRH neurona tireotropin-oslobađajućim hormonom (Shioda i sar. 1987), kao i enkefalinom (Daikoku i sar. 1988).

Smanjenje sekrecije GHRH uslovljeno GH (negativnom povratnom spregom) i to posredstvom SS i NPY oslobađajućih neurona koji sadrže GH receptor. Smanjenje sekrecije može biti regulisano i IGF 1 na nivou hipofize i hipotalamusa (Muller i sar. 1999).

GHRH iRNK nivo, kao i broj imunopozitivnih GHRH neurona smanjuje se tokom životnog ciklusa (DeGennaro i sar. 1989; Kuwahara i sar. 2004a,b). Novija studija (McArthur i sar. 2011) navodi prisustvo polnih razlika u broju GHRH neurona Arc jedra. Naime, broj GHRH neurona uvećava se 3-4 puta tokom prvih deset dana postnatalnog života kod oba pola, čime se u ovom periodu ne narušava prisutna polna

razlika u broju GHRH neurona (broj GHRH neurona duplo je veći kod mužjaka u odnosu na ženke). Od tog perioda broj neurona se smanjuje kod mužjaka, a povećava kod ženki, tako da polne razlike u broju GHRH neurona iznenađujuće nestaju tokom ranog i kasnog puberteta što je pokazala studija na miševima (McArthur i sar. 2011).

GHRH receptor (molekulska težina 26kDa) pripada grupi receptora kuplovanih G-proteinom što podrazumeva prisustvo sekundarnih cAMP, guanozin monofosfata (cGMP) i Ca-fosfolipidnog sistema. Aktivator ovih glasnika su Ca-jonski kanali, adenilat ciklaza i fosfatidilinozitol (Harvey 1995). Kontinuirana administracija GHRH smanjuje odgovor hipofize i dovodi do nishodne tzv. "down" regulacije GHRH receptora. GHRH receptori su receptori sa visokim afinitetom i malim kapacitetom, a detektovani su u hipotalamusu i adenohipofizi.

Kratka povratna sprega na nivou hipofize i hipotalamusa podrazumeva jedan od vidova regulacije sekrecije GHRH, te hipofizektomija dovodi do povećanja GHRH genske ekspresije (Muller i sar. 1990).

### **1.2.2. Periventrikularno jedro hipotalamusa i somatostatin**

Periventrikularno jedro je lokalizovano u periventrikularnoj zoni hipotalamusa uz zidove treće moždane komore. Prostire se duž rostralnog, medijalnog i kaudalnog regiona hipotalamusa. Mala gustina neurona je jedna od karakteristika ovog jedra. Neuron koji oslobađaju SS kod pacova smešteni su u rostralnom i središnjem regionu Pe jedra, tako da je SS imunoreaktivnost prisutna u ćelijskim telima i aksonima unutar uske zone uz treću mozdanu komoru (Fodor i sar. 1994; Ishikawa i sar. 1987; Kawano i Daikoku 1988). Rostro-kaudala distribucija SS neurona slična je u oba pola pacova, ali je ukupan broj neurona, kao i nivo SS iRNK veći kod mužjaka (Muller i sar. 1999; Van Vugt i sar. 2008). SS neuroni, koji učestvuju u regulaciji GH sekrecije lokalizovani su u anteriornoj zoni Pe jedra (Liposits i sar. 1993). Neuron središnjeg regiona Pe jedra pored SS sintetizuje TSH, leptin, gastrin i NPY, kao i LHRH kod primata. Kaudalni region Pe jedra učestvuje u regulaciji simpatičkog nervnog sistema.

SS, izolovan 1968. (Krulich i sar. 1968), je ciklični peptid od 14 amino-kiselina sa dva disulfidna mosta, koji inhibira lučenje hormona rasta (Brazeau i sar. 1973). Pored SS-a sa 14 aminokiselina (SS-14), u epitelu creva (Pradayrol i sar. 1980) i u hipotalamusu (Schally i sar. 1980) identifikovan je SS sa 28 aminokiselinskih ostataka

(SS-28), koji predstavlja dupliran SS-14 na NH<sub>2</sub> kraju. SS-14 je dominantno prisutan u moždanim strukturama, pankreasu i želucu, dok SS-28 dominira u gastrointestinalnom traktu, te je SS-28 potentniji u inhibiciji insulinske sekrecije nego SS-14 (Reichlin, 1983). Oba peptida podjednako efikasno inhibiraju sintezu i sekreciju hormona rasta (Francais i sar. 1990). Količinski odnos dva osnovna molekulska oblika SS-14 i SS-28 u portalnoj krvi ME je 70:30% (Moyses i sar. 1984).

Kod sisara SS nastaje transkripcijom jednog gena, a dobijena iRNK služi za sintezu pre-prosomatostatina (166 aminokiselina dugog prekursorskog molekula) koji se cepa dajući prosomatostatin. Obradom prosomatostatina nastaju SS-14 i SS-28 (Montminy i sar. 1984). U pojedinim tkivima SS-14 nastaje cepanjem SS-28 (Galanopoulou i sar. 1993; Cone i sar. 2002). Široka rasprostranjenost SS u moždanim strukturama: poput neurokorteza (Maurer i sar. 1985), hipotalamusa (Kwok i sar. 1992) amigdala (Leroux i sar. 1985), talamusa (Maurer i sar. 1985), striatuma (Vincent i Krosigk 1988) i hipokampalnog girusa (Martinez-Guijarro i sar. 1993) ukazuje na njegovu ne samo neurohormonsku već i neuromodulatornu ulogu. U moždanoj kori i hipokampusu, SS bi mogao da ima ulogu u kognitivnim funkcijama i nastanku Alchajmerove demencije (Lipponi i sar. 1990). Posebna pažnja je usmerena i na izučavanje strijatuma, gde verovatno ima ulogu u kontroli pokreta i nastanku Parkinsonove bolesti (Muller i sar. 1999). SS ima regulatornu ulogu u reproduktivnoj funkciji, cirkadijalnom ritmu, uzimanju hrane kao i u održavanju telesne temperature (Muller i sar. 1999).

Sekrecija SS je pod uticajem različitih jona, neuropeptida, neurotransmitera, hormona, faktora rasta i citokina. Glukagon, GHRH, neurotenzin, kortikotropni oslobađajući hormon (CRH) i bombesin su potencijalni stimulatori sekrecije SS, dok opijati i GABA inhibiraju sekreciju SS. Glukokortikoidi u malim dozama stimulišu, dok u većim inhibiraju sekreciju somatostatina. Insulin stimuliše oslobađanje hipotalamičkog somatostatina, a inhibira oslobađanje crevnog somatostatina (Patel 1999).

Najveći deo SS projekcija anteriornog Pe jedra dolazi do ME, dok ostali SS neuroni sinaptičke kontakte ostvaruju sa drugim SS neuronima (Alonso i sar. 1985) ili GHRH neuronima (Willoughby i sar. 1989b). Prisustvo SS neurona potvrđeno je i u Arc jedru. Neuroanatomske studije pokazuju malu povezanost GHRH i SS neurona. Studija

Toth i Palkovits (1998) ukazuje da se mali broj neurona Pe jedra projektuje na Arc jedro, već se oni dominantno (78%) i direktno projektuju na ME (Kawano i Daikoku 1988) bez povezivanja sa GHRH neuronima, a svega 3% GHRH neurona Arc jedra komunicira sa neuronima Pe jedra (Fodor i sar. 1994). Međutim, GHRH neuroni Arc jedra sadrže somatostatinske receptore (SSR), s obzirom na visoku koncentraciju SSR1 i SSR2 iRNK u Arc jedru, i najverovatnije su oni inervisani SS neuronima samog Arc jedra (Daikoku i sar. 1988; Liposits i sar. 1988; Beudet i sar. 1995; Breder i sar. 1992; Dournaud i sar. 1996). Literaturni podaci ukazuju i na sinaptičke veze SS neurona Pe jedra sa GABA (Willoughby i sar. 1987; Kakucska i sar. 1988), CRH (Horvath i Palkovits 1988) i NPY oslobađajućim neuronima (Hisano i sar. 1990).

Maksimalan nivo sekrecije SS ostvaren je tokom najmanje sekrecije GH, a najniži pri piku GH sekrecije kod mužjaka pacova (Plotski i Vale 1985; Zeitler i sar. 1991). Prisustvo direktne kontrole SS sekrecije GH omogućena je prisustvom GH receptora na SS neuronima (Burton i sar. 1992; Pellegrini i sar. 1996).

Odnos broja SS i GHRH neurona veoma je bitan za normaln rast i razviće. Za ranije periode života karakteristična je brojčana dominacija GHRH neurona u odnosu na SS neurone. Studije Kuwahara i sar. (2004a,b) pokazuje da se sa starenjem odnos broja GHRH i SS neurona menja, tako što dolazi do smanjenja brojnosti GHRH neurona dok se brojnost SS neurona značajno ne menja.

SSR je membranski receptor sa sedam transmembranskih domena što je karakteristika superfamilije receptora kuplovanih sa G proteinom. Vezivanjem SS za receptor aktivira se jedan od pet puteva prenosa signala uz neizostavno učešće G proteina, a mogući putevi su: vezivanje receptora za adenilat ciklazu; vezivanje receptora za  $K^+$  kanale; vezivanje receptora za  $Ca^{++}$  kanale; vezivanje receptora za egzocitotne vezikule; vezivanje receptora za fosfoprotein tirozin fosfatazu. SS je poznat i kao inhibitor mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) kaskadnih puteva čija aktivacija ima značajnu ulogu u ćelijskoj proliferaciji (Seeger i Krebs 1995), te u ovim slučajju SS ispoljava svoju antiproliferativnu karakteristiku. SSR je prisutan u moždanim strukturama, gastrointestinalnom traktu, hipofizi, štitastoj i nadbubrežnim žlezdama, endokrinom i egzokrinom pankreasu, bubrezima i ćelijama imunog sistema (Patel 1999). Do danas je otkriveno 6 tipova SS receptora čiji se kodirajući geni nalaze na različitim hromozomima (Yamada i sar. 1992). Između podtipova SSR uočena je



iznanađujuća specijska strukturna konzerviranost. Humani, pacovski i mišiji SSR1 su identični u 94-99% sekvence, 93-96% identični su pacovski, mišiji, svinjski i kravlji SSR2, a pacovski i humani SSR4 identični su u 88% sekvence.

### **1.2.3. Somatotropne ćelije hipofize i hormon rasta**

Somatotropne ćelije su kružnog ili elipsoidnog oblika sa izraženim okruglim jedrom koje je često ekscentrično postavljeno u ćeliji (Milošević i sar. 1998, 2005, 2012a). U pacovskoj hipofizi utvrđena je morfološka heterogenost populacije GH ćelija, koje se međusobno razlikuju po veličini sekretornih granula u citoplazmi (Kurosumi i sar. 1986). Sekretorne granule mogu biti velike – dijametra 250-350 nm i male – dijametra 100-150 nm. Moguće je razlikovati tri tipa GH ćelija: tip I – u citoplazmi ovih ćelija se nalaze velike sekretorne granule; tip II – u citoplazmi se nalaze i velike i male sekretorne granule; tip III – u citoplazmi se nalaze male sekretorne granule. GH ćelija tipa I i II su klasične somatotropne ćelije, ovalnog ili elipsoidnog oblika, sa sferičnim ekscentrično postavljenim jedrom. Granulirani endoplazmatični retikulum i Goldži aparat su umereno razvijeni, dok su lizozomi sporadični. Citoplazma ovih ćelija je ispunjena sekretornim granulama, a viđaju se i degranulisane ćelije. GH ćelije tipa III su često nepravilnog oblika sa kratkim citoplazmatičnim nastavcima i obično manjih dimenzija od ćelija tipa I i II. U citoplazmi se nalazi veliki broj sekretornih granula (Takahashi 1991). Pretpostavlja se da su ćelije tipa I zrela, a ćelije tipa III nezrela forma GH ćelija. Ćelije tipa II bi predstavljale prelaznu formu između nezrelih i zrelih GH ćelija (Takahashi 1991).

Heterogenost u okviru populacije somatotropnih ćelija nije uočena samo u pacovskoj hipofizi. Castano i sar. (1997) su na osnovu različite gustine GH ćelija (nakon centrifugiranja u "Percoll" gradijentu) identifikovali dva tipa ćelija u svinjskoj hipofizi. Prvom tipu pripadaju GH ćelije male gustine (low density; LD), a drugom ćelije velike gustine (high density; HD). Ova dva tipa ćelija se razlikuju kako po ultrastrukturnim tako i po funkcionalnim karakteristikama. U citoplazmi LD ćelija se nalazi mali broj sekretornih granula, a granulirani endoplazmatični retikulum je veoma dobro razvijen. Sa druge strane, citoplazma HD ćelija je ispunjena sekretornim granulama sa retkim cisternama granuliranog endoplazmatičnog retikuluma (Castano i

sar. 1997). U primarnoj ćelijskoj kulturi HD ćelije sekretuju daleko više GH u donosu na LD ćelije (Castano i sar. 1996).

U adenohipofizi velikog broja vrsta, uključujući pacova, miša i čoveka identifikovane su ćelije u čijoj se citoplazmi sintetišu GH i prolaktin, te su nazvane somatomamotropne ćelije. Somatomamotropne ćelije prisutne su kod jedinki oba pola, kao i kod ženki pacova tokom laktacije (Horvath i Kovacs 1988; Takahashi 1991). Somatomamotropne ćelije se, takođe, mogu podeliti u dva tipa. Tip I somatomamotropnih ćelija poseduje veliki broj sekretiranih granula gustog elektronskog sadržaja, malih dimenzija, dijametra od 100 do 200 nm. Ove granule mogu sadržati samo jedan od spomenutih hormona, a identifikovane su i granule koje istovremeno sadrže i prolaktin (PRL) i GH. Somatomamotropne ćelije tipa II poseduju granule većih dimenzija, vezikularne strukture, koje su prisutne u čitavoj citoplazmi. Hormon rasta i PRL prisutni su u različitim ili u istim granulama u okviru jedne ćelije. Nakon dvojnog imunobojenja manje oblasti citoplazme mogu istovremeno biti imunopozitivne na PRL i na GH, dok je veći deo citoplazme pozitivno obojen na PRL. Prisustvo organela u citoplazmi oba tipa opisanih somatomamotropnih ćelija nije izraženo (Iwama i Sasaki 1989).

GH je polipeptidni hormon, izgrađen od jednog lanca aminokiselina (kod ljudi 191 aminokiselina), a molekulska težina mu je 22-23 kDa (Goffin i sar. 1996). U cirkulaciji najzastupljeniji su monomeri GH, a prisutne su i oligomerne glikolizovane, fosforilisane forme kao produkti spajanja tokom procesa translacije (Lewis 1992). Poluživot hormona je oko 6 minuta kod pacova (Badger i sar. 1991).

GH utiče na metabolizam ciljnih tkiva, jetre i mišića, delujući preko svojih receptora (Karter-Su i sar 1996). GHR je jednolančani protein (620 aminokiselina; 70 kDa), koji se sastoji iz intracelularnog (-COOH), transmembranskog i ekstracelularnog (NH<sub>2</sub>) domena, i pripada klasi I velike familije citokinsko-hematopoetinskih receptora (Leung i sar. 1997). Nalazi se u gotovo svim tkivima (Simard i sar. 1996). Vezujući se za receptor GH izaziva kaskadu fosforilacije JAK/STAT puta (Carter-Su i sar. 1996). Dimerizacija receptora je neophodna za brzu aktivaciju tirozin kinaze JAK2, koja dovodi do fosforilacije STAT proteina. Fosforilisani STAT proteini direktno prelaze u nukleus gde izazivaju ekspresiju određenih gena vezujući se za dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) (Xu i sar. 2004).

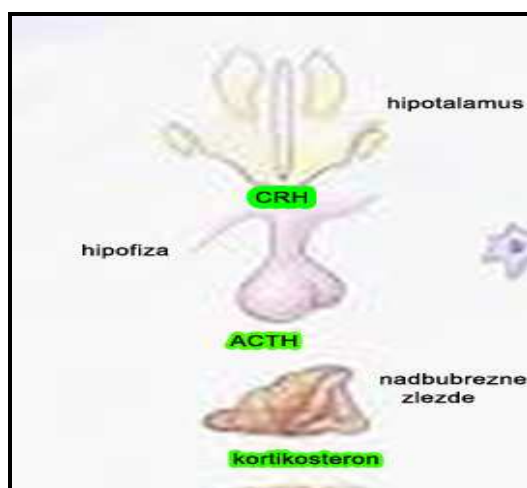
U jetri, mišićima i drugim tkivima, GH izaziva sintezu i sekreciju IGF-1. Smatra se da se uticaj GH na rast ostvaruje upravo preko IGF-1, iako sam GH ima direktan efekat na proliferaciju, rast i diferencijaciju ćelija vezujući se za GHR (Spagnoli i Rosenfeld 1996). IGF-1 se sintetiše u mnogim tkivima, na endokrini ili parakrini način utiče na metabolizam preko svog ili insulinskog receptora, s' obzirom na sličnost insulina i IGF-1 (Cohick i Clemmons 1993). IGF-2 se takođe sintetiše u mnogim tkivima, ali je njegov efekat na metabolizam ćelija manje poznat.

Mnogi autori su uočili seksualni dimorfizam somatotropne ose, koji se prvenstveno ogleda u različitoj šemi pulseva kod jedinki ženskog i muškog pola. Međutim, izražene razlike među vrstama onemogućuju jasan zaključak o mehanizmima koji dovode do seksualnog dimorfizma. Kod primata srednja vrednost koncentracije GH je veća kod jedinki ženskog, a manja kod jedinki muškog pola, dok je kod ostalih sisarskih vrsta obrnuto (Gatford i sar. 1998). Jasno je da do razlike među polovima u pulsatilnoj sekreciji i koncentraciji GH dolazi u toku i nakon puberteta, pa se sa sigurnošću može tvrditi da polni steroidi učestvuju u regulaciji somatotropne ose (Argente i Choven 1993).

Pulsativna sekrecija, kao i dnevna variranja sekrecije GH neophodne su za normalan rast. Kod ljudi je koncentracija GH u plazmi, kao i amplituda oslobađanja veća kod žena nego kod muškaraca, za razliku od pacova kod kojih je koncentracija GH kao i amplituda njegovog oslobađanja veća kod mužjaka u poređenju sa ženkama (Gatford i sar. 1998). Ipak, frekvencija oslobađanja hormona viša je u ženki nego u mužjaka kako kod ljudi tako i kod pacova (Pincus i sar. 1996). Kod adultnih pacova primećene su visoke amplitude i visok puls oslobađanja GH (na svaka tri časa), a ujedno i nizak bazalni nivo GH. Niže amplitude, veća nepravilna učestalost kao i viši bazalni nivo karakteristične su za GH oslobađanje kod ženki pacova (Eden 1979; Clark i sar. 1987; Gatford i sar. 1998). Kod ženki pacova GH oslobađanje pokazuje dnevni ritam: GH nivo u plazmi i učestalost oslobađanja raste tokom spavanja, dok je kod mužjaka pacova nezavisna od doba dana (Clark i sar. 1987; Pincus i sar. 1996; Veldhuis i sar. 2003). Takođe, različitost u telesnoj masi, metabolizmu steroida, dovodi se u vezu sa razlikama u sekreciji GH (Eden 1979; Mode i sar. 1982; Clark i sar. 1985). Tokom puberteta nivo sekrecije GH raste, dostiže svoj maksimum pred sam kraj puberteta, a potom se smanjuje sa starenjem jedinke (Ho i Hoffman 1993).

### 1.3. Adrenokortikotropni sistem

Hipotalamo-hipofizni-adrenokortikalni sistem (HHA sistem) je uključen u brojne, životno značajne, homeostatske i alostatske mehanizme odgovora na interne i eksterne stresore. Ovaj sistem karakteriše postojanje dinamičke mreže mehanizama povratne sprege sa cirkadijalnom ritmičnošću i pulsativnom sekrecijom neurohormona (Bergendahl i sar. 2000). Osnovne metaboličke i endokrine funkcije zahtevaju pažljivo kontrolisan model funkcionisanja HHA sistema u odsustvu stresa, kako bi u uslovima stresa organizam pružio adekvatan odgovor. Sistem obuhvata neuralne puteve koji kontrolišu oslobađanje katecholamina iz srži nadbubrežnih žlezda i hipotalamo-hipofiznu kontrolu produkcije i oslobađanja adrenokortikotropnog hormona (ACTH), odgovornog za regulaciju sinteze glukokortikoida u kori nadbubrežnih žlezda (Chrousos 1992; Tsigos i Chrousos 1994). Oslobađanje ACTH u najvećoj meri je stimulirano kortikotropni oslobađajućim hormonom (CRH) (Melmed i Kleinberg 2002).



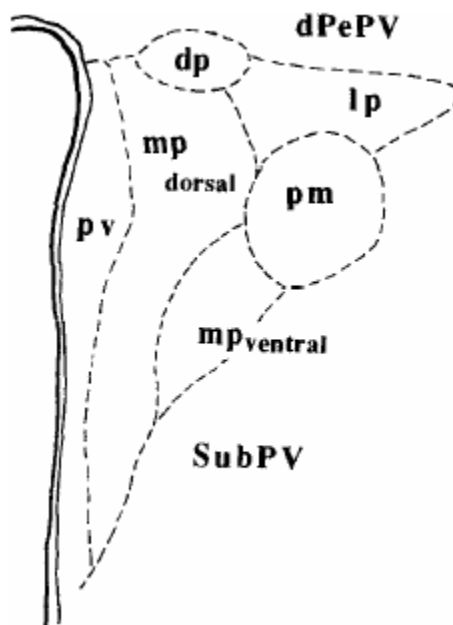
Crtež 1.7. Šema HHA sistema ([www.aic.cuhk.edu.hk](http://www.aic.cuhk.edu.hk))

#### 1.3.1. Paraventricularno jedro hipotalamusa i kortikotropni oslobađajući hormon

PVN pacova je parno jedro koje se nalazi strana treće moždane komore medijalnog dela anteriornog hipotalamusa. Regioni sa malim brojem ćelija na obodima ventralne, dorzalne i kaudalne strane PVN jasno ograničavaju ovo jedro. Na osnovu morfologije i eferentnih veza većina neurona PVN pripadaju trima osnovnim kategorijama ćelija. Zajedno sa SO jedrom ono sadrži većinu magnocelularnih neurona koji sintetišu i oslobađaju vazopresin (antidiuretičkog hormona), oksitocin (hormon uključen u sekreciji mleka, porođajne kontrakcije, kao i ejakulaciju). Aksoni ovih

neurona projektuju se u zadnji režanj hipofize gde dolazi do oslobađanja hormonalnog sadržaja direktno u sistemsku cirkulaciju. PVN sadrži veliku populaciju parvocelularnih neurosekretnih ćelija u koje spadaju neuroni koji sintetišu CRH, kao i TRH koji regulišu rad štitne žlezde te utiče na metabolizam (Kiss 1988). Parvocelularni neuroni PVN oslobađaju u manjoj meri vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), holecistokinin, supstancu P, neurotenzin, atriopeptin, GHRH, angiotenzin II (Kiss i sar. 1983; Kiss, 1988). Treća populacija ćelija u PVN su tzv. autonomne ćelije koje se projektuju na moždano stablo i kičmenu moždinu. Neuronska vlakna ovih ćelija putuju do motoneurona (motornog jedra) nerva vagusa i intermediodorzalnih puteva kičmene moždine te inervišu parasimpatičke i simpatičke pregangliske ćelije. Ovi neuroni inervišu regione autonomnog nervnog sistema, jedro solitarnog trakta, Edinger-Vestpalovo jedro, parabranihijalno jedro, kao i senzorno jedro trigeminusa, *substantia gelatinosa* leđnog roga kičmene moždine. Neuroni ovih projekcija su male do srednje veličine, smešteni u dorzalnog i kaudalnog delu PVN, čiji aksoni čine 30% svih aksona koji napuštaju hipotalamus. Veliki broj ovih autonomnih ćelija sadrži oksitocin i vazopresin. Ćelije PVN preko svojih projekcija utiče na kardiovaskularni sistem, unos hrane i vode, gastrointestinalne funkcije, kao i na sintezu melatonina u pinealnoj žlezdi. Prisustvo magnocelularnih i parvocelularnih, autonomnih ćelija, kao konstituenta tri homeostatska sistema, u jednom jedru predstavlja jedinstvenu pojavu u hipotalamusu, te Swanson i Kuypers (1980) karakterišu PVN kao ključni faktor integracije autonomne i neuroendokrine funkcije.

Kiss i sar. (1991) PVN dele u najmanje osam različitih ćelijskih grupa. To su magnocelularna grupa neurona, dve grupe mediocelularnih neurona, kao i pet grupa parvocelularnih neurona. Magnocelularnu ćelijsku populaciju čine kompaktno grupisani krupni neuroni (dijametara >12  $\mu\text{m}$ ), koji predstavljaju 19% ćelijske populacije PVN. Pored krupnih neurona magnocelularna grupa obuhvata i neurone srednjeg i malog dijametra. Dorzalna i posteriorna mediocelularna podgrupa neurona obuhvata 26% ćelijske populacije PVN. Dorzalnu podgrupu čine horizontalno orijentisani neuroni srednjeg dijametra, dok posteriornu podgrupu čine difuzno raspoređeni neuroni različite veličine. Između treće moždane komore i kompaktne mase magnocelularnih neurona leži masa sitnih parvocelularnih neurona koja predstavlja 53% ćelijske populacije PVN. Ćelije periventrikularne podgrupe parvocelularne grupe leže duž treće moždane



Slika 1.8. Šema frontalnog preseka centralnog dela PVN, pv-periventrikularna parvocelularna, dp-dorzalna parvocelularna, lp-lateralna parvocelularna, pm-posteriorna magnocelularna grupa neurona (Larsen i sar. 1994)

komore, izduženog su oblika i orijentisane paralelno zidu komore. Ova podgrupa se prostire duž celog PVN, što nije slučaj sa ostalim podgrupama parvocelularne populacije, te tako uslovljava relativno veliku brojnost ćelija ove podgrupe, oko 2700 ćelija, nasuprot njihovoj maloj gustini. Lateralno od periventrikularne grupe nalazi se medijalna parvocelularna grupa koja obuhvata četiri podgrupe, anteriornu, medijalnu, lateralnu, kaudalnu. Ćelije malog (44-48%), srednjeg (38-45%) i velikog (6-11%) zastuplene su u sve četiri podgrupe (Kiss i sar. 1991).

Postoji tendencija grupisanja ćelija koje sintetišu iste hormone, te je anatomska podela PVN dopunjena i podelom u zavisnosti od neurohemijskog sadržaja neurona. Tako paraventrikularni dovodni inputi inervišu neurone određene grupe. Noradrenergične inervacije moždanog stabla su uglavnom usmerne na magnocelularne neurone koji sintetišu vazopresin. Slično tome, ACTH-imunoreaktivnih inputi izgleda da inervišu periventrikularni i kaudalni region, dok su ovi inputi oskudno rasprostranjeni u CRH parvocelularnim neuronima PVN. Nasuprot tome, nervna vlakna koja oslobađaju adrenalin završavaju se na CRH neuronima kao i neuronima projektovanim na moždano stablo. Adrenalinom bogati aksoni se ne projektuju jedino na CRH neurone, već se adrenalinski aksoni nalaze širom PVN, ali su manje gustine.

Podela na osnovu prisutnosti određenih neurotransmitera u zonama PVN nije strikno odraz anatomske podele ovog jedra (Kiss 1988; Everitt i Hokfelt 1990).

Medijalna periventrikularna i medijalna lateralna PVN podgrupa sadrži oko polovinu svih CRH neurona prisutnih u PVN od kojih polaze brojne projekcije do spoljašnje zone ME. Oko 15% svih CRH obeleženih neurona pripada grupi magnocelularnih koji mahom sintetizuju i oksitocin. Skoro polovna CRH pozitivnih aksona koja se završava na ME se intenzivno boji na AVP i vazopresin-neurofizin, a CRH i derivati pro-AVP se nalaze u istim neurosekretornim vezikulama (Engler i sar. 1999). Niži nivo ekspresije CRH prisutan je i u SO, preoptičkom i Pe jedru hipotalamusa (Kawata i sar. 1983).

Snop aksona parvocelularnih neurona izlazi iz PVN u lateralnom pravcu, zajedno sa magnocelularnim hipotalamo-hipofiznim traktom. Snop aksona pruža se oko forniksa, te delimično ulazi u lateralni hipotalamus odakle se ulazi u ME kroz lateralnu retrohijazmatičnu oblast (Palkovits 1984).

Region oko PVN bogato je inervisan limbičkim strukturama i ima uticaja u regulaciji aktivnosti HHA sistema (Herman i sar. 2002). Pojedine studije su pokazale da regioni koji inervišu subPVN skoro po pravilu se ne projektuju na medijalni parvocelularni region PVN (Herman i sar. 2002). Medijalni parvocelularni neuroni PVN su ograničeni gustom dendritskom mrežom te limbički inputi ne kontaktiraju sa njima već deluju indirektno, preko neurona subPVN-a dominantno GABA-ergičnog fenotipa (Bovers i sar. 1998). Istraživanja Bovers i sar. (1998) pokazuju da je većina PVN-projektovanih neurona pozitivna na iRNK dekarboksilaze glutaminske kiseline (GAD). SubPVN region posebno je bogat GABA neuronima, projektovanim na PVN, koji reaguju na stres povećanom sintezom GABA (Bovers i sar. 1998) i povećanom cFos imunoreaktivnošću (Culinan i sar. 1996).

Jedna od ključnih struktura u regulaciji sekrecije CRH je i Arc jedro. Preciznije, neuroni Arc uspostavljaju direktan sinaptički kontakt sa CRH neuronima PVN (Sawchenko i sar. 1982; Bai i sar. 1985), a takođe se projektuju na ME i utiču na oslobađanje CRH iz nervnih završetaka (Haas and George 1989; Wiegand and Price 1980; Mezey i sar. 1985).

CRH je hormon koji se sastoji od 41 aminokiseline i poseduje visok stepen strukturne homologije (>80%) među vrstama, a prvi put je izolovan 1981. kao supstanca

koja povećava lučenje ACTH i  $\beta$ -endorfina u ćelijskoj kulturi hipofize pacova (Vale i sar. 1981; Lovejoy i Balment 1999). Uklanjanje osam amino-kiselina sa -N terminusa dovodi do gubitka aktivnosti molekula CRH, dok preostali peptid ipak zadržava mogućnost vezivanja za hipofizni CRH receptor.

Tokom evolucije uloga peptida koji stimuliraju sintezu i sekreciju ACTH bila je vezana za procese osmoregulacije i diureze, a vremenom ovi peptidi stiču nove uloge povezane sa odgovorom organizma na stres, kontrolom rasta, regulacijom metaboličkih procesa, vazoregulacijom i termoregulacijom. CRH utiče i na komponentu ponašanja organizma u stresu (Weninger i sar. 1999). I zaista, CRH je obeležen u oblastima mozga koji kontrolišu osećanja straha i anksioznosti (amigdaloidna jedra), raspoloženje i emocije (noradrenergični i serotonergični neuroni lokusa ceruleusa i rafe nukleusa). Prisustvo CRH dokazano je i u delovima moždanog stabla koji upravljaju autonomnim funkcijama (Phelix i Paull 1990). CRH snažno utiče i na funkciju imunog sistema, indirektno aktiviranjem HHA sistema, i direktnom regulacijom inflamatornog svojstva tkiva (Chrousos 1995; Elenkov i sar. 1999). Povećanjem sinteze ACTH i dalje glukokortikoida smanjuje se imuni odgovor. CRH parakrinim i autokrinim delovanjem utiče na tkiva imunog sistema i inflamatornog tkiva (Karalis i sar. 1991). Tako ovaj hormon stimulira sekreciju glukokortikoida, kateholamina, i perifernih CRH, a deluje i na sintezu regulatornih citokina (npr., IL-12, IFN-, IL-2, IL-4 i IL-10) i histamina (Elenkov i sar. 1999). CRH deluje i kao neuromodulator i neurotransmiter (Dunn i Berridge 1990). Prisustvo CRH dokazano je u interneuronima kore velikog mozga i kori malog mozga. Klinička ispitivanja ukazuju da se poremećaji u ekspresiji CRH povezani sa nizom psihijatrijskih (anksioznost, depresija, anoreksija, bolesti zavisnosti) (Scott i Dinan 1998), endokrinih (Kušingov sindrom) (Howlet i sar. 1985), autoimunih (reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus) (Straub i Cutolo 2001), neurodegenerativnih (Alchajmerova bolest) (Willenberg i sar. 2000), kardio-vaskularnih (Goncharuk i sar. 2002) bolesti.

Značajna količina CRH prisutna je i u perifernim tkivima: hipofizi, nadbubrežnim žlezdama, bubrezima, jetri, plućima i gastrointestinalnom traktu (Dotzer i sar. 2004). CRH koji je sintetisan u koži učestvuje u regulaciji lokalne homeostaze (Crofford i sar. 1995; Slominski i sar. 2001). CRH inhibira proliferaciju keratocita,



takođe reguliše adheziju molekula i citokina (Pisarchik i Slominski 2001; Zbytek i sar. 2002).

CRH svoje delovanje ostvaruje vezivanjem za dva tipa receptora CRHR1 i CRHR2, kodiranih različitim genima (Turnbull i Rivier 1997). To su transmembranski receptori, građeni od sedam transmembranskih domena, koji imaju strukturu alfa heliksa, a kuplovani su sa GTP-vezujućim proteinima. Nakon vezivanja liganda za oba tipa receptora dolazi do aktiviranja adenilat ciklaze i povećanja nivoa cAMP-a (Grigoriadis i sar. 2001). CRHR1, dominantan u adenohipofizi, ima visoki afinitet vezivanja CRH kao i aktivacije POMC transkripcije. Aktivnost ovih receptora modulirana je bivalentnim katjonima, kao i guanil-nukleotidom, dok se smanjenje broja receptora (down-regulacija) javlja kao odgovor na adenalektomiju, tretman glukokortikoidima i hroničan stres. Nasuprot tome pomenute promene/intervencije nemaju uticaj na broj receptora u mozgu. Pored velike zastupljenosti u *pars tuberalis* hipofize, veće količine CRHR1 prisutne su u kori velikog mozga, hipokampusu, Arc jedru, amigdalama. CRHR2 su prisutni u perifernim tkivima, nadbubrežnim žlezdama, srcu, prostati, crevima, jetri, bubrezima i testisima (Wong i sar. 1994).

### **1.3.2. Adrenokortikotropne ćelije hipofize i adrenokortikotropni hormon**

Kao odgovor na oslobađanje CRH, ACTH ćelije, identifikovane 1967 (Yamada i Yamashita), sintetizuju i oslobađaju ACTH. Korišćenjem imunocitohemijskih metoda pokazano je da su ACTH ćelije prvi tip ćelija koji počinje da sintetizuje hormone tokom fetalnog razvoja, u periodu kada još nije ni uspostavljena definitivna adulta organizacija hipofize. ACTH je imunocitohemijski obeležen najpre u ćelijama budućeg *pars tuberalis*, 13. dana razvoja fetusa pacova, a zatim u *pars distalis* 14. dana fetalnog razvoja, a oko 17. dana fetalnog razvoja u *pars intermedia* (Chatelain i sar. 1979; Manojlović i sar. 2007).

ACTH ćelije su nepravilnog oblika, sa citoplazmatičnim produžecima između drugih ćelija, uglavnom između GH ćelija (Milošević i sar. 2012b). Dijametar njihovih sekretornih granula iznosi oko 200 nm i smeštene su na periferiji citoplazme, dok se mitohondrije, endoplazmatični retikulum i Goldžijev kompleks nalaze u blizini nukleusa (Horvath i Kovacs 1988).

ACTH ćelije sintetišu produkte proopiomelanokortinskog (POMC) gena i to ACTH,  $\beta$ -lipotropin i endorfine. 4,5-kDa ACTH polipeptid se sastoji od 39 aminokiselina i veoma se malo razlikuje kod primata i drugih vrsta (svega u dve aminokiseline: na 31. i 33. poziciji) (Melmed i Kleinberg, 2002). Prvi produkt translacije POMC je lanac dug 266 aminokiselina, koji je prekursor za adrenokortikotropne, opioidne i melanotropne peptide. Daljom obradom nastaje ACTH koji se može prevesti u  $\alpha$ -melanocitni oslobađajući hormon ili intermedijarni peptid sličan kortikotropinu. CRH, citokini (IL-1, IL-2, IL-6), vazopresin, kateholamini i VIP zajedno aktiviraju gensku ekspresiju POMC, dok je glukokortikoidi inhibiraju (Melmed i Kleinberg, 2002).

ACTH receptori (ACTHR) brojni su na membranama ćelija kore nadbubrežnih žlezda, gde dovode do povećanja sinteze i oslobađanja glukokortikoida, dok u manjem stepenu stimulišu produkciju mineralokortikoida i androgena (Gantz i sar. 1993). ACTH signal preko adenilat ciklaze reguliše transkripciju citohrom P450 enzima (Melmed i Kleinberg 2002). Delujući pozitivno na sintezu sopstvenog receptora ACTH je u mogućnosti da kontroliše i sopstvenu sintezu. Prisustvo iRNK za ACTHR dokazano je u ACTH ćelijama adenohipofize. Inhibitorni uticaj glukokortikoida na ACTH sintezu i sekreciju izostaje u nekim slučajevima, uslovima hroničnog stresa i Kušingovog sindroma (Morris i sar. 2003).

U sinergizmu sa CRH stimulacija sekrecije ACTH potencirana je AVP-om, oksitocinom, angiotenzinom II, noradrenalinom i adrenalinom (Baird i sar. 1982; Gillies i sar. 1982), dok sam AVP ima malu ACTH sekretagognu aktivnost (Scott i Dinan 1998). Pozitivna recipročna interakcija između CRH i AVP (jedan hormon stimuliše oslobađanje drugog) prisutna je na nivou hipotalamusa. Sposobnost stimulacije oslobađanja ACTH iz ACTH ćelija hipofize imaju urotenzin, urokortin i sovagin, koji se i mogu vezati za CRH receptore. Cirkadijalni ritam ACTH sekrecije generiše Sch jedro, a kortikosteroidi utiču kako na cirkadijalni tako i ultradijalni ritam sekrecije ACTH. Stres, endogenog ili egzogenog porekla, deluje centralno, povećavajući amplitudu sekrecije ACTH, dok kortikosteroidi deluju na suprotan način.

## 1.4. Estrogeni i fitoestrogeni-izoflavoni soje

### 1.4.1. Estrogeni

Značajan pomak u razvoju reproduktivne biologije vezan je za kasne dvadesete godine prošlog veka, a ogledao se u objavljivanju radova o supstancama koje utiču na reprodukciju, a luče ih gonade. Prvi izolovani hormon je bio estron, poreklom iz urina trudnice, a izolovali su ga Doisy i sar. 1929. godine (Simoni i sar. 2002).

Estrogeni pripadaju porodici steroidnih hormona, s obzirom da je za njihovu sintezu neophodan holesterol. Čelije koje sintetišu steroidne hormone, pored *de novo* sinteze, unose holesterol vezan sa proteinima u obliku lipoproteina. Nakon ulaska lipoproteina u ćeliju aktivira se acil-CoA-holesterol transferaza koja omogućava esterifikaciju i skladištenje holesterola u obliku lipidnih kapi. Katalitičkom aktivnošću holesterol esteraze, od holesterola, koji je u obliku estera, dobija se deesterifikovan holesterol koji ulazi u mitohondrije. Uzevši u obzir činjenicu da testosteron i estradiol imaju manji broj C atoma od holesterola, prva faza u sintezi steroidnih hormona je uklanjanje fragmenta od šest C atoma iz bočnog lanca holesterola, pri čemu nastaje pregnenolon. U tom procesu prvo dolazi do hidroksilacije holesterola na C<sub>20</sub>-atomu, a zatim na C<sub>22</sub>-atomu, u cilju raskidanja veze između C<sub>20</sub> i C<sub>22</sub>-atoma, a reakciju katalizuje enzim dezmolaza (citohrom P450<sub>sc</sub>, *side-chain cleavage* ili CYP 11A1). Pregnenolon izlazi iz mitohondrija i u citoplazmi, uz prisustvo enzimskog kompleksa, može biti metabolisan na dva načina, odnosno duž dva biohemijska puta (Voet i Voet, 2004). Prema prvom putu, od pregnenolona se u dva koraka sintetiše progesteron, oksidacijom 3'-OH grupe pregnenolona u 3'-keto grupu i izomerizacijom  $\Delta^5$ -dvogube veze u  $\Delta^4$ -dvogubu vezu, reakcijama koje katalizuje enzim  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza /  $\Delta^{5-4}$  – izomeraza (3 $\beta$ HSD). Progesteron je prekursor u biosintezi androgena i estrogena. Njihova biosinteza otpočinje hidroksilacijom progesterona na C<sub>17</sub>-atomu od strane enzima 17 $\alpha$ -hidroksilaza/17, 20 liaze (CYP17), pri čemu se dobija 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron, koji se transformiše u androgen androstenedion eliminacijom bočnog lanca koji se sastoji od C<sub>20</sub>-i C<sub>21</sub>-atoma. Redukcijom C<sub>17</sub>-keto grupe androstenediona pod uticajem 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze nastaje testosteron. Aromatizacijom prstena A i gubitkom C<sub>19</sub>-metil grupe testosterona nastaje estradiol. Ovu reakciju katalizuje enzim aromataza P450 (CYP 19). Međutim, od androstenediona uz prisustvo CYP 19 može nastati i estron, a od estrona uz prisustvo 17 $\beta$ -hidroksisteroid

dehidrogenaze, nastaje takođe  $17\beta$ -estradiol (Voet i Voet, 2004). Prema drugom putu, uz prisustvo enzima CYP17, pregnenolon prelazi u  $17\alpha$ -hidroksipregnenolon, a od  $17\alpha$ -hidroksipregnenolona nastaje DHEA. Od DHEA, uz prisustvo enzima  $3\beta$ HSD nastaje androstenedion. Od androstenediona kao i prema prvom putu, nastaju testosteron, estron i estradiol.  $17\beta$ -estradiol i estron nastaju od testosterona i androstenediona u agranulisanom endoplazmatičnom retikulumu, procesom aromatizacije. *De facto* aromatizacija je proces hidroksilacije i gubitka metil grupe na C-19 i eliminacija 1. i 2. vodonika u A prstenu uz učešće CYP19 (Voet i Voet 2004).

Primarni izvor  $17\beta$ -estradiola, biološki najaktivnijeg estrogena, su jajnici, dok su aromataze, neophodne za njegovu sintezu, zastupljene i u masnom i mišićnom tkivu, testisima (Ghayee i Auchus 2007). Svi pomenuti enzimi, potrebni za konverziju holesterola u estrogen, pronađeni su u moždanom tkivu (Micevych i Mermelstein 2008), te mozak može funkcionisati i kao autonomni steroidogeni organ. Biološki slabiji estrogeni (estron, estriol) se uglavnom formiraju u jetri i placenti. U krvi se estrogeni nalaze vezani za transportne globuline i albumine, a svega 2-3% je slobodno i biološki aktivno. Razlaganje estrogena odvija se u jetri te se izlučuju urinom ili kroz žuč uglavnom u obliku estriola. Lučenje estrogena regulisano je GnRH hipotalamusa koji stimuliše lučenje FSH i LH (Pardridge 1986; Ghayee i Auchus 2007).

#### **1.4.1.1. Ćeliski mehanizmi delovanja estrogena**

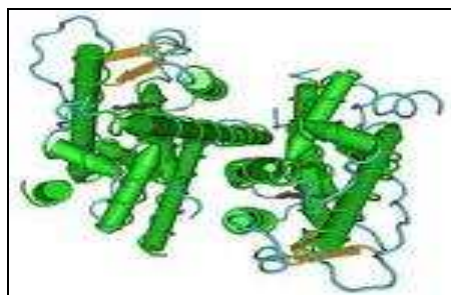
Kako su estrogeni rastvorljivi u lipidima u ćeliju ulaze prostom difuzijom. Estrogeni mogu da deluju genomskim i ne genomskim mehanizmima.

Sve do 1960. godine verovalo se da estrogeni deluju na enzimске procese (Jensen i Jordan 2003). Jensen i Jacobsen (1962) su pokazali da u nekim tkivima dolazi do koncentracije radioaktivnog estradiola nasuprot gradijentu koncentracije, što ukazuje na prisustvo intracelularnog hormon-vezujućeg proteina. Zajedno sa drugom grupom istraživača (Toft i Gorski 1966) ovaj efekat pripisan je prisustvu estrogenog receptora (ER) koji pripada superfamiliji jedarnih receptora. Pored ER ovoj familiji pripadaju glukokortikoidni, mineralokortikoidni te progestinski receptori, receptori za vitamin A, D, prostaglandine i tiroidne hormone (Pavao i Traish 2001). U ovu familiju se ubrajaju i receptori za koje ligandi još nisu identifikovani, takozvani receptori siročad (orphan receptors). Nakon vezivanja hormona za receptor i njegove transformacije, kompleks

receptor-ligand se vezuje za DNK specifične elemente tzv. „hormone response elements“ i na taj način regulišu transkripciju ciljnih gena (Tsai i O'Malley 1994). Kada ER nije vezan za svoje ligande stabilizovan je proteinima toplotnog šoka u jedru ili citoplazmi.

Do sada su identifikovana dva tipa receptora za estrogen: alfa ( $ER\alpha$ ) i beta ( $ER\beta$ ). Gen za estrogenski receptor  $\alpha$  identifikovana je 1985, dok je gen za  $ER\beta$  otkriven desetak godina kasnije (Walter i sar. 1985; Pace i sar. 1997).  $ER\alpha$  se dominantno nalaze u specifičnim organima kao što su mlečna žlezda, materica i vagina, a uključeni su u regulaciju reprodukcije (Kuiper i Gustafsson 1997).  $ER\beta$  se pored reproduktivnog trakta nalaze i u CNS, kardiovaskularnom, imunom, urinarnom i digestivnom sistemu i u plućima. Ovaj receptor vezuje estradiol sličnim afinitetom kao i  $ER\alpha$  (Kuiper i sar. 1997; 1998). Kada se u istom tkivu nalaze  $ER\alpha$  i  $ER\beta$ , vezivanje liganda za  $ER\beta$  je dominantnije (Kuiper i Gustafsson 1997).  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  kuplovani ligandima imaju sposobnost da se za promotorski region ciljnog gena vežu u obliku homo i hetero-dimera:  $ER\alpha$  homodimer,  $ER\beta$  homodimer i  $ER\alpha/ER\beta$  heterodimer (Pavao i Traish 2001).

Kloniranjem gena koji kodira  $ER\alpha$  kod ljudi i različitih vrsta životinja utvrđeno je postojanje 6 regiona (A, B, C, D, E, F) koji ulaze u sastav ER. Sekvence aminokiselina u ovim regionima se razlikuju u zavisnosti od vrste životinja (Kumar i sar. 1987). Funkcionalna analiza  $ER\alpha$  pokazuje postojanje regiona sa različitim funkcijama i to: region za vezivanje sa DNK, region za vezivanje sa ligandom-hormonom, region za formiranje dimera, region za vezivanje proteina i region za aktivaciju transkripcije (Tjian i Maniatis 1994; Tremblay i sar. 1997).  $ER\beta$  je kloniran kod pacova (Kuiper i sar. 1996), a nakon toga kod miša (Mosselman i sar. 1996; Enmark i sar. 1997) i ljudi (Tremblay i sar. 1997). Kod ljudi gen za  $ER\beta$  je lokalizovan na 14. hromozomu, dok je gen za  $ER\alpha$  lokalizovan na 6. hromozomu (Enmark i sar. 1997; Enmark i Gustafsson 1999). Istraživanja  $ER\beta$  kod ljudi ukazuju na postojanje nekoliko izoformi ovog receptora (Mosselman i sar. 1996; Moore i sar. 1998; Ogawa i sar. 1998).



Crtež 1.9. Struktura estrogenog receptora (www. wikipedia.org)

Mozak, kao i periferne organe karakteriše prisustvo ER. Autoradiografske studije ukazuju na moždanu distribuciju ER (Stumpf i Sar 1976), dok je tačna lokalizacija u određenim moždanim strukturama utvrđena nakon imunohistohemijских studija. Moždane stukture pokazuju heterogenost u distribuciji ER. Kod glodara ER je lokalizovan ne samo u neuronima već u glijalnim (Jung-Testas i sar. 1992; Platania i sar. 2003; Mhyre i Dorsa 2006) i neuralnim stem ćelijama (Brannvall i sar. 2002). ER $\alpha$  dominira u hipotalamusu, hipokampusu i preoptičkoj oblasti, više ili manje zastuljen je u korteksu i malom mozgu, dok je ER $\beta$  prisutan korteksu, malom mozagu, septumu, preoptičkoj oblasti, talamusu, u određenim jedrima moždanog stabla (Shughrue i sar. 1997a,b). U pojedinim oblastima, npr. preoptičkoj oblasti, oba tipa receptora podjednako su zastupljena (Shughrue i Merchenthaler 2001). Količina ER varira u odnosu na koncentraciju estrogena u cirkulaciji tokom estrusnog ciklusa. Tako je u optičkiom region količina ER mRNA je niska u period visoke koncentracije estrogena, dok se u arkuatnom jedru dešava suprotno (Shughrue i sar. 1992). Dosadašnja istraživanja pokazuju prisustvo isključivo ER $\alpha$  u ventromedijalnom nukleusu, dok je ER $\beta$  prvenstveno zastupljen u SO, PVN, Sch i tubelarnom jedru hipotalamusa. Ekspresija oba receptorska tipa prisutna je u neuronima Arc jedra (Kuiper i sar. 1997a; Shughrue i sar. 1997a; Chu i Fuller 1997; Laflamme i sar. 1998).

Aktivacija ER estrogenima dovodi do povećanja sinteze proteina za nekoliko minuta do sata. S druge strane estrogeni mogu izmeniti električnu aktivnost neurona u sekundi (Kelly i sar. 1976), povećati cAMP u materici za 15 sekundi (Szego i Davis 1967), što predstavlja vremenski suviše kratak period za *de novo* sintezu protein. Različiti autori su identifikovali skraćenu formu hER $\alpha$  od 46 kDa, koju su kroz različite eksperimentalne pristupe povezali sa membranskim odgovorom različitih tkiva na estrogen, ali njegova uloga u negenomskoj signalizaciji još nije definitivno potvrđena

(Monje i Boland 1999; Flouriot i sar. 2000). Izgleda da se signalizacija estrogenima odvija i negenomskim mehanizmima, koji ne zavise od prisustva jedarnih ER, i veoma brzo dovode do efekta, što verovatno uključuje prisustvo membranskog receptora (Segars i Driggers 2002) ili interagovanje ovih hormona sa drugim signalnim putevima (*cross-talk*), pre svega sa SRC Tyr kinazama i MAP-kinaznim putevima signalne transdukcije.

#### **1.4.2. Fitoestrogeni-izoflavoni soje**

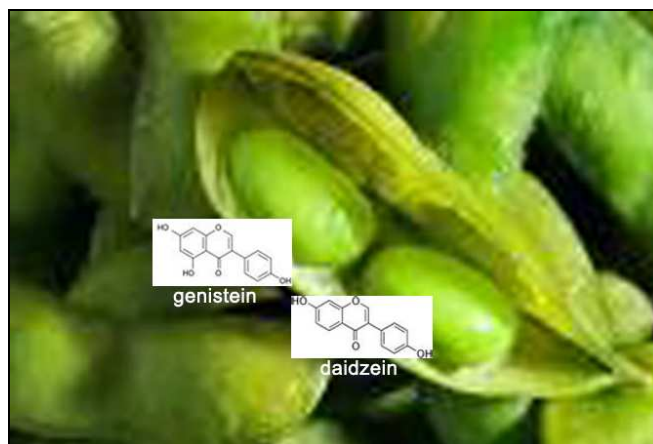
Upotreba određenih biljnih vrsta tokom prošlosti, a i danas, kao deo tradicionalne medicine i folklora naroda, između ostalog se dovodi u vezu sa njihovim estrogenim dejstvom. Tako je konzumiranje nara povezivano sa plodnošću (Price i Fenwick 1985), dok je biljka *Pueraria mirifica* korišćena za podmlađivanje i kao afrodisijak (Bradbury i White 1954). Zanimljivo je da je srednjevekovno katoličko sveštenstvo verovalo da se libido može smanjiti konzumacijom hmelja (Fuhrmann 1986). Prvi dokaz da biljni ekstrakti mogu imati estrogeno dejstvo potiču iz tridesetih godina XX veka, a sedamdesetih se govori o stotinama biljaka koja sadrže jedinjenja sa estrogenim efektom. Četrdesetih godina kao uzrok neplodnosti ovaca u Zapadnoj Australiji navodi se ishrana, tj. ispaša ovaca na livadama bogatim detelinom (Bennetts i sar. 1946). Folman i Pope (1966) ukazuju na postojanje kompeticije između aplikovanih fitoestrogena i endogenih steroida, kao i na to da njihov relativni odnos determiniše estrogenku, odnosno antiestrogenku aktivnost. Ovim se može objasniti dominantan estrogeni efekat fitoestrogena zapažen kod ovaca, odnosno antiestrogeni prisutan kod ljudi, kod kojih je koncentracija cirkulišućih estrogena relativno visoka. Učestalost javljanja određenih bolesti kod ljudi može se dovesti u vezu sa načinom ishrane. U Azijskih naroda u čijoj su ishrani visoko zastupljeni sojini proizvodi smanjen je rizik od karcinoma dojke, prostate kao i od kardiovaskularnih bolesti (Adlercreutz i Mazur 1997).

Estrogenske efekte ispoljavaju različita jedinjenja poreklom iz životinja, biljaka i mikroorganizama. Takođe, pojedina industrijski dobijena jedinjenja ili produkti njihove degradacije poseduju estrogeno delovanje. Tako pesticidi i insekticidi sadrže jedinjenja sa estrogenom aktivnošću koja se klasifikuju kao ksenoestrogeni. Potencijalno štetno dejstvo ksenoestrogena danas se pomno prati, s obzirom na

oskudnost podataka o njihovom dugotrajnom dejstvu na živi svet (Davis i Bradlow 1995).

Termin fitoestrogeni obuhvata jedinjenja sa hemijskom strukturom i biološkom aktivnošću sličnom  $17\beta$  estradiolu. U fitoestrogene ubrajamo i jedinjenja koja se *in vivo* transformišu u jedinjenja slična estrogenima (Setchell 1985) ili prouzrokuju efekte koji bi se mogli očekivati kao posledica egzogene aplikacije estrogena (Kuiper i sar. 1998). Najzastupljenija klasifikacija obuhvata tri glavne grupe fitoestrogena: izoflavonoide u koje spadaju izoflavoni i kumestani, lignane i ostale (Murkies i sar. 1998). Prisutni su kako u biljkama tako i u njihovim semenima. Pojedinačna biljka obično sadrži više od jedne grupe fitoestrogena. Tako je zrno soje bogato izoflavonima, dok klica soje obiluje kumestrolom, najzastupljenijim kumestanom (Price i Fenwick 1985).

Fitoestrogeni su nalaze u velikom broju biljnih vrsta koje se svakodnevno koriste kako u ljudskoj tako i u životinjskoj ishrani: začini (luk, mirođija, kim, peršun), mahunarke (soja, grašak, detelina), zrnevlje (žito, ječam, raž, pirinač, ovas), povrće (šargarepa, krompir), voće (jabuka, šljiva, kruška, grožđe, urma, trešnja) kao i pića (pivo, kafa) (Kurzer i Xu 1997). Zanimljivo je da obolela biljka (napadnuta insektima i gljivicama) *Medicago sativa* (alfalfa) produkuje fitoestrogene (kumestrol, sativil itd), dok zdrava biljka sadrži veoma male količine istih (Loper i sar. 1968). Proizvodi od soje, bilo prehrambeni (sojino mleko, sojin jogurt, tofu, soja sos) bilo u vidu suplemenata u ishrani ili medicinskih preparata, predstavljaju dominantan komercijalni izvor izoflavona za savremenog čoveka.



Crtež 1.10. Plod biljke soje i strukturna formula genisteina i daidzeina (www.viable-herbal.com)



Veliki procenat izoflavona zastupljen je u biljci soji Najpoznatiji izoflavoni: genistein, daidzein i glicitein koji se nalaze u soji po hemijskoj strukturi su triciklični bifenolni aglikani. U soji genistein je najzastupljenija, a ujedno i najaktivnija komponenta, dok se daidzein i glicitein nalaze u manjem procentu. Kompleksne strukture iz kojih se izvode genistein, daidzein i glicitein su, zapravo, njihove glikozilovane forme. Genistin, 6'-O-malonil genistin i 6'-O-acetil genistin su glikozilovane forme genisteina, dok su glikozilovane forme daidzeina daidzin, 6'-O-malonil daidzin i 6'-O-acetil daidzin. Glikozilovane forme gliciteina su predstavljene glicitinom, 6'-O-malonil glicitinom i 6'-O-acetil glicitinom. Malonil-glikozidi genisteina su najzastupljenija forma izoflavona u soji (Kulling i sar. 2002). Procesima digestije glikozilovane forme se enzimatski prevode u crevima u bifenolne aglikane, jedinjenja strukturno slična estrogenu (Setchell i sar. 1984). Kao krajnji produkt metabolizma daidzeina nastaje molekul visoko potentnog ekvola (Setchell i sar. 2002). Apsorbovani u crevima izoflavoni ulaze u enterohepatičku cirkulaciju i mogu biti ekskretovani putem žuči nakon dekonjugacije gastrointestinalnom florom, reapsorbovani, rekonjugovani u jetri i ekskretovani urinom (Axelson i Setchell 1981; Adlercreutz i sar. 1986). Koncentracija lignana i izoflavona može biti izmerena u urinu, krvnoj plazmi, fecesu, žuči, salivi i mleku (Adlercreutz i sar. 1987). Čak i pri kontrolisanom doziranju izoflavona prisutne su široke individualne razlike u njihovoj koncentraciji. Metabolizam izoflavona, i uopšte fitoestrogena, unetih *per os* određuje gastrointestinalna flora, te ga unošenje antibiotika i bolesti creva mogu izmeniti (Setchell i sar. 1984). Masnoće u ishrani, proteini, alkohol, različiti mikronutrijenti, voće, povrće, odnosno hrana bogata celuloznim vlaknima znatno utiču na metabolizam izoflavona (Tew i sar. 1996; Hutchins i sar. 1995; Lu i sar. 1996a,b).

#### **1.4.2.1. Ćelijski mehanizmi delovanja fitoestrogena-izoflavona soje**

Mehanizam delovanja fitoestrogena još uvek nije rasvetljen u potpunosti. Danas sa sigurnošću govorimo o više različitih mehanizama njihovog delovanja na ćelijskom nivou.

Sojini izoflavoni imaju slabo estrogensko dejstvo koje ostvaruju vezujući se za ER  $\alpha$  i  $\beta$ . Kostelac i sar. (2003) su pokazali da se genistein vezuje s većim afinitetom od daidzeina za oba tipa ER, kao i to da se oba ova izoflavona vezuju sa mnogo većim

afinitetom za ER  $\beta$ : 50% efikasnosti aktivacije ( $EC_{50}$ ) ER $\alpha$  odgovara 0.03  $\mu\text{mol}$ -a 17 $\beta$  estradiola, za genistein ta količina iznosi 15 $\mu\text{mol}$ -a, a za daidzein >300 $\mu\text{mol}$ -a.  $EC_{50}$  za ER $\beta$  odgovara 0.01 $\mu\text{mol}$ -u 17 $\beta$  estradiola, 0.03 $\mu\text{mol}$ -u genisteina i 0.035 $\mu\text{mol}$ -u daidzeina. Ova svojstva daju genisteinu i daidzeinu status selektivnih modulatora estrogenskih receptora (SERM), što znači da oni u nekim tkivima mogu delovati kao agonisti ili agonisti/antagonisti, kompetirajući sa endogenim estradiolom za mesto vezivanja i, u skladu sa tim, mogu da stimulišu ili antagoniziraju (blokiraju) delovanje 17 $\beta$  estradiola. Patisual (2005) navodi da se izoflavoni *in vivo* podjednako dobro vezuju i za ER  $\alpha$  i  $\beta$ , dok *in vitro* pokazuju veći afinitet vezivanja za ER $\beta$ . Da li će izoflavoni delovati kao agonisti ili antagonisti estogena zavisi i od količine izoflavona tj. efekat izoflavona doznno je zavistan (Setchell i Cassidy 1999).

Istraživanja reproduktivnog ponašanja ovaca (Bennetts i sar. 1946) pokazuju estrogensko dejstvo izoflavona. Takvo delovanje podrazumeva hipertrofije uterusa na šta ukazuju istraživanja Price i Fenwick (1985). Izoflavoni se generalno vezuju za ER koji su slobodni (pri niskom nivou endogenih estrogena) i estrogenski efekat je potenciran aplikovanjem nižih doza izoflavona (Adlercreutz i sar. 1997), a inhibiran usled kompeticije, aplikovanjem viših doza izoflavona. Niske koncentracije genisteina [ $10^{-5}$ - $10^{-8}$ ] stimulatorno deluju na rast MCF-7 humane ćelijske linije karcinoma dojke, dok više [ $10^{-4}$ - $10^{-5}$ ] koncentracije deluju inhibitorno, pokazala je *in vitro* studija (Wang i sar. 1996). Tretman sojinim izoflavonima povećava produkciju SHBG (*sex hormone binding globulin*) u jetri i na taj način umanjuje efekte polnih hormona s obzirom da SHBH, vezujući se za receptore na ćelijskoj površini, regulišući dostupnost ili dejstvo polnih hormona na veoma selektivan način (Adlercreutz i sar. 1987; Hammond 1995). Zajednički tretman genisteinom i estradiolom smanjuje preuzimanje estradiola u uterusu, te u ovom slučaju govorimo o anti-estrogenskom delovanju genisteina (Messina 1994).

Jedan od mogućih mehanizama delovanja estogena i izoflavona soje je kuplovanje sa androgenim receptorom (AR). AR, takođe poznat kao NR3C4 (nuklearni receptori podfamilija 3, grupa C, član 4), pripada grupi nuklearnih receptora (Lu i sar. 2006) i aktivira se vezivanjem testosterona ili dihidrotestosterona (DHT) (Roy i sar. 1999a) u citoplazmi, a potom se ovaj receptor-ligand kompleks translocira u jedro gde učestvuje u regulaciji genske transkripcije. Blizak je progesteronskom receptoru te veće

doze progesterona mogu dovesti do blokade AR (Bardin i sar. 1983; Raudrant i Rabe 2003). Kao ER, AR interaguje sa proteinima signalne transdukcije u citoplazmi što dovodi do brzih promena u ćelijskoj funkciji nezavisno od genske transkripcije (Heinlein i Chang 2002; Fix i sar. 2004). Endogeni estradiol se vezuje za AR skoro istim afinitetoma kao i DHT dok se genistein i daidzein vezuju sa nešto manjim (Wang i sar. 2010). U reproduktivnim organima mužjaka pacova brojnost AR je velika, dok je u bubrezima, jetri, kori nadbubrežnih žlezda, hipofizi, srcu glatkoj muskulaturi manja. Prisustvo AR potvrđeno je u ćelijama CNS, tako je PVN jedro pozitivano na prisustvo AR, te androgeni mogu direktno uticati na sintezu CRH kod ljudi (Bao 2006).

Izoflavoni soje i njihovi metaboliti u organizmu sisara mogu delovati i drugim mehanizmima nezavisno od receptora (Barnes i sar. 2000). Tako deluju na aktivnost enzima, proteinsku sinezu, ćelijsku proliferaciju, angiogenezu, transport kalcijuma,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  adenzin trifosfatazu, faktore rasta, oksidaciju masti, i ćelijsku diferencijaciju (Knight i Eden 1996; Adlercreutz i Mazur 1997). Njihovo delovanje na enzime je višedimenziono.

Genistein i daidzein direktno inhibiraju neke od najznačajnijih enzima uključenih u sintezu i metabolizam steroida, te na taj način modulišu biološku aktivnost endogenih estrogena, testosterona i glukokortikoida (Kao i sar. 1998; Whitehead i sar. 2002; Holzbeierlein i sar. 2005; Ohno i sar. 2002). Genistein je, potentan inhibitor Tyr kinaza, enzima koji imaju ključnu ulogu u signalnim putevima ćelijske proliferacije i rasta (Akiyama i sar. 1987), dok je ovakvo dejstvo daidzeina mnogo slabije izraženo (Yokoshiki i sar. 1996). Scholar i Toews (1994) su pokazali da visoke koncentracije daidzeina *in vitro* značajno inhibiraju invaziju ćelija karcinoma dojke posredovanu Tyr kinzama. *In vitro* studije Zhang i sar. (2001) su pokazale da genistein inhibira proliferaciju adenohipofiznih ćelija pacova. Genistein takođe inhibira enzime DNK topoizomeraze, kao i histidin kinazu (Adlercreutz i Mazur 1997).

#### **1.4.2.2. Biološki efekti izoflavona soje**

U sklopu ili mimo vezivanja za estrogenske receptore (tj. estrogenskog, antiestrogenskog i ostalih mehanizama), sojini izoflavoni mogu delovati antioksidativno, antikarcinogeno, antiaterogeno, hipolipidemijski, osteoprotektivno i

imunosupresivno. Brojni su podaci koji ukazuju na njihove metaboličke efekte, kako sistemske tako i na ćelijskom nivou.

Antioksidativno dejstvo je fundamentalna karakteristika izoflavona iz koje proizlazi čitav niz bioloških dejstava, uključujući: antibakterijsko, antiviralno, antiinflamatorno, antialergijsko, antitrombotsko, antimutageno, antikarcinogeno i vazodilatatorno (Rao i sar. 1997; Huang i sar. 1999). Izoflavoni soje antioksidativno dejstvo ispoljavaju direktno, vezujući i uklanjajući slobodne radikale iz medijuma ili indirektno, aktivirajući enzime antioksidativne zaštite ili menjajući fluidnost membrana.

Hemijska struktura izoflavona, odnosno prisustvo hidroksilnih grupa kao supstituenata na aromatičnim prstenovima je odgovorna za njihovu sposobnost direktnog uklanjanja slobodnih radikala (Heijnen i sar. 2001), čime biva sprečena ili odložena oksidacija drugih molekula putem sprečavanja inicijacije ili propagacije u oksidativnom lancu. Neka istraživanja ukazuju da je za uklanjanje slobodnih radikala iz medijuma izoflavonima bitniji položaj hidroksilnih grupa od njihovog broja (Chen i sar. 2002). Ista studija sugerise da su hidroksilne grupe u *ortho*- položaju prstena B (kakav je slučaj kod genisteina) najznačajnije aktivne grupe i da sa slobodnim radikalima učestvuju u formiranju intramolekulske vodonične veze pri čemu nastaje stabilna, rezonantna *ortho*-benzokvinonska struktura. Ovakva antioksidativna aktivnost izoflavona je utvrđena kako u *in vivo*, tako i u *in vitro* studijama, u većoj ili manjoj meri, za slobodne radikale različite hemijske prirode: superoksid anjon, vodonik peroksid, hidroksil, peroksil, peroksinitril, galvinoksil i difenilpikrilhidrazil radikal (Mitchell i sar. 1998; Guo i sar. 2002). Genistein po svemu sudeći može i da stimuliše produkciju superoksid dismutaze, izuzetno značajnog enzima antioksidativne zaštite u neutralisanju slobodnih radikala (Takekawa i sar. 2006; Borrás i sar. 2006).

Indirektnim putem izoflavoni ispoljavaju svoje antioksidativno dejstvo aktivirajući enzime antioksidativne zaštite ili menjajući fluidnost membrana. Wei i sar. (1995) navode da je genistein potentan inhibitor produkcije vodonik-peroksida u HL60 ćelijama, i inhibitor geneze superoksid anjona preko enzima ksantin oksidaze. Pored toga, genistein kod miševa povećava aktivnost antioksidativnih enzima: katalaze, superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze (Mitchell i sar. 1998). Takođe, utvrđeno je da pojedini izoflavoni, slično holesterolu i  $\alpha$ -tokoferolu,

ugradnjom unutar hidrofobnog jezgra membrane uzrokuju izraženo sniženje lipidne fluidnosti u tom regionu membrane i njenu stabilizaciju (Guo i sar. 2002). Nasuprot tome rezultati naše laboratorije ukazuju na različitu distribuciju genisteina i daidzeina u ćelijskoj membrani. Genistein smanjuje fluidnost membrane u površinskom regionu membrane, a daidzein povećava fluidnost u dubini membrane (Ajdžanović i sar. 2010).

Utvrđeno je da izoflavoni inhibiraju lipidnu peroksidaciju i moduliraju produkciju prostaglandina i leukotrijena uključenih u karcinogenezu, te tako snižavaju rizik pojave maligne proliferacije ćelija (King i McCay 1983). Učestalost karcinoma, zavisnih od koncentracije hormona, je niža u zemljama Azije i Istočne Evrope nego u zapadnim zemljama (Adlercreutz 1990) kao i kod vegetarijanaca (Hunter i sar. 1996). Poređenjem podataka o ishrani i stopi smrtnosti u različitim zemljama, karcinomi dojke, ovarijuma, prostate i debelog creva pokazuju negativnu korelaciju sa unosom izoflavona (Rose i sar. 1986). Predloženo je nekoliko mehanizama za moguće antikancerogeno dejstvo izoflavona. Oni uključuju inhibiciju enzima uključenih u biosintezu estradiola (Ibrahim i Abul-Hajj 1990; Pelissero i sar. 1996), inhibiciju Tyr kinaza (Ullrich i Schlessinger 1990), inhibiciju DNK topoizomeraze I i II (Yamashita i sar. 1990), kao i inhibiciju angiogeneze (Fotsis i sar. 1997).

Postoje podaci koji ukazuju da izoflavoni inhibitorno utiču na sekreciju gonadotropina (Cassidy i sar. 1995), što se negativno odražava na nivo estradiola i progesterona u plazmi, a i utiče na dužinu menstrualnog ciklusa (Lu i sar. 1996a). Sniženje nivoa estradiola u plazmi može biti direktna posledica inhibicije aromataze, ili indirektna, sniženjem koncentracije gonadotropina u plazmi. Pored aromataze, izoflavoni inhibiraju još dva enzima uključena u biosintezu estradiola, 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenazu i 17 $\beta$ -hidroksisteroid oksidoreduktazu I. Ovi efekti izoflavona smanjuju rizik pojave karcinoma dojke, jer se smanjenjem nivoa estradiola gubi i jak stimulus za proliferaciju malignih ćelija. Genistein inhibira rast malignih ćelija karcinoma dojke kako *in vitro* tako i *in vivo* (Peterson i Barnes 1991; Constantinou i sar. 1995). Utvrđeno je da u Severnoj Americi imigrantkinje iz Japana češće obolevaju od karcinoma dojke nego što je to slučaj kod žena koje žive u Japanu (Shimizu i sar. 1991). Ista studija ukazuje da je stopa karcinoma dojke imigrantkinja iz Japana nakon dugogodišnjeg života u Severnoj Americi, kao i njihovih ćerki gotovo ista kao kod autohtonih Amerikanki. Ovakve studije ukazuju na značaj ishrane (koja u

Japanu obiluje proizvodima od soje) u etiologiji karcinoma dojke. Naravno, uprkos svim ovim pozitivnim efektima izoflavona na sniženje rizika obolevanja od karcinoma dojke, treba imati na umu da oni imaju slabo estrogensko dejstvo i da će, pod određenim eksperimentalnim uslovima, uvek stimulisati ćelijsku proliferaciju i ekspresiju gena zavisnih od estrogena (Makela i sar. 1994). Pored inhibicije proliferacije ćelija karcinoma dojke, genistein ima slično dejstvo i kod karcinoma prostate. Studije, izvedene na muškarcima Japanskog porekla koji žive na Havajima, su ukazale na snižen rizik obolevanja od karcinoma prostate kao posledica ishrane bogate proizvodima od soje (Severson i sar. 1989). Druge, pak, vršene na Japanskim imigrantima u Severnoj Americi, govore o povećanoj stopi karcinoma prostate u kratkom periodu nakon imigracije (Baghurst i Rohan 1994), ukazujući na značaj ishrane u genezi ove vrste karcinoma. Utvrđeno je da genistein inhibira rast kako androgen zavisnih, tako i androgen nezavisnih malignih ćelija karcinoma prostate u kulturi ćelija (Rokhlin i sar. 1995). Da bi se postigao ovaj efekat, potrebne su visoke doze genisteina (Peterson i Barnes 1993). Utvrđeno je, takođe, sniženje nivoa intracelularnih, prostata-specifičnih antigena (PSA) u kulturi ćelija humanog karcinoma prostate nakon dodavanja genisteina u medijum (Adlercreutz i sar. 1995). Smatra se da genistein snižava konverziju testosterona u  $5\alpha$ -dihidrotestosteron, i na taj način redukuje intracelularne androgene efekte u prostati te usporava rast malignih ćelija (Evans i sar. 1995). Međutim, razmatrajući genistein kao potencijalni terapeutik kod obolelih od karcinoma prostate, teško je evaluirati rezultate dobijene *in vitro* i izvršiti njihovu ekstrapolaciju na živi sistem, pogotovo što rezultati dobijeni u našoj laboratoriji ukazuju na ekstremno povećanje lučenja DHEA iz *zona reticularis* kore nadbubrežne žlezde pacova nakon tretmana genisteinom (Ajdžanović i sar. 2009). Kod tumora testisa i prostate, koji su zavisni od prisustva androgena, takvo njegovo dejstvo bi bilo kontraproduktivno i opasno.

Pojedine epidemiološke studije sprovedene u Japanu ukazuju na smanjen rizik obolevanja od karcinoma debelog creva na područjima učestale konzumacije tofua (prehrambeni proizvod od soje) (Watanabe i Koessel 1993). Utvrđeno je takođe da genistein inhibira proliferaciju malignih ćelija jednjaka, želuca i debelog creva *in vitro* (Yanagihara i sar. 1993). Uzevši u obzir činjenicu da su ER pronađeni u normalnoj mukozi, adenomatoznim polipima i maligno transformisanim ćelijama debelog creva

(Xu i Thomas 1995) i da njihova koncentracija odgovara onoj u normalnom tkivu dojke (Singh i Langman 1995), pretpostavka je da genistein svoje antikancerogeno dejstvo ispoljava mehanizmom kuplovanja sa estrogenskim receptorima.

U procesu karcinogeneze veoma važnu ulogu ima proces angiogeneze. Preduslov za formiranje novih kapilara je razaranje bazalne membrane matičnih krvnih sudova, što je posledica finog balansa produkcije proteolitičkih enzima i njihovih inhibitora, a praćeno je migracijom endotelijalnih ćelija na mesto destrukcije membrane (Pepper i sar. 1990). Proteolitička degradacija ekstracelularnog matriksa pod dejstvom endotelijalnih ćelija kontrolisana je faktorima angiogeneze, koji indukuju produkciju plazminogenog aktivatora urokinaznog tipa, kao i produkciju njegovog fiziološkog inhibitora (Pepper i sar. 1990). Pokazano je da genistein redukuje produkciju kako plazminogenog aktivatora, tako i njegovog inhibitora u kloniranim goveđim endotelijalnim ćelijama krvnih kapilara (Fotsis i sar. 1993). Takođe, genistein inhibira migraciju endotelijalnih ćelija, stimulisanu bFGF (*bovine fibroblast growth factor*), na mestu povrede sloja endotelijalnih ćelija, i koči neke rane događaje u procesu angiogeneze. Mehanizam antiangiogenetskog dejstva genisteina može se ostvariti preko inhibicije Tyr kinaza, inhibicije S6 kinaze, kao i inhibicije DNK topoizomeraze I i II (Yamashita i sar. 1990).

Postoje podaci koji govore u prilog hipotezi da izoflavoni, poreklom iz hrane, utiču na smanjenje rizika obolevanja od kardiovaskularnih bolesti u Azijskim zemljama i kod vegetarijanaca, te se može smatrati da imaju kardioprotektivno dejstvo (Adlercreutz 1990). Odavno je poznato da konzumiranje sojinih proizvoda snižava nivo lipida u plazmi. Logičan zaključak koji se iz ovoga može izvesti je da su izoflavoni iz soje, bar delimično, odgovorni za ovaj efekat (Adlercreutz 1990). Studija, sprovedena na mužjacima i ženkama *Rhesus* majmuna čija se ishrana bazirala na soji, je pokazala za 30%-40% niže vrednosti koncentracija lipoprotein niske gustine-(LDL) i lipoprotein veoma niske gustine-(VLDL) holesterol u krvi, pri poređenju sa kontrolnim vrednostima (Anthony i sar. 1996). Pri tom, nivo lipoprotein visoke gustine (HDL) holesterola je povećan za oko 50% kod ženki, odnosno za oko 20% kod mužjaka. Prethodno je rečeno da je genistein snažan antioksidant, te kao takav inhibira oksidaciju LDL, što je utvrđeno u *in vitro* studijama (Tikkanen i sar. 1998). Sam mehanizam, međutim, još nije rasvetljen. Izoflavoni sprečavaju formiranje plaka u

krvnim sudovima obolelih od ateroskleroze i inhibiraju adheziju ćelija, te i na taj način deluju antiaterogeno (Raines i Ross 1995). Utvrđeno je da genistein inhibira agregaciju trombocita *in vitro* i to, verovatno, zahvaljujući, inhibiciji (Gaudette i sar. 1990). Takođe je pokazano da genistein i daidzein mogu inhibirati agregaciju trombocita delujući kao antagonisti za tromboksanski A2 receptor (Nakashima i sar. 1991). Zbog svega ovoga je zaključeno da izoflavoni iz soje imaju veliki potencijal u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja. Međutim, uzevši u obzir prethodno navedene podatke o snižavanju fluidnosti membrana (povećanju njihove krutosti) usled ugradnje genisteina u površinske hidrofobne slojeve membrane eritrocita (Ajdžanović i sar. 2010) trebalo bi biti veoma obazriv sa njihovom primenom, naročito kod hipertoničara. Naime, protok krvi kroz sužene lumene krvnih sudova (usled nagomilavanja ateromatoznih plaka) može biti otežan povećanjem krutosti eritrocitnih membrana i povišenjem viskoznosti krvi (Ajdžanović i sar. 2010) nakon primene genisteina. Rezultati naše istraživačke grupe, pored sniženja nivoa holesterola u serumu, ukazuju na povišenje nivoa triglicerida kod mužjaka pacova nakon tretmana genisteinom i daidzeinom (Šošić-Jurjević i sar. 2007) što može da smanji entuzijazam za njihovu primenu.

Pojedine studije ukazuju na moguću ulogu sojinih izoflavona u metabolizmu kostiju i prevenciji osteoporoze. Naime, kod postmenopauzalnih žena je došlo do povećanja mineralnog sadržaja u kostima usled unosa hleba obogaćenog komponentama soje u poređenju sa kontrolnom grupom žena koje su u ishrani koristile običan, pšenični hleb (Dalais i sar. 1998). Korišćenje soje u ishrani predupređuje gubitak koštane mase kod ovarijektomisanih pacova (Arjmandi i sar. 1996). Štaviše, utvrđeno je da genistein inhibira aktivnost osteoklasta te se na taj način smanjuje gubitak koštane mase u ovarijektomisanih pacova (Blair i sar. 1996). Genistein snižava nivo alkalne fosfataze u serumu, te i na taj način ispoljava svoje osteoprotektivno dejstvo (Filipović i sar. 2010).

Sojini izoflavoni ispoljavaju svoje dejstvo i na nivou imunog sistema. Tako je utvrđeno da genistein inhibira produkciju azot oksida u makrofagima, te pokazuje modulatoran efekat u imunom odgovoru (Krol i sar. 1995). Pokazano je moćno imunosupresivno dejstvo genisteina u inhibiciji humane T-ćelijske proliferacije stimulisane CD<sub>28</sub> monoklonskim antitelima (Atluru i Gudapaty 1993). Utvrđeno je da



genistein inhibira sintezu interleukina-2 i ekspresiju interleukinskog receptora, kao i da inhibira produkciju leukotrijena B (Reddy i Cohen 1986).

Tokom poslednjih petnaestak godina, utvrđeno je da genistein utiče i na endokrinu funkciju pankreasa. Sorenson i sar. (1994) su pokazali da inkubacija Langerhansovih ostrvaca, izolovanih iz tri i pet dana starih pacova, sa genisteinom znatno pojačava sekreciju insulina indukovanu 10 mM glukozom. Jonas i sar. (1995) su utvrdili da efekat genisteina na oslobađanje insulina nije bio praćen promenama u koncentracijama ATP-a, cAMP-a i IP<sub>3</sub> (inozitol 1, 4, 5-trifosfat) u Langerhansovim ostrvcima. Paradoksalno, bila je smanjena intracelularna koncentracija Ca<sup>2+</sup>, što je efekat koji, obično, obustavlja oslobađanje hormona. Pojačano oslobađanje insulina stimulirano genisteinom bilo je suprimirano diazoksidom (agensom koji otvara ATP-zavisne kalijumove kanale), te je zaključeno da je u pitanju vanreceptorski mehanizam delovanja, nezavisan od efekta na tirozin-kinaze. Uprkos navedenim *in vitro* rezultatima, *in vivo* studije pokazuju da genistein ne samo da ne povećava nivo insulina u krvi, nego ga smanjuje (Cheng i sar. 2004), te se definitivno i iscrpno mišljenje o efektima sojinih izoflavona na endokrinu funkciju pankreasa još uvek čeka.

U poslednje vreme, mnoga istraživanja su usmerena na regulaciju unosa hrane sojinim izoflavonima. Pokazano je sniženje nivoa leptina u krvi, kao i sniženje telesne mase i mase belog masnog tkiva kod mužjaka pacova nakon unosa izoflavona hranom (Lephart i sar. 2004). Izoflavoni su, u ovom slučaju, izazvali promene na nivou hipotalamusa, doveli su do povećanja nivoa neuropeptida Y, i usloveli povećanje unosa hrane i vode. Uzevši u obzir činjenicu da nakon tretmana genisteinom, nivo insulina kod pacova ne raste, hipoleptinemijski efekat izoflavona može biti rezultat njihovog direktnog dejstva na adipocite. Utvrđeno je da se to dejstvo ne ogleda u inhibiciji aktivnosti protein kinaze A, ni u povećanju produkcije cAMP kao što je to slučaj u nekim drugim tipovima ćelija, već u inhibiciji glukoznog metabolizma (Szkudelski i sar. 2005). Mimo efekata na insulin i leptin, izoflavoni mogu izazvati brojne metaboličke promene koje doprinose smanjenju telesne mase. Naaz i sar. (2003) su utvrdili da genistein inhibira ekspresiju gena za lipoprotein lipazu u masnom tkivu ovarijektomisanih ženki miševa. Ovakvo njegovo dejstvo se ogleda u smanjenom intenzitetu deponovanja masti u adipocitima. Eksperimenti sa izolatima jetre iz ovarijektomisanih pacova ukazuju na mogućnost direktnog dejstva genisteina na lipidni

metabolizam u ovom organu (Nogowski i sar. 1998). Naime, dodavanje genisteina u perfuzioni medijum značajno snižava lipogenezu u jetri, determinisanu konverzijom glukoze u totalne lipide. Paralelno sa tim procesom, izlučivanje slobodnih masnih kiselina je intenzivirano, ukazujući na lipolitičku aktivnost genisteina u jetri (Nogowski i sar. 1998). Naposljetku, studije na izolovanim adipocitima ukazuju na još jedno veoma značajno dejstvo genisteina, inhibiciju glukoznog transporta (Smith i sar. 1993). Pomenuta istraživačka grupa je utvrdila da genistein obustavlja transport glukoze indukovani insulinom, zahvaljujući konformacionim promjenama membranskih transportera GLUT4 i bez značajnog sniženja njihovog broja. Treba napomenuti da postoje podaci i o povišenju telesne mase nakon tretmana genisteinom (Penza i sar. 2006) kao i o izostanku efekta na telesnu masu (Faqi i sar. 2004) što je verovatno uslovljeno različitim eksperimentalnim uslovima i protokolima.

Brojne studije ukazuju na goitrogene (goiter-gušavost) efekte sojinih izoflavona (Doerge i Sheehan, 2002). U mnogim slučajevima koncentracija tiroidnih hormona u krvi je nepromjenjena, ali je gušavost povezana sa povišenim nivoom TSH. Utvrđeno je još da genistein inhibira aktivnost tiroidne peroksidaze koja katalizuje jodiniciju tiroglobulina i oksidativno kuplovanje sa dijodtironinom što rezultuje formiranjem tiroksina ( $T_4$ ) (Divi i sar. 1997).

Tretmanom gravidnih ženki pacova genisteinom i praćenjem njegovog prisustva u krvi potomaka Doerge i sar. (2001) dokazuju sposobnost prolaza genisteina kroz placentu. Kouki i sar. (2003) pokazuju da neonatalni tretman genisteinom dovodi do ranijeg vaginalnog otvaranja kao i do produžetka estrusa, dok tretman daidzeinom nema efekata.

Konačno, ne bi trebalo zanemariti blagotvoran efekat sojinih izoflavona na simptome koji prate menopauzu, poput talasa vrućine („hot flushes”), gubitka vaginalne sekrecije, lošeg sna i nervoze praćene pojačanim lučenjem hormona stresa. Ukazuje se na ređe javljanje menopauzalnih simptoma kod Japanki u poređenju sa Kanađankama, verovatno usled ishrane bogate sojinim proizvodima (Adlercreutz i sar. 1995). Takođe, rezultati naše istraživačke grupe (Ajdžanović i sar. 2009), koji ističu drastično sniženje nivoa hormona stresa kod starih pacova nakon tretmana genisteinom, mogli bi povećati interes za njegovom primenom u andropauzi.

### 1.5. Delovanje estrogena i izoflavona soje na ćelije hipotalamusa

Kao što je već rečeno polni hormoni determinišu reproduktivnu anatomiju i fiziologiju, kao i razvoj polno specifičnog ponašanja (McLusky i Naftolin 1981). Ženke, izložene estrogenima ili androgenima podložnim aromatizaciji, tokom kritičnog perioda polnog razvoja CNS, postaju anovulatorne kao adulti, te pokazuju modus sekrecije GnRH i obrasce ponašanja karakteristične za mušjake (McEwen 1980, Toran-Allerand 1984). Još su Faber i Hughes (1991) pretpostavili da supstance sa estrogenim dejstvom, dostupne iz životne sredine, utiču na androgenizaciju mozga. Lovekamp-Swan i sar. (2007) navode da visok nivo soje u ishrani obezbeđuje korisne efekte u mozgu, slične efektima niskih doza estrogena koje se često koriste u tretmanu postmenopauzalnih žena. Tako, genistein deluje kao estrogen tokom seksualne diferencijacije (dovodi do maskulinizacije mozga), pokazuje studija Kouki i sar. (2003) na neonatalnim pacovima.

Unutar preoptičke oblasti nalazi se polno dimorfno jedro koje predstavlja morfološki marker polne diferencijacije CNS, s obzirom da je ovo jedro 3-5 puta veće kod mušjaka nego kod ženki (Gorski 1978). U polno dimorfnom jedru testosteron se konvertuje u estradiol aromatizacijom i deluje preko ER $\alpha$  na promenu moždanih struktura i funkcija (McCarthy 2008). Ključnu ulogu u generisanju preovulatornog talasa sekrecije GnRH ima AVPV jedro hipotalamusa koje je manje kod mušjaka nego kod ženki, dok su dopaminergični neuroni u ovom jedru 3-4 puta zastupljeniji kod ženki. Polne razlike kao i sposobnost da se generiše preovulatorni talas zavise od postnatalne izloženosti polnim steroidima i prisustva ER $\alpha$  (Simerly 2002). Nedavna studija Waters i Simerly (2009) je pokazala da estradiol, delujući direktno na ćelije AVPV jedra dovodi do gubitka dopaminergičnih neurona ovog jedra. VMN, odgovorano za modulaciju reprodukcije kod ženki, je takođe region hipotalamusa koji je osetljiv na estrogene, i tretman estrogenom dovodi to značajnog povećanja proenkefalin iRNK u ovom jedru. Starenjem uticaj estrogena na proenkefalin iRNK opada u VMN jedru (Li i sar. 1997). O delovanju estrogena na GHRH iRNK postoje različiti podaci. Senaris i sar. (1992) navode redukciju GHRH iRNK posle estrogenskog tretmana. S druge strane GHRH iRNK nije promenjena gonadektomijom i hormonskom terapijom kako mušjaka tako i ženki pacova navodi pak druga grupa naučnika (DeGennaro i sar.1989; Maiter i sar. 1991). Pored toga, različite studije na ženkama pacova pokazuju da se nivo SS u ME menja istovremeno sa promenama

estrogena u plazmi (Estupina i sar. 1996; Freeman 1994; Knuth sar. 1983; Zorilla i sar. 1991), što pokazuje da estrogen utiče na sintezu i oslobađanje SS (Milošević i sar. 2012b). Proučavajući efekat estrogena na adrenokortikotropni sistem kod jedinki koje su bile izložene stresu Figueiredo i sar. (2007) dolaze do podataka o smanjenju sekretorne aktivnosti ćelija PVN jedra. Polni steroidi preko receptorskih mehanizama promoviraju opstanak neurona, smanjujući učestalost njihove smrti (Forger 2006), dok se o uticaju estrogena na apoptozu manje zna.

Literaturni podaci o delovanju sojinih izoflavona na morfofunkcionalne karakteristike ćelija hipotalamusa, kao i na sistemske posledice koje iz njega proističu, su tokom poslednje decenije u fokusu mnogih istraživanja. Utvrđeno je da visoka doza genisteina, aplikovana tokom neonatalnog perioda ženkama pacova, dovodi do izrazitog povećanja volumena hipotalamičkog polno dimorfnog jedra i smanjenja hipofizne osetljivosti na GnRH (Faber i Hughes 1991). Interesantno je istaći da je 10 puta manja doza genisteina imala dijametralno suprotne efekte na volumen polno dimorfnog jedra i hipofiznu osetljivost na gonadotropine. Intracerebroventrikularni tretman ovarjektomisanih ovaca genisteinom ima uticaja na sekretornu aktivnost GnRH neurona, kao i na oslobađanje LH iz hormon sekretujućih ćelija hipofize (Wojcik-Gladysz i sar. 2005). Ishrana bogata sojinim izoflavonima dovodi da značajnog smanjenja volumena AVPV jedra (Lephart i sar. 2001, 2003). Daljim istraživanjima o uticaju isoflavona na AVPV. Bu i Lephart (2007) pokazuju da ishrana bogata sojinim izoflavonima intenzivira procese apoptoze u ćelijama AVPV, preciznije dovodi do gubitka ER $\beta$  imunoreaktivnih neurona pomenutog jedra mozga pacova. Takođe i odsustvo normalne polne diferencijacije AVPV jedra dešava se nakon neonatalnog tretmana genisteinom (Patisaul i sar. 2007). U prisustvu ili odsustvu 17 $\beta$  estradiola, genistein nema efekta na količinu receptora za oksitocin u VMN (Patisaul 2002). Genistein povećava ER $\beta$  iRNK u PVN, dok estradiol deluje suprotno, te se primenom ove doze (500ppm *parts per million*) ispoljava antiestrogenski efekat genisteina u PVN *via* ER $\beta$  (Patisaul 2002).

#### **1.6. Delovanje estrogena i izoflavona soje na ćelije hipofize**

17 $\beta$  estradiol nije samo odgovoran za regulatornu funkciju u reproduktivnom sistemu, već je značajan fiziološki regulator sekretorne aktivnosti hipofize (Kitay 1963).

On, naime, reguliše sintezu i sekreciju različitih hormona hipofize na ćelijsko-specifičan i promotor-specifičan način (Schreihofner i sar. 2000). Pod mehanizmom ćelijske specifičnosti se podrazumeva diferencijalna ekspresija različitih izoformi ER, dok promotorska specifičnost uključuje regulaciju ekspresije određenih gena. Ovaj steroid pokazuje pozitivne i negativne efekte na oslobađanje gonadotropina i stimuliše sintezu, deponovanje i oslobađanje prolaktina (Gharib i sar. 1990, Gourджи i Laverriere, 1994).  $17\beta$ -estradiol je takođe uključen u mehanizme koji determinišu veličinu i broj prolaktinskih ćelija (Ellerkmann i sar. 1991). Različiti efekti na ćelije hipofize mogu biti prisutni u isto vreme. Na primer,  $17\beta$ -estradiol stimuliše proliferaciju prolaktinskih ćelija i sintezu prolaktina, dok istovremeno inhibira sekreciju gonadotropina *in vivo* (Lieberman i sar. 1978, Nedvidkova i sar. 1998). Promotor-specifični mehanizmi delovanja  $17\beta$ -estradiola se odvijaju uz učešće ER (Mangelsdorf i sar. 1995). Imunocitohemije i autoradiografije studije su pokazale prisustvo ER u gonadotropnim, somatotropnim i prolaktinskim ćelijama hipofize (Morel i sar. 1981). Najmanje tri različite izoforme ER je prisutno u hipofizi pacova uključujući ER $\alpha$ , ER $\beta$  i specifičnu formu ER $\alpha$  (*truncated estrogen receptor product-1*; TERP) čija je ekspresija ograničena isključivo na hipofizu (Mitchner i sar. 1998). Povećanje nivoa progesteronskog receptora, koje predstavlja tipičan odgovor na  $17\beta$  estradiol, nije zapaženo kod prolaktinskih ćelija (Gasc i Baulieu 1988, Sprangers i sar. 1990). Za transkripciju prolaktinskog gena u pacova, koji eksprimiraju prolaktinske i somatomatotropne ćelije, je pokazano da je pod multihormonskom kontrolom (Ben-Jonathan i Liu 1992). Regulacija transkripcije prolaktinskog gena  $17\beta$  estradiolom podrazumeva najmanje dva mehanizma (Shull i Gorski 1985). Prvi, indirektni, se odnosi na modulaciju hipotalamičkih faktora. Drugi uključuje brzu i direktnu stimulaciju ekspresije prolaktinskog gena, preko ER pošto prolaktinski gen sadrži sekvencu, za koju se vezuje kompleks hormon-receptor u okviru promotora (ERE), ali i strogo zavisi od prisustva hipofizno-specifičnog faktora Pit-1 (Gourджи i Laverriere 1994). Nolan i Levy (2006) u svojoj studiji ukazuju da estrogeni, egzogenog porekla ili lokalno nastali aromatizacijom aplikovanog testosterona, kod kastriranih pacova znatno povećavaju mitotsku aktivnost ćelija adenohipofize. Childs i sar. (2005) navode da niže koncentracije estrogen značajno povećavaju procenat ćelija koje eksprimiraju GH antigen i GH iRNK, dok više nemaju efekta ili smanjuju iRNK. Estrogeni imaju izvesne

efekte i na ACTH ćelije. Kod ovarijektomisanih ženki pacova, estradiol suprimira ekspresiju POMC gena, smanjuje sadržaj raspoloživog ACTH i snižava nivo odgovora na ponovljeni toplotni stres (Redei i sar. 1994).

*In vivo* rezultati o delovanju sojinih izoflavona na ćelije hipofize kontradiktorni su. Prema nekim autorima genistein nije uticao na GnRH indukovan puls LH oslobađanja (McGarvey i sar. 2001). Nasuprot njima, Hughes i sar. (1991) su pokazali potpunu blokadu GnRH indukovanog LH oslobađanja genisteinom i tvrdili, čak, da je genistein u tom smislu potentniji od estradiola. Aplikacija sojinih izoflavona utiče na sekreciju prolaktina i GH. Genistein indukuje oslobađanje prolaktina i stimuliše rast estrogen-zavisnih malignih ćelija hipofize u kulturi, vezujući se za ER (Stahl i sar. 1998). Kod ovarijektomisanih ovaca, koncentracija prolaktina u plazmi je znatno viša tokom i nakon intracerebroventrikularne infuzije genisteina (Romanowicz i sar. 2004). Korišćenjem tehnika ćelijske kulture, inkorporacije radioaktivnog timidina i elektronske mikroskopije je utvrđeno da genistein inhibira proliferaciju ćelija prednjeg režnja hipofize u pacova (Zhang i sar. 2001). Utvrđeno je da genistein blokira proliferaciju ćelija adenohipofize u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>/M fazama i značajno povećava stopu apoptoze tih ćelija (Zhang i sar. 2001). Predpostavlja se da su i ovi efekti genisteina posledica inhibitornog delovanja na tirozin-kinaze. Genistein pojačava GHRH stimulisano oslobađanje GH kod pacova, i to preko inhibicije Tyr kinaza (Ogiwara i sar. 1997). Ova istraživačka grupa je utvrdila da je tirozin-kinazni put uključen u kontrolu oslobađanja GH i da genistein dovodi do akumulacije cAMP-a. Literaturni podaci o delovanju genisteina na ACTH ćelije adenohipofize nisu brojni. Zna se da su različiti citokini, generisani tokom stresa, uključeni u regulaciju HHA sistema, čime je utvrđen koncept imunoneuroendokrine interakcije (Besedovsky i sar. 1996). Preciznije rečeno, oni su uključeni u regulaciju sekrecije ACTH i može se reći da postoji izvestan stepen sinergizma između citokina i CRH u stimulaciji ekspresije POMC gena (Besedovsky i sar. 1996, Katahira i sar. 1998). Kao moćan inhibitor tirozin-kinaza, genistein narušava signalnu kaskadu i inhibira stimulatorne efekte citokina na ekspresiju POMC gena *in vitro* (Katahira i sar. 1998). Skorašnje toksikološke studije, koje su podrazumevale dugotrajno hranjenje pacova genisteinom, ukazuju na indukciju maligne transformacije ćelija hipofize (Shelby 2008). Predpostavlja se da je vezivanje za estrogenske receptore odgovorno za ovakav rezultat.

Interesantno je da do karcinogeneze dolazi isključivo kod ženki pacova, ali ne i kod mužjaka.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Izoflavoni soje genistein i daidzein se sve više koriste kao dodaci ishrani, pomoćna lekovita sredstva, te kao preventiva i terapija različitih patoloških stanja. Uticaj izoflavona soje na neuroendokrini sistem bio je, a i danas je, predmet istraživanja različitih studija. Veliki broj literaturnih podataka govori o uticaju izoflavona soje na reproduktivni sistem, s obzirom na njihovu estrogensku i anti-estrogensku aktivnost. Ipak, podaci o njihovom uticaju na somatotropni i adrenokortikotropni sistem oskudni su, a neophodni, imajuću u vidu značaj ovih sistema za normalan razvoj i funkcionisanje živih sistema. Takođe mnogobrojne *in vitro* studije obezbeđuju samo limitirane informacije o potencijalnim efektima *in vivo*.

Uzimajući u obzir navedene činjenice definisani su ciljevi ove doktorske disertacije, koji su podrazumevali kvantifikaciju promena:

- telesnih masa, masa i volumena hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom u odnosu na odgovarajuće kontrole,
- stereoloških, histoloških i biohemijskih parametara somatotropnog sistema pacova eksperimentalnih grupa u odnosu na odgovarajuće kontrole, što obuhvata utvrđivanje promena: 1) volumena Arc i Pe jedra hipotalamusa, 2) volumenske gustine SS neurona Pe jedra, 3) intenzitet imunoobojenosti GHRH i SS neurosekreta u ME; 4) volumenske i numeričke gustine GH ćelija hipofize, 5) apsolutnog broja GH ćelija, 6) volumena GH ćelija i 7) koncentracije GH u cirkulaciji eksperimentalnih grupa u odnosu na odgovarajuće kontrole,
- stereoloških, histoloških i biohemijskih parametara adrenokortikotropnog sistema pacova eksperimentalnih grupa u odnosu na odgovarajuće kontrole, što obuhvata utvrđivanje promena: 1) volumena PVN jedra hipotalamusa, 2) volumenske gustine CRH i aktiviranih CRH neurona PVN jedra, 3) intenzitet imunoobojenosti CRH neurosekreta u ME, 4) volumenske i numeričke gustine ACTH ćelija hipofize, 5) apsolutnog broja, 6) volumena ACTH ćelija i 7) koncentracije ACTH u cirkulaciji ispitivanih eksperimentalnih grupa u odnosu na odgovarajuće kontrole.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Laboratorijsko održavanje životinja

Korišćenje životinja i eksperimentalni protokol za izradu ove doktorske disertacije odobrio je Etički komitet Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” (IBISS) u Beogradu. Postupanje sa eksperimentalnim životinjama bilo je u skladu sa regulativom objavljenom u “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS no. 123 Appendix A)”. Tokom studije korišćeni su mužjaci pacova Wistar soja, starosti 3 meseca, prosečne telesne mase 300-400g (posle završenog tretmana). Pacovi su gajeni u vivarijumu IBISS-a, a uslovi su ispunjavali standardne zahteve: po dve životinje su bile u plastičnim kavezima sa prostirkama od sterilne strugotine u uslovima konstantne temperature prostorije ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) i na svetlostom režimu 12h dan / 12h noć, i imale su slobodan pristup vodi i hrani. Sastav hrane je bio sledeci:

Tabela 1. Sastav hrane bez prisustva soje koju su konzumirali mužjaci pacova		
Sastojci hrane		g/100g hrane
Proteini	Kazein <sup>1</sup>	20.3
Ugljeni hidrati	Kukuruzno brašno <sup>2</sup>	45
	Saharoza <sup>2</sup>	20
Masti	Kukuruzno ulje <sup>2</sup>	5.2
Celuloza, mikrokristalna <sup>1</sup>		3.7
Vitaminsko/Mineralni premiks <sup>2</sup>		1.5
di-Ca-fosfat ( $\text{CaHPO}_4$ ) <sup>2</sup>		3.3
Kreda ( $\text{CaCO}_2$ ) <sup>2</sup>		1
So ( $\text{NaCl}$ , jodirana sa 38mg KJ/kg) <sup>2</sup>		0.5

Nabavljeno od: <sup>1</sup>Alfa Aesar, Johnson Matthey GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Germany; <sup>2</sup>PKB INSHRA, Beograd, Srbija.

Uzevši u obzir da su dve grupe životinja bile tretirane izoflavonima soje, genisteinom i daidzeinom, kojim u glikozilovanom obliku, obiluju soja i leguminoze, laboratorijska hrana nije sadržala komponente iz soje, a ni sastojke leguminoza, kako bi se izbeglo eventualno prisustvo genisteina i daidzeina u njoj. Receptura za pripremu laboratorijske hrane, koja kao jedini izvor proteina sadrži kazein, preuzeta je od Picherit i sar. (2000).

### 3.2. Eksperimentalni protokol i tretmani

Svi operativni zahvati na životinjama izvođeni su u ketaminskoj anesteziji (15mg/kg t.m. ketamin hidrohlorid, Richter pharma, Wels, Austria). Eksperimentalni protokol podrazumevao je orhidektomiju ili lažnu (sham) operaciju, dvonedeljni oporavak, naknadno formiranje sedam eksperimentalnih grupa sa po šest životinja, i odgovarajuće tretmane.

Eksperimentalne grupe:

- \* **Sham1** grupu su sačinjavale lažno (sham) operisane životinje subkutano (s.c.) tretirane odgovarajućom zapreminom sterilnog maslinovog ulja, medijumom estradiol-dipropionata (medijum I);
- \* **Orx1** grupu su sačinjavale orhidektomisane (orx) životinje s.c tretirane odgovarajućom zapreminom medijuma I;
- \* **Orx1+E** grupu su činile orhidektomisane životinje s.c. tretirane estradiol-dipropionatom (E) u medijumu I ( 0,6 mg/kg t. m. E; ICN Galenika, Beograd, Srbija);
- \* **Sham2** grupu su sačinjavale lažno operisane životinje s.c tretirane odgovarajućom zapreminom mešavine alkohola i sterilnog maslinovog ulja, medijumom genisteina i daidzeina (u odnosu 1:2; medijum II);
- \* **Orx2** grupu su sačinjavale orhidektomisane životinje s.c tretirane odgovarajućom zapreminom medijuma II;
- \* **Orx2+G** grupu su sačinjavale orhidektomisane životinje s.c tretirane rastvorenim genisteinom (G) (30 mg/kg t. m. G; Nutraceutica, Monterenzio, Italy);
- \* **Orx2+D** grupu su sačinjavale orhidektomisane životinje s.c tretirane rastvorenim daidzeinom (30 mg/kg t. m. D; Nutraceutica, Monterenzio, Italy);

Sve grupe životinja su dobijale tretman svakog dana (osim nedelje), tokom tri nedelje.

### 3.3. Uzimanje i priprema tkiva za analizu

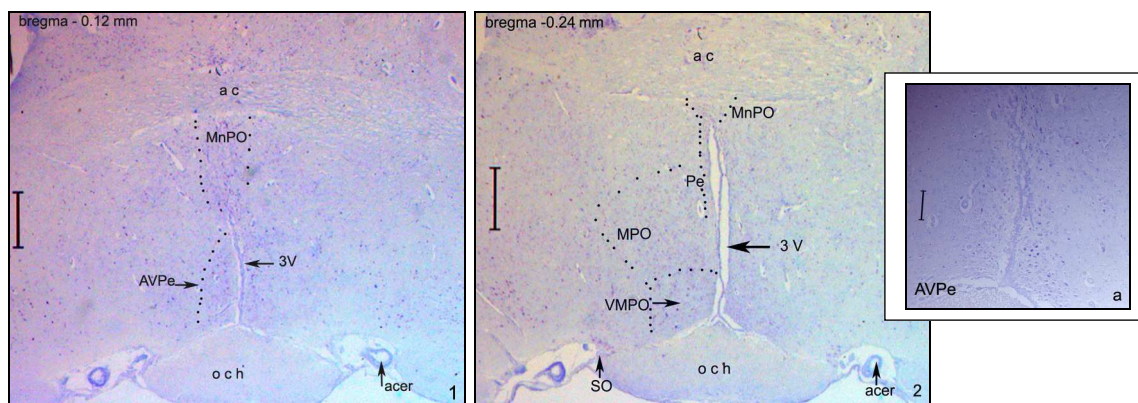
Dvadeset četiri časa nakon poslednjeg tretmana životinje su žrtvovane dekapitacijom. Nakon žrtvovanja izolovani su hipotalamus i hipofiza, fiksirani u Bouin-ovom fiksativu, dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola, prosvetljeni u ksilolu i ukalupljeni u parafinu (Histowax; Histolab Product AB, Göteborg, Sweden). Hipotalamusi i hipofize su serijski sečeni na rotacionom mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Weltzar, Germany) na preseke debljine 5  $\mu\text{m}$  (hipotalamus) i 3  $\mu\text{m}$  (hipofiza) i montirani na mikroskopskim pločicama. Preseci su posle sušenja pripremljeni za histološka i imunohistohemijska bojenja.

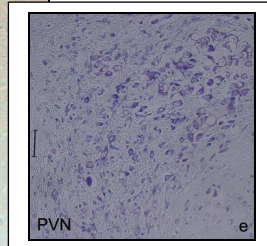
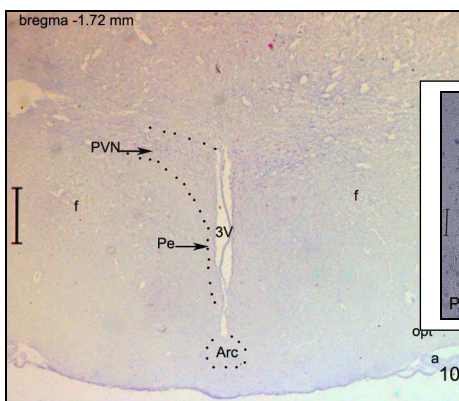
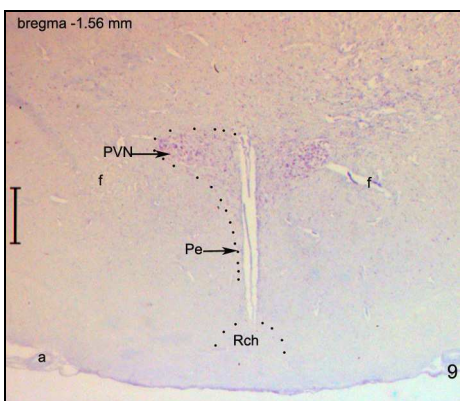
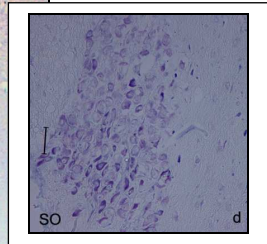
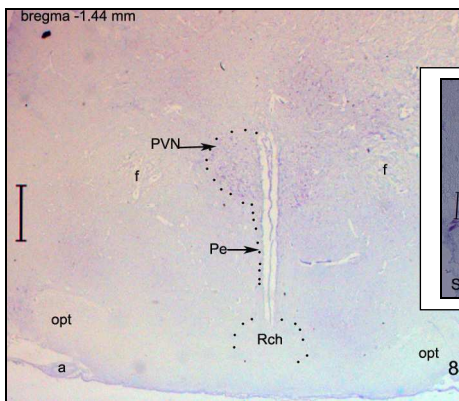
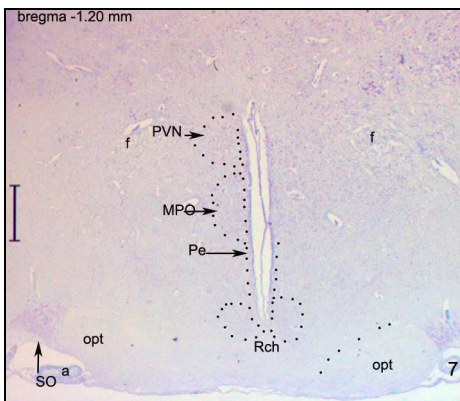
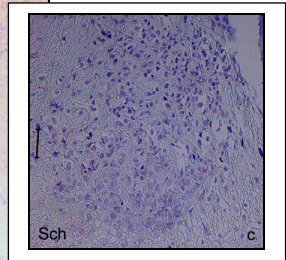
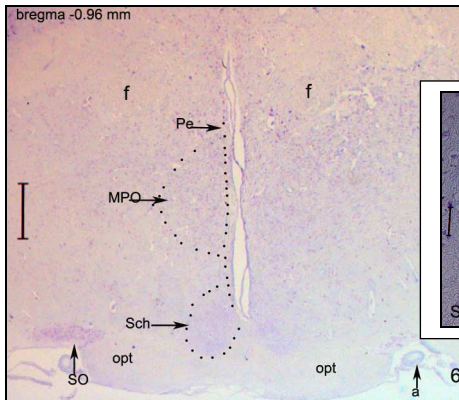
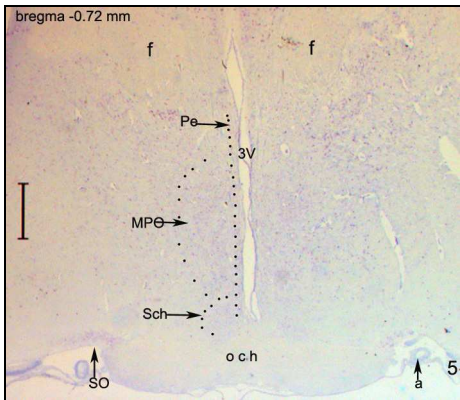
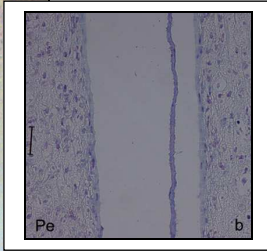
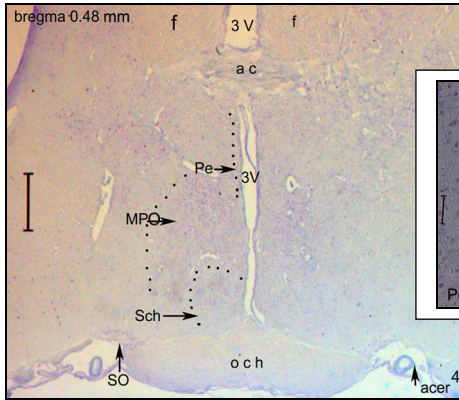
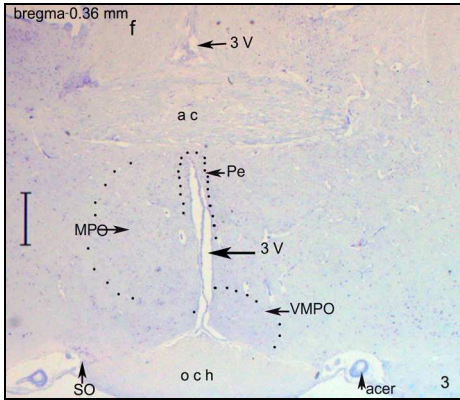
#### 3.3.1. Histološko bojenje hipotalamusa

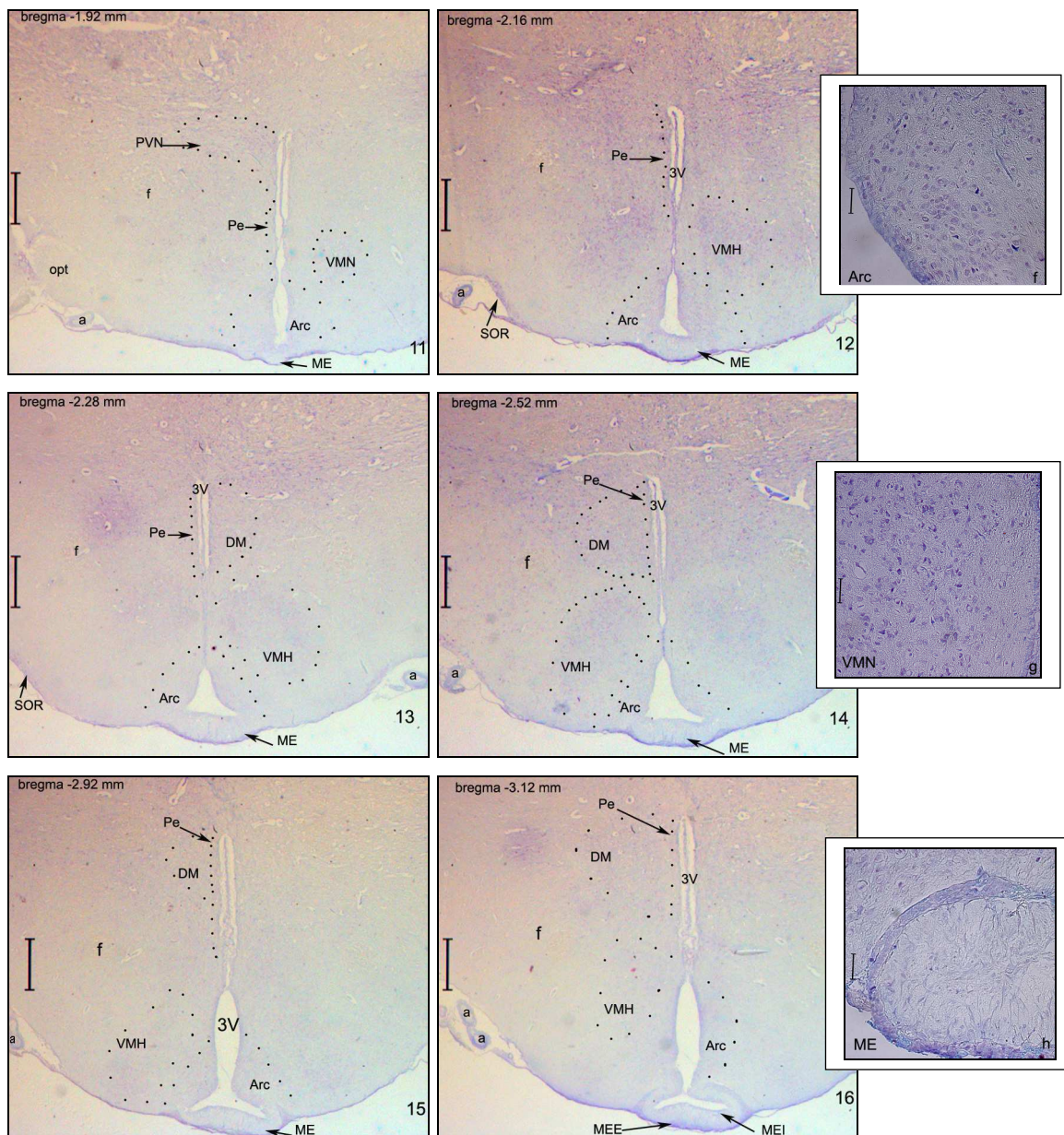
Za histološko bojenje hipotalamusa korišćena je boja krezil-ljubičasto (krezyl-violet). Ovo bojenje se koristi za identifikaciju osnovnih neuronskih struktura u mozgu. Boja krezil-ljubičasto detektuje Nislovu supstancu u citoplazmi neurosekretornih ćelija, i pri tome je boji ljubičasto-plavo. Za neurosekretorne ćelije je karakteristično, da se osnovna masa bazofilnih granula (Nislova supstanca) nalazi u perifernom delu citoplazme, i da je visoka bazofilija uslovljena velikom količinom RNA.

Procedura bojenja obuhvata deparafinizaciju u ksilolu, potom rehidrataciju u seriji alkohola, inkubaciju u 0,1% rastvoru krezil ljubičaste boje 15 min, potom ispranje u destilovanoj vodi, dehidrataciju u seriji alkohola rastuće koncentracije i montiranje DPX-om (Fluka, Buchs, Switzerland).

#### 3.3.2. Lokalizacija jedara hipotalamusa







**Slika 3.1.** Lokalizacija jedara (1-16) i pojedina jedra (a-h) hipotalamusa na frontalnim krezil-ljubičasto obojenim presecima (ac-prednja komisura, 3V-treća moždana komora; och-optička hijazma, acer-krvni sud, f-forniks, AVPe-anteroventrikularno periventrikularno jedro MnPO-median preoptičko jedro, VMPO ventro medijalno preoptičko jedro, MPO medijalno preoptičko jedro, Sch-suprahijazmatično jedro, SO-supraoptičko jedro, PVN-paraventrikularno jedro, Arc-arkuatno jedro, VMN-ventromedijalno jedro, opt-optički trakt, DM-dorzomedijalno jedro, SOR-supraoptičko retrohijazmatično jedro, ME-eminencija medijana, MEE- eksterna, MEI-interna; slika 1-16, bar-400 $\mu$ m; slika a-h, bar-50 $\mu$ m).

Jedra hipotalamusa su lokalizovana na frontalnim presecima hipotalamusa pomoću atlasa pacovskog mozga (Paxinos 2004) Lokalizacija moždanih struktura,

jedara hipotalamusa, vršena je u odnosu na bregmu (mesto spajanje čeone i parijetalne kosti).

### **3.3.3. Imunohistohemijsko obeležavanje oslobađajućih hormona hipotalamusa**

Imunohistohemijsko bojenje je proces lokalizacije proteina u ćeliji na preparatima tkiva, koje se zasniva na principima reakcije antitelo-antigen. Vizuelizacija ove interakcije antitelo-antigen se može realizovati na više različitih načina. U ovoj studiji je korišćeno imunoperoksidazno (PAP) bojenje, gde je primarno antitelo neobeleženo, a sekundarno je konjugovano sa peroksidazom rena, koja može da pokrene bojenu reakciju. Kao hromogen za ovakav tip reakcije je korišćen 3,3'-diaminobenzidine tetrahidrohlorid (DAB), koji nakon razlaganja enzimom peroksidaze rena razvija specifičnu braon boju. Takođe, rađeno je imunofluorescentno bojenje, gde se na primarno neobeleženo antitelo veže sekundarno antitelo konjugovano sa fluorescentnom bojom.

Za bolju detekciju antigena, pre postupka imunohistohemije, korišćena je tehnika demaskiranja antigena (antigen retrieval), koja ima za cilj bolje otkrivanje antigena, jer u toku fiksacije tkiva dolazi do formiranja kovalentnih veza između aldehida iz fiksativa i antigena. Ovaj postupak je jednostavan i zahteva tretiranje preparata 0.05M citratnim puferom (pH 6) u mikrotalasnoj pećnici na 700W, dva puta po deset minuta.

#### **3.3.3.1. Imunohistohemijsko obeležavanje oslobađajućih hormona hipotalamusa u periventrikularnom i paraventrikularnom jedru i eminenciji medijani**

Za imunohistohemijsko obeležavanje somatostatina (SS) i oslobađajućeg hormona hormona rasta (GHRH) hipotalamusa korišćena je metoda peroksidaze-antiperoksidaze (PAP; Sternberger i sar. 1970). Čitav postupak se odvija na sobnoj temperaturi, osim inkubacije u primarnim antitelima koja se odvija na 4°C. Nakon deparafinizacije i rehidratacije preparata blokirana je aktivnost endogene peroksidaze inkubacijom preseka u 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u metanolu tokom 15 minuta. Nakon ispiranja u 0.01M fosfatnom puferu (Phosphate Buffer Saline PBS; pH 7.6; 2x5 min.), redukcija nespecifičnog bojenja postignuta je inkubacijom preseka u normalnom serumu svinje (Normal swine serum, Dako Dakopatts, Denmark; razblaženja 1:10 u 0,2% Tritonu x-100 (SIGMA Steinheim, Germany) u PBS), 1 čas. Potom su se nanosila primarna

poliklonska antitela, anti-GHRH (Rabbit anti-GHRH, Abcam, razblaženja 1:500 u 2% Tritonu x-100 u PBS), odnosno anti-SS (Rabbit anti-SS, Abd serotec, razblaženja 1:500 u 2% Tritonu x-100 u PBS). Inkubacija u anti-GHRH antitelu bila je 48 sati, a u anti-SS antitelu 72 sata na 4°C. Po ispiranju u PBS-u (2x5 min) preseci su inkubirani 1 čas u sekundarnom konjugovanom antitelu (Policlonal swine anti rabbit IgG (HRP), Dako Dakopatts, Denmark; razblaženje 1:200 u PBS). Nakon ispiranja u PBS-u, vizualizacija je omogućena primenom DAB-a (Liquid DAB substrate chromogen system, Dako, Dakopatts, Denmark). Kontrastiranje je obavljeno Mayer-ovim hematoksilinom (Merck-Alkaloid, Alkaloid, Skoplje BJR Makedonija), dehidratacija rastućom serijom etanola, a montiranje DPX-om.

### **3.3.3.2. Imunofluorescentno obeležavanje oslobađajućih hormona paraventricularnog jedra i eminencije medijane**

a) Duplo imunofluorescentno obeležavanje kortikotropin oslobađajućih neurona paraventricularnog jedra

Aktivnost kortikotropin oslobađajućih (CRH) neurona paraventricularnog jedra (PVN) hipotalamusa određena je duplim imunofluorescentnim bojenjem. Čitav postupak se odvija na sobnoj temperaturi, osim inkubacije u primarnom antitelu koja se odvija na +4°C. Nakon deparafinizacije, rehidratacije, ispiranja u 0.01M fosfatnom puferu (Phosphate Buffer Saline PBS; pH 7.6; 10 min), pristupilo se demaskiranju antigena (2 x 10 min inkubiranja u 0.05M citratnim puferom (pH 6) u mikrotalasnoj pećnici na 700W; sa hlađenjem između 2 inkubiranja). Preseci su ispirani u PBS-u (3x10 min) i inkubirani u normalnom serumu magarca (normal donkey serum, Sigma; razblaženje 1:10 u 0,2 % Tritonu x-100 u PBS) 30 minuta sa ciljem blokiranja nespecifičnog bojenja. Preseci se potom nisu ispirali, već su se nanosila primarna antitela; poliklonska anti-cFos (goat anti-cFos polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology; razblaženje 1:50 u 2 % Tritonu x-100 u PBS) koja su stajala preko noći na +4°C. Sledećeg dana višak antitela je ispran u PBS-u (3x10 min) i na preseke je nanošeno sekundarno antitelo, koje je obeleženo fluorescentnom bojom; konjugovana anti-kozja (donkey anti-goat Alexa fluor 555 IgG, Invitrogen; razblaženje 1:200 u PBS-u) u trajanju od 2 sata. Zatim su preseci ispirani u PBS-u (3x10 min) i inkubirani u normalnom serumu magarca (normal donkey serum, Sigma; razblaženje 1:10 u 0,2 %

Tritonu x-100 u PBS). Nakon toga je usledila inkubacija u primarnim poliklonskim antitelima; anti-CRH (rabbit anti-CRH, Abcam; razblaženja 1:500 u 0,2 % Tritonu x-100 u PBS) preko noći na +4°C. Nakon ispiranja u PBS-u (5x5 min), odgovarajuće sekundarno antitelo je naneto na preseke; konjugovano anti-zec (donkey anti-rabbit, Alexa fluor 488 IgG, Invitrogen; razblaženje 1:200 u PBS-u). Montiranje preseka moviolom (Calbiochem) izvršeno je posle ispiranja u PBS-u. Fluorescentna boja Alexa fluor 555 se pobuđuje na 550 nm, emituje signal na 570 nm u crvenom delu spektra a vidljiva je pod zelenim filterom, dok boja Alexa fluor 488 se pobuđuje na 492 nm i uočava se na 510 nm u zelenom delu spektra.

Procedura duplog imunofluorescentnog bojenja podrazumevala je odsustvo reakcije između sekundarnih antitela, tj. u odvojenim eksperimentima konstatovano je da između sekundarnih antitela nema reakcije.

Preparati su analizirani i fotografisani korišćenjem Zeiss Axiovert fluorescentnog mikroskopa opremljenim kamerom i EC Plan-Apochromat-om.

#### b) Imunofluorescentno obeležavanje somatostatina u eminenciji medijani

Nakon deparafinizacije, rehidratacije, ispiranja u 0.01M PBS (10 min) preseci su inkubirani u normalnom serumu magarca (normal donkey serum, Sigma; razblaženje 1:10 u 0,2 % Tritonu x-100 u PBS). Potom su se nanosila primarna antitela anti-SS, (Abd serotec, razblaženja 1:500 u 0,2 % Tritonu x-100 u PBS). Inkubacija u anti-SS antitelu trajala je 72 sata na 4°C. Po ispiranju u PBS-u (2x5 min) preseci su inkubirani 2 čas u sekundarnom antitelu, koje je obeleženo fluorescentnom bojom konjugovanom anti-zec sekundarnom antitelu (donkey anti-rabbit, Alexa fluor 488 IgG, Invitrogen; razblaženje 1:200 u PBS-u). Montiranje preseka moviolom (Calbiochem) izvršeno je posle ispiranja u PBS-u (5x5min). Fluorescentna boja Alexa fluor 488 se pobuđuje na 492 nm i uočava se na 510 nm u zelenom delu spektra. Preparati su analizirani i fotografisani na fluorescentnom mikroskopu Zeiss opremljenim kamerom i EC Plan-Apochromat.

### **3.3.4. Imunohistohemijsko obeležavanje ćelija hipofize**

Za imunohistohemijsko obeležavanje ACTH i GH ćelija hipofize korišćena je metoda peroksidaze–antiperoksidaze (PAP; Sternberger i sar. 1970). Nakon deparafinizacije i rehidratacije preparata prvo je blokirana aktivnost endogene



peroksidaze inkubacijom preseka u 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u metanolu, tokom 15 minuta. Redukcija nespecifičnog bojenja postignuta je inkubacijom preseka u normalnom serumu svinje (Normal swine serum, Dako Dakopatts, Denmark; razblaženje 1:10 u PBS), tokom 1 časa. Ovako pripremljeni preseci se ostavljaju preko noći na 4°C u primarnom antitelu. Primarna antitela korišćena u ovoj studiji su poliklonska anti-ACTH ili anti-GH (anti-human ACTH, Dako Dakopatts, Denmark; koncentrovano; rabbit anti-human growth hormone (hGH) (Milošević i sar. 1998), razblaženja 1:200 u PBS). Po ispiranju u PBS-u (3x5 min.) preseci su inkubirani 1 čas u sekundarnom konjugovanom antitelu (Policlonal swine anti rabbit IgG (HRP)), Dako Dakopatts, Denmark; razblaženja 1:200 u PBS). Posle ispiranja u PBS-u vizualizacija je omogućena primenom DAB-a (Dako). Kontrastiranje je obavljeno Mayer-ovim hematoksilinom (Merck-Alkaloid, Alkaloid, Skoplje BJR Makedonija), dehidratacija rastućom serijom etanola, a montiranje DPX-om.

Specifičnost svih antitela je potvrđena izostankom primarnog antitela tokom imunocitohemijske procedure, što je rezultiralo potpunim gubitkom imunoreakcije.

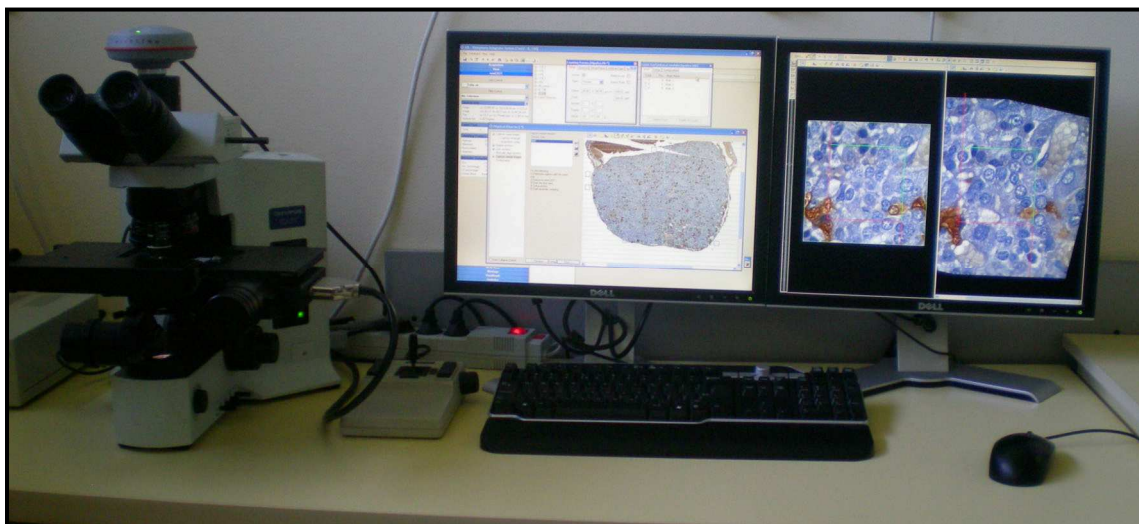
### **3.4. Stereološka merenja**

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

Stereološka analiza je rađena uz pomoć newCAST stereološkog softverskog paketa (VIS – Visiopharm Integrator System, version 2.12.1.0; Visiopharm; Denmark). Mikroskop (Olympus BX-51) je opremljen sa motorizovanim stočićem (Prior) sa preciznošću pomeranja po x-y osi od 1 μm. Pomeranje stočića po z osi kontrolisano je mikrokatorom (Heidenhain MT1201) sa preciznošću od 0.2 μm. Za mikroskop je vezana CCD video kamera (PixeLink). Pri analizi korišćeni su planahromatski objektivni visoke numeričke aperture, uvećanja 4x, 20x i 100x. NewCast stereološki sistem je generisao interaktivnu stereološku mrežicu i stereološki disektorski ram.

Kako bi bila određena stvarna debljina preseka (3,0 μm, odnosno 5,0 μm) korišćen je metod napredovanja bloka (block advance method-BA) (Dorph-Petersen i sar. 2001). Ovaj metod se sastoji u sledećem: parafinski blok tkiva se sekče na

mikrotomu pri čemu dolazi do smanjenja visine parafinskog bloka. Kako bi utvrdili prosečnu debljinu preseka treba iseći veliki broj preseka parafinskog bloka i izmeriti promene u visini bloka. Izmerena promena visine se deli sa brojem preseka i izračunava se stvarna debljina pojedinačnog preseka. Koristeći BA metod ustanovljeno je da je stvarna deblina preseka ne odstupa od nominalne debljine, one koja je naznačena na mikrotomu (3,0  $\mu\text{m}$ , odnosno 5,0  $\mu\text{m}$ ).



**Slika 3.2.** Mikroskop (Olympus BX-51) sa newCAST stereološkim softverskim paketom.

### **3.4.1. Stereološka merenja struktura hipotalamusa**

#### **3.4.1.1. Volumen jedara hipotalamusa**

Kako bi smo odredili volumen Pe i Arc jedra, kao i PVN bilo je neophodno lokalizovati pomenute strukture hipotalamusa (slika 3.1).

Prvi krezil-ljubičasto obojen presek uključen u analizu volumena Pe jedra bio je presek sa jasno uočljivim strukturama: trećom moždanom komorom i anteroventrikularno-periventrikularnim jedrom (AVPe; bregma  $-0.12$  mm; slika 3.1). Rastojanje između dva susedna analizirana preseka bilo je 75  $\mu\text{m}$ . Poslednji deo Pe jedra uključen u analizu bio je deo u kome infundibularna drška počinje da se odvaja od hipotalamusa (bregma  $-3.12$  mm; slika 3.1). Srednja vrednost ukupnog broja analiziranih preseka Pe jedra bila je 23, i na svakom preseku analizirano je 50% tkiva.

Arc jedro se pojavljuje kaudalno, u retrohijazmatičnoj oblasti, kao skup neurona duž srednje linije (bregma  $-1.72$  mm; slika 3.1). Rastojanje između dva susedna

analizirana preseka iznosilo je 50  $\mu\text{m}$ . Poslednji deo Arc jedra uključen u analizu bio je deo u kome infundibularna drška počinje da se odvajaju od hipotalamusa (bregma  $-3.12$  mm; slika 3.1), odnosno presek koji označava i kraj analize volumena Pe jedra. Srednja vrednost ukupnog broja analiziranih preseka Arc jedra bila je 20, a na svakom preseku analizirano je 50% tkiva.

Treća moždana komora i forniks su moždane strukture između kojih je lokalizovano PVN. Prvi krezil-ljubičasto obojen presek uključen u analizu volumena PVN bio je presek sa uočljivim skupom neurona, rostralno sa strana treće moždane komore (bregma  $-1.20$  mm; slika 3.1), tj. na mestu u kome suprahijazmatično jedro više nije vidljivo. Rastojanje između dva susedna analizirana preseka bilo je  $50\mu\text{m}$ . Poslednji presek uključen u analizu je presek udaljen od bregme  $-2.16$  mm. Srednja vrednost ukupnog broja analiziranih preseka PVN bila je 18, a na svakom preseku analizirano je 50% tkiva.

Volumen jedara hipotalamusa određen je pomoću Kavalijerijevog principa (Gundersen 1986; Gundersen i Jensen 1987). Analiziran je svaki deseti presek Arc jedra i PVN, kao i svaki petnaesti presek Pe jedra. Na monitoru pri konačnom uveličanju 150x (uveličanje objektiva 4x) definisano je tkivo od interesa tj. jedro hipotalamusa koje je predmet analize i na njega je postavljena ineraktivna stereološka mrežica (mrežica  $5 \times 6$  tačaka; jedna tačka zauzima površinu od  $14913,04 \mu\text{m}^2$ ). Dalje se pristupilo brojanju pogodaka koji padaju unutar tkiva od interesa na konačnom uveličanju 750x (uveličanje objektiva 20x). Volumen jedara hipotalamusa izračunat je po formuli:

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

gde je  $a(p)$  površina koja pripada svakoj tački uzorkovanja tj. jednom pogotku koji pada na analiziranu fazu ( $14913,04 \mu\text{m}^2$ ), BA srednja vrednost između dva uzastopno analizirana preseka ( $50 \mu\text{m}$ , odnosno  $75 \mu\text{m}$ ) koja se izračunava množenjem stvarne debljine preseka i njihovog broja (preseka) i  $\sum P_i$  suma pogodaka koji padaju na fazu ispitivanog jedra hipotalamusa.

#### **3.4.1.2. Volumenska gustina somatostatinskih neurona periventrikularnog jedra hipotalamusa**

Prvi presek Pe jedra uključen u analizu procentualne zastupljenosti SS neurona ovog jedra bio je presek sa jasno vidljivim Sch jedrom, dok je poslednji presek bio presek sa jasno uočljivim PVN, s obzirom da je pomenuti region Pe bio SS imunopozitivan. Na presecima je definisana površina od interesa odnosno Pe jedro. Stereološki sistem je generisao interaktivnu stereološku mrežicu i pristupilo se brojanju pogodaka koji padaju na imunohistohemijski obeležene SS neurone i na ostatak u okviru definisanog tkiva od interesa. Deljenjem ove dve vrednosti i njihovim množenjem sa 100 dobijana je procentualna zastupljenost imunofluorescentno obeleženih neurona tj. njihova volumenska gustinu.

#### **3.4.1.3. Volumenska gustina imunofluorescentno obeleženih neurona hipotalamusa**

Volumenska gustina CRH obeleženih neurona PVN kao i cFos-obeleženih CRH neurona određena je u ovoj studiji. Imunofluorescentno obeleženi preseki hipotalamusa su fotografisani kamerom Zeiss fluorescentnog mikroskopa i mikrografije su importovane u Vis program. Korišene su fotomikrografije različitih nivoa analiziranog jedra. Analiza PVN jedra obuhvatila je analizu mikrografija sa tri nivoa jedra. Mikrografijama su predstavljeni isti nivoi jedra hipotalamusa različitih životinja. Zatim je na importovanim mikrografijama definisana površina od interesa tj. jedro. Stereološki sistem je generisao interaktivnu stereološku mrežicu i pristupilo se brojanju pogodaka koji padaju na fluorescentno obeležene (CRH, zeleno) ili duplofluorescentno obeležene (CRH-cFos, oker) neurone kao i na pogotke koji padaju na neobeleženo tkivo u okviru definisanog jedra. Deljenjem ove dve vrednosti i njihovim množenjem sa 100 dobijen je procenat imunofluorescentno obeleženih neurona tj. njihova volumenska gustinu.

#### **3.4.1.4. Analiza fluorescentno obeleženih oslobađajućih hormona u eminenciji medijani**

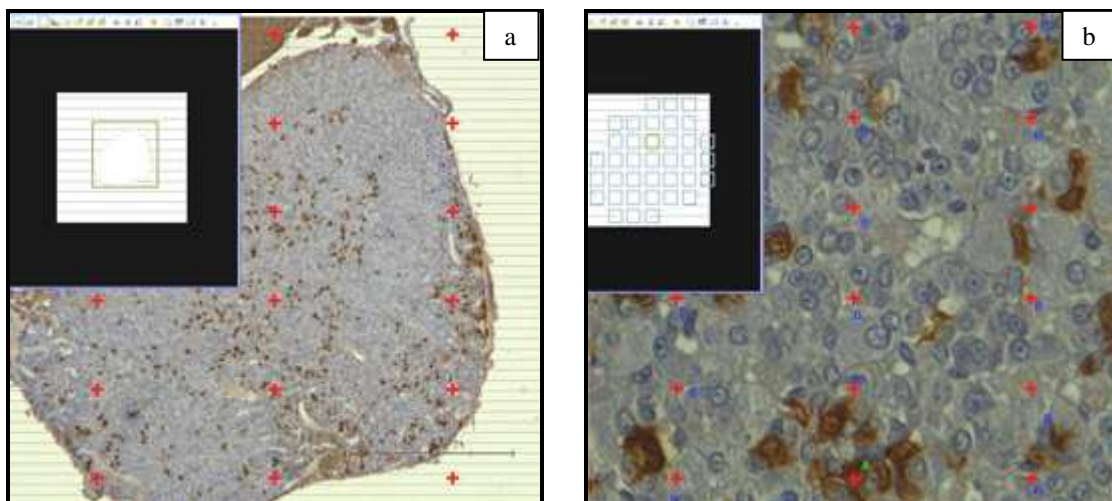
Prisustvo imunopozitivnog signala u ME je u korelaciji sa količinom neurosekreta koji se oslobađa iz aksonskih završetaka neurona čija su neuronska tela pozicionirana u analiziranim jedrima hipotalamusa. Na osnovu kvalitativne histološke analize serijskih preseka (intenzitet obojenosti neurosekreta i imunopozitivna površina

ME) procenjivana je količina oslobođenog neurosekreta u hipotalamo-hipofizno kapilarnom spletu.

### 3.4.2. Stereološka merenja hipofize

#### 3.4.2.1. Volumen hipofize

Volumen hipofize određen je primenom Kavalijerijevog principa (Gundersen 1986; Gundersen i Jensen 1987). Analiziran je svaki dvadeseti imunohistohemijski obojen presek hipofize. Presek od kog će otpočeti analiza, izabran je pomoću tablice nasumičnih brojeva. Na monitoru, konačnog uveličanja 150x (uveličanje objektivna 4x) definisan je okvir tkiva od interesa-površina analiziranog tkiva u okviru hipofize (slika 3.3). Stereološki sistem je generisao interaktivnu stereološku mrežicu i pristupilo se brojanju pogodaka koji padaju unutar okvira analiziranog tkiva pri uveličanju 750x (uveličanje objektivna 20x) (slika 3.3).



**Slika 3.3.** a) Definisano tkivo od interesa hipofize; b) Interaktivna stereološka mrežica.

Površina jednog pogodaka koji pada na analiziranu fazu bila je  $26,7363864 \mu\text{m}^2$  (a(p)), BA  $60\mu\text{m}$ . Volumen hipofize izračunat je po formuli:

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

### 3.4.2.2. Volumenska gustina ACTH i GH ćelija

Ukupni volumen ACTH, odnosno GH ćelija određen je brojanjem pogodaka na imunohistohemijski obeležene ACTH ili GH ćelije. Ukupan volumen ACTH, odnosno GH ćelija podeljen sa volumenom hipofize i pomnožen sa 100 predstavlja volumensku gustinu ACTH odnosno GH ćelija.

### 3.4.2.3. Apsolutni broj ACTH i GH ćelija

Broj ACTH i GH ćelija određen je kombinacijom frakcionatora i fizičkog disektora (Miller i sar. 1997, 1999; Manojlović i sar. 2010), analiziranjem svakog dvadesetog (ACTH ćelije), odnosno četrdesetog preseka (GH ćelije) hipofize. U okviru frakcionatora tkivo je uzorkovano na sistematski uniforman način na dva nivoa, pri čemu je početak uzorkovanja bio nasumičan (Gundersen i Jensen 1987; Wreford 1995; Miller i sar. 1997; 1999). U prvom nivou uzorkovanja analiziran je svaki 20-ti i 21-ti (ACTH ćelije), odnosno 40-ti i 41-ti (GH ćelije) presek, budući da GH ćelija brojnije u odnosu na ACTH ćelije. Preseci analizirani za dobijanje broja ACTH odnosno GH ćelija su isti kao i preseci korišćeni pri određivanju volumena hipofize. Prvi presek u serijskom nizu parafinskih preseka bio je određen korišćenjem tablice nasumičnih brojeva. Preseci koji su određeni kao disektorski par su prvo skenirani uz pomoć BX-51 mikroskopa i motorizovanog stočića. Jedan od preseka iz para imenovan je kao referentni a drugi kao kontrolni ("look up") presek. Potom je brojanje obavljeno u suprotnom pravcu, tj. kontrolni presek postaje referentni i obrnuto. Na ovaj način duplirana je prva frakcija uzorkovanja sa 1/20, odnosno 1/40 na 1/10, odnosno 1/20 ( $1(f_1) = 1/10=0.1; 1/20=0.05$ ).

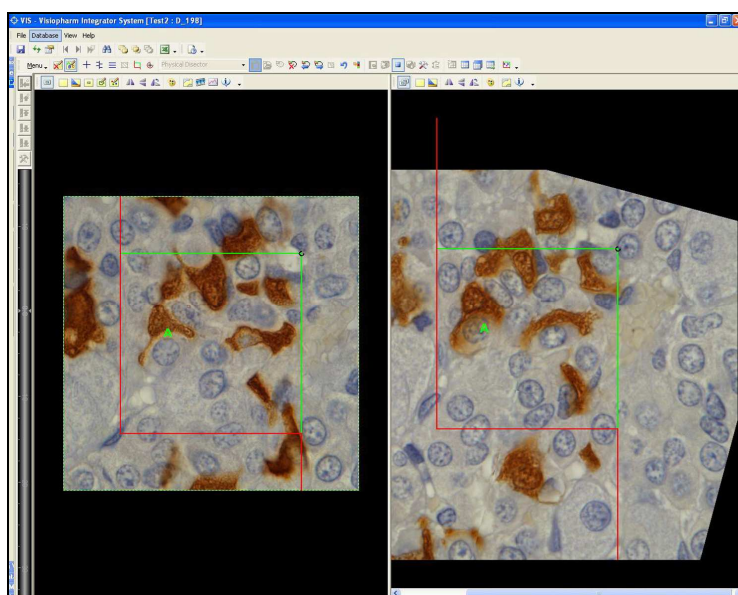
Za izračunavanje broja ACTH/GH ćelija korišćena su dva odvojena nepristrasna rama ("unbiased stereological frame" Mayers i sar. 2004). Cilj dizajna je da po hipofizi jedne životinje bude izbrojano 100 – 200 ACTH/GH ćelija. Dimenzije nepristrasnog rama za brojanje ćelija ACTH/GH bili su 35 x 35  $\mu\text{m}$  (1225  $\mu\text{m}^2$ ). Nakon definisanja dimenzija ramova, opcijom "meander sampling" nasumično je uzorkovano 1% tkiva hipofize (pod kontrolom newCAST softvera). Dakle druga uzorkovana frakcija za ćelije hipofize bila je 0.01 ( $f_2=0.01$ ).

Brojanje ACTH/GH ćelija obavljeno je uz pomoć uljanog objektivu uvećanja 100x visoke numeričke aperture, pri čemu je konačno uvećanje na monitoru iznosilo

3750x. Poređenje referentnog i kontrolnog preseka je omogućeno opcijom newCAST softvera. Prvo je izabrana pozicija na referentnom preseku, a zatim računar pomera motorizovani stočić do iste pozicije na kontrolnom preseku. Računar na kontrolnom preseku skenira široko polje od 4 mikrografije. Njihovim spajanjem, lako se nalazi vidno polje koje odgovara onom na referentnom preseku. Referentna partikula u brojanju ćelija je jedro ćelije. Metod fizičkog disektora podrazumeva brojanje referentnih partikula primenom pravila brojanja. Broje se ćelije koje se nalazi unutar nepristrasnog rama za brojanje tj. ne seku zabranjene, crvene linije nepristrasnog rama, i kod kojih je referentna partikula tj. jedro ćelije prisutno na kontrolnom a nije prisutno na referentnom preseku (Gundersen 1986).

Dobijeni broj ( $Q^-$ ) ćelija pomnožen je sa recipročnim vrednostima frakcija uzorkovanja i na taj način je određen apsolutni broj ACTH/GH ćelija po hipofizi.

$$Q^- (\text{ćelija}) \cdot (1/f1) \cdot (1/f2) = Q^- \cdot 1/0.1 \cdot 1/0.01$$



**Slika 3.4.** Referentni presek i kontrolni “look up” presek, na kojima se jasno uočavaju nepristrasni stereološki ramovi za brojanje ACTH/GH ćelija.

#### 3.4.2.4. Volumen ACTH i GH ćelija

Volumen pojedinačnih ćelija određen je deljenjem totalnog volumena ACTH/GH ćelija sa njihovim brojem (de Lima et al. 2007).

### **3.5. Biohemijske analize**

#### **3.5.1. Priprema krvne plazme i seruma**

Određivanje koncentracije ACTH vršeno je iz krvne plazme pacova. U ohlađene epruvete sa EDTA (koji je imao funkciju antikoagulacionog sredstva; 1mg/ml) sakupljani su pojedinačni uzorci krvi. Odvajanje ćelijskih elemenata od plazme vršeno je centrifugiranjem u hladnoj centrifugi (Tehtnica, Železniki, LC-321, Slovenija) na 3000 obrtaja u trajanju od 5 minuta. Nakon toga izdvojena plazma je odvajana u mikro epruvete i zamrzavana na  $-70^{\circ}\text{C}$  (deepfreeze, Revco, USA).

Određivanje koncentracija GH vršeno je iz krvnog seruma pacova, koji je prikupljan uvek u isto vreme. U staklenim epruvetama prikupljani su pojedinačni uzorci krvi, koji su ostavljani na sobnoj temperaturi. Nakon koagulacije izdvojeni serum je centrifugiran na 3000 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Precišćeni serum je izdvajan u mikro epruvete i čuvan na  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.5.2. Određivanje koncentracije GH**

Koncentracija GH je određivana pomoću "sendvič" ELISA testa (Rat/Mouse Growth hormone ELISA; Millipore) u nekoliko etapa. Prvo se uzorak seruma nepoznate koncentracije inkubira sa anti-GH poliklonskim antitelima, nakon čega sledi ispiranje nevezanog materijala iz uzorka. Dalja procedura podrazumeva vezivanje drugog biotiniziranog anti-GH poliklonskog antitela, te ponovno ispiranje nevezanog materijala. U sledećem koraku se peroksidaza rena konjuguje sa vezanim biotiniziranim antitelima nakon čega sledi ispiranje slobodnog enzimskog kompleksa. Kvantifikacija vezanog antitelo-enzim kompleksa vršena je praćenjem aktivnosti peroksidaze rena u prisustvu 3,3',5,5' tetrametilbenzidina. Enzimska aktivnost je merena spektrofotometrijski, povećanjem absorbance na 450 nm. S obzirom da je povećanje absorbance direktno proporcionalno količini vezanog GH uzorka nepoznate koncentracije, konstrukcijom standardne krive (zavisnosti apsorbance od koncentracije GH standarda) i upoređivanjem vrednosti dobijenih za uzorak očitava se nepoznata koncentracija GH u serumu. Analitička senzitivnost testa je 0,07 ng/ml kada se koristi uzorak zapremine 10 $\mu\text{l}$ . Varijacija unutar eseja iznosi 4,3% za srednju koncentraciju GH od 2,7 ng/ml.



### **3.5.3. Određivanje koncentracije ACTH**

Kvantitativno određivanje nivoa ACTH u plazmi vrši se sekvencijalnim, dvostepenim, hemiluminiscentnim imunometričkim testom (DPC IMMULITE ACTH assay). Monoklonska mišija ACTH antitela inkubiraju se sa uzorcima nepoznate koncentracije. Tom prilikom dolazi do specifičnog vezivanja ACTH iz uzorka za monoklonska anti-ACTH antitela. Nevezani višak se ispira centrifugiranjem. Zatim se uvode poliklonska zečija anti-ACTH antitela obeležena alkalnom fosfatazom. Prilikom inkubacije dolazi do specifičnog vezivanja za već formirane antigen-antitelo komplekse. Nakon ovoga nevezani enzimski konjugat se odstranjuje. Sledeći korak je uvođenje hemiluminiscentnog substrata tj. fosfatnog estra adamantil dioksetana. Ovaj substrat u prisustvu alkalne fosfataze podleže hidrolizi i formira nestabilni intermedijerni produkt. Kontinuirana produkcija ovog nestabilnog intermedijera rezultuje u stalnoj emisiji svetla. Fotonska emisija se beleži luminometrom i proporcionalna je koncentraciji ACTH u serumu. Konstrukcijom standardne krive (zavisnosti koncentracije ACTH standarda i emisije fotona) i upoređivanjem vrednosti dobijenih za uzorak očitava se nepoznata koncentracija ACTH u plazmi. Analitička senzitivnost testa je 0,07 ng/ml kada se koristi uzorak zapremine 10 $\mu$ l. Varijacija unutar eseja iznosi 9,6%. za srednju koncentraciju ACTH od 2,7 ng/ml.

### **3.6. Statistička analiza podataka**

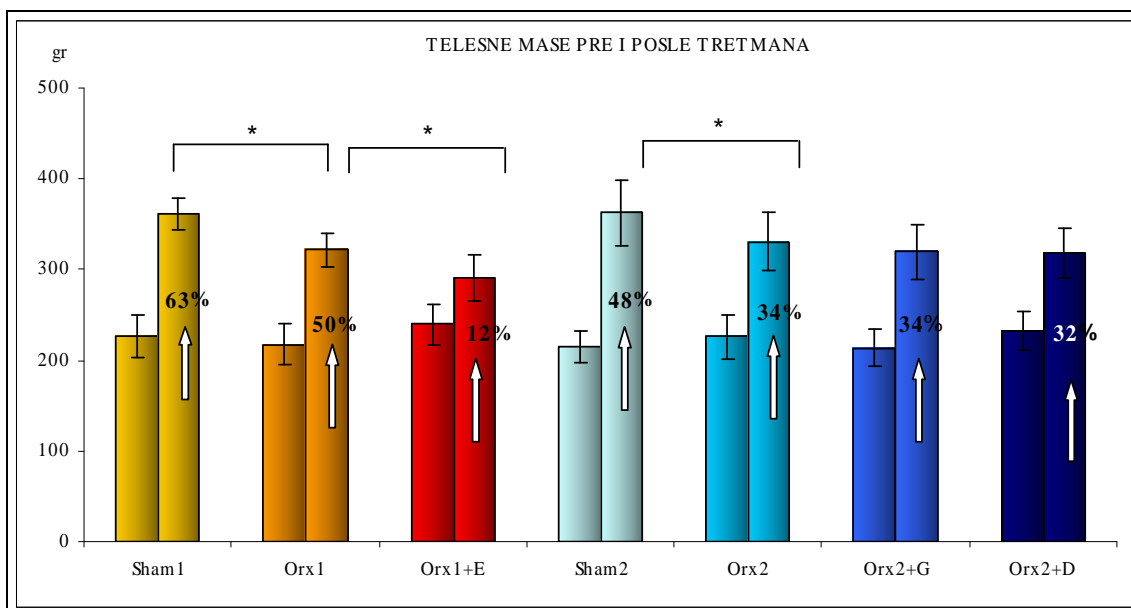
Dobijeni podaci su statistički obrađeni. Pri statističkoj obradi prvo je urađena analiza normalne distribucije podataka uz pomoć Kolmogorov–Smirnov testa. Urađena je analiza varijanse (ANOVA), a zatim je Duncanov test korišćen za post hoc poređenje između grupa. Statistički značajnom se smatra razlika ukoliko je verovatnoća razlike  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Telesne mase adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom

Telesna masa lažno orhidektomisanih adultnih pacova tretiranih medijumom I (Sham1 grupa) iznosila je  $222,0 \pm 23,3$  g pre početka tretmana, odnosno  $361,0 \pm 17,1$  g posle završenog tretmana. Ova grupa životinja zabeležila je prirast telesne mase od 63% u toku pet nedelja. Telesna masa orhidektomisanih adultnih pacova tretiranih medijumom I (Orx1 grupa) iznosila je  $213,0 \pm 21,9$  g pre početka tretmana, odnosno  $316,0 \pm 18,3$  g posle završenog tretmana. Pomenuta grupa je imala prirast telesne mase od 50%, što je statistički značajno ( $p < 0,05$ ) manji prirast telesne mase u odnosu na Sham1 grupu. Telesna masa orhidektomisanih adultnih pacova tretiranih estradiol-dipropionatom (Orx1+E grupa) iznosila je  $265,0 \pm 22,4$  g pre početka tretmana, odnosno  $391,3 \pm 25,9$  g posle završenog tretmana. Prirast telesne mase od 12% u ovoj grupi životinja predstavlja statistički značajno ( $p < 0,05$ ) manji prirast u poređenju sa prirastom telesne mase u Orx1 grupi (Histogram 4.1.).

Telesna masa lažno orhidektomisanih adultnih pacova tretiranih medijumom II (Sham2 grupa) iznosila je  $215,0 \pm 18,1$  g pre početka tretmana, odnosno  $362,4 \pm 36,3$  g posle završenog tretmana, što pokazuje da je prirast telesne mase bio 48% u ovoj grupi. Telesna masa orhidektomisanih adultnih pacova tretiranih medijumom II (Orx2 grupa) iznosila je  $225,0 \pm 25,1$  g pre početka tretmana, odnosno  $330,4 \pm 32,3$  g posle završenog tretmana. Ova grupa je zabeležila prirast telesne mase od 34%, što predstavlja statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje u odnosu na Sham2 grupu. Telesna masa orhidektomisanih, adultnih pacova, tretiranih genisteinom (Orx2+G grupa), iznosila je  $213,7 \pm 21,3$  g pre početka tretmana, odnosno  $320,0 \pm 30,0$  g posle završenog tretmana. Telesna masa orhidektomisanih adultnih pacova tretiranih daidzeinom (Orx2+D grupa) iznosila je  $231,7 \pm 21,4$  g pre početka tretmana, odnosno  $318,7 \pm 27,8$  g posle završenog tretmana. U Orx2+G grupa beleži se prirast telesne mase od 34%, dok u Orx2+D grupi prirast telesne mase iznosi 32% (Histogram 4.1.).

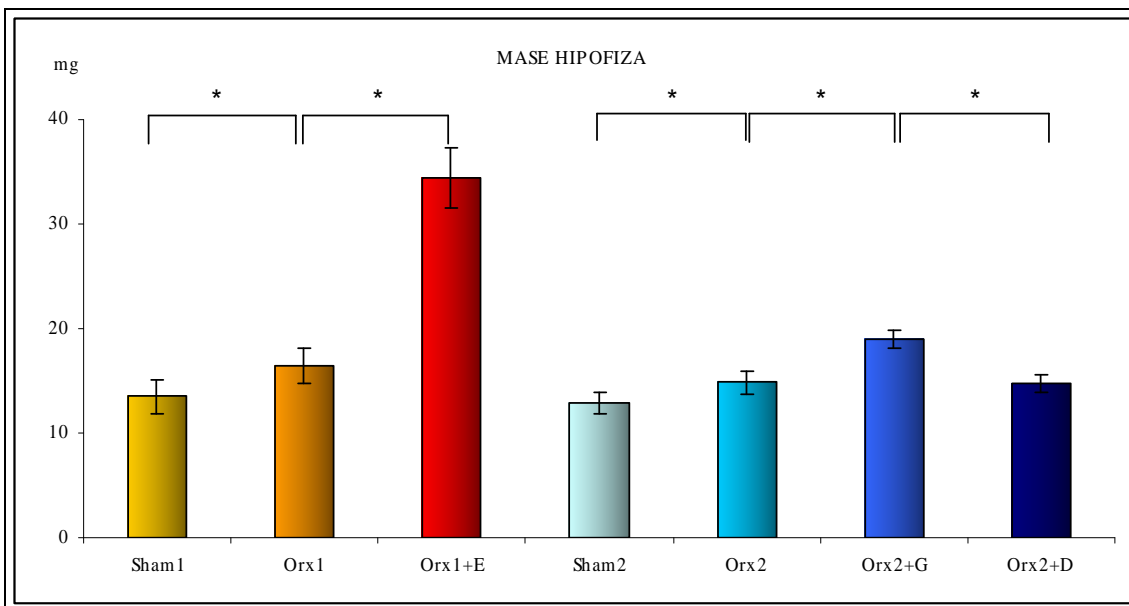


**Histogram 4.1.** Promene prirasta telesne mase adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiolom-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

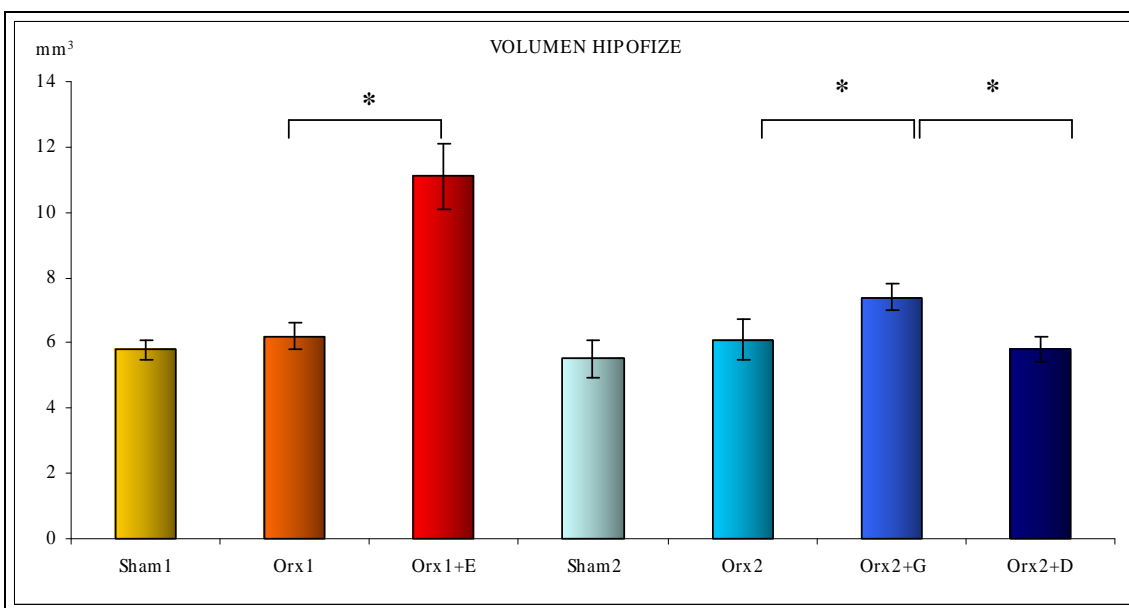
#### 4.2. Masa i volumen hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom

Prosečna masa hipofize iznosila je  $13,5 \pm 1,6$  mg, odnosno  $16,4 \pm 1,7$  mg u Sham1 i Orx1 eksperimentalnoj grupi. Masa hipofize Orx1 grupe statistički značajno ( $p < 0,05$ ) je povećana za 18% u poređenju sa odgovarajućom vrednošću Sham1 grupe. Masa hipofize Orx1+E grupe iznosila je  $34,4 \pm 2,9$  mg, što predstavlja statistički ( $p < 0,05$ ) značajno povećanje od 110% u odnosu na Orx1 grupu (Histogram 4.2).

Prosečne mase hipofize u grupama Sham2 i Orx2 iznosila je  $12,9 \pm 1,1$  mg, odnosno  $14,9 \pm 1,1$  mg. Masa hipofize Orx2 grupe statistički značajno ( $p < 0,05$ ) je povećana za 16% u poređenju sa odgovarajućim vrednostima kod Sham2 grupe. Masa hipofize Orx2+G grupe iznosila je  $19,0 \pm 0,8$  mg, što predstavlja statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje od 27% u poređenju sa Orx2 grupom. Masa hipofize Orx2+D grupe iznosila je  $14,8 \pm 0,8$  mg, što predstavlja statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje od 22% u poređenju sa masom hipofize Orx2+G grupe (Histogram 4.2).



**Histogram 4.2.** Mase hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.



**Histogram 4.3.** Volumen hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje

Morfometrijskim merenjem izračunati su prosečni volumeni hipofiza. Volumeni hipofiza Sham1 i Orx1 grupe, iznosili su  $5,8 \pm 0,3 \text{ mm}^3$ , odnosno  $6,2 \pm 0,4 \text{ mm}^3$ . Volumen hipofize Orx1+E grupe statistički značajno ( $p < 0,05$ ) je povećan za 44 % u odnosu na isti parametar Orx1 grupe, i iznosio je  $11,1 \pm 1,0 \text{ mm}^3$  (Histogram 4.3).

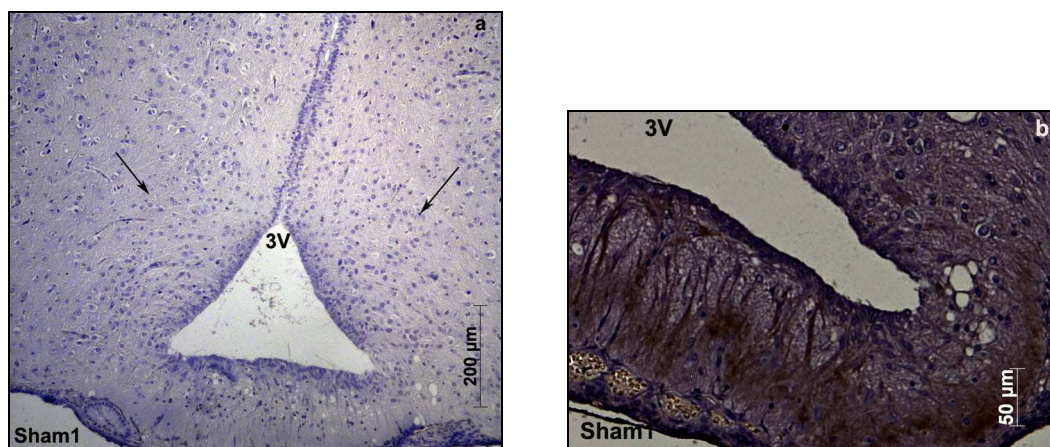
Prosečni volumeni hipofiza Sham2 i Orx2 grupe bili su  $5,5 \pm 0,6 \text{ mm}^3$ , odnosno  $6,1 \pm 0,6 \text{ mm}^3$ . Nakon tretmana genisteinom dolazi do statistički značajnog ( $p < 0,05$ ) povećanja volumena hipofize pacova za 21% u odnosu na Orx2 grupu, dok se nakon tretmana daidzeinom beleži statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje volumena za 22% (Histogram 4.3).

#### **4.3. Somatotropni sistem adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom**

##### **4.3.1. Histološke karakteristike arkuatnog jedra, periventrikularnog jedra i eminencije medijane**

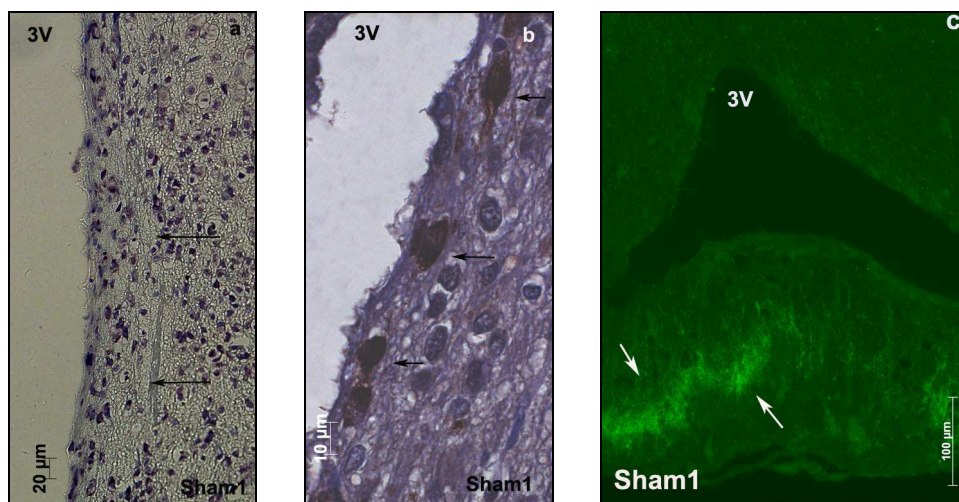
###### **4.3.1.1. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham1 grupa)**

Arkuatno jedro (Arc) Sham1 grupe pacova nalazi se u tuberalnom regionu medijalnog hipotalamusa, i ograničeno je trećom moždanom komorom s medijalne strane i regionom koji je oskudan ćelijskim elementima sa lateralne strane. Ovo jedro čine sitne ćelije vretenastog ili okruglog oblika, koji predstavljaju ujedno i deo parvicelularnog hipotalamo-hipofiznog sistema (Slika 4.1a). Od neurona Arc jedra polaze nervna vlakna ka spoljašnjoj zoni eminencije medijane (ME) u kojoj dolazi, između ostalog, i do izlučivanja oslobađajućeg hormona hormona rasta (GHRH) u hipotalamo-hipofizni portalni krvotok (Slika 4.1b).



**Slika 4.1.** a) Frontalni presek u nivou Arc jedra hipotalamusa lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham1), krezil-ljubičasto, bar-200 µm; b) GHRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Sham1 grupe pacova, bar-50 µm; 3V- treća moždana komora.

Periventrikularno (Pe) jedro Sham1 grupe pacova je parno jedro anteriornog i tuberalnog hipotalamusa koje se prostire u tankom sloju periventrikularne zone treće moždane komore. Čine ga većinom sitni neuroni, čija se nervna vlaknima pružaju paralelno s trećom moždanom komorom. Somatostatinski (SS) neuroni prisutni su u intermedijalnoj zoni Pe jedra, (Slika 4.2b). Nervni završeci ćelija Pe jedra projektuju se na spoljašnju zonu ME gde oslobađaju SS (Slika 4.2c).



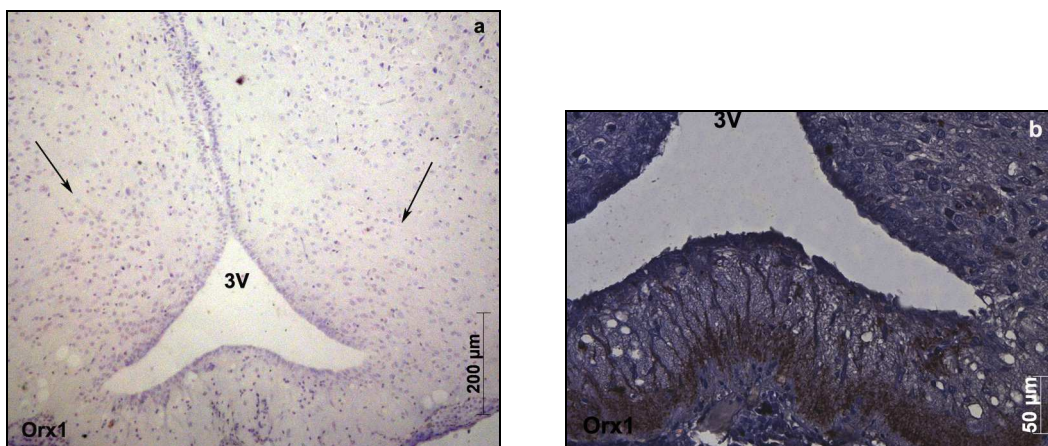
**Slika 4.2.** a) Frontalni presek u nivou Pe jedra lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham1), krezil-ljubičasto, bar 20- $\mu\text{m}$ ; b) Imunoreaktivni SS neuroni na frontalnom preseku intermedijalne zone Pe jedra Sham1 grupe pacova, bar-10  $\mu\text{m}$ ; c) SS imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Sham1 grupe pacova, bar-100  $\mu\text{m}$ ; 3V-treća moždana komora.

#### 4.3.1.2. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1 grupa)

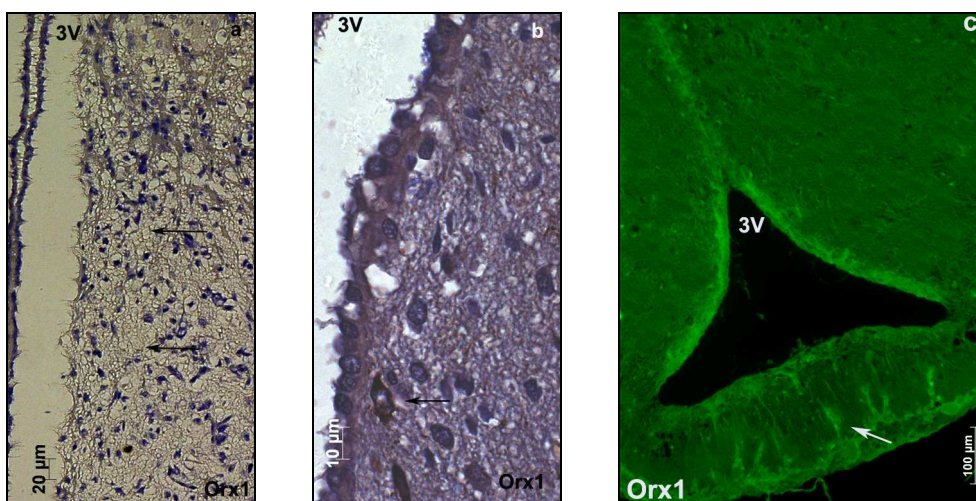
Histološkom analizom uočeno je povećanje površine Arc jedra Orx1 grupe u poređenju sa površinom jedra u Sham1 grupi (Slika 4.3a). Nervna vlakna parvicelularnog hipotalamo-hipofiznog sistema Arc jedra pružaju se do spoljašnje zone ME gde oslobađaju neurosekret. Intenzitet obojenosti GHRH neurosekreta Orx1 grupe smanjen je u odnosu na Sham1 grupu pacova (slika 4.3b).

Nakon histološke analize serije preseka Pe jedra Orx1 grupe uočeno je da ne postoje značajne razlike u odnosu na Sham1 grupu. Uočavaju se sitni neuroni u periventrikularnoj zoni treće moždane komore (Slika 4.4a). Nakon orhidektomije brojnost imunopozitivnih SS neurona u intermedijalnoj zoni Pe jedra je smanjena u

odnosu na Sham1 grupu životinja (Slika 4.4b), kao i intenzitet obojenosti SS neurosekreta u spoljašnjoj zoni ME (Slika 4.4c).



**Slika 4.3.** a) Frontalni presek u nivou Arc jedra hipotalamusa orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1), kretil-ljubičasto, bar-200 μm; b) GHRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx1 grupe pacova, bar-50 μm; 3V-treća moždana komora.

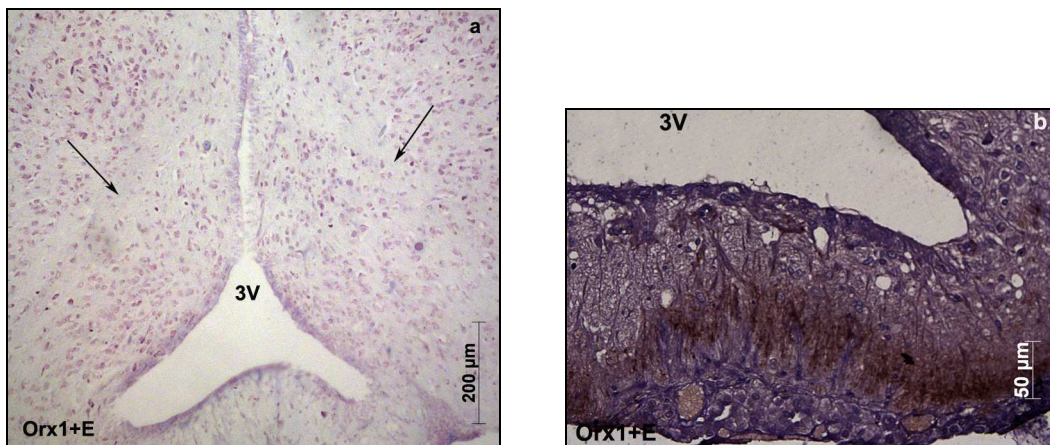


**Slika 4.4.** a) Frontalni presek u nivou Pe jedra orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1), kretil-ljubičasto, bar 20-μm; b) Imunoreaktivni SS neuroni na frontalnom preseku intermedijalne zone Pe jedra Orx1 grupe pacova, bar-10 μm; c) SS imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx1 grupe pacova, bar-100 μm; 3V-treća moždana komora.

#### 4.3.1.3. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1+E grupa)

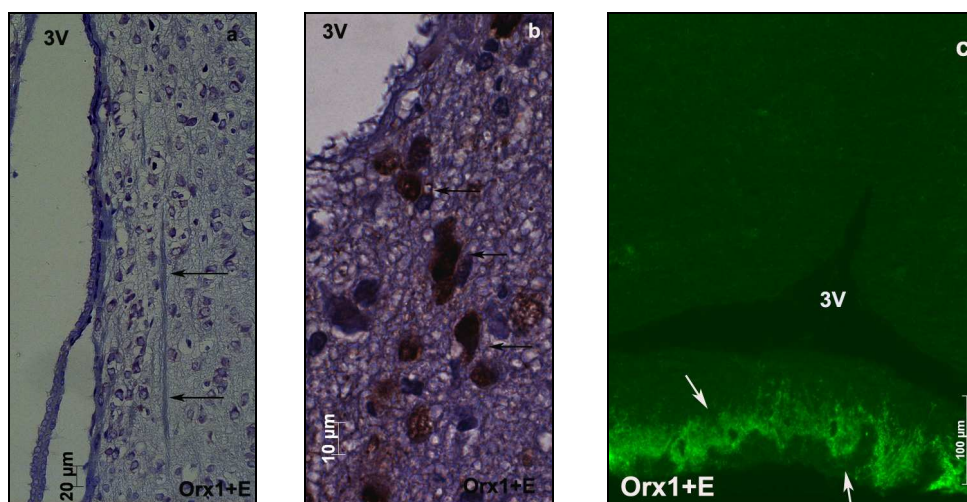
Hroničan tretman orhidektomisanih adultnih pacova estradiol-dipropionatom uticao je na histološku sliku oba jedra somatotropnog sistema. Analizom serijskih

preseka Arc jedro Orx1+E grupe (Slika 4.5a) uočena je veća površina jedra u odnosu na Orx1 grupu. Nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom razlike u intenzitetu obojenosti GHRH neurosekreta u ME u odnosu na Orx1 grupu nisu uočene (Slika 4.5b).



**Slika 4.5.** a) Frontalni presek u nivou Arc jedra hipotalamusa orhidektomisanih adultnih pacova hronično tretiranih estradiol-dipropionatom (Orx1+E), kretil-ljubičasto, bar-200 µm; b) GHRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx1+E grupe pacova, bar-50 µm; 3V-treća moždana komora.

Površina Pe jedra Orx1+E grupe je povećana u odnosu na površinu jedra Orx1 grupe (Slika 4.6a). Brojnost imunopozitivnih SS neurona intermedijarne zone Pe jedra, kao i intenzitet obojenosti SS neurosekreta u spoljašnjoj zoni ME povećan je u Orx1+E grupi u odnosu na Orx1 grupu pacova (Slika 4.6b, c).

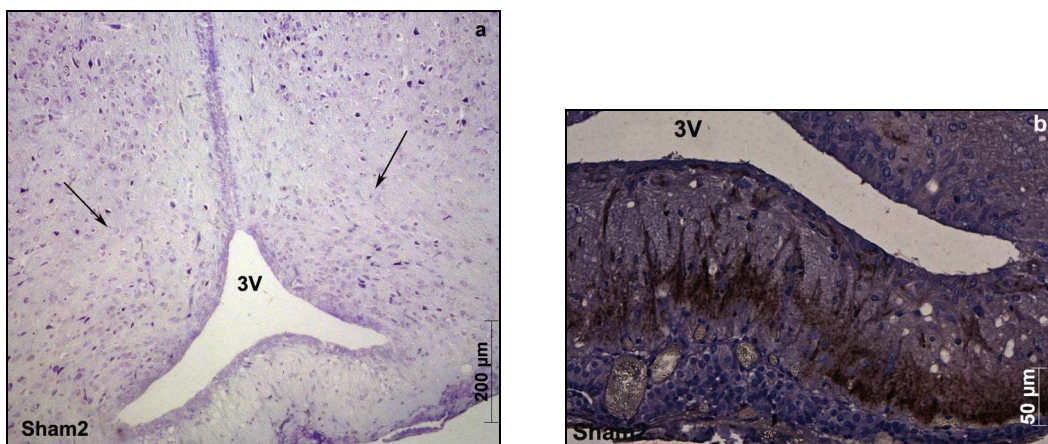


**Slika 4.6.** a) Frontalni presek u nivou Pe jedra orhidektomisanih adultnih pacova hronično tretiranih estradiol-dipropionatom (Orx1+E), kretil-ljubičasto, bar 20-µm; b) Imunoreaktivni SS neuroni na frontalnom preseku intermedijalne zone Pe jedra Orx1+E grupe pacova, bar-10 µm; c) SS Imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx1+E grupe pacova, bar-100 µm; 3V-treća moždana komora.

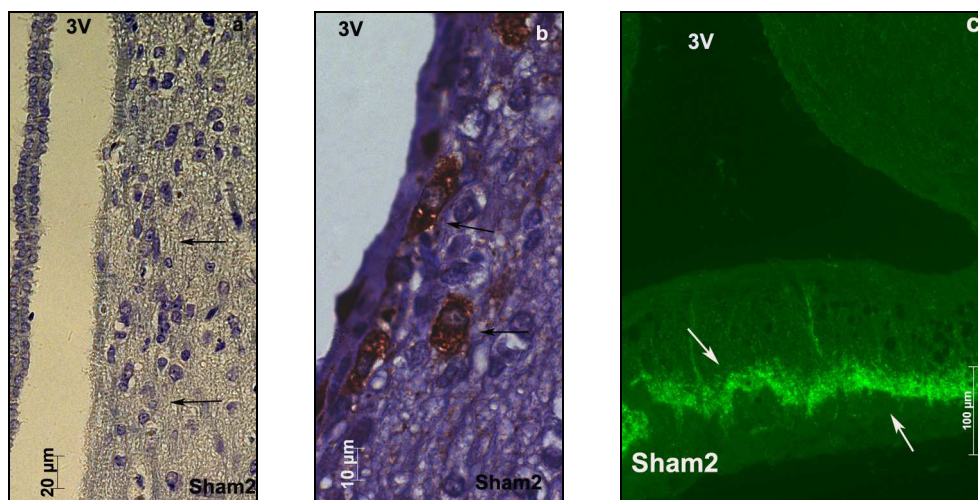


#### 4.3.1.4. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham2 grupa)

Arc jedro Sham2 grupe pacova pozicionirano je u tuberalnom regionu hipotalamusa sa obe strane proširenja treće moždane komore (Slika 4.7a). Nervna vlakna Arc jedra dosežu do ME u koju oslobađaju GHRH neurosekret (Slika 4.7b).



**Slika 4.7.** a) Frontalni presek u nivou Arc jedra hipotalamusa lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham2), kretil-ljubičasto, bar-200 µm; b) GHRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Sham2 grupe pacova, bar-50 µm; 3V-treća moždana komora.

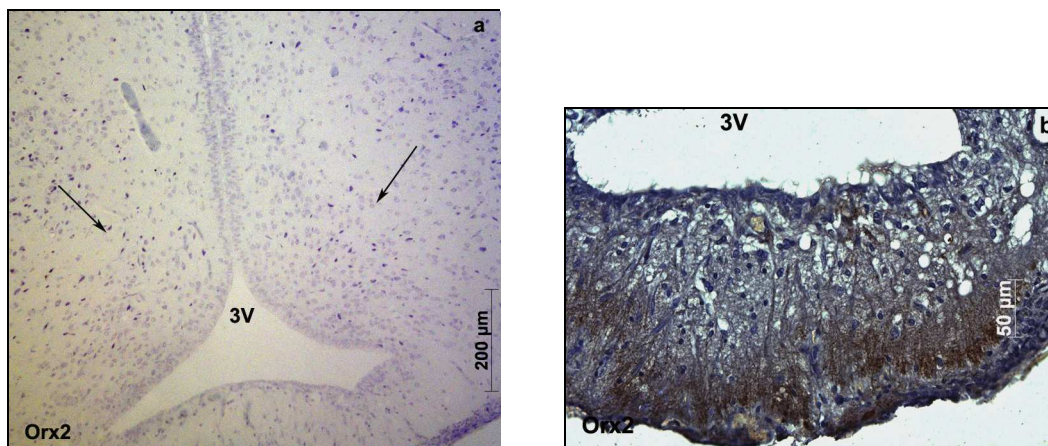


**Slika 4.8.** a) Frontalni presek u nivou Pe jedra lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham2), kretil-ljubičasto, bar 20-µm; b) Imunoreaktivni SS neuroni na frontalnom preseku intermedijalne zone Pe jedra Sham2 grupe pacova, bar-10 µm; c) SS imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Sham2 grupe pacova, bar-100 µm; 3V-treća moždana komora.

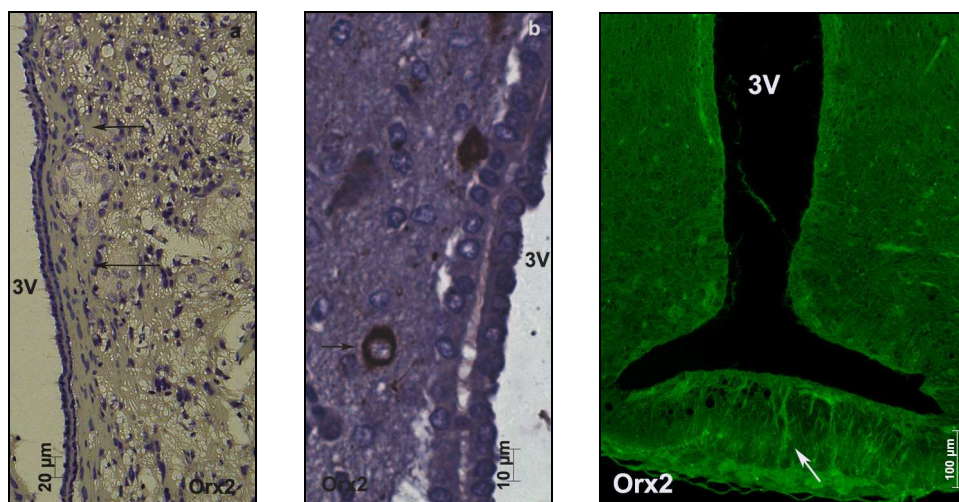
Periventrikularno jedro Sham2 grupe životinja predstavljeno je nizovima parvocelularnih neurona duž treće moždane komore anteriornog i tuberalnog

hipotalamusa (Slika 4.8a). U intermedijalnoj zoni Pe jedra lokalizovani su SS neuroni. (Slika 4.8b). Nervna vlakna SS neurona dosežu do spoljašnje zone ME gde oslobađaju neurosekret (Slika 4.8c).

**4.3.1.5. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2 grupa)**



**Slika 4.9.** a) Frontalni presek u nivou Arc jedra hipotalamusa orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2), kretil-ljubičasto, bar-200 µm; b) GHRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx2 grupe pacova, bar-50 µm; 3V-treća moždana komora.



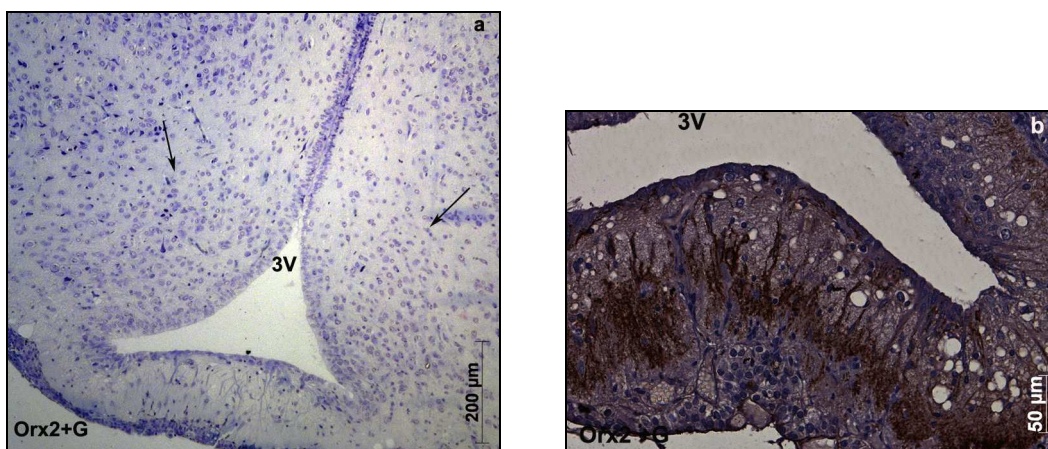
**Slika 4.10.** a) Frontalni presek u nivou Pe jedra orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2), kretil-ljubičasto, bar 20-µm; b) Imunoreaktivni SS neuroni na frontalnom preseku intermedijalne zone Pe jedra Orx2 grupe pacova, bar-10 µm; c) SS imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx2 grupe pacova, bar-100 µm; 3V-treća moždana komora.

Orhidektomija izaziva histološke promene Arc jedra. Arc jedro Orx2 grupe pacova zauzima veću površinu u odnosu na Sham2 grupu pacova, (Slika 4.9a), dok je intenzitet obojenosti GHRH neurosekreta u spoljašnjoj zoni ME kod Orx2 grupe smanjen u odnosu na Sham2 grupu (Slika 4.9b).

Nakon orhidektomije pacova nisu zapažene značajne histološke promene Pe jedra u odnosu na Sham2 grupu pacova (Slika 4.10a), dok je brojnost imunopozitivnih SS neurona intermedijarne zone Pe jedra smanjena (Slika 4.10b) što je praćeno i smanjenom količinom imunofluorescentno obeleženog SS neurosekreta u ME.

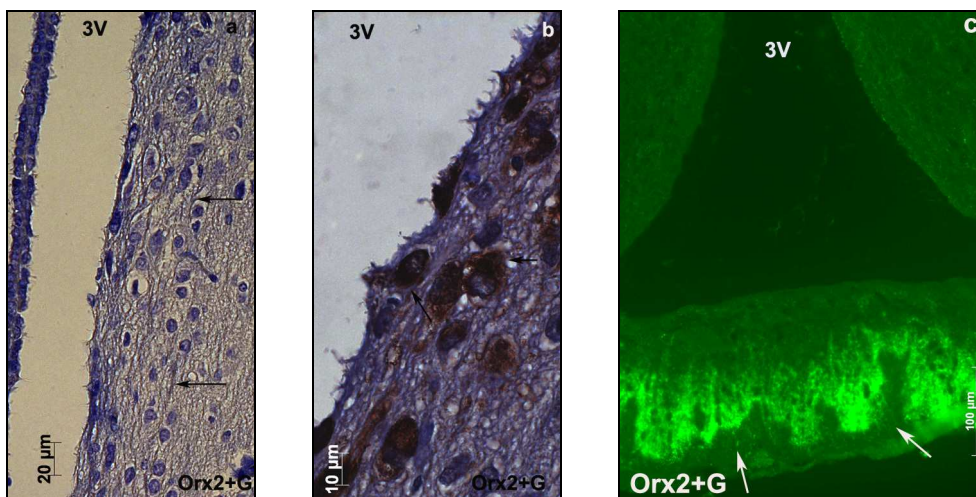
#### 4.3.1.6. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana genisteinom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2+G grupa)

Histološkom analizom serijskih preseka Arc jedra Orx2+G grupe uočeno je povećanje površine Arc jedra u odnosu na Orx2 grupu (Slika 4.11a). Tretmana genisteinom rezultira povećanjem intenziteta obojenosti GHRH neurosekreta u spoljašnjoj zoni ME u odnosu na Orx2 grupu pacova (Slika 4.11b).



**Slika 4.11.** a) Frontalni presek u nivou Arc jedra hipotalamusa orhidektomisanih adultnih pacova hronično tretiranih genisteinom (Orx2+G), krezil-ljubičasto, bar-200 µm; b) GHRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx2+G grupe pacova, bar-50 µm; 3V-treća moždana komora.

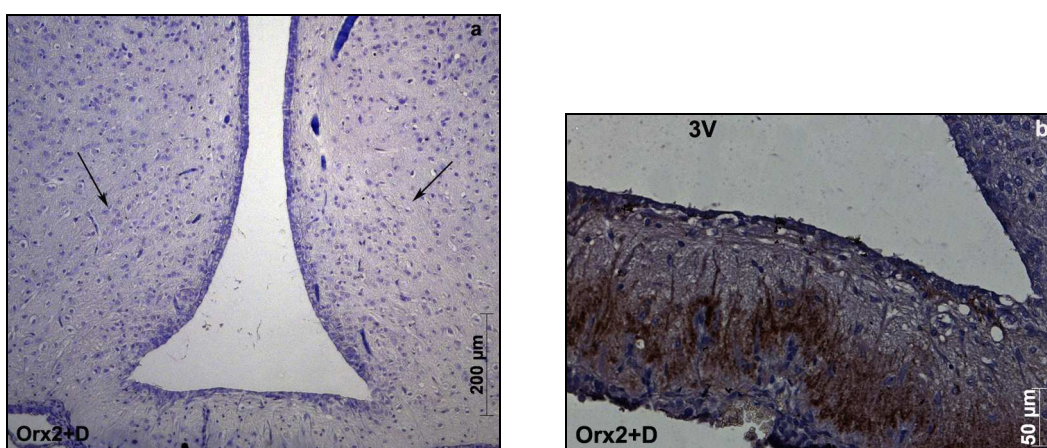
Pe jedro Orx2+G grupe čine nizovi parvocelularnih neurona duž treće moždane komore (Slika 4.12a). Brojnost imunopozitivnih SS neurona Pe jedra Orx2+G grupe povećana je u odnosu na Orx2 grupu (Slika 4.12b), a takođe je konstatovano i povećanje intenziteta obojenosti SS neurosekreta u ME nakon imunofluorescentnog bojenja (Slika 4.12c).



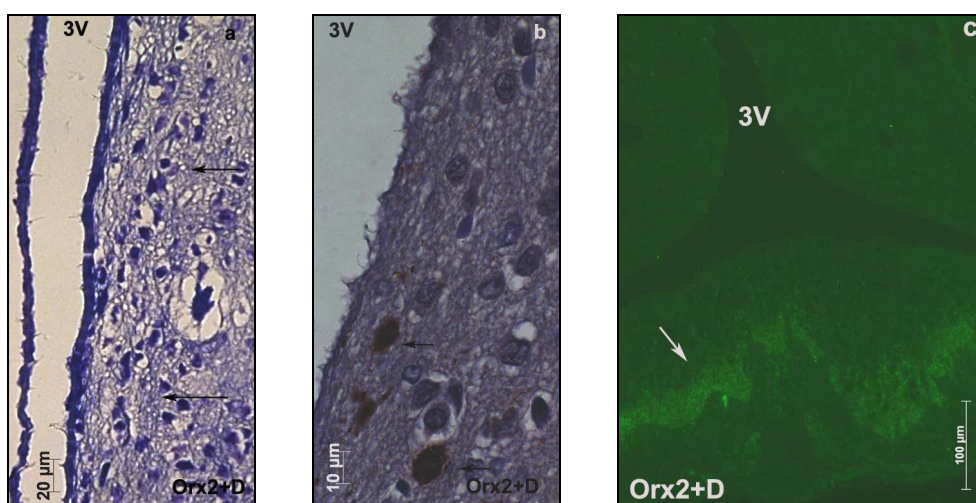
**Slika 4.12.** a) Frontalni presek u nivou Pe jedra orhidektomisanih adultnih pacova hronično tretiranih genisteinom (Orx2+G), krezil-ljubičasto, bar 20-µm; b) imunoreaktivni SS neuroni na frontalnom preseku intermedijalne zone Pe jedra Orx2+G grupe pacova, bar-10 µm; c) SS imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx2+G grupe pacova, bar-100 µm; 3V-treća moždana komora.

#### 4.3.1.7. Arkuatno jedro, periventrikularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana daidzeinom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2+D grupa)

Histološkom analizom Arc nukleusa pacova hronično tretiranih daidzeinom nisu utvrđene značajne promene u odnosu na Orx2 grupu (Slika 4.13a), dok je intenzitet obojenosti GHRH neurosekreta blago povećan u poređenju sa intenzitetom obojenošću koji je prisutan u Orx2 grupi (Slika 4.13b).



**Slika 4.13.** a) Frontalni presek u nivou Arc jedra hipotalamusa orhidektomisanih adultnih pacova hronično tretiranih daidzeinom (Orx2+D), krezil-ljubičasto, bar-200 µm; b) GHRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx2+D grupe pacova, bar-50 µm, 3V-treća moždana komora.



**Slika 4.14.** a) Frontalni presek u nivou Pe jedra hipotalamusa orhidektomisanih adultnih pacova hronično tretiranih daidzeinom (Orx2+D) krezil-violet, bar 20-µm; b) Imunoreaktivni SS neuroni na frontalnom preseku intermedijalne zone Pe jedra Orx2+D grupe pacova, bar-10 µm; c) SS imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx2+D grupe pacova, bar-100 µm, 3V-treća moždana komora

Nakon hroničnog tretmana daidzeinom orhidektomisanih pacova nisu konstatovane promene površine koju zauzima Pe jedro, brojnosti imunopozitivnih SS neurona intermedijalne zone Pe jedra, kao ni promene u intenzitetu obojenosti SS neurosekreta u ME (Slika 4.14a, b, c).

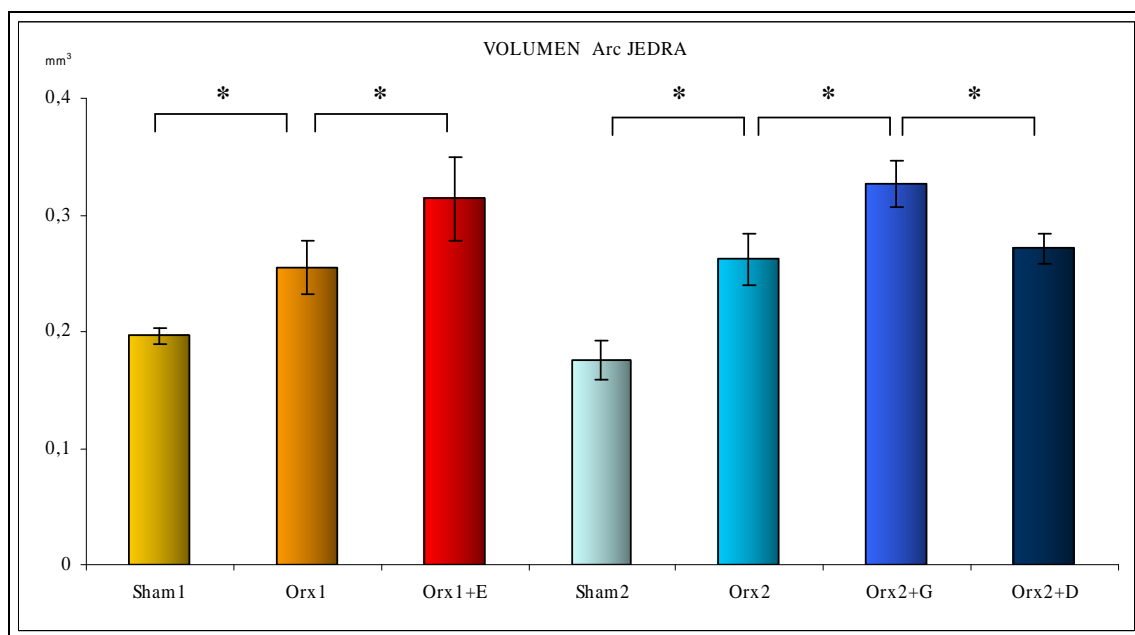
### 4.3.2. Stereološke karakteristike arkuatnog jedra, periventrikularnog jedra i eminencije medijane adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom

#### 4.3.2.1. Volumen arkuatnog i periventrikularnog jedra

Prosečan volumen Arc jedra u Sham1 grupi iznosio je  $0,197 \pm 0,007 \text{ mm}^3$ . Nakon orhidektomije došlo je do statistički značajnog ( $p < 0,05$ ) povećanja volumena Arc jedra ( $0,255 \pm 0,022 \text{ mm}^3$ ) za 30% u odnosu na Sham1 grupu. Tretman estradiol-dipropionatom dodatno je uticao na statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje volumena Arc jedra za 23% u odnosu na volumen Arc jedra Orx1 grupe, a vrednost prosečnog volumena jedra ove grupe je iznosila  $0,314 \pm 0,036 \text{ mm}^3$  (Histogram 4.4).

Prosečna vrednost volumena Arc jedra Sham2 i Orx2 grupe bili su  $0,175 \pm 0,017 \text{ mm}^3$ , odnosno  $0,262 \pm 0,023 \text{ mm}^3$ . Orhidektomija je dovela do statistički značajnog ( $p < 0,05$ ) povećanja volumena Arc jedra za 46%. Prosečni volumen Arc jedra kod

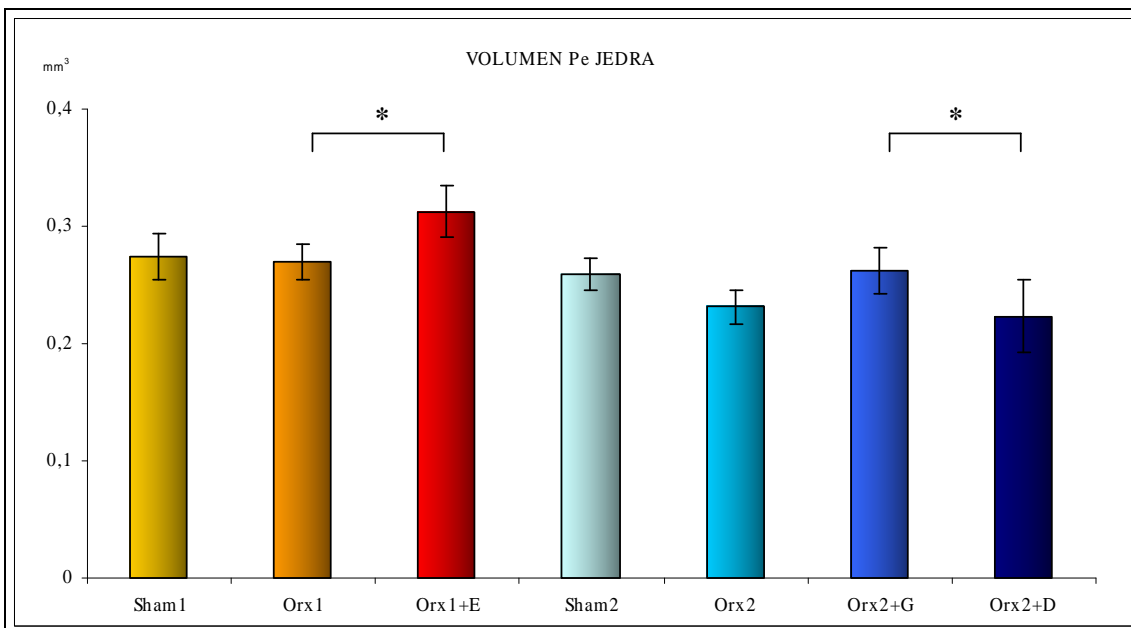
pacova hronično tretiranih genisteinom statistički značajno ( $p < 0,05$ ) je povećan za 25% u odnosu na odgovarajući parametar Orx2 grupe i iznosio je  $0,326 \pm 0,019 \text{ mm}^3$ , dok tretman daidzeinom nije rezultirao statistički značajnom razlikom. Prosečni volumen Arc jedra pacova hronično tretiranih daidzeinom bio  $0,271 \pm 0,013 \text{ mm}^3$ , što je statistički ( $p < 0,05$ ) značajno smanjenje od 17% u odnosu na odgovarajući parametar Orx2+G grupe (Histogram 4.4).



**Histogram 4.4.** Promene volumena Arc jedra hipotalamusa adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

Srednje vrednosti volumena Pe jedra Sham1 i Orx1 grupe iznosile su  $0,274 \pm 0,021 \text{ mm}^3$ , odnosno  $0,270 \pm 0,015 \text{ mm}^3$ . Hroničan tretman estradiol-dipropionatom doveo je do statistički značajnog ( $p < 0,05$ ) povećanja volumena Pe jedra za 16% u odnosu na Orx1 grupu, a vrednost volumena jedra je iznosila  $0,313 \pm 0,022 \text{ mm}^3$  (Histogram 4.5).

Srednje vrednosti volumena Pe jedra Sham2 i Orx2 grupe iznosile su  $0,259 \pm 0,014 \text{ mm}^3$ , odnosno  $0,231 \pm 0,014 \text{ mm}^3$ . Prosečni volumeni Pe jedra Orx2+G i Orx2+D grupa iznosili su  $0,263 \pm 0,021 \text{ mm}^3$ , odnosno  $0,223 \pm 0,031 \text{ mm}^3$ . Statistički značajno smanjenje volumena Pe jedra ( $p < 0,05$ ) od 15% zabeleženo je u Orx2+D grupi pacova u odnosu na Orx2+G grupu (Histogram 4.5).

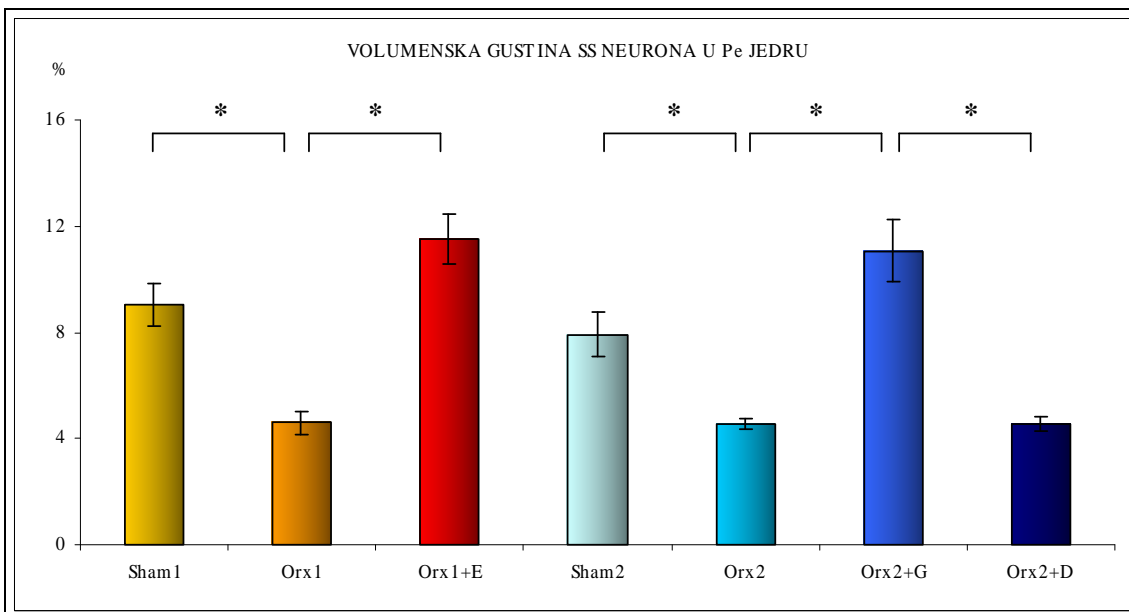


**Histogram 4.5.** Promene volumena Pe jedra adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

#### 4.3.2.2. Volumenska gustina SS neurona u Pe jedru

Volumenska gustina SS neurona u Pe jedru Sham1 grupe pacova iznosila je  $9,0 \pm 0,8$  %. Nakon orhidektomije vrednost ovog parametra iznosila je  $4,6 \pm 0,4$ %, što predstavlja statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) od 49% u odnosu na odgovarajući parametar Sham1 grupe. Hroničan tretman estradiol-dipropionatom povećao je procentualnu zastupljenost SS neurona u Pe jedru za 150%, u odnosu na Orx1 grupu, a njena vrednost je bila  $11,5 \pm 0,9$ % (Histogram 4.6).

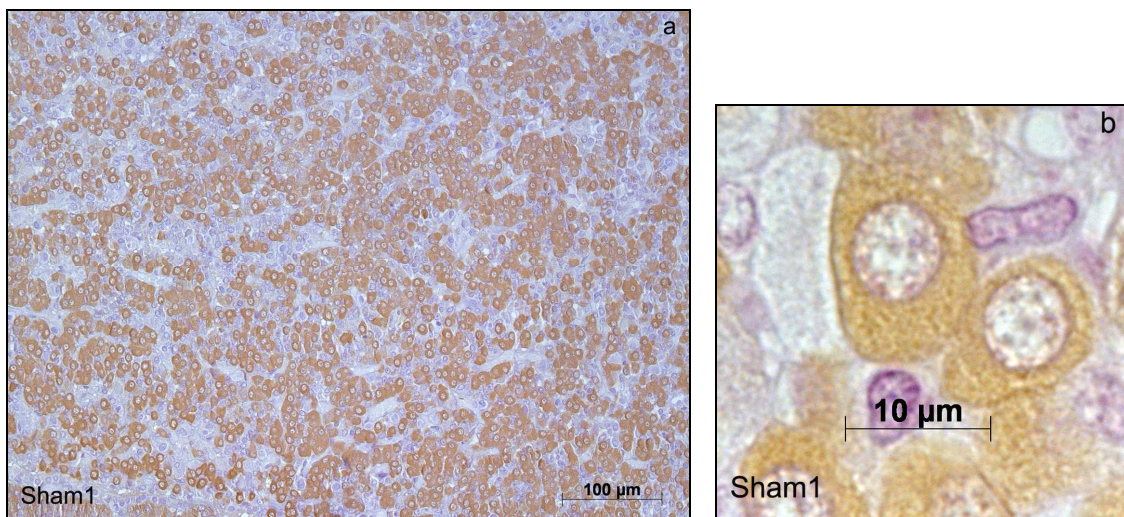
Vrednosti procentualne zastupljenosti SS neurona u Pe jedru u Sham2 i Orx2 grupi životinja iznosile su  $7,9 \pm 0,8$ %, odnosno  $4,6 \pm 0,2$ %. Statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) procentualne zastupljenosti SS neurona od 43% zabeleženo je u Orx2 grupi u odnosu na Sham2 grupu pacova. S druge strane statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) od 145% zabeleženo je u Orx2+G grupi u kojoj je vrednost pomenutog parametra iznosila  $11,0 \pm 1,2$ %. U odnosu na Orx1 grupu procentualna zastupljenost SS neurona u Orx2+D nije promenjena i iznosila je  $4,6 \pm 0,3$ %, dok je u odnosu na Orx2+G grupu zabeleženo statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) od 60% (Histogram 4.6).



**Histogram 4.6.** Volumenska gustina SS neurona Pe jedra adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

### 4.3.3. Histološke karakteristike somatotropnih (GH) ćelija hipofiza

#### 4.3.3.1. GH ćelije lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham1 grupa)



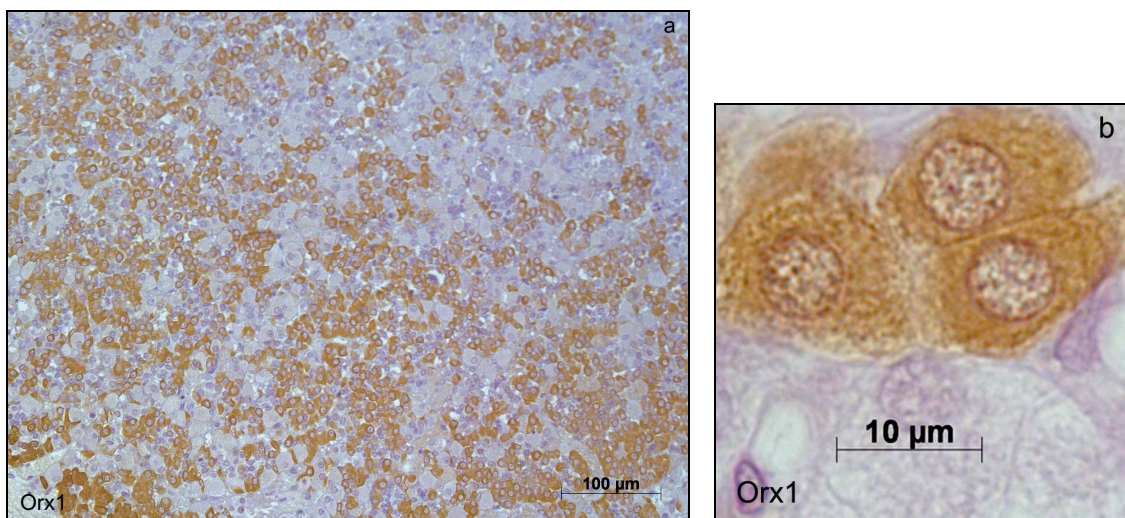
**Slika 4.15.** Imunoreaktivne GH ćelije u adenohipofizi lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham1) a) bar-100 µm; b) bar-10 µm.

Na presecima hipofiza sham operisanih mužjaka pacova koji su tretirani medijumom I (Sham1 grupa) GH ćelije su jasno uočljive nakon imunohistohemijskog bojenja. Prisustvo GH imunopozitivnih ćelija u centralnim i perifernim regionima *pars distalis* je ujednačeno. GH ćelije su najčešće grupisane, ali se uočavaju i kao



pojedinačne (Slika 4.15a). Obično su kružnog ili elipsoidnog oblika, mada se uočavaju i GH ćelije nepravilnog oblika, sa citoplazmatičnim nastavcima koje se pružaju između ostalih hormon sekretujućih ćelija. Jedro GH ćelija je krupno i okruglo, često ekscentrično postavljeno (Slika 4.15b).

#### 4.3.3.2. GH ćelije orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1 grupa)

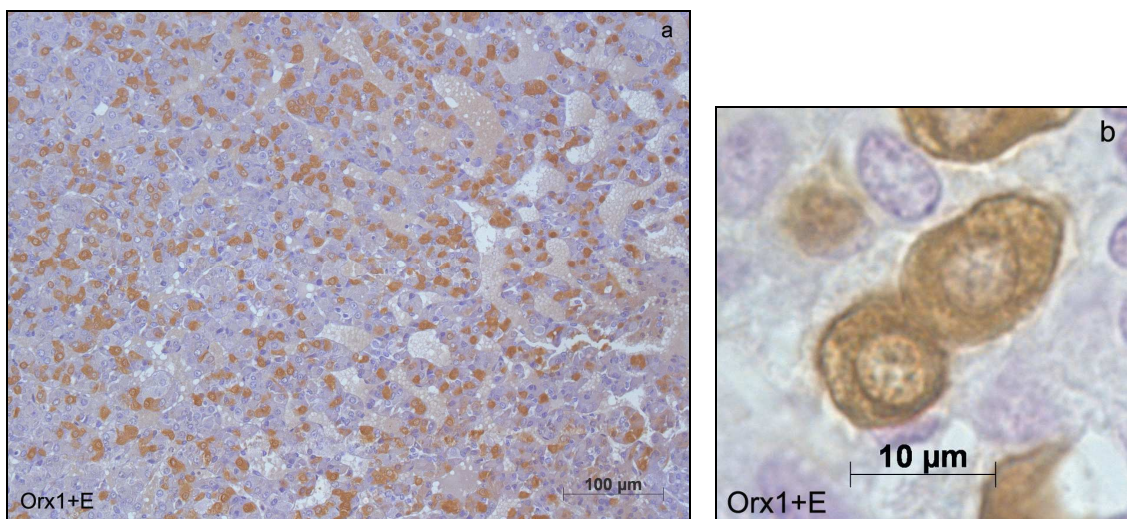


**Slika 4.16.** Imunoreaktivne GH ćelije u adenohipofizi orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1) a) bar-100 µm; b) bar-10µm.

Histološka slika adenohipofize i GH ćelija adultih pacova promjenjena je nakon orhidektomije. Naime, GH ćelije hipofiza orhidektomisanih adultnih pacova malobrojnije su u poređenju sa Sham1 grupom (Slika 4.16a). Takođe, uočljive su krupne, verovatno gonadotropne ćelije koje se prostiru između GH ćelija. Nakon orhidektomije nisu uočene promene oblika, veličine i intenziteta obojenosti GH ćelija u odnosu na Sham1 grupu (Slika 4.16b).

#### 4.3.3.3. GH ćelije nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1+E grupa)

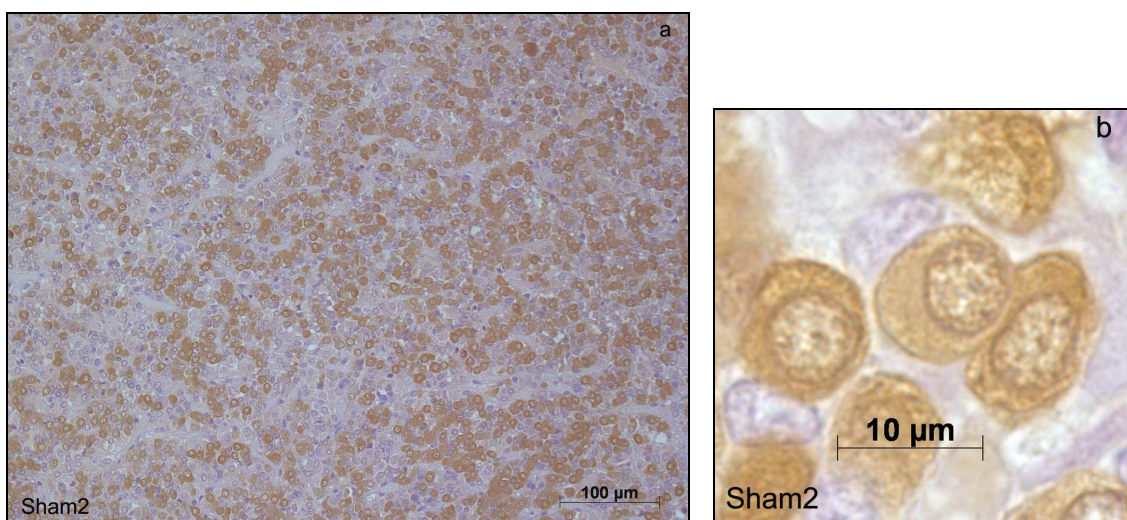
U hipofizama Orx1+E grupe pacova uočeno je značajno smanjenje brojnosti GH ćelija u poređenju sa Orx1 grupom pacova (Slika 4.17a). Takođe, uočljivi su i dilatirani krvni sudovi. Oblik GH ćelija je sferičan, veličina nepromenjena, a imunopozitivnost izraženija u odnosu na Orx1 grupu (Slika 4.17b).



**Slika 4.17.** Imunoreaktivne GH ćelije u adenohipofizi orhidektomisanih adultnih pacova hronično tretiranih estradiol-dipropionatom (Orx1+E) a) bar 100 μm; b) bar 10μm.

#### 4.3.3.4. GH ćelije lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham2 grupa)

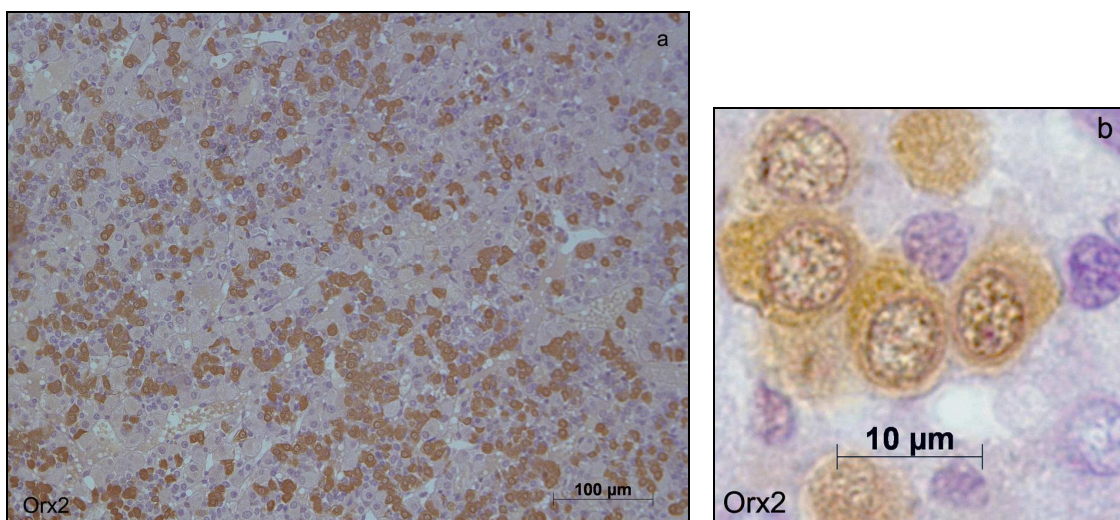
Somatotropne ćelije u hipofizama lažno orhidektomisanih adultnih pacova tretiranih medijumom II ravnomerno su raspoređene u *pars distalis* između drugih ćelija koje sekretuju hormone. GH ćelije su grupisane, ali prisutne su i kao pojedinačne ćelije koje naležu na krvne kapilare (Slika 4.18a). Oblik ćelija je kružan do elipsoidan. Imaju krupno, okruglo, ekscentrično postavljeno jedro, oko koga je ravnomerno obojena citoplazma (Slika 4.18b).



**Slika 4.18.** Imunoreaktivne GH ćelije u adenohipofizi lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham2) a) bar 100-μm; b) bar-10μm.

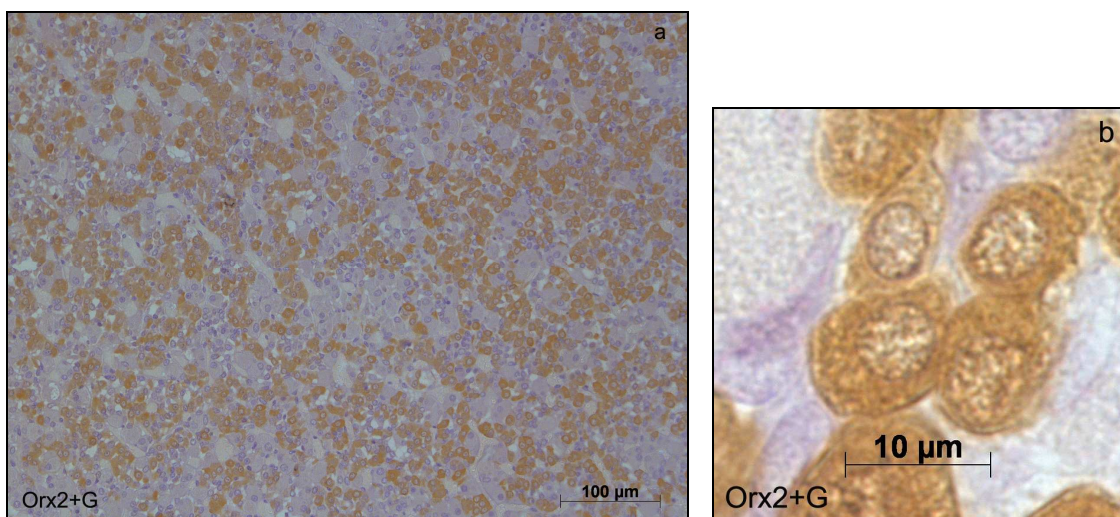
#### 4.3.3.5. GH ćelije orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2 grupa)

Nakon orhidektomije brojnost GH ćelija značajno je smanjena u poređenju sa Sham2 grupom pacova. Histološkom analizom uočavaju se krupne ćelije, verovatno gonadotropne, između GH ćelija (Slika 4.19a). Oblik i veličina GH ćelija nije promenjena, dok je intenzitet obojenosti ćelija smanjen u odnosu na Sham2 grupu životinja (Slika 4.19b).



**Slika 4.19** . Imunoreaktivne GH ćelije u adenohipofizi orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2) a) bar-100 μm; b) bar-10μm.

#### 4.3.3.6. GH ćelije nakon hroničnog tretmana genisteinom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2+G grupa)

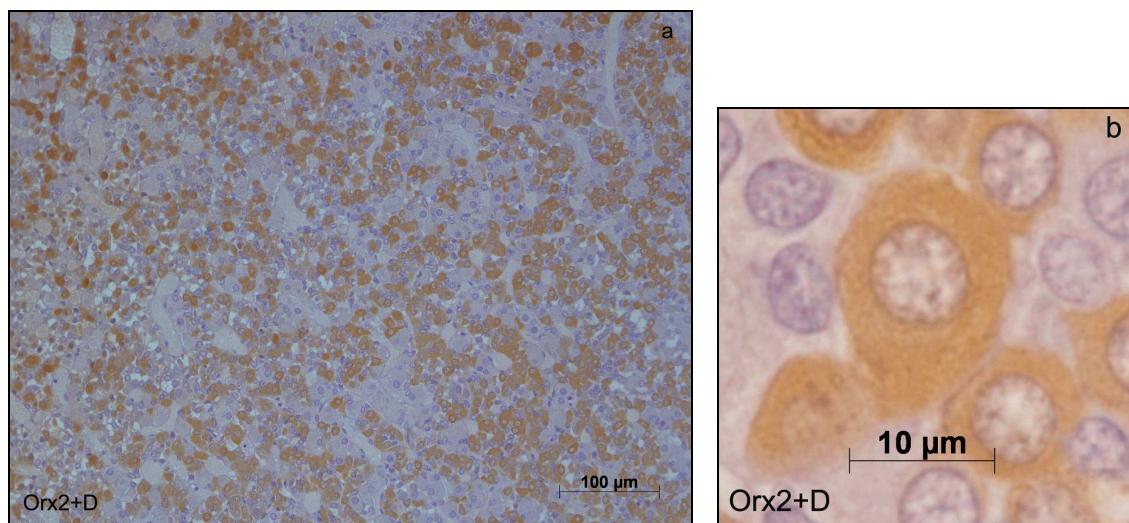


**Slika 4.20** . Imunoreaktivne GH ćelije u adenohipofizi orhidektomisanih adultnih pacova hronično tretiranih genisteinom (Orx2+G) a) bar-100 μm; b) bar-10μm.

Hroničan tretman genisteinom značajno je uticao na histološku sliku GH ćelija. Naime, brojnost GH ćelija povećana je u odnosu na Orx2 grupu pacova. Nakon orhidektomije zapažaju se izrazitno krupne ćelje, verovatno gonadotropne ćelije, koje nisu imunocitohemjski obeležene (Slika 4.20a). Zapaženo je i povećanje veličine GH ćelije u ovoj eksperimentalnoj grupi u odnosu na Orx2 grupu. Histološka analiza pokazuje intenzivniju imunopozitivnost GH ćelija pacova tretiranih genisteinom u odnosu na Orx2 grupu (Slika 4.20b).

#### 4.3.3.7. GH ćelije nakon hroničnog tretmana daidzeinom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2+D grupa)

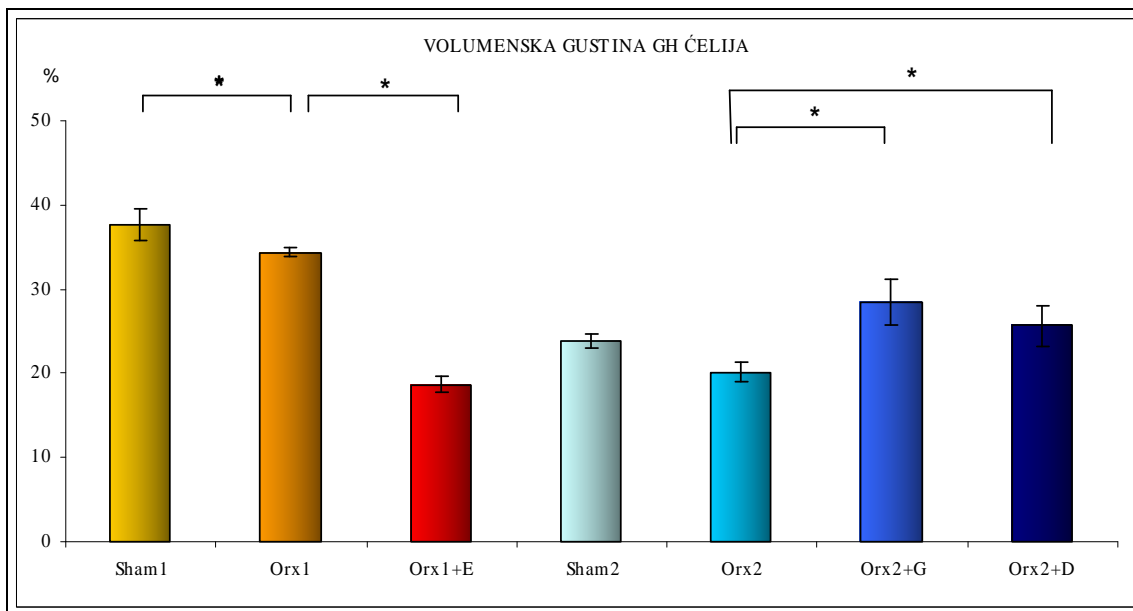
Histološka slika somatotropnih ćelija izmenjena je nakon tretmana daidzeinom u odnosu na Orx2 adultne pacove. Naime, GH ćelije adultnih pacova hronično tretiranih daidzeinom mnogobrojnije su u poređenju sa Orx2 grupom (Slika 4.21a). Na većem uveličanju vidljive su kružne i elipsoidne ćelije različite veličine, pri čemu krupnije ćelije dominiraju (Slika 4.21b).



**Slika 4.21.** Imunoreaktivne GH ćelije u adenohipofizi orhidektomisanih adultnih pacova hronično tretiranih daidzeinom (Orx2+D) a) bar 100- $\mu$ m; b) bar-10 $\mu$ m.

#### 4.3.4. Stereološke karakteristike GH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom

##### 4.3.4.1. Volumenska gustina GH ćelija

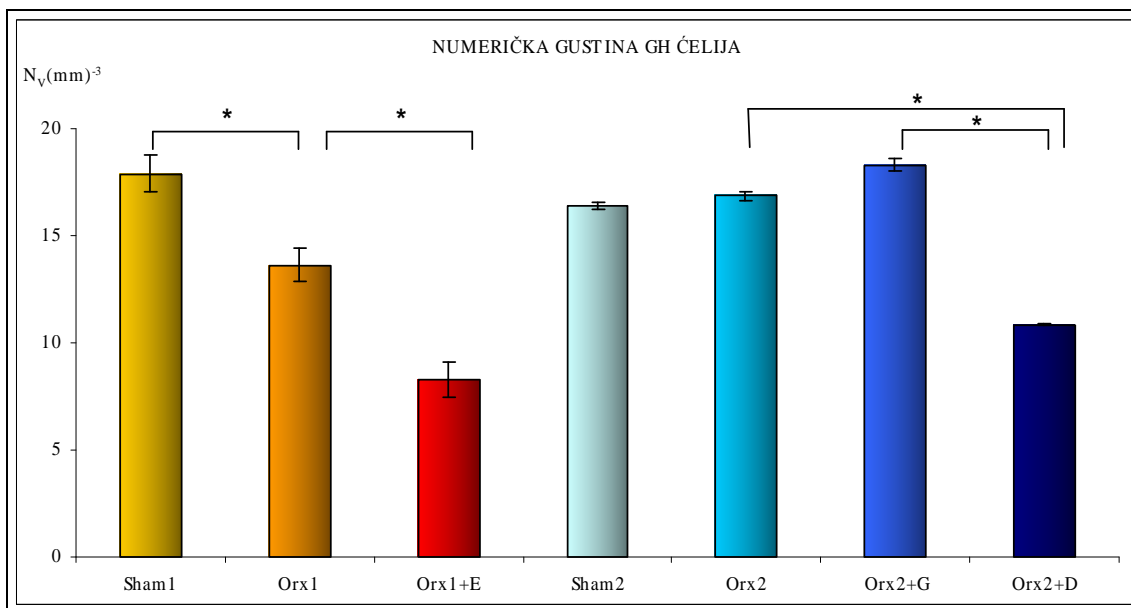


**Histogram 4.7.** Volumenska gustina GH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

Volumenska gustina GH ćelija Sham1 grupe iznosila je  $37,7 \pm 1,9$  %. Nakon orhidektomije volumenska gustina GH ćelija je statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjena za 9 % u odnosu na Sham1 i iznosila je  $34,4 \pm 0,5$ %. Volumenska gustina GH ćelija posle tretmana estradiol-dipropionatom iznosila je  $18,7 \pm 0,9$ %, što predstavlja statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) od 46% u odnosu na odgovarajući parametar Orx1 grupe (Histogram 4.7).

Vrednost volumenske gustine GH ćelija u Sham2 grupi iznosila je  $23,8 \pm 0,87$ %, a u Orx2 grupi  $20,1 \pm 1,15$ %. Statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) volumenske gustine GH ćelija od 41% zabeleženo je u Orx2+G grupi u odnosu na Orx2 grupu, a njena vrednost je iznosila  $28,4 \pm 2,7$ %. Volumenska gustina GH ćelija Orx2+D grupe smanjena je za 28% u poređenju sa Orx2 grupom i iznosila je  $25,6 \pm 2,4$ % (Histogram 4.7).

#### 4.3.4.2. Numerička gustina GH ćelija



**Histogram 4.8.** Numerička gustina GH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje

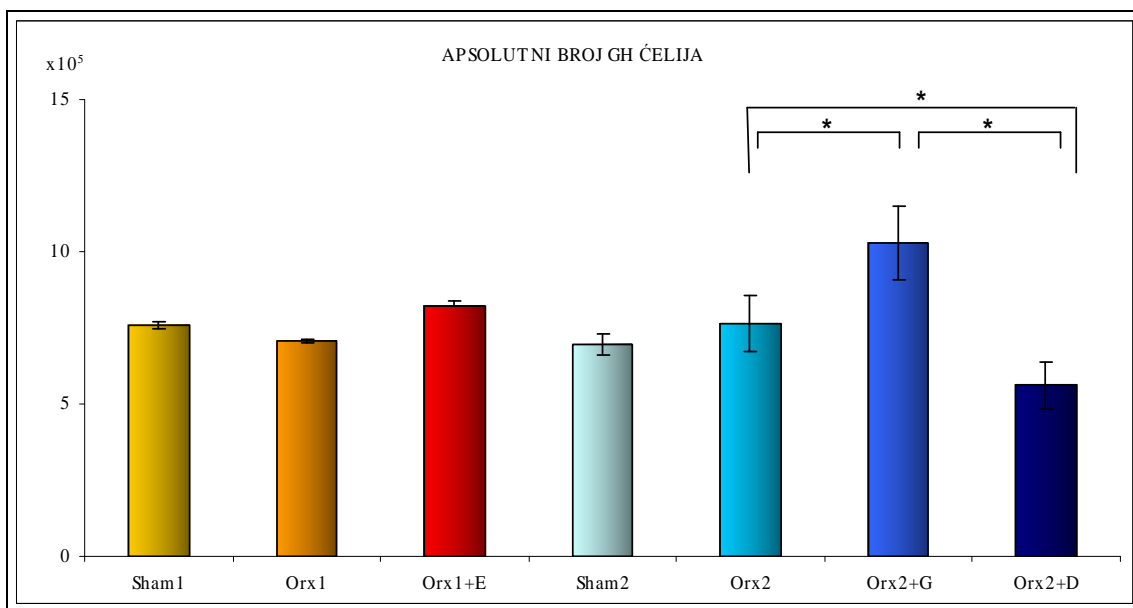
Numerička gustina ( $N_v$ ) Sham1 grupe iznosila je  $17,9 \pm 0,8 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ , a Orx1  $13,6 \pm 0,8 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ , odnosno nakon orhidektomije dolazi do statistički značajno smanjenja ( $p < 0,05$ ) ovog parametra od 24% u odnosu na Sham1 grupu. Statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ )  $N_v$  GH ćelija od 39% zabeleženo je u Orx1+E grupi u odnosu na Orx1 grupu, a vrednost je iznosila  $8,3 \pm 0,8 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$  (Histogram 4.8).

$N_v$  GH ćelija Sham2 grupe je iznosila je  $16,4 \pm 1,4 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ . Vrednost istog parametra u Orx1 grupi iznosila je  $16,8 \pm 2,1 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ , a u Orx2+G grupi bila je  $18,3 \pm 2,8 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ . Nakon tretmana daidzeinom orhidektomisanih pacova (Orh2+D grupa), u kojoj je vrednost pomenutog parametra iznosila  $10,8 \pm 0,6 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ , došlo je do statistički značajnog ( $p < 0,05$ ) smanjenje zastupljenosti GH ćelija u odnosu na Orx2 grupu za 36%, kao i za 41% u odnosu na Orx2+G grupu (Histogram 4.8).

#### 4.3.4.3. Apsolutni broj GH ćelija

Apsolutni broj GH ćelija Sham1 grupe je iznosio  $7,6 \pm 0,11 \times 10^5$ , dok je apsolutni broj GH ćelija Orx1 grupe je bio  $7,1 \pm 0,5 \times 10^5$ . Vrednost apsolutnog broja GH ćelija u Orx1+E grupi iznosila je  $8,2 \pm 0,01 \times 10^5$  (Histogram 4.9).

Apsolutni broj GH ćelija Sham2 grupe iznosio je  $7,0 \pm 0,3 \times 10^5$ , a apsolutni broj GH ćelija Orx2 grupe bio je  $7,6 \pm 0,9 \times 10^5$ . Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje apsolutnog broja GH ćelija za 35 % u odnosu na Orx2 grupu zabeleženo je u Orx2+G grupi, i vrednost je iznosila  $10,3 \pm 1,2 \times 10^5$ . Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje apsolutnog broja GH ćelija za 27 % i 45 % u odnosu na Orx2 grupu, odnosno Orx2+G grupu zabeleženo je u Orx2+D grupi, a izračunata vrednost je bila  $5,6 \pm 0,8 \times 10^5$  (Histogram 4.9).

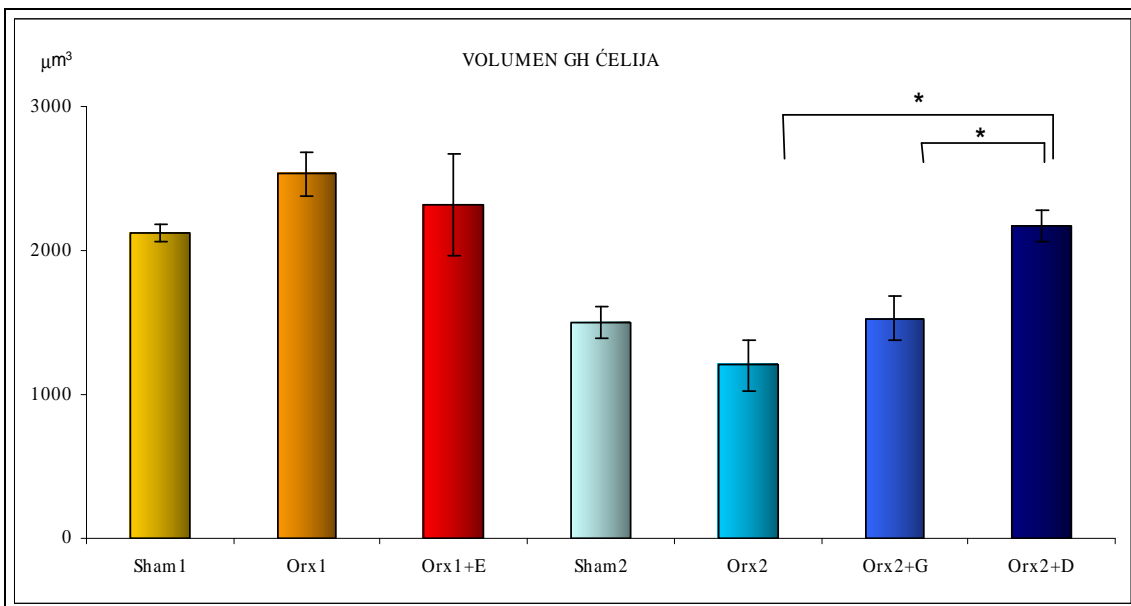


**Histogram 4.9.** Apsolutni broja GH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

#### 4.3.4.4. Volumen GH ćelija

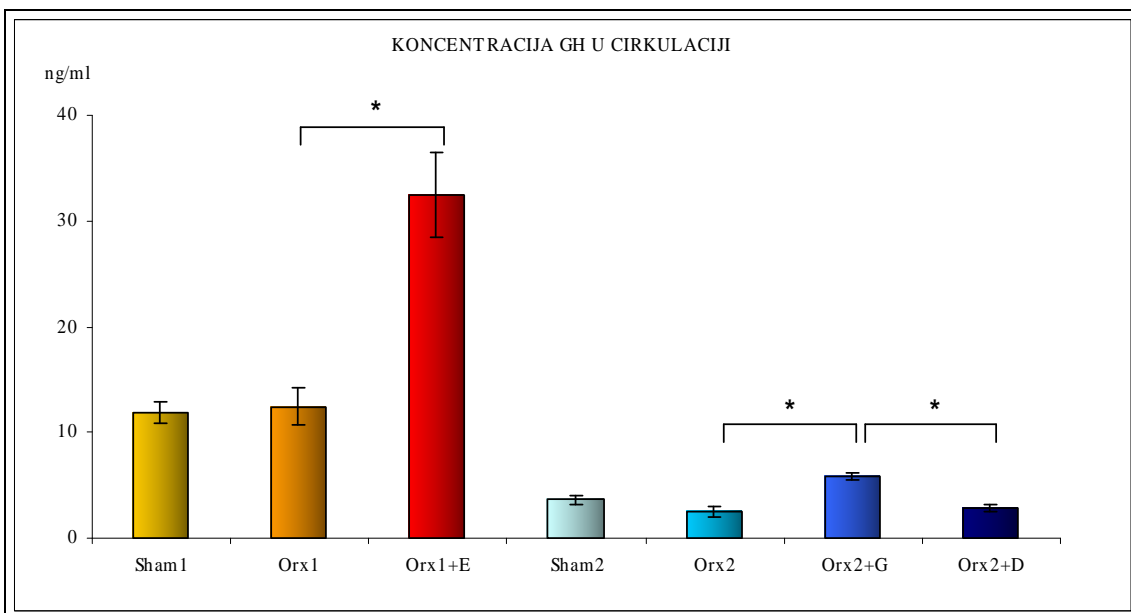
Volumeni GH ćelija Sham1 i Orx1 grupe bili su  $2121,2 \pm 62,6 \mu\text{m}^3$ , odnosno  $2533,2 \pm 153,0 \mu\text{m}^3$ , dok je u Orx1+E grupi isti parametar imao vrednost od  $2319,1 \pm 357,0 \mu\text{m}^3$  (Histogram 4.10).

Volumeni GH ćelija Sham2 i Orx2 grupe bili su  $1498,0 \pm 109,2 \mu\text{m}^3$ , odnosno  $1203,8 \pm 174,9 \mu\text{m}^3$ . Volumeni GH ćelija Orx2+G i Orx2+D grupe bili su  $1527,4 \pm 150,1 \mu\text{m}^3$ , odnosno  $2172,6 \pm 110,8 \mu\text{m}^3$ . Statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) volumena GH ćelija od 80 % i 42 % zabeleženo je kod Orx2+D grupe, u odnosu na Orx2, odnosno Orx2+G grupu, (Histogram 4.10).



**Histogram 4.10.** Volumena GH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

#### 4.3.5. Koncentracija GH u cirkulaciji



**Histogram 4.11.** Promene koncentracije GH u cirkulaciji adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) i daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

Koncentracije GH u cirkulaciji Sham1 i Orx1 grupe iznosili su  $11,8 \pm 1,0$  ng/ml, odnosno  $12,5 \pm 1,7$  ng/ml. Statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) nivoa GH od 161%



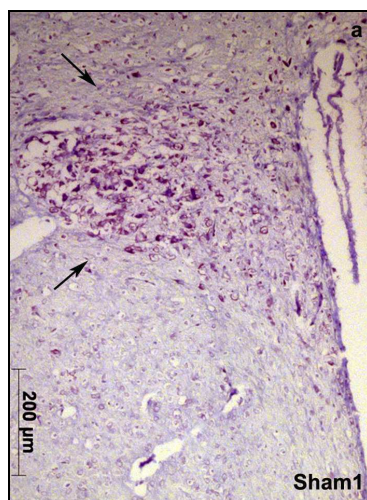
zabeleženo je nakon hroničnog tretmana estradiol-diproprionatom, a vrednost parametra je iznosila  $11,8 \pm 1,0$  ng/ml (Histogram 4.11).

U Sham2 i Orx2 grupi vrednosti koncentracije GH u cirkulaciji su iznosile  $3,6 \pm 0,4$  ng/ml, odnosno  $2,6 \pm 0,5$  ng/ml. Tretman genisteinom doveo je do statistički značajnog povećanja ( $p < 0,05$ ) koncentracije GH od 127% u odnosu na Orx1 grupu, a njena vrednost je bila  $5,9 \pm 0,3$  ng/ml. Vrednost koncentracije GH u Orx2+D grupi bila je  $2,9 \pm 0,3$  ng/ml, što predstavlja statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) od 51% u poređenju sa Orx2+G grupom (Histogram 4.11).

#### **4.4. Adrenokortikotropni sistem adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom**

##### **4.4.1. Histološke karakteristike paraventrikularnog jedra i eminencije medijane**

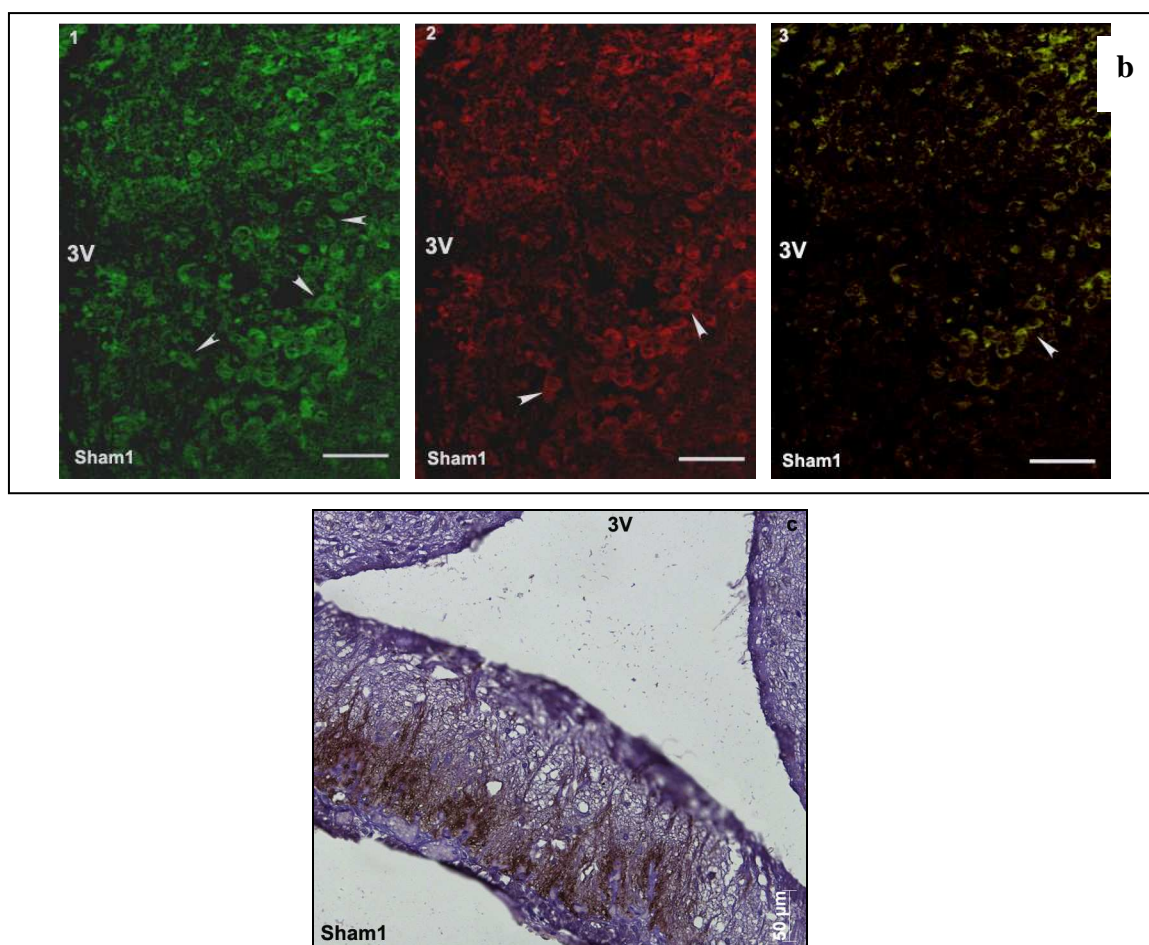
##### **4.4.1.1. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham1 grupa)**



**Slika 4.22.** a) Frontalni presek hipotalamusa u nivou PVN lažno orhidektomisanih pacova (Sham1), krezil-ljubičasto, bar-200  $\mu$ m.

PVN prostire se u medijalnoj zoni anteriornog hipotalamusa. To je parno jedro koje je ograničeno trećom moždanom komorom i regionom koji je karakterističan po izuzetno malom (siromašnom) prisustvu ćelijskih elemenata (Slika 4.22a). PVN čine krupni magnocelularni neuroni, koji su predominantno grupisani u lateralnom delu jedra. Oni predstavljaju deo hipotalamo-hipofiznog magnocelularnog sistema koji se projektuje do neurohipofize gde dolazi do oslobađanja oksitocina i vazopresina u

sistemsku cirkulaciju. Sitni parvocelularni neuroni grupisani su najvećim delom u medijalnom području jedra i deo su hipotalamo-hipofiznog parvicelularnog sistema.



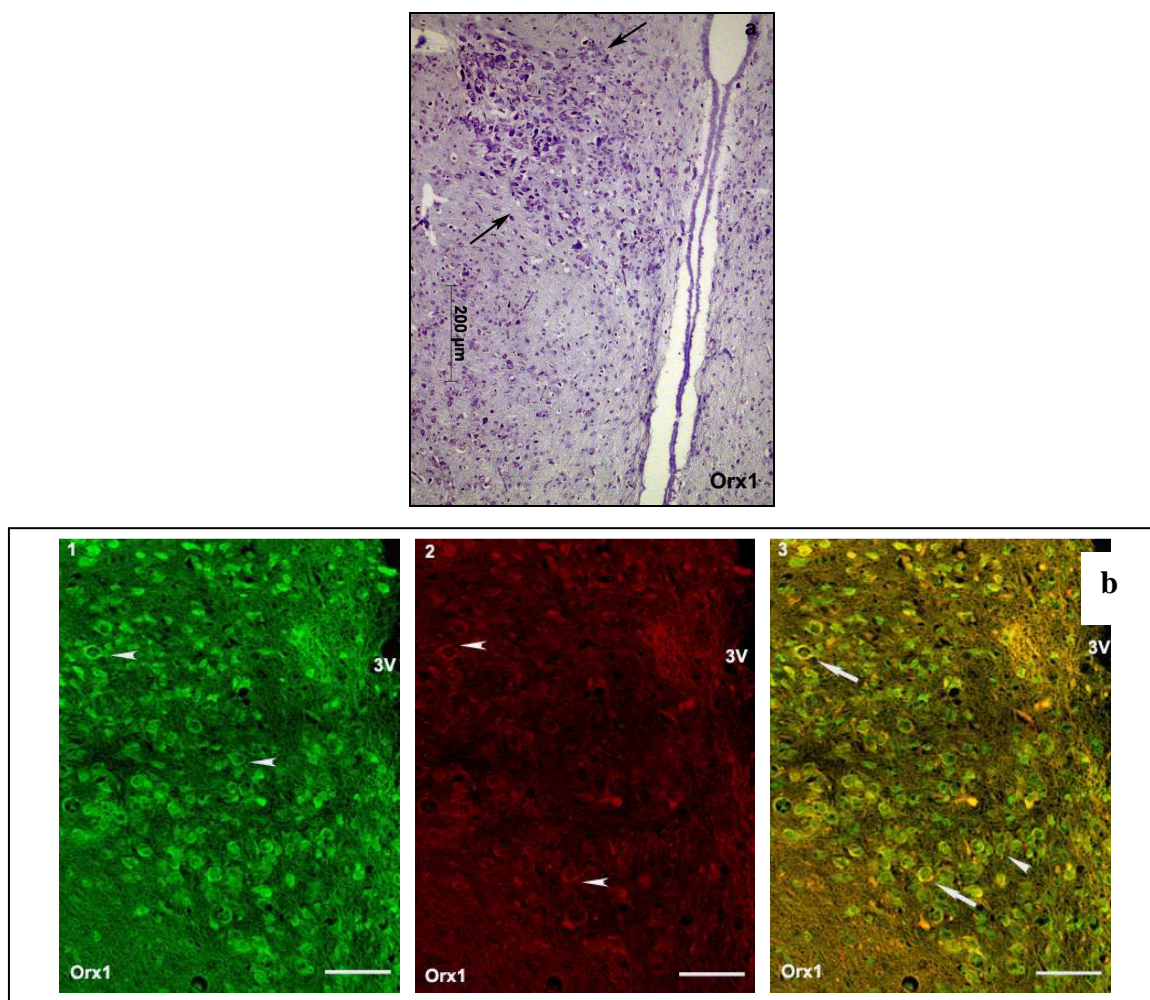
**Slika 4.22.** b) 1-imunoreaktivni CRH neuroni (zeleno obojene ćelije označene glavom strelice); 2-imunoreaktivni cFos neuroni (crveno obojene ćelije označene glavom strelice); 3-imunoreaktivni CRH/cFos neuroni na frontalnom preseku medijalne zone PVN Sham1 grupe pacova, bar-50μm; c) CRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Sham1 grupe pacova, bar-50μm; 3V-treća moždana komora.

CRH imunoreaktivnost prisutna je u većini ćelija PVN, dok je manji broj CRH ćelija aktivan tj. pokazuje imunopozitivnost na cFos (Slika 4.22b). Aksoni ovog sistema dosežu do ME, gde između ostalih hormona, oslobađaju kortikotropni oslobađajući hormon (CRH) u spoljašnju zonu ME (Slika 4.22c).

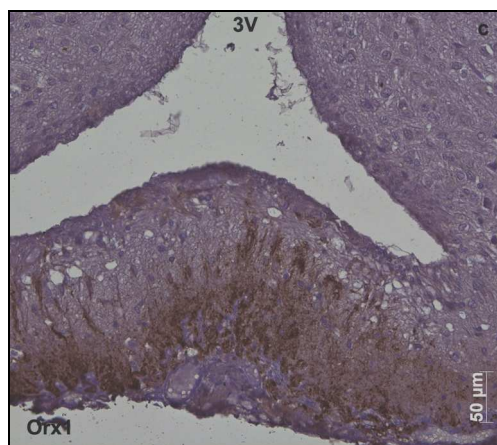
#### 4.4.1.2. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1 grupa)

Histološkom analizom serijskih frontalnih preseka PVN Orx1 grupe uočena je veća površina koje ovo jedro zauzima u odnosu na površinu PVN u Sham1 grupi (Slika

4.23a). Brojnost imunofluorescentno obeleženih CRH i CRH/cFos neurona nakon orhidektomije povećana je u odnosu na brojnost pomenutih neurona u Sham1 grupi (Slika 4.23b). Povećana CRH imunopozitivnost se zapaža u spoljašnjoj zoni ME, mestu gde se CRH oslobađa iz aksonskih završetaka i prelazi u hipotalamo-hipofizni kapilarni sistem (Slika 4.23c).



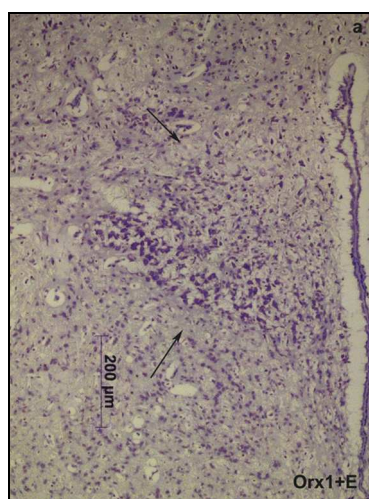
**Slika 4.23.** a) Frontalni presek u nivou PVN hipotalamusa orhidektomisanih pacova (Orx1), krezil-ljubičasto, bar-200 µm; b) 1-imunoreaktivni CRH neuroni (zeleno obojene ćelije označene glavom strelice), 2-imunoreaktivni cFos neuroni (crveno obojene ćelije označene glavom strelice), 3-imunoreaktivni CRH/cFos neuroni (žuto-narandžasto obojene ćelije označene strelicom) na frontalnom preseku medijalne zone PVN Orx1 grupe pacova; bar-50µm; 3V-treća moždana komora.



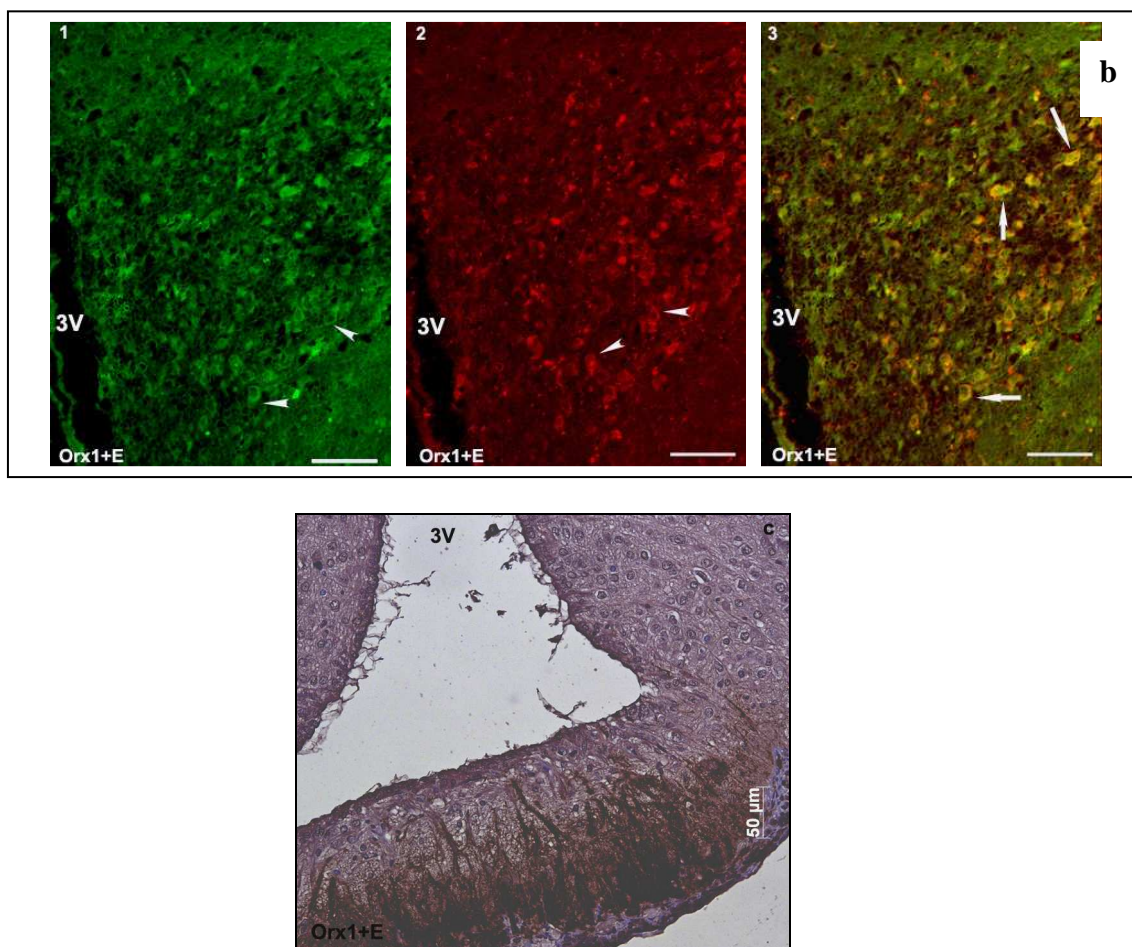
**Slika 4.23.** c) CRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx1 grupe pacova, bar-50  $\mu\text{m}$ , 3V-treća moždana komora.

#### 4.4.1.3. Paraventricularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1+E grupa)

Nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom dolazi do povećanja površine PVN u odnosu na Orx1 grupu (Slika 4.24a). Histološkom analizom je utvrđeno da brojnost CRH neurona PVN nije promenjena nakon tretmana estradiol-dipropionatom (Slika 4.24b-1), dok je aktivnost CRH neurona povećana uzevši u obzir povećan broj duplo-imunofluorescentno obeleženih CRH/cFos neurona u odnosu na brojnost CRH/cFos neurona u Orx1 grupi (slika 4.24b-3). Takođe je zapaženo i povećanje intenziteta obojenosti CRH neurosekreta u spoljašnjoj zoni ME nakon tretman estradiol-dipropionatom (slika 4.24c).



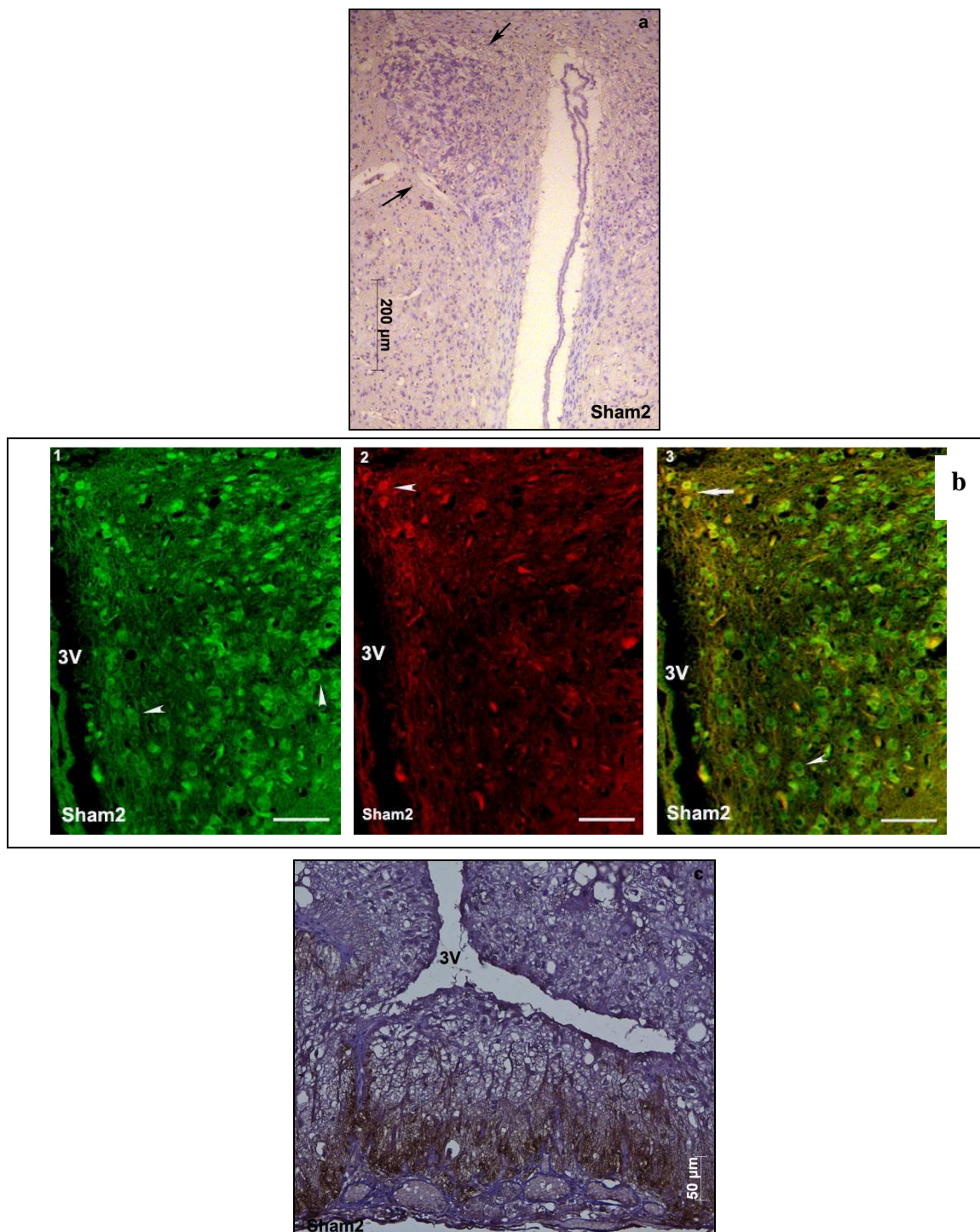
**Slika 4.24.** a) Frontalni presek u nivou PVN hipotalamusa orhidektomisanih pacova hronično tretiranih estradiol-dipropionatom (Orx1+E), krezil-ljubičasto, bar-200  $\mu\text{m}$ .



**Slika 4.24.** b) 1-imunoreaktivni CRH neuroni (zeleno obojene ćelije, obeležene glavom strelice), 2-imunoreaktivni cFos neuroni (crveno obojene ćelije, obeležene glavom strelice), 3-imunoreaktivni CRH/cFos neuroni (žuto-narandžasto obojene ćelije, obeležene strelicom) na frontalnom preseku medijalne zone PVN Orx1+E grupe pacova, bar-50μm; c) CRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx1+E grupe pacova, bar-50 μm; 3V-treća moždana komora.

#### 4.4.1.4. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana lažno orhidektomisanih adultnih pacova (Sham2 grupa)

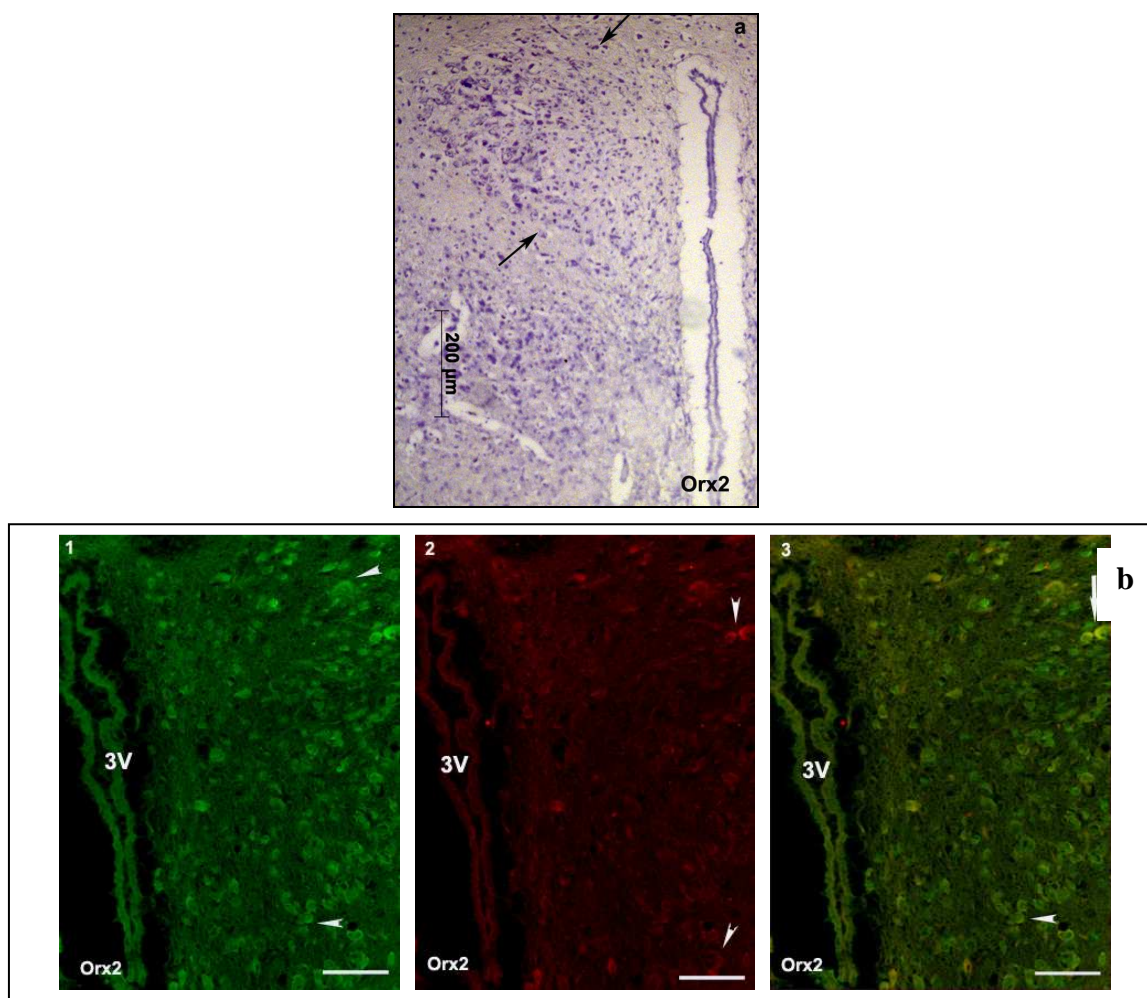
U anteriornom hipotalamusu Sham2 u PVN uočljivi su krupni magnocelularni i sitni parvicelularni neuroni (Slika 4.25a). CRH imunopozitivnost uočava se u oba tipa neurona (Slika 4.25b-1). Na osnovu prisustva duplo imunofluorescentno obeleženih CRH/cFos neurona zapaža se manji broj aktivanih CRH neurona u poređenju sa ukupnim brojem CRH neurona (Slika 4.25b-3). Nervna vlakna parvicelularnih neurona PVN dosežu do spoljašnje zone ME, gde oslobađaju CRH neurosekret u hipotalamo-hipofizni kapilarni splet (Slika 4.25c).



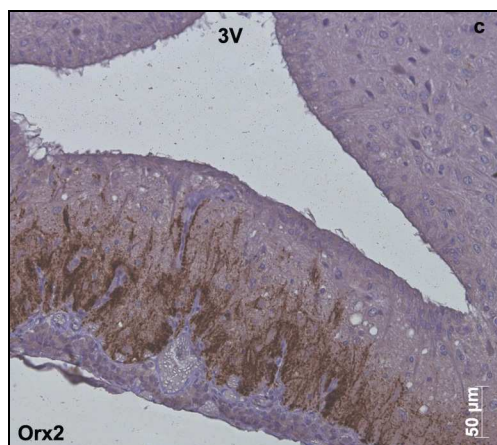
**Slika 4.25.** a) Frontalni presek u nivou PVN hipotalamusa lažno orhidektomisanih pacova (Sham2), krezil-ljubičasto, bar-200 µm; b) 1-imunoreaktivni CRH neuroni (zeleno obojene ćelije, obeležene glavom strelice), 2-imunoreaktivni cFos neuroni (crveno obojene ćelije, obeležene glavom strelice), 3-imunoreaktivni CRH/cFos neuroni (žuto-narandžasto obojene ćelije, obeležene strelicom) na frontalnom preseku medijalne zone PVN Sham2 grupe pacova, bar-50µm; c) CRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Sham2 grupe pacova, bar-50 µm; 3V-treća moždana komora.

#### 4.4.1.5. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2 grupa)

Histološka slika PVN je promenjena nakon orhidektomije adultnih pacova, u smislu povećanja površine jedra na serijskim presecima u odnosu na Sham2 grupu. U medijalnoj zoni ovog jedra jasno su uočljivi sitni i krupni neuroni (Slika 4.26a). Brojnost imunopozitivnih CRH i CRH/cFos neurona medijalne zone PVN povećana je nakon orhidektomije adultnih pacova (Slika 4.26b). Ovo povećanje brojnosti i aktivnosti CRH neurona praćeno je povećanim sadržajem CRH neurosekreta u ME Orx2 grupe u poređenju sa Sham2 grupom pacova (Slika 4.26c).



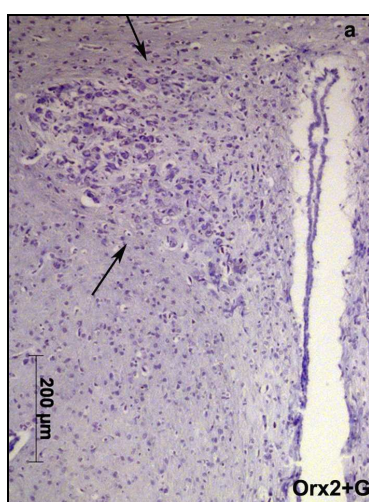
**Slika 4.26.** a) Frontalni presek u nivou PVN hipotalamusa orhidektomisanih pacova (Orx1), krezil-ljubičasto, bar-200 μm; b) 1-imunoreaktivni CRH neuroni (zeleno obojene ćelije, obeležene glavom strelice), 2-imunoreaktivni cFos neuroni (crveno obojene ćelije, obeležene glavom strelice), 3-imunoreaktivni CRH/cFos neuroni (žuto-narandžasto obojene ćelije, obeležene strelicom) na frontalnom preseku medijalne zone PVN Orx2 grupe pacova, bar-50μm; 3V-treća moždana komora.



**Slika 4.26.** c) CRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx2 grupe pacova, bar-50  $\mu\text{m}$ ; 3V-treća moždana komora.

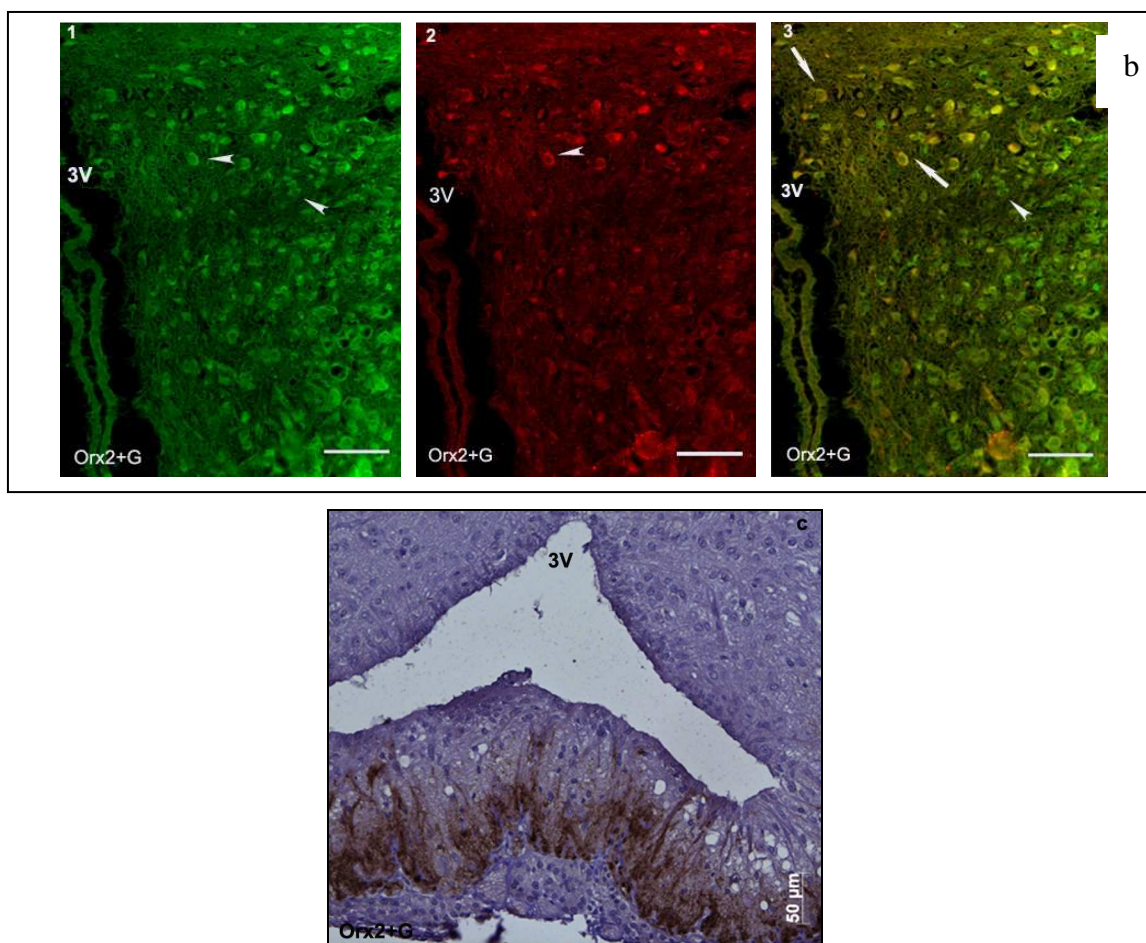
#### 4.4.1.6. Paraventricularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana genisteinom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2+G grupa)

Hroničan tretman genisteinom nije doveo do značajne promene površine PVN u odnosu na površinu jedra u Orx2 grupi (Slika 4.27a). Uočavaju se magnocelularni neuroni u lateralnoj, kao i parvocelularni neuronu u medijalnoj zoni PVN (Slika 4.27a). Nakon tretmana genisteinom brojnost imunoobeležanih CRH i CRH/cFos neurona PVN povećana je u poređenju sa brojem neurona Orx2 grupe (Slika 4.27b). Nervna vlakna parvicelularnog sistema oslobađaju CRH neurosekret u ME. Intenzitet obojenosti CRH neurosekreta u ME nije promenjen nakon tretmana genisteinom u odnosu na Orx2 grupu (Slika 4.27c).



**Slika 4.27.** a) Frontalni presek u nivou PVN hipotalamusa orhidektomisanih pacova hronično tretiranih genisteinom (Orx2+G), krezil-ljubičasto, bar-200  $\mu\text{m}$ .

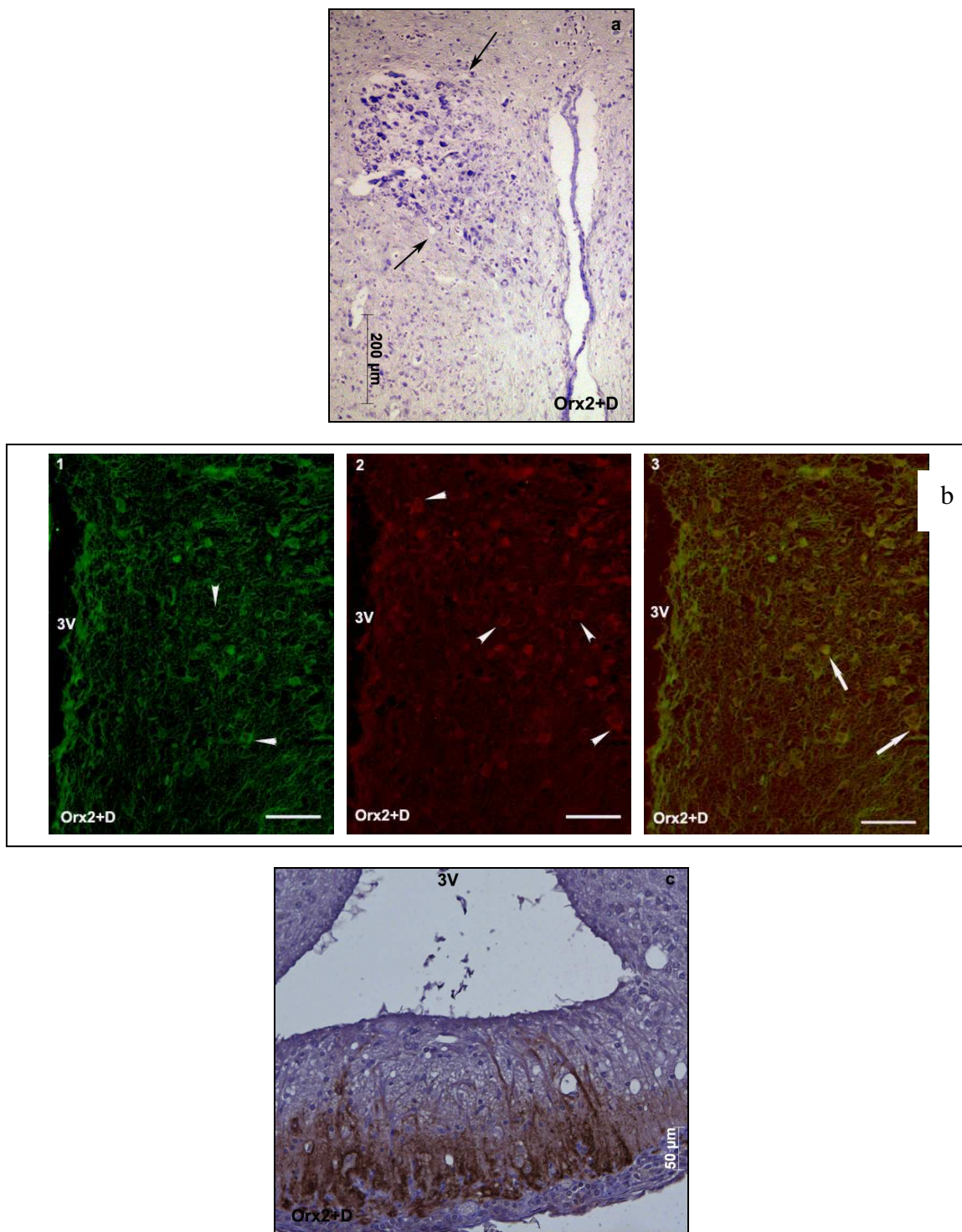




**Slika 4.27.** b) 1-imunoreaktivni CRH neuroni (zeleno obojene ćelije, označene glavom strelice), 2-imunoreaktivni cFos neuroni (crveno obojene ćelije, označene glavom strelice), 3-imunoreaktivni CRH/cFos neuroni (žuto-narandžasto obojene ćelije, strelica) na frontalnom preseku medijalne zone PVN Orx2+G grupe pacova, bar-50 $\mu$ m; c) CRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx2+G grupe pacova, bar-50  $\mu$ m, 3V-treća moždana komora.

#### 4.4.1.7. Paraventrikularno jedro i eminencija medijana nakon hroničnog tretmana daidzeinom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2+D grupa)

Hroničan tretman daidzeinom nije doveo do promena histološke slike PVN u odnosu na Orx2 grupu. Površina PVN Orx2+D grupe približno je jednaka površini jedra Orx2 grupe (Slika 4.28a). Brojnost CRH neurona u PVN nakon tretmana daidzeinom smanjena je u odnosu brojnost neurona u Orx2 grupi (Slika 4.28b-1). S druge strane brojnost duplo-imunopozitivnih CRH/cFos neurona povećana je u odnosu na Orx2 grupu (Slika 4.28b-3). Imunoreaktivnost CRH u spoljašnjoj zoni ME približno je ista kao CRH imunoobojevnost u Orx2 grupi (Slika 4.28c).



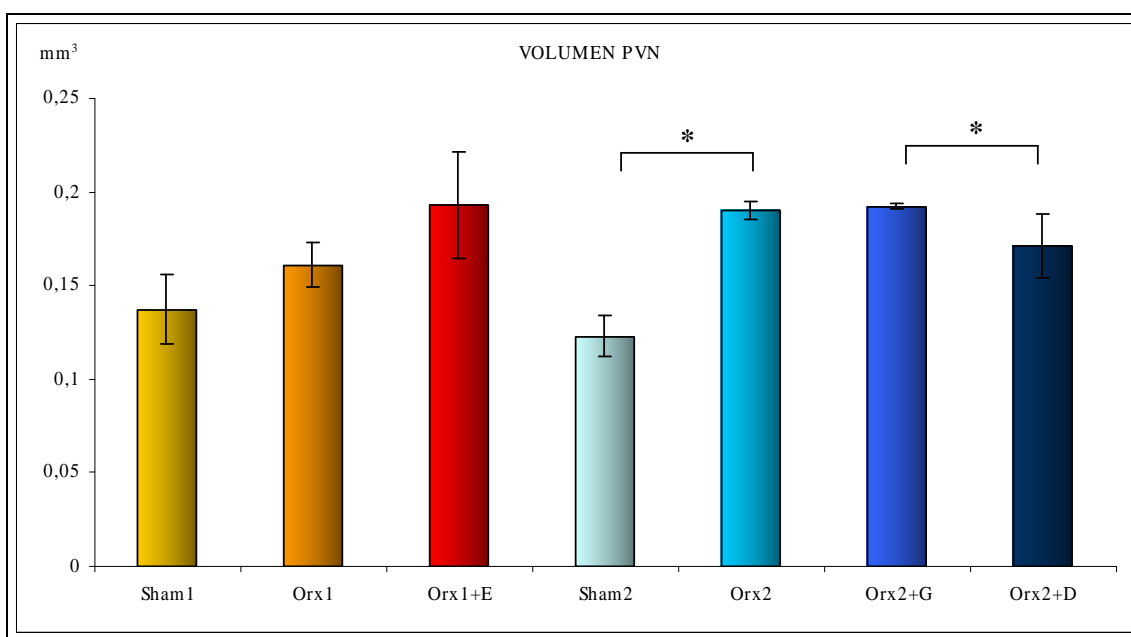
**Slika 4.28.** a) Frontalni presek u nivou PVN hipotalamusa orhidektomisanih pacova hronično tretiranih daidzeinom (Orx2+D), krezil-ljubičasto, bar-200 µm; b) 1- imunoreaktivni CRH neuroni (zeleno obojene ćelije, označeni glavom strelice), 2- imunoreaktivni cFos neuroni (crveno obojene ćelije, označene glavom strelice), 3- imunoreaktivni CRH/cFos neuroni (žuto-narandžasto obojene ćelije, označene strelicom) na frontalnom preseku medijalne zone PVN Orx2+D grupe pacova; bar-50µm, c) CRH imunoreaktivnost na frontalnom preseku hipotalamusa u nivou ME Orx2+D grupe pacova, bar-50 µm; 3V-treća moždana komora.

#### 4.4.2. Stereološke karakteristike paraventrikularnog jedra hipotalamusa adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom

##### 4.4.2.1. Volumen paraventrikularnog jedra

Prosečni volumen PVN Sham1 grupe iznosio je  $0,137 \pm 0,017 \text{ mm}^3$ . Vrednosti volumena PVN nakon orhidektomije i hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom iznosili su  $0,161 \pm 0,012 \text{ mm}^3$ , odnosno  $0,193 \pm 0,029 \text{ mm}^3$  (Histogram 4.12).

Prosečna vrednost volumena PVN Sham2 grupe iznosila je  $0,123 \pm 0,011 \text{ mm}^3$ . Orhidektomija je dovela do statistički značajnog ( $p < 0,05$ ) povećanja volumena PVN za 55%, a vrednost je iznosila  $0,190 \pm 0,005 \text{ mm}^3$ . Volumen PVN nakon hroničnog tretmana genisteinom iznosio je  $0,192 \pm 0,019 \text{ mm}^3$ . Prosečan volumen PVN pacova hronično tretiranih daidzeinom iznosio je  $0,171 \pm 0,017 \text{ mm}^3$ , što je statistički ( $p < 0,05$ ) značajno smanjenje za 11% u odnosu na odgovarajući parametar Orx2+G grupe (Histogram 4.12).



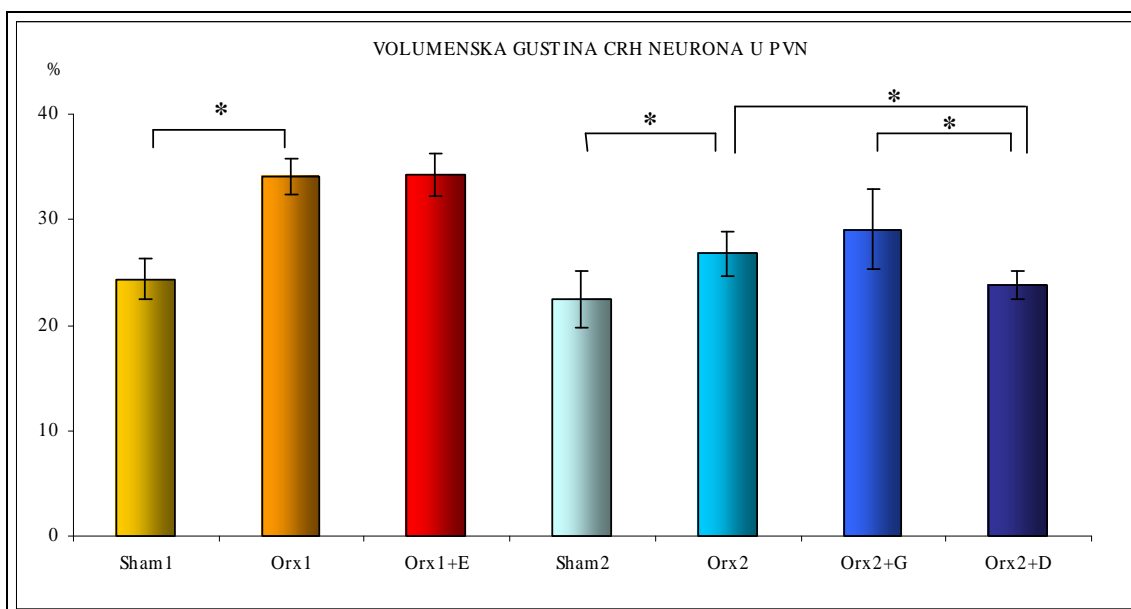
**Histogram 4.12.** Volumena PVN adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

##### 4.4.2.2. Volumenska gustina CRH neurona u PVN

Volumenska gustina CRH neurona u PVN Sham1 grupe pacova iznosila je  $24,33 \pm 1,96 \%$ . Nakon orhidektomije vrednost ovog parametra iznosila je  $34,04 \pm 1,71\%$ , što predstavlja statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) od 40% u odnosu na odgovarajući

parametar Sham1 grupe. Vrednost navedenog parametra nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom iznosila je  $34,30 \pm 2,03\%$ , (Histogram 4.13).

Procentualna zastupljenost CRH neurona u PVN Sham2 grupe je iznosila  $22,43 \pm 2,69\%$ . Orhidektomija je dovela do statistički značajnog povećanja ( $p < 0,05$ ) pomenutog parametra za 19% i on je u Orx2 grupi iznosio  $26,78 \pm 2,11\%$ . Nakon orhidektomije i hroničnog tretmana genisteinom procentualna zastupljenost CRH neurona u PVN iznosila je  $29,06 \pm 3,77\%$ . Statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) procentualne zastupljenosti CRH neurona od 11%, odnosno 18%, zabeleženo je u nakon hroničnog tretmana daidzeinom u odnosu na Orx2, odnosno Orx2+G grupu pacova (Histogram 4.13).

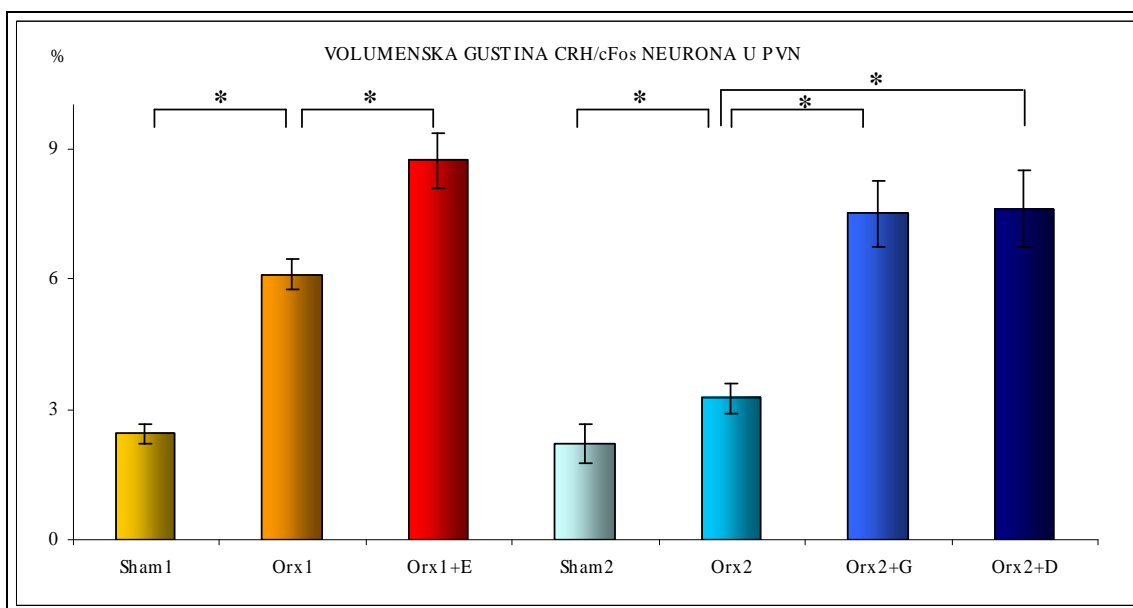


**Histogram 4.13.** Volumenska gustina CRH neurona PVN adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

#### 4.4.2.3. Volumenska gustina duplo-imunoobeležanih CRH/cFos u PVN

Volumenska gustina CRH/cFos neurona u PVN Sham1 grupe pacova iznosila je  $2,44 \pm 0,22\%$ . Orhidektomija je dovela do statistički značajnog povećanja ( $p < 0,05$ ) volumenske gustine CRH/cFos neurona od 150% i vrednost ovog parametra u Orx1 grupi je iznosila  $6,10 \pm 0,33\%$ . Vrednost ovog parametra nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom bila je  $8,72 \pm 2,03\%$ , što je statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) od 43% u odnosu na odgovarajući parametar u Orx1 grupi (Histogram 4.14).

Vrednost volumenske gustine CRH/cFos neurona u PVN Sham2 grupe je iznosila  $2,21 \pm 0,44\%$ . Orhidektomija je dovela do statistički značajnog povećanja ( $p < 0,05$ ) pomenutog parametra za 47% i on je u Orx2 grupi iznosio  $3,25 \pm 0,34\%$ . Nakon hroničnog tretmana genisteinom, odnosno daidzeinom volumenska gustina CRH/cFos neurona u PVN iznosila je  $7,49 \pm 0,74\%$ , odnosno  $7,60 \pm 0,88\%$ , što predstavlja statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) od 131% odnosno 134% u odnosu na odgovarajući parametar Orx2 grupe, (Histogram 4.14)

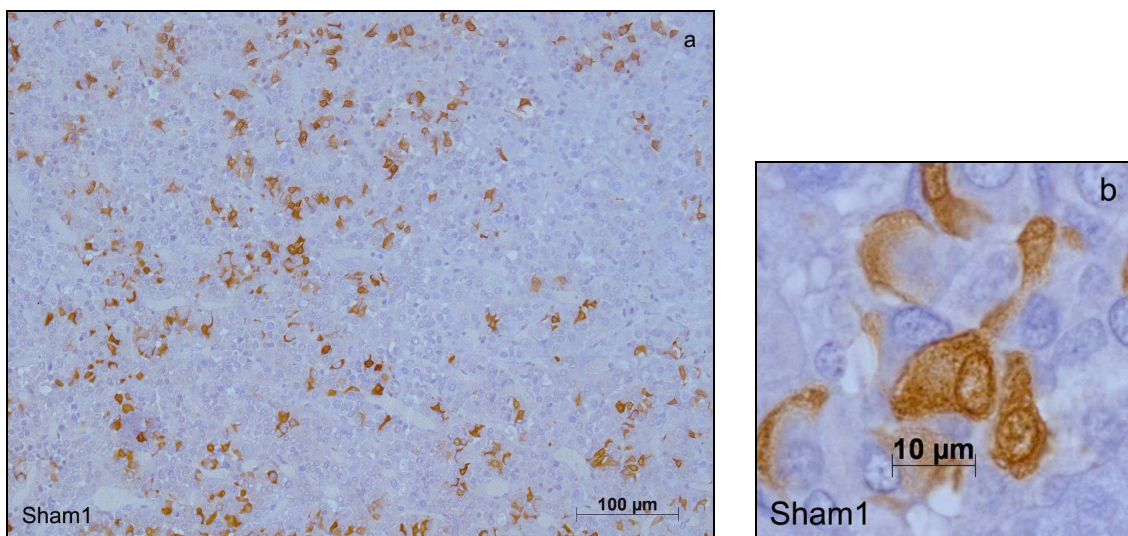


**Histogram 4.14.** Volumenska gustina CRH/cFos neurona PVN adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmanh estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

#### 4.4.3. Histološke karakteristike adrenokortikotropnih (ACTH) ćelija hipofiza

##### 4.4.3.1. ACTH ćelije lažno operisanih adultnih pacova (Sham1 grupa)

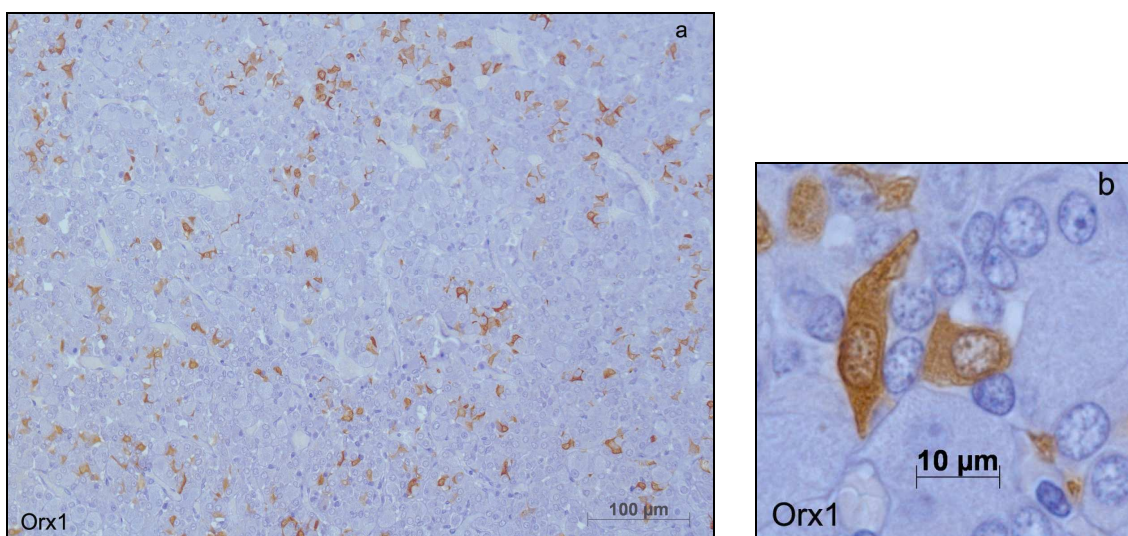
ACTH ćelije lažno orhidektomisanih adultnih pacova Sham1 grupe raspoređene su u grupama, češće nego pojedinačne. Između ovih ćelija uočljiv je bogat splet krvnih kapilara. Oblik ACTH ćelija je nepravilan, od elipsoidnog do zvezdolikog (Slika 4.29a). Zvezdolike ćelije imaju jasno uočljive citoplazmatične produžetke kojim obuhvataju druge ćelije ili ih pružaju između njih. U citoplazmi je uočljivo ovalno jedro, ekscentrično postavljeno (Slika 4.29b).



**Slika 4.29.** Imunoreaktivne ACTH ćelije u adenohipofizi lažno orhidektomisanih pacova (Sham1) a) bar 100 µm b) bar 10µm.

#### 4.4.3.2. ACTH ćelije orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1 grupa)

Histološkom analizom uočeno je smanjenje brojnosti ACTH ćelija nakon orhidektomije (Slika 4.30a). Ćelije su nepravilnog oblika, dominiraju svetlije ćelije u odnosu na intenzitet obojenosti u Sham1 grupi (Slika 4.30b).

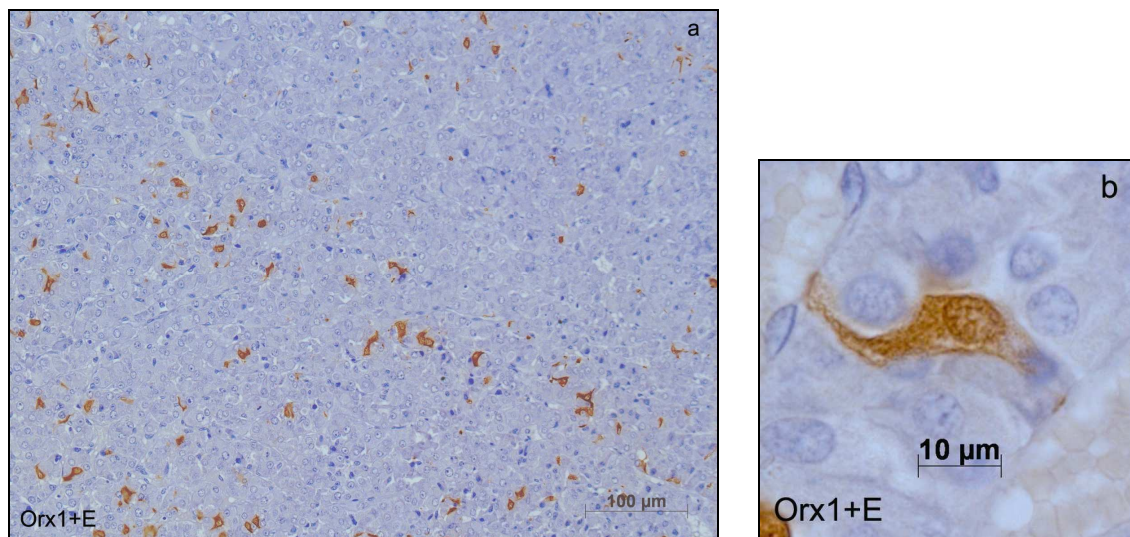


**Slika 4.30.** Imunoreaktivne ACTH ćelije u adenohipofizi orhidektomisanih pacova (Orx1) a) bar 100 µm; b) bar 10µm.

#### 4.4.3.3. ACTH ćelije nakon hroničnog tretmana estradiol-dipropionatom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx1+E grupa)

Nakon tretmana orhidektomisanih pacova estradiolo-dipropionatom uočeno je značajno smanjenje brojnosti ACTH ćelija (Slika 4.31a). ACTH ćelije su nepravilnog

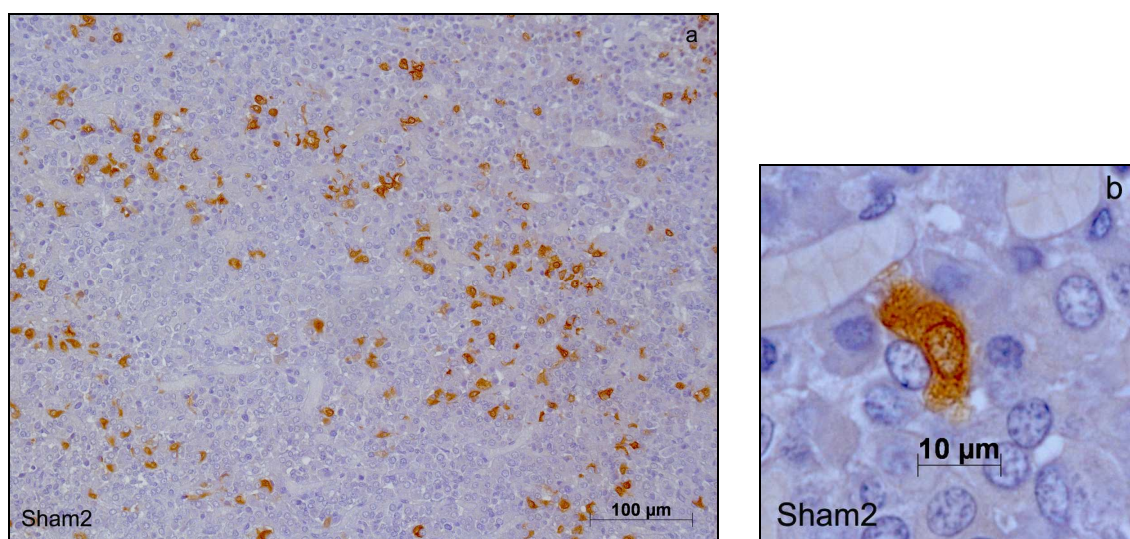
oblika i često naležu na krvne kapilare. Intenzitet obojenosti citoplazme ACTH ćelija ove grupe smanjen je u poređenju sa intenzitetom obojenosti ACTH ćelija Orx1 grupe (Slika 4.31b).



**Slika 4.31.** Imunoreaktivne ACTH ćelije u adenohipofizi orhidektomisanih pacova hronično tretiranih estradiol-dipropionatom (Orx2+E) a) bar 100 µm b) bar 10µm.

#### 4.4.3.4. ACTH ćelije lažno operisanih adultnih pacova (Sham2 grupa)

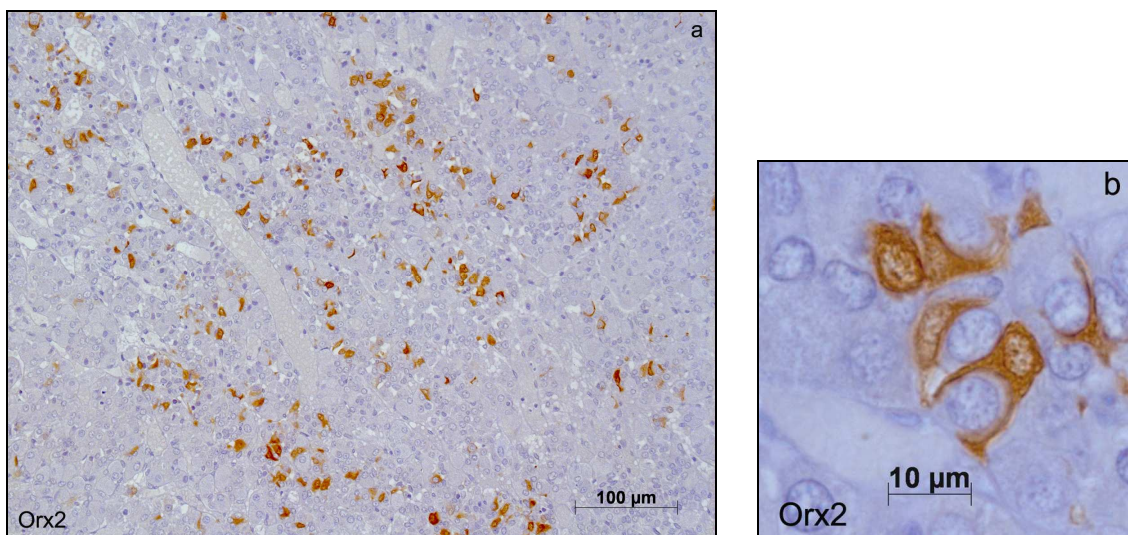
Imunopozitivne ACTH ćelije Sham2 grupe raspoređene su relativno ravnomerno po *pars distalis* hipofize između razgranate mreže krvnih kapilara (Slika 4.32a). Intenzivno obojena citoplazma okružuje ekscentrično postavljeno, ovalno jedro ACTH ćelija (Slika 4.32b).



**Slika 4.32.** Imunoreaktivne ACTH ćelije u adenohipofizi lažno orhidektomisanih pacova (Sham2) a) bar 100 µm; b) bar 10µm.

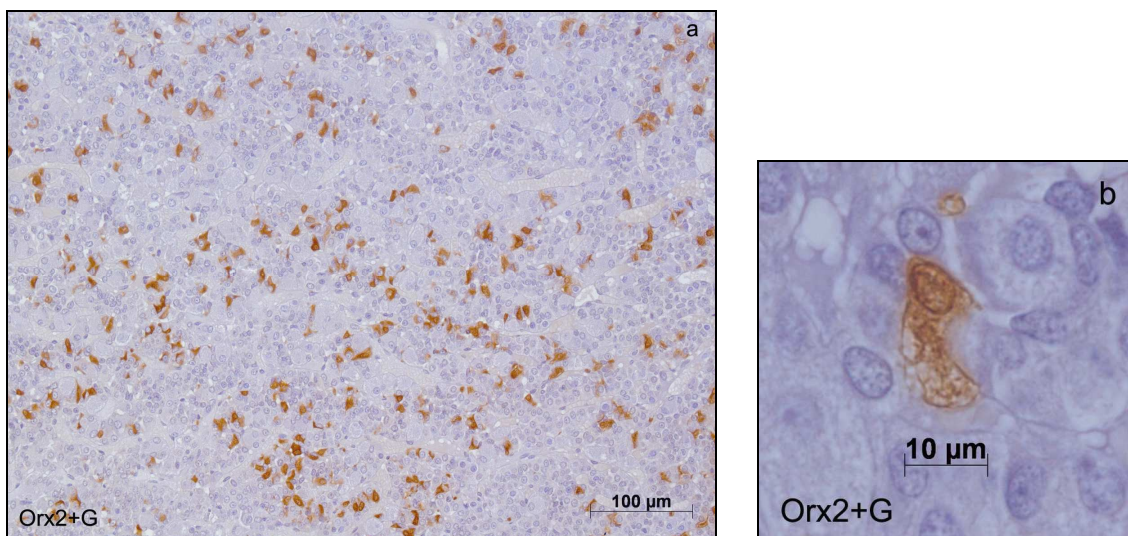
#### 4.4.3.5. ACTH ćelije orhidektomisanih adulta pacova (Orx2)

ACTH ćelije hipofize orhidektomisanih pacova ne razlikuju se značajno u pogledu brojnosti i lokalizacije u poređenju sa istim tipom ćelija kod Sham2 grupe životinja (Slika 4.33a). Zvezdolikog su oblika, sa izduženim citoplazmatičnim nastavcima koji se protežu između susednih ćelija. Citoplazma ACTH ćelija ravnomerno je obojena, a ćelije sa svetlom citoplazmom dominiraju (Slika 4.33b).



**Slika 4.33.** Imunoreaktivne ACTH ćelije u adenohipofizi orhidektomisanih mužjaka pacova (Orx2) a) bar 100 µm; b) bar 10µm.

#### 4.4.3.6. ACTH ćelije nakon hroničnog tretmana genisteinom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2+G grupa)



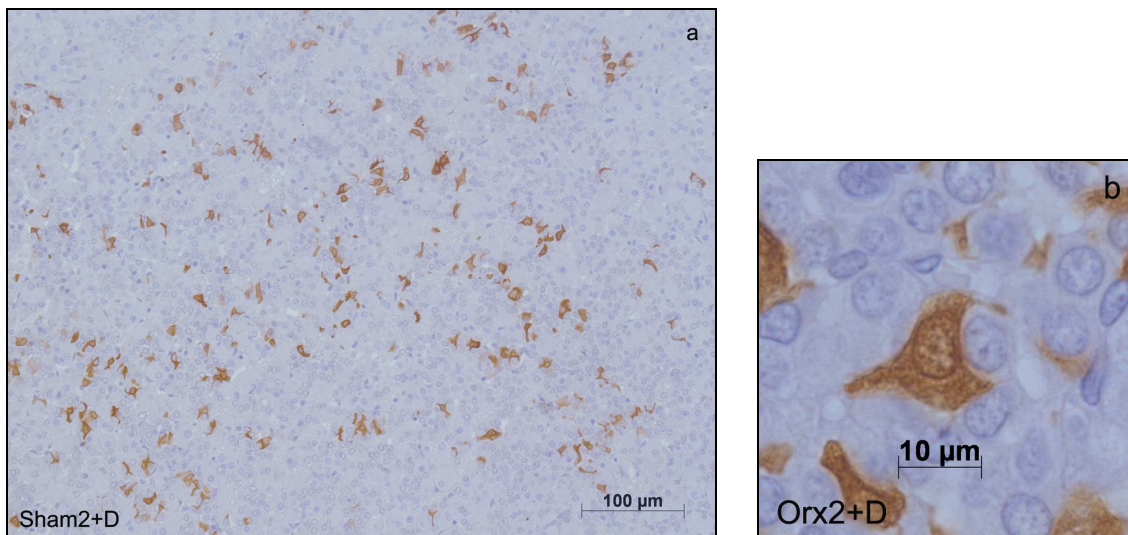
**Slika 4.34.** Imunoreaktivne ACTH ćelije u adenohipofizi orhidektomisanih pacova hronično tretiranih genisteinom (Orx2+G) a) bar 100 µm; b) bar 10µm.



Nakon hroničnog tretmana genisteinom uočeno je povećanje brojnosti ACTH ćelija u odnosu na Orx1 grupu (Slika 4.34a). Citoplazma većine ACTH ćelije nije ravnomerno obojena, već se uočavaju prosvetljeni delovi. Jedro je ekscentrično postavljeno (Slika 4.34b).

#### 4.4.3.7. ACTH ćelije nakon hroničnog tretmana daidzeinom orhidektomisanih adultnih pacova (Orx2+D grupa)

ACTH ćelije pacova hronično tretiranih daidzeinom nepravilnog su oblika, raspoređene kao pojedinačne ili u grupama. Na histološkoj slici uočava se smanjena brojnost navedenih ćelija u odnosu na Orx2 grupu (Slika 4.35a). Citoplazma ćelija je ravnomerno imunohistohemijski obojena, a prisutne su sitnije i krupnije ćelije, (Slika 4.35b).



**Slika 4.35.** Imunoreaktivne ACTH ćelije u adenohipofizi orhidektomisanih pacova hronično tretiranih daidzeinom (Orx2+D) a) bar 100 µm; b) bar 10µm.

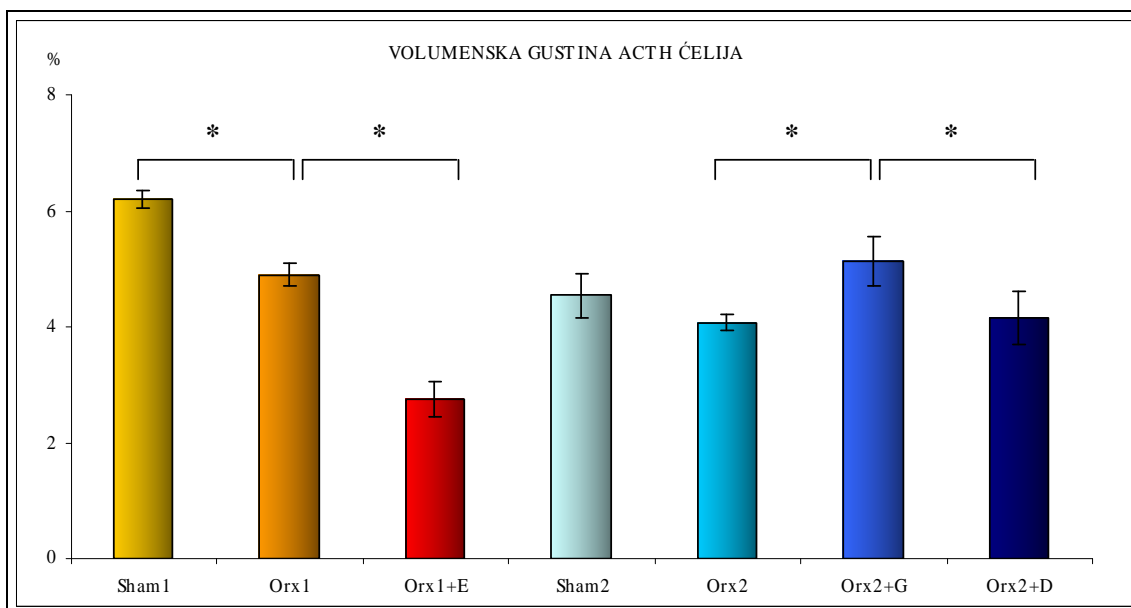
#### 4.4.4. Stereološke karakteristike ACTH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom

##### 4.4.4.1. Volumenska gustina ACTH ćelija

Volumenska gustina ACTH ćelija Sham1 grupe iznosila je  $6,2 \pm 0,1\%$ . Kod Orx1 grupe volumenska gustina ACTH ćelija značajno je smanjena je za 21% ( $p < 0,05$ ) u odnosu na Sham1 grupu i iznosila je  $4,9 \pm 0,2\%$ . Volumenska gustina ACTH ćelija

značajno je smanjena za 44% ( $p < 0,05$ ) kod grupe pacova tretiranih estradiol-dipropionatom u odnosu na Orx1 grupu, i iznosila je  $2,8 \pm 0,3\%$  (Histogram 4.15)

Vrednost volumenske gustine ACTH ćelija u Sham2 grupi iznosila je  $4,5 \pm 0,4\%$ , a u Orx2 grupi  $4,1 \pm 0,1\%$ . Statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) volumenske gustine ACTH ćelija od 26% zabeleženo je u Orx2+G grupi u odnosu na Orx2 grupu, u kojoj je vrednost pomenutog parametra bila  $5,1 \pm 0,4\%$ . U Orx2+D grupi volumenska gustina ACTH ćelija nije promenjena u odnosu na Orx2 grupu, a smanjena je za 19% ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa Orx2+G grupom i iznosila je  $4,1 \pm 0,5\%$  (Histogram 4.15).



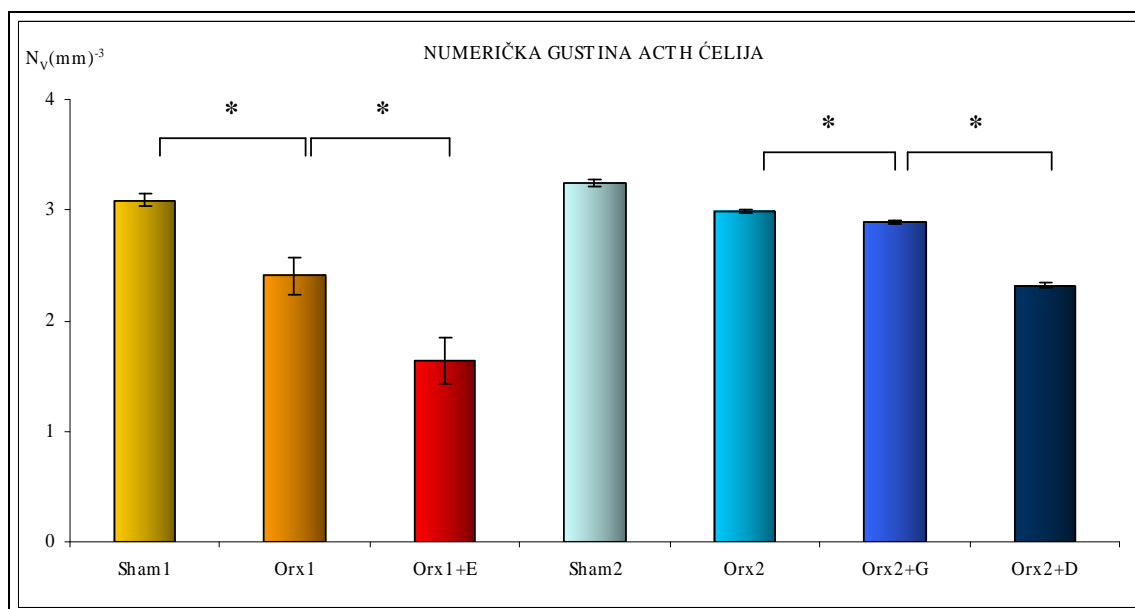
**Histogram 4.15.** Volumenska gustina ACTH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

#### 4.4.4.2. Numerička gustina ACTH ćelija

Numerička gustina ( $N_V$ ) ACTH ćelija Sham1 grupe iznosila je  $3,10 \pm 0,06 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ , kod Orx1 grupe je iznosila  $2,40 \pm 0,16 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ , što predstavlja statistički značajno sniženje ( $p < 0,05$ ) od 23% u odnosu na Sham1 grupu. Statistički značajno sniženje ( $p < 0,05$ ) numeričke gustine ACTH ćelija od 33% zabeleženo je u Orx1+E grupi u odnosu na vrednost odgovarajućeg parametra Orx1 grupe, i iznosila je  $1,64 \pm 0,21 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$  (Histogram 4.16).

Numerička gustina Sham2 grupe iznosila je  $3,24 \pm 0,03 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ , a Orx1 grupe  $2,99 \pm 0,02 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ . Vrednost pomenutog parametra Orx2+G grupe bila je

$2,89 \pm 0,02 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ . Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje  $N_V$  ACTH ćelija od 23%, odnosno 20%, zabeleženo je Orh2+D grupi u poređenju sa odgovarajućim parametrom Orx2, odnosno Orx2+G grupe. Vrednost  $N_V$  ACTH ćelija Orh2+D grupe bila je  $2,31 \pm 0,02 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$  (Histogram 4.16).

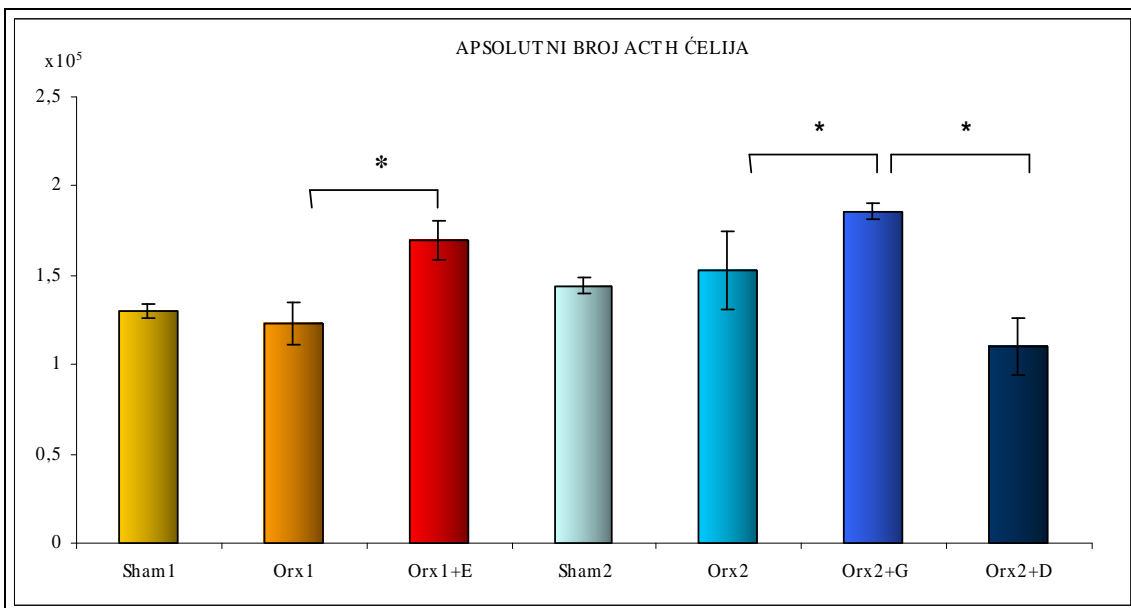


**Histogram 4.16.** Numerička gustina ACTH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

#### 4.4.4.3. Apsolutni broj ACTH ćelija

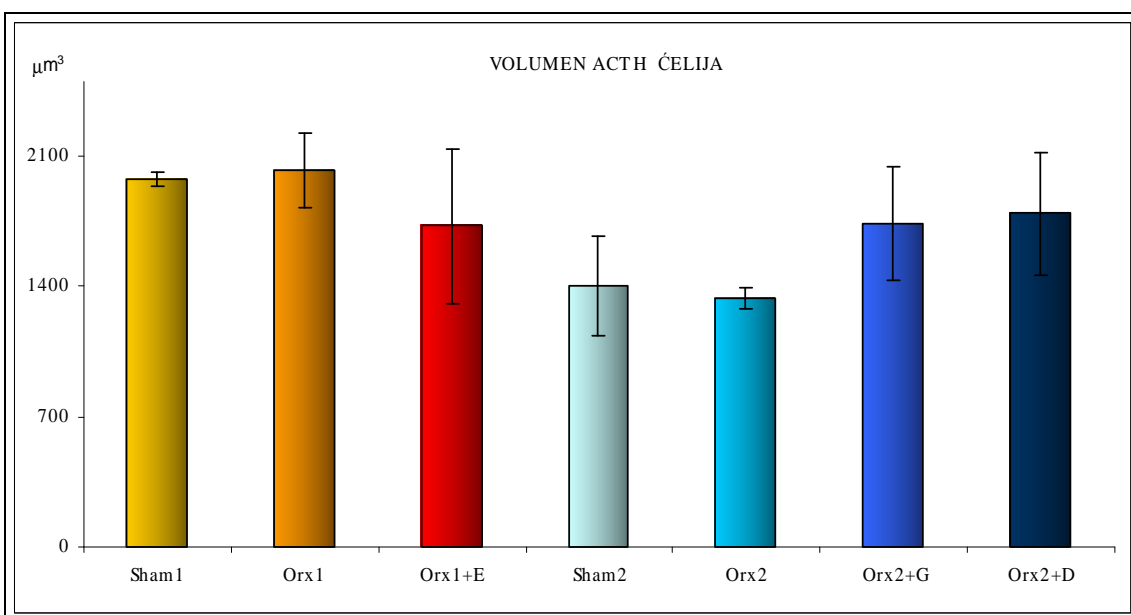
Apsolutni broj ACTH ćelija Sham1 grupe je iznosio  $1,30 \pm 0,04 \times 10^5$ , dok je apsolutni broj ACTH ćelija Orx1 grupe iznosio  $1,23 \pm 0,12 \times 10^5$ . Kod pacova tretiranih estradiol-dipropionatom apsolutni broj ACTH ćelija povećan je za 38% ( $p < 0,05$ ) u odnosu na odgovarajući parametar Orx1 grupe, i njegova vrednost je iznosila  $1,70 \pm 0,11 \times 10^5$  (Histogram 4.17).

Apsolutni broj ACTH ćelija Sham2 grupe je iznosio  $1,44 \pm 0,05 \times 10^5$ , a apsolutni broj ACTH ćelija Orx2 grupe je iznosio  $1,53 \pm 0,22 \times 10^5$ . Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje apsolutnog broja ACTH ćelija za 22% u odnosu na Orx2 grupu zabeleženo je u Orx2+G grupi, a njegova vrednost je iznosila  $1,86 \pm 0,05 \times 10^5$ . Vrednost apsolutnog broja ACTH ćelija Orh2+D grupe iznosila je  $1,10 \pm 0,16 \times 10^5$ , što predstavlja nepromenjenu vrednost u odnosu na Orx1 grupu. Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje apsolutnog broja ACTH ćelija Orh2+D grupi za 41% zabeleženo je u odnosu na odgovarajući parametar Orx2+G grupe. (Histogram 4.17).



**Histogram 4.17.** Apsolutni broj ACTH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

#### 4.4.4.4. Volumen ACTH ćelija

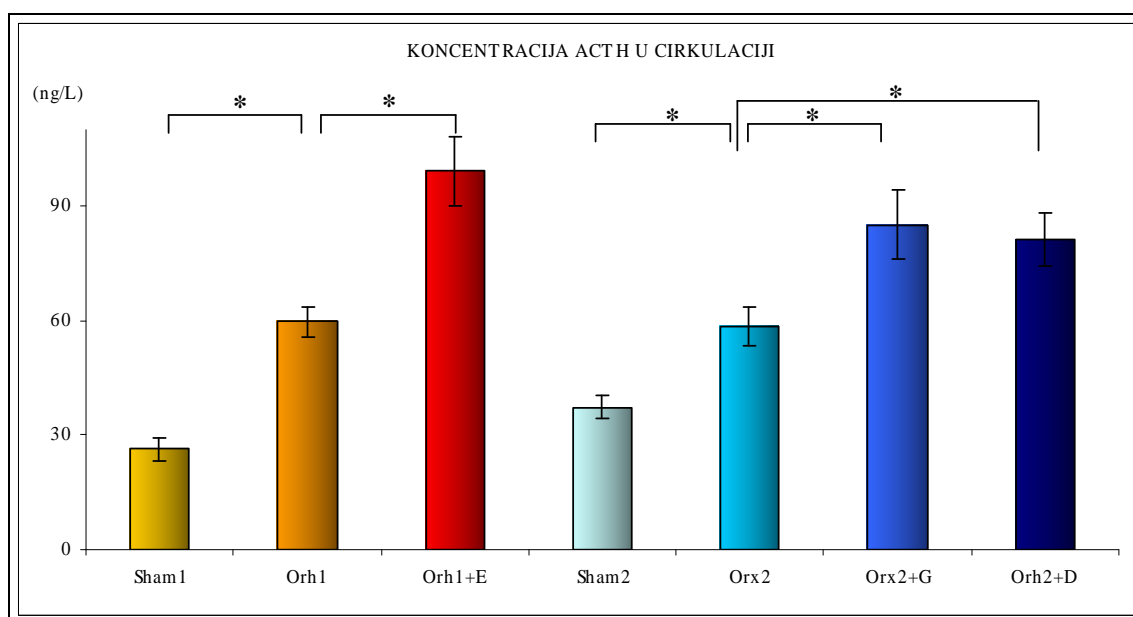


**Histogram 4.18.** Volumen ACTH ćelija hipofiza adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) ili daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

Volumeni ACTH ćelija Sham1 i Orx1 grupe iznosili su  $1973,7 \pm 38,8 \mu\text{m}^3$ , odnosno  $2026,1 \pm 201,7 \mu\text{m}^3$ . U Orx1+E grupi pomenuti parametar je imao vrednost  $1725,3 \pm 38,8 \mu\text{m}^3$  (Histogram 4.18).

Volumeni ACTH ćelija Sham2 i Orx2 grupe bili su  $1406,4 \pm 267,6 \mu\text{m}^3$ , odnosno  $1337 \pm 58,5 \mu\text{m}^3$ . Volumeni ACTH ćelija Orx2+G i Orh2+D grupe bili su  $1739,7 \pm 305,2 \mu\text{m}^3$ , odnosno  $1790 \pm 328,4 \mu\text{m}^3$  (Histogram 4.18).

#### 4.4.5. Koncentracija ACTH u cirkulaciji



**Histogram 4.19.** Promene koncentracije ACTH u cirkulaciji adultnih pacova nakon orhidektomije (Orx1 i Orx2) i hroničnih tretmana estradiol-dipropionatom (Orx1+E), genisteinom (Orx2+G) i daidzeinom (Orx2+D); Sham1 i Sham2 lažno orhidektomisane životinje.

Koncentracije ACTH u cirkulaciji Sham1 grupe iznosila je  $26,3 \pm 3,0$  ng/L. Statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) nivoa ACTH od 127% zabeleženo je nakon orhidektomije, a nivo ACTH u Orx1 grupi iznosio je  $59,7 \pm 4,1$  ng/L. Hroničan tretman estradiol-dipropionatom je doveo do statistički značajnog povećanja ( $p < 0,05$ ) nivoa ACTH u cirkulaciji od 66% u odnosu na nivo navedenog hormona u Orx1 grupi, koji je iznosio  $99,2 \pm 9,2$  ng/L (Histogram 4.19).

Koncentracija ACTH u cirkulaciji Sham2 grupe iznosila je  $37,3 \pm 3$  ng/L. Koncentracije navedenog hormona Orx2 grupe iznosila je  $58,6 \pm 5,1$  ng/L, što je statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) od 57% u odnosu na odgovarajući parametar

Sham2 grupe. Vrednost koncentracije ACTH u Orx2+G grupi je iznosila  $85,0 \pm 9,2$  ng/L, što predstavlja statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) od 45% u poređenju sa odgovarajućim parametrom Orx2 grupe. Statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) nivoa ACTH u cirkulaciji od 39% zabeleženo je nakon tretmana daidzeinom u odnosu na isti parametar Orx2 grupe, a njegova vrednost iznosila je  $81,2 \pm 7,0$  ng/L (Histogram 4.19).

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Efekti orhidektomije, tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom na telesnu masu adultnih pacova

Orhidektomija adultnih (starih tri meseca) pacova smanjila je prirast telesne mase u odnosu na sham operisane životinje. Literaturni podaci su pokazali da smanjenje nivoa cirkulišućeg testosterona može smanjiti telesnu masu, ali i da promene mogu izostati (Ojeda i sar. 2000; Pereira i sar. 2006; Christoffersen i sar. 2006; Antonioli i sar. 2007). Poznato je da gonadalni steroidi, posebno kod glodara, utiču na promene: telesne mase (nezavisno od unosa hrane), energetskog balansa, funkcionisanja gastrointestinalnog trakta, stope rasta i telesne građe (Chen i sar. 1995; Cortright i Koves 2000; Wajchenberg 2000; Asarian i Geary 2006). Testosteron je anabolički hormon koji u najvećoj meri utiče na telesnu građu, mišićnu masu i distribuciju adipoznog tkiva kod mužjaka (Marin i sar. 1992; Katznelson i sar. 1996). Hipogonadalno stanje kod mužjaka smanjuje skeletnu i mišićnu masu, a povećava masu adipoznog tkiva (Katznelson i sar. 1996; Mauras i sar. 1998). Kod čoveka u tom stanju akumulira se viscelarno adipozno tkivo (Seidell i sar. 1990; Tsai i sar. 2000; Borst i Conover 2006), koje kod pacova izostaje (Christoffersen i sar. 2006). Asarian i Geary (2002) su pokazali da orhidektomija smanjuje unos hrane. Poznato je da amino kiselina leucin predstavlja važan nutritivni signal, koji između ostalog stimuliše sintezu proteina u mišićnom tkivu (Kimball i Jefferson 2006). Istraživanja Jiao i sar. (2009) su pokazala da hipogonadizam dovodi do smanjene sinteze proteina zavisne od leucina, i povećavane degradacije proteina, što vodi smanjenju mišićne mase.

Hroničan tretman estradiol-diproprionatom je doveo do smanjenja prirasta telesne mase orhidektomisanih adultnih pacova u odnosu na orhidektomisane pacove. Jedna od mnogih bioloških aktivnosti estradiola je modulacija telesne mase. Ranija istraživanja su pokazala da tretman estradiolom dovodi do smanjenja prirasta telesne mase (Winneker i Parsons 1981; Ospina i sar. 2002) na dozno-zavistan način (Brewster i sar. 1997), kao i do smanjenja unosa hrane (Geary 2004), delujući direktno ili indirektno na oreksigene peptide. Tako estrogen, preko ER receptora, smanjuje

ekspresiju i oslobađanje NPY i melanin-koncentrišućeg hormona (MNC-melanin-concentrating hormone), bitnih regulatora energetskog balansa. Koncentracija oreksigenog peptida grelina, poreklom iz gastrointestinalnog trakta, je povećana tokom gladovanja i pre jela, te tretman pacova grelinom dovodi do povećanja unosa hrane (Kojima i Kangawa 2008). Estradiol smanjuje signalnu moć grelina, kod oba pola pacova, te tako smanjuje njegov oreksigeni potencijal (Clegg i sar. 2007). Estrogen deluje i na anoreksigene peptide insulin, leptin, serotonin i holecistokinin (Brown i Clegg 2010). On je ključan faktor u determinaciji osetljivosti mozga na kataboličke aktivnosti insulina, a koncentracija insulina je u direktnoj korelaciji sa telesnom masom i procentom adipoznog tkiva (Brown i Clegg 2010). Leptin je hormon adipoznog tkiva čija je koncentracija takođe u korelaciji sa procentom adipoznog tkiva. Pored mnogih uloga u mozgu, leptin predstavlja moćan katabolički signal koji dovodi do inhibicije unosa hrane. Tretman estradiolom kod mužjaka pacova povećava senzitivnost mozga na leptin i dovodi do povećanja subkutanog adipoznog tkiva. Poznato je da estrogen reguliše ekspresiju iRNK leptinskog receptora, te tako deluje na regulaciju energetskog balansa (Brown i Clegg 2010). Poznato je da estradiol, stimulišući sekreciju serotonina, povećava anoreksiju i smanjuje hiperfagiju (Asarian i Geary 2006). Holecistokinin (CCK), poreklom iz tankog creva, se oslobađa tokom obroka i predstavlja signal sitosti. Tretman estradiolom dovodi do povećanja CCK pozitivnih ćelija u jedru *tractus solitarius*, PVN i centralnom jedru amigdale, te na taj način utiče na smanjen unos hrane (Geary 2004; Moran 2006;). S obzirom na odsustvo efekta estradiola na telesnu masu, unos hrane i obilnost obroka kod ER $\alpha$  nokaut životinja, zaključeno je da se pomenuti efekti estradiola odigravaju aktivacijom ER $\alpha$  zavisanog mehanizama (Geary 2004).

Hroničan tretman genisteinom ili daidzeinom orhidektomisanih adultnih pacova nije doveo do promene telesnih masa u odnosu na orhidektomisanu grupu adultnih pacova. Efekti sojinih izoflavona na telesnu masu su dozno zavisni (Faqi i sar. 2004; McClain i sar. 2006; Penza i sar. 2006; Mizushige i sar. 2007). U studiji Kishida i sar. (2007) je pokazano da ishrana bogata izoflavonima soje ne utiče na unos hrane kod mužjaka pacova. Nogowski i sar. (2007) navode da tretman genisteinom ženki pacova nije doveo do smanjenja telesne mase, iako dolazi do smanjenja nivoa anoreksigenih peptida insulina i leptina u krvi i rezervi triglicerida u mišićima. U nekim animalnim modelima genistein snižava ekspresiju gena za lipoprotein lipazu u masnom tkivu, što



izaziva smanjenje unosa lipida u adipocite i izostanku gojenja (Naaz i sar. 2003). S druge strane introcerebroventrikularna (ICV) aplikacija genisteina izaziva povećanje nivoa cirkulišućeg GH kod eksperimentalnih životinja (Misztal i sar. 2007). Odsustvo promena unosa hrane i telesnih masa nakon tretmana genisteinom ili daidzeinom može biti posledica slabijeg estrogenskog efekta koji karakteriše izoflavone (Kuiper i sar. 1998). Estrogen svoj efekat na telesnu masu u najvećem procentu ostvaruje preko ER $\alpha$  zavisnog mehanizma, dok izoflavoni pokazuju veći afinitet za ER $\beta$ , što je najverovatnije i razlog odsustva promena telesnih masa posle tretmana izoflavonima.

## **5.2. Efekti orhidektomije, tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom na masu i volumen hipofize orhidektomisanih adultnih pacova**

Nakon orhidektomije pacova apsolutna masa hipofize je povećana. Na nivou hipofize testosteron reguliše ekspresiju gena za gonadotropne hormone direktno (*via steroid response elements*) i indirektno preko specifičnih peptida (aktivin B i folistatin) (Gharib i McCann 1990; Roberts i sar. 1989). Pretpostavlja se da je povećana masa hipofize posledica proliferacije gonadotropnih ćelija adenohipofize, s obzirom da orhidektomija dovodi do povećanja mitotske aktivnosti ovih ćelija (Kitay 1963; Inoue i sar. 1985). GnRH, LH i FSH stimulišu sintezu testosterona koji pak negativnom povratnom spregom reguliše sopstvenu sintezu; smanjenje nivoa testosterona izazvano orhidektomijom dovodi do ukidanja negativne povratne sprege zavisne od testosterona, i brojnosti gonadotropnih ćelija hipofize se povećava (Kitay 1963; Inoue i sar. 1985). Nepromenjen volumen hipofize nakon orhidektomije verovatno je posledica smanjenja volumena i broja drugih hormon sekretujućih ćelija hipofize, kao težnja organizma ka homeostazi.

Tretman estradiol-diproprionatom doveo je do povećanja mase i volumena hipofize orhidektomisanih pacova. Studija Nolan i Levy (2006) pokazala da tretmani estrogenom ili testosteronom (koji se procesom aromatizacije prevodi u estrogen) znatno povećavaju mitotsku aktivnost ćelija adenohipofize kod orhidektomisanih pacova. Pomenuta povećanja na nivou hipofize posledica su povećane proliferacije prolaktinskih ćelija nakon tretmana estrogenima (Kitay 1963; Lieberman i sar. 1978; Milošević i sar. 2007).

Tretman genisteinom povećao je masu i volumen hipofize orhidektomisanih pacova. Delclos i sar. (2001) navode trend povećanja mase hipofize mladunaca pacova čije su majke dobijale visoke doze genisteina. Dugotrajne toksikološke studije sa korišćenjem genisteina u ishrani pacova su pokazale značajno povećanje mase hipofiza kod ženki pacova (Shelby 2008). Ovakvi rezultati, uključujući i rezultat naše studije, je verovatno posledica estrogenskog dejstva genisteina na prolaktinske ćelije. Genistein intenzivira i rast malignih ćelija hipofize zavisnih od estrogena koje su transplantirane pacovima (Fujimoto 2003). Odsustvo razlika u masi i volumenu hipofiza kod grupe pacova tretirane daidzeinom u odnosu na orhidektomisane pacove može biti posledica smanjene estrogenske aktivnosti ovog izoflavona, zbog manjeg afinitet daidzeina prema oba tipa ER (Kostelac i sar. 2003) u odnosu na genistein.

### **5.3. Efekti orhidektomije, tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom na somatotropni sistem adultnih pacova**

#### **5.3.1. Efekti orhidektomije na somatotropni sistem adultnih pacova**

Kao što je odavno poznato, a pokazano je i ovom studijom, endogeni ili egzogeni gonadalni steroidi imaju značajan uticaj na funkcionisanje somatotropnog sistema, te stoga njihovo uklanjanje gonadektomijom dovodi do promena aktivnosti navedenog sistema. Gonadalni steroidi iz cirkulacije utiču na aktivnost i razvoj hormonsenzitivnih neurona u mozgu vezivanjem za specifične receptore (Simerley i Young 1991). Delovanje testosterona na različite moždane strukture ostvaruje se ne samo posredstvom AR, već i preko ER nakon aromatizacije testosterona u estradiol (Schleicher i sar. 1986). Dominantan mehanizam delovanja uključuje direktno ili indirektno vezivanje (nakon prevođenja u  $5\alpha$ -dihidroksitestosteron; Sar i Stumpf 1977.) za AR i regulaciju genske ekspresije. Imunohistohemijsko obeležavanje AR u moždanim strukturama intenzivnije je u jedrima mužjaka pacova (Clancy i sar. 1992), a u citoplazmi ženki pacova (Roselli i sar 1989). Visoka koncentracija AR kod mužjaka prisutna je, između ostalog, u ventro medijalnom jedru (VMN), a nešto niži nivo je u Arc jedru i periventrikularnoj oblasti hipotalamusa (Roselli i sar 1989).

Volumen Arc jedra povećan je nakon orhidektomije adultnih pacova. Studija Litteria (1973) je pokazala da nakon orhidektomije dolazi do povećanog vezivanja  $^3\text{H}$ -lizina (indikator povećane aktivnosti neurona) u neuronima hipotalamusa. Dilatacija

cisterni endoplazmatskog retikuluma i povećanje broja ribozoma u ćelijama hipotalamusa nakon orhidektomije još jedan su marker hiperaktivnosti neurona (Zambrano i Robertis 1968). Promene u dendritskoj arhitekturi CNS važna su komponenta funkcionalne plastičnosti adultnog CNS. Studije Danzer i sar. (1998; 2001) su pokazale da nakon orhidektomije dolazi do promena dendritske arhitekture Arc neurona kod pacova. Isti autori navode da nakon orhidektomije dolazi do povećanja tela neurona, dužine i volumena dendrita, što je direktno povezano sa povećanjem ukupnog volumena Arc jedra. S druge strane, Santolaya i Zimmermann (1983) su pokazali da testosteron dovodi do povećanja jedara ćelija pojedinih zona Arc jedra. Testosteron reguliše gensku ekspresiju i organizaciju NPY neurona Arc jedra (Urban i sar. 1993). Povećanje volumena Arc jedra, između ostalog, je i posledica povećanja dijametra *granular filamentous* tela u neuronima Arc jedra nakon orhidektomije pacova (Blázquez i sar. 1995).

Volumen Pe jedra nakon orhidektomije adultnih pacova nije promenjen. Ranije studije (Zambrano i Robertis 1968; Litteria 1973) su pokazale da orhidektomija pacova dovodi do povećanje aktivnosti i volumena neurona hipotalamusa. Verovatno, veliki volumen i mala gustina neurona Pe jedra mogu biti razlog odsustva promena u volumenu Pe jedra nakon orhidektomije.

Intenzitet GHRH obojenosti u ME smanjen je nakon orhidektomije adultnih pacova. Kod pacova GHRH neuroni zastupljeni su u Arc, dorzo-medijalnom (DM) jedru, VMN, PVN hipotalamusa (Merchantheler i sar. 1984). Orhidektomija adultnih pacova dovela je do smanjenja GHRH iRNK za 35% u Arc i VMN jedru, a smanjenje je izostalo ukoliko se injecirao testosteron (Zeitler i sar. 1990), što je u saglasnosti sa smanjenim intenzitetom imunoobojenosti GHRH u ME. S druge strane neke studije (Gabriel i sar. 1989; Hasegawa i sar. 1992; Maiter i sar. 1991) su pokazale da orhidektomija adultnih pacova ne dovodi do promena GHRH imunoreaktivnosti. Prisustvo AR u Arc i VMH jedru sugeruje na androgen receptor-zavistan mehanizam delovanja testosterona u ovim hipotalamičkim jedrima. Iako postoji kolokalizacija u anatomskoj distribuciji GHRH i AR u neuronima, skoro nijedna GHRH imunoreaktivna ćelija mediobazalne oblasti hipotalamusa ne sadrži AR. Stoga, GHRH imunopozitivni neuroni nisu ciljne strukture u delovanja androgena, te je efekat testostosterone na ekspresiju GHRH indirektan, posredstvom drugog neuralnog ili endokrinog procesa

(Fodor i sar. 2001). Između ostalog, SS neuroni poseduju AR, ali nasuprot fiziološkoj povezanosti GHRH i SS neurona, neuroanatomske veze između pomenutih neurona su malobrojne (Kawano i Daikoku 1988; Willoughby i sar. 1989b; Toth i Palkovits 1998; Fodor i sar. 1994). Ipak, izgleda da uticaj SS na GHRH neurone ne izostaje, s obzirom da su u podskupovima GHRH neurona zastupljene iRNK za sst1 i sst2 (Tannenbaum i sar. 1998). Plotsky i Vale (1985) su pokazali da ICV administracija SS dovodi do inhibicije GHRH.

Volumenska gustina SS neurona u Pe jedru i intenzitet imunopozitivnosti SS u ME smanjen je nakon orhidektomije adultnih pacova. Ranije studije navode smanjenje SS iRNK (Argente i sar. 1990) i pre-pro SS iRNK (Zorrilla i sar. 1990) nakon pada nivoa testosterona u cirkulaciji, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatom. Studija Herbison (1995) je pokazala da je 40% SS neurona Pe jedra AR pozitivno, kod mužjaka pacova, dok je kod ženki taj procenat daleko manji i iznosi svega 7%. Rezultati Huang i Harlan (1994) su pokazali da čak 70% SS neurona Pe jedra kolokalizovano sa AR. Ovi rezultati nedvosmisleno sugerišu da testosteron na SS neurone Pe jedra može uticati direktno preko AR-zavisnog mehanizma. Tako aplikacija testostosterone kod orhidektomisanih pacova vraća nivo SS iRNK na nivo intaktnih životinja (Argente i sar. 1990). Aplikacija flutamida, blokatora androgenske aktivnosti, dovodi takođe do pada nivoa SS iRNK u hipotalamusu (Pazos i sar. 2000). S obzirom da testosteron stimuliše sintezu SS, orhidektomija dovodi do pada nivoa SS, što je i rezultat ove studije.

Efekti orhidektomije praćeni su na stereološkim parametrima GH ćelija adenohipofize. Volumenska i numerička gustina GH ćelija su smanjene nakon orhidektomije u Orx1 grupi (tretirana medijumom I tj. maslinovim uljem), dok promene u vrednostima pomenutih parametara izostaju u Orx2 grupi (tretirana medijumom II tj. mešavinom alkohola i maslinovog ulja). Razlike u vrednostima pomenutih parametara između Sham 1 i Sham 2 grupe verovatno su posledica uticaja hroničnog tretmana alkoholom. Studija Soszynski i sar. (1992a) je pokazala da tretman alkoholom ne menja nivo iRNK za GH, iako dolazi do smanjenja GH u cirkulaciji. Ista studija navodi da alkohol menja proces translacije i sekrecije GH, a ne utiče na gensku ekspresiju ovog hormona. S obzirom na odsustvo promena nivoa iRNK za GH u *in vitro* studiji (Soszynski i sar. 1992b) inhibicija GH sekrecije posledica je smanjenja GHRH genske ekspresije. Ulazak alkohola kroz plazmamembranu u ćelije hipofize dovodi do bubrenja

ćelija i stimulacije hormonske sekrecije (Sato i sar. 1991). Iako trenutno (akutni tretmani) dolazi do povećanja volumena ćelija i stimulacije sekrecije, hroničan efekat tretmana alkohola na stereološke karakteristike GH ćelija je drugačiji (smanjenje volumenske gustine i volumena GH ćelija), pokazala je ova studija.

Smanjenje volumenske i numeričke gustine GH ćelija nakon orhidektomije u Orx1 grupi posledica je hipertrofije FSH i LH ćelija adenohipofize. Naime, nakon orhidektomije ili aplikacije flutamida dolazi do hipertrofije ovih ćelija (Console i sar. 2001). Isti autori su pokazali da je nivo iRNK za LH $\beta$  subjedinicu povećan tri do deset puta, dok je iRNK za FSH $\beta$  bio povećan dva do četiri puta nakon orhidektomije. Orhidektomija adultnih pacova nije uticala na broj GH ćelija, što je u saglasnosti sa ranijom studijom (González-Parra i sar. 1998). Volumen i intenzitet obojenosti ovih ćelija takođe nije promenjen. Volumen GH ćelija kod hrčaka nepromenjen je nakon orhidektomije na šta ukazuje studija Hira i sar. (2001). Androgeni mogu uticati na sintezu i sekreciju GH ćelija hipofize direktno, posredstvom receptorskog mehanizma (AR su prisutni u GH ćelijama, Saeger i sar. 2000), i/ili indirektno, modulacijom GHRH i SS hipotalamusa (Jansson i sar. 1985). Testosteron moduliše nivo Pit-1 transkripcionog faktora (transkripcioni faktor za GH, PRL i TSH) barem delimično na nivou adenohipofize (ER-zavisnim mehanizmom). *In vivo* studija je pokazala da orhidektomija snižava Pit-1, kao i GH iRNK dok u *in vitro* uslovima odsustvuju promene nivoa GH iRNK, najverovatnije zbog indirektnog efekat ovog steroida na iRNK *via* GHRH i SS hipotalamusa (González-Parra i sar. 1998). Receptori za IGF 1 prisutni su u GH ćelijama te vezivanjem IGF 1 dolazi do inhibicije GH sekrecije (Eppler i sar. 2007), kao i do stimulacije SS sekrecije (Giordano i sar. 2008). Orhidektomija dovodi do pada IGF 1 (Savas i sar. 2003; Gradosova i sar. 2012). Aplikacija flutamida mužjacima pacova ne utiče na GH ekspresiju kao ni na GH rezervu u ćelijama hipofize, a ipak dovodi do smanjenja IGF-I (Pazos i sar. 2000). Testosteron generiše niski bazalni nivo GH, kao i visinu i trajanje impulsa, ali ne i frekvencu GH pulsa (Jansson i Frohman 1987). Orhidektomija pacova dovodi do smanjenja pika sekrecije GH, dok su impulsi neregularni (Painson i sar. 1992). U ovoj studiji nivo GH u cirkulaciji nije promenjen nakon orhidektomije, što je u skladu sa studijom Tomiyoshi i sar. (2002). S druge strane Ahmed i sar. (1989) opisali su da je nakon orhidektomije nivo GH u cirkulaciji smanjen.

### **5.3.2. Efekti tretmana estradiol-diproprionata na somatotropni sistem orhidektomisanih adultnih pacova**

Imajući u vidu brojne signalne puteve koji su modulirani estrogenima, kao i veliki broj moždanih ćelija osjetljivih na pomenute hormone, nije iznenađujuće da estrogeni imaju dalekosežne morfološke i fiziološke efekte u mozgu, ne samo tokom njegovog razvoja, već i kasnije. Iako estrogeni mogu da deluju mehanizmima nezavisnim od ER, estrogensko delovanje prvenstveno je zavisno od ER, te je njihova lokalizacija od ključnog interesa za razumevanje efekata estrogena. Kod glodara ER je lokalizovan ne samo u neuronima već u glijalnim (Jung-Testas i sar. 1992) i neuralnim stem ćelijama (Brannvall i sar. 2002). Kaudalni deo Arc jedra je identifikovan kao deo najveće osjetljivosti na estrogen, s obzirom da svega 1h nakon administracije estradiola dolazi do njegovog povećanja (Zimmermann 1982). Slično je uočeno i u Pe jedru, čiji su medijalni i posteriorni deo osjetljiviji na gonadalne steroide u odnosu na prednji deo jedra (Van Vugt i sar. 2008). Ova zapažanja podržavaju postojanje specifičnih podskupova neurona sa specifičnim funkcijama u vezi sa, na primer, regulisanjem GH sekrecije (Willoughby i sar. 1989).

Tretman estradiol-diproprionatom doveo je do povećanja volumena Arc jedra orhidektomisanih adultnih pacova. Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa ranijom studijom koja je opisala povećanje nuklearnog volumena neurona Arc jedra nakon dugotrajnog tretmana estradiolom (Hsu i sar. 1998). Studija Parducz i sar. (1996) govori o estradiol kordiniranim promenama broja akso-somatskih sinapsi, visine glijalnog omotača, kao i membranske ultrastrukture tela neurona. Isti autori navode povećanje broja vezikula na periferiji neurona i povećanje obloženih sinaptičkih pukotina, ali i smanjenja akso-somatskih sinapsi nakon aplikacije estradiola, što ide u prilog činjenici da morfološke promene izazvane estrogenima utiču na interneuronski transport kao i na neuroglijalne interakcije. Tretman estradiolom utiče na GABA-ergične sinapse kojima je bogato Arc jedro. GABA-ergični neuroni se projektuju na neurone koji sadrže tirozin hidroksilazu (ograničava dopaminsku sintezu), te se može zaključiti da estradiol između ostalog utiče na sintezu dopamina (van den Pol 1986; Decavel i van den Pol 1992). Efekat estrogena na neurone Arc jedra nije polno specifičan, te aplikacija estradiola gonadektomisanim životinjama povećava aktivnost neurona Arc jedra kod oba pola (Shieh i Pan 1996).

Povećanje aktivnosti neurona Arc jedra nakon estadiolskog tretmana verovatno je uslovalo i povećanje njegovog volumena dobijeno u ovoj studiji.

Volumen Pe jedra je povećan nakon tretmana estradiol-diproprionatom. Nema literaturnih podataka o delovanju estrogena na promene arhitekture Pe jedra, te su najverovatnije promene arhitekture Pe neurona koje dovode do povećanja volumena jedra, slične promenama prisutnim VMN. Neuron Pe jedra i VMN kolokalizovani su sa ER $\alpha$  (Shughrue i sar. 1997), dok ER $\beta$  nije prisutan u ovim jedrima (Kamegai i sar. 2001). Tretman estrogenom povećao je volumen tela i jedara neurona, i promenio strukturu nukleolusa i granularnog endoplazmatičnog retikuluma neurona VMN (Jones i sar. 1985).

Intenzitet GHRH imunoobojenosti u ME nepromenjen je nakon tretmana estradiol-diproprionatom orhidektomisanih adultnih pacova. Podaci o delovanju estradiola na količinu GHRH i GHRH iRNK su kontradiktorni. Jedna grupa istraživača navodila je da estrogen inhibira GHRH sintezu i sekreciju (Fernandez i sar. 1992; Senaris i sar. 1992; Bennett i sar. 1996), dok druga navodila odsustvo promena (Maiter i sar. 1991). Aplikacija estradiola nakon orhidektomije nije imala efekata na orhidektomijom izazvano smanjenje GHRH iRNK (Zaitler i sar. 1990).

Tretman estradiol-diproprionatom povećao je volumensku gustinu SS neurona Pe jedra i intenzitet imunoobojenosti SS neurosekreta u ME orhidektomisanih adultnih pacova. Podaci o delovanju estradiola na SS neurone su kontradiktorni. U radovima Estupina i sar. (1996) i Van Vugt i sar. (2008) aplikacija estradiola gonadektomisanim pacovima nije uticala na SS imunoreaktivnost Pe jedra. Istraživanja druge grupe naučnika (Baldino i sar. 1988; Werner i sar. 1988; Zorilla i sar. 1990) su pokazala da tretman estradiolom anulira efekat orhidektomije na SS neurone Pe jedra (smanjenje SS iRNK i volumenske gusine SS neurona Pe jedra). Zorilla i sar. (1990) opisali su da tretman estrogenom gonadektomisanih pacova dovodi do povećanja pre-pro SS iRNK za 40%. Svega 5% SS neurona Pe i Arc jedra poseduje ER $\alpha$ , dok ER $\beta$  nije prisutan u Pe jedru (Shimizu i sar. 2005). Studija Herbison i Theodosis (1993) je pokazala odsustvo ER imunoreaktivnosti u Pe jedru oba pola pacova, te estradiol na Pe neurone deluje indirektno. Estradiol deluje na SS neurone preko ćelija koje se nalaze oko Pe jedra, a sadrže ER $\alpha$  (Herbison i Augood 1994), i/ili preko estrogen osetljivih GABA-ergičnih

neurona Pe regiona (Flugge i sar. 1986), koji se projektuju na SS neurone Pe jedra (Herbison i Augood 1994; Willoughby i sar. 1987a).

Nakon tretmana estradiol-diproprionatom zabeleženo je smanjenje volumenske gustine GH ćelija adenohipofize. Prisutno smanjenje može biti rezultat porasta volumena i broja drugih ćelija hipofize nakon orhidektomije (Carretero i sar. 1992). Naime, utvrđeno je da  $17\beta$  estradiol stimuliše proliferaciju PRL ćelija i sintezu prolaktina (Kitay 1963; Lieberman i sar. 1978) posredstvom ER prisutnih na ovim ćelijama (Mitchner i sar. 1998). Tretman estradiolom može delovati na GH sekreciju i menjati proporciju GH ćelijskih tipova (Takahashi 1991). Ipak, apsolutni broj GH ćelija nije promenjen dok je numerička gustina ćelija smanjena nakon tretmana estradiol-diproprionatom. *In vitro* studija je pokazala da estradiol nema efekta na proliferaciju GH ćelija (Yamamuro i sar. 2001). Smanjenje numeričke gustine GH ćelija nakon tretmana estradiol-diproprionatom rezultat je nepromenjenog apsolutnog broja i povećanja volumena hipofize nakon tretmana. *In vivo* estradiol stimuliše Pit-1 iRNK, dok *in vitro* nema efekta (González-Parra i sar. 1998), što ukazuje na dominantan uticaj estradiola na GH ćelije posredstvom hipotalamusa. GH ćelije intezivnije su obojene nakon tretmana estradiol-diproprionatom. Nivo GH u cirkulaciji je povećan jedan i po put nakon tretmana estradiol-diproprionatom, što je u skladu sa navedenim povećanjem intenziteta obojenosti GH ćelija, kao i povećanja nivoa Pit-1 iRNK hipofize. Poznato je da estradiol smanjuje pik amplitude, a povećava bazalni nivo GH (Jansson i sar. 1984; Painson i sar. 1992). Različite studije (Carretero i sar. 1992; Bottner i Wuttke 2006) navode, takođe, povećanje GH nivoa nakon estrogenskog tretmana.

### **5.3.3. Efekti tretmana genisteinom ili daidzeinom na somatotropni sistem orhidektomisanih adultnih pacova**

Genistein i daidzen, kao jedinjenja prirodnog porekla koja deluju posredstvom ER ili nezavisno od njih utiču na morfofunkcionalne karakteristike moždanih struktura. Ograničena akumulacija genisteina u moždanom tkivu odraslih pacova, u poređenju sa ostalim tkivima, može biti odraz loše penetracije izoflavona u CNS. Međutim, prisustvo genisteina (Chang i sar. 2000) i daidzeina (Ma i sar. 2010) u moždanim strukturama uočeno je nakon periferne aplikacije ovih izoflavona. Lephart i sar. (2000) ukazuju da je delovanje izoflavona na moždane strukture prvenstveno posredovano ER mehanizmom. Distribucija ER $\alpha$  i ER $\beta$  je različita u moždanim strukturama (Shughrue i sar. 1997a), te



vezivanje istog liganda za receptore može dovesti do različite genske ekspresije. Izoflavoni mogu uticati i na arhitekturu moždanih struktura. Tretman genisteinom dovodi do promena preoptičkog regiona hipotalamusa, tj. do povećanja volumena polno dimorfnog jedra kod ovarijsktomisanih ženki pacova, dok je kod intaktnih životinja došlo do zanemarljivog smanjenja volumena jedra (Lephart i sar. 2002). Volumen AVPV jedra veći je kod ženki pacova koje su hranjene fitoestrogenima bogatom hranom (fito hrana) u odnosu na mužjake, dok mužjaci hranjeni fito hranom imaju manji volumen AVPV jedra od mužjaka čija hrana nije sadržala fitoestrogene (Lephart i sar. 2003). Nameće se zaključak da je hormonalni status od presudnog značaja za delovanje izoflavona na moždane strukture. Generalno, sinteza proteina u moždanim strukturama povećana je nakon tretmana genisteinom (Lyou i sar. 2002), dok s druge strane nivo aromataza kod adultnih pacova nije promenjen nakon tretmana fitoestrogenima (Lephart i sar 2002). Studija Faber i Hughes (1991) je pokazala da je tretman genisteinom doveo do povećanja osetljivosti hipohize na GnRH kod mužjaka pacova. Genistein menja sekretornu aktivnost GnRH neurona hipotalamusa i LH sekreciju hipofize ovaca direktnim centralnim dejstvom (Wojcik-Gladysz i sar. 2005).

Tretman genisteinom povećao je volumen Arc jedra, dok tretman daidzeinom ne dovodi do promena volumena jedra. *In vitro* studija na ćelijskim linijama hipokampusu pokazala je da genistein i daidzein povećavaju ćelijsku proliferaciju i vijabilnost (Pan i sar. 2012). Vakuolizacija oksitocinskih neurona je povećana nakon tretmana genisteinom i daidzeinom (Yoshimura i sar. 2011). Izgleda da je estrogenski efekat (povećana aktivnost neurona) genisteina, doveo do povećanja volumena Arc jedra. Odsustvo promena nakon tretmana daidzeinom verovatno je posledica manjeg estrogenog dejstva daidzeina.

Eventualne promene u neuronskoj arhitekturi nisu uticale na volumen Pe jedra nakon tretmana genisteinom ili daidzeinom, s obzirom na mali broj ćelija u velikom volumenu jedra.

Intenzitet imunoobojenosti GHRH u ME povećan je nakon tretmana genisteinom ili daidzeinom. U Arc jedru dominantno je prisutan ER $\alpha$  (Dellovade i Merchanthaler 2004) i 70% GHRH neurona poseduje ovaj tip receptora (Kamegai i sar. 2001; Shimizu i sar. 2005). SS takođe učestvuje u kontroli GHRH sekrecije s obzirom na prisustvo somatostatinskih receptora na GHRH neuronima (Tannenbaum i sar. 1998).

Povećanje intenziteta imunoobojenosti GHRH u ME po svemu sudeći je posledica direktnog uticaja genisteina ili daidzeina na oslobađanje GHRH posredstvom ER na ovim neuronima.

Volumenska gustina SS neurona Pe jedra i intenzitet imunoobojenosti SS neurosekreta u ME povećali su se nakon tretmana genisteinom. S obzirom na odsustvo ER u Pe jedru i na činjenicu da izoflavoni u mozgu prvenstveno deluju preko ER, izgleda da genistein stimuliše sekreciju u SS neuronima preko ćelija koje se nalaze oko Pe jedra, a sadrže ER $\alpha$ , i/ili preko GABA-ergičnih neurona koji se projektuju na SS neurone Pe jedra (Herbison 1995; Herbison i Augood 1994; Willoughby i sar. 1987). Volumenska gustina i količina SS neurosekreta u ME nije promenjena nakon tretmana daidzeinom, najverovatnije kao posledica slabijeg estrogenskog dejstva ovog izoflavona u odnosu na genistein.

Volumenska i numerička gustina i apsolutni broj GH ćelija povećan je nakon genisteinskog tretmana. Povećanja pomenutih stereoloških parametara verovatno su posledica povećane aktivnosti GH ćelija s obzirom i na povećan intenzitet imunoobojenosti GHRH neurosekreta u ME. U GH ćelijama pacova prisutni su ER $\alpha$  i Er $\beta$  (Childs i sar. 2006), te genisteina može delovati i direktno posredstvom ER na nivou hipofize. Volumen GH ćelija nije promenjen, dok je intenzitet obojenosti ovih ćelija veći nakon genisteinskog tretmana. Nivo GH u cirkulaciji takođe je povećan nakon genisteinskog tretmana, što je u saglasnosti sa ranijom studijom (Misztal i sar. 2007). Volumenska gustina GH ćelija povećana je nakon daidzeinskog tretman. Numerička gustina i apsolutni broj ćelija je smanjen nakon ovog tretmana. Volumen ćelija i intenzitet obojenosti povećan je nakon daidzeinskog tretmana. Nivo GH u cirkulaciji nije promenjen nakon daidzeinskog tretmana. Povećana volumenska gustina GH ćelija posledica je povećanog volumena pojedinačnih GH ćelija. Smanjena numerička gustina u korelaciji je sa smanjenim apsolutnim brojem GH ćelija nakon tretmana. Razlog za dobijeno smanjenje apsolutnog broj moglo bi biti prisustvo membranskog ER na GH ćelijama, čijim kuplovanjem sa ligandom dolazi do apoptoze (Zarate i sar. 2009). Nema podataka u literaturi o eventualnom delovanju daidzeina posredstvom ovog tipa ER, ali potencijalne efekte ne bi trebalo zanemariti s obzirom na smanjen broj GH ćelija. Povećan volumen i intenzitet obojenosti verovatno je posledica

većeg nivoa GHRH u ME. S jedne strane povećana aktivnost GH ćelije, s druge strane smanjen broj ćelija verovatno je bio uzrok nepromenjenog GH nivoa u cirkulaciji.

#### **5.4. Efekti orhidektomije, tretmana estradiol-dipropionatom, genisteinom ili daidzeinom na adrenokortikotropni sistem adultnih pacova**

##### **5.4.1. Efekti orhidektomije na adrenokortikotropni sistem adultnih pacova**

Nivo polnih steroida u cirkulaciji odgovoran je za polnu specifičnost HPA sistema, njegovu aktivnost, kao i odgovor ovog sistema na stres (Handa i sar. 1994). Eliminacija testosterona orhidektomijom dovodi do promena u funkcionisanju HPA sistema.

U Orx2 grupi orhidektomija adultnih pacova dovela je do povećanja volumena PVN. Volumenska gustina CRH neurona, duplo obeleženih CRH/cFos neurona u PVN, kao i intenzitet imunoobojenosti CRH neurosekreta u ME povećani su nakon orhidektomije. Dobijeni rezultat je očekivan, s obzirom da testosteron deluje kao inhibitor HPA sistema (Handa i sar. 1994; Evuarherhe i sar. 2009), te njegovo uklanjanje dovodi do povećanja CRH imunoreaktivnosti (Bingaman i sar. 1994; Handa i sar. 1994). Povećana aktivnost neurona dovodi do povećanja volumenske gustine CRH i CRH/cFos, što uslovljava i povećanje volumena PVN. Seale i sar. (2004) su ukazali da nearomatizovan androgen-dihidrotestosteron inhibira HPA sistem orhidektomisanih mužjaka pacova, te se zaključuje da testosteron na HPA sistem deluje putem AR. U PVN mužjaka i ženki pacova prisutni su AR (Huang and Harlan 1994; Zhou i sar. 1994). Studija Viau i sar. (2001) ukazuje da hipofizotropni neuroni PVN ne poseduju AR, te treba uzeti u obzir i mehanizme delovanja androgena nezavisne od prisustva AR u ovim neuronima. Testosteron inhibira HPA sistem povećanjem broja glukokortikoidnog receptora (GR) u medijalnom preoptičkom regionu (Viau i Meaney 1996). Takođe, uticaj androgena na ekspresiju iRNK u parvocelularnim neuronima PVN može uključiti AVP puteve medijalnog jedra amigdale i CRH-AVP neurone *stria terminalis* (Viau i sar. 2001).

Volumenska i numerička gustina ACTH ćelija hipofize smanjena je nakon orhidektomije u Orx1 grupi. Smanjenje volumenske gustine ACTH ćelija nakon orhidektomije u Orx1 grupi pacova posledica je hipertrofije gonadotropnih i prolaktinskih ćelija, s obzirom na odsustvo inhibicije testosteronom (Kitay 1963; Inoue i

sar. 1985). Numerička gustina ACTH ćelija je smanjena nakon orhidektomije kao posledica nepromenjenog apsolutni broj ovih ćelija i povećanja ukupnog volumena hipofize. Sakuma i sar. (1984) navode da orhidektomija adultnih pacova ne utiče na mitotsku aktivnost ACTH ćelija, što je u skladu sa dobijenim rezultatom, tj. nepromenjenim apsolutnim brojem i volumenom ACTH ćelija. Hira i sar. (2001) takođe, ukazuju da nije došlo do promena veličine ACTH ćelija hipfize nakon orhidektomije hrčaka. Dominacija svetlijih (po intenzitetu obojenosti) ACTH ćelija nakon orhidektomije verovatno upućuje na veće oslobađanje ACTH iz ćelija. Biohemijski rezultati tj. povećanje nivoa ACTH u cirkulaciji nakon orhidektomije, potvrđuju prethodnu opservaciju (Bingaman i sar. 1994) koja ukazuje na povećanu sintezu i sekreciju ACTH pod uticajem aktiviranih CRH neurona hipotalamusa, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatom.

#### **5.4.2. Efekti tretmana estradiol-diproprionatom na adrenokortikotropni sistem orhidektomisanih adultnih pacova**

Veliki broj studija pokazuje da estrogeni deluju na adrenokortikotropni sistem. Tretman estradiolom smanjuje sposobnost GR da reguliše sintezu sopstvenog proteina, i tako modifikuje GR funkciju (Burges and Handa 1993). Estradiol utiče na sekreciju kortikosterona, s obzirom da ženke pacova, čiji je nivo estrogena u cirkulaciji viši, imaju i viši pik dnevne sekrecije kortikosterona u odnosu na mužjake pacova, čiji je nivo estrogena u cirkulaciji niži (Seale i sar. 2004). ER je identifikovan u neurosekretornim ćelijama PVN (Bodo i Rissman 2006), te estrogen direktno utiče na ćelijsku aktivnost i gensku ekspresiju u PVN. Spremnost adrenokortikotropnog sistema da odgovori na različite stresore je pojačana nakon tretmana estrogenima, delimično zbog smanjene glukokortikoidne negativne povratne sprege (Patchev i sar. 1995) i/ili zbog smanjenja inhibitornih GABA-eričnih inputa u PVN (Bodo i Rissman 2006; Weiser i Handa 2009).

Administracija estradiol-diproprionata orhidektomisanim pacovima povećala je volumensku gustinu CRH/cFos neurona, što ukazuje na povećanu aktivnost CRH neurona. Volumen PVN kao i volumenska gustina CRH neurona nije promenjena tretmanom estradiol-diproprionatom. Veliki broj studija ukazuje da administracija estrogena povećava CRH iRNK (Bohler i sar. 1990; Patchev i sar. 1995; Roy i sar.

1999b). Parvocelularni CRH neuroni PVN poseduju ER, te estrogen direktno utiče na gensku ekspresiju ovih neurona (Laflamme 1998). Sposobnost glukokortikoida da inhibiraju sopstvenu sekreciju (negativna povratna sprega) smanjena je administracijom estrogena, i to preko ER $\alpha$  mehanizma u PVN (Weiser i Handa 2009). Povećanje aktivnosti CRH neurona dovelo je do prisustva većeg intenziteta imunoobojenosti CRH neurosekreta u ME nakon tretmana estradiol-diproprionatom.

Volumenska i numerička gustina ACTH ćelija nakon tretmana estradiol-diproprionatom su smanjeni. Smanjenje volumenske i numeričke gustine ACTH ćelija posledica je proliferacije estrogen-zavisnih PRL ćelija (Lieberman i sar. 1978), posredstvom ER prisutnih u ovim ćelijama (Mitchner i sar. 1998). Apsolutni broj ACTH ćelija je povećan. Iako su ER prisutni na ACTH ćelijama (Mitchner i sar. 1998) izgleda da estrogen deluje indirektno, posredstvom CRH, čija je količina povećana u ME, s obzirom da je *in vitro* studija, pokazala da estrogen nije uticao na sekreciju ACTH u hipofizi (Malendowicz 1994). Volumen ACTH ćelija nije promenjen nakon tretmana estradiol-diproprionatom. Intenzitet obojenosti citoplazme ACTH ćelija slabiji je u poređenju sa orhidektomisanim životinjama, verovatno zbog povećane sekrecije ACTH. Nivo ACTH je povećan u cirkulaciji, što ukazuje da indukovana aktivnost HPA sistema još intenzivnija nakon tretmana estradiol-diproprionatom. Po svemu sudeći u primenjenom eksperimentalnom modelu estradiol-diproprionatom prvenstveno deluje na CNS i pokreće kaskadu događaja.

#### **5.4.3. Efekti tretmana genisteinom ili daidzeinom na adrenokortikotropni sistem orhidektomisanih adultnih pacova**

Izoflavoni imaju širok spektar dejstva na moždane strukture i posredstvom ER, diferencijalno prisutnih u njima, utiču na gensku ekspresiju. Utvrđeno je da genistein može doprineti up-regulaciji ER $\beta$  u PVN stimulišući iRNK koja ga kodira (Patisaul 2005). Konzumacija ishrane bogate izoflavonima povećala je nivo vazopresina u hipotalamusu pacova (Patisaul 2005), a dovela je i do povećanja volumen polnog dimorfnog jedra pacova (Patisaul 2005).

Aktivnost CRH neurona PVN je povećana nakon tretmana genisteinom ili daidzeinom orhidektomisanih pacova. Utvrđeno je da genistein ili daidzein deluju na moždane strukture dominantno posredstvom ER (Laflamme i sar. 1998). *In situ* studije,

bazirane na utvrđivanju količine ER iRNK, su pokazale da je u PVN dominantno prisutan ER $\beta$  u odnosu na ER $\alpha$  (LaFlamme i sar. 1998). ER $\beta$  su identifikovani u parvocelularnim i magnocelularnim neuronima, i 60%-80% magnocelularnih CRH neurona je bilo pozitivno na ER $\beta$  (Roy 1999). CRH neurosekret je prisutan u parvocelularnim i magnocelularnim neuronima PVN (Cho i sar. 2007). PVN, pored veze sa neuronima drugih jedara hipotalamusa, prima ekstrahipotalamične inpute iz moždanog stabla, amigdala i *stria terminalis* (Simerly i sar. 1991; LaFlamme i sar. 1998). To su regioni bogati ER i povezani sa kateholaminergičnim neuronima, koji regulišu aktivnost HPA sistema (Li i sar. 1993; Weiser i Handa 2009). Aktivnost CRH neurona u našem eksperimentu najverovatnije je povećana usled delovanja korišćenih izoflavona na CRH neurone posredstvom ER $\beta$ , ali vrlo verovatno i indirektno posredstvom drugih moždanih struktura.

Volumenska gustina CRH neurona nije promenjena nakon tretmana genisteinom, dok je smanjena nakon tretmana daidzeinom. Volumen PVN jedra nije promenjen nakon tretmana genisteinom ili daidzeinom. Pokazano je da aktivacija ER $\beta$ , dominantno prisutnog u PVN, pojačava ekspresiju gena odgovornog za smanjenje ćelijske proliferacije (Paruthiyil i sar. 2004; Chang i sar. 2007), što može biti posledica nepromenjene, odnosno čak i smanjene volumenske gustine nakon tretmana genisteinom, odnosno daidzeinom. Nepromenjeni volumen PVN jedra nakon tretmana genisteinom je u korelaciji sa odsustvom promene volumenske gustine CRH neurona. Iako je aktivnost CRH neurona povećana intenzitet imunoobojenosti CRH neurosekreta u ME nije promenjen nakon oba tretmana.

Tretman genisteinom povećao je volumensku gustinu i apsolutni broj ACTH ćelija. Povećanje navedenih stereoloških parametara ACTH ćelija i pored odsustva promena u količini CRH u ME verovatno je posledica sudelovanja drugih mehanizama regulacije ACTH sekrecije i sinteze: Konzumacija fito hrane dovela je do povećanja nivoa vazopresina, ACTH sekretagoge, u plazmi pacova (Hartley i sar. 2003). Mitchner i sar. (1998) su pokazali da je 35% ACTH ćelija pozitivno na ER $\alpha$ , a 25% na ER $\beta$ , te genistein preko ER može i direktno učestvovati u regulaciji ACTH sinteze i sekrecije. Seuntjens i sar. (2002) su ukazali i na mogućnost transdiferencijacije pluripotentnih ćelija kao odgovor na privremeni endokrini zahtev, koji može favorizovati između ostalih i ACTH ćelije. Numerička gustina ACTH ćelija je smanjena nakon

genisteinskog tretmana kao posledica povećanja volumena hipofize. Nepromenjen volumen i smanjen intenzitet obojenosti ACTH ćelija nakon tretmana genisteinom, zajedno sa povećanim nivoom ACTH u cirkulaciji verovatno je posledica kontinuirane sinteze i sekrecije ACTH. Dobijeno povećanje ACTH u cirkulaciji nakon tretmana genisteinom u saglasnosti je sa studijom Ohno i sar. (2003) izvedenom na mladim pacovima.

Nakon tretmana daidzeinom nije došlo do promena stereoloških parametara (volumenske i numeričke gustine, apsolutnog broja i volumena) ACTH ćelija. Iako su ER (Mitchner i sar. 1998), preko kojih daidzein može delovati, prisutni u ACTH ćelijama, manji afinitet daidzeina za oba tipa ER u odnosu na genistein (Kostelac i sar. 2003), može biti uzrok odsustva promena na nivou stereoloških parametara ACTH ćelija. Zabeleženo povećanje nivoa ACTH u cirkulaciji verovatno je posledica delovanja daidzeina na nivou hipotalamusa, prvenstveno stimulacije vazopresinskih neurona, koji su velikom procentu (86%) pozitivni na ER $\beta$  (Hrabovszky i sar. 2004).

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata, dobijenih ispitivanjem efekata orhidektomije i hroničnih tretmana estradiol-diproprionatom, genisteinom ili daidzeinom na: telesne mase, apsolutne mase i volumene hipofiza, stereološke, histološke, i biohemijske parametre somatotrofnog sistema (Arc i Pe jedara hipotalamusa, GH ćelija hipofize, koncentracije GH u cirkulaciji) i histološke, stereološke i biohemijske parametre adrenokortikotropnog sistema (PVN hipotalamusa, ACTH ćelija hipofize i koncentracije ACTH u cirkulaciji), adultnih pacova, možemo izvesti sledeće zaključke:

- Orhidektomija je smanjila telesne mase adultnih pacova u odnosu na Sham operisanu grupu pacova. Hroničan tretman estradiol-diproprionatom je smanjio telesnu masu u odnosu na Orx grupu pacova. Hroničan tretman genisteinom ili daidzeinom nije doveo do promene telesnih masa u odnosu na Orx grupu pacova.

- Orhidektomije adultnih pacova smanjila je apsolutne mase hipofize, dok je volumen hipofize ostao nepromenjen u odnosu na Sham grupu pacova. Tretman estradiol-diproprionatom je izazvao povećanje apsolutne mase i volumena hipofize u odnosu na Orx grupu pacova. Tretman genisteinom povećao je masu i volumen hipofize u odnosu na Orx grupu pacova. Tretman daidzeinom nije izazvao promene mase i volumena hipofize u odnosu na Orx grupu pacova.

- Somatotropni sistem

Orhidektomija je izazvala promene stereoloških, histoloških i biohemijskih parametara somatotrofnog sistema adultnih pacova, koje su praćene u odnosu na Sham operisanu grupu pacova.

\* Orhidektomija je povećala volumen Arc jedra, smanjila intenzitet imunoobojenosti GHRH u ME, volumensku gustinu SS neurona u Pe jedru, intenzitet imunoobojenosti SS u ME, dok nije uticala na volumen Pe jedra.



\*Nakon orhidektomije smanjene su volumenska i numerička gustina GH ćelija, dok nema promena u apsolutnom broju, volumenu i intenzitetu obojenosti GH ćelija.

\* Nivo GH u cirkulaciji nije promenjen nakon orhidektomije.

Hroničan tretman estradiol-diproprionatom promenio je stereološke, histološke i biohemijske parametare somatotrofnog sistema adultnih pacova, koje su praćene u odnosu na Orx grupu pacova.

\* Nakon tretmana estradiol-diproprionatom došlo je do povećanja volumena Arc i Pe jedra, volumenske gustine SS neurona Pe jedra, kao i intenziteta imunoobojenosti SS neurosekreta u ME, a tretman nije uticao na intenzitet imunoobojenosti GHRH neurosekreta u ME.

\*Hroničan tretman estradiol-diproprionatom je smanjio volumenske i numeričke gustine GH ćelija, povećao intenzitet obojenosti ovih ćelija, dok apsolutni broj i volumen GH ćelija nije promenjen.

\* Nivo GH u cirkulaciji je povećan nakon tretmana estradiol-diproprionatom.

Hronični tretmani genisteinom ili daidzeinom su promenili stereološke, histološke i biohemijske parametare somatotrofnog sistema adultnih pacova, koje su praćene u odnosu na Orx grupu pacova.

\* Hroničan tretman genisteinom je povećao volumen Arc jedra, intenziteta imunoobojenosti GHRH u ME, volumenske gustine SS neurona Pe jedra, kao i intenzitet imunoobojenosti SS neurosekreta u ME, a nije uticao na volumena Pe jedra.

\* Volumenska i numerička gustina, apsolutni broj i intenzitet obojenosti GH ćelija je povećan nakon tretmana genisteinom, dok volumen ovih ćelija nije promenjen.

\* Nivo GH u cirkulaciji je povećan nakon tretmana genisteinom.

\* Hroničan tretman daidzeinom nije uticao na volumen Arc i Pe jedra, volumensku gustinu SS neurona Pe jedra, intenzitet imunoobojenosti SS neurosekreta u ME, dok je povećao intenziteta imunoobojenosti GHRH neurosekreta u ME.

\* Tretman daidzeinom je povećao volumensku gustinu, kao i volumen i intenzitet obojenosti GH ćelija a smanjio numeričku gustinu i apsolutni broj ovih ćelija.

\* Nivo GH u cirkulaciji nije promenjen nakon tretmana daidzeinom.

- Adrenokortikotropni sistem

Orhidektomija je izazvala promene stereoloških, histoloških i biohemijskih parametara adrenokortikotropnog sistema adultnih pacova koje su praćene u odnosu na Sham grupu pacova.

\* Orhidektomija je povećala volumen PVN, volumensku gustinu CRH neurona i duplo obeleženih CRH/cFos neurona u PVN i intenzitet imunoobojenosti CRH neurosekreta u ME.

\* Orhidektomija je smanjila volumensku i numeričke gustine ACTH ćelija hipofize, kao i intenzitet obojenosti ACTH ćelija, dok apsolutni broj i volumen ACTH ćelija nisu promenjeni.

\* Nivo ACTH u cirkulaciji je povećan nakon orhidektomije.

Hroničan tretman estradiol-diproprionatom je doveo do promena stereoloških, histoloških i biohemijskih parametara adrenokortikotropnog sistema adultnih pacova koje su praćene u odnosu na Orx grupu pacova.

\* Hroničan tretman estradiol-diproprionatom nije uticao na volumen PVN i volumensku gustinu CRH neurona, dok je navedeni tretman doveo do povećanja volumenske gustine CRH/cFos neurona i povećanja intenziteta imunoobojenosti CRH neurosekreta u ME.

\* Hroničan tretman estradiol-diproprionatom je smanjio volumenske i numeričke gustine kao i intenzitet obojenosti ACTH ćelija, povećao apsolutni broj ovih ćelija, dok nije uticao na njihov volumen.

\* Nivo ACTH je povećan u cirkulaciji nakon tretmana estradiol-diproprionatom.

Hronični tretmani genisteinom ili daidzeinom doveli su do promena stereoloških, histoloških i biohemijskih parametara adrenokortikotropnog sistema adultnih pacova koje su praćene u odnosu na Orx grupu pacova.

\* Hroničan tretman genisteinom nije uticao na volumen PVN, volumensku gustinu CRH neurona i intenzitet imunoobojenosti CRH neurosekreta u ME, dok je navedeni tretman povećao volumenske gustine CRH/cFos neurona.

\* Hroničan tretman genisteinom je povećao volumensku gustinu i apsolutni broj ACTH ćelija, smanjio numeričku gustinu i intenzitet obojenosti ACTH ćelija, dok tretman nije uticao na volumen ovih ćelija.

\* Nivo ACTH je povećan u cirkulaciji nakon tretmana genisteinom.

- \* Hroničan tretman daidzeinom nije uticao na volumen PVN i intenzitet imunoobojenosti CRH neurosekreta u ME, ali je smanjio volumensku gustinu CRH neurona i povećao volumensku gustinu CRH/cFos neurona.
- \* Nakon hroničnog tretmana daidzeinom nije došlo do promena stereoloških i histoloških parametara (volumenske i numeričke gustine, apsolutnog broja i volumena, intenziteta obojenosti) ACTH ćelija.
- \* Nivo ACTH je povećan u cirkulaciji nakon tretmana daidzeinom.

## 7. LITERATURA

1. **Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach SL, Hockerstedt KA, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makela TH, Wahala KT, Adlercreutz T** (1995) Soybean phytoestrogen intake and cancer risk, Review. *J Nutr* 125(3):757-770.
2. **Adlercreutz H** (1990) Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 201:3-23.
3. **Adlercreutz H, Fotsis T, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T** (1986) Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets. *J Steroid Biochem* 25(5):791-797.
4. **Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C, Bloigu S, Hamalainen E, Fotsis T, Ollus A** (1987) Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG) *J Steroid Biochem* 27(4-6):1135-1144.
5. **Adlercreutz H, Mazur W** (1997) Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29(2):95-120.
6. **Ahmed HH, Fayez M, Meites J** (1989) Episodic growth hormone secretory pattern in male rats: relationship to gonadal steroid hormones. *Zentralbl Veterinarmed A* 36(4):292-298.
7. **Ajdžanović V, Šosić-Jurjević B, Filipović B, Trifunović S, Manojlović-Stojanoski M, Sekulić M, Milosević V** (2009) Genistein-induced histomorphometric and hormone secreting changes in the adrenal cortex in middle-aged rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 234(2):148-156.
8. **Ajdžanović V, Spasojević I, Filipović B, Šosić-Jurjević B, Sekulić M, Milosević V** (2010) Effects of genistein and daidzein on erythrocyte membrane fluidity: an electron paramagnetic resonance study. *Can J Physiol Pharmacol* 88(4):497-500.

9. **Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y** (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262(12):5592-5595.
10. **Alonso G, Tapia-Arancibia L, Assenmacher I** (1985) Electron microscopic immunocytochemical study of somatostatin neurons in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus with special reference to their relationships with homologous neuronal processes. *Neuroscience* 16:297–306.
11. **Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL Jr, Morgan TM, Burke GL** (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 126(1):43-50.
12. **Antonioli E, Bruni Cardoso A, Carvalho H** (2007) Effects of long-term castration on the smooth muscle cell phenotype of the rat ventral prostate. *J Androl* 28(5):777-783.
13. **Argente J, Chowen-Breed JA, Steiner RA, Clifton DK** (1990) Somatostatin messenger RNA in hypothalamic neurons is increased by testosterone through activation of androgen receptors and not by aromatization to estradiol. *Neuroendocrinology* 52(4):342-349.
14. **Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC** (1996) Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126(1):161-167.
15. **Asa SL, Ezzat S** (1999) Molecular determinants of pituitary cytodifferentiation, Review. *Pituitary*1(3-4):159-168.
16. **Asarian L, Geary N** (2002) Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav* 42:461–471.
17. **Asarian L, Geary N** (2006) Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. Review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1471):1251-1263.
18. **Atluru D, Gudapaty S** (1993) Inhibition of bovine mononuclear cell proliferation, interleukin-2 synthesis, protein-tyrosine kinase and leukotriene B4 production by a protein-tyrosine kinase inhibitor, genistein. *Vet Immunol Immunopathol* 38(1-2):113-122.

19. **Axelsson M, Setchell KD** (1981) The excretion of lignans in rats: evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. *FEBS Lett* 123(2):337-342.
20. **Badger TM, Millard WJ, Owens SM, LaRovere J, O'Sullivan D** (1991) Effects of gonadal steroids on clearance of growth hormone at steady state in the rat. *Endocrinology* 128:1065–1072.
21. **Baghurst PA, Rohan TE** (1994) High-fiber diets and reduced risk of breast cancer. *Int J Cancer* 56(2):173-176.
22. **Bai LF, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, Tohyama M** (1985) An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res* 331:172–175.
23. **Baird A, Wehrenberg WB, Shibasaki T, Benoit R, Chong-Li Z, Esch F, Ling N** (1982) Ovine corticotropin-releasing factor stimulates the concomitant secretion of corticotropin, b-lipotropin, b-endorphin and g-melanotropin by the bovine adenohypophysis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 108:959–964.
24. **Baldino F, Fitzpatrick-McElligott S, O'Kane TM, Gozes I** (1988) Hormonal regulation of somatostatin messenger RNA *Synapse* 2(3):317-325.
25. **Bao AM, Fischer DF, Wu YH, Hol EM, Balesar R, Unmehopa UA, Zhou JN, Swaab DF** (2006) A direct androgenic involvement in the expression of human corticotropin-releasing hormone. *Mol Psychiatry* 11(6):567-576.
26. **Bardin CW, Brown T, Isomaa VV, Janne OA** (1983) Progestins can mimic, inhibit and potentiate the actions of androgens. *Pharmacol Ther* 23(3):443–459.
27. **Barnes S, Boersma B, Patel R, Kirk M, Darley-USmar VM, Kim H, Xu J** (2000) Isoflavonoids and chronic disease: mechanisms of action. *Review Biofactors* 12(1-4):209-215.
28. **Beaudet A, Greenspun D, Raelson J, Tannenbaum GS** (1995) Patterns of expression of SSTR1 and SSTR2 somatostatin receptor subtypes in the hypothalamus of the adult rat: relationship to neuroendocrine function. *Neuroscience* 65(2):551-561.
29. **Ben-Jonathan N, Liu JW** (1992) Pituitary lactotrophs: endocrine, paracrine, juxtacrine, and autocrine interactions. *Trends Endocrinol Metab* 3(7):254-258.

30. **Bennett PA, Levy A, Carmignac DF, Robinson IC, Lightman SL** (1996) Differential regulation of the growth hormone receptor gene: effects of dexamethasone and estradiol. *Endocrinology* 137(9):3891-3896.
31. **Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL** (1946) A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust Vet J* 22:2-12.
32. **Bergendahl M, Iranmanesh A, Pastor C, Evans WS, Veldhuis JD** (2000) Homeostatic joint amplification of pulsatile and 24-hour rhythmic cortisol secretion by fasting stress in midluteal phase women: concurrent disruption of cortisol-growth hormone, cortisol-luteinizing hormone, and cortisol-leptin synchrony. *J Clin Endocrinol Metab* 85(11):4028-4035.
33. **Besedovsky HO, del Rey A** (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses, Review. *Endocr Rev* 17(1):64-102.
34. **Bilezikjian LM, Vale WW** (1983) Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 113(5):1726-1731.
35. **Bingaman EW, Magnuson DJ, Gray TS, Handa RJ** (1994). Androgen inhibits the increases in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-immunoreactivity following gonadectomy. *Neuroendocrinology* 593:228-234.
36. **Blair HC, Jordan SE, Peterson TG, Barnes S** (1996) Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem* 61(4):629-637.
37. **Blazquez JL, Pastor FE, Amat P, Pelaez B, Sanchez A, Amat-Peral G** (1995) Giant granular filamentous bodies in the cytoplasm of arcuate nucleus neurons of castrated rats. *Histol Histopathol* 10(2):385-392.
38. **Bodo C, Rissman EF** (2006) New roles for estrogen receptor beta in behavior and neuroendocrinology, Review. *Front Neuroendocrinol* 27:217-232.
39. **Bohler HC, Zoeller RT, King JC, Rubin BS, Weber R, Merriam GR** (1990). Corticotropin releasing hormone mRNA is elevated on the afternoon of

- proestrus in the parvocellular paraventricular nuclei of the female rat. *Brain Res Mol. Brain Res* 8:259–262.
40. **Borras C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE, Vina J** (2006) Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. *FASEB J* 20(12):2136-2138.
  41. **Borst SE, Conover CF** (2006) Orchiectomized Fischer 344 male rat models body composition in hypogonadal state *Life Sci* 79(4):411-415.
  42. **Bottner M, Wuttke W** (2006) Chronic treatment with physiological doses of estradiol affects the GH-IGF-1 axis and fat metabolism in young and middle-aged ovariectomized rats. *Biogerontology* 7(2):91-100.
  43. **Boulanger L, Roughly P, Gaudreau P** (1992) Catabolism of rat growth hormone-releasing factor (1-29) amide in rat serum and liver. *Peptides* 13(4):681-689.
  44. **Bowers G, Cullinan WE, Herman JP** (1998) Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci* 18(15):5938-5947.
  45. **Bradbury RB, White DE** (1954) Estrogens and related substances in plants. *Vitam Horm* 12:207-233.
  46. **Brannvall K, Korhonen L, Lindholm D** (2002) Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci* 21(3):512-520.
  47. **Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R** (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179(4068):77-79.
  48. **Breder CD, Yamada Y, Yasuda K, Seino S, Saper CB, Bell GI** (1992) Differential expression of somatostatin receptor subtypes in brain. *J Neurosci* 12:3920–3934.
  49. **Brewster ME, Anderson WR, Pop E** (1997) Effect of sustained estradiol release in the intact male rat: correlation of estradiol serum levels with actions on body weight, serum testosterone, and peripheral androgen-dependent tissues. *Physiol Behav* 61(2):225-229.



50. **Brown LM, Clegg DJ** (2010) Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122(1-3):65-73.
51. **Bu L, Lephart ED** (2007) AVPV neurons containing estrogen receptor-beta in adult male rats are influenced by soy isoflavones. *BMC Neurosci* 1:8:13.
52. **Burgess LH, Handa RJ** (1993) Estrogen-induced alterations in the regulation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor messenger RNA expression in the female anterior pituitary gland and brain. *Mol Cell Neurosci* 4:191-198.
53. **Burton KA, Kabigting EB, Clifton DK, Steiner RA** (1992) Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid distribution in the adult male rat brain and its colocalization in hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology* 131(2):958-963.
54. **Carretero J, Sanchez F, Gonzalez R, Montero M, Juanes JA Riesco JM, Vazquez R** (1992) Morphometric analysis of GH immunoreactive cells after GH release induced by treatment with oestrogen in adult male rats. *Acta Histochem* 93:271 -276.
55. **Carter-Su C, Schrawtz J, Smit LS** (1996) Molecular mechanism of growth hormone action. *Annu Rev Physiol* 58:187–207.
56. **Cassidy A, Bingham S, Setchell K** (1995) Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. *Br J Nutr* 74(4):587-601.
57. **Castano JP, Ruiz-Navarro A, Malagon MM, Hidalgo-Diaz C, Gracia-Navarro F** (1997) Secretory and morphological heterogeneity of porcine somatotropes during postnatal development. *J Neuroendocrinol* 9(10):769-775.
58. **Castano JP, Torronteras R, Ramirez JL, Gribouval A, Sanchez-Hormigo A, Ruiz-Navarro A, Gracia-Navarro F** (1996) Somatostatin increases growth hormone (GH) secretion in a subpopulation of porcine somatotropes: evidence for functional and morphological heterogeneity among porcine GH-producing cells. *Endocrinology* 137(1):129-136.
59. **Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR** (2000) Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 130(8):1963-1970.

60. **Chang SB, Miron P, Miron A, Iglehart JD** (2007) Rapamycin inhibits proliferation of estrogen-receptor-positive breast cancer cells *J Surg Res* 138(1):37-44.
61. **Chatelain A, Dupouy JP, Dubois MP** (1979) Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, prolactin) in the fetal hypophysis of the rat: influence of the hypothalamus. *Cell Tissue Res* 28:196(3):409-427.
62. **Chen JW, Zhu ZQ, Hu TX, Zhu DY** (2002) Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects. *Acta Pharmacol Sin* 23(7):667-672.
63. **Chen TS, Doong ML, Chang FY, Lee SD, Wang P** (1995) Effects of sex steroid hormones on gastric emptying and gastrointestinal transit in rats. *Am J Physiol* 268:171–176.
64. **Cheng SY, Shaw NS, Tsai KS, Chen CY** (2004) The hypoglycemic effects of soy isoflavones on postmenopausal women. *J Womens Health (Larchmt)* 13(10):1080-1086.
65. **Childs GV, Iruthayanathan M, Akhter N, Johnson BW** (2006) Estrogen mediated cross talk between the ovary and pituitary somatotrope. Pre-ovulatory support for reproductive activity, Review. *Mol Cell Endocrinol* 247(1-2):60-3.
66. **Childs GV, Iruthayanathan M, Akhter N, Unabia G, Whitehead-Johnson B** (2005) Bipotential effects of estrogen on growth hormone synthesis and storage in vitro. *Endocrinology* 146(4):1780-1788.
67. **Cho ES, Lee SY, Park JY, Hong SG, Ryu PD** (2007). Organotypic slice culture of the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *J Vet Sci* 8:15-20.
68. **Christoffersen B, Raun K, Svendsen O, Fledelius C and Golozoubova V** (2006) Evaluation of the castrated male Sprague–Dawley rat as a model of the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)* 30, 1288–1297.
69. **Chronwall BM** (1985) Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides* 6:1–11.
70. **Chrousos GP** (1992) Regulation and dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis: the corticotropin releasing hormone perspective. *Endocrinol Metab Clinics NA* 21:833–858.

71. **Chrousos GP** (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation *N Engl J Med* 332:1351–1362.
72. **Chu S, Fuller PJ** (1997) Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Mol Cell Endocrinol* 132(1-2):195-199.
73. **Clancy AN, Bonsall RW, Michael RP** (1992) Immunohistochemical labeling of androgen receptors in the brain of rat and monkey *Life Sci* 50(6):409-417.
74. **Clark RG, Carlsson LM, Robinson IC** (1987) Growth hormone secretory profiles in conscious female rats. *J Endocrinol* 114:399-407.
75. **Clark RG, Jansson JO, Isaksson O, Robinson IC** (1985) Intravenous growth hormone: growth responses to patterned infusions in hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 104(1):53-61.
76. **Clayton RN, Bailey LC, Abbot SD, Detta A, Docherty K** (1986) Cyclic adenosine nucleotides and growth hormone-releasing factor increase cytosolic growth hormone messenger RNA levels in cultured rat pituitary cells. *J Endocrinol* 110(1):51-57.
77. **Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, Kemp CJ, Strader AD, Benoit SC, Woods SC, Mangiaracina M, Geary N** (2007) Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes* 56(4):1051-1058.
78. **Cohen LA, Choi K, Numoto S, Reddy M, Berke B, Weisburger JH** (1986) Inhibition of chemically induced mammary carcinogenesis in rats by long-term exposure to butylated hydroxytoluene (BHT): interrelations among BHT concentration, carcinogen dose, and diet. *J Natl Cancer Inst* 76(4):721-730.
79. **Cohick WS, Clemmons DR** (1993) The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 55:131–153.
80. **Cone RD, Low MJ, Elmquist JK, Cameron JL** (2002) Neuroendocrinology. In Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Plonsky KS, eds *Williams, Text Book of Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders Company 81-176.
81. **Console GM, Jurado SB, Rulli SB, Calandra RS, Gomez Dumm CL** (2001) Ultrastructural and quantitative immunohistochemical changes induced by nonsteroid antiandrogens on pituitary gonadotroph population of prepubertal male rats. *Cells Tissues Organs* 169(1):64-72.

82. **Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R.** (1995) Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod* 58(2):217-225.
83. **Cortright RN, Koves TR** (2000) Sex differences in substrate metabolism and energy homeostasis. *Can J Appl Physiol* 25:288–311.
84. **Crofford LJ, Sano H, Karalis K** (1995) Local expression of corticotropin-releasing hormone in inflammatory arthristis. *Ann NY Acad Sci* 771: 459–471
85. **Cronin MJ, Summers ST, Sortino MA, Hewlett EL** (1986) Protein kinase C enhances growth hormone releasing factor (1-40)-stimulated cyclic AMP levels in anterior pituitary. Actions of somatostatin and pertussis toxin. *J Biol Chem* 261(30):13932-13935.
86. **Crosby EC, Woodburne (1940)** The comparative anatomy of the preoptic area and the hypothalamus. *Proc Assoc Res. Nerv Mental Dis* 20:52-169.
87. **Cullinan WE, Helmreich DL, Watson SJ** (1996) Fos expression in forebrain afferents to the hypothalamic paraventricular nucleus following swim stress. *J Comp Neurol* 22:368(1):88-99.
88. **Daikoku S, Hisano S, Kawano H, Chikamori-Aoyama M, Kagotani Y, Zhang RJ, Chihara K** (1988) Ultrastructural evidence for neuronal regulation of growth hormone secretion. *Neuroendocrinology* 47:405–415.
89. **Dalais FS, Rice GE, Wahlqvist ML, Grehan M, Murkies AL, Medley G, Ayton R, Strauss BJ** (1998) Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. *Climacteric* 1(2):124-129.
90. **Danzer SC, McMullen NT, Rance NE** (1998) Dendritic growth of arcuate neuroendocrine neurons following orchidectomy in adult rats *J Comp Neurol* 390(2):234-246.
91. **Danzer SC, McMullen NT, Rance NE** (2001) Testosterone modulates the dendritic architecture of arcuate neuroendocrine neurons in adult male rats. *Brain Res* 890(1):78-85.
92. **Daughaday WH** (1992) Pituitary gigantism, Review. *Endocrinol Metab Clin North Am* 21(3):633-647.
93. **Davis DL, Bradlow HL** (1995) Can environmental estrogens cause breast cancer? *Sci Am* 273(4):167-172.

94. **de Lima A.R, Nyengaard JR, Jorge AA, Balieiro JC, Peixoto C, Fioretto E.T, Ambrosio CE, Miglino MA, Zatz M, Ribeiro AA** (2007) Muscular dystrophy-related quantitative and chemical changes in adenohipophysis GH-cells in golden retrievers. *Growth Horm IGF Res.* 17:480-491.
95. **Decavel C, van den Pol AN** (1992) Converging GABA and glutamate-immunoreactive axons make synaptic contact with identified hypothalamic neurosecretory neurons. *J Comp Neurol* 316(1):104-116.
96. **DeGennaro Colonna V, Zoli M, Cocchi D, Maggi A, Marrama P, Agnati LF, Muller EE** (1989) Reduced growth hormone releasing factor (GHRF)-like immunoreactivity and GHRF gene expression in the hypothalamus of aged rats. *Peptides* 10(3):705-708.
97. **Delclos KB, Bucci TJ, Lomax LG, Latendresse JR, Warbritton A, Weis CC, Newbold RR** (2001) Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol* 15(6):647-663.
98. **Dellovade TL, Merchenthaler I** (2004) Estrogen regulation of neurokinin B gene expression in the mouse arcuate nucleus is mediated by estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 145(2):736-742.
99. **Divi RL, Chang HC, Doerge DR** (1997) Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochem Pharmacol* 54(10):1087-1096.
100. **Doerge DR, Churchwell MI, Chang HC, Newbold RR, Delclos KB** (2001) Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod Toxicol* 15(2):105-110.
101. **Doerge DR, Sheehan DM** (2002) Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones, Review. *Environ Health Perspect* 3:349-353.
102. **Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ** (2001) Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size *J Microsc* 204(3):232-246.
103. **Dotzler SA, Digeronimo RJ, Yoder BA, Siler-Khodor TM** (2004) Distribution of corticotropin releasing hormone in fetus, newborn, juvenile, and adult baboon. *Pediatr Res* 55:120-125.

104. **Dournaud P, Gu YZ, Schonbrunn A, Mazella J, Tannenbaum GS, Beaudet A** (1996) Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific anti-peptide antibody. *J Neurosci* 16(14):4468-4478.
105. **Driggers PH, Segars JH** (2002) Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling, Review. *Trends Endocrinol Metab* 13(10):422-427.
106. **Dunn AJ, Berridge CW** (1990) Is corticotropin-releasing factor a mediator of stress responses? Review. *Ann N Y Acad Sci* 579:183-191.
107. **Eden S** (1979) Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 105:555-560.
108. **Elenkov IJ, Webster EL, Torpy DJ, Chrousos GP** (1999) Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response Acute and chronic effects. *Ann NY Sci* 876:1–11.
109. **Ellerkmann E, Nagy GM, Frawley LS** (1991) Rapid augmentation of prolactin cell number and secretory capacity by an estrogen-induced factor released from the neurointermediate lobe. *Endocrinology* 129(2):838-842.
110. **Engler D, Redei E, Kola I** (1999) The corticotropin-release inhibitory factor hypothesis: a review of the evidence for the existence of inhibitory as well as stimulatory hypophysiotropic regulation of adrenocorticotropin secretion and biosynthesis. Review. *Endocr Rev* 20(4):460-500.
111. **Enmark E, Gustafsson JA** (1999) Oestrogen receptors-an overview. *J Intern Med* 246:133–138.
112. **Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA** (1997) Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4258–4265.
113. **Eppler E, Jevdović T, Maake C, Reinecke M** (2007) Insulin-like growth factor I (IGF-I) and its receptor (IGF-1R) in the rat anterior pituitary. *Eur J Neurosci* 25(1):191-200.
114. **Estupina C, Pinter A, Belmar J, Astier H, Arancibia S** (1996) Variations in hypothalamic somatostatin release and content during the estrous cycle in the

- rat. Effects of ovariectomy and estrogen supplementation. *Neuroendocrinology* 63:181–187.
115. **Evans BA, Griffiths K, Morton MS** (1995) Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J Endocrinol* 147(2):295-302.
116. **Everitt BJ, Hokfelt T** (1990) Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 47:1-15.
117. **Everitt BJ, Meister B, Hokfelt T, Melander T, Terenius L, Rokaesus A, Theodorsson-Norheim E, Dockray G, Edwardson J, Cuello C, Elde R, Goldstein M, Hemmings H, Ouimet C, Walaas I, Greengard P, Vale W, Weber E, Yu JY, Chang KJ** (1986) The hypothalamic arcuate nucleus-median eminence complex: Immunohistochemistry of transmitters, peptides and DARPP-32 with special reference to coexistence in dopamine neurons. *Brain Res Rev* 11:97–155.
118. **Evuarherhe O, Leggett JD, Waite EJ, Kershaw YM, Atkinson HC, Lightman SL** (2009). Organizational role for pubertal androgens on adult hypothalamic-pituitary-adrenal sensitivity to testosterone in the male rat. *J Physiol* 587:2977-2985.
119. **Faber KA, Hughes CL** (1991) The effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol, genistein, and zearalenone on pituitary responsiveness and sexually dimorphic nucleus volume in the castrated adult rat. *Biol Reprod* 45(4):649-653.
120. **Faqi AS, Johnson WD, Morrissey RL, McCormick DL** (2004) Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *Reprod Toxicol.* 18(4):605-611.
121. **Fernandez G, Sanchez-Franco F, de los Frailes MT, Tolon RM, Lorenzo MJ, Lopez J, Cacicedo L** (1992) Regulation of somatostatin and growth hormone-releasing factor by gonadal steroids in fetal rat hypothalamic cells in culture *Regul Pept* 42(3):135-144.
122. **Figueiredo HF, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Herman JP** (2007) Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(4): 1173-1182.

123. **Filipović B, Šošić-Jurjević B, Ajdžanović V, Brkić D, Manojlović-Stojanoski M, Milošević V, Sekulić M** (2010) Daidzein administration positively affects thyroid C cells and bone structure in orchidectomized middle-aged rats. *Osteoporos Int* 21(9):1609-1616.
124. **Fix C, Jordan C, Cano P, Walker WH** (2004) Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(30):10919–10924.
125. **Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F** (2000) Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J* 19(17):4688-4700.
126. **Flugge G, Oertel WH, Wuttke W** (1986) Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area of the rat brain. *Neuroendocrinology* 43(1):1-5.
127. **Fodor M, Csaba Z, Kordon C, Epelbaum J** (1994) Growth hormone-releasing hormone, somatostatin, galanin and beta-endorphin afferents to the hypothalamic periventricular nucleus. *J Chem Neuroanat* 8(1):61-73.
128. **Fodor M, Oudejans CB, Delemarre-van de Waal HA** (2001) Absence of androgen receptor in the growth hormone releasing hormone-containing neurones in the rat mediobasal hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 13(8):724-727.
129. **Folman Y, Pope GS** (1966) The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other utero-vaginitrophic compounds of low potency. *J Endocrinol* 34(2):215-225.
130. **Forger NG** (2006) Cell death and sexual differentiation of the nervous system. *Neuroscience* 138:929–938.
131. **Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L** (1993) Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(7):2690-2694.
132. **Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L** (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 57(14):2916-2921.



133. **Francis BH, Baskin DG, Saunders DR, Ensinck JW** (1990) Distribution of somatostatin-14 and somatostatin-28 gastrointestinal-pancreatic cells of rats and humans. *Gastroenterology* 99(5):1283-1291.
134. **Freeman ME** (1994) The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neill JD eds *The physiology of reproduction*, vol 2. Raven Press, New York 613–658.
135. **Frohman LA, Jansson JO** (1986) Growth hormone-releasing hormone. *Endocr Rev* 7(3):223-253.
136. **Fuhrmann H** (1986) *Germany in the middle ages. Cambridge medieval textbooks*, Cambridge: Cambridge University Press 1050-1200.
137. **Fujimoto N** (2003) Effects of environmental estrogenic compounds on growth of a transplanted estrogen responsive pituitary tumor cell line in rats. *Food Chem Toxicol* 41(12):1711-1717.
138. **Gabriel SM, Millard WJ, Koenig JI, Badger TM, Russell WE, Maiter DM, Martin JB** (1989) Sexual and developmental differences in peptides regulating growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 50(3):299-307.
139. **Galanopoulou AS, Kent G, Rabbani SN, Seidah NG, Patel YC** (1993) Heterologous processing of prosomatostatin in constitutive and regulated secretory pathways. Putative role of the endoproteases furin, PC1, and PC2. *J Biol Chem* 268(8):6041-6049.
140. **Gantz I, Tashiro T, Barcroft C, Konda Y, Shimoto Y, Miwa H, Glover T, Munzert G, Yamada T** (1993) Localization of the genes encoding the melanocortin-2 (adrenocorticotrophic hormone) and melanocortin-3 receptors to chromosomes 18p11.2 and 20q13.2-q13.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 18(1):166-167.
141. **Gasc JM, Baulieu EE** (1988) Regulation by estradiol of the progesterone receptor in the hypothalamus and pituitary: an immunohistochemical study in the chicken. *Endocrinology* 122(4):1357-1365.
142. **Gatford KL, Egan AR, Clarke IJ, Owens PC** (1998) Sexual dimorphism of the somatotrophic axis. *J Endocrinol* 157:373-389.

143. **Gaudette DC, Holub BJ** (1990) Effect of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on U46619-induced phosphoinositide phosphorylation in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 170(1):238-242.
144. **Geary N** (2004) The estrogenic inhibition of eating. In *Handbook of behavioral neurobiology*, vol. 14. Neurobiology of food and fluid intake Stricker E.M, Woods S.C 2nd edn. eds: New York, NY:Kluwer. 307–345.
145. **Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW** (1990) Molecular biology of the pituitary gonadotropins, Review. *Endocr Rev* 11(1):177-199.
146. **Ghayee HK, Auchus RJ** (2007) Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Review.Rev Endocr Metab Disord.* 8(4):289-300.
147. **Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ** (1982) Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 299:355–357.
148. **Giordano R, Bonelli L, Marinazzo E, Ghigo E, Arvat E** (2008) Growth hormone treatment in human ageing: benefits and risks. *Hormones (Athens)* 7(2):133-139.
149. **Giustina A, Veldhuis JD** (1998) Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 19:717–797.
150. **Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA** (1996) Sequence–function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr Rev* 17:385–410.
151. **Goncharuk VD, Van Heerikhuize J, Swaab DF, Buijs RM** (2002) Paraventricular nucleus of the human hypothalamus in primary hypertension: activation of corticotropin-releasing hormone neurons. *J Comp Neurol* 18:443(4):321-331.
152. **Gonzalez-Parra S, Argente J, Garcia-Segura LM, Chowen JA** (1998) Cellular composition of the adult rat anterior pituitary is influenced by the neonatal sex steroid environment. *Neuroendocrinology* 68(3):152-162.
153. **Gorski RA** (1978) Sexual differentiation of the brain. *Hosp Pract* 13(10):55-62.

154. **Gourdji D, Laverrière JN** (1994) The rat prolactin gene: a target for tissue-specific and hormone-dependent transcription factors, Review. *Mol Cell Endocrinol* 100(1-2):133-142.
155. **Gradosova I, Zivna H, Palicka V, Hubena S, Svejtkovska K, Zivny P** (2012) Protective effect of atorvastatin on bone tissue in orchidectomised male albino Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 679(1-3):144-150.
156. **Grantz I, Miwa H, Konda Y** (1993) Molecular cloning, expression, and gene localization of fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268:15174-15179.
157. **Grigoriadis DE, Haddach M, Ling N, Saunders J** (2001) The CRF receptor: Structure, function and potential for therapeutic intervention. *Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents* 1(1): 63-97(35).
158. **Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB** (1982) Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218(4572):585-587.
159. **Gundersen HJ** (1986). Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc* 143, 3-45
160. **Gundersen HJ, Jensen EB** (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* 147:229-263.
161. **Guo Q, Rimbach G, Moini H, Weber S, Packer L** (2002) ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology* 179(1-2):171-180.
162. **Haas, DA, George SR** (1989) Neuropeptide Y-induced effects on hypothalamic corticotropin-releasing factor content and release are dependent on noradrenergic/adrenergic neurotransmission. *Brain Res* 498:333-338.
163. **Hamilton WJ, Mossman HW** (1982) Human embryology, Heffer Cambridge 437-535.
164. **Hammond GL** (1995) Potential functions of plasma steroid-binding proteins. *Trends Endocrinol Metab* 6(9-10):298-304.
165. **Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keffe JA** (1994). Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav* 28:464-476.

166. **Hartley DE, Edwards JE, Spiller CE, Alom N, Tucci S, Seth P, Forsling ML, File SE** (2003) The soya isoflavone content of rat diet can increase anxiety and stress hormone release in the male rat. *Psychopharmacology (Berl)* 167(1):46-53.
167. **Harvey S** (1995) Growth hormone release: integrative hypothalamic control. In *Growth Hormone* Eds S Harvey, CG Scanes and WH Daughaday, Florida CRC Press: 131–162.
168. **Hasegawa O, Sugihara H, Minami S, Wakabayashi I** (1992) Masculinization of growth hormone (GH) secretory pattern by dihydrotestosterone is associated with augmentation of hypothalamic somatostatin and GH-releasing hormone mRNA levels in ovariectomized adult rats. *Peptides* 13:475-481.
169. **Haugen BR, Gordon DF, Nelson AR, Wood WM, Ridgway EC** (1994) The combination of Pit-1 and Pit-1T have a synergistic stimulatory effect on the thyrotropin beta-subunit promoter but not the growth hormone or prolactin promoters. *Mol Endocrinol* 8(11):1574-1582.
170. **Hauspie A, Seuntjens E, Vankelecom H, Denef C** (2003) Stimulation of combinatorial expression of prolactin and glycoprotein hormone alpha-subunit genes by gonadotropin-releasing hormone and estradiol-17beta in single rat pituitary cells during aggregate cell culture. *Endocrinology* 144(1):388-399.
171. **Haymond MW, Mauras N** (1996) The rationale for the use of recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor-I for catabolic conditions in humans, Review. *Horm Res* 46(4-5):202-207.
172. **Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A** (2001) Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro* 15(1):3-6.
173. **Heinlein CA, Chang C** (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 16 (10):2181–2187.
174. **Herbison AE** (1995) Sexually dimorphic expression of androgen receptor immunoreactivity by somatostatin neurones in rat hypothalamic periventricular nucleus and bed nucleus of the stria terminalis. *J Neuroendocrinol* 7(7):543-53.

175. **Herbison AE, Augood SJ** (1994) Expression of GABA receptor alpha 2 subunit mRNA by periventricular somatostatin neurones in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 173(1-2):9-13.
176. **Herbison AE, Theodosis DT** (1993) Absence of estrogen receptor immunoreactivity in somatostatin (SRIF) neurons of the periventricular nucleus but sexually dimorphic colocalization of estrogen receptor and SRIF immunoreactivities in neurons of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology* 132(4):1707-1714.
177. **Herlant M** (1964) The cells adenohypophysis and their functional significance. *Int Rev Cytol* 17:299-382.
178. **Herman JP, Tasker JG, Ziegler DR, Cullinan WE** (2002) Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: glutamate-GABA connections, Review. *Pharmacol Biochem Behav* 71(3):457-468.
179. **Hira Y, Sakai Y, Matsushima S** (2001) Effects of photoperiod and melatonin on the development of growth hormone cells and the pituitary-adrenal axis in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Arch Histol Cytol* 64(2):211-222.
180. **Hisano S, Tsuruo Y, Kagotani Y, Daikoku S, Chihara K** (1990) Immunohistochemical evidence for synaptic connections between neuropeptide Y-containing axons and periventricular somatostatin neurons in the anterior hypothalamus in rats. *Brain Res* 520:170-177.
181. **Ho KY, Hoffman DM** (1993) Aging and growth hormone. *Horm Res* 40:80-86.
182. **Holzbeierlein JM, McIntosh J, Thrasher JB** (2005) The role of soy phytoestrogens in prostate cancer. Review. *Curr Opin Urol* 15(1):17-22.
183. **Horvath E, Kovach K** (1988) Fine structural cytology of the adenohypophysis. *J Electron Microscop Tech* 8:401-432.
184. **Horvath S, Palkovits M** (1988) Synaptic interactions among growth hormone-releasing hormone (GHRH)-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 48:471-476.
185. **Howard CV, Reed MG** (2005) *Unbiased Stereology. Second Edition.* Garland Science/BIOS Scientific Publishers, New York 1-277.

186. **Howlett TA, Price J, Hale AC, Doniach I, Rees LH, Wass JA, Besser GM** (1985) Pituitary ACTH dependent Cushing's syndrome due to ectopic production of a bombesin-like peptide by a medullary carcinoma of the thyroid. *Clin Endocrinol (Oxf)* 22:91–101.
187. **Hrabovszky E, Kallo I, Steinhauser A, Merchenthaler I, Coen CW, Petersen SL, Liposits Z** (2004) Estrogen receptor-beta in oxytocin and vasopressin neurons of the rat and human hypothalamus: Immunocytochemical and in situ hybridization studies. *J Comp Neurol* 473(3):315-333.
188. **Hsu C, Yang SL, Hsieh YL, Lue SI, Hsu HK, Peng MT** (1998) Enlarging effects of estradiol on the nuclear volume of neurons in the hypothalamus during aging. *Gerontology* 44(3):140-143.
189. **Huang RQ, Fang MJ, Dillon GH** (1999) The tyrosine kinase inhibitor genistein directly inhibits GABA receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 67(1):177-183.
190. **Huang X, Harlan RE** (1994) Androgen receptor immunoreactivity in somatostatin neurons of the periventricular nucleus but not in the bed nucleus of the stria terminalis in male rats *Brain Res* 652(2):291-296.
191. **Hughes CL Jr, Chakinala MM, Reece SG, Miller RN, Schomberg DW Jr, Basham KB** (1991) Acute and subacute effects of naturally occurring estrogens on luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat: Part 2. *Reprod Toxicol* 5(2):133-137.
192. **Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Goldbohm RA, Graham S, Howe GR** (1996) Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer-a pooled analysis. *N Engl J Med* 334(6):356-361.
193. **Hutchins AM, Lampe JW, Martini MC, Campbell DR, Slavin JL** (1995) Vegetables, fruits, and legumes: effect on urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion. *J Am Diet Assoc* 95(7):769-774.
194. **Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG** (1999) The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20(6):761-787.
195. **Ibrahim AR, Abul-Hajj YJ** (1990) Aromatase inhibition by flavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(2):257-260.

196. **Inoue K, Tanaka S, Kurosumi K** (1985). Mitotic activity of gonadotropes in the anterior pituitary of the castrated male rat. *Cell Tissue Res* 240:271-276.
197. **Ishikawa K, Taniguchi Y, Kurosumi K, Suzuki M, Shinoda M** (1987) Immunohistochemical identification of somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology* 121(1):94-97.
198. **Iwama Y, Sasaki F** (1989) Classifications of somatotropes, lactotropes and corticotropes in the mouse adenohypophysis with immunohistochemistry. *Acta Anat (Basel)* 134(3):232-236.
199. **Jansson J-O, Eden S, Isaksson O** (1985) Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocrine Reviews* 6:128–150.
200. **Jansson JO, Ekberg S, Isaksson OG, Eden S** (1984) Influence of gonadal steroids on age- and sex-related secretory patterns of growth hormone in the rat. *Endocrinology* 114(4):1287-1294.
201. **Jansson JO, Frohman LA** (1987) Differential effects of neonatal and adult androgen exposure on the growth hormone secretory pattern in male rats. *Endocrinology* 120(4):1551-1557.
202. **Jensen E, Jacobsen H** (1962) Basic guides to mechanisms of estrogen receptor action. *Recent Prog Horm Res* 18:387-414.
203. **Jensen EV, Jordan VC** (2003). The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 9(6):1980-1989.
204. **Jiao Q, Pruznak AM, Huber D, Vary TC, Lang CH** (2009) Castration Differentially Alters Basal and Leucine-Stimulated Tissue Protein Synthesis in Skeletal Muscle and Adipose Tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:1221-1232.
205. **Jonas JC, Plant TD, Gilon P, Detimary P, Nenquin M, Henquin JC** (1995) Multiple effects and stimulation of insulin secretion by the tyrosine kinase inhibitor genistein in normal mouse islets. *Br J Pharmacol* 114(4):872-880.
206. **Jones KJ, Pfaff DW, McEwen BS** (1985) Early estrogen-induced nuclear changes in rat hypothalamic ventromedial neurons: an ultrastructural and morphometric analysis. *Comp Neurol* 239(3):255-266.

207. **Jung-Testas I, Renoir M, Bugnard H, Greene GL, Baulieu EE** (1992) Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells. *Steroid Biochem Mol Biol* 41(3-8):621-631.
208. **Kakucska I, Tappaz ML, Gaal Gy, Stoeckel ME, Makara GB** (1988) GABAergic innervation of somatostatin-containing neurosecretory cells of the anterior periventricular hypothalamic area: a light and electron microscopy double immunolabelling study. *Neuroscience* 25:585–593.
209. **Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I** (2001) Estrogen receptor (ER)alpha, but not ERbeta, gene is expressed in growth hormone-releasing hormone neurons of the male rat hypothalamus. *Endocrinology* 142(2):538-543.
210. **Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM** (2000) *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Companies Inc.
211. **Kao YC, Zhou C, Sherman M, Laughton CA, Chen S** (1998) Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environ Health Perspect* 106(2):85-92.
212. **Karalis K, Sano H, Redwine S, Listwak R, Wilder L, Chrousos GP** (1991) Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254:421–423.
213. **Karanth S, McCann SM** (1991) Anterior pituitary hormone control by interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(7):2961-2965.
214. **Kastin JA** (2005) Hypothalamic neuropeptides and blood-brain barrier, chapter 93 in *Handbook of biologically active peptides*. Elsevier inc.
215. **Katahira M, Iwasaki Y, Aoki Y, Oiso Y, Saito H** (1998) Cytokine regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells. *Endocrinology* 139(5):2414-2422.
216. **Katznelson L, Finkelstein JS, Schoenfeld DA, Rosenthal DI, Anderson EJ, Klibanski A** (1996) Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4358–4365.



217. **Kawano H, Daikoku S** (1987) Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 8:265(2):242-253.
218. **Kawano H, Daikoku S** (1988) Somatostatin-containing neuron systems in the rat hypothalamus: retrograde tracing and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol* 271(2):293-299.
219. **Kawata M, Hashimoto K, Takahara J, Sano Y** (1983) Immunohistochemical identification of neurons containing corticotropin-releasing factor in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res* 230(2):239-246.
220. **Kelly MJ, Moss RL, Dudley CA** (1976) Differential sensitivity of preoptic-septal neurons to microelectrophoresed estrogen during the estrous cycle. *Brain Res* 114(1):152-157.
221. **Kimball SR, Jefferson LS** (2006) Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J Nutr* 136: 227–231.
222. **King MM, McCay PB** (1983) Modulation of tumor incidence and possible mechanisms of inhibition of mammary carcinogenesis by dietary antioxidants. *Cancer Res* 43(5):2485-2490.
223. **Kishida T, Mizushige T, Ohtsu Y, Ishikawa S, Nagamoto M, Izumi T, Obata A, Ebihara K** (2008) Dietary soy isoflavone-aglycone lowers food intake in female rats with and without ovariectomy. *Obesity (Silver Spring)* 16(2):290-297.
224. **Kiss J, Csaba Z, Csaki A, Halasz B** (2006) Glutamatergic innervation of growth hormone-releasing hormone-containing neurons in the hypothalamic arcuate nucleus and somatostatin-containing neurons in the anterior periventricular nucleus of the rat. *Brain Res Bull* 70(4-6):278-288.
225. **Kiss JZ**, (1988) Dynamism of chemoarchitecture in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res Bull* 20: 699-708.
226. **Kiss JZ, Martos J, Palkovits M** (1991) Hypothalamic paraventricular nucleus: a quantitative analysis of cytoarchitectonic subdivisions in the rat. *J Comp Neurol* 313(4):563-573.

227. **Kiss JZ, Palkovits M, Zaborszky L, Tribollet E, Szabo D, Makara GB** (1983) Quantitative histological studies on the hypothalamic paraventricular nucleus in rats: I. Number of cells and synaptic boutons. *Brain Res* 262: 217-224.
228. **Kitay JI** (1963) Effects of estradiol on pituitary-adrenal function in male and female rats *Endocrinology* 72:947-954.
229. **Knight DC, Eden JA** (1996) A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol* 87:897-904.
230. **Knuth UA, Sikand GS, Casanueva FF, Friesen HG** (1983) Changes in somatostatin-like activity in discrete areas of the rat hypothalamus during different stages of proestrus and diestrus and their relation to serum gonadotropin, prolactin, and growth hormone levels. *Endocrinology* 112:1506–1511.
231. **Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K** (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762):656-660.
232. **Kojima M, Kangawa K** (2008) Structure and function of ghrelin. Review. *Results Probl Cell Differ* 46:89-115.
233. **Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams E.F, Lowe D.G, Kangawa K, Grossman AB** (2001) The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:881–887.
234. **Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K** (2003) Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J Agric Food Chem* 51(26):7632-7635.
235. **Kouki T, Kishitake M, Okamoto M, Oosuka I, Takebe M, Yamanouchi K** (2003) Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. *Horm Behav* 44(2):140-145.
236. **Krieger DT, Hughes JC** (1980) *Neuroendocrinology* Sinauer Associates Inc. Sunderland Massachusetts.

237. **Krol W, Czuba ZP, Threadgill MD, Cunningham BD, Pietsz G** (1995) Inhibition of nitric oxide (NO.) production in murine macrophages by flavones. *Biochem Pharmacol* 50(7):1031-1035.
238. **Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM** (1968) Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 83(4):783-790.
239. **Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA** (1997a) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863–870.
240. **Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA** (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (12):5925-30.
241. **Kuiper GG, Gustafsson JA** (1997b) The novel estrogen receptor-b subtype: potential role in the cell and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 410:87–90.
242. **Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA** (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252–4263.
243. **Kulling SE, Lehmann L, Metzler M** (2002) Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 777(1-2):211-218.
244. **Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin J.R, Chambon P** (1987) Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51:941–951.
245. **Kurosumi K, Koyama T, Tosaka H** (1986) Three types of growth hormone cells of the rat anterior pituitary as revealed by immunoelectron microscopy using a colloidal gold-antibody method. *Arch Histol Jpn* 49(2):227-242.
246. **Kurzer MS, Xu X** (1997) Dietary phytoestrogens, Review. *Annu Rev Nutr* 17:353-381.
247. **Kuwahara S, Kesuma Sari D, Tsukamoto Y, Tanaka S, Sasaki F** (2004a) Age-related changes in growth hormone (GH)-releasing hormone and

- somatostatin neurons in the hypothalamus and in GH cells in the anterior pituitary of female mice *Brain Res* 1025(1-2):113-122.
248. **Kuwahara S, Sari DK, Tsukamoto Y, Tanaka S, Sasaki F** (2004b) Age-related changes in growth hormone (GH) cells in the pituitary gland of male mice are mediated by GH-releasing hormone but not by somatostatin in the hypothalamus. *Brain Res* 998(2):164-173.
249. **Kwok RP, Cameron JL, Faller DV, Fernstrom JD** (1992) Effects of cysteamine administration on somatostatin biosynthesis and levels in rat hypothalamus. *Endocrinology* 131(6):2999-3009.
250. **Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Rivest S** (1998) Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol* 36(3):357-378.
251. **Lam KS, Lee MF, Tam SP, Srivastava G** (1996) Gene expression of the receptor for growth-hormone-releasing hormone is physiologically regulated by glucocorticoids and estrogen. *Neuroendocrinology* 63(6):475-480.
252. **Larsen PJ, Hay-Schmidt A, Mikkelsen JD** (1994) Efferent connections from the lateral hypothalamic region and the lateral preoptic area to the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 342(2):299-319.
253. **MacLusky NJ, Naftolin F** (1981) Sexual differentiation of the central nervous system, Review. *Science* 211(4488):1294-302.
254. **Le Gros Clark WE** (1938) Morphological aspects of the hypothalamus. In *The Hypothalamus* (Le Gros Clark WE, Beattie J, Riddoch G, Dott N, Eds) Oliver and Boyd, Edinburgh 1-66.
255. **Le Roith D, Scavo L, Butler A** (2001) What is the role of circulating IGF-I? Review. *Trends Endocrinol Metab* 12(2):48-52.
256. **Lee S, Selvage D, Hansen K, Rivier C** (2004) Site of action of acute alcohol administration in stimulating the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis: comparison between the effect of systemic and intracerebroventricular injection of this drug on pituitary and hypothalamic responses *Endocrinology* 145(10):4470-4479.

257. **Lephart ED, Adlercreutz H, Lund TD** (2001) Dietary soy phytoestrogen effects on brain structure and aromatase in Long-Evans rats. *Neuroreport* 12(16):3451-3455.
258. **Lephart ED, Porter JP, Lund TD, Bu L, Setchell KD, Ramoz G, Crowley WR** (2004) Dietary isoflavones alter regulatory behaviors, metabolic hormones and neuroendocrine function in Long-Evans male rats *Nutr Metab (Lond)* 23:1(1):16.
259. **Lephart ED, Rhees RW, Setchell KD, Bu LH, Lund TD** (2003) Estrogens and phytoestrogens: brain plasticity of sexually dimorphic brain volumes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85(2-5):299-309.
260. **Lephart ED, West TW, Weber KS, Rhees RW, Setchell KD, Adlercreutz H, Lund TD** (2002) Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens, Review. *Neurotoxicol Teratol* 24(1):5-16.
261. **Leroux P, Quirion R, Pelletier G** (1985) Localization and characterization of brain somatostatin receptors as studied with somatostatin-14 and somatostatin-28 receptor radioautography. *Brain Res* 347(1):74-84.
262. **Leung KC, Waters MJ, Markus I, Baumbach WR, Ho KK** (1997) Insulin and insulin-like growth factor-I acutely inhibit surface translocation of growth hormone receptors in osteoblasts: a novel mechanism of growth hormone receptor regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(21):11381-11386.
263. **Lewis UJ** (1992) Growth hormone. What is it and what does it do? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 3:117-121.
264. **Li H, Zeitler PS, Valerius MT, Small K, Potter SS** (1996) Gsh-1, an orphan Hox gene, is required for normal pituitary development. *EMBO J* 15:714-724.
265. **Li HY, Blaustein JD, De Vries GJ, Wade GN** (1993) Estrogen-receptor immunoreactivity in hamster brain: preoptic area, hypothalamus and amygdala. *Brain Res* 631:304-312.
266. **Li Y, McGivern RF, Nagahara AH, Handa RJ** (1997) Alterations in the estrogen sensitivity of hypothalamic proenkephalin mRNA expression with age and prenatal exposure to alcohol. *Brain Res Mol Brain Res* 47(1-2):215-222.
267. **Lieberman ME, Maurer RA, Gorski J** (1978) Estrogen control of prolactin synthesis in vitro *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(12):5946-5949.

268. **Liposits ZS, Merchenthaler I, Paull WK, Flerko B** (1988) Synaptic communication between somatostatinergic axons and growth hormone-releasing factor (GRF) synthesizing neurons in the arcuate nucleus of the rat. *Histochemistry* 89(3):247-252.
269. **Liposits ZS, Merchenthaler I, Reid JJ, Negro-Vilar A** (1993) Galanin-immunoreactive axons innervate somatostatin-synthesizing neurons in the anterior periventricular nucleus of the rat. *Endocrinology* 132(2):917-23.
270. **Lipponi G, Cadeddu G, Antonicelli R, Compagnucci M, Spazzafumo L, Foschi F, Gaetti R** (1990) Vasopressin, prolactin and growth hormone in Alzheimer's disease: their evaluation after metoclopramide stimulation. *Arch Gerontol Geriatr* 10(3):269-278.
271. **Litteria M** (1973) In vivo alterations in the incorporation of <sup>3</sup>H-lysine into the medial preoptic nucleus and specific hypothalamic nuclei during the estrous cycle of the rat *Brain Res* 55(1):234-237.
272. **Loper GM** (1968) Effect of Aphid Infestation on the Coumestrol Content of Alfalfa Varieties Differing in Aphid Resistance. *Crop Science* 8(1):104-106.
273. **Lovejoy DA, Balment RJ** (1999) Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. Review. *Gen Comp Endocrinol* 115(1):1-22.
274. **Lovekamp-Swan T, Glendenning M, Schreihofner DA** (2007) A high soy diet reduces programmed cell death and enhances bcl-xL expression in experimental stroke. *Neuroscience* 148(3):644-652.
275. **Lu LJ, Anderson KE, Grady JJ, Nagamani M** (1996a) Effects of soya consumption for one month on steroid hormones in premenopausal women: implications for breast cancer risk reduction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5(1):63-70.
276. **Lu LJ, Lin SN, Grady JJ, Nagamani M, Anderson KE** (1996b) Altered kinetics and extent of urinary daidzein and genistein excretion in women during chronic soya exposure. *Nutr Cancer* 26(3):289-302.
277. **Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, Hochberg RB, McKay L, Renoir JM, Weigel NL, Wilson EM, McDonnell DP, Cidlowski JA** (2006) International Union of Pharmacology. LXV. The

- pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev* 58(4): 782–797.
278. **Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Shioda S** (2001) Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroscience Letters* 321:157–160.
279. **Lussier BT, French MB, Moor BC, Kraicer J** (1991a) Free intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and growth hormone (GH) release from purified rat somatotrophs. III. Mechanism of action of GH-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 128(1):592-603.
280. **Lussier BT, French MB, Moor BC, Kraicer J** (1991b). Free Intracellular  $Ca^{2+}$  Concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and Growth Hormone Release from Purified Rat Somatotrophs. I. GH-Releasing Factor-Induced  $Ca^{2+}$  Influx Raises  $[Ca^{2+}]_i$  *Endocrinology* 128(1):570-582.
281. **Lyou S, Hirano E, Tujioka K, Mawatari Y, Hayase K, Okuyama S, Yokogoshi H** (2002) Dietary genistein affects brain protein synthesis rates in ovariectomized female rats. *J Nutr* 132(7):2055-2058.
282. **Ma TC, Campana A, Lange PS, Lee HH, Banerjee K, Bryson JB, Mahishi L, Alam S, Giger RJ, Barnes S, Morris SM Jr, Willis DE, Twiss JL, Filbin MT, Ratan RR** (2010) A large-scale chemical screen for regulators of the arginase 1 promoter identifies the soy isoflavone daidzein as a clinically approved small molecule that can promote neuronal protection or regeneration via a cAMP-independent pathway. *J Neurosci* 30(2):739-748.
283. **MacLusky NJ, Naftolin F.** (1981) Sexual differentiation of the central nervous system, Review. *Science* 211(4488):1294-1302.
284. **Maiter D, Koenig JI, Kaplan LM** (1991) Sexually dimorphic expression of the growth hormone-releasing hormone gene is not mediated by circulating gonadal hormones in the adult rat. *Endocrinology* 128(4):1709-1716.
285. **Makela S, Davis VL, Tally WC, Korkman J, Salo L, Vihko R, Santti R, Korach KS** (1994) Dietary Estrogens Act through Estrogen Receptor-Mediated

- Processes and Show No Antiestrogenicity in Cultured Breast Cancer Cells. *Environ Health Perspectn* 102(6-7):572-578.
286. **Malendowicz LK, Nussdorfer GG, Nowak KW, Mazzocchi G** (1994) The possible involvement of galanin in the modulation of the function of rat pituitary-adrenocortical axis under basal and stressful conditions. *Endocr Res* 20(3):307-317.
287. **Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM** (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade, Review. *Cell* 83(6):835-839.
288. **Manojlović-Stojanoski M, Nestorović M, Negić N, Trifunović S, Sekulić M, Milošević V** (2007) Development of pituitary ACTH and GH cells in near term rat fetuses *Arc Biol Sci* 59 (1):37-44.
289. **Manojlović-Stojanoski M, Nestorović N, Ristić N, Trifunović S, Filipović B, Šošić-Jurjević B, Sekulić M** (2010). Unbiased stereological estimation of the rat fetal pituitary volume and of the total number and volume of TSH cells after maternal dexamethasone application. *Microsc Res Tech* 73:1077-1085.
290. **Marin P, Holmang S, Jonsson L, Sjostrom L, Kvist H, Holm G** (1992) The effects of testosterone treatment on body-composition and metabolism in middle-aged obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16: 991–997.
291. **Markakis EA, Swanson LW** (1997) Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system, Review. *Brain Res Brain Res Rev* 24(2-3):255-291.
292. **Martínez-Guijarro FJ, Soriano E, Del Rio JA, Blasco-Ibanez JM, Lopez-Garcia C** (1993) Parvalbumin-containing neurons in the cerebral cortex of the lizard *Podarcis hispanica*: morphology, ultrastructure, and coexistence with GABA, somatostatin, and neuropeptide. *J Comp Neurol* 336(3):447-467.
293. **Mauras N, Hayes V, Welch S, Rini A, Helgeson K, Dokler M** (1998) Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1886–1892.
294. **Maurer R, Reubi JC, Sandoz MD** (1985) Somatostatin receptors. *Jama* 10-18.



295. **Mayo KE, Godfrey PA, Suhr ST, Kulik DJ, Rahal JO** (1995) Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. Review. *Recent Prog Horm Res* 50:35-73.
296. **McArthur S, Robinson IC, Gillies GE** (2011) Novel ontogenetic patterns of sexual differentiation in arcuate nucleus GHRH neurons revealed in GHRH-enhanced green fluorescent protein transgenic mice. *Endocrinology* 152(2):607-617.
297. **McCarthy MM** (2008) Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* 88:91–124.
298. **McClain MR, Wolz E, Davidovich A, Pfannkuch F, Edwards JA, Bausch J** (2006) Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats *Food Chem Toxicol.* 44(1):56-80.
299. **McEwen BS.** (1980) Gonadal steroids and brain development, Review. *Biol Reprod* 22(1):43-48.
300. **McGarvey C, Cates PA, Brooks A, Swanson IA, Milligan SR, Coen CW, O'Byrne KT** (2001) Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* 142(3):1202-1208.
301. **Meister B, Hokfelt T, Vale WW, Sawchenko PE, Swanson L, Goldstein M** (1986) Coexistence of tyrosine hydroxylase and growth hormone-releasing factor in a subpopulation of tubero-infundibular neurons of the rat. *Neuroendocrinology* 42:237–247.
302. **Melmed S, Kleinberg D** (2002) Anterior pituitary. In Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Plonsky KS, eds *Williams, Text Book of Endocrinology.* Philadelphia: WB Saunders Company 175-279.
303. **Merchantheler L, Vigh S, Schally AV, Petrusz P** (1984) Immunocytochemical localization of growth-hormone releasing factor in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 114:1082–1085.
304. **Messina M** (1994) To recommend or not to recommend soy foods. *J Am Diet Assoc* 94(11):1253-1254.
305. **Mezey E, Kiss JZ, Mueller GP, Eskay R, O'Donohue TL, Palkovits M** (1985) Distribution of the pro-opiomelanocortin derived peptides

- adrenocorticotrope hormone a-melanocyte-stimulating hormone and b-endorphin (ACTH, a-MSH, b-END) in the rat hypothalamus *Brain Res* 328:341–347.
306. **Mhyre AJ, Dorsa DM** (2006) Estrogen activates rapid signaling in the brain: role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in neurons and glia. *Neuroscience* 138(3):851-858.
307. **Micevych PE, Mermelstein PG** (2008) Membrane estrogen receptors acting through metabotropic glutamate receptors: an emerging mechanism of estrogen action in brain. *Mol Neurobiol* 38(1):66-77.
308. **Miller PB, Charleston JS, Battaglia DE, Klein NA, Soules MR** (1997) An accurate, simple method for unbiased determination of primordial follicle number in the primate ovary. *Biol Reprod* 56(4):909-915.
309. **Miller PB, Charleston JS, Battaglia DE, Klein NA, Soules MR** (1999) Morphometric analysis of primordial follicle number in pigtailed monkey ovaries: symmetry and relationship with age. *Biol Reprod* 61(2):553-556.
310. **Milošević V, Brkić B, Velkovski SD, Sekulić M, Lovren M, Starčević V, Severs W B** (1998) Morphometric and functional changes of the rat pituitary somatotropes and lactotropes after central administration of somatostatin. *Pharmacology* 57: 27-34.
311. **Milošević V, Starčević V, Šošić-Jurjević B, Filipović B, Trifunović S, Ristić N, Nestorović N, Manojlović M, Sekulić M** (2007) Effects of estradiol or calcium treatment on mammothrophs of female middle aged rats 57 (5-6):393-402.
312. **Milošević V, Todorović D, Veličković M, Ristić N, Ušćebrka G, Knežvić V, Ajdžanović V** (2012b). Immunohistomorphometric features of acth cells in juvenile rats after treatment with estradiol or human chorionic gonadotropin. *J. Med Biochem* 31:34–39.
313. **Milošević V, Trifunović S, Filipović B, Šošić-Jurjević B, Pantelić J, Perčinić-Popovska F, Ajdžanović V** (2012a) Estradiol and GH cells: immunohistomorphometric study in an animal model of the andropause. *Arch Biol Sci* 64 (2):451-457.

314. **Milošević V, Trifunović S, Šošić-Juriević B, Bujšić N Sekulić M** (2005) Estradiol and calcium affect the growth hormone-producing cells in middle-aged rat females. *Acta Vet* 55 (2-3):111-120.
315. **Misztal T, Wankowska M, Gorski K, Romanowicz K** (2007) Central estrogen-like effect of genistein on growth hormone secretion in the ewe. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 67(4):411-419.
316. **Mitchner NA, Garlick C, Ben-Jonathan N** (1998) Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 139(9):3976-3983.
317. **Mizushige T, Mizushige K, Miyatake A, Kishida T, Ebihara K** (2007) Inhibitory effects of soy isoflavones on cardiovascular collagen accumulation in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 53(1):48-52.
318. **Mode A, Gustafsson JA, Jansson JO, Eden S, Isaksson O** (1982) Association between plasma level of growth hormone and sex differentiation of hepatic steroid metabolism in the rat. *Endocrinology* 111(5):1692-1697.
319. **Monje P, Boland R** (1999) Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus. *Mol Cell Endocrinol* 147(1-2):75-84.
320. **Montminy MR, Goodman RH, Horovitch SJ, Habener JF** (1984) Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(11):3337-3340.
321. **Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Klier SA, Lehmann JM, Willson TM** (1998) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247:75-78.
322. **Moran TH** (2006) Neural and hormonal controls of food intake and satiety. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. San Diego: Academic Press: 877-894.
323. **Morel G, Raynaud JP, Dubois PM** (1981) Ultrastructural localization of estradiol and moxestrol in the gonadotropic cells of rat by immunocytochemistry after cryo-ultramicrotomy: evidence for hormonal specificity *Experientia* 37(1):98-100.

324. **Morris DG, Kola B, Borboli N, Kaltsas GA, Gueorguiev M, Jones TH, Baldweg S, Powell M, Korbonitis M, Grossman AB** (2003) Identification of the ACTH receptor in the human pituitary and its loss of expression in pituitary adenomas, Abstracts. *Endocrine* 5:p 130.
325. **Mosselman S, Polman J, Dijkema R** (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49–53.
326. **Moyse E, Benoit R, Enjalbert A, Gautron JP, Kordon C, Ling N, Epelbaum J** (1984) Subcellular distribution of somatostatin-14, somatostatin-28 and somatostatin-28 (1-12) in rat brain cortex and comparisons of their respective binding sites in brain and pituitary. *Regul Pept* 9(1-2):129-137.
327. **Muller EE** (1990) Clinical implications of growth hormone feedback mechanisms. *Horm. Res* 33 4:90–96.
328. **Muller EE, Locatelli V, Cocchi D** (1999) Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physical Rev* 79:511-607.
329. **Murkies AL, Wilox G, Davis SR** (1998) Clinical review 92: Phytoestrogens, Review. *J Clin Endocrinol Metab* 83(2):297-303.
330. **Mutsuga N, Iwasaki Y, Morishita M, Nomura A, Yamamori E, Yoshida M, Asai M, Ozaki N, Kambe F, Seo H, Oiso Y, Saito H** (2001) Homeobox protein Gsh-1-dependent regulation of the rat GHRH gene promoter. *Mol Endocrinol* 15:2149–2156.
331. **Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, Helferich WG, Cooke PS** (2003) The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* 144(8):3315-3320.
332. **Nakashima S, Koike T, Nozawa Y** (1991) Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits thromboxane A<sub>2</sub>-mediated human platelet responses. *Mol Pharmacol* 39(4):475-480.
333. **Naumov AP, Herrington J, Hille B** (1994) Actions of growth-hormone-releasing hormone on rat pituitary cells: intracellular calcium and ionic currents. *Pflugers Arch* 427(5-6):414-421.
334. **Nedvidkova J, Haluzik M, Pacak K, Schreiber V, Starka L** (1998) Estrogenic effect of estradiol-sulfamate on the male rat anterior pituitary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67(4):359-362.

335. **Neill D J** (2005) Anatomy of the Hypothalamo–Hypophysial Complex. Chapter 27 u Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (pp1340–1446). London: Academic Press.
336. **Niimi M, Takahara J, Sato M, Kawanishi K** (1990) Immunohistochemical identification of galanin and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Neuroendocrinology* 51:572–575.
337. **Niimi M, Takahara J, Sato M, Kawanishi K** (1991) Neurotensin and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study, *Neurosci Lett* 133:183–186.
338. **Nogowski L, Mackowiak P, Kandulska K, Szkudelski T, Nowak KW** (1998) Genistein-induced changes in lipid metabolism of ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab* 42(6):360-366.
339. **Nogowski L, Nowicka E, Szkudelski T, Szkudelska K** (2007) The effect of genistein on some hormones and metabolic parameters in the immature, female rats. *Journal of Animal and Feed Science* 16: 274–282.
340. **Nolan LA, Levy A** (2006) A population of non-luteinising hormone/non-adrenocorticotrophic hormone-positive cells in the male rat anterior pituitary responds mitotically to both gonadectomy and adrenalectomy. *J Neuroendocrinol* 18(9):655-661.
341. **Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M** (1998) The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 243:122–126.
342. **Ogiwara T, Chik CL, Ho AK.** (1997) Tyrosine kinase inhibitors enhance GHRH-stimulated cAMP accumulation and GH release in rat anterior pituitary cells *J Endocrinol* 152(2):193-199.
343. **Ohno S, Nakajima Y, Inoue K, Nakazawa H, Nakajin S** (2003) Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats *Life Sci* 74(6):733-742.

344. **Ohno S, Shinoda S, Toyoshima S, Nakazawa H, Makino T, Nakajin S** (2002) Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80(3):355-363.
345. **Ojeda MS, Gómez NN, Gil E, Scardapane L and Gimenez MS** (2000) Morphologic and biochemical changes in male rat lung after surgical and pharmacological castration *Braz J Med Biol Res* 33:279-285.
346. **Ospina JA, Krause DN, Duckles SP** (2002) 17beta-estradiol increases rat cerebrovascular prostacyclin synthesis by elevating cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase. *Stroke* 33(2):600-605.
347. **Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC, Ali S** (1997) Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 272(41):25832-25838.
348. **Painson JC, Thorner MO, Krieg RJ, Tannenbaum GS** (1992) Short-term adult exposure to estradiol feminizes the male pattern of spontaneous and growth hormone-releasing factor-stimulated growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 130(1):511-519.
349. **Palkovits M** (1982) Neuropeptides in the median eminence: their sources and destinations. *Peptides* 3(3):299-303.
350. **Palkovits M** (1984) Neuropeptides in the hypothalamo-hypophyseal system: lateral retrochiasmatic area as a common gate for neuronal fibers towards the median eminence. *Peptides* 5 (1):35-99.
351. **Pan M, Han H, Zhong C, Geng Q** (2012) Effects of genistein and daidzein on hippocampus neuronal cell proliferation and BDNF expression in h19-7 neural cell line. *J Nutr Health Aging* 16(4):389-394.
352. **Pardridge WM.** (1986). Serum bioavailability of sex steroid hormones. *Clin Endocrinol Metab* 15(2):259-278.
353. **Parducz A, Szilagyi T, Hoyk S, Naftolin F, Garcia-Segura LM** (1996) Neuroplastic changes in the hypothalamic arcuate nucleus: the estradiol effect is accompanied by increased exocytotic activity of neuronal membranes. *Cell Mol Neurobiol* 16(2):259-269.

354. **Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC** (2004) Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 64(1):423-428.
355. **Pašić M** (1993) Fiziologija nervnog sistema. Naučna knjiga (četvrto izdanje).
356. **Patchev VK, Hayashi S, Orikasa C, Almeida OF** (1995) Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *FASEB J* 9:419–423.
357. **Patel YC** (1999) Somatostatin and its receptor family, Review. *Front Neuroendocrinol* 20(3):157-98.
358. **Patisaul HB** (2005) Phytoestrogen action in the adult and developing brain, Review. *J Neuroendocrinol* 17(1):57-64.
359. **Patisaul HB, Fortino AE, Polston EK** (2007) Differential disruption of nuclear volume and neuronal phenotype in the preoptic area by neonatal exposure to genistein and bisphenol-A. *Neurotoxicology* 28:1–12.
360. **Patisaul HB, Melby M, Whitten PL, Young LJ** (2002) Genistein affects ER beta- but not ER alpha-dependent gene expression in the hypothalamus. *Endocrinology* 143(6):2189-2197.
361. **Pavao M, Traish A.M** (2001) Estrogen receptore antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *Steroids* 66:1-16.
362. **Paxinos G** (2004) The rat nervous system Elsevier Inc 3rd Edition.
363. **Pazos F, Sanchez-Franco F, Balsa JA, Escalada J, Palacios N, Cacicedo L** (2000) Mechanisms of reduced body growth in the pubertal feminized male rat: unbalanced estrogen and androgen action on the somatotropic axis. *Pediatr Res* 48(1):96-103.
364. **Pelissero C, Lenczowski MJ, Chinzi D, Davail-Cuisset B, Sumpter JP, Fostier A** (1996) Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57(3-4):215-223.
365. **Pellegrini E, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Bennett P, Kordon C, Epelbaum J** (1996) Central administration of a growth hormone (GH) receptor mRNA

- antisense increases GH pulsatility and decreases hypothalamic somatostatin expression in rats. *J Neurosci* 16:8140-8148.
366. **Penza M, Montani C, Romani A, Vignolini P, Pampaloni B, Tanini A, Brandi ML, Alonso-Magdalena P, Nadal A, Ottobrini L, Parolini O, Bignotti E, Calza S, Maggi A, Grigolato PG, Di Lorenzo D** (2006) Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-depe and gender-specific manner. *Endocrinology* 147(12):5740-5751.
367. **Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD** (1990) Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 111(2):743-755.
368. **Pereira S, Martinez M, Martinez FE, Júnior WM** (2006) Repercussions of castration and vasectomy on the ductal system of the rat ventral prostate. *Cell Biol Int* 30(2):169-174.
369. **Peterson G, Barnes S** (1991) Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun* 179(1):661-667.
370. **Peterson G, Barnes S** (1993) Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. *Prostate* 22(4):335-345.
371. **Phelix CF, Paul WK** (1990) Demonstration of distinct corticotropin releasing factor--containing neuron populations in the bed nucleus of the stria terminalis. A light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. *Histochemistry* 94(4):345-364.
372. **Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP** (2000). Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 130:1675-1681.
373. **Pincus SM, Gevers EF, Robinson IC, van den Berg G, Roelfsema F, Hartman ML, Veldhuis JD.** (1996) Females secrete growth hormone with more process irregularity than males in both humans and rats. *Am J Physiol* 270:107-115.



374. **Pisarchik A, Slominski A** (2001) Alternative splicing of CRH-R1 receptors in human and mouse skin: Identification of new variants and their differential expression. *FASEB J* 15: 2754–2756.
375. **Platania P, Laureanti F, Bellomo M, Giuffrida R, Giuffrida-Stella AM, Catania MV, Sortino MA** (2003) Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the spinal cord during postnatal development: localization in glial cells. *Neuroendocrinology* 77(5):334-340.
376. **Plotsky PM, Vale W.** (1985) Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science* 230(4724):461-463.
377. **Pradayrol L, Jornvall H, Mutt V, Ribet A.** (1980) N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 109(1):55-58.
378. **Price KR, Fenwick GR** (1985) Naturally occurring oestrogens in foods—a review. *Food Addit Contam* 2(2):73-106.
379. **Raines EW, Ross R** (1995) Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy, Review. *J Nutr* 125(3):624-630.
380. **Rao CV, Wang CX, Simi B, Lubet R, Kelloff G, Steele V, Reddy BS** (1997) Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Res* 57(17):3717-3722.
381. **Raudrant D, Rabe T** (2003) Progestogens with antiandrogenic properties. *Drugs* 63 (5):463–492.
382. **Reddy BS, Cohen LA** (1986) Diet, nutrition and cancer: a critical evaluation. In *Macronutrients, nonnutritive dietary factors and cancer. Volume II*, Boca Raton, FLCRS Press.
383. **Redei E, Li L, Halasz I, McGivern RF, Aird F** (1994) Fast glucocorticoid feedback inhibition of ACTH secretion in the ovariectomized rat: effect of chronic estrogen and progesterone. *Neuroendocrinology* 60(2):113-123.
384. **Reichlin S** (1983) Somatostatin, Review. *N Engl J Med* 309 (24):1495-1501.
385. **Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W** (1982) Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature* 300(5889):276-278.

386. **Roberts JL, Dutlow CM, Jakubowski M, Blum M, Millar RP** (1989) Estradiol stimulates preoptic area-anterior hypothalamic proGnRH-GAP gene expression in ovariectomized rats *Brain Res Mol Brain Res* (2-3):127-34.
387. **Rokhlin OW, Cohen MB** (1995) Differential sensitivity of human prostatic cancer cell lines to the effects of protein kinase and phosphatase inhibitors. *Cancer Lett.* 98(1):103-110.
388. **Romanowicz K, Misztal T, Barcikowski B** (2004) Genistein, a phytoestrogen, effectively modulates luteinizing hormone and prolactin secretion in ovariectomized ewes during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology* 79(2):73-81.
389. **Rose DP, Boyar AP, Wynder EL** (1986) International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption. *Cancer* 58(11):2363-2371.
390. **Roselli CE, Handa RJ, Resko JA** (1989) Quantitative distribution of nuclear androgen receptors in microdissected areas of the rat brain *Neuroendocrinology* 49(5):449-453.
391. **Roudbaraki M, Lorsignol A, Langouche L, Callewaert G, Vankelecom H, Denef C** (1999) Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca<sup>2+</sup> responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology* 140(10):4874-4885.
392. **Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, Bi BY, Chatterjee B** (1999a) Regulation of androgen action. *Vitam Horm* 55:309–352.
393. **Roy BN, Reid RL, Van Vugt DA** (1999b). The effects of estrogen and progesterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid levels in the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus of the rhesus monkey. *Endocrinology* 140:2191–2198.
394. **Saeger W, Schreiber S, Ludecke DK** (2000) Androgen receptor in pituitary adenomas of the gonadotroph cell complex *Pathol Res Pract* 196(11):771-773.

395. **Sakuma S, Shirasawa N, Yoshimura F** (1984) A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adenohipophysial cells in immature and mature castrated rats. *J Endocrinol* 100:323-328.
396. **Santolaya RC, Zimmermann P** (1983) Testosterone-induced alterations in the reactivity pattern of the neurons in the arcuate nucleus of male mice. A karyometric study. *Cell Tissue Res* 229(1):183-189.
397. **Saper CB** (2003) Central autonomic nervous system in "The rat nervous system" Paxinos G, Ed, 3rd ed. Elsevier, San Diego.
398. **Saper CB, Levisohn D** (1983) Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. *Brain Res* 288(1-2):21-31.
399. **Sar M, Stumpf WE** (1977) Distribution of androgen target cells in rat forebrain and pituitary after [3H]-dihydrotestosterone administration *J Steroid Biochem* 8(11):1131-1132.
400. **Sato N, Wang XB, Greer MA** (1991) Hormone secretion stimulated by ethanol-induced cell swelling in normal rat adenohipophysial cells. *Am J Physiol* 260(6 Pt 1):E946-950.
401. **Savas C, Ozguner IF, Ozguner M, Delibas N** (2003) The effects of unilateral testicular ischemia and hemicastration on contralateral testicular IGF-1 level, histology and lipid peroxidation *Int Urol Nephrol* 35(2):231-235.
402. **Sawchenko PE, Swanson LW, Joseph SA** (1982) The distribution and cells of origin of ACTH (1-39)-stained varicosities in the paraventricular. *Brain Res* 232:365-374.
403. **Sawchenko PE, Swanson LW, Rivier J, Vale WW** (1985) The distribution of growth-hormone-releasing factor (GRF) immunoreactivity in the central nervous system of the rat: An immunohistochemical study using antisera directed against rat hypothalamic GRF. *J Comp Neurol* 237:100-115.
404. **Schleicher G, Stumpf WE, Morin JK, Drews U** (1986) Sites of aromatization of [3H] testosterone in forebrain of male, female and androgen receptor-deficient Tfm mice: an autoradiographic study *Brain Res* 397(2):290-296.

405. **Scholar EM, Toews ML** (1994) Inhibition of invasion of murine mammary carcinoma cells by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *Cancer Lett* 87(2):159-162.
406. **Schreihof DA, Stoler MH, Shupnik MA** (2000) Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ERalpha protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology* 141(6):2174-2184.
407. **Scott LV, Dinan TG** (1998) Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression, Review. *Life Sci* 62(22):1985-1998.
408. **Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Harbuz MS, Lightman SL** (2004). Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J Neuroendocrinol* 16:989–998.
409. **Seger R, Krebs EG** (1995) The MAPK signaling cascade, Review. *FASEB J* 9(9):726-735.
410. **Segars JH, Driggers PH** (2002) Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes, Review.. *Trends Endocrinol Metab* 13(8):349-354.
411. **Seidell JC, Bjorntorp P, Sjostrom L, Kvist H, Sannerstedt R** (1990) Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism* 39:897–901.
412. **Selemon LD, Sladek JR** (1986) Diencephalic catecholamine neurons (A-11, A-12, A-13, A-14) show divergent changes in the aged rat. *J Comp Neurol* 254:113–124.
413. **Senaris RM, Lago F, Lewis MD, Dominguez F, Scanlon MF, Dieguez C.** (1992) Differential effects of in vivo estrogen administration on hypothalamic growth hormone releasing hormone and somatostatin gene expression. *Neurosci Lett* 141(1):123-126.

414. **Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M** (1984) Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr* 40(3):569-578.
415. **Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E** (2002) The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 132(12):3577-3584.
416. **Setchell KD, Cassidy A** (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129(3):758-767.
417. **Setchell KDR** (1985) Naturally occurring non/steroidal estrogens of dietary origin. In: McLachlan J, ed. *Estrogens in the environment*. New York: Elsevier 69-85.
418. **Seuntjens E, Hauspie A, Vankelecom H, Denef C** (2002). Ontogeny of plurihormonal cells in the anterior pituitary of the mouse, as studied by means of hormone mRNA detection in single cells. *J Neuroendocrinol* 14:611-619.
419. **Severson RK, Nomura AM, Grove JS** (1989) Stemmermann GN A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Res* 49(7):1857-1860.
420. **Shelby RA, Golden-Kreutz DM, Andersen BL** (2008) PTSD diagnoses, subsyndromal symptoms, and comorbidities contribute to impairments for breast cancer survivors. *J Trauma Stress* 2:165-172.
421. **Shieh KR, Pan JT** (1996) Sexual differences in the diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in the rat: role of cholinergic control. *Biol Reprod* 54(5):987-992.
422. **Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM** (1991) Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 63(6):963-966.
423. **Shimizu T, Kamegai J, Tamura H, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S** (2005) The estrogen receptor (ER) alpha, but not ER beta, gene is expressed in hypothalamic growth hormone-releasing hormone neurons of the adult female rat. *Neurosci Res* 52(1):121-125.

424. **Shioda S, Kohara H, Nakai Y** (1987) TRH axon terminals in synapsis with GRF neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus as revealed by double labeling immunocytochemistry. *Brain Res* 402:355–358.
425. **Shughrue PJ, Bushnell CD, Dorsa DM** (1992) Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology* 131(1):381-388.
426. **Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I** (1997a) Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  and- $\beta$  mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507–525.
427. **Shughrue PJ, Merchenthaler I** (2001) Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 436(1):64-81.
428. **Shughrue PJ, Scrimo P, Lane M, Askew R, Merchenthaler I** (1997b) The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology* 138(12):5649-5652.
429. **Shull JD, Gorski J** (1985) Estrogen regulates the transcription of the rat prolactin gene in vivo through at least two independent mechanisms. *Endocrinology* 116(6):2456-2462.
430. **Simard M, Manthos H, Giaid A, Lefèbvre Y, Goodyer CG** (1996) Ontogeny of growth hormone receptors in human tissues: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 81(8):3097-3102.
431. **Simerley RB, Young BJ** (1991) Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol Endocr* 5:424-435.
432. **Simerly RB** (2002) Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci* 25:507–536.
433. **Simerly RB** (2004) Anatomical substrates of hypothalamic integration. In G. Paxinos ed: *The Rat Nervous System*, treće izdanje, San Diego: Academic Press, pp. 335–368.

434. **Simoni RD, Hill RH, Vaughan M** (2002) Urease, the first crystalline enzyme and the proof that enzymes are proteins: the work of James B. Sumner 277(35):23e.
435. **Singh S, Langman MJ** (1995) Oestrogen and colonic epithelial cell growth, Review. Gut. 37(6):737-739.
436. **Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A** (2001) Cutaneous expression of corticotropin releasing hormone (CRH), urocortin and CRH receptors. FASEB J 15:1678–1693.
437. **Smith RM, Tiesinga JJ, Shah N, Smith JA, Jarett L** (1993) Genistein inhibits insulin-stimulated glucose transport and decreases immunocytochemical labeling of GLUT4 carboxyl-terminus without affecting translocation of GLUT4 in isolated rat adipocytes: additional evidence of GLUT4 activation by insulin. Arch Biochem Biophys 300(1):238-246.
438. **Soderman A** (2006) GABA neurocircuits controlling the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. Master teza 1-64
439. **Sorenson RL, Brelje TC, Roth C** (1994) Effect of tyrosine kinase inhibitors on islets of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. Endocrinology 134(4):1975-1978.
440. **Šošić-Jurjević B, Filipović B, Ajdžanović V, Brkić D, Ristić N, Stojanoski MM, Nestorović N, Trifunović S, Sekulić M** (2007) Subcutaneously administrated genistein and daidzein decrease serum cholesterol and increase triglyceride levels in male middle-aged rats. Exp Biol Med (Maywood) 232(9):1222-1227.
441. **Soszynski PA, Frohman LA** (1992a) Inhibitory effects of ethanol on the growth hormone (GH)-releasing hormone-GH-insulin-like growth factor-I axis in the rat. Endocrinology 131(6):2603-2608.
442. **Soszynski PA, Frohman LA** (1992b) Interaction of ethanol with signal transduction mechanisms mediating growth hormone release by rat pituitary cells in vitro. Endocrinology 131(1):173-180.
443. **Spagnoli A, Rosenfeld RG** (1996) The mechanisms by which growth hormone brings about growth. The relative contributions of growth hormone and insulin-like growth factors. Endocrinol Metab Clin North Am 25:615–631.

444. **Sprangers SA, West NB, Brenner RM, Bethea CL** (1990) Regulation and localization of estrogen and progesterin receptors in the pituitary of steroid-treated monkeys. *Endocrinology*. 126(2):1133-1142.
445. **Stahl S, Chun TY, Gray WG** (1998) Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 152(1):41-48.
446. **Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG** (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18(5):315-333.
447. **Straub RH, Cutolo M** (2001) Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role, Review. *Arthritis Rheum* 44(3):493-507.
448. **Stumpf WE, Sar M** (1976) Steroid hormone target sites in the brain: the differential distribution of estrogen, progesterin, androgen and glucocorticosteroid. *J Steroid Biochem* 7(11-12):1163-1170.
449. **Swanson LW** (1992) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Amsterdam: Elsevier.
450. **Swanson LW, Kuypers HG** (1980) The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194(3):555-570.
451. **Szego CM, Davis JS**. 1967. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 58(4):1711-1718.
452. **Szkudelski T, Nogowski L, Pruszyńska-Oszmałek E, Kaczmarek P, Szkudelska K** (2005) Genistein restricts leptin secretion from rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96(3-4):301-307.



453. **Takahashi S** (1991) Immunocytochemical and immuno-electron-microscopical study of growth hormone cells in male and female rats of various ages. *Cell Tissue Res* 266(2):275-284.
454. **Takekawa S, Matsui T, Arakawa Y** (2006) The protective effect of the soybean polyphenol genistein against stress-induced gastric mucosal lesions in rats, and its hormonal mechanisms. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 52(4):274-280.
455. **Tannenbaum GS, Ling N** (1984) The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115(5):1952-1957.
456. **Tannenbaum GS, Zhang WH, Lapointe M, Zeitler P, Beaudet A** (1998) Growth hormone-releasing hormone neurons in the arcuate nucleus express both Sst1 and Sst2 somatostatin receptor genes. *Endocrinology* 139(3):1450-1453.
457. **Tew BY, Xu X, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S** (1996) A diet high in wheat fiber decreases the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women. *J Nutr* 126(4):871-877.
458. **Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V, Adlercreutz H** (1998) Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(6):3106-3110.
459. **Tjian R, Maniatis T** (1994) Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77:5-8.
460. **Toft D, Gorski J**. 1966. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 55(6):1574-1581.
461. **Tomiyoshi Y, Sakemi T, Aoki S, Miyazono M** (2002) Different effects of castration and estrogen administration on glomerular injury in spontaneously hyperglycemic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Nephron* 92(4):860-867.
462. **Toran-Allerand CD** (1984) Gonadal hormones and brain development: implications for the genesis of sexual differentiation, Review. *Ann N Y Acad Sci* 435:101-111.

463. **Toth ZE, Palkovits M** (1998) Distributions of periventricular projections of the paraventricular nucleus to the median eminence and arcuate nucleus *Brain Res* 17:802(1-2):294-297.
464. **Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V** (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 11:353–365.
465. **Tsai EC, Boyko EJ, Leonetti DL, Fujimoto WY** (2000) Low serum testosterone level as a predictor of increased visceral fat in Japanese-American men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:485–491.
466. **Tsai MJ, O'Malley BW** (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451– 486.
467. **Tsigos C, Chrousos GP** (1994) Physiology of the hypothalamic– pituitary– adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 23:451–466.
468. **Turnbull AV, Rivier C** (1997) Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proc Soc Exp Biol Med* 215:1–10.
469. **Ullrich A, Schlessinger J** (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity, Review. *Cell* 61(2):203-212.
470. **Urban JH, Bauer-Dantoin AC, Levine JE** (1993) Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus: sexual dimorphism and modulation by testosterone. *Endocrinology* 132(1):139-145.
471. **Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J** (1981) Characterization of a 41- residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotropin and b-endorphin. *Science* 213:1394–1397.
472. **van den Pol AN** (1986) Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons throughout the hypothalamus receive glutamate decarboxylase immunoreactive synapses: a double pre-embedding immunocytochemical study with particulate silver and HRP. *J Neurosci* 6(3):877-891.
473. **van den Pol AN, Cassidy J.R** (1982) Hypothalamic arcuate nucleus of rat—A quantitative Golgi analysis. *J Comp Neurol* 204:65–98.

474. **van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E** (2004) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin, Review. *Endocr Rev* 25(3):426-457.
475. **Van Vugt HH, Van de Heijning BJ, Van der Beek EM** (2008) Somatostatin in the rat periventricular nucleus: sex differences and effect of gonadal steroids *Exp Brain Res*. 188(4):483-491.
476. **Vankelecom H** (2007) Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell, Review. *Semin Cell Dev Biol* 18(4):559-570.
477. **Vankelecom H, Gremeaux L** (2010) Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field, Review. *Gen Comp Endocrinol* 166(3):478-488.
478. **Veldhuis JD, Roemmich JN, Rogol AD** (2003) Gender and sexual maturation-dependent contrasts in the neuroregulation of growth hormone secretion in prepubertal and late adolescent males and females-a general clinical research center-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2385-2394.
479. **Veldhuis JD, Roemmich JN, Richmond EJ, Rogol AD, Lovejoy JC, Sheffield-Moore M, Mauras N, Bowers CY** (2005) Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and puberty. *Endocr Rev* 26(1):114-146.
480. **Viau V, Meaney MJ** (1996) The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. *J Neurosci* 16:1866-1876.
481. **Viau V, Soriano L, Dallman MF** (2001) Androgens alter corticotropin releasing hormone and arginine vasopressin mRNA within forebrain sites known to regulate activity in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 13(5):442-452.
482. **Villalobos C, Nunez L, García-Sancho J** (2004) Phenotypic characterization of multi-functional somatotropes, mammotropes and gonadotropes of the mouse anterior pituitary. *Pflugers Arch* 449(3):257-264.
483. **Vincent SR, von Krosigk M** (1988) Two populations of somatostatin-immunoreactive neurons in the guinea pig striatum. *Cell Tissue Res* 252(1):219-222.
484. **Voet D, Voet GJ** (2004) *Biochemistry* 3rd ed - Hoboken, NJ : J. Wiley & Sons.

485. **Wajchenberg BL** (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Res* 21:697–738.
486. **Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P** (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82(23):7889-7893.
487. **Wang H, Li J, Gao Y, Xu Y, Pan Y, Tsuji I, Sun ZJ, Li XM** (2010) Xeno-oestrogens and phyto-oestrogens are alternative ligands for the androgen receptor. *Asian J Androl* 12(4):535-547.
488. **Wang TT, Sathyamoorthy N, Phang JM** (1996) Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways *Carcinogenesis* 17(2):271-275.
489. **Watanabe S, Koessel S** (1993) Colon cancer: an approach from molecular epidemiology. *J Epidemiol* 3:47-61.
490. **Waters EM, Simerly RB** (2009) Estrogen induces caspase-dependent cell death during hypothalamic development. *J Neurosci* 29(31):9714-9718.
491. **Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y** (1995) Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 208(1):124-130.
492. **Weiser MJ, Handa RJ** (2009) Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic- pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience* 159:883-895.
493. **Weninger SC, Muglia LJ, Jacobson L, Majzoub JA** (1999) CRH-deficient mice have a normal anorectic response to chronic stress. *Regul Pept* 22:84(1-3):69-74.
494. **Werner H, Koch Y, Baldino F Jr, Gozes I** (1988) Steroid regulation of somatostatin mRNA in the rat hypothalamus. *J Biol Chem* 263:7666–7671.
495. **Whitehead SA, Cross JE, Burden C, Lacey M** (2002) Acute and chronic effects of genistein, tyrphostin and lavendustin A on steroid synthesis in luteinized human granulosa cells *Hum Reprod* 17(3):589-594.
496. **Wiegand SJ, Price JL** (1980) Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. *J Comp Neurol* 192:1–19.

497. **Wiegand SJ, Terasawa E** (1982) Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology* 34(6):395-404.
498. **Willenberg HS, Bornstein SR, Hiroi N, Path G, Goretzki PE, Scherbaum WA, Chrousos GP** (2000) Effects of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type I antagonist on human adrenal function. *Mol Psychiatry* 5(2):137-141.
499. **Willoughby JO, Beroukas D, Blessing WW** (1987) Ultrastructural evidence for gamma aminobutyric acid-immunoreactive synapses on somatostatin-immunoreactive perikarya in the periventricular anterior hypothalamus, *Neuroendocrinology* 46:268–272.
500. **Willoughby JO, Brogan M, Kapoor R** (1989a) Intrahypothalamic actions of somatostatin and growth hormone releasing factor on growth hormone secretion. *Neuroendocrinology* 50(5):592-596.
501. **Willoughby O, Brogan M, Kapoor R** (1989b) Hypothalamic interconnections of somatostatin and growth hormone releasing factor neurons, *Neuroendocrinology* 50 584–591.
502. **Winneker RC, Parsons JA** (1981) Effects of 17 beta-estradiol and medroxyprogesterone acetate upon MtTW15 mammosomatotropic pituitary tumor growth and hormone production in male and female rats *Cancer Res* 41(5):1772-1777.
503. **Wojcik-Gładysz A, Romanowicz K, Misztal T, Polkowska J, Barcikowski B** (2005) Effects of intracerebroventricular infusion of genistein on the secretory activity of the GnRH/LH axis in ovariectomized ewes *Anim Reprod Sci* 86(3-4):221-235.
504. **Wong ML, Licinio J, Pasternak KI, Gold PW** (1994) Localization of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor mRNA in adult rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Endocrinology* 135:2275–2278.
505. **Wreford NG** (1995) Theory and practice of stereological techniques applied to the estimation of cell number and nuclear volume in the testis, Review. *Microsc Res Tech* 32(5):423-436.

506. **Xu JX, Xia D, Zhao RQ, Xu QF, Wei XH, Chen J** (2004) The developmental changes of GHR and IGF-1R gene expressions in porcine hypothalamus and pituitary. *Yi Chuan Xue Bao* 31(5):495-501.
507. **Xu X, Thomas ML** (1995) Biphasic actions of estrogen on colon cancer cell growth: possible mediation by high- and low-affinity estrogen binding sites. *Endocrine* 3 (9):661-665.
508. **Yamada K, Yamashita K** (1967) An electron microscopic study on the possible site of production of ACTH in the anterior pituitary of mice. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 80(1):29-43.
509. **Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S** (1992) Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(1):251-255.
510. **Yamamuro Y, Aoki T, Sensui N** (2001) Effect of estradiol and FBS on PRL cells, GH cells, and PRL/GH cells in primary cultures of pituitary cells from prenatal rats *Exp Biol Med (Maywood)* 226(2):140-143.
511. **Yamashita Y, Kawada S, Nakano H** (1990) Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem Pharmacol* 39(4):737-744.
512. **Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M** (1993) Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 53(23):5815-5821.
513. **Yokoshiki H, Sumii K, Sperelakis N** (1996) Inhibition of L-type calcium current in rat ventricular cells by the tyrosine kinase inhibitor, genistein and its inactive analog, daidzein. *J Mol Cell Cardiol* 28(4):807-14.
514. **Yoshimura R, Yamamoto E, Endo Y** (2011) Morphological effects of isoflavones (daidzein and genistein) on hypothalamic oxytocin neurons in the neonatal mouse brain slice cultures. *Neurosci Lett* 505(2):87-92.
515. **Zambrano D, De Robertis E** (1968) The effect of castration upon the ultrastructure of the rat hypothalamus. II. Arcuate nucleus and outer zone of the median eminence. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 87(3):409-421.

516. **Zarate S, Jaita G, Zaldivar V, Radl DB, Eijo G, Ferraris J, Pisera D, Seilicovich A** (2009) Estrogens exert a rapid apoptotic action in anterior pituitary cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(4):664-671.
517. **Zbytek B, Mysliwski A, Slominski A, Wortsman J, Wei ET, Mysliwska J** (2002) Corticotropin-releasing hormone affects cytokine production in human HaCaT keratinocytes. *Life Sci* 70:1013–1021.
518. **Zeitler P, Argente J, Chowen-Breed JA, Clifton DK, Steiner RA** (1990) Growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in the hypothalamus of the adult male rat is increased by testosterone. *Endocrinology* 127(3):1362-1368.
519. **Zeitler P, Tannenbaum GS, Clifton DK, Steiner RA** (1991) Ultradian oscillations in somatostatin and growth hormone-releasing hormone mRNAs in the brains of adult male rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(20):8920-8924.
520. **Zhang QH, Hu YZ, Zhou SS, Wang FZ** (2001) Inhibitory effect of genistein on the proliferation of the anterior pituitary cells of rats. *Sheng Li Xue Bao* 53(1):51-54.
521. **Zhou L, Blaustein JD, De Vries GJ** (1994) Distribution of androgen receptor immunoreactivity in vasopressin- and oxytocin-immunoreactive neurons in the male rat brain. *Endocrinology* 134(6):2622-2627.
522. **Zimmermann P** (1982) Estrogen-dependent changes in the functional interrelationships among neurons, ependymal cells and glial cells of the arcuate nucleus. Cytometric studies in the female albino mouse. *Cell Tissue Res* 227(1):113-128.
523. **Zorrilla R, Simard J, Labrie F, Pelletier G** (1991) Variations of pre-prosomatostatin mRNA levels in the hypothalamic periventricular nucleus during the rat estrous cycle. *Mol Cell Neurosci* 2:294–298.
524. **Zorrilla R, Simard J, Rhéaume E, Labrie F, Pelletier G** (1990) Multihormonal control of pre-pro-somatostatin mRNA levels in the periventricular nucleus of the male and female rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 52(5):527-536.

## Biografija

Svetlana L. Trifunović je rođena 29. 01. 1975. godine u Beogradu. Gimnaziju je završila 1994. godine, kada upisuje Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu. Biološki fakultet završava 2001. godine, a od 2003. godine zaposlena je u Odeljenju za citologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, gde i danas radi u okviru projekta 173009 Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije. Magistarsku tezu pod nazivom „Uticaj sintetskih somatostatina na morfofunkcionalne osobine hipofizno-adrenokortikalnog sistema pacova“ odbranila je 2006. godine i stekla zvanje magistra bioloških nauka. Član je Srpskog biološkog društva i Srpskog društva za mikroskopiju. Publikovala je kao autor i koautor više naučnih radovi, neki od njih su:

- **Trifunović S**, Manojlović Stojanoski M, Ajdžanović V, Nestorović N, Ristić N, Medigović I, Milošević V (2012) Genistein stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in adult rats: Morphological and hormonal study. *Histology and Histopathology* 27:627-640.

- Milošević V, **Trifunović S**, Filipović B, Šošić-Jurjević B, Pantelić J, Perčinić-Popovska F, Ajdžanović V (2012) Estradiol and GH cells: immunohistomorphometric study in an animal model of the andropause. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64: 451-457.

- **Trifunović S**, Filipović B, Ajdžanović V, Manojlović-Stojanoski M, Nestorović N, Sekulić M, Milošević V (2010) The effect of SRIH-14 or octreotide on the morphological characteristics of adrenal medulla using newcast. *Arch Biol Sci* 62:93-96.

- Manojlović-Stojanoski M, Nestorović N, Ristić N, **Trifunović S**, Filipović B, Šošić-Jurjević B, Sekulić M (2010) Unbiased stereological estimation of the rat fetal pituitary volume and of the total number and volume of TSH cells after maternal dexamethasone application. *Microsc Res Tech* 73:1077-1085.

- Milošević V, Nestorović N, Terzić M, Ristić N, Ajdžanović V, **Trifunović S**, Milka Sekulić (2009) Pituitary ACTH cells in female rats after neonatal treatment with SRIH-14. *Folia Histochem Cytobiol* 47: 479-484.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Светлана Трифуновић

број уписа  /

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Одговор хипоталамо-хипофизног система пацова на изофлавоне соје:  
морфофункционална студија

- 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 докторанта

У Београду, 01.06.2012.

Светлана Трифуновић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Светлана Трифуновић

Број уписа \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Наслов рада: Одговор хипоталамо-хипофизног система пацова на изофлавоне  
соје: морфофункционална студија

Ментори: др Весне Коко, др Милица Манојловић-Стојаноски

Потписани Светлана Трифуновић

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 докторанта

У Београду, 01.06.2012.

Светлана Трифуновић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Одговор хипоталамо-хипофизног система пацова на изофлавоне соје:  
морфофункционална студија

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 докторанта

У Београду, 01.06.2012

*Великаша М. П. Profundis*

#### Prilog 4.

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