



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Miljana N. Ljubomirović**

**MORFOMETRIJSKA I IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA  
STRUKTURA ADENOHIPOFIZE UKLJUČENIH U SISTEM  
HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-ADRENALNE OSOVINE  
TOKOM STARENJA ČOVEKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2014. godina



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Miljana N. Ljubomirović**

**MORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL  
ANALYSIS OF THE ADENOHYPHYSIS STRUCTURES  
INVOLVED IN THE SYSTEM  
OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS  
DURING THE AGING PROCESS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2014

---

## **I Autor**

Ime i prezime: Miljana Ljubomirović  
Datum i mesto rođenja: 24.06.1980.g.  
Sadašnje zaposlenje: Asistent na predmetu Anatomija Medicinskog fakulteta u Nišu

---

## **II Doktorska disertacija**

Naslov: Morfometrijska i imunohistohemijska analiza struktura adenohipofize uključenih u sistem hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine tokom starenja čoveka

Broj stranica: 105  
Broj šema / slika: 9  
Broj tabela: 8  
Broj grafikona: 15  
Broj bibliografskih podataka: 155  
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Institut za anatomiju, Zavod za sudsku medicinu, Institut za patološku anatomiju i kliničku patologiju u Nišu

Naučna oblast: Anatomija  
Mentor: Prof. dr Ivan Jovanović

---

## **III Ocena i odbrana**

Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: 04-MM-3/06, 17.04.2013. god.

Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata: Prof. dr Rade Čukuranović  
Prof. dr Ivan Jovanović  
Prof. dr Slađana Ugrenović

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: Prof. dr Slađana Ugrenović, predsednik  
Prof. dr Ivan Jovanović, mentor i član  
Prof. dr Natalija Stefanović, član sa Fakulteta sporta i fizičke kulture Univerziteta u Nišu

Datum odbrane doktorske disertacije:

---

Naučni doprinos disertacije:

Pavlović M, Jovanović I, Ugrenović S, Vasović Lj, Krstić M, Bakić M, Živković V, Stojanović V. Morphometric analysis of the human anterior pituitary's folliculostellate cells during the aging process. *Annals of Anatomy* 2013;195:231-7.

Pavlović M, Jovanović I, Pavlović S, Stojanović V, Živković V, Bakić M, Kundalić B, Antić V. Morphometric study of connective tissue in the human pituitary during aging process. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 2013;30(2):79-84.

---

- ☞ *Zahvalnost dugujem svojim roditeljima zbog dosadašnjeg usađivanja svesti o značaju intelektualnog usavršavanja, sestrama na podršci.*
  
- ☞ *Zahvalna sam suprugu Draganu, na psihičkoj podršci i razumevanju u mojim naporima do ostvarenja cilja.*
  
- ☞ *Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Ivanu Jovanoviću koji mi je, od početka do kraja, nesebično prenosio znanje i iskustvo i podržao me da istrajem na naučnom putu koji će biti prekretnica u mojoj karijeri.*

**MORFOMETRIJSKA I IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA STRUKTURA  
ADENOHIPOFIZE UKLJUČENIH U SISTEM  
HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-ADRENALNE OSOVINE  
TOKOM STARENJA ČOVEKA**

**Rezime**

Proces starenja čoveka praćen je porastom prisustva vezivnog tkiva u svim organima i tkivima, a u adenohipofizi i porastom kortikotropnih i folikulostelatnih ćelija, što može da utiče na funkciju HPA osovine kod zdravih starih individua.

Cilj istraživanja je bio da se na tkivu adenohipofiza dobijenih na autopsijama, primenom histohemijskih, imunohistohemijskih i morfometrijskih metoda izvrši kvantifikacija strukturnih promena koje nastaju tokom starenja (celularnosti, prisustva vezivnog tkiva i prokrvljenosti) kao i kolagena tipa IV, adrenokortikotropnih ćelija i folikulostelatnih ćelija.

Histohemijski deo istraživanja je pokazao da tokom normalnog procesa starenja u adenohipofizi dolazi do porasta veličine ćelija. Analizirane ćelije adenohipofize su značajno krupnije i istovremeno se karakterišu značajno pravilnijim oblikom kod slučajeva ženskog u odnosu na slučajeve muškog pola. Uočene su razlike u celularnom sastavu tkiva adenohipofize slučajeva suprotnog pola i zapaža se značajnije prisustvo bazofila kod slučajeva muškog pola. Hipertrofija ćelija je praćena proliferacijom vezivnog tkiva adenohipofize, kao i njenom slabijom vaskularizacijom tokom starenja.

Rezultati imunohistohemijskog dela istraživanja potvrdili su da dolazi do porasta prosečne zapreminske gustine folikulostelatnih ćelija kao i adrenokortikotropnih ćelija. Porast prisustva kolagena tipa IV takođe je prisutan i dobijeni rezultat je saglasan statistički značajnom porastu prisustva vezivnog tkiva u adenohipofizi tokom procesa starenja, uočenom tokom histohemijskog dela istraživanja.

**Ključne reči:** adenohipofiza, hipofiza, HPA osovina, starenje

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Anatomija

**UDK:** 611.814:612.67(043.3)

**MORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS  
OF THE ADENOHYPOPHYSIS STRUCTURES INVOLVED  
IN THE SYSTEM OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS  
DURING THE AGING PROCESS**

**Summary**

The aging in men is accompanied by an increase in the presence of connective tissue in all the organs and tissues, and with increase of corticotrophs and folliculostellate cells in adenohypophysis, which can affect the function of the HPA axis in healthy elderly individuals.

Objective of the research was to perform quantification of structural changes during aging (cellularity, presence of the connective tissue and blood flow), collagen type IV, corticotrophs and folliculostellate cells on the pituitary tissue, obtained at autopsy, using histochemical, immunohistochemical and morphometric methods.

Histochemical part of the research showed an increase of the cell size that occurred during normal aging in the adenohypophysis. The analyzed cells of the adenohypophysis were significantly larger and, at the same time, they were characterized by a substantially more regular shape in female in comparison to the male patients cases. Differences in the cellular composition of the pituitary tissue were observed in cases of the opposite sex and the significant higher number of basophils in males was noted. Hypertrophy of the cells was accompanied by proliferation of the pituitary connective tissue, as well as by its poorer vascularization during aging.

Results of the immunohistochemical part of the study confirmed that there was an increase in the average volume densities of the folliculostellate cells and corticotrophs. The increase in the presence of type IV collagen was also present and the obtained result is consistent to statistically significant increase in the presence of the connective tissue in the adenohypophysis during the aging process, which we observed in the histochemical part of our study.

**Key words:** adenohypophysis, pituitary gland, HPA axis, aging

**The scientific field:** Medicine

**Special topics:** Anatomy

**UDC:** 611.814:612.67(043.3)

# SADRŽAJ

---

<b>UVOD</b> .....	1
STARENJE .....	1
<i>Teorije starenja</i> .....	2
Evolucione teorije .....	2
Molekularne teorije .....	2
Celularne teorije .....	4
Sistemske teorije .....	4
ANATOMSKE KARAKTERISTIKE	
HIPOTALAMO-PITUITARNO-ADRENALNE OSOVINE .....	5
<i>Hipotalamus</i> .....	6
Građa hipotalamus-a .....	6
Anatomske karakteristike paraventrikularnog jedra hipotalamusa .....	9
<i>Hipofiza</i> .....	11
Adenohipofiza .....	11
Funkcija adenohipofize .....	15
Kortikotropne ćelije .....	16
Folikulostelatne ćelije .....	17
Neurohipofiza .....	19
Vaskularizacija hipofize .....	20
Inervacija hipofize .....	21
<i>Nadbubrežna žlezda</i> .....	21
Građa nadbubrežne žlezde .....	22
Kora nadbubrežne žlezde .....	22
Srž nadbubrežne žlezde .....	24
Funkcija kore nadbubrežne žlezde .....	24
Vaskularizacija nadbubrežne žlezde .....	25
Inervacija nadbubrežne žlezde .....	25
FUNKCIJA HIPOTALAMO-PITUITARNO-ADRENALNE OSOVINE .....	26
STARENJE I HIPOTALAMO-PITUITARNO-ADRENALNA OSOVINA .....	27
<b>CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	30

<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	32
MATERIJAL.....	32
METODE .....	32
<i>Morfološka analiza</i> .....	34
<i>Morfometrijska analiza</i> .....	35
Morfometrijska analiza histohemijski obrađenih preparata .....	37
Morfometrijska analiza ćelija adenohipofize .....	37
Morfometrijska analiza vezivnog tkiva adenohipofize .....	37
Morfometrijska analiza krvnih sudova adenohipofize .....	38
Morfometrijska analiza imunohistohemijski obrađenih preparata.....	39
<i>Statistička analiza</i> .....	41
<b>REZULTATI</b> .....	42
MORFOLOŠKA ANALIZA.....	42
<i>Morfološka analiza histohemijski obrađenih preparata</i> .....	42
<i>Morfološka analiza imunohistohemijski obrađenih preparata</i> .....	45
Kolagen tipa IV .....	46
ACTH ćelije .....	47
Folikulostelatne (FS) ćelije .....	49
MORFOMETRIJSKA ANALIZA .....	51
<i>Morfometrijska analiza histohemijski obrađenih preparata</i> .....	51
<i>Morfometrijska analiza imunohistohemijski obrađenih preparata</i> .....	69
<b>DISKUSIJA</b> .....	76
<b>ZAKLJUČAK</b> .....	92
<b>LITERATURA</b> .....	93



# LISTA SKRAĆENICA

---

**DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina

**HPA** – hipotalamo-pituitarno-adrenalna osovina

**Nc** – nucleus

**Tr** – tractus

**HE metoda** – Hematoksilin – eozin metoda

**GH** – hormon rasta

**PRL** – prolaktin

**ACTH** – adrenokortikotropni hormon

**MSH** – melanocitno stimulirajući hormon

**TSH** – tirotropni hormon

**FSH** – folikulostimulirajući hormon

**LH** – luteinizirajući hormon

**GH** – gonadotropni hormon

**iRNK molekul** – molekul informacione ribonukleinske kiseline

**AMP** – adenzin monofosfat

**PKA** – adenilat ciklaza – ciklični AMP – protein kinaza A put

**Ca<sup>2+</sup>** – joni kalcijuma

**PLC** – fosfolipaza C

**PKC** – protein kinaza C

**POMC** – proopiomelanokortin

**PC** – prohormon konvertaza

**CRH** – kortikotropni oslobađajući (rilizing) hormon

**IL – 1** – interleukin 1

**IL – 6** – interleukin 6

**FS** – folikulostelatne ćelije

**Na<sup>+</sup> kanali** – natrijumovi kanali

**K<sup>+</sup> kanali** – kalijumovi kanali

**VEGF (vascular endothelial growth factor)** – vaskularni endotelijalni faktor rasta

**FGF-2 (fibroblast growth factor 2)** – fibroblastni faktor rasta 2

**GFAP (glial fibrillary acidic protein)** – glijalni kiseli fibrilarni protein

**LDL (low-density lipoprotein)** – lipoprotein niske gustine

**HDL (high-density lipoprotein)** – lipoprotein svisoke gustine

**ACE** – angiotenzin-konvertujući enzim

**PVN (nucleus paraventricularis)** – paraventrikularno jedro

**TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha)** – faktor nekroze tumora - alfa

**IL-1 $\alpha$**  – interleukin 1 $\alpha$

**IL-1 $\beta$**  – interleukin 1 $\beta$

**IL-8** – interleukin 8

**IL-1Ra (Interleukin 1 receptor antagonist)** – antagonist interleukin-1 receptora

**sTNFR (Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor)** – receptor rastvorljivog faktora nekroze tumora - alfa

**CRP (C-reactive protein)** – C reaktivni protein

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – vodonik peroksid

**PBS** – fosfatni puffer

**DAB** – 3,3-diamino benzidin

**PAP metoda** – peroksidaza-antiperoksidaza metoda

**A<sub>AH</sub>** – area

**B<sub>AH</sub>** – perimetar

**OF** – oblikovni faktor

**MOD** – prosečna optička gustina

**IOD** – integralna optička gustina

**MdOD** – medijanska optička gustina

**V<sub>VT</sub>** – zapreminska gustina vezivnog tkiva

**P<sub>VT</sub>** – količnik broja tačaka koje pogađaju vezivno tkivo

**P<sub>T</sub>** – broj tačaka testnog sistema

**V<sub>VKS</sub>** – zapreminska gustina krvnih sudova

**S<sub>VKS</sub>** – površinska gustina krvnih sudova

**L<sub>VKS</sub>** – dužinska gustina krvnih sudova

**A<sub>KS</sub>** – area uočenih krvnih sudova

**$\Sigma$ B<sub>KS</sub>** – ukupan perimetar svih uočenih krvnih sudova

**$\Sigma$ A<sub>T</sub>** – ukupna testna površina svih analiziranih vidnih polja

**N<sub>AKS</sub>** – broj uočenih krvnih sudova po jedinici površine testnog sistema

**N<sub>KS</sub>** – ukupan broj uočenih krvnih sudova na svim analiziranim vidnim poljima jednog slučaja

**V<sub>VCOLIV</sub>** – zapreminska gustina kolagena tipa IV

**V<sub>VACTH</sub>** – zapreminska gustina ACTH pozitivnih ćelija

**P<sub>Col IV</sub>** – broj tačaka koje pogađaju kolagen tipa IV imunopozitivne zone

**P<sub>ACTH</sub>** – broj tačaka koje pogađaju ACTH imunopozitivne zone

**V<sub>VFSC</sub>** – zapreminska gustina folikulostelatnih ćelija

**CT** – kompjuterizovana tomografija

**MRI** – magnetna rezonanca

**NF- $\kappa$ B** – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

**IGF-1** – insulinu sličan faktor rasta

**CGRP (calcitonin gene-related peptide)** – calcitonin gen–zavisni peptid

**IFN- $\gamma$**  – interferon  $\gamma$

**MHC** – major histocompatibility complex

**LPS (lipopolysaccharide binding protein)** – lipopolisaharid vezujući protein

# UVOD

---

## STARENJE

Starenje se može definisati kao multifaktorijalni proces okarakterisan heterogenim obrascima i povećanim rizikom za nastanak različitih bolesti (Goncharova i Lapin, 2002). Ono vodi ka progresivnom, generalizovanom smanjenju funkcija čitavog organizma i rezultira povećanjem njegove vulnerabilnosti u odgovoru na izazove spoljašnje sredine (Kirkwood, 2005). Starenje je praćeno multiplim internim homeostatskim alteracijama koje su isprvo-cirane dejstvom različitih eksternih stimulusa ili stresora. Kao posledica toga dolazi do smanjenja sposobnosti odgovora na stres i poremećaja homeostatske ravnoteže, pri čemu se povećava incidenca pojave patoloških stanja, što vodi smrti kao konačnom ishodu (Seeman i Robbins, 1994; Weinert i Timiras, 2003). Pretpostavlja se da starenje počinje posle zrelog doba, iako većina znakova nije očigledna ni tokom kasnijih životnih perioda. Tokom starenja ne dolazi do promene funkcije jednog regulatornog sistema, već do interakcije velikog broja procesa, od kojih se svaki odigrava u različitom trenutku (Carlson i Riley, 1998). Konačno, narušavanje morfološkog integriteta i funkcionalnog kapaciteta endokrinog, nervnog i imunog sistema, kao i njihova redukovana sposobnost da održe homeostazu predstavljaju nepo-bitnu karakteristiku ovog procesa (Cónsole i sar., 2000).

Poslednjih decenija došlo je do ekspanzije studija o starenju. Razlog za to je produženje prosečnog ljudskog životnog veka, praćeno produženjem maksimalne dužine života, kao i povećanjem procenta starih ljudi u ukupnoj populaciji. Heterogenost fenotipa i razlike u dužini životnog veka unutar jedne vrste navode na činjenicu da su za dužinu životnog veka odgovorni kako genetski, tako i faktori sredine (Weinert i Timiras, 2003). Danas je poznato preko tri stotine teorija starenja. Sve one teže da identifikuju uzrok, objasne njegovu celularnu i molekularnu bazu i, na kraju, raspletu klupko multiplih mehanizama koji prouzrukuju akumulaciju oštećenja prisutnu tokom ovog, za ljudsko društvo veoma bitnog procesa (Weinert i Timiras, 2003; Kirkwood, 2005).

## Teorije starenja

Svaka teorija o starenju posmatra čitav proces sa različitog, sopstvenog aspekta: genetskog, biohemijskog ili fiziološkog, što ujedno i determiniše način na koji se objašnjavaju promene uočene tokom starenja.

### Evolucionne teorije

Evolucionne teorije zastupaju ideju da starenje nastaje kao rezultat opadanja snage prirodne selekcije. Kako evolucija primarno ima ulogu da poboljša reproduktivnu sposobnost individue, dugovečnost u tom slučaju bila bi favorizovana samo u cilju unapređenja reproduktivne sposobnosti vrste. Dužina života je specifična za svaku životinjsku vrstu. Ona je u funkciji njene sposobnosti preživljavanja i reproduktivne strategije u kompetitivnom okruženju. To znači da bi dužina životnog veka jedinke određene vrste trebala biti usklađena sa njenim okruženjem. Produženi životni vek može da pogoduje unapređenju reproduktivne funkcije, ali sa druge strane, u pojedinim okolnostima žrtvovanje dugovečnosti u cilju opstanka vrste predstavlja neminovnost (Weinert i Timiras, 2003). U ovu grupu teorija spadaju: teorija akumulacije mutacija, teorija potrošnog tela i teorija antagonističke plejotropije. *Teorija akumulacije mutacija* sugeriše da se štetne mutacije akumuliraju u populaciji sa vremenom i konačno dovode do pojave određenih patoloških stanja sa starenjem. Preostale dve teorije su zasnovane na konceptu evolucionog kompromisa. *Teorija potrošnog tela* se bazira na pretpostavci optimalne preraspodele metaboličkih resursa u cilju očuvanja integriteta i reparacije tela neophodnih za normalno obavljanje prvenstveno reprodukcije, kao i mnogih drugih funkcija. Po ovoj teoriji, po završetku reproduktivnog perioda dolazi do naglog porasta trošenja tela, smanjenja njegove regenerativne i reparativne sposobnosti i napredovanja procesa starenja sa pojavom onih patoloških stanja karakterističnih za taj period života. *Teorija antagonističke plejotropije* pretpostavlja da neki geni mogu imati korisne efekte u mladosti, dok njihova ekspresija u starosti ima štetne efekte koji doprinose starenju (Kirkwood, 2005).

### Molekularne teorije

Molekularne teorije objašnjavaju starenje kao posledicu promena na nivou molekula DNK. *Teorija genske regulacije starenja* pripada ovim teorijama i zastupa stav da starenje nastaje kao posledica promena u genskoj ekspresiji. Naime, poznato je da se ekspresija mnogih gena menja sa godinama. Međutim, postojanje gena čija ekspresija direktno dovodi do

starenja do danas nije potvrđeno (Kirkwood, 2002). Na životni vek utiču geni koji promoviraju dugovečnost. Analize sprovedene u cilju dešifrovanja humanog genoma su omogućile istraživačima da sastave transkripcioni obrazac normalnog starenja. Ovi podaci mogu da se dovedu u vezu sa pokušajima da se uspori ili ubrza starenje identifikacijom promene ekspresije gena bitnih za proces starenja. Razumevanjem načina na koji priroda odlaže starenje, promenama genske ekspresije može se otkriti mnogo novih podataka o samom procesu starenja. Ta činjenica može predstavljati početnu tačku za dalja istraživanja u cilju usporavanja nastanka onih promena u čovečjem organizmu koje se javljaju sa njim.

Studije na stogodišnjacima i njihovim rođacima pokazale su da genetski faktori značajno više od socioekonomskih i faktora okoline utiču na dužinu životnog veka. Takođe, nedavna studija je potvrdila da lokus na hromozomu 4 sadrži gen ili gene koji pospešuju dugovečnost (Perls i sar., 2002).

*Teorija „katastrofalne greške“* zastupa stav da se tokom života broj grešaka postepeno uvećava sve dok ne dostigne kritičan nivo kada nastupa smrt (katastrofa) ćelije, pri čemu krajnju posledicu čitavog ovog procesa predstavlja smrt organizma (Weinert i Timiras, 2003). *Teorija oštećenja i popravke DNK* navodi da tokom starenja nastanak somatskih mutacija i posledično oštećenje ćelije nastaju usled smanjenja efikasnosti repair mehanizama koji bi to trebali da spreče. Oštećenje mitohondrijalne DNK npr. dovodi smanjenja efikasnosti mitohondrija u produkciji energije, ireverzibilnog oštećenja i smrti ćelije (Gorbunova i sar., 2007). *Teorija unakrsnog povezivanja (kolagenska teorija)* podrazumeva da sa starenjem dolazi do međusobnog povezivanja makromolekula, koji su normalno odvojeni izuzetno jakim vezama. Primer za ovu teoriju su molekuli kolagena. Zbog unakrsnog povezivanja njegovih molekula, on postaje nerastvorljiv i rigidan, što rezultira promenom propustljivosti ćelijske membrane. Usled međusobnog povezivanja molekula elastina menja se i struktura vezivnog tkiva. Poremećaji replikacije DNK i deobe ćelije mogu da se jave u slučaju zahvatanja strukturnih proteina i proteina deobnog vretena ovim procesom. Samo unakrsno povezivanje nastupa usled glikozilacije terminalnih aminokiselina proteinskih lanaca. Neki od napred navedenih produkata deluju toksično. Njihovo toksično dejstvo može da se ostvari na dva načina: inicijacijom stvaranja slobodnih radikala i njihovom povećanom sklonošću ka proteolizi i degradaciji, što dovodi do strukturalnih i funkcionalnih promena sličnih onima koje karakterišu starenje (Grillo i Colombatto, 2008).

## **Celularne teorije**

*Teorija telomera* pripada celularnim teorijama i po njoj ćelijsko starenje je opisano kao proces koji ograničava broj ćelijskih deoba humanih ćelija u kulturi (Weinert i Timiras, 2003). Ovo ograničenje replikativnog kapaciteta se javlja nakon odgovarajućeg broja ćelijskih deoba i rezultira zaustavljanjem deoba ćelija koje postaju fiziološki izmenjene (Campisi, 2003).

Ćelijsko starenje takođe može da nastane kao odgovor na različita molekularna zbivanja. Replikativno starenje je specifičan tip celularnog starenja koji rezultira gubitkom telomera. Sa svakom ćelijskom deobom dolazi do gubitka male količine DNK na svakom kraju hromozoma, što rezultira skraćanjem telomera, izmenom njihove strukture i pojavom replikativnog starenja. Aktivacijom enzima telomeraze telomere se regenerišu, a primarne humane ćelijske kulture postaju besmrtne (Blackburn, 2000).

*Teorija slobodnih radikala*, kao jedna od celularnih teorija, navodi da je povećano stvaranje slobodnih radikala bitan biološki proces koji rezultira kumulativnim oštećenjem ćelija i starenjem. Shodno tome, povišeni nivoi oksidativno oštećene DNK i proteina su pronađeni kod starih organizama (Shringarpure i Davies, 2002). Teorija slobodnih radikala je podeljena na nekoliko hipoteza koje se fokusiraju na ulogu pojedinačnih organela i tipove oštećenih molekula u procesu starenja. Jedna od tih hipoteza zastupa stav da mutacije u mitohondrijalnoj DNK ubrzavaju oštećenje izazvano slobodnim radikalima učešćem alterisanih komponenti enzima u lanac elektronskog transporta. Oštećen transport elektrona rezultira daljim povišenjem nivoa slobodnih radikala i sledstveno povećanom pojavom mutacija mitohondrijalne DNK kao i povišenom produkcijom oksidansa, što dovodi do starenja. Po drugoj hipotezi, slobodni radikali izazivaju starenje pojavom akumuliranja oksidisanih proteina u ćelijama (Mandavilli i sar., 2002; Shringarpure i Davies, 2002).

## **Sistemske teorije**

Sistemske teorije povezuju proces starenja sa sniženjem funkcija organskih sistema koji kontrolišu ostale sisteme u organizmu i koji su bitni za komunikaciju organizma sa spoljašnjom sredinom i adaptaciju na njene promene. Kod čoveka, nervni, imuni i endokrini sistem igraju važnu ulogu u koordinaciji svih ostalih sistema i regulaciji njihovog odgovora na stimulse iz spoljašnje i unutrašnje sredine.

*Neuroendokrina teorija* zastupa stav da se starosne promene javljaju paralelno sa promenama nervnih i endokrinih funkcija koje su ključne za: 1) koordinaciju komunikacije

svih organskih sistema sa spoljašnjom sredinom; 2) programiranje fizioloških odgovora na stimulse spoljašnje sredine i 3) stvaranje optimalnih uslova za reprodukciju i preživljavanje kao odgovor na zahteve spoljašnje sredine. Važna komponenta ove teorije je hipotalamo-pituitarno-adrenalna (HPA) osovina kao glavni generator i regulator signala za početak i završetak svakog stadijuma života. Jedna od glavnih funkcija HPA osovine je da obezbedi fiziološke uslove neophodne za očuvanje unutrašnje homeostaze uprkos promenama u spoljašnjoj sredini. Tokom života, hronična ekspozicija fizičkom, biološkom i emocionalnom stresu može iscrpiti i oslabiti kapacitet adaptacije organizma i dovesti najpre do “bolesti adaptacije” i na kraju njegove smrti. Nastanak starosnih promena se u tom slučaju može objasniti kao rezultat smanjenja sposobnosti organizma za preživljavanje stresa. Hipotalamus, kao najviši centar ovog sistema, vrši integraciju odgovora na stimulse spoljašnje sredine koji se stvaraju u različitim delovima CNS-a (cerebralnom korteksu, limbičkom sistemu, retikularnoj formaciji) (Weinert i Timiras, 2003).

*Neuroendokrino-imunološka teorija* potencira interakciju i integraciju neuroendokrinog i imunog sistema. Ova interakcija se odvija na sledeće načine: 1) putem neuropeptida i citokina prisutnih u imunom sistemu koji predstavljaju medijatore kako unutar samog imunog sistema, tako i između neuroendokrinog i imunog sistema; 2) putem hormona prednjeg i zadnjeg režnja hipofize koji kontrolišu brojne imune funkcije i 3) recipročnom interakcijom citokina neuroendokrinog sistema. Iako se neuroendokrini i imuni sistem karakterišu visokim stepenom plasticiteta, tj. sposobnosti da modifikuju svoju funkciju u zavisnosti od potrebe, ona opada tokom procesa starenja (Weinert i Timiras, 2003). To na kraju rezultira starosnim promenama imunog sistema koje se karakterišu smanjenjem rezistencije organizma na infektivne agense, slabljenjem zaštite od pojave malignih oboljenja i češćom pojavom autoimunih bolesti (Franceschi i sar., 2000).

## **ANATOMSKE KARAKTERISTIKE**

### **HIPOTALAMO-PITUITARNO-ADRENALNE OSOVINE**

Hipotalamo-pituitarno-adrenalnu (*HPA*) osovinu čine tri glavne komponente: hipotalamus, adenohipofiza i nadbubrežna žlezda. Ova osovina predstavlja jedan od najpouzdanijih homeostatskih mehanizama ljudskog tela, koji reguliše brojne procese, uključujući digestiju, funkciju imunog sistema, raspoloženje i emocije, seksualnost, kao i stvaranje i potrošnju energije. Ona predstavlja ključnu tačku u povezivanju endokrinog, nervnog i imunog sistema (Ferrari i sar., 2001). Kao takva, ona kontrolišu pojedine aspekte adaptacije, rasta i razvoja je-



dinke (Goncharova i Lapin, 2001) i koordiniše metaboličke i odgovore neuroendokrinog sistema na stres (Seeman i Robbins, 1994). Stresori koji izazivaju aktivaciju HPA osovine mogu biti fizički, zatim spoljašnji ili unutrašnji faktori kao što su aktivacija imunog sistema, bol, zatim izlaganje tela toploti ili hladnoći. Veoma značajne stresore mogu da predstavljaju i različiti psihološki faktori.

## Hipotalamus

Hipotalamus (*hypothalamus*) predstavlja veoma mali deo međumozga koji učestvuje u izgradnji poda i dela bočnog zida treće moždane komore. On se rostralno pruža sve do optičke raskrsnice (*chiasma opticum*) i terminalne lamine (*lamina terminalis*). Zadnja moždana spojnica (*commissura cerebri posterior*) predstavlja njegovu kaudalnu granicu prema srednjem mozgu (*mesencephalon*). Dorzalnu granicu hipotalamusa predstavlja rostralno prednja moždana spojnica (*commissura cerebri anterior*), a sulcus hypothalamicus i ventralni talamus kaudalno. Lateralno, hipotalamus se pruža sve do subtalamičkog jedra (*nc. subthalamicus*). Na njegovoj ventralnoj strani koja naleže na dorzalnu stranu tela klinaste kosti (*os sphenoidale*) uočavaju se idući od rostralnog ka kaudalnom kraju *chiasma opticum*, pepljasta kvržica (*tuber cinereum*) i peteljka hipofize (*infundibulum*) i, na kraju, bradavičasta telašca (*corpora mamillaria*) (Kahle i Frotscher, 2002; Mills, 2007; Siegel i Sapru, 2011).

### Građa hipotalamus-a

Hipotalamus se sastoji iz sive i bele mase. Siva masa je sistematizovana u nejasno razgraničena jedra koja su, prema klasičnoj anatomskoj literaturi, vlaknima stubova moždanog svoda (*fornix*) podeljena u medijalnu i lateralnu oblast (Standring i sar., 2008; Siegel i Sapru, 2011). Lateralnu oblast (*regio hypothalamica lateralis*) čine slabo definisana jedra (*nc. perifornicalis, nc. tuberomamillaris i ncc. tuberales laterales*) između kojih prolaze vlakna medijalnog telencefalnog snopa (*fasciculus telencephalicus medialis*). U njoj se nalaze bihevioralni centri, kao i centar za glad i unošenje tečnosti. Medijalni hipotalamus čini više grupa jedara sastavljenih od neurona čiji produkti regulišu funkciju hipofize, pa se zbog toga on označava i kao hipofiziotropna zona (Siegel i Sapru, 2011). Topografski i funkcionalno, medijalni hipotalamus je izdiferenciran na prednju (*regio hypothalamica anterior*), srednju (*regio hypothalamica intermedia*), zadnju (*regio hypothalamica posterior*) i manju dorzalnu (*regio hypothalamica dorsalis*) oblast (Standring, 2008).

Prednja oblast medijalnog hipotalamusa u svoj sastav uključuje preoptička (*nc. preopticus medianus*, *nc. preopticus periventricularis*, *nc. preopticus medialis* i *nc. preopticus lateralis*), zatim supraoptičko (*nc. supraopticus*), suprahijazmatsko (*nc. suprachiasmaticus*) i paraventrikularno jedro (*nc. paraventricularis*). Ovaj region se grubo može podeliti na medijalni i lateralni deo. Za medijalni deo je ustanovljeno da učestvuje u regulaciji endokrinih funkcija i termoregulaciji, dok je funkcija lateralnog dela znatno slabije izučena. Suprahijazmatsko jedro se nalazi u ventromedijalnom delu prednje zone medijalnog hipotalamusa i zalazi delimično u preoptički region. Ono je vlaknima retinohipotalamičkog snopa (*tr. retinohypothalamicus*) povezano sa retinom i odgovorno je za diurnalni ritam sekrecije hormona. Supraoptičko jedro se nalazi dorzalno od lateralnog dela optičke hijazme, dok se paraventrikularno jedro nalazi u dorzomedijalnom delu prednje zone medijalnog hipotalamusa, neposredno ispod ependima bočnog zida treće moždane komore. Oba ova jedra sastoje se iz krupnih neurona koji luče oksitocin i arginin-vazopresin. Ova dva hormona se preko hipotalamo-hipofiznog snopa prenose u neurohipofizu, odakle se izlučuju u njene vene i dalje u vensku cirkulaciju. Putem krvi oni dospevaju do ciljnih tkiva gde ostvaruju svoj efekat. Oksitocin stimuliše kontrakcije mioepitelnih ćelija dojke i učestvuje u izlučivanju mleka u procesu dojenja. On takođe stimuliše na kontrakciju i glatko-mišićne ćelije uterusa tokom porođaja. Arginin-vazopresin ostvaruje svoj efekat na nivou distalnih tubula bubrega gde dovodi do resorpcije vode i samim tim koncentrovanja mokraće i ostalih telesnih tečnosti (Kahle i Frotscher, 2003; Standring, 2008; Siegel i Sapru, 2011).

Srednja zona medijalnog hipotalamusa označava se kao tubero – infundibularni region. U njenom ventromedijalnom delu, neposredno iznad infundibuluma, u nivou središnjeg uzvišenja (*eminentia mediana*), kaudalno od suprahijazmatskog jedra nalazi se arkuatno jedro (*nc. arcuatus s. infundibularis*). Ovo jedro je izgrađeno pretežno iz dopaminergičkih neurona koji sintetišu prolaktin inhibirajući hormon. Ventromedijalno jedro (*nc. ventromedialis*) se takođe nalazi u ventralnom delu ovog dela hipotalamusa. U njemu se nalazi centar za kontrolu agresivnog ponašanja, centar za sitost, kao i centar za endokrinu kontrolu. Neposredno dorzalno u odnosu na ventromedijalno nalazi se dorzomedijalno jedro (*nc. dorsomedialis*) koje je po građi i funkciji veoma slično napred opisanom jedru. Kontrolu oslobađanja rilizing hormona iz hipotalamusa u hipotalamo – hipofizni portni sistem i samim tim dalje u adenohipofizu vrše jedra koja se nalaze neposredno uz zid treće moždane komore ove zone hipotalamusa koja se označavaju kao tuberalna jedra (Siegel i Sapru, 2011).

Zadnja ili mamilarna zona medijalnog hipotalamusa nalazi se kaudalno u odnosu na intermedijarnu zonu, u nivou bradavičastih telašaca. Ona u svom sastavu sadrži više bele

mase, pa je pojedini autori (Kahle i Frotscher, 2003) označavaju i kao dobro mijeliniziranu zonu, dok preostali deo medijalnog hipotalamusa označavaju kao slabo mijeliniziranu zonu. Najveći deo mamilarnih telašaca gradi medijalno mamilarno jedro (*nc. mamillaris medialis*) izgrađeno od sitnih neurona. Dorzolateralno u odnosu na njega nalazi se znatno manje lateralno mamilarno jedro (*nc. mamillaris lateralis*). Ova dva mamilarna jedra su okružena slabije mijeliniziranim delom hipotalamusa unutar koga se nalaze premamilarna (*nc. premamillaris ventralis et dorsalis*), zadnje jedro hipotalamusa (*nc. posterior hypothalami*) i supramamilarno jedro (*nc. supramamillaris*) (Kahle i Frotscher, 2003).

Hipotalamus predstavlja zonu CNS – a koja je primarno uključena u regulaciju rada unutrašnjih organa, zatim regulaciju endokrine sekrecije, funkcije autonomnog nervnog sistema i emocija. On dodatno vrši regulaciju telesne temperature, seksualne funkcije, ishrane i uzimanja tečnosti, kao i ispoljavanja ofanzivnog (agresivnog) ili defanzivnog ponašanja jedinke (Siegel i Sapru, 2011). On je izgrađen iz posebne vrste nervnih ćelija koje se označavaju kao neurosekretorne ćelije i predstavljaju prelaznu formu između nervnih i sekretornih ćelija. Morfološki, one su slične neuronima i sastoje se iz tela od koga polazi veći broj kraćih nastavaka, dendrita i jedan dugi nastavak, odnosno akson. Za razliku od neurona, u njihovom perikarionu se umesto neurotransmitera sintetišu peptidi koji se tu deponuju najpre unutar malih vezikula. Vezikule se zatim transportuju duž njihovih aksona. U terminalnim delovima aksona sintetisani peptidi se stapanjem membrane vezikula sa membranom terminalnog dela aksona izlučuju u krvotok putem koga dospevaju do hipofize. U njoj oni mogu da ispolje dva efekta. Pojedini peptidi deluju stimulatивно na sekretornu aktivnost endokrinih ćelija adenohipofize i označavaju se kao rilizing („*releasing*“) hormoni. Nasuprot njima, drugi peptidi deluju inhibitorno na napred navedene endokrine ćelije i označavaju se kao inhibitorni („*inhibiting*“) hormoni. Oslobođanje rilizing odnosno inhibiting hormona iz neurosekretornih ćelija hipotalamusa vrši se pod uticajem nervnih impulsa ili humoralnih stimulusa. Čitav proces sinteze i sekrecije gore navedenih hormona od strane hipotalamusnih neurona označava se kao neurosekrecija (Kahle i Frotscher, 2003; Siegel i Sapru, 2011).

U okviru hipotalamusa razlikuju se dva velika i anatomski jasno diferencirana sekretorna sistema. U prvi sistem su uključena dva magnocelularna jedra prednje zone medijalnog hipotalamusa, supraoptičko i paraventrikularno jedro. Njihovi krupni neuroni produkuju oksitocin i vazopresin koji se vezuju za svoje transportne proteine neurofizin I i II u Goldži aparatu. Iz Goldži aparata ovakve, neaktivne forme dva napred navedena hormona dospevaju u transportne vezikule. One se zatim preko aksona ovih neurona transportuju do krvnih sudova neurohipofize gde se, pošto se prethodno razdvoje od svojih proteinskih transporterata, oslo-

bađaju iz vezikula kalcijum zavisnim procesom egzocitoze. Aksoni neurona supraoptičkog i paraventrikularnog jedra na putu ka neurohipofizi obrazuju supraoptikohipofizealni i paraventrikulohipofizealni snop. Drugi sistem čine jedra tuberalnog regiona i njihove veze sa adenohipofizom. Ova jedra se, za razliku od supraoptičkog i paraventrikularnog, sastoje iz sitnih neurona u čijim telima se produkuju rilizing i inhibiting hormoni hipotalamusa. Njihovi aksoni obrazuju tuberoinfundibularni snop čija vlakna završavaju u bogato vaskularizovanom uzvišenju (*eminentia mediana*) zadnjeg dela drške hipofize (*infundibulum*). Terminalni delovi aksona u napred navedenom delu infundibuluma stupaju u odnose sa fenestriranim kapilarima. U njih oni izlučuju produkovane hormone koji zatim preko hipofiznog portog sistema dospevaju do adenohipofize na čije ćelije deluju (Kahle i Frotscher, 2003; Mills, 2007). U značajnije hipotalamusne hormone spadaju: tireotropni rilizing hormon (sintetiše se uglavnom u levom ventromedijalnom, dorzomedijalnom i paraventrikularnom jedru), kortikotropni rilizing hormon (sintetiše se u periventrikularnom i medijalnom delu paraventrikularnog jedra), somatotropni rilizing hormon (sintetiše se u arkuatnom jedru), somatotropni inhibitorni hormon ili somatostatin (sintetiše se u periventrikularnom, paraventrikularnom i parvocelularnom delu arkuatnog jedra), gonadotropni rilizing hormon (sintetiše se uglavnom u ventromedijalnom, dorzomedijalnom, arkuatnom i paraventrikularnom jedru), dopamin (sintetiše se u arkuatnom jedru), arginin-vazopresin (sintetiše se u supraoptičkom i paraventrikularnom jedru) i oksitocin (sintetiše se u supraoptičkom i paraventrikularnom jedru) (Mills, 2007).

### **Anatomske karakteristike paraventrikularnog jedra hipotalamusa**

Paraventrikularno jedro čoveka predstavlja jedro koje ima najznačajniju ulogu u regulaciji aktivnosti hipotalamo-pituitarno-adrenalne osovine. Ono ima oblik vertikalno postavljene ploče lokalizovane u preoptičkom i delimično intermedijarnom delu medijalnog hipotalamusa. Medijalno se pruža neposredno ispod endodima treće moždane komore, od koje je odvojeno uskim slojem glije. Dorzolateralni deo ovog jedra je usečen descendentnim delom forniksa. U njegov sastav ulazi prosečno oko 56 000 neurona, dok mu prosečna zapremina iznosi oko 6 mm<sup>3</sup>. Paraventrikularno jedro je mnogobrojnim aferentnim vezama povezano sa drugim delovima mozga. Kada su u pitanju aferentne veze, najveći broj vlakana dolazi iz limbičkog sistema (*nc. septalis lateralis*, *nc. striae terminalis*, *corpus amygdaloideum* i *subiculum*), zatim iz hipotalamusa, moždanog stabla, kao i prefrontalnog korteksa. Većina napred navedenih vlakana završava u parvocelularnom delu ovog jedra, osim vlakana poreklom iz *nc. dorsomedialis-a* i *nc. preopticus periventricularis-a* koja završavaju u magnocelularnom delu ovog jedra. Eferentna vlakna paraventrikularnog jedra koja potiču iz nje-

govog magnocelularnog dela završavaju u zadnjem lobusu hipofize. Vlakna poreklom iz parvocelularnog dela završavaju u nc. coeruleus-u, nc. tegmentalis ventralis-u, ncc. parabrachiales, nc. tractus solitarii, nc. dorsalis nervi vagi, periakveduktalnoj sivoj masi, nc. intermediolateralis-u kičmene moždine, spoljašnjoj zoni eminentia mediana-e, zadnjem režnju hipofize i corpus amygdaloideum-u. Većina vlakana koja predstavljaju pretežno eferentne veze paraventrikularnog jedra ulazi u sastav fasciculus longitudinalis medialis-a. Na osnovu veza ovog jedra može se zaključiti koliko je njegova uloga važna za normalno odvijanje endokrinih procesa čoveka. Preko njega medijalni prefrontalni korteks velikog mozga modulira odgovor na stres. Na taj način se vrši integracija kognitivno-afektivnih informacija i funkcija hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine (Turnbull i Rivier, 1999; Babović i sar., 2009).

Prema Koutcherov-u i saradnicima (2000), humano paraventrikularno jedro se sastoji iz pet anatomski jasno definisanih delova: anteriornog parvocelularnog, parvocelularnog, magnocelularnog, dorzalnog i posteriornog. Anteriorni parvocelularni deo predstavlja najrostralniji deo ovog jedra. Sastoji se iz sitnih ili neurona srednje veličine, ovalnog oblika, lokalizovanih u ventralnom delu hipotalamusa. Oni poseduju jasno definisane nastavke i sekretuju arginin – vazopresin, neurofizin i dopamin. Parvocelularni deo je lokalizovan medijalno, neposredno ispod endodima treće moždane komore, ventralno i dorzalno od descendentnog dela stubova moždanog svoda. On se sastoji iz sitnih neurona koji sekretuju kortikotropin rilizing hormon i gonadotropin rilizing hormon. Magnocelularni deo zauzima ventrolateralni kvadrant paraventrikularnog jedra i sastoji se iz krupnih ili srednje veličine multipolarnih neurona. On predstavlja njegov najupadljiviji deo i pruža se put pozadi i dorzalno, dosežući nivo hipotalamičnog žleba i ograničavajući lateralno parvocelularni i ventralno dorzalni odeljak ovog jedra. Neuronu ovog dela paraventrikularnog jedra sekretuju dopamin, arginin – vazopresin, neurofizin i u nešto manjoj meri oksitocin. Dorzalno od magnocelularnog dela nalazi se dorzalni deo paraventrikularnog jedra. On zauzima njegov dorzolateralni kvadrant i sastoji se iz mešovite populacije sitnih i krupnih neurona koji pretežno luče dopamin, oksitocin, neurofizin i u znatno manjoj meri arginin-vazopresin. Konačno, kaudalno od descendentnog dela stubova moždanog svoda, u nivou hipotalamičnog žleba nalazi se posteriorni deo, koji je sačinjen iz mešovite populacije krupnih bipolarnih i multipolarnih, kao i sitnih neurona. Sekretuje dopamin, kortikotropin rilizing hormon, gonadotropin rilizing hormon, arginin-vazopresin, oksitocin i neurofizin (Koutcherov i sar., 2000; Babović i sar., 2009).

## Hipofiza

Hipofiza (*hypophysis s. gl. pituitaria*) je glavna žlezda endokrinog sistema koja produktima svoje sekrecije (hormonima) reguliše funkciju većine endokrinih žlezda. Pojedini njeni hormoni, kao što je npr. hormon rasta, mogu da deluju i direktno na određena ciljna tkiva koja ne pripadaju endokrinom sistemu. Napred navedenim mehanizmima, hipofiza reguliše brojne važne procese u organizmu kao što su rast, metabolizam, razvoj u pubertetu, fertilitet, odgovor na stres i imunološki odgovor (Vankelecom, 2007; Ilić, 2009). Regulacija aktivnosti hipofize nastaje kao odgovor na stimulatorne i inhibitorne centralne i periferne signale (Chesnokova i Melmed, 2010).

Hipofiza je mala žlezda, prečnika oko 1cm, teška od 0.5 do 1g. Ona se nalazi u turskom sedlu (*sella turcica*), koštanom udubljenju na gornjoj strani tela sfenoidalne kosti baze lobanje. Hipofiza je dorzalno od mozga odvojena duplikaturom tvrde moždanice (*diaphragma sellae*). Ventralno, od desnog i levog sfenoidalnog sinusa koji čine centralnu šupljinu tela klinaste kosti, odvojena je tankim koštanim zidom turskog sedla. Lateralno od nje nalaze se desni i levi kavernozi sinus i unutar njegovog lumena unutrašnja karotidna arterija i VI kranijalni živac. Kroz duplikaturu njegovog spoljašnjeg zida pružaju se raspoređeni, idući odozgo put naniže, III, IV, V<sub>1</sub> i V<sub>3</sub> moždani živac. Na *diaphragma sellae* nalazi se otvor kroz koji prolazi peteljka hipofize (*infundibulum*), njena veza sa hipotalamusom. Iznad dijafragme nalazi se optička raskrsnica (*chiasma opticum*) (Standring, 2008; Ilić, 2009).

Hipofiza predstavlja strukturalnu i funkcionalnu vezu između dva glavna regulatorna i integraciona sistema čovečijeg tela – nervnog i endokrinog. Ona nastaje integracijom žlezdanog i nervnog tkiva tokom embrionalnog razvoja. Žlezdani deo predstavlja adenohipofiza ili njen prednji režanj (*adenohypophysis s. lobus anterior*), dok njen nervni deo čini neurohipofiza ili zadnji režanj (*neurohypophysis s. lobus posterior*) (Henrikson i sar., 1997; Anđelković, 2009). Adeno- i neurohipofiza su obavijene zajedničkom kapsulom, čineći na taj način u anatomskom smislu jedinstvenu žlezdu. Ipak, svaki od njena dva napred navedena dela se karakteriše različitim embrionalnim poreklom, celularnim sastavom i funkcijom (Gartner i Hiatt, 2007).

### Adenohipofiza

Adenohipofiza (*adenohypophysis*) čini oko 75% čitave žlezde. Sastoji se iz tri dela: pars distalis, pars intermedia i pars tuberalis. Kod čoveka su pars intermedia i pars tuberalis zakržljali, tako da je endokrina aktivnost gotovo isključivo vezana za distalni deo adenohipofize.

Histološki, adenohipofiza, tačnije njen distalni deo, predstavlja klasičnu endokrinu žlezdu koja luči šest veoma važnih hormona (Guyton i Hall, 2008; Anđelković, 2009). Oni imaju veoma značajnu ulogu u regulaciji funkcije većine endokrinih žlezda ljudskog organizma, kao i kontroli njegovih metaboličkih funkcija. Distalni deo adenohipofize (*pars distalis*) se sastoji iz parenhimskih ćelija, krvnih sudova, nervnih vlakana i mreže kolagenih vlakana. Prema podacima iz klasične histološke literature (Cross i Mercer, 1993; Kuehnel, 2003; Mills, 2007; Young i sar., 2007; Eroschenko, 2008) distalni deo adenohipofize se sastoji iz parenhimskih ćelija koje su raspoređene u vidu gredica ili acinusa između kojih se nalaze vezivno- tkivne septe. Unutar vezivno- tkivnih septi uočava se bogata kapilarna mreža sačinjena od fenestriranih sinusoidnih kapilara, što omogućava neometan prelazak produkata sekrecije endokrinih ćelija u krvotok. Na histološkim preparatima bojenim HE metodom, u adenohipofizi se razlikuju 2 tipa parenhimskih ćelija: hromofobne, čija se citoplazma boji veoma slabo i hromofilne čija se citoplazma intenzivno boji napred navedenim metodom. Hromofilne ćelije se dalje mogu podeliti u dve subpopulacije: prvu koja uključuje ćelije čija citoplazma ispoljava visok stepen acidofilije i boji se crveno (acidofili) i drugu u koju spadaju ćelije sa citoplazmom koja poseduje bazofilne karakteristike i boji se plavo nakon primene HE metode (bazofili). Hromofobne ćelije nisu prijemčive ni za kisele ni za bazne boje. Njihova citoplazma se primenom HE metode veoma slabo boji i ne poseduje sekretorne granule koje se uočavaju u citoplazmi acidofila i bazofila. Ove ćelije se označavaju i kao folikulostelatne ćelije koje mogu da sekretuju veoma male količine bilo kog hormona. U funkcionalnom smislu hromofilne ćelije mogu da se podele na podgrupu čiji produkti sekrecije deluju na neendokrina tkiva i na one koje svojim hormonima regulišu rad većine endokrinih žlezda (Young i sar., 2007).

U prvu podgrupu spadaju:

- Somatotropne ćelije – sekretuju hormon rasta (GH) i praktično sačinjavaju oko 50% svih endokrinih ćelija distalnog dela adenohipofize;
- Mamotropne (laktotropne) ćelije – sačinjavaju oko 20% svih endokrinih ćelija i sekretuju prolaktin (PRL) koji reguliše produkciju mleka u mlečnim žlezdama tokom perioda dojenja.

U drugu grupu spadaju:

- Kortikotropne ćelije – takođe čine oko 20% endokrinih ćelija prednjeg režnja hipofize i sekretuju veliki polipeptidni molekul proopimelanokortin. Njegovim enzimskim razlaganjem nastaju kortikotropin (ACTH), zatim lipotropin (učestvuje u regulaciji

metabolizma lipida), endorfini (endogeni opiodi) i različite forme melanocitno stimulišućeg hormona (MSH);

- Tirotropne ćelije predstavljaju malobrojniju populaciju ćelija distalnog dela prednjeg režnja (oko 5%) i luče tirotropin (TSH) koji reguliše rad štitne žlezde;
- Gonadotropne ćelije kojih takođe ima oko 5% u pars distalis-u adenohipofize odgovorne su za sekreciju folikulostimulišućeg (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH).

**Pars intermedia** čini oko 3% adenohipofize i u njemu se uglavnom uočavaju bazofilne ćelije koje luče MSH. One mogu da se uoče i u dorzalnim delovima hipofize što se označava kao bazofilna invazija. Prisustvo koloidnih cista obloženih prostim kubičnim ili višeslojnim stratifikovanim epitelom varijabilnog stepena diferencijacije predstavlja upadljivu strukturalnu karakteristiku ovog dela hipofize. One ukazuju na zajedničko embrionalno poreklo ovog i distalnog dela prednjeg režnja adenohipofize od Rathke-ovog špaga primitivne usne duplje (Kuehnel, 2003).

**Pars tuberalis** je deo adenohipofize levkastog oblika, koji okružuje infundibulum neurohipofize. Većina njegovih ćelija luči gonadotropine (Junqueira i Carneiro, 2005).

Sekretorna aktivnost većine napred navedenih tipova endokrinih ćelija adenohipofize se nalazi pod kontrolom ranije opisanih rilizing hormona hipotalamusa. Izuzetak predstavljaju jedino mamotropne ćelije čija se sekretorna aktivnost nalazi pod inhibitornom kontrolom dopamina. Kontrolu sekrecije hormona rasta od strane somatotropnih ćelija pars distalis-a vrše kako rilizing tako i inhibiting (somatostatin) hormoni hipotalamusa (Young i sar., 2007).

Prema Mills-u (2007), na preparatima hipofize bojenim klasičnim HE metodom uočava se pojačano prisustvo bazofilnih ćelija u središnjem, klinastom ili mukoidnom delu prednjeg režnja, neposredno ventralno u odnosu na zadnji režanj. One predominantno sekretuju ACTH, TSH, LH i FSH. Nasuprot njemu, lateralni delovi („lateralna krila“) prednjeg režnja su sačinjeni uglavnom od acidofilnih ćelija koje sekretuju najvećim delom GH, a u znatno manjoj meri PRL. Prema tome, primena ovog metoda samo delimično omogućava razlikovanje napred navedenih funkcionalnih tipova ćelija adenohipofize. Njihova definitivna vizualizacija je moguća samo primenom imunohistohemijskog i elektronomikroskopskog metoda. Elektronomikroskopskim metodom se uočava različita veličina i elektronska gustina sekretornih granula kod različitih ćelijskih tipova. Tako, somatotropi poseduju sekretorne granule srednje veličine (300 nm), dok tirotropi poseduju sitne granule (16 – 60 nm) koje su lokalizovane na periferiji ćelije. Gonadotropi predstavljaju krupne ćelije čije su sekretorne granule varijabilne veličine (300 – 400 nm). Kortikotropi poseduju retke sekretorne granule



prosečne veličine 200 – 500 nm koje su lokalizovane na krajnjoj periferiji ćelije (Kuehnel, 2003; Young i sar., 2007).

Napred opisani tip histološke organizacije adenohipofize pojedini autori (Le Tissier i sar., 2012) poistovećuju sa strukturom difuznog neuroendokrinog sistema. Na tankim histološkim presecima, takav tip organizacije karakteriše heterogena distribucija različitih funkcionalnih tipova endokrinih ćelija adenohipofize. I kod takvog modela njene građe navodi se prisustvo morfološke povezanosti kortikotropa i somatotropa, zatim tirotropa i somatotropa, kao i laktotropa i gonadotropa. Napred navedeni autori (Le Tissier i sar., 2012) takođe navode i podatak da je najveća koncentracija laktotropa uočena u krajnjem rostralnom i krajnjem kaudalnom delu distalnog dela prednjeg režnja, dok su somatotropi najzastupljeniji u njegovim anterolateralnim krilima. Takva percepcija adenohipofize u vidu dezorganizovanog ćelijskog mozaika bi ukazivala da endokrine ćelije koje pripadaju istom funkcionalnom tipu mogu da oslobađaju hormon u krvotok bez neke izrazite potrebe za međusobnom koordinacijom. Iz svega napred opisanog bi se moglo zaključiti da endokrine ćelije, u vidu sekundarnog oscilatora, izvršavaju instrukcije prispELE preko hipofiznog portnog krvotoka iz hipofiziotropnih neurona hipotalamusa (Fauquier i sar., 2002). Ipak, isti autori dalje tvrde da je verovatnoća da su parenhimske endokrine ćelije prednjeg režnja hipofize razbacane bez nekog pravila unutar njega mala, što dodatno podupiru robustnost (sinteza i sekrecija hormona i u slučaju težih poremećaja kao što su lokalna ishemija ili inflamacija) i modularnost (održavanje normalne produkcije hormona u promenljivim fiziološkim uslovima) njegove funkcije. To sve ukazuje na međusobnu povezanost (fizičku ili hemijsku) čak i prostorno udaljenih homotipskih endokrinih ćelija i njihovu koordinaciju pomoću parakrinih faktora ili prenošenjem signala pomoću „gap“ spojeva (Mollard i sar., 2012). Strukturalno, adenohipofiza bi u najvećoj meri odgovarala trodimenzionalnom lavirintu unutar koga vezivno tkivo, imune ćelije i fenestrirani kapilari grade „zidove“ koridora koji ispunjavaju parenhimske ćelije (Fauquier i sar., 2002).

Funkcionalne mreže homotipskih endokrinih ćelija adenohipofize su najbolje proučene kod eksperimentalnih životinja (miševa). Do danas, takav tip povezanosti opisan je kod četiri od pet funkcionalnih tipova endokrinih ćelija. Tako, somatotropne ćelije formiraju klustere unutar lateralnih delova prednjeg režnja. Oni su naročito razvijeni u postpubertetskom periodu kod muškog pola. Klasteri koji se nalaze kako na istoj, tako i na suprotnim stranama prednjeg režnja povezani su pomoću ćelijskih gredica sačinjenih iz jednog reda ćelija istog funkcionalnog tipa. Prisustvo klastera u središnjem delu distalnog dela prednjeg režnja nije uočeno. Ćelije koje ekspimiraju proopiomelanokortin, polipeptid koji će se kasnije procesuirati u ACTH, javljaju se tokom razvoja najpre u obliku klastera u lateralnim partijama ka-

udalnog i ventralnog dela prednjeg režnja. Kasnije se od njih pružaju ćelijske trake ka središnjem delu ventralnog pars distalis-a lobus anterior-a i nastavljaju da penetriraju i ka njegovim dubljim (dorzalnim) delovima. Takav tip organizacije se zadržava i u adultnom periodu. Melanotropi, koji takođe eksprimiraju proopiomelanokortin, ali sekretuju MSH, zauzimaju središnji deo prednjeg režnja, između infundibuluma i pituitarne fisure. Kortikotropne ćelije na tankim presecima izgledaju potpuno razdvojene. Ipak, one poseduju tanke nastavke, tzv. citoneme, koje ih povezuju međusobno, kao i sa krvnim sudovima. Gonadotropne ćelije se javljaju, kao i kortikotropne ćelije, na ventralnoj strani prednjeg režnja i tokom daljeg razvoja prate kortikotropne ćelije, sa kojima su i strukturalno povezane. Laktotropi se, kao i somatotropi, predominantno uočavaju u lateralnim delovima prednjeg režnja, gde u adultnoj adenohipofizi formiraju „saćaste“ strukture. One su naročito upadljive kod ženskog pola tokom perioda laktacije (Le Tissier i sar., 2012; Mollard i sar., 2012).

### ***Funkcija adenohipofize***

Yeung i sar. (2006) su u svom pregledu opsežno opisali funkciju endokrinih tipova ćelija prednjeg režnja hipofize. Naime, pulsatilna ili epizodična sekrecija trofičkih hormona adenohipofize se nalazi pod kontrolom sinhronizovanog sekretornog obrasca hipotalamusnih hormona. Ova hipotalamusno-adenohipofizna osovina reguliše sintezu i sekreciju trofičkih hormona od strane određenih ćelijskih tipova integracijom centralnih i perifernih signala. Pored hipotalamusnih hormona koji do hipofize dospevaju preko hipofiznog portnog cirkulatornog sistema, adenohipofizna sekretorna aktivnost može biti modifikovana nivoima samih hormona koji su izlučeni, zatim cirkardijalnim ritmom i na kraju mehanizmom negativne povratne sprege. Hipotalamusni rilizing hormoni deluju na odgovarajući funkcionalni tip endokrinih ćelija vezujući se za receptore vezane za G-protein u njihovoj ćelijskoj membrani. To dalje dovodi do pojačane transkripcije gena odgovornih za sintezu hormona i stabilizacije molekula iRNK koji pri tome nastaju. Napred navedeni hormoni vezivanjem za membranske receptore ciljnih adenohipofiznih endokrinih ćelija pospešuju sekreciju trofičkih hormona i aktivacijom adenilat ciklaza – ciklični AMP-protein kinaza A (PKA) puta. Vezivanje hipotalamusnog rilizing hormona za specifičan receptor aktivira AMP – PKA put, što na kraju rezultira porastom nivoa  $Ca^{2+}$  u pituitarnim ćelijama influksom ekstracelularnog  $Ca^{2+}$  preko membranskih kalcijumskih kanala. Alternativno, dolazi do aktivacije fosfolipaze C (PLC) – protein kinaze C (PKC) puta koji dovodi do bifaznog porasta nivoa intracelularnog  $Ca^{2+}$  i to najpre njegovim oslobađanjem u citoplazmu iz depoa u endoplazmatskom retikulumu, a za-

tim influksom ekstracelularnog kalcijuma. Povišenje intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  predstavlja neophodan preduslov za egzocitozu trofičkih adenohipofiznih hormona. Sekretija hormona kao što su hormon rasta, prolaktin, ACTH i TSH vrši se pomoću AMP – PKA puta, dok se pomoću PLC - PKC puta vrši sekretija gonadotropina i TSH. Hipotalamusni inhibiting hormoni kao što su somatostatin i dopamin ostvaruju svoje dejstvo delimično inhibicijom aktivnosti adenilat ciklaze, delimično pomoću mehanizama kojima snižavaju nivo intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$ .

Napred navedeni autori (Yeung i sar., 2006) dalje navode da su tradicionalni stavovi da određeni hipotalamusni rilizing hormon reguliše oslobađanje samo jednog adenohipofiznog trofičkog hormona i da endokrine ćelije jednog funkcionalnog tipa adenohipofize mogu da budu stimulisane samo od strane samo jednog rilizing hormona modifikovani. Naime, pojedine pituitarne ćelije su multifunkcionalne po prirodi i mogu da eksprimiraju više različitih fenotipova. Ove ćelije mogu da budu uključene u paradoksalnu sekretiju (sekretija hormona pod uticajem neodgovarajućeg rilizing hormona) i transdiferencijaciju (promena fenotipa već diferentovanih ćelija bez izvršene ćelijske deobe). To čini ove ćelije osetljivim na prisustvo više različitih rilizing hormona, zbog čega se pojedini funkcionalni tipovi endokrinih ćelija sastoje iz više diskretnih subpopulacija. Sve napred navedeno ukazuje da je hipotalamusna kontrola funkcije adenohipofize znatno složenija nego što se to ranije smatralo.

### ***Kortikotropne ćelije***

Kortikotropne (ACTH) ćelije su lokalizovane u anteromedijalnom delu prednjeg režnja i čine 15 – 20% ćelijske populacije adenohipofize. Morfološki, ove ćelije se karakterišu poligonarnim ili elongiranim oblikom, dobro razvijenim endoplazmatskim retikulumom, prominentnim Golgi kompleksom, brojnim krupnim lizozomima, prisustvom tipa I filamenata i citoplazmom ispunjenom brojnim iregularnim sekretornim granulama (Ooi i sar., 2004; Anđelković, 2009).

Izučavanje ovog funkcionalnog tipa ćelija prednjeg režnja vršeno je na AtT-20 ćelijama koje su dobijene presejavanjem ćelija ACTH-produkujućih pituitarnih tumora eksperimentalnih životinja (miševa) u ćelijskim kulturama. Ćelije ove linije, kao i kortikotropne ćelije in situ produkuju prohormon i poseduju enzimski aparat koji vrši njegovu obradu do nivoa zrelog molekula proopiomelanokortina (POMC). One takođe poseduju i mašineriju za dalju post-translacionu obradu proopiomelanokortina i njegovo razlaganje na molekule ACTH,  $\beta$ -lipotropni hormon, dok melanotropne ćelije intermedijarnog režnja adenohipofize razlaganjem ovog molekula produkuju  $\alpha$ -melanocitno stimulišući hormon,  $\gamma$ -lipotropni

hormon i  $\beta$ -endorfin. Razlaganje molekula POMC kataliziraju enzimi označeni kao prohormon konvertaze (PC), pri čemu kortikotropi eksprimiraju samo PC-1, a melanotropne ćelije PC-1 i PC-2 izoforme ovog enzima. Unutar kortikotropnih ćelija, produkovani hormoni se pakuju unutar granula iz kojih se sintetisani hormoni mogu oslobađati neposredno nakon njihove sinteze ili se mogu najpre deponovati i zatim izlučiti kasnije. Kortikotropne ćelije eksprimiraju glikokortikoidne, somatostatinske, histaminske H3 receptore, zatim dopaminske i holinergičke muskarinske receptore. Vezivanjem za napred navedene receptore sinteza i sekrecija ACTH se nalazi pod kontrolom glikokortikoida, CRH, arginin-vazopresina i citokina (IL-1 i IL-6) (Ooi i sar., 2004; Perez-Castro i sar., 2012).

### ***Folikulostelatne ćelije***

Folikulostelatne (FS) ćelije predstavljaju agranularne, neendokrine ćelije adenohipofize zvezdastog oblika sa prisutnim dugim, tankim nastavcima na njihovoj površini, koji se pružaju između endokrinih ćelija (Pavlović i sar., 2013a). One predstavljaju njene parenhimske ćelije koje su najpre označavane kao hromofobne (Fauquier i sar., 2002). Iako se za njihovo prisustvo zna oko 60 godina unazad, tek se u poslednjih 20 godina otkrivaju njihove brojne bitne funkcije (Inoue i sar., 1999; Allaerts i Vankelecom, 2005; Devnath i Inoue, 2008; Perez-Castro i sar., 2012). Inicijalno, FS ćelije su klasifikovane u dva komplementarna, ali morfološki različita tipa: „folikularne“ ćelije koje svojim nastavcima okružuju šupljine ispunjene koloidnim materijalom i „stelatne“ ćelije, koje takođe poseduju duge nastavke, ali njima ne oblažu šupljine ispunjene koloidom. Kasnije je predloženo da ova dva tipa FS ćelija u stvari predstavljaju jedinstvenu populaciju označenu kao „folikulostelatne“ ćelije. Takođe je uočeno da su one svojim dugim nastavcima, koji se pružaju između sekretornih ćelija i kapilara, međusobno povezane i formiraju trodimenzionalnu mrežu koja se pruža čitavom površinom prednjeg režnja pituitarne žlezde (Fauquier i sar., 2002; Acosta i sar., 2010). Folikulostelatne ćelije čine 5 – 10% čitave populacije ćelija prednjeg režnja adenohipofize (Gartner i Hiatt, 2007). Njihova uloga nije u potpunosti razjašnjena, ali se pretpostavlja da pružaju potporu žlezdanim ćelijama prednjeg režnja, zatim da učestvuju u trofičkim procesima, transferu metabolita i jona i imaju nutritivnu ulogu. Njihova prostorna organizacija, povezanost sa endokrinim ćelijama i krvnim sudovima sugerišu na njihovu moguću ulogu u parakrinoj regulaciji (Console i sar., 2000; Anđelković, 2009; Acosta i sar., 2010). Jedna od veoma važnih odlika FS ćelija jeste ekscitabilnost njihove ćelijske membrane zahvaljujući prisustvu  $\text{Na}^+$ , zatim  $\text{Ca}^{2+}$  i još najmanje dve vrste  $\text{K}^+$  kanala. Zahvaljujući tome, one su sposobne da se

spontano depolarizuju pri čemu nastaje akcioni potencijal. On predstavlja okidač za porast koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u njihovoj citoplazmi. U porast intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  mogu da budu uključeni i drugi mehanizmi kao npr. oni koji se odigravaju uz učešće inozitol-tri-fosfata. Veoma bitnu činjenicu predstavlja i podatak da FS ćelije međusobno, kao i sa endokrinim ćelijama prednjeg režnja komuniciraju preko „gap“ spojeva. To omogućava prenošenje porasta intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  širom žlezde, u vidu talasa koga karakteriše određeni spacio – temporalni obrazac. Joni kalcijuma predstavljaju univerzalni signalni molekul koji je, kao što smo već napred naveli, veoma bitan za sekreciju sintetisanih trofičkih hormona iz endokrinih ćelija adenohipofize (Fauquier i sar., 2002). Pored porasta citoplazmatskog  $\text{Ca}^{2+}$ , FS ćelije mogu da prenose informacije širom prednjeg režnja adenohipofize sintezom i sekrecijom brojnih faktora rasta, kao što su IL-6 (Lohrer i sar., 2000; Gloddek i sar., 2001; Correa-de-Santana i sar., 2009), VEGF, FGF-2, aneksin-1 (Theogaraj i sar., 2005), kao i ekspresijom receptora za hormone hipofize (Brokken i sar., 2004). Sekrecijom citokina i faktora rasta ove ćelije regulišu sekreciju prolaktina, hormona rasta, FSH, LH i ACTH (Mabuchi i sar., 2004; Henderson i sar., 2008). Demonstrirano je da FS ćelije takođe stvaraju lipokortin-1, koji deluje na nivou hipofize učestvujući u inhibiciji sinteze ACTH i na nivou hipotalamusa inhibicijom sinteze CRH, što na kraju rezultira smanjenjem sinteze glikokortikoida na nivou nadbubrega. U FS ćelijama, kao i u gonadotropima, sintetiše se folistatin koji indirektno, parakrinim dejstvom, reguliše biosintezu i sekreciju FSH (Danila, 2005).

Koordinaciju aktivnosti kako lokalnih, tako i udaljenih grupa endokrinih ćelija, FS ćelije mogu da vrše i preko veza koje formiraju sa nastavcima hipotalamusnih neurona koji završavaju u pars tuberalis-u (Mabuchi i sar., 2004; Henderson i sar., 2008). One se povezuju i sa funkcionalnim plasticitetom hipofize zbog svoje sposobnosti da modifikuju broj međusobnih „gap“ intercelularnih spojeva, kao i modulacije veza sa hormonskim ćelijama u cilju adekvatnijeg odgovora adenohipofize na fiziološki izazov (Le Tissier i sar., 2012). Rezultati novijih studija ukazuju na učešće FS ćelija u komunikaciji između imunog i endokrinog sistema (Herkenham, 2005). Naime, postoje tvrdnje da subpopulacija FS ćelija, morfološki bliska dendritičnim ćelijama, ima specifičnu ulogu u ostvarivanju komunikacije između imunog sistema i endokrinih ćelija adenohipofize (Perez-Castro i sar., 2012).

Grupa FS ćelija koje učestvuju u obrazovanju folikula delimično sintetiše, a takođe i učestvuje u apsorpciji folikularnog koloida. Prisustvo PRL i LH u sastavu folikularnog koloida može da navede na zaključak da se sekretorne granule gonadotropa i laktotropa oslobađaju usled celularne degradacije i predstavljaju supstrat fagocitne aktivnosti FS ćelija (Console

i sar., 2000; Anđelković, 2009; Acosta, 2010). Pojedini autori smatraju da ove ćelije predstavljaju i stem ćelije prednjeg režnja adenohipofize (Vankelecom, 2007).

Folikulostelatne ćelije ispoljavaju imunoreaktivnost na S100 i glijalni kiseli fibrilarni protein (GFAP), što navodi da one mogu da potiču od astrocita ili mikroglije. Ova pretpostavka je poduprta i njihovom ulogom u fagocitozi celularnog debrija i apoptotičnih telašaca, kao i njihovom potpornom funkcijom sličnom istoj funkciji astrocita u mozgu, zatim ulogom u održavanju homeostaze, regulaciji transporta vode i zaštiti od mogućih oštećenja nastalih dejstvom generisanih slobodnih radikala (Vankelecom i sar., 1993; Perez-Castro i sar., 2012).

## Neurohipofiza

Zadnji režanj hipofize, neurohipofiza (*neurohypophysis*) po svojoj strukturi ne predstavlja pravu endokrinu žlezdu, već ventralnu ekstruziju CNS-a. Čini kaudalnu petinu hipofize i sastoji se iz tri dela: nervnog (*pars nervosa*), peteljke hipofize (*infundibulum*) i središnjeg uzvišenja (*eminentia mediana*) (Mills, 2007).

Nervni deo (*pars nervosa*) predstavlja najveći deo neurohipofize sagrađen uglavnom od pituicita (ćelija sličnih glijalnim), snopova (fascikulusa) nemijeliniziranih nervnih vlakana, vezivnog tkiva i krvnih sudova (Mills, 2007; Young i sar., 2007; Eroschenko, 2008; Anđelković, 2009).

Pituiciti predstavljaju najbrojnije ćelije neurohipofize. Morfološki, oni predstavljaju elongirane uni- i bipolarne ćelije, sa čije površine polaze jedan ili dva duga i tanka nastavka. Oni ispoljavaju pozitivnu reakciju na GFAP, zatim S-100 i na kraju na vimentin. Njihovi nastavci se, slično glijalnim ćelijama, pružaju sve do vezivnog tkiva, kao i zidova krvnih sudova neurohipofize. Postoji pet glavnih formi pituicita: glavna, tamna, ependimalna, onkocitna i granularna. Njihova fiziološka uloga nije u potpunosti rasvetljena (Mills, 2007).

Amijelinska nervna vlakna neurohipofize predstavljaju u najvećoj meri aksone neurona čija su tela lokalizovana u supraoptičkom i paraventrikularnom jedru i, u nešto manjoj meri, holinergičkih neurona hipotalamusa. Na ultrastrukturnom nivou, dijametar ovih amijelinskih nervnih vlakana se kreće od 0,05 – 1,0  $\mu\text{m}$  i ona sadrže longitudinalno raspoređene snopove mikrotubula i neurofilamenata. Opisana su dva tipa neurosekretornih aksona: tip A koji predstavlja brojniji tip vlakana i sadrži krupnije sekretorne granule promera 100 – 300 nm i tip B, koji je nešto slabije zastupljen i poput aminergičkih neurona sadrži sitnije sekretorne granule promera 50 – 100 nm. Neurosekretorna vlakna su tesno povezana sa pituicitima, koji formiraju njihov omotač (Mills, 2007; Young i sar., 2007; Eroschenko, 2008).

Hormoni oksitocin i arginin – vazopresin izlučuju se u krvotok preko neurohipofize. Njihova sinteza se, međutim, vrši u neuronima supraoptičkog i paraventrikularnog jedra hipotalamusa. Oni se zatim, vezani za molekul neurofizina unutar sekretornih granula, transportuju amijelinskim aksonima ovih neurona koji obrazuju hipotalamo – hipofizni trakt u neurohipofizu. Distalni krajevi aksona ovog puta su distendirani i u njima se napred navedeni hormoni akumuliraju, formirajući Herring – ova telašca. Pod uticajem signala poreklom iz hipotalamusa, oksitocin i vazopresin se oslobađaju iz Herring – ovih telašaca u male kanale koji naležu na abluminalnu površinu bazalne membrane kapilara. Oni dalje iz perivaskularnog prostora dospevaju u lumen kapilara preko njihove bazalne membrane i endotela (Mills, 2007; Young i sar., 2007; Eroschenko, 2008).

### **Vaskularizacija hipofize**

Arterijska vaskularizacija hipofize potiče od dve bočne grane unutrašnje karotidne arterije (a. carotis interna), gornje i donje hipofizne arterije (a. hypophysialis superior et a. hypophysialis inferior). Gornja hipofizna arterija se odvaja od stabla unutrašnje karotidne arterije neposredno nakon njenog ulaska u lobanjsku duplju. Ona se nakon kratkog puta deli na prednju i zadnju granu, koje se spajaju sa istoimenim arterijama suprotne strane, formirajući arterijski prsten oko gornjeg dela infundibuluma. Od prednjih grana gornjih hipofiznih arterija odvajaju se trabekularne arterije. One najpre imaju descendentan tok pružajući se preko gornjeg dela prednjeg režnja. U tom delu svog puta one daju arteriju fibroznog jezgra kao bočnu granu. Završne grane trabekularnih arterija predstavljaju duge infundibularne arterije. One se pružaju ascendentno i završavaju u tuberalnom delu prednjeg režnja. Pored trabekularnih, od prednje i zadnje grane gornje hipofizne arterije se u nivou gornjeg dela infundibuluma odvajaju kratke infundibularne arterije, koje penetriraju u infundibulum i nastavljaju da se pružaju ascendentno ili descendentno. Završni delovi dugih i kratkih infundibularnih arterija formiraju strukture koje se označavaju kao gomitoli. One se sastoje iz centralne arterije okružene glomerulolikim strukturama sačinjenim od kapilara. Vezu između arterija i kapilara unutar gomitola predstavljaju specijalizovane arteriole obavijene glatko – mišićnim sfinkterima, koji regulišu protok krvi kroz ove strukture. Kapilari gomitola dreniraju svoju krv u obilnu pampiniformnu vensku mrežu, koja obavlja infundibulum i predstavlja deo hipofiznih portnih vena. Donja hipofizna arterija se odvaja od meningohipofiznog stabla unutrašnje karotidne arterije u nivou njenog dela koji se nalazi u kavernožnom sinusu. Ona pristupa inferolateralnom delu hipofize, nakon čega se deli na medijalnu i lateralnu završnu granu. One se spajaju sa istoimenim arterijama suprotne strane formirajući arterijski prsten oko neurohipo-

fize. Ova arterija vaskularizuje uglavnom neurohipofizu i donji deo infundibuluma. Od nje se odvajaju kapsularne grane koje vaskularizuju periferni deo adenohipofize (Mills, 2007).

Komunikacija između hipotalamusa i hipofize odvija se preko hipotalamo-hipofiznog portnog sistema. Preko njega se vrši distribucija hipofiziotropnih faktora poreklom iz hipotalamusa do endokrinih žlezda adenohipofize (Alves i sar., 2002; Perez-Castro i sar., 2012). U eminenciji medijani i infundibulumu grane gornje i donje hipofizne arterije formiraju bogatu mrežu sinusoidnih kapilara, označenu kao primarni kapilarni pleksus. U njega dospevaju neurohormoni hipotalamusa oslobođeni iz terminalnih delova neurosekretne vlakana hipotalamo-infundibularnog trakta. Od primarnog kapilarnog spleta spuštaju se preko prednje strane infundibuluma duge portne vene do distalnog dela adenohipofize, gde njihovim grananjem nastaje sekundarni kapilarni pleksus. Preko njega neurohormoni hipotalamusa difunduju iz krvi ka žlezdanim ćelijama adenohipofize čiju aktivnost kontrolišu. Hormoni adenohipofize difunduju u krvotok preko hipofiznih vena i dalje do subhipofiznog, kavernoznog i gornjeg cirkularnog sinusa. Slabije razvijen kapilarni pleksus grane gornje i donje hipofizne arterije obrazuju u donjem delu infundibuluma. Od njega polaze kratke portne vene koje završavaju u intermedijarnom delu adenohipofize, na granici između prednjeg i zadnjeg režnja. Prema tome, adenohipofizu krvlju pretežno snabdevaju vene, dok neurohipofizu predominantno arterije (Mills, 2007; Young i sar., 2007; Eroschenko, 2008; Standring, 2008; Anđelković, 2009).

### **Inervacija hipofize**

Živci koji inervišu prednji režanj hipofize predstavljaju postganglijska vlakna autonomnog nervnog sistema sa vazomotornom funkcijom. Nervna vlakna koja dospevaju do infundibuluma i zadnjeg režnja potiču iz hipotalamičkih jedara i predstavljaju komponentu zadnjeg režnja hipofize (Ross i sar., 2003).

### **Nadbubrežna žlezda**

Nadbubrežna žlezda (*glandula suprarenalis*) je parna žlezda sa unutrašnjom sekrecijom, lokalizovana između superomedijalnog dela bubrega i istostranog stuba prečage. In vivo je žućkaste boje. Obavijena je bubrežnom fascijom, kojom je pričvršćena za odgovarajući mišićno-tetivni stub dijafragme. Renalna fascija daje tanak septum koji nadbubrežnu žlezdu razdvaja od gornjeg pola odgovarajućeg bubrega. Oblik i odnosi desne i leve nadbubrežne žlezde razlikuju se međusobno. Tako, desna nadbubrežna žlezda se karakteriše piramidalnim oblikom, superiornijim položajem u odnosu na istostrani bubreg, dok je leva nadbubrežna



žlezda polumesečastog oblika i nalazi se medijalno u odnosu na gornji deo levog bubrega. Desna nadbubrežna žlezda se nalazi anterolateralno u odnosu na desni mišićno-tetivni stub dijafragme i odnosi se sa jetrom anterolateralno, a anteromedijalno sa donjom šupljom venom. Leva nadbubrežna žlezda se napred odnosi sa želucem, slezinom, gušteračom, a pozadi sa levim mišićno-tetivnim stubom dijafragme. Na prednjoj strani obe nadbubrežne žlezde uočava se hilus preko koga iz žlezde izlaze vena i limfni sudovi, dok arterije i nervi ulaze u žlezdu preko više različitih mesta (Moore i sar., 2010).

## **Grada nadbubrežne žlezde**

Na preseku nadbubrežne žlezde fiksirane u formalinu uočavaju se periferna žuto prebojena zona, zatim braon prebojena zona ispod nje i na kraju sivo prebojena zona u unutrašnjosti žlezde. Histološki, na površini nadbubrežne žlezde se uočava vezivno – tkivna kapsula varijabilne debljine, sačinjena od kolagenih i elastičnih vlakana. Kroz nju prolaze krvni sudovi i živci koji učestvuju u vaskularizaciji i inervaciji žlezde. Ispod kapsule se nalazi parenhim koji je sistematizovan u periferni deo označen kao kora (*cortex*) i središnji deo koji predstavlja srž nadbubrežne žlezde (*medulla*) (Mills, 2007; Standring, 2008).

### ***Kora nadbubrežne žlezde***

Kora nadbubrežne žlezde (*cortex*) je tradicionalno sistematizovana u tri zone: zona glomeruloza (*zona glomerulosa*) koja produkuje aldosteron (mineralokortikoide), zona fascikulata (*zona fasciculata*) koja produkuje kortizol (glikokortikoide) i zona retikularis (*zona reticularis*) u kojoj se proizvode polni hormoni. Tokom adultnog perioda, dotrajale ćelije kore se zamenjuju novim. Mesto produkcije novih ćelija kore nadbubrega predstavlja zona fascikulata. Tako stvorene ćelije kore mogu dalje da se diferenciraju u ćelije zone glomeruloze ili zone retikularis (Mills, 2007).

Zona glomeruloza predstavlja najperiferniji deo kore, lokalizovan neposredno ispod kapsule. Njena debljina varira kod različitih individua. Kod pojedinih slučajeva, ona se uočava u vidu jasno diferenciranog kontinuiranog perifernog pojasa, dok se kod drugih ona uočava u vidu diskontinuiranog subkapsularnog sloja kore. Kod slučajeva sa diskontinuiranom ovom zonom kore nadbubrežne žlezde, na mestima gde ona nedostaje, subkapsularno se nalazi sledeći sloj kore, tj. zona fascikulata. Ćelije zone glomeruloze poseduju jasne konture i grupisane su u klastere koje okružuje oskudna fibrovaskularna stroma. One mogu biti još raspoređene i tako da formiraju trabekularne formacije sačinjene od jednog reda ćelija, para-

lelne sa kapsulom nadbubrežne žlezde. Citoplazma im je najčešće acidofilna, dok su im jedra okrugla, nešto manja i tamnije prebojena u odnosu na jedra ostalih slojeva kore. Neretko jedra mogu biti elongirana, sa prisutnim longitudinalnim žlebom. Nukleo – citoplazmatski odnos ćelija ove zone je visok (Rosol i sar., 2001; Mills, 2007). Ultrastrukturalno, citoplazma ćelija zone glomeruloze se karakteriše prisustvom okruglih, ovalnih ili elongiranih mitohondrija, čija unutrašnja membrana svojim naborima daje lamelarne kriste koje imaju lestvičast raspored, slično kao i u drugim tkivima. Pored mitohondrija, u citoplazmi se uočava i dobro razvijen Goldži kompleks (Rosol i sar., 2001).

Zona fascikulata čini više od polovine ukupne debljine kore nadbubrega i nalazi se između zone glomeruloze, koja se nalazi površnije i zone retikularis, koja se nalazi između nje i srži nadbubrežne žlezde. Ćelije ovog dela kore su raspoređene u gredice, sačinjene iz dva reda ćelija i pružaju se perpendikularno u odnosu na kapsulu. Susedne celularne gredice u ovoj zoni su međusobno razdvojene kapilarima. Ćelije su krupne, sa jasno definisanom ćelijskom membranom, svetlom citoplazmom i centralno postavljenim jedrom. Jedro ovih ćelija je svetlije prebojeno u odnosu na jedra ćelija zone glomeruloze i karakteriše se periferno lokalizovanim grudvicama hromatina i centralno postavljenim nukleolusom. Citoplazma, naročito ćelija spoljašnje dve trećine zone fascikulate, sadrži veliku količinu lipida (holesterol, masne kiseline i neutralne masti) koji se tokom histološke obrade tkiva ispiraju, zbog čega ćelije na histološkim preparatima poprimaju sunderast izgled i svetlije su u odnosu na ćelije preostale dve zone kore. Bogat sadržaj lipida uzrokuje žutu prebojenost ove zone na makroskopskim presecima nadbubrežne žlezde (Rosol i sar., 2001; Mills, 2007). Ultrastrukturalno, ćelije zone fascikulate sadrže brojne lipidne kapljice u citoplazmi. Dodatno, karakteriše ih prisustvo sferičnih mitohondrija sa vezikularnim kristama i dobro razvijen glatki endoplazmatski retikulum (Rosol i sar., 2001).

Zona retikularis se nalazi dublje u odnosu na zonu fascikulatu. Sačinjena je od ćelija koje su nešto manje u odnosu na fascikulatnu zonu, sa kompaktnom, acidofilnom citoplazmom koja sadrži malo lipida. Ćelije su raspoređene tako da grade gredice sačinjene od jednog reda ćelija. Gredice su, za razliku od prethodne zone, u zoni retikularis međusobno izukrštane i grade sunderastu mrežu čija okca ispunjavaju dilatirani kapilari. Citoplazma ćelija dubljih slojeva retikularne zone, neposredno do medule nadbubrežne žlezde, obično sadrži lipofuscine. Prisustvo ovog pigmenta uzrokuje braon prebojenost napred navedene zone kore nadbubrega na makroskopskim presecima nadbubrežne žlezde (Mills, 2007). Ultrastrukturalno, ćelije zone retikularis poseduju osobine ćelija koje produkuju steroidne hormone. Mitohondrije su elongirane, sa tubularnim ili vezikularnim kristama. U citoplazmi su prisutne lipofuscinske

granule, kao i membranom ograničene organele sa umereno kondenzovanim matriksom i prisutnim lipidnim globulama u njihovoj unutrašnjosti. Pored napred navedenog, uočava se prisustvo glikogena, kao i prominentnih lizozoma (Rosol i sar., 2001; Mills, 2007).

### ***Srž nadbubrežne žlezde***

Srž (*medulla*) nadbubrežne žlezde uglavnom luči adrenalin i funkcionalno je tesno povezana sa simpatičkim delom autonomnog nervnog sistema. Pretežno se sastoji iz feohromocita ili hromafinih ćelija. Dodatno u njoj mogu da se uoče ostrvca kortikalnih ćelija, zatim pojedinačne ili klasteri ganglijskih ćelija, nervna vlakna i fibrovaskularna stroma. Hromafine ćelije su raspoređene u vidu klastera ili trabekula koji su okruženi potpornim ćelijama i fibrovaskularnom stromom. One predstavljaju krupne poligonalne ili cilindrične ćelije, sa citoplazmom koja je predominantno bazofilna sa prisutnim vakuolama. Jedra ovih ćelija najčešće su ekscentrično lokalizovana, ispoljavaju pleomorfizam (najčešće su okrugla, ali mogu imati i elipsoidan ili neki drugi oblik), sa periferno lokalizovanim grudvicama hromatina i centralno postavljenim acidofilnim nukleolusom. Ganglijske ćelije srži nadbubrega su krupne i u pojedinim slučajevima u njihovoj citoplazmi mogu da se uoče hijaline inkluzije lamelarne građe. Napred navedene strukture se mogu uočiti u srži i izvan citoplazme ganglijskih ćelija. U tom slučaju one se nalaze u njihovoj neposrednoj okolini i veoma često vrše pritisak na njih. Ultrastrukturalno, u srži se razlikuju dva tipa feohromocita. Prvi tip sadrži u citoplazmi membranozne granule čiji je dijametar u proseku 190  $\mu\text{m}$  i sadrže adrenalin. Drugi tip sadrži krupnije granule, prosečnog promera oko 250  $\mu\text{m}$ , koje su lokalizovane ekscentrično unutar vezikularnih membranoznih struktura. One sadrže noradrenalin (Mills, 2007).

### **Funkcija kore nadbubrežne žlezde**

Kora nadbubrežne žlezde je odgovorna za sintezu steroidnih hormona. Prekursor steroidnih hormona je holesterol. On može da se sintetiše „*de novo*“ u kortikalnim ćelijama iz acetata ili da se resorbuje preko LDL, odnosno ređe HDL lipoproteina. Prvi steroidni hormon koji se sintetiše iz holesterola je pregnolon. On nastaje u mitohondrijama aktivnošću enzima citohroma P – 450. Ova reakcija se nalazi pod kontrolom ACTH sekretovanog od strane adenohipofize i veoma je bitna za ograničavanje količine sintetisanih steroidnih hormona. ACTH se vezuje za receptore koji su povezani sa G-proteinom, što dovodi do porasta citoplazmatskog cAMP-a i sinteze pregnolona. Nakon toga, u mitohondrijama i naročito glatkom endoplazmatskom retikulumu, aktivnošću enzima hidrolaza iz pregnolona se sintetiše kortizol, glavni

glikokortikoid kod čoveka. Kod čoveka, iz pregnolona se u ćelijama zone retikularis sintetisuje androgeni hormoni, koji dalje mogu da se od strane samih kortikalnih ćelija ili u gonadama metabolišu u testosteron kod muškog, odnosno estrogen, kod ženskog pola. Ćelije zone glomeruloze sintetisuje aldosteron. Njegovu produkciju stimulišu angiotenzin II i joni  $K^+$ . Naime, hormon prekursor angiotenzina II, angiotenzinogen, se proizvodi u jetri i pod uticajem renina proizvedenog u jukstaglomerularnom aparatu bubrega se konvertuje u angiotenzin I. Angiotenzin I zatim pod uticajem angiotenzin-konvertujućeg enzima (ACE) daje angiotenzin II. Angiotenzin II zatim stimuliše produkciju aldosterona koji deluje na nivou bubrenih tubula dovodeći do resorpcije vode i jona  $Na^+$ , a ekskrecije jona  $K^+$ . Kortikalne ćelije ne poseduju strukturu u kojima bi se deponovali sintetisani steroidni hormoni. Zbog toga je njihova sinteza neposredno praćena njihovom sekrecijom u krvotok. U krvi oni se vezuju za transportni protein transkortin koji produžava njihov životni vek i povećava rastvorljivost. Slobodni molekuli steroidnih hormona u plazmi se ili vezuju za ciljane ćelije i ostvaruju svoje metaboličke efekte, ili se transformišu u inaktivne metabolite u jetri procesima konjugacije ili hidroksilacije (Rosol i sar., 2001).

### **Vaskularizacija nadbubrežne žlezde**

Arterijska vaskularizacija nadbubrežne žlezde potiče od gornje, srednje i donje nadbubrežne arterije (a. suprarenalis superior, a. suprarenalis media et a. suprarenalis inferior), bočnih grana donje prečazne arterije (a. phrenica inferior), trbušne aorte (aorta abdominalis) i bubrene arterije (a. renalis). Ova tri krvna suda se dele na 50 – 60 manjih grana koje preko prednje i zadnje strane žlezde probijaju kapsulu i daju neposredno ispod nje subkapsularni pleksus. Od ovog pleksusa pružaju se između kolumni ćelija zone fascikulate sinusoidni kapilari koji završavaju u zoni retikularis. U njoj se nalazi sekundarni vaskularni pleksus, koji se drenira u sinusoidne srži nadbubrežne žlezde. Sinusoidi srži nadbubrežne žlezde se preko vena koje u svom zidu imaju dobro razvijen glatko-mišićni sloj dreniraju u centralnu nadbubrežnu venu. Ona izlazi iz nadbubrega preko njegove prednje strane i uliva se u istostranu bubrenu venu na levoj i donju šuplju venu, na desnoj strani. Prema tome, kora nadbubrežne žlezde je vaskularizovana pretežno arterijama, a srž venama (Mills, 2007; Standring, 2008).

### **Inervacija nadbubrežne žlezde**

Kora nadbubrežne žlezde ne poseduje inervaciju, dok je srž inervisana preganglijskim i postganglijskim simpatičkim vlaknima solarnog spleta (*plexus coeliacus*), koja potiču od

velikog splahnjičkog živca (*n. splanchnicus major*), donjih grudnih i lumbalnih splahnjičkih živaca (*nn. splnchnici lumbales*) gornjih slabinskih gangliona simpatičkog stabla (Mills, 2007; Standring, 2008).

## **FUNKCIJA HIPOTALAMO-PITUITARNO-ADRENALNE OSOVINE**

Komponente HPA osovine funkcionišu po principu hijerarhijski integrisanog sistema. Uloga corpus amygdaloideum-a u stresnim i anksioznim situacijama koje prati aktivacija HPA sistema je pouzdano dokazana. On predstavlja deo ekstrahipotalamičnog CRH sistema koji posreduje u bihevioralnoj ekspresiji napred navedenih stanja. Nasuprot paraventricularnom jedru hipotalamusa, glikokortikoidi u njemu pojačavaju ekspresiju CRH po principu pozitivne povratne sprege, što je praćeno posledičnom dezinhicijom HPA osovine (De Kloet i sar., 1998). U tom slučaju, neuroendokrine ćelije paraventricularnog jedra hipotalamusa sekretuju CRH i njegove sekretagoge, arginin-vazopresin i oksitocin. Porast sekrecije CRH i arginin-vazopresina naročito, ispoljavaju sinergistički efekat na kortikotropne ćelije adenohipofize i vode ka njihovoj aktivaciji i posledičnoj sekreciji ACTH. Oslobođeni ACTH putem cirkulacije dospeva do ćelija zone fascikulate kore nadbubrega i stimuliše sekreciju glikokortikoida tj. kortizola, od strane ovih ćelija (Vedder, 2007). Kortizol putem krvi dospeva do svih tkiva i ćelija ljudskog organizma i ostvaruje metaboličke efekte koji mu omogućavaju da se kao celina uspešno adaptira na prisustvo inicijalnog faktora, koji je konačno i doveo do aktivacije čitavog sistema. Deo kortizola dospeva putem cirkulacije do mozga. U njemu on deluje na strukture čije ćelije poseduju mineralokortikoidne (tip I) i glikokortikoidne receptore (tip II). Pored neurosekretornih ćelija paraventricularnog jedra hipotalamusa i kortikotropnih ćelija adenohipofize, ove receptore poseduju i neuroni medijalnog prefrontalnog korteksa i naročito piramidalni neuroni hipokampusa. Mineralokortikoidni receptori poseduju pet puta veći afinitet za vezivanje kortizola u odnosu na isti glikokortikoidnih receptora. Glikokortikoidi vezivanjem za ove receptore napred navedenih struktura inhibišu dalju sintezu CRH, a samim tim ACTH i na kraju kortizola mehanizmom negativne povratne sprege. Prema tome, za razliku od corpus amygdaloideum-a hipokampus deluje inhibitorno na aktivnost HPA osovine. U bazalnom stanju, kada je aktivnost organizma niska (kod čoveka tokom spavanja), kortizol, čiji su nivoi u krvi tada niski, vezuje se predominantno za mineralokortikoidne receptore i takav mod regulacije aktivnosti HPA osovine se označava kao „proaktivni“. Tokom dana, aktivnost organizma u celini, a samim tim i nivoa kortizola u krvi rastu. U tom periodu, aktivnost HPA osovine se reguliše vezivanjem kortizola i za mineralokortikoidne i glikokor-

tikoidne receptore, što se označava kao „reaktivni“ mod (De Kloet i sar., 1998; Turnbull i Rivier, 1999; Keenan i sar., 2001). Aktivacija HPA osovine dovodi do mobilizacije zaliha energije i podešavanja kardiovaskularnog tonusa, što ima za cilj da olakša kognitivnu i fizičku adaptaciju organizma na stres i predstavlja krucijalni momenat za preživljavanje jedinke (Seeman i Robbins, 1994). Mehanizam negativne povratne sprege ima ulogu da po prestanku dejstva inicijalnog stresora vrati nivoe oslobođenih hormona na bazalne vrednosti i održava ih relativno konstantnim (Guyton i Hall, 2008).

## **STARENJE I HIPOTALAMO-PITUITARNO-ADRENALNA OSOVINA**

Starenje predstavlja proces koji je praćen hroničnim izlaganjem različitim oblicima stresa, što je praćeno dugoročnom aktivacijom HPA osovine (Seeman i Robbins, 1994). Tokom njega, i pored očuvanja bazalne endokrino-metaboličke funkcije, ipak dolazi do smanjenja kapaciteta za očuvanje homeostaze u odgovoru na stresore (Cizza i sar., 1994). Starenjem izazvane promene u sekreciji glikokortikoida mogu se uočiti na više nivoa HPA osovine. Centralnu kontrolu aktivnosti HPA osovine obavljaju najvećim delom neuroni PVN-a. Oni pokazuju brojne starenjem izazvane funkcionalne promene koje, na kraju, mogu biti odgovorne za alterisanu glukokortikoidnu sekreciju. Naime, sinteza i sekrecija CRH opadaju, dok je sekrecija ACTH povećana, što prema pojedinim autorima (Herman i sar., 2001) ukazuje na povećanu osetljivost adenohipofize na CRH tokom starenja. Takođe, javlja se hipersenzitivnost adrenalnog korteksa na ACTH kao i nemogućnost brzog prekida sekrecije glikokortikoida stimulisanе dejstvom akutnih stresora. Kao posledica svega napred navedenog, odnosno odgovora na hroničnu stimulaciju, nastaje hipertrofija zone fascikulate i zone retikularis nadbubrežne žlezde (Hauger i sar., 1994).

Cizza i sar. (1994) su kod eksperimentalnih životinja uočili da tokom starenja jutarnji nivoi bazalnog kortikosterona rastu, dok nakon stresa njegova koncentracija u plazmi usporeno pada.

Seeman i Robbins (1994) navode da se kontrola aktivnosti HPA osovine primarno vrši na nivou hipokampusa preko mineralokortikoidnih i glikokortikoidnih receptora koji su prisutni na njegovim nervnim ćelijama. On, kao što je to već napred opisano, ima glavnu inhibitornu ulogu kada je u pitanju aktivnost HPA osovine (Smith i sar., 2005). Međutim, postoje i stavovi da se modifikacija aktivnosti HPA osovine može vršiti i na nivou adenohipofize (Seeman i Robbins, 1994). Prema Turnbull i Rivier-u (1999) citokini kao što su IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  mogu da stimulišu sekreciju ACTH delovanjem kako na same kortikotropne ćelije,

tako i dejstvom na FS ćelije koje pod njihovim uticajem oslobađaju u adenohipofizu produkte svoje parakrine aktivnosti. Efekat tih molekula na kortikotropne ćelije čoveka nije u potpunosti razjašnjen. Ipak, rezultati studija sprovedenih na eksperimentalnim životinjama ukazuju da produkti parakrine aktivnosti FS ćelija predominantno ispoljavaju stimulatorni efekat na kortikotropne ćelije, stimulišu oslobađanje ACTH i na kraju sekreciju kortizola od strane ćelija zone fascikulate kore nadbubrega (Johnson i sar., 1990; Schwartz, 2000; Bilezikjian i sar., 2003; Herkenham, 2005; Gerez i sar., 2007).

Hauger i sar. (1994), Seeman i Robbins (1994) i Goncharova i Lapin (2002) smatraju da sa starenjem dolazi do disregulacije funkcije HPA osovine koja se karakteriše slabljenjem procesa negativne povratne sprege, što na kraju rezultira hroničnim povišenjem nivoa kortizola u krvi zdravih starih individua. Ferrari i sar. (2001) smatraju da je poremećaj negativne povratne sprege u okviru HPA osovine tokom fiziološkog starenja u osnovi posledica poremećaja na nivou hipokampusa. Naime, pojačano prisustvo stresa tokom starenja i posledično dugotrajno povišenje nivoa kortizola u krvi rezultira slabljenjem negativne povratne sprege HPA osovine bilo preko pada broja glikokortikoidnih receptora na hipokampalnim neuronima, ili pada broja hipokampalnih neurona uopšte, što može biti posledica neurotoksičnog efekta povišenih nivoa glikokortikoida u krvi. Sve to ima za posledicu slabljenje inhibitornog efekta glikokortikoida na sekreciju CRF-a, a samim tim i ACTH. Gust i sar. (2000) smatraju da napred navedene promene smanjuju osetljivost HPA osovine, tj. njenu sposobnost da odgovori na stres, što na kraju vodi ka poravnanju cirkadijalnog ritma kortizola (Gust i sar., 2000). Smith i sar. (2005) navode da izmenjeni odgovor na stres tokom starenja može biti posledica ne samo navedenih promena u broju glikokortikoidnih receptora u hipokampusu, već i posledica vaskularnih promena koje rezultiraju smanjenim dotokom glikokortikoida do mozga, kao i oštećenim signalnim transdukcionim putanjama. Promene aktivnosti HPA osovine koje se javljaju tokom starenja, dovode po principu pozitivne povratne sprege do daljih strukturalnih i funkcionalnih oštećenja na nivou hipokampusa (gubitak piramidalnih neurona), kako tokom fiziološkog starenja, tako i tokom Alchajmerove demencije. Zato, korigovanje osetljivosti HPA osovine može biti deo terapije koja će odložiti ili usporiti progresiju starenjem i / ili Alchajmerovom bolešću izazvanog gubitka memorije (Raskind i sar., 1994).

Adekvatna aktivacija HPA osovine kao odgovor na izazov (stres) je bitna, jer hipo- i hiperaktivacija mogu biti štetne. Podjednako je bitna i adekvatna deaktivacija HPA osovine nakon stresa. Produženo izlaganje organizma neuralnim, imunološkim i endokrinim medijatorima stresa može izazvati razne patofiziološke konsekvence (Traustadóttir i sar., 2004; Ferrari i sar., 2001). Smanjenje kapaciteta za kompenzaciju promena u aktivnosti HPA osovi-

ne vodi poremećaju hormonske kontrole glavnih telesnih funkcija i može igrati veoma važnu ulogu u pojavi bolesti izazvanih poremećajem u regulaciji glikokortikoida u relativno ranom životnom dobu. Ove bolesti mogu biti praćene strukturalnim, metaboličkim i kognitivnim oštećenjima (Herman i sar., 2001; Goncharova i Lapin, 2001).

Povišeno prisustvo stresora tokom starenja je prema Bruunsgaard-u i sar. (2001) praćeno prisustvom hroničnog inflamatornog procesa niskog intenziteta i povišenim nivoima proinflatornih molekula kao što su TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1Ra, sTNFR, proteina akutne faze kao što su CRP i serum amiloid A, pa i porastom broja neutrofila u krvi zdravih starih individua. Kao što je napred navedeno, mnogi od ovih citokina ostvaruju svoj uticaj na funkciju HPA osovine tako što dovode do aktivacije fibroblasta koji u tom pobuđenom stanju i sami predstavljaju izvor citokina (Wolf i sar., 2012), zatim FS ćelija koje tada pojačano luče parakrine faktore i, na kraju, kortikotropnih ćelija adenohipofize. Sve napred navedeno vodi na kraju ka pojačanoj produkciji i i sekreciji ACTH (Turnbull i Rivier, 1999).



# CILJ ISTRAŽIVANJA

---

S obzirom da su se dosadašnja istraživanja starosnih promena HPA osovine pretežno fokusirala na njihov funkcionalni aspekt, cilj našeg istraživanja je bio:

- Da se primenom HE bojenja detektuje prisustvo i distribucija acidofilnih, bazofilnih i hromofobnih ćelija adenohipofize slučajeva različite starosti i pola.
- Da se denzitometrijskom analizom, merenjem prosečne, integralne i medijanske optičke gustine kvantifikuju promene celularnog sastava adenohipofize tokom procesa starenja.
- Da se histohemijskom analizom, primenom Mallory trihromnog bojenja, detektuje prisustvo i distribucija krvnih sudova u adenohipofizi.
- Da se primenom stereološkog metoda, određivanjem zapreminske, površinske i dužinske gustine krvnih sudova kvantifikuju kako njihovo prisustvo, tako i njihova veličina u adenohipofizi tokom procesa starenja.
- Da se histohemijskom analizom, primenom Mallory trihromnog bojenja, detektuje prisustvo i distribucija vezivnog tkiva u adenohipofizi.
- Da se stereološkim metodom, merenjem zapreminske gustine vezivnog tkiva kvantifikuju dinamika njegovog prisustva u adenohipofizi tokom procesa starenja.
- Da se astereološkim metodom, merenjem aree, perimetra i oblikovnog faktora kvantifikuju promene veličine i oblika ćelija adenohipofize kod slučajeva različite starosti i pola.
- Da se imunohistohemijskom analizom, primenom monoklalnog antitela za kolagen tipa IV detektuje prisustvo kolagena tipa IV u adenohipofizi slučajeva različite starosti.
- Da se stereološkom metodom, na presecima bojenim imunohistohemijskim metodom i odgovarajućim monoklalnim antitelom, merenjem zapreminske gustine kolagena tipa IV kvantifikuju dinamika njegovog prisustva u adenohipofizi tokom procesa starenja.
- Da se imunohistohemijskom analizom i primenom monoklalnog antitela za ACTH detektuje prisustvo, morfološke karakteristike i distribucija adrenokortikotropnih ćelija u adenohipofizi tokom procesa starenja.
- Da se stereološkom metodom, na presecima bojenim imunohistohemijskim metodom i odgovarajućim monoklalnim antitelom, merenjem zapreminske gustine ACTH ćelija kod slučajeva različite starosti kvantifikuju dinamika njihovog prisustva tokom procesa starenja.

- Da se imunohistochemijskom analizom, primenom poliklonalnog antitela za S-100 protein detektuje prisustvo, morfološke karakteristike i distribucija folikulostelatnih ćelija adenohipofiza slučajeva različitog pola i starosti.
- Da se stereološkim metodom, na presecima bojenim imunohistochemijskim metodom i odgovarajućim poliklonalnim antitelom, merenjem zapreminske gustine S-100 pozitivnih zona kvantifikuje prisustvo folikulostelatnih ćelija u adenohipofizi tokom procesa starenja.

# MATERIJAL I METODE

---

## MATERIJAL

Kao materijal korišćeno je tkivo hipofize 29 kadavera oba pola (15 muškog i 14 ženskog), starosti od 33 do 95 godina, koje je dobijeno sa autopsija izvedenih na Institutu za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta u Nišu. Tkivo hipofize koje je korišćeno tokom istraživanja poticalo je od kadavera kod kojih je, na osnovu rezultata autopsije utvrđeno da uzrok smrti ne predstavlja oboljenje ili povreda mozga i na osnovu dostupne medicinske dokumentacije i heteroanamnestičkih podataka potvrđeno da za života nije dijagnostikovano oboljenje mozga ili endokrinog sistema, odnosno bilo koji drugi poremećaj sistemskog karaktera. Vremenski period od trenutka smrti do uzimanja uzorka nije bio duži od 12 h.

## METODE

Na kadaveričnom materijalu je metodom disekcije nakon otklanjanja duralne dijafragme (*diaphragma sellae*) i presecanja drške (*infundibulum*) iz turskog sedla (*sella turcica*) uzimana hipofiza. Tkivo hipofize je zatim fiksirano u puferisanom 10% formalinu ne duže od 24h. Nakon toga, u nivou središnjeg dela sa maksimalnom vrednošću njenog dijametra pravljen je horizontalni presek debljine do 5 mm koji je zatim kalupljen u parafinu. Pomoću mikrotoma dobijeni preseki tkiva hipofize debljine do 5  $\mu$ m su dalje obrađivani klasičnim histološkim metodom i bojeni HE i Mallory trihromnim bojenjem. Dodatno, histološki preseki 15 od svih 29 analiziranih slučajeva su bojeni imunohistohemijskom metodom (streptavidin biotin imunoperoksida za kit), monoklonalnim mišjim antitelom za kolagen tipa IV, zatim poliklonalnim zečijim antitelom za S-100 protein i monoklonalnim mišjim antitelom za ACTH u cilju detekcije i kasnije kvantifikacije prisustva napred navedenog tipa kolagena, FS ćelija i kortikotropnih ćelija.

### ***Bojenje monoklonalnim mišjim antitelom za kolagen tipa IV i poliklonalnim zečijim antitelom za S-100 protein***

Tkivni preseki debljine 3  $\mu$ m montirani su na predmetna stakla, a zatim sušeni jedan sat na 60°C u termostatu. Nakon toga vršena je njihova deparafinizacija i hidratacija sukcesivnim provođenjem kroz rastvor ksilola (2×5min) i rastvore etanola sa opadajućim koncentracijama (100% – 2×2min, 96% – 2min i 70% – 2min) sve do destilovane vode. U sledećoj fazi vršeno je

demaskiranje antigena. Kada je u pitanju kolagen tipa IV (Novocastra, UK) demaskiranje je vršeno u mikrotalasnoj pećnici, na visokoj temperaturi i 780W tokom 20 min., u 0,01M citratnom puferu (pH 6). Priprema za primenu antitela za S-100 protein (DAKO, Denmark) je podrazumevala proteolitičku digestiju proteinazom K 10 minuta na sobnoj temperaturi. U daljem postupku vršena je blokada endogene peroksidaze tako što su pripremljeni preseći ispirani destilovanom vodom, inkubirani u 3% rasvoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 minuta na sobnoj temperaturi, zatim je vršeno njihovo ispiranje u destilovanoj vodi 5 minuta i na kraju u 0,1M PBS-u (fosfatni pufer) na pH 7,2.

Inkubacija primarnim, monoklonalnim antitelom na kolagen tipa IV (Mouse monoclonal Collagen IV, Clone PHM-12; 1:100) i poliklonalnim antitelom na S-100 protein (Polyclonal rabbit anti-cow S-100, 1:400) vršena je 30 minuta na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. Potom je vršeno ispiranje preseka u PBS-u 3×3 minuta, zatim njihova inkubacija sa biotiniziranim anti-mišijim, kada je u pitanju kolagen tipa IV i anti-zečijim, kada je u pitanju S100 protein, sekundarnim antitelom, 30 minuta na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori (Novocastra Biotynulated Secondary Antibody, Novocastra Peroxidase Detection System, Novocastra, UK) i na kraju je ponovljeno ispiranje u PBS-u 3×3 minuta. Nakon toga preseći su 30 minuta na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori inkubirani sa streptavidinskim konjugatom na peroksidazu rena (Streptavidin HRP, Novocastra Peroxidase Detection System, Novocastra, UK), a zatim ispirani u PBS-u 3×3 minuta.

Sledeća faza je obuhvatala inkubaciju preseka u rastvoru supstrat-hromogena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 3-amino-9-etil-karbazol u N,N-dimetilformamidu; AEC+ Substrat-Hromogen ili 3,3-diamino benzidin – DAB), 3-5 minuta na sobnoj temperaturi. Ispiranje tako obrađenih preseka je vršeno tekućom vodom, a kontrastno bojenje Mayer-ovim hematoksilinom trajalo je jedan minut, nakon čega su preseći dodatno isprani tekućom vodom. Njihova dalja dehidracija vršena je etanolom rastućih koncentracija (70%, 96% i 100%), nakon čega su potapani u ksilol i pokriveni odgovarajućom sintetskom smolom (dpx) i pokrovnim staklom. Ukoliko je kao hromogen korišćen AEC+, obojeni preseći su bez dehidracije tkiva prepokrivani vodenim medijumom i pokrovnim staklom. Pozitivna reakcija i prisustvo ispitivanih antigena su se manifestovali kao braon ili crveno obojeni precipitati hromogena (u zavisnosti od vrste hromogen supstrata) na mestima njihovog prisustva, za razliku od okolnog tkiva koje je bilo sa negativnom reakcijom i plavo prebojeno. Kao pozitivna kontrola u toku imunohistohemijskog bojenja korišćeni su uzorci tkiva za koje je prethodno potvrđeno da sadrže ispitivane antigene koje je moguće vizuelizovati metodom primenjenom tokom sprovedenog istraživanja. Negativnu kontrolu predstavljali su tkivni uzorci na koje je umesto primarnih antitela aplikovan neimuni serum.

### ***Bojenje monoklonalnim mišjim antitelom za ACTH (klon 02A3)***

Imunohistohemijska analiza ACTH vršena je peroksidaza-antiperoksidaza (PAP) metodom (Sternberger i sar, 1970).

Tkivni preseci debljine 5  $\mu\text{m}$  su najpre inkubirani u 0.3% rastvoru vodonik peroksida u metanolu tokom 15 min. na sobnoj temperaturi u cilju blokiranja aktivnosti endogene peroksidaze, a zatim je vršeno njihovo ispiranje u fosfatnom puferu (PBS) na pH 7,4 5 min. na sobnoj temperaturi. Nakon toga usledila je inkubacija u razblaženom normalnom svinjskom serumu (NOS) 1:10 u PBS-u tokom 45 min. na sobnoj temperaturi kako bi se neutralisao efekat nespecifičnog bojenja pozadine. Tako tretirani tkivni preseci adenohipofize su zatim modifikovanom metodom prema Milošević i sar. (1994) inkubirani u primarnom antipacovskom ACTH antitelu (NIDDK, USA; 1:1000) tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u primarnom antitelu, obavljano je njihovo ispiranje u PBS-u 5 min. i inkubacija u sekundarnom antitelu (svinja-antizec IgG; Dakopatts, Danska; 1:500) 45 min. na sobnoj temperaturi i zatim ponovo ispiranje u PBS – u 5 min. Inkubacija u PAP sistemu (Dakopatts, Danska; 1:100) je vršena tokom 45 min. na sobnoj temperaturi, nakon čega su preseci ponovo ispirani u PBS-u 5 min. Dalje obrada je obuhvatala njihovo inkubiranje u hromogenskom supstratu (DAB; Serva, Germany) rastvorenom u 0.3% vodonik peroksidu u TRIS-HCl puferu (pH 7,4) 5 min. na sobnoj temperaturi. Kontrastno bojenje je obavljeno Mayer-ovim hematoksilinom, naknadna dehidratacija serijom rastvora etanola sa rastućim koncentracijama i na kraju je usledilo montiranje Canada balzomom (Merck–Alkaloid, Alkaloid, Skoplje, BJR Makedonija).

Pozitivna kontrola bojenja ovim antitelom je vršena tako što su preseci tkiva prolazili kroz kompletnu proceduru imunohistohemijskog bojenja osim inkubacije u rastvoru primarnog antitela.

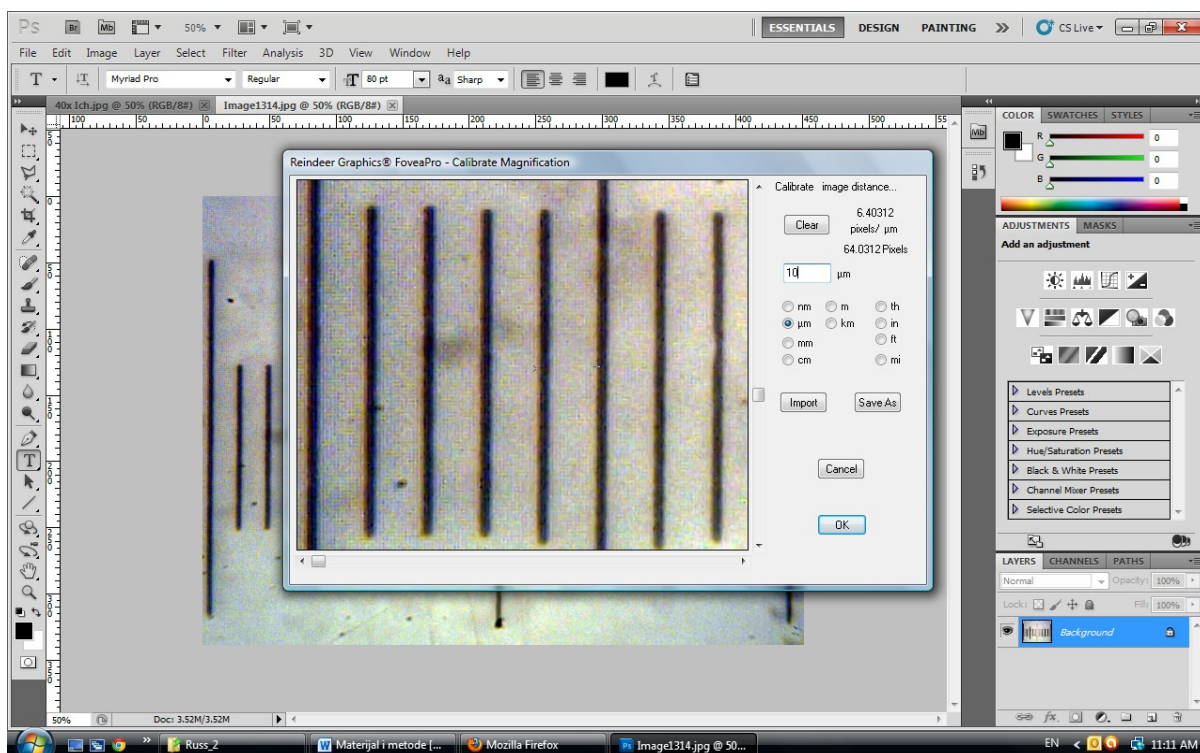
### **Morfološka analiza**

Histološka analiza obojenih preseka vršena je pomoću svetlosnog mikroskopa Olympus CHK2. Ona se je sastojala iz histohemijskog i imunohistohemijskog dela. Tokom histohemijske analize, pod uvećanjima mikroskopa 40 $\times$ , 100 $\times$  i 400 $\times$ , na preparatima bojenim HE metodom analizirani su oblik, veličina, zastupljenost i distribucija acidofila, bazofila i hromofobnih ćelija, dok su na preparatima bojenim Mallory trihromnim bojenjem analizirani prisustvo i distribucija vezivnog tkiva, kao i prisustvo, distribucija i tip krvnih sudova adenohipofize slučajeva različite starosti. Tokom imunohistohemijskog dela morfološke analize, pod uvećanjem 400 $\times$ , na preparatima bojenim monoklonalnim antitelom na kolagen tipa IV, kao i monoklonal-

nim antitelom na ACTH ispitivani su zastupljenost i distribucija kolagena tipa IV i kortikotropnih ćelija adenohipofize tokom procesa starenja. Na preparatima bojenim poliklonalnim antitelom na S-100 protein, pod uvećanjem mikroskopa 1000 $\times$ , ispitivani su zastupljenost i distribucija folikulostelatnih ćelija adenohipofiza analiziranih slučajeva. Preparati su zatim fotografisani digitalnom kamerom pričvršćenom za okular mikroskopa, rezolucije 1.3 megapiksela.

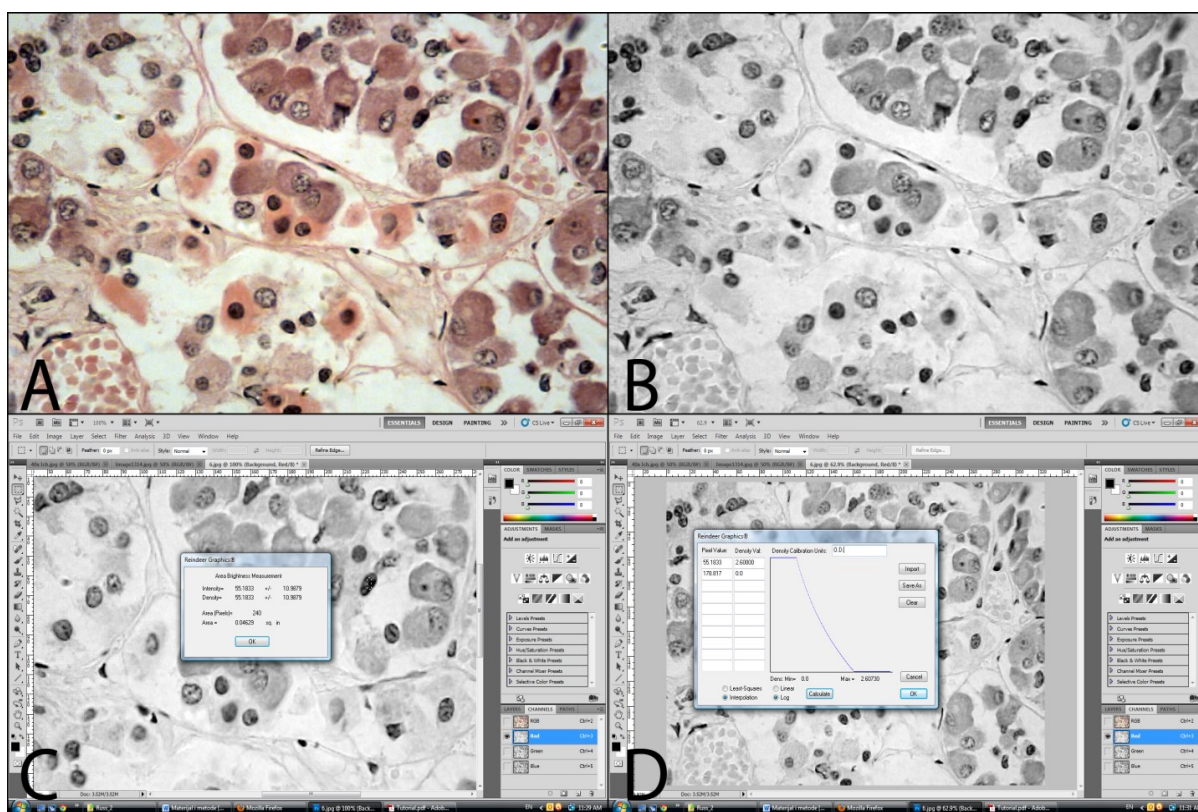
## Morfometrijska analiza

Morfometrijska analiza vršena je pomoću specijalnog alata programa Adobe Photoshop CS5 za analizu i procesiranje digitalne slike Fovea Pro 4.0 (<http://reindeergraphics.com/>). Spacijalna kalibracija sistema je vršena pomoću objektnog mikrometra (1:100). Na digitalnim slikama objektnog mikrometra pod odgovarajućim uvećanjem i pri odgovarajućoj rezoluciji slike preko opcije Filter  $\rightarrow$  IP\*Measure Global  $\rightarrow$  Calibrate Magnification selektovana je distanca od 10  $\mu\text{m}$  na osnovu koje je program izračunavao broj piksela/ $\mu\text{m}$  (Slika 1).



Slika 1. Spacijalna kalibracija softvera pomoću objektnog mikrometra (1:100) pri odgovarajućem uvećanju mikroskopa.

Kalibracija optičke gustine je vršena pomoću crno – belih („grayscale“) fotografija odabranih vidnih polja histoloških preseka bojenih HE metodom. U te svrhe korišćen je kao kanal sa najboljim kontrastom ispitivanih faza crveni kanal 24 bitne RGB kolor fotografije odabranog vidnog polja histološkog preseka (Slika 2A i 2B). U prvom koraku je pomoću pravougaone selekcije selektovana najtamnije prebojena zona datog vidnog polja, nakon čega je opcijom IP\*Measure Global → Brightness meren nivo sive prebojenosti regiona od interesa (Slika 2C). Tako formirana nepromenjena selekcija je zatim premeštana pomoću kursora do najsvetlije prebojene zone preseka, pri čemu bi na isti način kao i u prethodnom koraku bio meren nivo sive prebojenosti i ove zone. U sledećem koraku je preko opcije IP\*Measure Global → Calibrate Density vršena aktivacija dijaloga za kalibraciju optičke gustine u kome su izmerene vrednosti nivoa sivog za najtamniju i najsvetliju zonu crvenog kanala digitalne slike ispitivanog vidnog polja ukucavane u koloni Pixel Value, dok su u koloni Density Val ukucavane odgovarajuće vrednosti optičke gustine, i to 0 za najsvetliju, odnosno 2.6 za najtamniju tačku datog histološkog



**Slika 2.** Kalibracija optičke gustine Fovea Pro 4.0 sistema za analizu i procesiranje digitalne slike; A – 24 bitna RGB kolor fotografija odabranog vidnog polja histološkog preseka bojenog HE metodom; B – Crno bela fotografija („grayscale“) crvenog kanala istog vidnog polja histološkog preseka; C – Proces merenja sive prebojenosti najtamnije zone crvenog kanala datog vidnog polja; D – Logaritamska kalibraciona kriva dobijena procesom interpolacije pomoću vrednosti sive prebojenosti najtamnije i najsvetlije tačke crvenog kanala datog vidnog polja.

preseka (*Slika 2D*), prema uputstvu datom na sajtu ImageJ softvera za analizu i procesiranje digitalne slike (<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/index.html>). Kao krajnji rezultat, procesom interpolacije dobijana je logaritamska kalibraciona kriva. Čitav proces kalibracije je vršen zasebno za svako od ispitivanih vidnih polja.

Kao i morfološka, i morfometrijska analiza je rađena na preparatima bojenim histohe-mijskim i imunohistohe-mijskim bojenjem. Morfometrijska analiza histohe-mijski obrađenih preparata je obuhvatala merenje astereoloških parametara ćelija adenohipofize, kao i stereoloških parametara vezivnog tkiva i uočenih krvnih sudova u adenohipofizi.

## **Morfometrijska analiza histohe-mijski obrađenih preparata**

### ***Morfometrijska analiza ćelija adenohipofize***

Morfometrijska analiza ćelija adenohipofize obuhvatala je analizu veličine i oblika. Na presecima bojenim HE metodom i slikanim pod povećanjem 400×, metodom slučajnog izbora je odabrano 40 vidnih polja adenohipofize po jednom slučaju. Na svakom od analiziranih vidnih polja je istom metodom, pomoću alatke Magnetic lasso selektovano po 10 žlezdanih ćelija, odnosno ukupno 400 ćelija po jednom slučaju. Korišćenjem opcija IP\*Measure features → Measure regions merena je area ( $A_{AH}$ ), perimetar ( $B_{AH}$ ) i oblikovni faktor (OF) odabranih ćelija adenohipofize. Dobijene vrednosti su korišćene za izračunavanje prosečnih vrednosti merenih parametara za svaki analizirani slučaj. Dodatno, svakom od napred navedenih vidnih polja bila je merena prosečna (MOD), zatim integralna (IOD) i medijanska (MdOD) optička gustina u cilju ispitivanja moguće promene celularnog sastava adenohipofiza ispitivanih slučajeva.

### ***Morfometrijska analiza vezivnog tkiva adenohipofize***

Digitalne slike preseka bojenih Mallory trihromnim bojenjem slikane su pod povećanjem 400× i u daljem postupku korišćene za merenje stereoloških parametara vezivnog tkiva i krvnih sudova adenohipofize.

Metodom slučajnog izbora, odabrano je 40 vidnih polja po jednom slučaju. Preko digitalnih slika napred navedenih vidnih polja superponiran je prost linijski mrežni sistem generisan od strane softvera korišćenjem opcija IP\*Lines and points → Line greeds → Square line greed. Broj tačaka testnog sistema je iznosio  $P_t=108$ , površina  $A_t=31950,72 \mu m^2$ , površina koja pripada jednoj tački testnog sistema  $a=295,84 \mu m^2$ , dok je rastojanje između dve tačke testnog sistema iznosilo  $d=17,20 \mu m$ . Pomoću alatke Count Tool Adobe Photoshop CS5

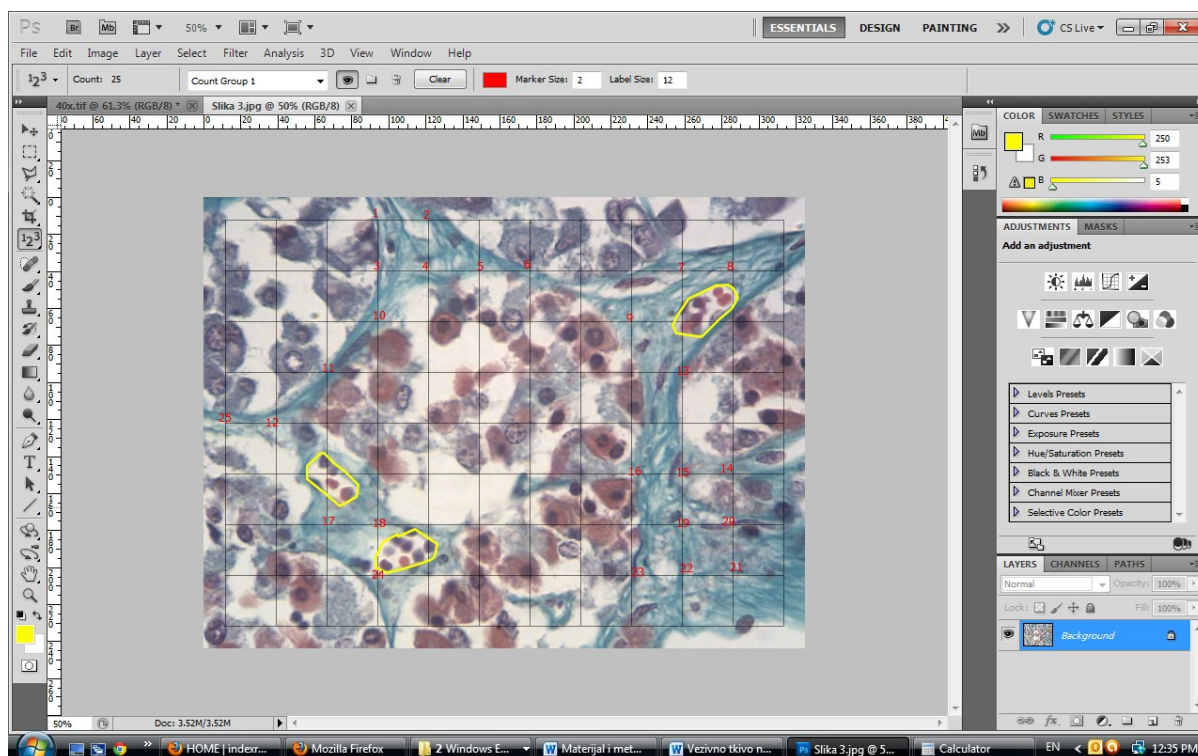


Analyze menija brojane su tačke koje su pogađale zeleno prebojene zone sa prisutnim vezivnim tkivom (*Slika 3*). Tačke koje su pogađale vezivno tkivo adenohipofize, a nalazile su se na preseku horizontalnih linija i desne i vertikalnih linija i donje ivice testnog sistema nisu uzimane u obzir prilikom merenja. Zapreminska gustina vezivnog tkiva ( $V_{VT}$ ) je izračunavana kao količnik broja tačaka koje su pogađale vezivno tkivo ( $P_{VT}$ ) na datom vidnom polju i ukupnog broja tačaka testnog sistema ( $P_T$ ) ( $V_{VT} = P_{VT} / P_T$ ) (Kališnik, 1985; Russ, 2004). Iz dobijenih vrednosti zapreminske gustine svih analiziranih vidnih polja izračunavana je prosečna vrednost zapreminske gustine svakog slučaja koja je izražavana u procentima.

### ***Morfometrijska analiza krvnih sudova adenohipofize***

Digitalne slike 40 vidnih polja svakog od ispitanih slučajeva korišćene za kvantifikaciju kolagena tipa IV korišćene su istovremeno i za analizu krvnih sudova adenohipofize tokom procesa starenja. Na svakom od analiziranih vidnih polja alatom Polygonal Lasso selektovani su svi krvni sudovi čiji su se profili, čitavom svojom areom, nalazili unutar testne površine (*Slika 3*). Korišćenjem opcije programa IP\*Measure features → Measure regions mereni su area i perimetar selektovanih krvnih sudova, da bi zatim pomoću metoda Manoonkitiwongsa i sar. (2001) izračunavana zapreminska ( $V_{VKS}$ ), površinska ( $S_{VKS}$ ) i dužinska gustina ( $L_{VKS}$ ) uočenih krvnih sudova adenohipofize slučajeva različite starosti.

Zapreminska gustina krvnih sudova svakog ispitanog slučaja je, prema napred navedenom metodu (Manoonkitiwongsa i sar., 2001), dobijana kao količnik ukupne aree svih krvnih sudova ( $\sum A_{KS}$ ) uočenih na 40 analiziranih vidnih polja i ukupne testne površine ( $\sum A_T$ ) napred navedenih vidnih polja ( $V_{VKS} = \sum A_{KS} / \sum A_T$ , gde  $A_{KS}$  predstavlja areu uočenih krvnih sudova). Površinska gustina je dobijana pomoću sledeće formule:  $S_{VKS} = (4/\pi) \times (\sum B_{KS} / \sum A_T)$ , pri čemu  $\sum B_{KS}$  predstavlja ukupan perimetar svih uočenih krvnih sudova na 40 analiziranih vidnih polja jednog slučaja, a  $\sum A_T$  predstavlja ukupnu testnu površinu napred navedenih vidnih polja. Konačno, dužinska gustina krvnih sudova adenohipofiza ispitanih slučajeva je izračunavana prema formuli:  $L_{VKS} = 2 \times N_{AKS}$ , gde  $N_{AKS}$  predstavlja broj uočenih krvnih sudova po jedinici površine testnog sistema i izračunava se prema formuli  $N_{AKS} = \sum N_{KS} / \sum A_T$  ( $\sum N_{KS}$  predstavlja ukupan broj uočenih krvnih sudova na svih 40 analiziranih vidnih polja jednog slučaja,  $\sum A_T$  predstavlja ukupnu testnu površinu napred navedenih vidnih polja).

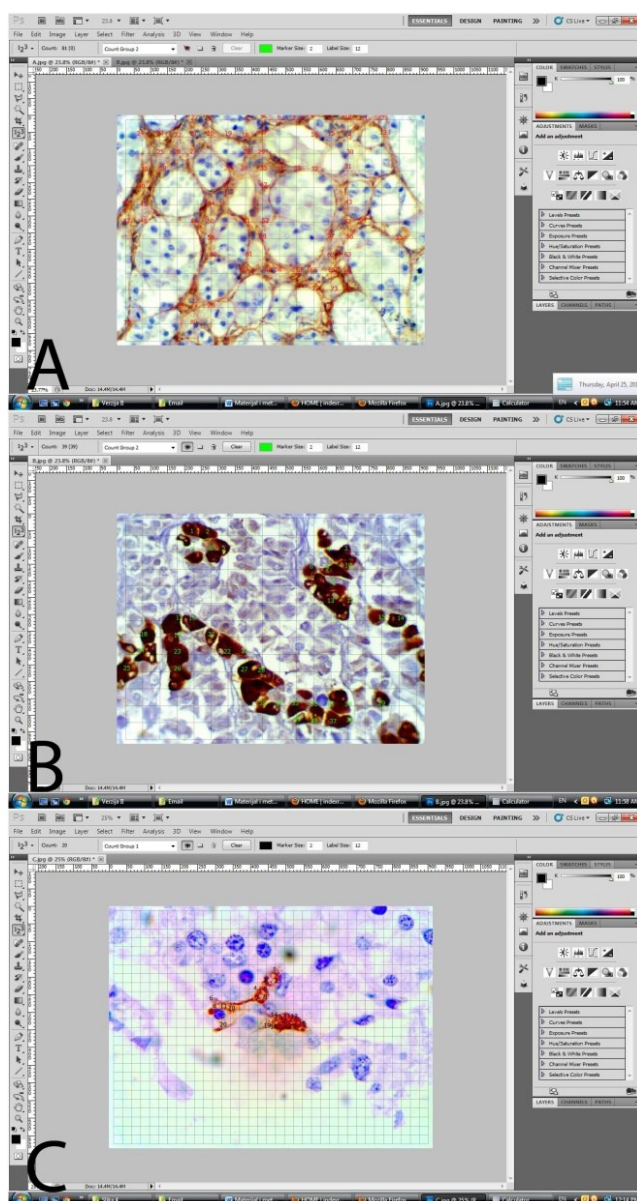


Slika 3. Kvantifikacija vezivnog tkiva i krvnih sudova adenohipofize kod analiziranih slučajeva.

### Morfometrijska analiza imunohistohemijski obrađenih preparata

Morfometrijska analiza imunohistohemijski obrađenih preparata je obuhvatala kvantifikaciju ekspresije kolagena tipa IV, ACTH i S-100 proteina, kod 15 od 29 ukupno analiziranih slučajeva, merenjem zapreminske gustine imunopozitivnih zona na digitalnim fotografijama histoloških preseka. U slučaju kolagena tipa IV i ACTH analizirano je 40 vidnih polja kod svakog od 15 ukupno analiziranih slučajeva, slikanih pod povećanjem 400× svetlosnog mikroskopa. Preko digitalne fotografije svakog vidnog polja postavljan je, napred opisanim metodom, korišćenjem opcija IP\*Lines and points → Line greeds → Square line greed softvera, prost linijski mrežni testni sistem sa sledećim karakteristikama:  $P_T = 252$ ,  $A_T = 209018,88 \mu\text{m}^2$ ,  $a = 829,44 \mu\text{m}^2$ ,  $d = 28,8 \mu\text{m}$ . Tokom procesa kvantifikacije brojane su one tačke testnog sistema koje su pogadale braon prebojene imunopozitivne zone analiziranih vidnih polja. Sam proces kvantifikacije nije obuhvatao one tačke testnog sistema koje su se nalazile na preseku horizontalnih linija i desne i vertikalnih linija i donje ivice testnog sistema (Slika 4A i B). Zapreminska gustina kolagena tipa IV ( $V_{V\text{Col IV}}$ ) i ACTH pozitivnih ćelija adenohipofize ( $V_{V\text{ACTH}}$ ) je dobijana kao količnik broja tačaka koje su pogadale imunopozitivne zone i ukupnog broja tačaka testnog sistema ( $V_{V\text{Col IV}} = P_{\text{Col IV}} / P_T$ ;  $V_{V\text{ACTH}} = P_{\text{ACTH}} / P_T$ ) za svako vidno polje zasebno. Zapreminska gustina jednog slučaja je dobijana kao prosečna vrednost zapreminskih gustina svih 40 analiziranih vidnih polja tog slučaja. Zapreminska gustina foli-

kulostelatnih ćelija ( $V_{VFSC}$ ) je merena korišćenjem istog metoda, na digitalnim fotografijama 40 vidnih polja svakog od 15 ukupno analiziranih slučajeva, slikanih pod uvećanjem  $1000\times$  svetlosnog mikroskopa. Preko digitalnih fotografija napred navedenih vidnih polja postavljan je prost linijski mrežni testni sistem generisan od strane programa sa sledećim karakteristikama:  $P_T = 972$ ,  $A_T = 6016,68 \mu m^2$ ,  $a = 38.32 \mu m^2$ ,  $d = 6,19 \mu m$ . Zapreminska gustina folikulostelatnih ćelija svakog ispitanog slučaja je izračunavana po istom principu kao i zapreminska gustina kolagena tipa IV i ACTH ćelija adenohipofize (Slika 4C).



**Slika 4.** A – kvantifikacija kolagena tipa IV;  
B – kvantifikacija ACTH pozitivnih ćelija;  
C – kvantifikacija folikulostelatnih ćelija.

## **Statistička analiza**

Dobijene vrednosti morfometrijskih parametara su statistički analizirane pomoću statističkog paketa NCSS – PASS 2007. Najpre je primenjena analiza glavnih komponenti kojom je izvršena klasifikacija ispitivanih morfometrijskih parametara u faktore. Dobijeni faktori su kasnije korišćeni kao parametri za klasifikaciju analiziranih slučajeva u starosne grupe primenom cluster analize (metoda k-proseka). Značajnost razlika prosečnih vrednosti morfometrijskih parametara dobijenih starosnih grupa je ispitivana pomoću One Way ANOVA testa. Naknadne razlike između ispitivanih grupa međusobno su ispitivane pomoću Tukey – Kramer – ovog i Games – Howell – ovog post hoc testa. Značajnost razlika između slučajeva suprotnog pola je ispitivana pomoću t-testa nezavisnih uzoraka. Veza između dobijenih vrednosti morfometrijskih parametara adenohipofize i starosti ispitivanih slučajeva je ispitivana pomoću Pearson-ovog koeficijenta linearne korelacije i primenom linearne regresione analize.

Rezultati morfometrijske i statističke analize su prikazani tabelarno i grafički pomoću programa MS Excel.

# REZULTATI

---

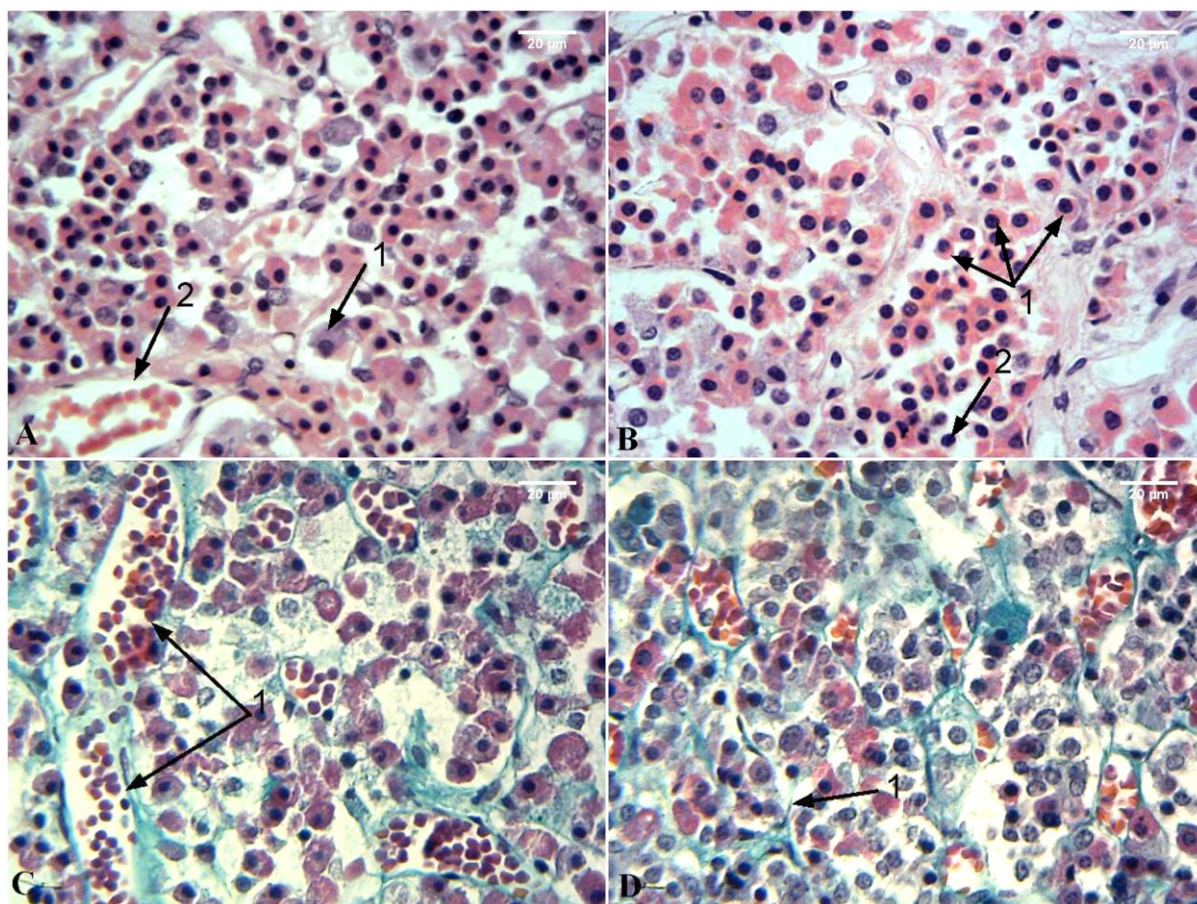
## MORFOLOŠKA ANALIZA

Morfološka analiza se sastojala iz histološke analize preseka tkiva adenohipofize bojениh histochemijskim metodama: HE metodom i trihromnom Mallory metodom i histološke analize preseka tkiva adenohipofize bojениh imunohistochemijskim metodama: poliklonalnim antitelom na S-100 protein i monoklonalnim antitelima na kolagen tipa IV i na ACTH.

### Morfološka analiza histochemijski obrađenih preparata

Na histološkim preparatima humane adenohipofize mlađih slučajeva bojениh HE bojenjem (*Slike 5A i 5B*), u pars distalis-u uočene su brojne hromofilne ćelije grupisane u vidu traka ili acinusa. Acidofilne ćelije su bile zastupljenije kod većine slučajeva i karakterisale su se ravnomerno ružičasto do svetlocrveno prebojenom citoplazmom i centralno postavljenim, okruglim, tamnoplavo prebojenim euhromatičnim jedrom. Ove ćelije su se karakterisale uniformnim izgledom i bile su približno slične veličine i oblika koji se kretao od okruglog do poligonalnog sa zaobljenim uglovima. Bazofilne ćelije su bile u nešto manjoj meri zastupljene i karakterisale su se ljubičastoplavo prebojenom citoplazmom, neznatno obilnijom u odnosu na acidofilne ćelije. U citoplazmi su se mestimično uočavale okrugle vakuole koje su potiskivale umereno plavo do tamnoplavo prebojeno jedro ka suprotnom polu ćelije. Jedro bazofilnih ćelija je u većini slučajeva bilo euhromatično, a kod manjeg broja ćelija je ono bilo heterohromatično. Distribucija acidofilnih i bazofilnih ćelija u pars distalis-u nije bila homogena i karakterisala se prisustvom brojnijih bazofilnih ćelija u srednjem delu žlezde, neposredno ispred tkiva zadnjeg režnja (*pars intermedia*), dok su acidofilne ćelije dominirale svojim prisustvom u njenim lateralnim delovima. Između hromofilnih ćelija uočavale su se retke hromofobne ćelije nejasno razgraničene od okolnih struktura adenohipofize, sa slabo uočljivom, bledoplavo prebojenom citoplazmom i krupnim, okruglim i tamnoplavo prebojenim euhromatičnim jedrom. Acinuse žlezdanih ćelija okružavali su svetlocrveno prebojeni snopovi vezivnog tkiva, koji su se teško razlikovali od slično prebojenih okolnih struktura. Između tankih vezivno-tkivnih snopova uočavali su se dominantno sinusoidni kapilari koji su se u najvećem broju slučajeva karakterisali prisustvom širokih lumena, nepravilnošću

oblika i tankim zidovima. Unutar lumena uočavali se se svetlocrveno prebojeni, okrugli eritrociti i mestimično tamnoplavo prebojena, heterohromatična jedra leukocita.



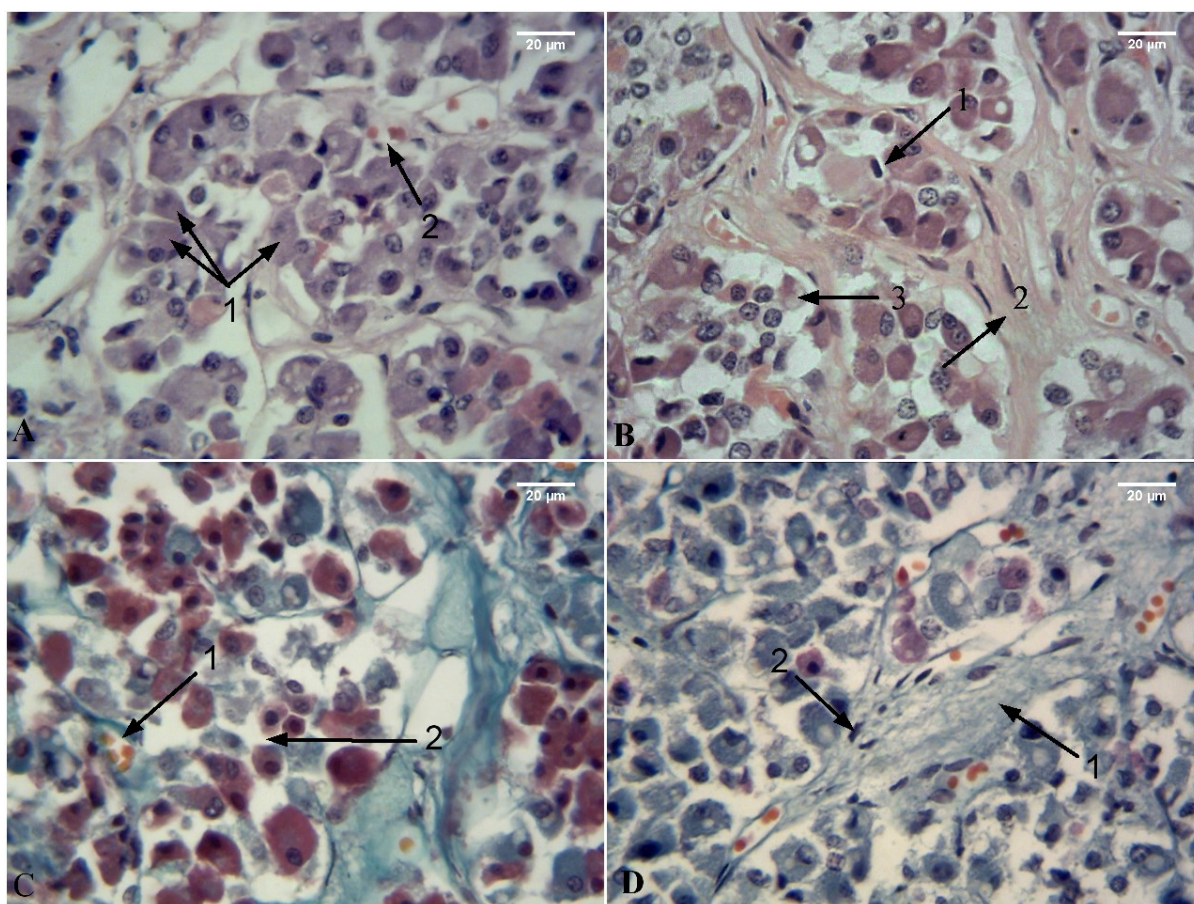
**Slika 5.** (A) 1. Bazofilna ćelija poligonalnog oblika, 2. Krvni sud širokog lumena ispunjen eritrocitima, *slučaj muškog pola starosti 35 godina*, HE bojenje; uvećanje 400×; (B) 1. Sitne acidofilne ćelije okruglog oblika, 2. Hromofobna ćelija, *slučaj muškog pola starosti 45 godina*, HE bojenje; uvećanje 400×; (C) 1. Krvni sudovi širokog lumena ispunjeni eritrocitima, *slučaj muškog pola starosti 35 godina*, Mallory trihromno bojenje; uvećanje 400×; (D) Tanki vezivno- tkivna pregrada, *slučaj muškog pola starosti 44 godine*, Mallory trihromno bojenje; uvećanje 400×.

Na histološkim preparatima mlađih slučajeva bojenim Mallory trihromnim bojenjem, (Slike 5C i 5D), acidofilne ćelije su se karakterisale tamnocrveno prebojenom citoplazmom i tamnoplavo prebojenim euhromatičnim jedrom. Bazofilne ćelije su se karakterisale tamnoplavo prebojenošću citoplazme i tamnoplavo prebojenim, manje ili više ekscentrično postavljenim jedrom i, u pojedinim slučajevima, prisustvom vakuola u citoplazmi. Žlezdane ćelije su grupisane u acinuse između kojih su uočavane nežne zelenkastoplavo prebojene vezivno- tkivne pregrade. Unutar vezivno- tkivnih septi, pored vezivno- tkivnih vlakana i retkih vretenastih tamnoplavo prebojenih euhromatičnih jedara fibroblasta uočavana je mreža sinuso-

idnih kapilara sa tankim zidovima, širokim lumenom ispunjenim narandžasto prebojenim eritrocitima i ponekim tamnoplavo prebojenim jedrom leukocita. Oko sinusoidnih kapilara uočavan je uzan perikapilarni prostor. Između žlezdanih ćelija su, kao i na preparatima bojenim HE bojenjem, uočavana tamnoplavo prebojena, euhromatična jedra hromofobnih ćelija sa bledom, oskudnom citoplazmom oko njih. Na preparatima bojenim trihromnim bojenjem, distribucija acidofilnih i bazofilnih ćelija se nije razlikovala od iste uočene na preparatima bojenim HE bojenjem, sa predominantnim prisustvom bazofila u srednjem i acidofila u lateralnim delovima žlezde.

Prednji režanj hipofize starijih slučajeva se na preparatima bojenim HE metodom karakterisao izrazitim prisustvom bazofilnih ćelija, kako u njenom središnjem, tako i u njenim lateralnim delovima. U njihovoj citoplazmi su znatno češće uočavane krupne vakuole, čije je prisustvo uslovljavalo ekscentričan položaj nešto manjeg i sa slabije izraženom euhromazijom jedra u odnosu na ista mlađih slučajeva. Acidofilne ćelije, koje su i kod ovih slučajeva dominirale u odnosu na ostale strukture adenohipofize su bile krupnije i nepravilnijeg oblika u odnosu na iste mlađih slučajeva. Porast njihove veličine je uglavnom bio posledica porasta veličine njihove citoplazme u odnosu na centralno, ili blago ekscentrično postavljeno, tamnoplavo prebojeno euhromatično jedro. Kao i kod bazofila, euhromazija jedara acidofila je bila slabije izražena u odnosu na ista mlađih slučajeva. Okrugla, tamnoplavo prebojena euhromatična jedra hromofobnih ćelija, okružena bledom i slabo ograničenom citoplazmom su uočavana u većoj meri naročito u središnjem delu žlezde sa dominacijom bazofilnih ćelija (*Slike 6A i 6B*).

Na preparatima adenohipofize starijih slučajeva bojenim Mallory trihromnim bojenjem pored napred navedenih promena u morfologiji i distribuciji žlezdanih ćelija, zapaženo je izrazito prisustvo intesticijalne i perivaskularne fibroze. Parenhim žlezde se karakterisao delimičnom narušenošću acinusne arhitekture sa izrazito zadebljalim vezivno-tkivnim septama unutar kojih su uočavana brojna i zadebljala vezivno-tkivna vlakna, kao i brojnija, vretenasta, sa varijabilnim stepenom euhromazije, tamnoplavo prebojena jedra fibroblasta, u odnosu na ista mlađih slučajeva. Unutar zadebljelih vezivno-tkivnih pregrada adenohipofiza ovih slučajeva su se uočavali krvni sudovi manjeg kalibra, pravilnijeg okruglastog oblika i zadebljelih zidova u odnosu na krvne sudove adenohipofize mlađih slučajeva (*Slike 6C i 6D*).



**Slika 6.** (A) 1. Krupne bazofilne ćelije različitih oblika, 2. Krvni sud malog lumena, *slučaj ženskog pola starosti 73 godine*, HE bojenje; uvećanje 400×; (B) 1. Žlezdani acinus, 2. Vezivno tkivo, 3. Vakuole u citoplazmi, *slučaj muškog pola starosti 80 godina*; HE bojenje; uvećanje 400×; (C) 1. Krvni sud malog lumena, 2. Žlezdani acinus nejasno ograničen, *slučaj muškog pola starosti 89 godina*, Mallory trihromno bojenje; uvećanje 400×. (D) 1. Debla vezivno-tkivna pregrada, 2. Jedro fibroblasta, *slučaj ženskog pola starosti 95 godina*; Mallory trihromno bojenje; uvećanje 400×.

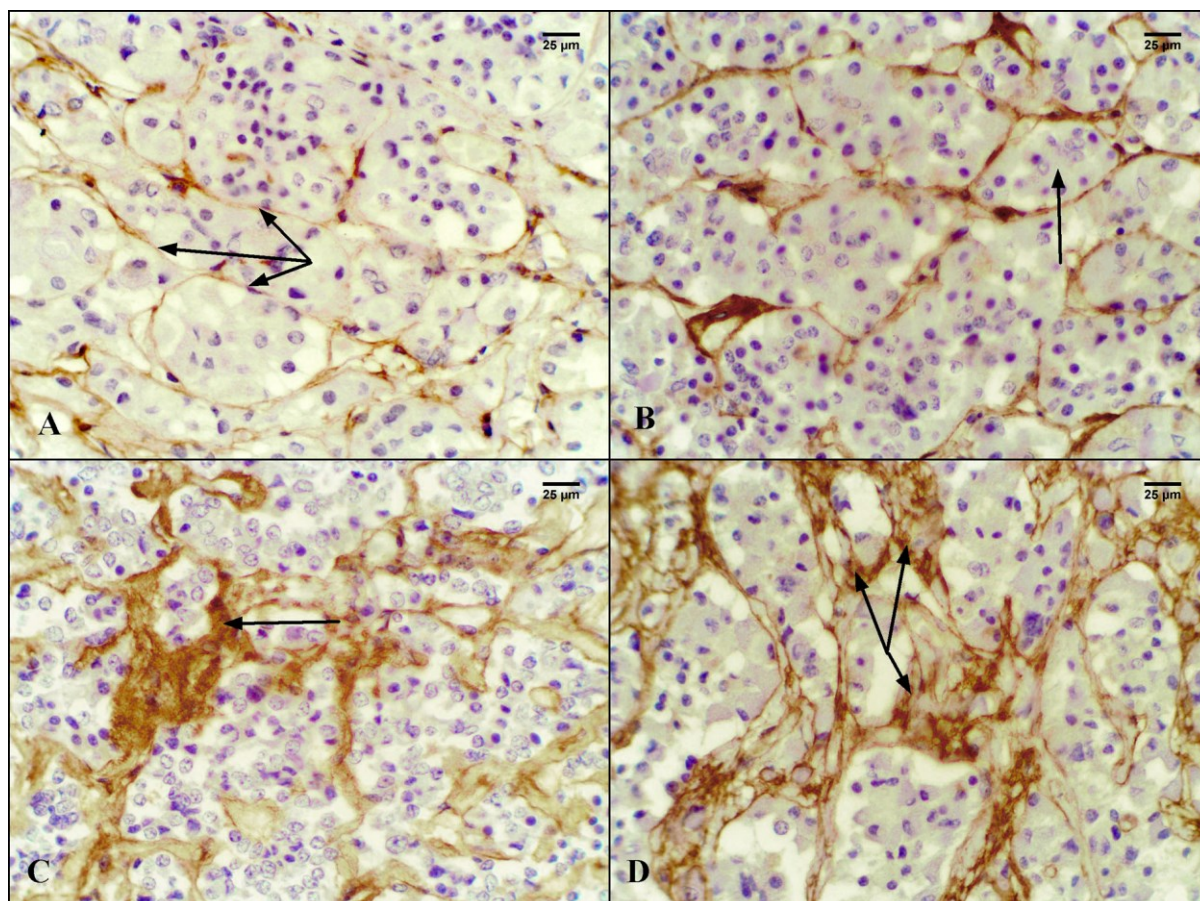
## Morfološka analiza imunohistohemijski obrađenih preparata

Imunohistohemijska analiza je podrazumevala ispitivanje prisustva morfološkog tipa imunoreaktivnosti tkiva adenohipofize na monoklonalna antitela za kolagen tipa IV i ACTH, kao i na poliklonalno antitelo za S-100 protein u cilju detekcije kolagena tipa IV, kortikotropnih i folikulostelatnih ćelija kod slučajeva različitog pola i starosti.



**Kolagen tipa IV**

Braon prebojeni snopovi vlakana kolagena tipa IV su uočavani predominantno kao sastavni strukturni element intersticijskog vezivnog tkiva adenohipofize, u kojoj su oni učestvovali u formiranju iregularne dvodimenzionalne mreže unutar koje su bili smešteni acinusi endokrinih ćelija. Dodatno, njegovo prisustvo je zapaženo i unutar zidova krvnih sudova kao deo njihovih bazalnih membrana (*Slike 7A, 7B, 7C, 7D*).



**Slika 7.** (A) Vlakna kolagena tipa IV, formacija oblika mreže, *slučaj ženskog pola starosti 46 godina*; (B) Žlezdani acinus, *slučaj ženskog pola starosti 56 godina*; (C) Zadebljala vlakna kolagena tipa IV, *slučaj ženskog pola starosti 80 godina*; (D) Široka polimerna mreža kolagena tipa IV, *slučaj muškog pola starosti 80 godina*. Bojenje antitelima na kolagen tipa IV; uvećanje 400×.

Kod mlađih slučajeva, ova mreža se sastojala iz tankih i ređih kolagenih vlakana, koja su u pojedinim delovima parenhima pars distalis-a bila potpuno odsutna, što je granicu između pojedinih acinusa činilo slabije uočljivom ili potpuno odustnom. Krvni sudovi tipa sinusoida koji su se nalazili između žlezdanih acinusa, karakterisali su se širokim lumenom nepravilnog oblika, tankim zidovima unutar kojih su, kao sastavni deo njihovih bazalnih membrana, uoč-

vani slabo izraženi snopovi vlakana kolagena tipa IV koji su bili povezani sa znatno brojnijim vlaknima vezivno-tkivnih septi (*Slike 7A i 7B*).

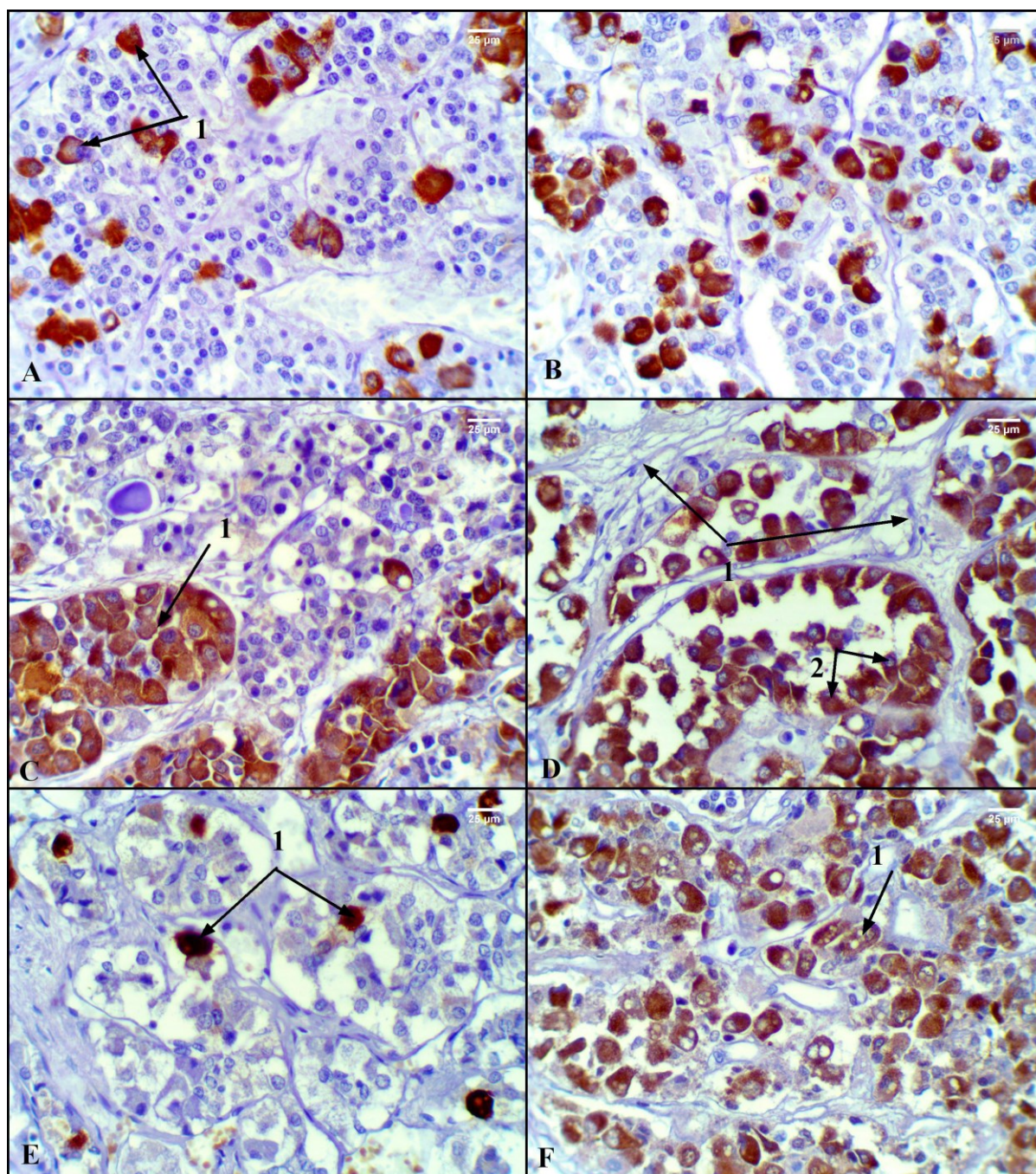
Sa starenjem, uočeno je prisustvo perivaskularne fibroze koja je bila najizraženija u hilusu intermedijarnog dela parenhima, dok je u ostalim delovima adenohipofize ona bila slabije izražena. U intersticijumu je uočena znatno gušća mreža nepravilnog oblika sačinjena od međusobno isprepletanih i znatno debljih u odnosu na mlađe slučajeve kolagenih vlakana. Unutar zadebljanih zidova uočenih krvnih sudova, koji su se karakterisali i znatno užim lumenom pravilnijeg oblika, detektovana su znatno deblja i brojnija kolagena vlakna njihovih bazalnih membrana. Sa povećanjem prisustva kolagenih vlakana, na preparatima je uočeno istovremeno smanjenje broja i veličine žlezdanih acinusa i to naročito u intermedijarnom delu adenohipofize (*Slike 7C i 7D*).

### ***ACTH ćelije***

Primena monoklonalnog antitela za ACTH omogućila je histološku diferencijaciju adrenokortikotropnih od ostalih bazofilnih ćelija (tireotropa i gonadotropa).

Adrenokortikotropne ćelije su uočavane kao braon prebojene, pretežno ovalnog ili poligonarnog oblika, sa okruglim, euhromatičnim, i ekscentrično postavljenim plavo prebojenim jedrom (*Slike 8A, 8B, 8C, 8D, 8E, 8F*). Na većem uvećanju mikroskopa, u perifernom delu njihove citoplazme zapažan je varijabilan broj krupnih, tamnobraon prebojenih sekretornih granula. Kod mlađih slučajeva, žlezdani acinusi su se sastojali predominantno od ACTH negativnih, dok su između njih detektovane pojedinačne ili grupe sačinjene od dve do tri ili ređe više ACTH pozitivnih ćelija. Njihovo prisustvo je bilo naročito izraženo u intermedijarnom delu (*Slike 8A i 8B*), dok je njihov broj bio nešto manji u lateralnom delu adenohipofize (*Slika 8E*).

Kod starijih slučajeva, ACTH pozitivne ćelije su dominirale svojim brojem i veličinom unutar žlezdanih acinusa intermedijarnog dela pars distalis-a, dok su ACTH imunonegativne ćelije u ovom delu adenohipofize bile znatno slabije zastupljene (*Slike 8C i 8D*). U njihovoj citoplazmi su znatno češće uočavane vakuole varijabilnog oblika i veličine koje su dovodile do dislokacije jedra ka suprotnom polu ćelije. U pojedinim delovima parenhima koji su se karakterisali narušenom acinusnom arhitekturom, retke ACTH pozitivne ćelije su uočavane u perivaskularnim prostorima intersticijuma, što može predstavljati i posledicu procesa histološke obrade tkiva. Kod ovih slučajeva, značajnije prisustvo adrenokortikotropnih ćelija je detektovano i unutar acinusa pars lateralis-a (*Slika 8F*). Kod jednog slučaja ženskog pola starog 71 godinu, veliki broj ACTH imunopozitivnih ćelija je uočen kako u svim delovima pars distalis-a, tako i unutar neurohipofize, što predstavlja fenomen bazofilne invazije (*Slika 8F*).



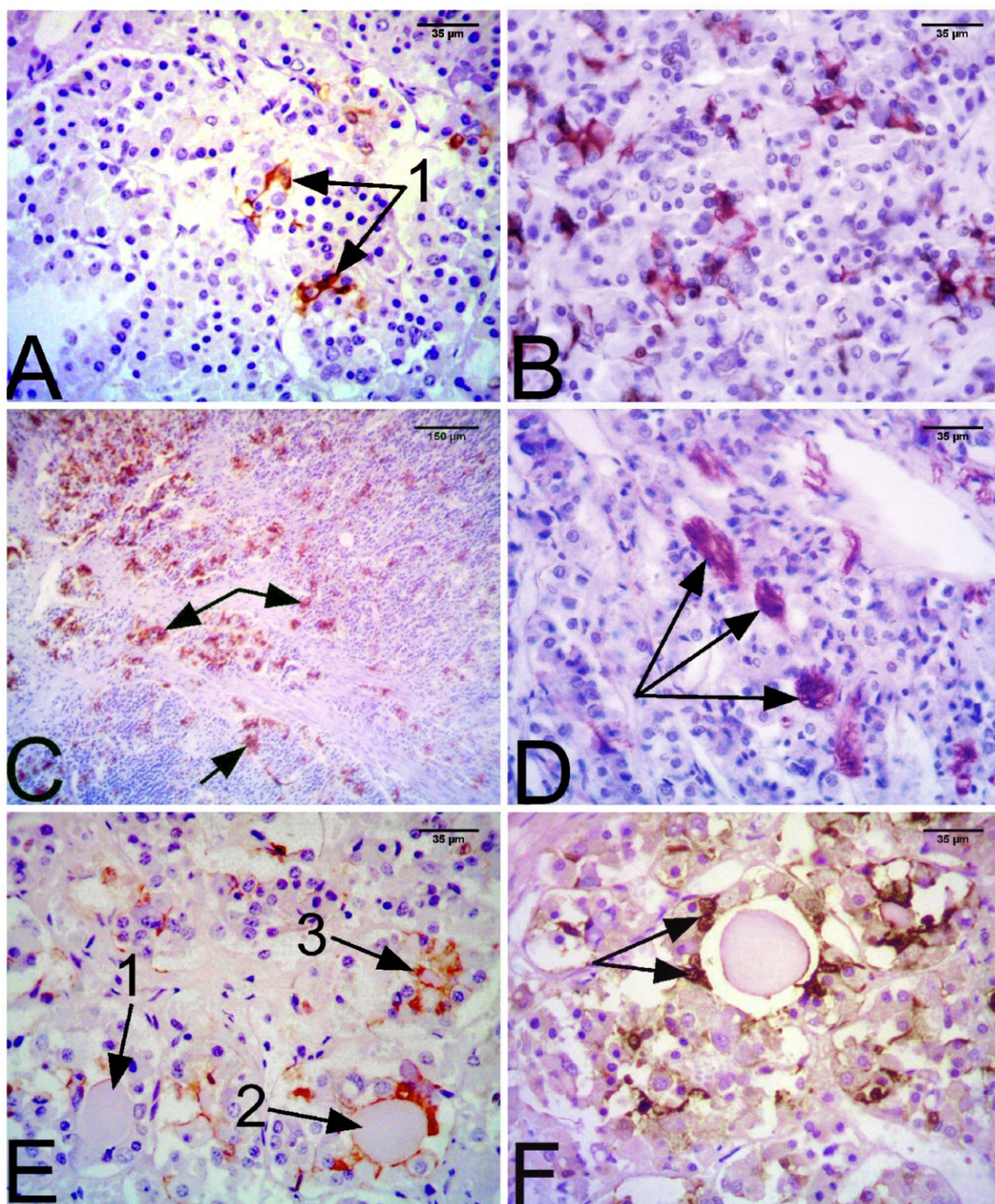
**Slika 8.** (A) Pojedinačne ACTH ćelije u pars distalis-u adenohipofize, *slučaj ženskog pola starosti 46 godina*; (B) ACTH ćelije u pars distalis-u adenohipofize, *slučaj muškog pola starosti 44 godine*; (C) 1. Žlezdani acinus ispunjen ACTH ćelijama u pars distalis-u adenohipofize, *slučaj muškog pola starosti 66 godina*; (D) 1. Izražene vezivno-tkivne pregrade; 2. ACTH ćelije u pars distalis-u adenohipofize, *slučaj ženskog pola starosti 71 godinu*; (E) 1. Pojedinačne ACTH ćelije u pars lateralis-u adenohipofize, *slučaj muškog pola starosti 44 godine*; (F) Bazofilna invazija ACTH ćelijama u pars lateralis-u adenohipofize, 1. Vakuole u citoplazmi ACTH ćelija, *slučaj ženskog pola starosti 71 godinu*; Bojenje antitelima na ACTH; uvećanje: 400×.

### ***Folikulostelatne (FS) ćelije***

Na histološkim preparatima, FS ćelije su uočavane kao zvezdolike, crveno prebojene S-100 imunopozitivne ćelije smeštene između hormon sekretujućih ćelija acinusa adenohipofize (*Slika 9A*). Pozitivnom reakcijom na anti – S-100 antitelo su se karakterisali kako citoplazma, tako i jedro ovih ćelija. Karakterističan oblik ovih ćelija je uslovio da se na pojedinim delovima histoloških preseka između žlezdanih ćelija acinusa uočavalo samo njihovo S-100 imunopozitivno jedro sa uzanim slojem citoplazme koja ga je okruživala ili delovi S-100 pozitivne citoplazme njihovih nastavaka.

Mlađi slučajevi su se karakterisali predominantno prisustvom pojedinačnih FS ćelija, koje su retko u pojedinim delovima parenhima formirale male grupacije sačinjene od dve do tri S-100 pozitivne ćelije. U tom slučaju, dugi i tanki nastavci ovih ćelija su se pružali između endokrinih ćelija i međusobno su bili povezani (*Slika 9A*). Kod napred navedenih slučajeva nije uočena značajnija predominacija prisustva S-100 imunopozitivnih ćelija u različitim delovima pars distalis-a hipofize.

Kod starijih slučajeva, zapažene su značajno brojnije S-100 pozitivne FS ćelije, koje su često međusobno bile povezane svojim nastavcima, zbog čega jasna granica između njih nije mogla biti uočena (*Slika 9B*). Značajnije prisustvo ovih ćelija je detektovano u intermedijarnom u odnosu na lateralne delove adenohipofize (*Slika 9C*). U pojedinim delovima parenhima retko su se uočavale S-100 pozitivne zone sačinjene od struktura koje nisu posedovale zvezdast oblik. Unutar ovih struktura detektovan je određen broj malih S-100 negativnih plavo prebojenih jedara što indirektno može da ukaže da one verovatno predstavljaju manje ili veće grupe FS ćelija čiji oblik i granice nisu jasno definisani (*Slika 9D*). U središtu pojedinih acinusa uočavan je lumen koji je ispunjen pretežno S-100 negativnim materijalom, tako da su u celini te formacije poprimale izgled folikula (*Slika 9E*). Ovakve strukture su češće uočavane kod starijih slučajeva, posebno u delu pars intermedia lokalizovanom neposredno ispred lobus posterior-a. Pored S-100 negativnog koloida u njihovom središtu, okruženog predominantno S-100 negativnim kuboidnim ili cilindričnim ćelijama, u njihovoj okolini nalazile su se grupe FS ćelija. U pojedinim slučajevima, nastavci tih FS ćelija su se pružali do folikularnog zida, provlačili između ćelija njegovog zida i dospeli do perifernih delova koloida (*Slika 9E*). Ređe, uočavane su FS ćelije koje su ulazile u sastav folikularnog zida (*Slika 9F*).



**Slika 9.** (A) 1. Grupe FS ćelija u adenohipofizi, slučaj muškog pola starosti 44 godine; (B) FS ćelije adenohipofize, slučaj ženskog pola starosti 80 godina; (C) Grupe FS ćelija adenohipofize, slučaj ženskog pola starosti 71 godinu; (D) S-100 pozitivne strukture bez formiranja zvezdastih formacija, adenohipofiza slučaja muškog pola starosti 70 godina; (E) Adenohipofiza slučaja muškog pola starosti 80 godina; 1 – Folikul okružen S-100 negativnim ćelijama; 2 – Folikul sa fokalnom S-100 pozitivnom reakcijom unutar zida; 3 – Grupa FS ćelija; (F) S-100 imunoreaktivne FS ćelije na ivici folikula u adenohipofizi slučaja muškog pola starosti 89 godina. S-100; uvećanje 1000×.

## MORFOMETRIJSKA ANALIZA

Morfometrijska analiza je rađena na preparatima bojenim histochemijskom i imunohistochemijskom metodom.

### Morfometrijska analiza histochemijski obrađenih preparata

Ovaj deo morfometrijske analize obuhvatao je kvantifikaciju veličine i oblika ćelija adenohipofize, zatim kvantifikaciju promene celularnog sastava adenohipofize (acidofila, bazofila i hromofoba), kao i kvantifikaciju prisustva vezivnog tkiva u adenohipofizi i njene vaskularizacije tokom procesa starenja. Analizirano je svih 29 slučajeva (15 muškog i 14 ženskog pola) čija se starost kretala između 33 i 95 godina (prosečno 64 godine). Najmlađi ispitivani slučaj muškog pola je bio star 33 godine, a najstariji 89 godina (prosečno 61 godina), dok je najmlađi ispitivani slučaj ženskog pola bio star 45 godina, a najstariji 95 godina (prosečno 70 godina).

Rezultati morfometrijske analize su prikazani u *Tabeli 1*. Starost ispitanih slučajeva, pol, area ( $A_{AH}$ ) i perimetar ( $B_{AH}$ ) ćelija adenohipofize, njihov oblikovni faktor (OF), zatim prosečna (MOD), medijanska (MdOD) i integralna (IOD) optička gustina tkiva adenohipofize, zapreminska gustina vezivnog tkiva ( $V_{VT}$ ) adenohipofize, zapreminska ( $V_{VKS}$ ), površinska ( $S_{VKS}$ ) i dužinska ( $L_{VKS}$ ) gustina krvnih sudova adenohipofize su podvrgnuti eksploratornoj faktor analizi u verziji 2007 NCSS-a sa ciljem ustanovljavanja veze između starosti ispitivanih slučajeva i napred navedenih morfometrijskih parametara. Pre same analize izvršena je procena prikladnosti podataka za faktorsku analizu. Korelaciona matrica ispitivanih parametara (*Tabela 2*) je ukazala na prisustvo značajnog broja koeficijenata korelacije čija je vrednost iznosila iznad 0.3. Vrednost Phi indeksa je iznosila 0.4, a Bartletov test sferičnosti je bio statistički značajan ( $p < 0.0001$ ), što sve ukazuje na faktorabilnost korelacione matrice.

Analiza glavnih komponenti je otkrila prisustvo tri komponente čija je karakteristična vrednost bila preko 1 i koje su objašnjavale svaka posebno 48.45%, 44.09% i 19.59% ukupne varijanse. Pregledom dijagrama prevoja, utvrđeno je prisustvo jasne tačke preloma nakon druge komponente. Na osnovu Katelovog kriterijuma zadržane su tokom daljeg istraživanja prve dve komponente, koje su objašnjavale 92.55% ukupne varijanse i to komponenta 1 48.45%, a komponenta 2 44.09%. Nakon izvršene oblimin rotacije uočeno je da obe komponente sadrže veliki broj značajnih faktorskih težina, pri čemu svi parametri daju znatnu težinu samo po jednoj komponenti. U prvoj komponenti najveću težinu poseduje površinska, zatim zapreminska gustina krvnih sudova adenohipofize. Potom slede area, perimetar adenohipofiznih

**Tabela 1.** Prosečne vrednosti morfometrijskih parametara svih 29 analiziranih slučajeva dobijenih kao rezultat morfometrijske analize.

Slučaj	Starost	Pol	A <sub>AH</sub> (mm <sup>2</sup> )	B <sub>AH</sub> (mm)	OF	IOD	MOD	MdOD	V <sub>VT</sub> (%)	V <sub>VKS</sub> (%)	S <sub>VKS</sub> (mm <sup>-1</sup> ) ×10 <sup>-3</sup>	L <sub>VKS</sub> (mm <sup>-2</sup> ) ×10 <sup>-3</sup>
1	33	Muški	98.66	47.87	0.753	2823.27	0.151	0.034	11.31	5.25	15.35	0.35
2	35	Muški	99.01	48.05	0.757	5490.70	0.066	0.013	12.47	4.76	13.06	0.17
3	44	Muški	108.99	37.81	0.761	4299.07	0.124	0.039	13.98	4.95	15.23	0.30
4	45	Muški	103.73	46.42	0.747	3963.84	0.193	0.118	11.92	4.07	13.96	0.44
5	45	Ženski	107.38	45.39	0.789	3753.26	0.174	0.080	12	2.62	10.53	0.32
6	46	Ženski	124.96	46.17	0.754	5694.52	0.094	0.031	11.66	4.97	16.74	0.35
7	51	Ženski	100.28	51.41	0.771	2743.98	0.030	0.009	14.62	5.53	14.92	0.16
8	52	Muški	110.05	40.47	0.745	6985.84	0.322	0.116	14.6	3.22	12.29	0.21
9	55	Muški	97.09	42.77	0.774	2680.88	0.205	0.061	15.18	5.87	16.86	0.26
10	56	Ženski	103.34	46.79	0.768	3688.18	0.159	0.070	15.23	4.44	12.75	0.14
11	64	Muški	83.36	41.55	0.727	4053.39	0.116	0.024	19.53	5.3	15.92	0.28
12	66	Muški	131.43	45.42	0.748	5413.35	0.083	0.029	18.87	4.03	9.36	0.27
13	68	Ženski	132.08	40.39	0.757	6300.20	0.161	0.057	19.65	3.94	16.42	0.24
14	70	Muški	119.68	44.88	0.739	12407.93	0.364	0.157	17.03	1.93	7.23	0.16
15	71	Ženski	141.05	46.39	0.753	2157.18	0.205	0.084	14.61	3.02	9.34	0.28
16	73	Muški	97.95	42.73	0.743	10621.82	0.096	0.066	16.02	3.87	10.87	0.28
17	73	Ženski	134.97	40.31	0.781	7013.25	0.080	0.017	17.63	4.3	14.08	0.28
18	75	Muški	116.13	43.74	0.757	3272.01	0.096	0.061	18.35	4.38	13.68	0.32
19	75	Muški	120.54	48.69	0.726	4228.82	0.023	0.005	19.56	0.14	0.57	0.21
20	75	Muški	101.83	42.30	0.756	5685.80	0.126	0.059	18.14	4.94	14.24	0.30
21	76	Ženski	112.41	45.47	0.767	3278.75	0.124	0.023	22.6	4.97	14.78	0.01
22	78	Ženski	160.44	40.94	0.755	967.59	0.108	0.060	16.77	4.96	11.17	0.22
23	78	Ženski	119.08	40.90	0.766	2830.66	0.167	0.043	17.09	4.92	14.94	0.26
24	80	Muški	138.03	41.23	0.735	4923.35	0.110	0.035	16.38	3.99	8.71	0.26
25	80	Ženski	129.12	39.38	0.753	3075.91	0.079	0.010	15.36	2.83	12.63	0.32
26	81	Ženski	124.77	41.68	0.754	2847.30	0.081	0.033	19.49	3.66	12.42	0.25
27	83	Ženski	119.28	44.32	0.756	2714.08	0.080	0.026	17.04	1.42	4.99	0.10
28	89	Muški	107.82	40.41	0.771	2781.03	0.083	0.006	17.31	2.92	10.29	0.28
29	95	Ženski	144.04	43.96	0.756	778.48	0.083	0.010	20.05	2.4	8.79	0.28

A<sub>AH</sub> – areaB<sub>AH</sub> – perimetar

OF – oblikovni faktor

IOD – integralna optička gustina

MOD – prosečna optička gustina

MdOD – medijanska optička gustina

V<sub>VT</sub> – zapreminska gustina vezivnog tkivaV<sub>VKS</sub> – zapreminska gustina krvnih sudovaS<sub>VKS</sub> – površinska gustina krvnih sudovaL<sub>VKS</sub> – dužinska gustina krvnih sudova

ćelija i starost ispitanih slučajeva. Na kraju, u ovaj faktor su uvršteni i dužinska gustina krvnih sudova, kao i zapreminska gustina vezivnog tkiva adenohipofize. Za razliku od prve komponente u koju su svrstani oni morfometrijski parametri koji koreliraju sa starošću, u drugu komponentu su svrstani oni parametri koji koreliraju sa polom ispitanih slučajeva. Najveću faktorsku težinu je posedovala integralna, zatim prosečna i medijanska optička gustina i, na kraju pol ispitanih slučajeva i oblikovni faktor adenohipofiznih ćelija (*Tabela 3*). Prema tome, rezultati eksploratorne faktor analize su ukazali da su količina prisutnog vezivnog tkiva, prokrvljenost i veličina ćelija adenohipofize povezani sa procesom starenja, dok su njena histološka struktura, oblik, a delimično i veličina ćelija povezani sa polom ispitanih slučajeva.

**Tabela 2.** Korelaciona matrica morfometrijskih parametara adenohipofize ispitanih slučajeva.

Varijable	Pol	A <sub>AH</sub>	B <sub>AH</sub>	OF	MOD	IOD	MdOD	V <sub>VT</sub>	V <sub>VKS</sub>	S <sub>VKS</sub>	L <sub>VKS</sub>
Starost	0.25	0.52	0.53	-0.13	-0.13	-0.14	-0.05	0.76	-0.42	-0.44	-0.21
Pol		0.48	0.42	0.48	-0.37	-0.38	-0.15	0.12	-0.05	0.08	0.06
A <sub>AH</sub>			0.99	-0.04	-0.18	-0.19	-0.05	0.27	-0.31	-0.34	-0.17
B <sub>AH</sub>				-0.15	-0.14	-0.15	-0.02	0.29	-0.36	-0.40	-0.21
OF					-0.31	-0.30	-0.14	-0.19	0.29	0.39	0.27
MOD						1.00	0.89	-0.04	-0.13	-0.07	-0.01
IOD							0.88	-0.04	-0.13	-0.07	-0.02
MdOD								0.14	-0.08	0.04	0.10
V <sub>VT</sub>									-0.20	-0.23	-0.14
V <sub>VKS</sub>										0.88	0.60
S <sub>VKS</sub>											0.81

A<sub>AH</sub> – area

B<sub>AH</sub> – perimetar

OF – oblikovni faktor

IOD – integralna optička gustina

MOD – prosečna optička gustina

MdOD – medijanska optička gustina

V<sub>VT</sub> – zapreminska gustina vezivnog tkiva

V<sub>VKS</sub> – zapreminska gustina krvnih sudova

S<sub>VKS</sub> – površinska gustina krvnih sudova

L<sub>VKS</sub> – dužinska gustina krvnih sudova



**Tabela 3.** Matrica faktorskih težina i korelacija promjenljivih i dva faktora dobijenih tokom analize glavnih komponenti oblimin rotacijom.

Parametar	Faktorske težine		Koeficijenti korelacije promjenljivih i faktora		Deo varijanse objašnjen zajedničkim faktorima
	Komponenta 1	Komponenta 2	Komponenta 1	Komponenta 2	
Starost	<b>0.693</b>	0.156	<b>0.481</b>	0.024	0.505
Pol	0.190	<b>0.473</b>	0.036	<b>0.223</b>	0.260
A <sub>AH</sub>	<b>0.690</b>	0.291	<b>0.476</b>	0.085	0.560
B <sub>AH</sub>	<b>0.737</b>	0.233	<b>0.544</b>	0.054	0.598
OF	-0.316	<b>0.382</b>	0.100	<b>0.146</b>	0.246
MOD	-0.007	<b>-0.968</b>	0.000	<b>0.936</b>	0.936
IOD	-0.007	<b>-0.970</b>	0.000	<b>0.941</b>	0.941
MdOD	0.017	<b>-0.765</b>	0.000	<b>0.585</b>	0.585
V <sub>VT</sub>	<b>0.456</b>	0.023	<b>0.208</b>	0.001	0.209
V <sub>VKS</sub>	<b>-0.738</b>	0.187	<b>0.545</b>	0.035	0.580
S <sub>VKS</sub>	<b>-0.817</b>	0.162	<b>0.668</b>	0.026	0.694
L <sub>VKS</sub>	<b>-0.559</b>	0.101	<b>0.312</b>	0.010	0.323

A<sub>AH</sub> – areaB<sub>AH</sub> – perimetar

OF – oblikovni faktor

IOD – integralna optička gustina

MOD – prosečna optička gustina

MdOD – medijanska optička gustina

V<sub>VT</sub> – zapreminska gustina vezivnog tkivaV<sub>VKS</sub> – zapreminska gustina krvnih sudovaS<sub>VKS</sub> – površinska gustina krvnih sudovaL<sub>VKS</sub> – dužinska gustina krvnih sudova

Prosečne vrednosti analiziranih morfometrijskih parametara slučajeva muškog i ženskog pola su prikazane u *Tabeli 4*.

**Tabela 4.** Vrednosti analiziranih morfometrijskih parametara kod slučajeva muškog i ženskog pola.

Muški						
Varijable	n	Prosek	Mediana	SD	SE	95% CI
Starost	15	62	66	17	4	9
A <sub>AH</sub> (mm <sup>2</sup> )	15	108.95	107.82	14.28	3.69	7.23
B <sub>AH</sub> (mm)	15	42.43	41.68	2.83	0.73	1.43
OF	15	0.749	0.748	0.014	0.004	0.007
MOD	15	0.157	0.126	0.084	0.022	0.042
IOD	15	5308.74	4299.07	2815.34	726.92	1424.73
MdOD	15	0.053	0.043	0.040	0.010	0.020
V <sub>VT</sub> (%)	15	16.04	16.38	2.73	0.70	1.38
V <sub>VKS</sub> (%)	15	3.97	4.07	1.47	0.38	0.74
S <sub>VKS</sub> (mm <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>	15	11.84	13.06	4.21	1.09	2.33
L <sub>VKS</sub> (mm <sup>-2</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>	15	0.25	0.26	0.09	0.02	0.048
Ženski						
Starost	14	70	75	15	4	8
A <sub>AH</sub> (mm <sup>2</sup> )	14	125.23	124.86	16.78	4.48	8.79
B <sub>AH</sub> (mm)	14	45.10	45.41	3.15	0.84	1.65
OF	14	0.763	0.757	0.011	0.003	0.006
MOD	14	0.102	0.089	0.055	0.015	0.029
IOD	14	3417.38	2961.61	1816.99	485.61	951.78
MdOD	14	0.042	0.030	0.034	0.009	0.018
V <sub>VT</sub> (%)	14	16.70	16.91	3.09	0.82	1.62
V <sub>VKS</sub> (%)	14	3.86	4.12	1.23	0.33	0.64
S <sub>VKS</sub> (mm <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>	14	12.46	12.69	3.27	0.87	1.890
L <sub>VKS</sub> (mm <sup>-2</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>	14	0.26	0.27	0.08	0.02	0.049

A<sub>AH</sub> – areaB<sub>AH</sub> – perimetar

OF – oblikovni faktor

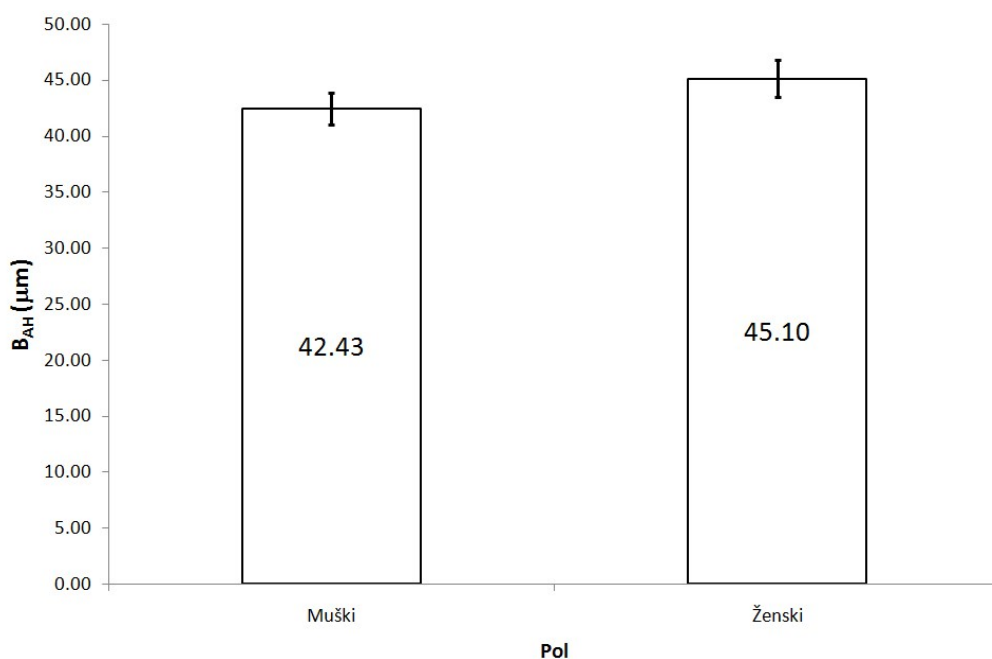
IOD – integralna optička gustina

MOD – prosečna optička gustina

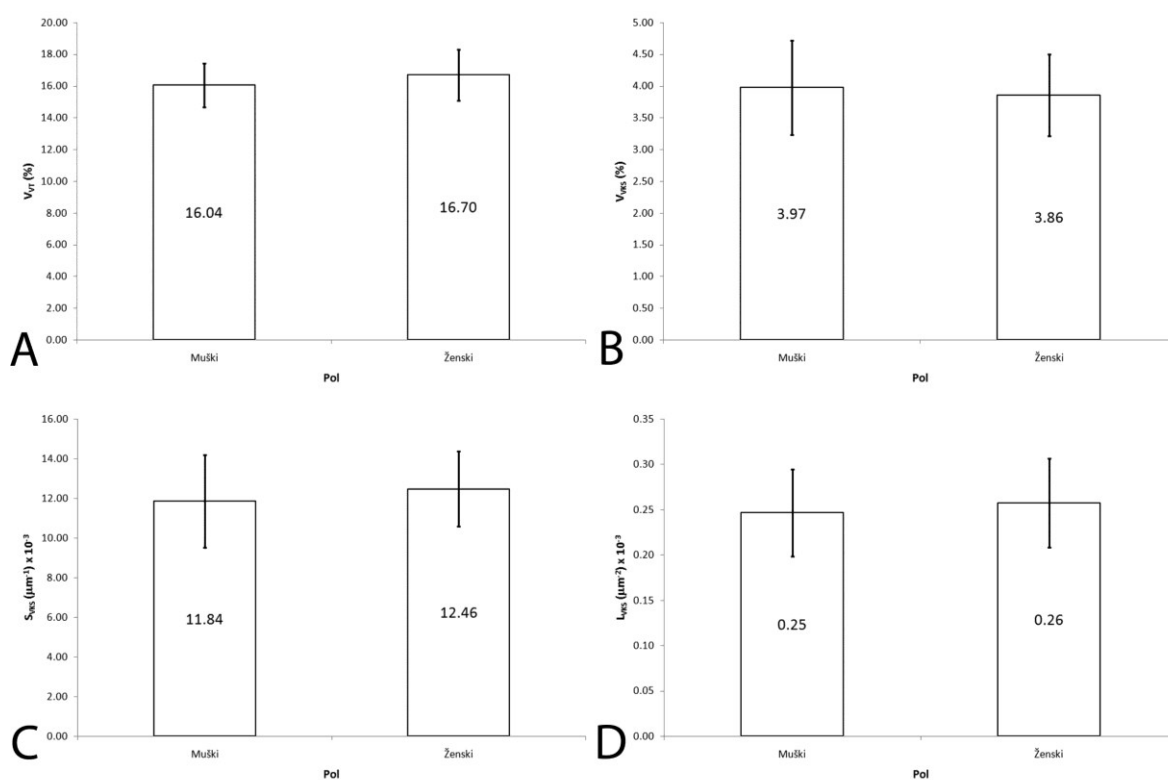
MdOD – medijanska optička gustina

V<sub>VT</sub> – zapreminska gustina vezivnog tkivaV<sub>VKS</sub> – zapreminska gustina krvnih sudovaS<sub>VKS</sub> – površinska gustina krvnih sudovaL<sub>VKS</sub> – dužinska gustina krvnih sudova

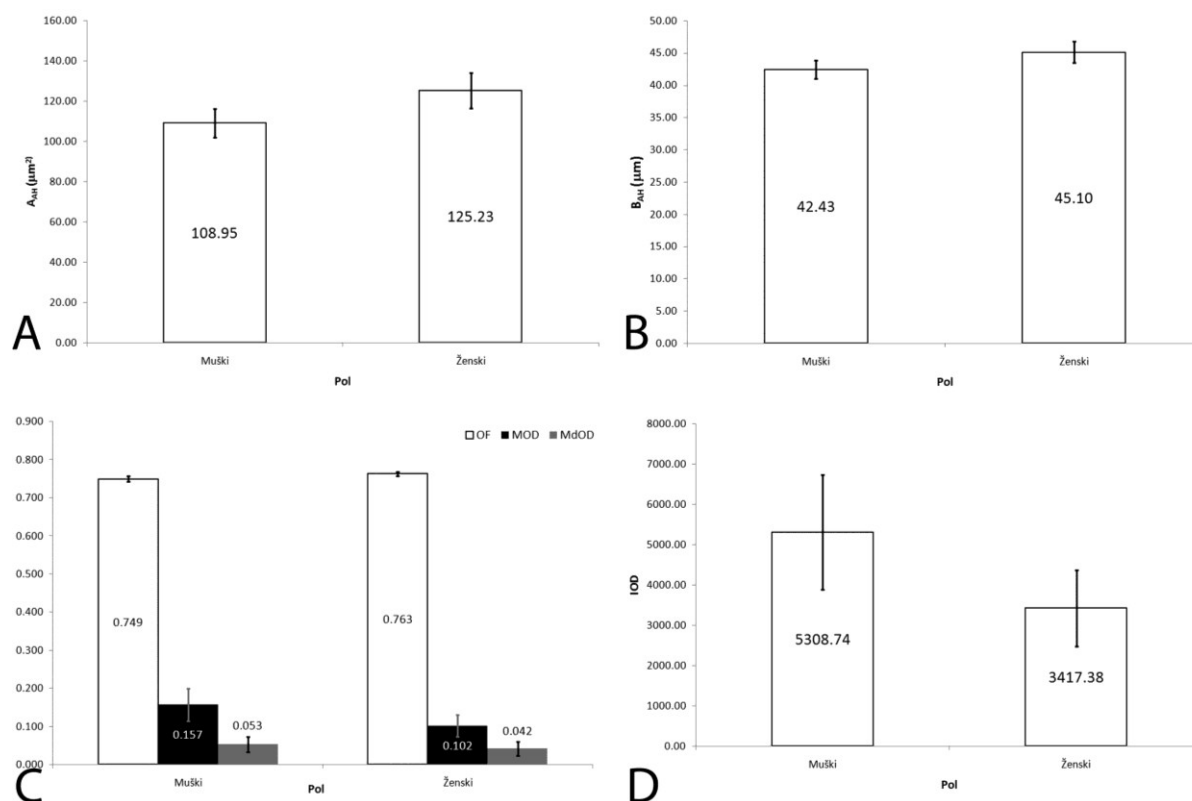
Napred navedene vrednosti su analizirane t-testom nezavisnih uzoraka. Prosečna starost (*Grafikon 1*), zatim prosečne vrednosti zapreminske gustine vezivnog tkiva, zapreminske, površinske i dužinske gustine krvnih sudova adenohipofize nisu se statistički značajno razlikovale ( $p > 0.05$ ) između slučajeva muškog i ženskog pola (*Grafikoni 2A, 2B, 2C i 2D*). Nasuprot napred navedenim parametrima, prosečna vrednost aree ćelija adenohipofize slučajeva ženskog pola je bila statistički značajno viša u odnosu na istu slučajeva muškog pola ( $t(27) = 2.82$ ,  $p = 0.009$ ). Uočena razlika (prosečna vrednost razlike =  $16.27 \mu\text{m}^2$ , CI:  $4.43 - 28.12 \mu\text{m}^2$ ) se karakterisala vrlo velikom veličinom uticaja ( $\eta^2 = 0.23$ ), ukazujući da su analizirane ćelije adenohipofize značajno krupnije kod slučajeva ženskog u odnosu na slučajeve muškog pola (*Grafikon 3A*). Slično prosečnoj arei, prosečan perimetar (*Grafikon 3B*) je bio statistički značajno viši kod slučajeva ženskog u odnosu na slučajeve muškog pola ( $t(27) = 2.41$ ,  $p = 0.024$ ; prosečna razlika =  $2.67 \mu\text{m}$ ; CI:  $0.39 - 4.95 \mu\text{m}$ ), kao i oblikovni faktor (*Grafikon 3C*) ( $t(27) = 2.88$ ,  $p = 0.008$ ; prosečna razlika =  $0.014$ ; CI:  $0.004 - 0.023$ ), što u slučaju prosečnog perimetra ( $\eta^2 = 0.18$ ), kao i oblikovnog faktora ( $\eta^2 = 0.24$ ) predstavlja vrlo veliku razliku i ukazuje da su ove ćelije kod slučajeva ženskog pola krupnije i da se istovremeno karakterišu i značajno pravilnijim oblikom. Nasuprot napred navedena dva parametra, prosečna integralna optička gustina (*Grafikon 3D*) ( $t(27) = 2.13$ ,  $p = 0.042$ ; prosečna razlika =  $1891.36$ ; CI:  $71.04 - 3711.67$ ) i prosečna optička gustina (*Grafikon 3C*) ( $t(27) = 2.12$ ,  $p = 0.045$ ; prosečna razlika =  $0.06$ ; CI:  $0.001 - 0.110$ ) analiziranih vidnih polja tkiva adenohipofize su statistički značajno više kod slučajeva muškog u odnosu na slučajeve ženskog pola. Prosečna medijanska optička gustina (*Grafikon 3C*) se ne razlikuje statistički značajno između slučajeva muškog i slučajeva ženskog pola ( $p > 0.05$ ). Prema tome, činjenica da su dva od napred navedena tri oblika optičke gustine statistički značajno viša kod slučajeva muškog u odnosu na slučajeve ženskog pola, pri čemu se ta razlika u oba slučaja karakteriše velikim efektom veličine ( $\eta^2 = 0.14$  i za IOD i za MOD), može indirektno da ukaže na moguće razlike u celularnom sastavu tkiva adenohipofize slučajeva suprotnog pola i eventualno značajnije prisustvo bazofila kod slučajeva muškog pola.



**Grafikon 1.** Prosečna starost ispitanih slučajeva muškog i ženskog pola



**Grafikon 2.** Prosečna zapreminska gustina vezivnog tkiva (A), zapreminska (B), površinska (C) i dužinska gustina krvnih sudova adenohipofize (D) slučajeva muškog i ženskog pola.



**Grafikon 3.** Prosečna area (A), perimetar (B) ćelija adenohipofize, prosečan oblikovni faktor, prosečna i medijanska (C), kao i prosečna integrisana optička gustina tkiva adenohipofize kod ispitanih slučajeva muškog i ženskog pola (D).

Veza između ispitivanih morfometrijskih parametara adenohipofize i starosti ispitivanih slučajeva je ispitivana pomoću Pearson-ovog koeficijenta linearne korelacije (*Tabela 5*).

**Tabela 5.** Korelaciona matrica Pearson-ovog koeficijenta linearne korelacije između starosti ispitanih slučajeva s jedne i prosečne aree i perimetra ćelija adenohipofize, prosečne zapreminske gustine vezivnog tkiva, prosečne zapreminske, površinske i dužinske gustine krvnih sudova adenohipofize istih sa druge strane.

Parametar	$A_{AH}$	$B_{AH}$	OF	MOD	IOD	MdOD	$V_{VT}$	$V_{VKS}$	$S_{VKS}$	$L_{VKS}$
R	0,52	0,53	-0,13	-0,13	-0,14	-0,05	0,76	-0,42	-0,44	-0,21
p	0,004	0,003	0,492	0,500	0,483	0,796	0,000	0,024	0,017	0,263
n	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29

$A_{AH}$  – area

$B_{AH}$  – perimetar

OF – oblikovni faktor

IOD – integralna optička gustina

MOD – prosečna optička gustina

MdOD – medijanska optička gustina

$V_{VT}$  – zapreminska gustina vezivnog tkiva

$V_{VKS}$  – zapreminska gustina krvnih sudova

$S_{VKS}$  – površinska gustina krvnih sudova

$L_{VKS}$  – dužinska gustina krvnih sudova

Rezultati korelacione analize su ukazali na prisustvo statistički značajnog i velikog porasta prosečne aree ( $R = 0.52$ ,  $n = 29$ ,  $p = 0.004$ ), prosečnog perimetra ( $R = 0.53$ ,  $n = 29$ ,  $p = 0.003$ ) i prosečne zapreminske gustine vezivnog tkiva adenohipofize ( $R = 0.76$ ,  $n = 29$ ,  $p < 0.0001$ ) tokom procesa starenja. Za razliku od napred navedenih parametara, prosečna zapreminska i površinska gustina krvnih sudova adenohipofize su ispoljavale statistički značajan pad (prosečna zapreminska gustina:  $R = -0.42$ ,  $n = 29$ ,  $p = 0.024$ ; prosečna površinska gustina:  $R = -0.44$ ,  $n = 29$ ,  $p = 0.017$ ) tokom procesa starenja. Veza između ova dva parametra i starenja je bila umerenog intenziteta.

Dodatno, primenom linearne regresione analize ispitana je prediktivna sposobnost starenja za one morfometrijske parametre koji su statistički značajno korelirali sa starošću analiziranih slučajeva.

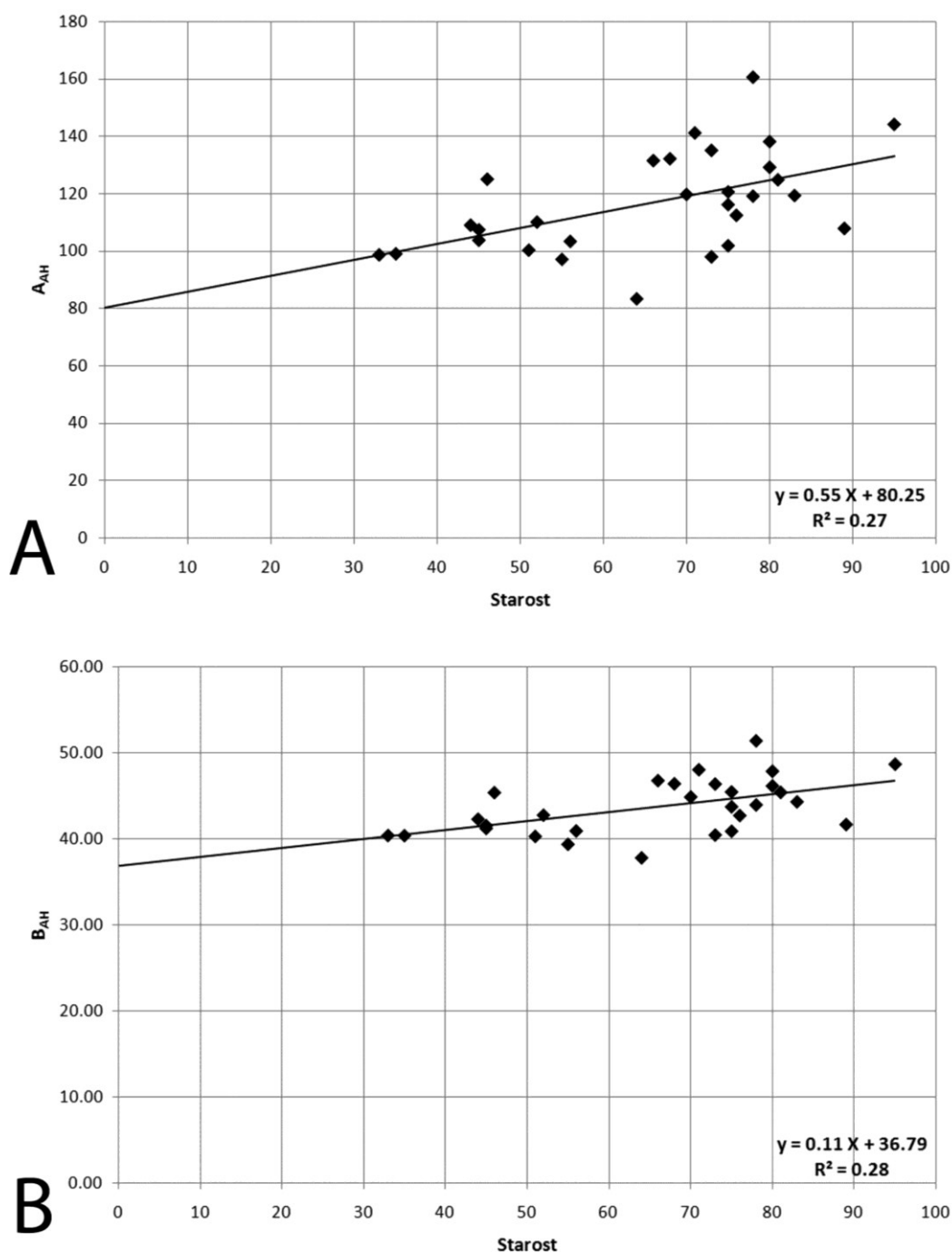
Tako, rezultati linearne regresione analize su ukazali da starenje predstavlja statistički značajan prediktor prosečne aree ćelija adenohipofize ( $F(1,27) = 10.19$ ,  $p = 0.004$ ), prema modelu koji je identifikovan sledećom jednačinom:  $A_{AH} = 80.25 \mu\text{m}^2 + 0.55 \times \text{starost}$ . Prema napred navedenom modelu, starost ispitanih slučajeva objašnjava 25% ukupne varijanse prosečne aree ćelija adenohipofize (korigovani  $R^2 = 0.25$ ), što predstavlja veoma veliki efekat veličine (*Grafikon 4A*).

Slična veza, samo još jačeg intenziteta je ustanovljena između starosti i prosečnog perimetra. I u ovom slučaju starost predstavlja statistički značajan prediktor prosečnog perimetra adenohipofiznih ćelija ( $F(1,27) = 10.66$ ,  $p = 0.003$ ). Identifikovana jednačina ( $B_{AH} = 36.79 \mu\text{m} + 0.11 \times \text{starost}$ ) je ukazala da starost objašnjava 26% ukupne varijanse ovog morfometrijskog parametra (korigovani  $R^2 = 0.26$ ), što predstavlja veliki efekat (*Grafikon 4B*).

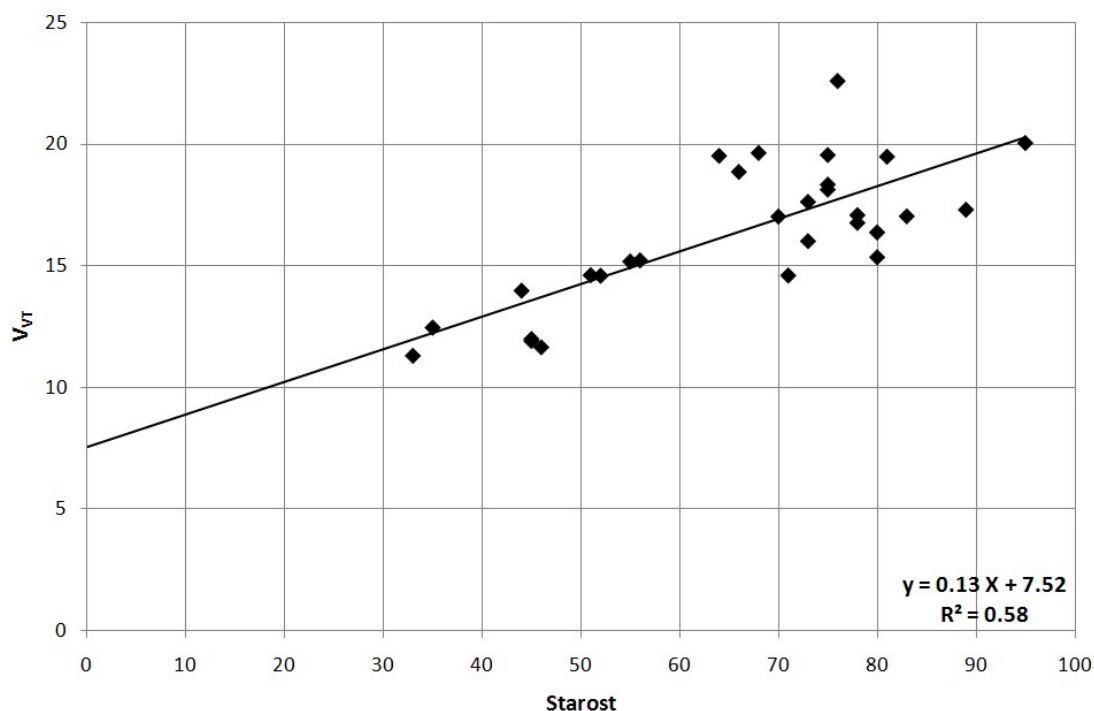
Starost ispitanih slučajeva takođe predstavlja statistički značajan prediktor prosečne zapreminske gustine vezivnog tkiva adenohipofize ( $F(1,27) = 37.88$ ,  $p < 0.0001$ ). Prema identifikovanom modelu ( $V_{VT} = 7.52 \% + 0.13 \times \text{starost ispitanog slučaja}$ ), starost ispitanih slučajeva bi objašnjavala 57% ukupne varijanse ovog parametra (korigovani  $R^2 = 0.57$ ), što takođe predstavlja vrlo veliki efekat (*Grafikon 5*).

Kada je u pitanju prosečna zapreminska gustina krvnih sudova adenohipofize, starost je takođe predstavljala statistički značajan prediktor ( $F(1,27) = 5.76$ ,  $p = 0.024$ ). Međutim, prema identifikovanom modelu ( $V_{VKS} = 6.17 \% - 0.03 \times \text{starost ispitanog slučaja}$ ), starost ispitanih slučajeva je objašnjavala samo 15% ukupne varijanse ovog parametra (korigovani  $R^2 = 0.15$ ), što predstavlja slabiji u odnosu na prethodna dva, ali još uvek umereni efekat (*Grafikon 6A*).

Konačno, starost takođe predstavlja statistički značajan prediktor prosečne površinske gustine krvnih sudova adenohipofize ( $F(1,27) = 6.41$ ,  $p = 0.017$ ). Identifikovani model ( $S_{VKS} = 19 \times 10^{-3} \mu\text{m}^{-2} - 0.01 \times 10^{-3} \times \text{starost}$ ) je ukazao da starost ispitanih slučajeva objašnjava 16% ukupne varijanse ovog parametra (korigovani  $R^2 = 0.16$ ), što predstavlja umereni efekat (*Grafikon 6B*).



**Grafikon 4.** Scatter dijagram korelacije između starosti ispitanih slučajeva i prosečne aree (A), odnosno prosečnog perimetra (B) adenohipofiznih ćelija.



**Grafikon 5.** Scatter dijagram korelacije između starosti i prosečne zapreminske gustine vezivnog tkiva adenohipofize ispitanih slučajeva.

Prema tome, iz svega napred navedenog može se zaključiti da tokom procesa starenja dolazi do značajnog uvećanja veličine ćelija adenohipofize. Njihova hipertrofija, koja je izrazitija kod slučajeva ženskog pola, je praćena proliferacijom vezivnog tkiva, kao i njenom slabijom vaskularizacijom.

Morfometrijski parametri, kao i starost ispitanih slučajeva, koji su nakon izvršene eksploratorne faktor analize klasifikovani u komponentu 1 (*Tabela 3*) korišćeni su kao kriterijumi za klasifikaciju ispitanih slučajeva u tri starosne grupe, kako bi detaljnije bila ispitana njihova dinamika, kao i dinamika preostalih morfometrijskih parametara klasifikovanih u sastavu komponente 2, tokom procesa starenja. Sprovedena je klasifikaciona analiza metodom k-proseka. Vrednosti morfometrijskih parametara grupa dobijenih klaster analizom su prezentovani u *Tabeli 6*.

Jednofaktorska analiza varijanse (One Way ANOVA) je primenjena za ispitivanje značajnosti razlika između vrednosti morfometrijskih parametara dobijenih grupa. Tako je ustanovljeno da se prosečna starost ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ( $F(2,26) = 30.20$ ,  $p < 0.0001$ ). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je starost prve grupe bila statistički značajno niža u odnosu na II i III ( $p < 0.05$ ), dok je III grupa bila neznatno starija od II, ali ta razlika nije bila statistički značajna ( $p > 0.05$ ) (*Grafikon 7*). Broj slučajeva muškog i ženskog pola se nije razlikovao statistički značajno kod grupa dobijenih klasifikacionom analizom ( $\chi^2 = 1.84$ ,  $SS = 2$ ,  $n = 29$ ,  $p = 0.40$ ).

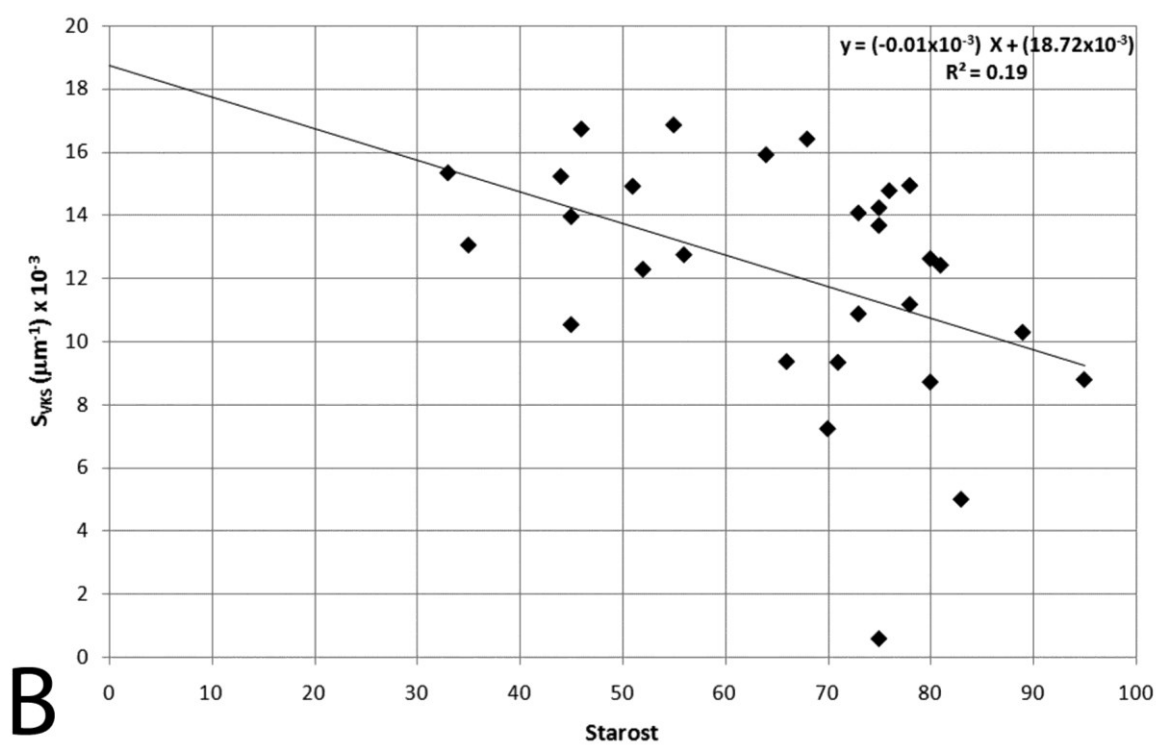
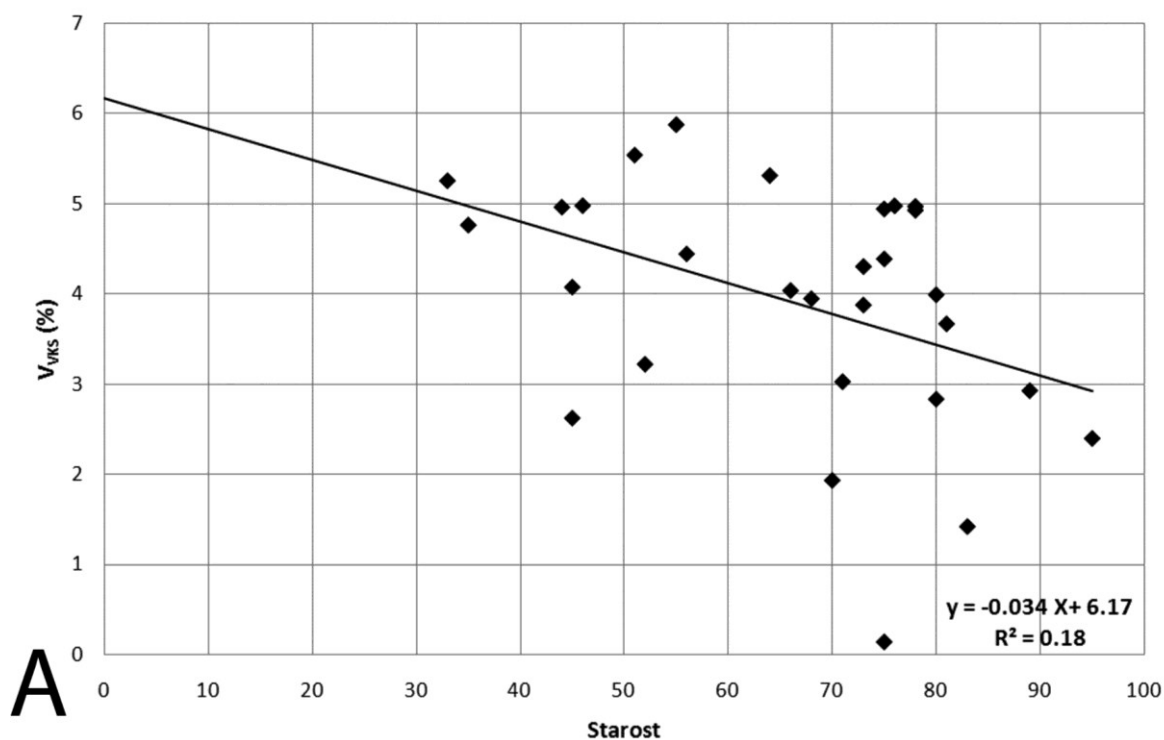


**Tabela 6.** Prosečne vrednosti ispitivanih morfometrijskih parametara grupa dobijenih klasifikacionom analizom.

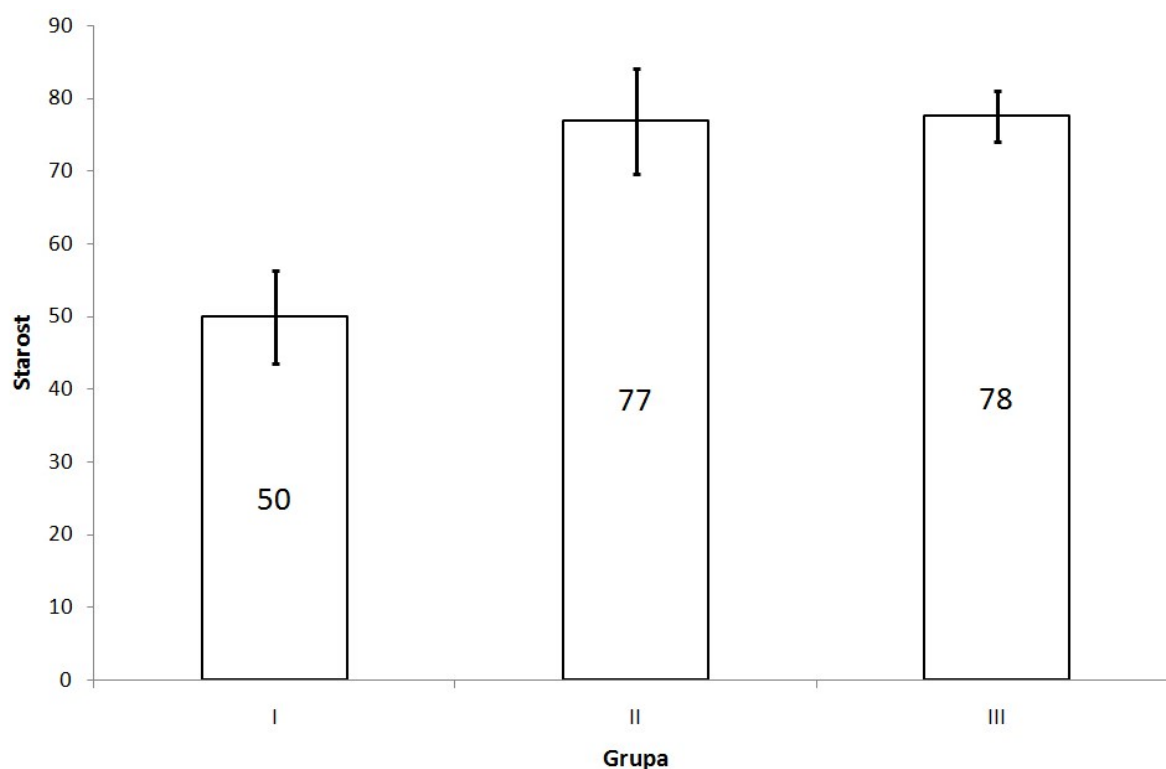
Grupa I						
Varijabla	N	Prosek	Md	SD	SE	95% CI
Starost	12	50	49	11	3	6
$A_{AH}$ (mm <sup>2</sup> )	12	102.90	101.81	9.89	2.85	5.60
$B_{AH}$ (mm)	12	41.08	40.7	1.87	0.54	1.06
OF	12	0.757	0.756	0.016	0.005	0.009
MOD	12	0.141	0.12	0.069	0.02	0.039
IOD	12	4733.23	4008.61	2263.54	653.43	1280.69
MdOD	12	0.047	0.048	0.032	0.009	0.018
$V_{VT}$ (%)	12	14.04	14.29	2.37	0.68	1.34
$V_{VKS}$ (%)	12	4.57	4.86	0.97	0.28	0.55
$S_{VKS}$ (mm <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>	12	14.00	14.44	2.15	0.62	1.22
$L_{VKS}$ (mm <sup>-2</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>	12	0.27	0.28	0.04	0.01	0.02
Grupa II						
Starost	7	77	75	10	4	7
$A_{AH}$ (mm <sup>2</sup> )	7	133.78	131.43	15.59	5.89	11.55
$B_{AH}$ (mm)	7	47.09	46.79	2.5	0.94	1.85
OF	7	0.748	0.753	0.011	0.004	0.008
MOD	7	0.121	0.08	0.118	0.044	0.087
IOD	7	4095.35	2714.08	4027.05	1522.08	2983.23
MdOD	7	0.043	0.023	0.055	0.021	0.041
$V_{VT}$ (%)	7	17.71	17.04	1.9	0.72	1.41
$V_{VKS}$ (%)	7	2.56	2.4	1.62	0.61	1.20
$S_{VKS}$ (mm <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>	7	7.35	8.79	3.56	1.35	2.64
$L_{VKS}$ (mm <sup>-2</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>	7	0.14	0.16	0.06	0.02	0.04
Grupa III						
Starost	10	78	77	6	2	3
$A_{AH}$ (mm <sup>2</sup> )	10	121.62	121.92	12.14	3.84	7.52
$B_{AH}$ (mm)	10	44.53	44.69	2.29	0.72	1.42
OF	10	0.760	0.757	0.012	0.004	0.007
MOD	10	0.125	0.096	0.049	0.015	0.030
IOD	10	4200.83	3275.38	1624.39	513.68	1006.79
MdOD	10	0.051	0.039	0.032	0.01	0.020
$V_{VT}$ (%)	10	18.20	17.89	2.02	0.64	1.25
$V_{VKS}$ (%)	10	4.09	4.14	0.78	0.25	0.48
$S_{VKS}$ (mm <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>	10	13.22	13.88	2.3	0.73	1.43
$L_{VKS}$ (mm <sup>-2</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>	10	0.31	0.28	0.06	0.02	0.04

$A_{AH}$  – area  
 $B_{AH}$  – perimetar  
 OF – oblikovni faktor  
 IOD – integralna optička gustina  
 MOD – prosečna optička gustina

MdOD – medijanska optička gustina  
 $V_{VT}$  – zapreminska gustina vezivnog tkiva  
 $V_{VKS}$  – zapreminska gustina krvnih sudova  
 $S_{VKS}$  – površinska gustina krvnih sudova  
 $L_{VKS}$  – dužinska gustina krvnih sudova



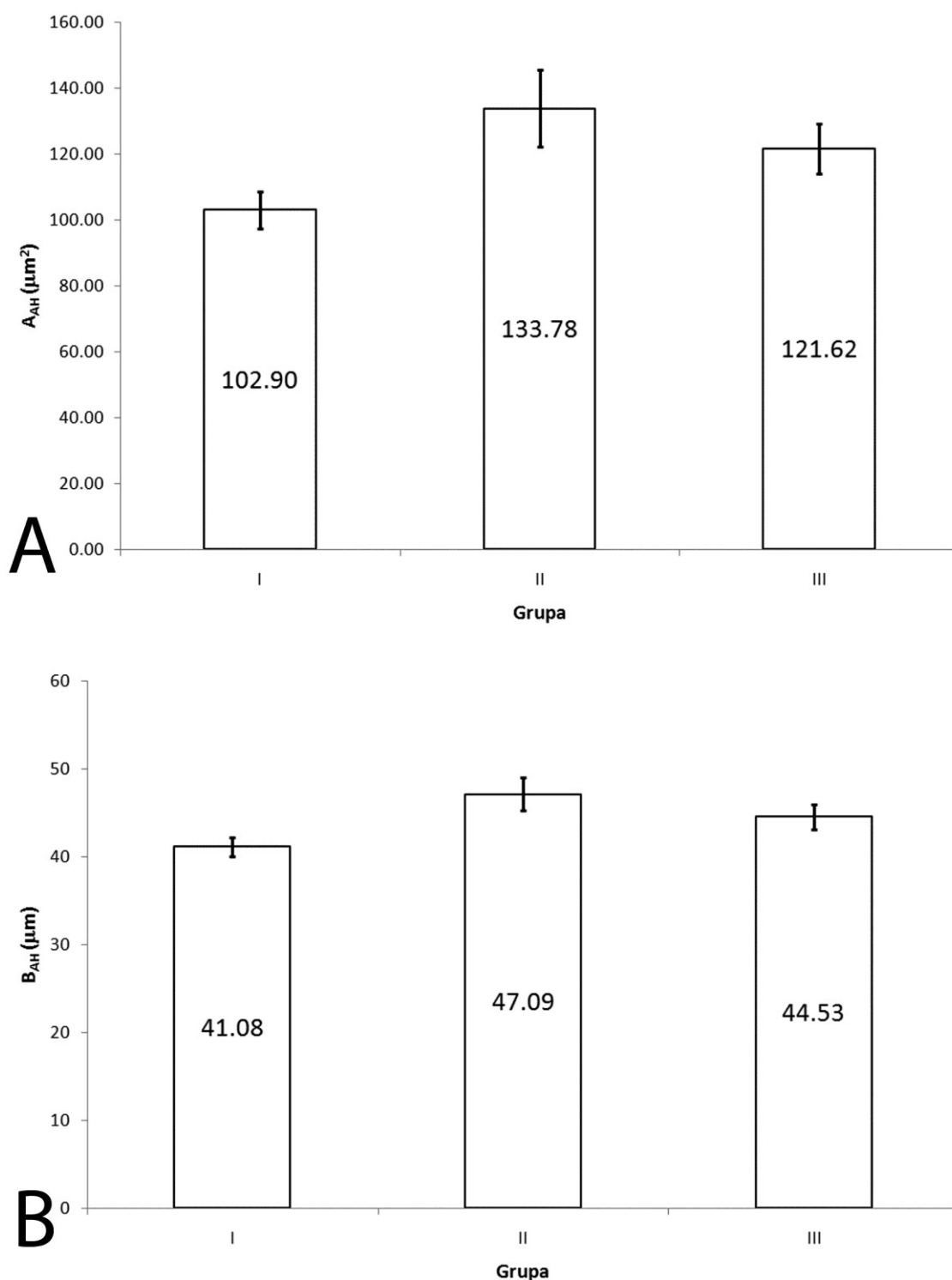
**Grafikon 6.** Scatter dijagram korelacije između starosti i prosečne zapreminske (A) i površinske (B) gustine krvnih sudova adenohipofize ispitanih slučajeva.



**Grafikon 7.** Prosečna starost grupa dobijenih klasifikacionom analizom.

Prosečna area ćelija adenohipofize se statistički značajno razlikuje između grupa dobijenih klasifikacionom analizom ( $F(2,26) = 15.39$ ,  $p < 0.0001$ ). Napred navedena razlika je vrlo velika, što potvrđuje vrednost  $\eta^2 = 0.54$ . Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da prosečna area statistički značajno raste u II u odnosu na I grupu ( $p < 0.05$ ). Zatim njena vrednost opada u III grupi u odnosu na II grupu, ali taj pad nije statistički značajan ( $p > 0.05$ ). Ipak, vrednost ovog parametra u III grupi ostaje statistički značajno viša u odnosu na I grupu ( $p < 0.05$ ) (*Grafikon 8A*). Dakle, slučajevi II grupe, u proseku mlađi od slučajeva III grupe se karakterišu nešto izrazitijom hipertrofijom analiziranih ćelija u odnosu na preostale dve grupe.

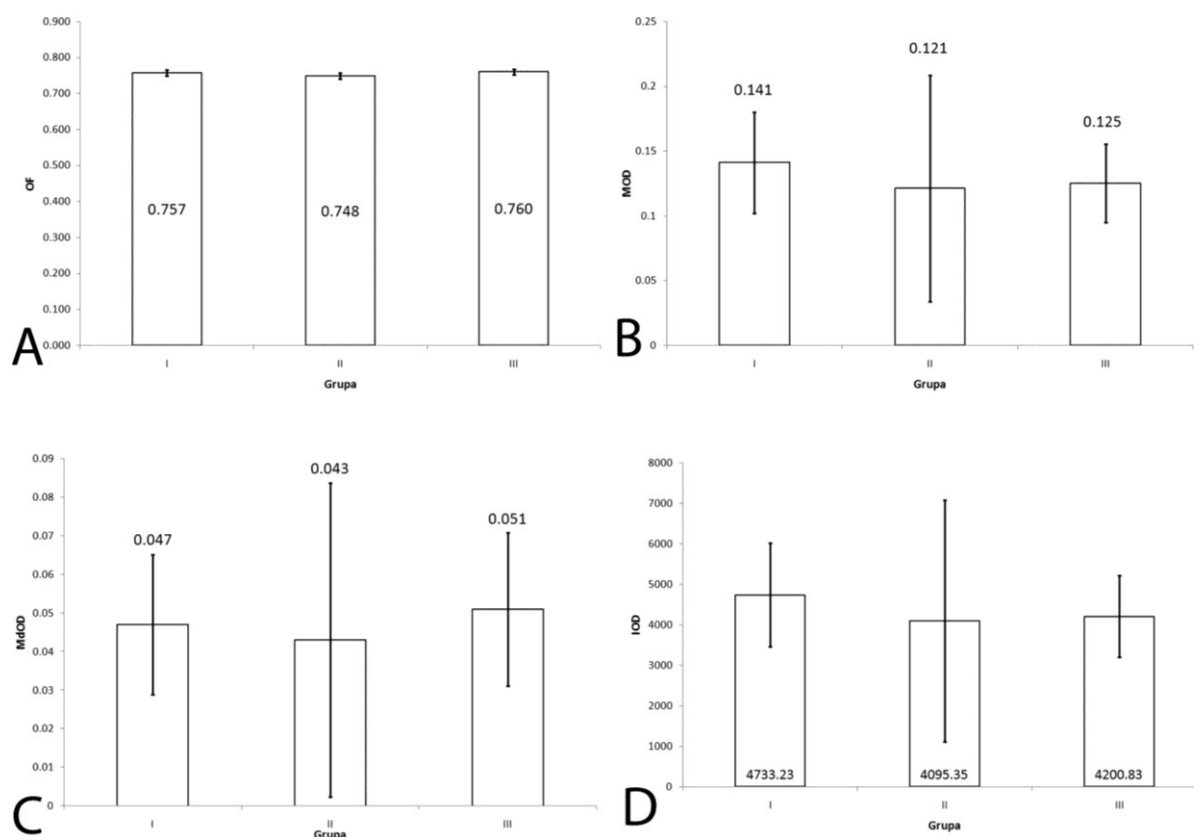
Prosečan perimetar ima sličan trend prosečnoj arei adenohipofiznih ćelija (*Grafikon 8B*). On se statistički značajno razlikuje između dobijenih grupa ( $F(2,26) = 17.90$ ,  $p < 0.0001$ ), pri čemu i on statistički značajno raste u II u odnosu na I grupu ( $p < 0.05$ ), a zatim blago opada u III u odnosu na II grupu, pri čemu taj pad nije statistički značajan ( $p > 0.05$ ). I kod njega vrednost u III grupi ostaje statistički značajno viša u odnosu na I grupu ( $p < 0.05$ ). Vrednost eta kvadrat je dodatno ukazala da su ustanovljene razlike ovog parametra ispitivanih grupa takođe velike ( $\eta^2 = 0.58$ ).



**Grafikon 8.** Prosečna area (A) i perimetar (B) adenohipofiznih ćelija grupa dobijenih klasičnom analizom.

Vrednosti oblikovnog faktora ustanovljenih grupa se ne razlikuju statistički značajno ( $p > 0.05$ ) (Grafikon 9A). Za razliku od prosečne aree i perimetra, vrednosti izmerenih optičkih gustina tkiva adenohipofize (MOD, MdOD i IOD) ispoljavaju suprotan trend. Njihove vrednosti su najviše u I grupi i opadaju u II u odnosu na I, nakon čega rastu u III grupi u odnosu

na II, ali još uvek ostaju niže u odnosu na I grupu (*Grafikoni 9B, C i D*). Ipak, ove razlike nisu statistički značajne ( $p > 0.05$ ).

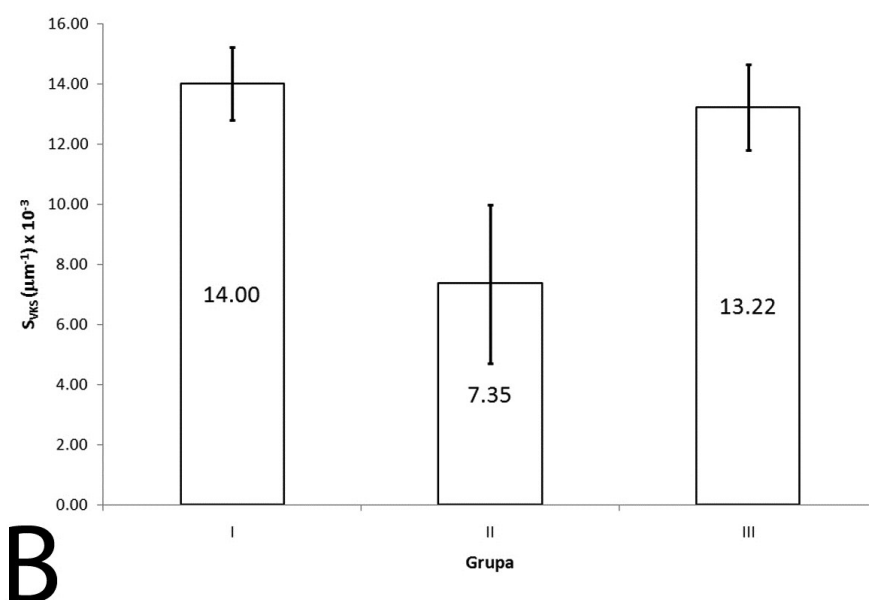
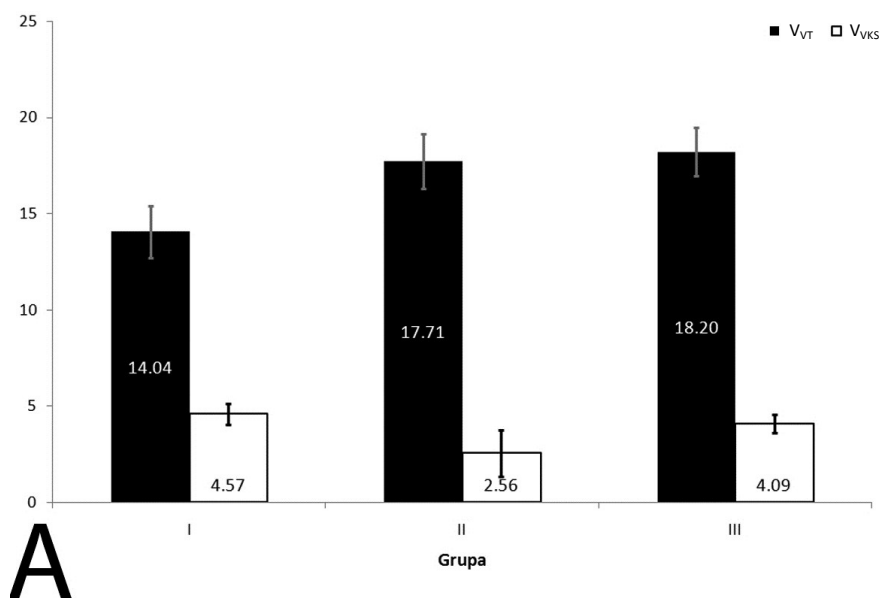


**Grafikon 9.** Prosečan oblikovni faktor (A), prosečna (B), medijanska (C) i prosečna integrisana optička gustina (D) tkiva adenohipofize grupa dobijenih klasifikacionom analizom.

Prosečna zapreminska gustina vezivnog tkiva adenohipofize statistički značajno raste kod ispitivanih grupa ( $F(2,26) = 12.00$ ,  $p = 0.0002$ ). Uočene razlike ispoljavaju veliki efekat ( $\eta^2 = 0.48$ ), pri čemu vrednost ovog parametra statistički značajno raste u II u odnosu na I, dok njegova vrednost u znatno manjoj meri raste u III u odnosu na II starosnu grupu. Taj porast nije statistički značajan ( $p > 0.05$ ), ali zato vrednost prosečne zapreminske gustine vezivnog tkiva adenohipofize u ovoj grupi ostaje statistički značajno viša u odnosu na I grupu ( $p < 0.05$ ) (*Grafikon 10A*). Dakle, adenohipofize slučajeva dve starije grupe su se karakterisale izrazitim fibrozom u odnosu na I grupu.

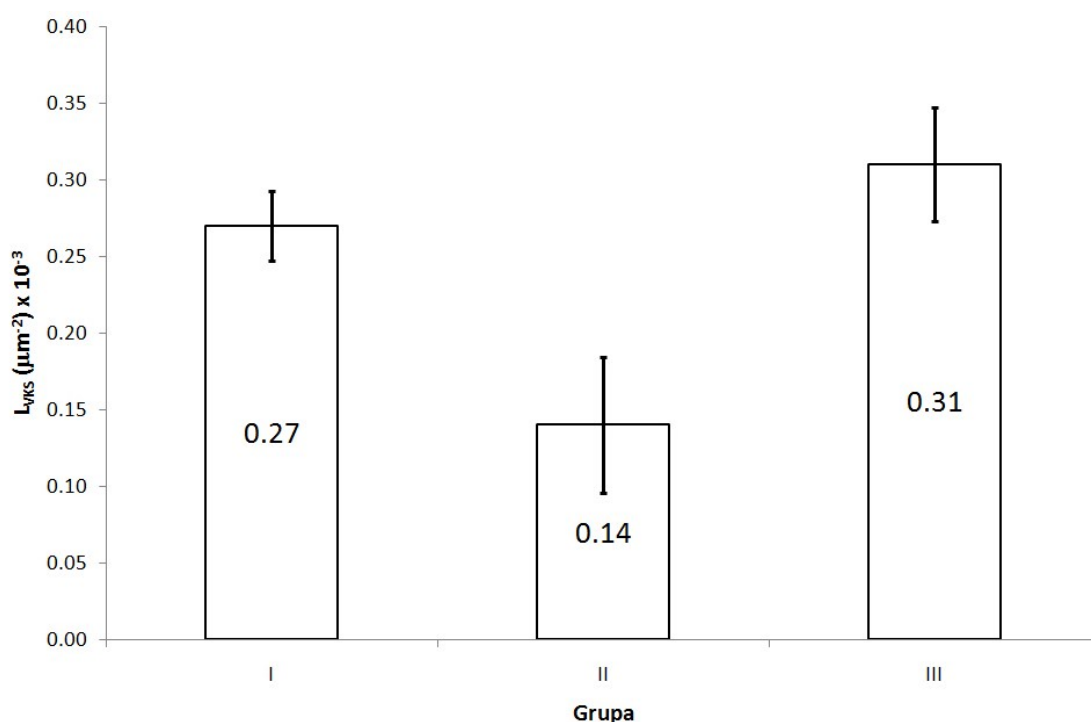
Kada su u pitanju krvni sudovi adenohipofize, vrednosti prosečne zapreminske i površinske gustine se statistički značajno razlikuju između dobijenih grupa ( $V_{VKS}$ :  $F(2,26) = 7.56$ ,  $p = 0.003$ ;  $S_{VKS}$ :  $F(2,26) = 16.06$ ,  $p < 0.0001$ ), pri čemu su ustanovljene razlike ispoljavale veliki efekat veličine ( $V_{VKS} \eta^2 = 0.37$ ,  $S_{VKS} \eta^2 = 0.55$ ). Vrednosti ovih parametara, slično

vrednostima merenih optičkih gustina tkiva adenohipofize, su u I i III grupi više u odnosu na II grupu, ali su za razliku od napred navedenih razlika optičkih gustina, ove razlike statistički značajne ( $p < 0.05$ ). Vrednosti ovih parametara III grupe ostaju niže u odnosu na I grupu, ali ta razlika nije statistički značajna ( $p > 0.05$ ) (Grafikon 10A i B).



**Grafikon 10.** Prosečna zapreminska gustina vezivnog tkiva i prosečna zapreminska gustina krvnih sudova (A); prosečna površinska gustina krvnih sudova (B) adenohipofize kod grupa dobijenih klasifikacionom analizom.

Konačno, trend prosečnih vrednosti dužinske gustine krvnih sudova adenohipofize ispitivanih grupa se blago razlikuje od trenda prosečne zapreminske i površinske gustine. Ona se statistički značajno razlikuje između dobijenih grupa ( $F(2,26) = 25.33$ ,  $p < 0.0001$ ), pri čemu kao i kod dva napred navedena parametra njena vrednost je statistički značajno najniža u II u odnosu na I i III grupu ( $p < 0.05$ ). Vrednost ovog parametra u III grupi je viša u odnosu na I grupu, ali ta razlika nije statistički značajna ( $p > 0.05$ ). Uočene razlike se karakterišu veoma velikim efektom veličine ( $\eta^2 = 0.66$ ) (*Grafikon 11*). Dakle, slučajevi II grupe se odlikuju slabijom vaskularizacijom u odnosu na I i III grupu.



**Grafikon 11.** Prosečna dužinska gustina krvnih sudova adenohipofize kod grupa dobijenih klasifikacionom analizom.

Prema tome, klasifikacionom analizom dobijene su tri grupe, prva u proseku najmlađa i dve grupe značajno starije u odnosu na I, ali čija se starost međusobno nije statistički značajno razlikovala. Adenohipofize slučajeva dve starije grupe su se karakterisale izrazitijom fibrozom u odnosu na I grupu. Sadržaj vezivnog tkiva se nije značajno razlikovao između napred navedene dve grupe. Proces starenja je praćen i porastom veličine ćelija adenohipofize. Ipak, taj porast nije linearan. Slučajevi II grupe, u proseku mlađi od slučajeva III grupe se karakterišu nešto izrazitijom hipertrofijom analiziranih ćelija u odnosu na preostale dve grupe, ali i slabijom vaskularizacijom u odnosu na I i III grupu. Konačno, broj slučajeva muškog i ženskog pola se ne razlikuje statistički značajno kod grupa dobijenih klasifikacionom analizom ( $\chi^2 = 1.84$ ,  $SS = 2$ ,  $n = 29$ ,  $p = 0.40$ ).

## Morfometrijska analiza imunohistohemijski obrađenih preparata

Morfometrijska analiza imunohistohemijski obojenih preseka obuhvatala je kvantifikaciju prisustva kolagena tipa IV, kortikotropnih i folikulostelatnih ćelija kod slučajeva različitog pola i starosti.

Rezultati imunohistohemijskog dela morfometrijske analize su prezentovani u *Tabeli 7*.

**Tabela 7.** Prosečne vrednosti zapreminske gustine kolagena tipa IV, zatim zapreminske gustine ACTH pozitivnih i zapreminske gustine S-100 pozitivnih ćelija adenohipofize svih 15 analiziranih slučajeva.

Slučaj	Starost	Pol	V <sub>VColIV</sub>	V <sub>VACTH</sub>	V <sub>VFSC</sub>
1	44	Muški	9.68	5.08	1.71
2	46	Ženski	10.30	6.03	3.48
3	51	Ženski	10.52	10.37	3.73
4	55	Muški	13.57	11.53	3.57
5	56	Ženski	13.03	6.59	3.75
6	66	Muški	15.23	12.33	4.21
7	70	Muški	18.19	10.81	2.36
8	71	Ženski	19.67	16.52	4.17
9	73	Ženski	14.27	12.98	3.11
10	75	Muški	20.29	12.64	2.38
11	80	Muški	17.74	17.50	4.28
12	80	Ženski	13.74	17.90	6.33
13	81	Ženski	16.05		4.91
14	83	Ženski	16.33	14.35	3.34
15	89	Muški	18.13	14.80	6.34

V<sub>VColIV</sub> – volumenska gustina kolagena tipa IV

V<sub>VACTH</sub> – volumenska gustina ACTH pozitivnih ćelija

V<sub>VFSC</sub> – volumenska gustina folikulostelatnih ćelija

Korelaciona analiza je ukazala na prisustvo statistički značajne korelacije između starenja i svih ispitanih morfometrijskih parametara. Tako je uočena statistički značajna korelacija između starosti ispitanih slučajeva i prosečne zapreminske gustine kolagena tipa IV ( $R = 0.77$ ,  $n = 15$ ,  $p = 0.001$ ), zatim prosečne zapreminske gustine ACTH pozitivnih ( $R = 0.85$ ,  $n = 14$ ,  $p < 0.0001$ ) i na kraju prosečne zapreminske gustine S-100 pozitivnih ( $R = 0.55$ ,  $n = 15$ ,  $p = 0.035$ ) ćelija adenohipofize (*Tabela 8*).



**Tabela 8.** Korelaciona matrica morfometrijskih parametara i starosti imunohistohemijski analiziranih slučajeva.

Parametar	$V_{VCol\ IV}$	$V_{VACTH}$	$V_{VFSC}$
R	0.77	0.85	0.55
Starost	p	0.001	0.000
	n	15	14
			15
$V_{VCol\ IV}$	R	0.67	0.17
	p	0.009	0.556
	n	14	15
$V_{VACTH}$	R		0.61
	p		0.022
	n		14

$V_{VCol\ IV}$  – volumenska gustina kolagena tipa IV

$V_{VACTH}$  – volumenska gustina ACTH pozitivnih ćelija

$V_{VFSC}$  – volumenska gustina folikulostelatnih ćelija

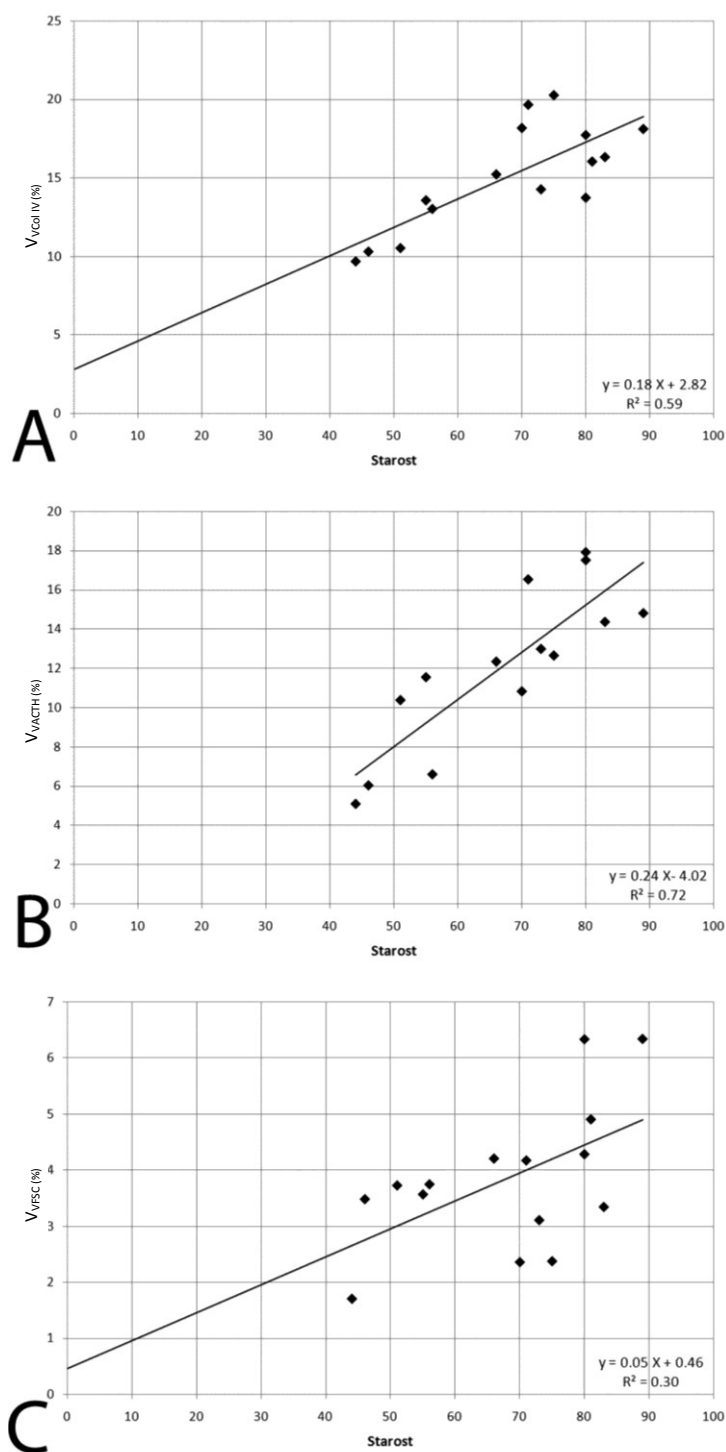
Dodatno, ustanovljena je i statistički značajna korelacija između prosečne zapreminske gustine kolagena tipa IV i prosečne zapreminske gustine ACTH pozitivnih ćelija adenohipofize ( $R = 0.67$ ,  $n = 14$ ,  $p = 0.009$ ), što se može objasniti kao posledica procesa starenja. Konkretno, uočena je statistički značajna korelacija između prosečne zapreminske gustine ACTH i S-100 pozitivnih ćelija adenohipofize ( $R = 0.61$ ,  $n = 14$ ,  $p = 0.022$ ).

Uočene veze između analiziranih morfometrijskih parametara i starosti ispitanih slučajeva, kao i između prosečne zapreminske gustine ACTH pozitivnih i S-100 pozitivnih ćelija adenohipofize, detaljnije su analizirane linearnom regresionom analizom. Veoma jaka i statistički značajna korelacija između prosečne zapreminske gustine kolagena tipa IV i starosti ispitanih slučajeva, kao i prosečne zapreminske gustine ACTH pozitivnih ćelija adenohipofize i starosti ukazala je na moguće prisustvo multikolinearnosti, usled čega linearna regresiona analiza između prosečne zapreminske gustine kolagena tipa IV kao nezavisne i prosečne zapreminske gustine ACTH pozitivnih ćelija adenohipofize kao zavisne promenljive nije izvršena.

Tokom linearne regresione analize ispitivana je prediktivna sposobnost starosti ispitanih slučajeva, kao nezavisne promenljive, i prosečne zapreminske gustine kolagena tipa IV, zatim prosečne zapreminske gustine ACTH pozitivnih, kao i prosečne zapreminske gustine S100 pozitivnih ćelija adenohipofize, kao zavisnih promenljivih. Međusobne veze su ispitivane pomoću zasebnih modela za svaku zavisnu promenljivu.

Kada je u pitanju kolagen tipa IV, identifikovani model ( $V_{VCol\ IV} = 2.82 + 0.18 \times \text{starost}$ ) je objašnjavao 56% ukupne varijanse njegove zapreminske gustine (korigovani  $R^2 = 0.56$ ), što predstavlja veliki efekat (*Grafikon 12A*) i ukazuje na statistički značajan uticaj starenja na

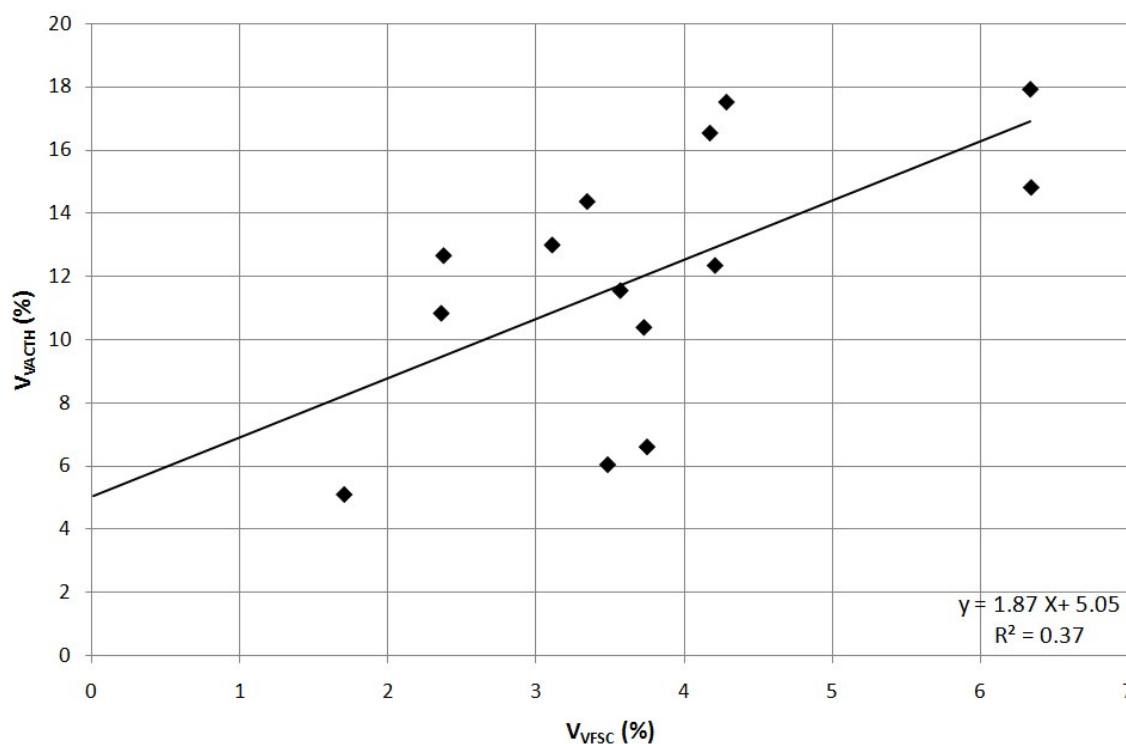
prisustvo kolagena tipa IV u adenohipofizi ispitanih slučajeva ( $F(1,13) = 18.34$ ,  $p = 0.0008$ ). Dobijeni rezultati su saglasni statistički značajnom porastu prisustva vezivnog tkiva u adenohipofizi tokom procesa starenja, uočenom tokom histohemijskog dela istraživanja.



**Grafikon 12.** Prosečna zapreminska gustina kolagena tipa IV (A), prosečna zapreminska gustina ACTH pozitivnih (B) i prosečna zapreminska gustina S-100 pozitivnih ćelija (C) adenohipofize tokom procesa starenja.

Slično prosečnoj zapreminskoj gustini kolagena tipa IV, uočen je statistički značajan porast prosečne zapreminske gustine ACTH pozitivnih ćelija adenohipofize tokom procesa starenja ( $F(1,12) = 30.49$ ,  $p = 0.0001$ ). Jednačina dobijena linearnom regresionom analizom ( $V_{VACTH} = 0.24 \times \text{starost} - 4.02$ ) je ukazala da starost objašnjava 69% ukupne varijanse ovog parametra (korigovani  $R^2 = 0.69$ ), što takođe predstavlja veoma veliki efekat (*Grafikon 12B*).

Konačno, prosečna zapreminska gustina S-100 pozitivnih ćelija adenohipofize takođe statistički značajno raste tokom procesa starenja ( $F(1,13) = 5.51$ ,  $p = 0.035$ ). Dobijeni model ( $V_{VFSC} = 0.46 + 0.05 \times \text{starost}$ ) je ukazao da starost objašnjava 24% ukupne varijanse ovog parametra (korigovani  $R^2 = 0.24$ ), što predstavlja umereni efekat (*Grafikon 12C*). Prema tome, pored procesa starenja, na porast prisustva adrenokortikotropnih ćelija u adenohipofizi može da utiče povećano prisustvo folikulostelatnih ćelija u njoj. Rezultati linearne regresione analize su potvrdili napred navedenu pretpostavku i ukazali da porast prisustva folikulostelatnih ćelija prati statistički značajan porast prisustva adrenokortikotropnih ćelija kod ispitanih slučajeva ( $F(1,12) = 6.93$ ,  $p = 0.022$ ). Identifikovana jednačina ( $V_{VACTH} = 5.05 + 1.87 \times V_{VFSC}$ ) je ukazala da prosečna zapreminska gustina folikulostelatnih ćelija objašnjava 31% ukupne varijanse prosečne zapreminske gustine adrenokortikotropnih ćelija (korigovani  $R^2 = 0.31$ ), što predstavlja umereni efekat i sa 69% varijanse koju objašnjava starost ispitanog slučaja zajedno objašnjava 100% ukupne varijanse ovog parametra (*Grafikon 13*).



**Grafikon 13.** Scatter dijagram korelacije prosečne zapreminske gustine folikulostelatnih i prosečne zapreminske gustine adrenokortikotropnih ćelija.

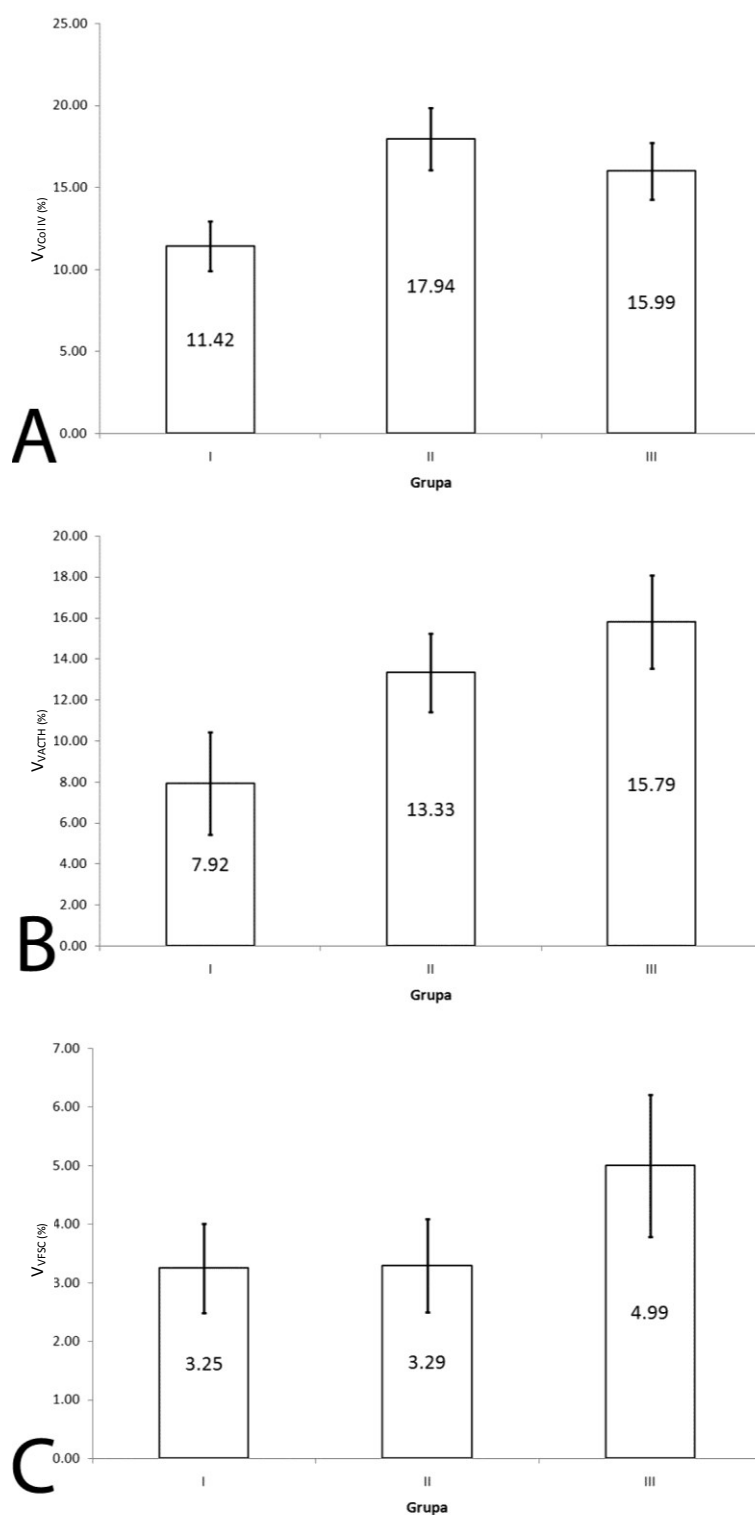
Analiza razlika imunohistohemijskih morfometrijskih parametara slučajeva koji su pripadali grupama dobijenim tokom histohemijskog dela morfometrijske analize ispitivana je pomoću jednofaktorske analize varijanse. Na taj način je detaljnije ustanovljavana dinamika ovih parametara tokom procesa starenja.

Tako, prosečna zapreminska gustina kolagena tipa IV se statistički značajno razlikuje između imunohistohemijski ispitanih slučajeva grupa dobijenih tokom klasifikacione analize histohemijskog dela studije ( $F(2,12) = 14.47$ ,  $p = 0.0006$ ). Dodatno, Tukey-Kramer post hoc test je pokazao da su prosečne vrednosti ovog parametra II i III grupe statistički značajno više u odnosu na I grupu ( $p < 0.05$ ). Prosečna zapreminska gustina kolagena tipa IV II grupe je nešto viša u odnosu na III grupu koja je u proseku starija, ali ta razlika nije statistički značajna ( $p > 0.05$ ) (*Grafikon 14A*). To je saglasno rezultatima histohemijskog dela morfometrijske analize koji se odnose na sadržaj vezivnog tkiva u adenohipofizi. Efekat veličine ove razlike je veoma veliki ( $\eta^2 = 0.71$ ).

Prosečna zapreminska gustina adrenokortikotropnih ćelija se takođe statistički značajno razlikuje između ispitivanih grupa ( $F(2,11) = 12.13$ ,  $p = 0.002$ ). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da su prosečne vrednosti ovog parametra statistički značajno više u II i III u odnosu na I grupu ( $p < 0.05$ ). Zapreminska gustina ACTH pozitivnih ćelija III grupe je viša u odnosu na II grupu, ali ta razlika nije statistički značajna ( $p > 0.05$ ) (*Grafikon 14B*). Efekat veličine uočenih razlika je i u ovom slučaju bio veliki ( $\eta^2 = 0.69$ ).

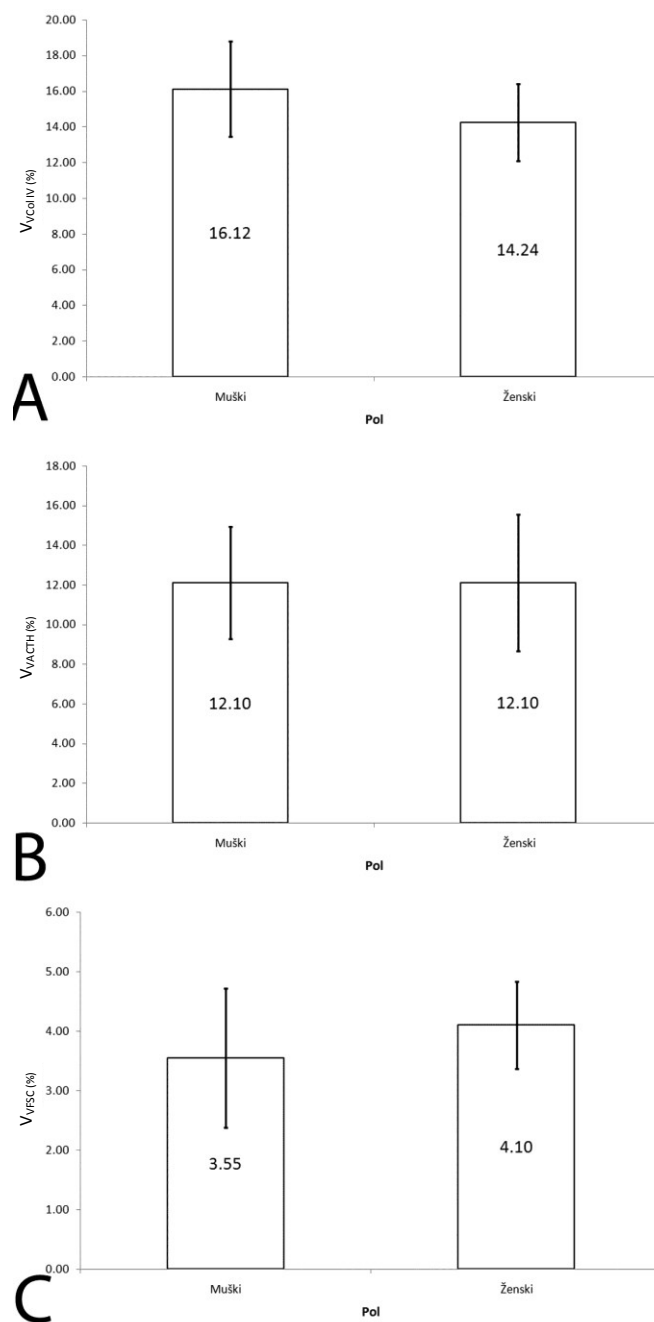
Konačno, prosečne vrednosti zapreminske gustine folikulostelatnih ćelija slučajeva I i II grupe su niže u odnosu na slučajeve III grupe (*Grafikon 14C*), ali ta razlika nije statistički značajna ( $p > 0.05$ ).

Prema tome, rezultati imunohistohemijske analize su u velikoj meri saglasni sa rezultatima histohemijske analize. Druga grupa, za koju je tokom histohemijske analize ustanovljeno da uključuje slučajeve približno iste starosti, zatim koji se karakterišu približno istim prisustvom vezivnog tkiva i sličnim stepenom hipertrofije ćelija adenohipofize, ali i slabijom vaskularizacijom u odnosu na III grupu, imunohistohemijski odlikuje sličan sadržaj kolagena tipa IV, kao i adrenokortikotropnih ćelija, kao i u III grupi. Vrednosti ovih parametara su više kod ove dve grupe u odnosu na I grupu. Ipak, prisustvo folikulostelatnih ćelija kod slučajeva II grupe je znatno niže u odnosu na III, a veoma slično stepenu njihovog prisustva u I grupi.



**Grafikon 14.** Prosečna zapreminska gustina kolagena tipa IV (A), adrenokortikotropnih ćelija (B) i folikulostelatnih ćelija (C) kod grupa dobijenih klasifikacionom analizom.

Konačno sadržaj kolagena tipa IV, adrenokortikotropnih ćelija, kao i folikulostelatnih ćelija ne razlikuje se statistički značajno ( $p > 0.05$ ) između imunohistohemijski analiziranih slučajeva muškog i slučajeva ženskog pola (*Grafikoni 15 A, B, C, D*).



**Grafikon 15.** Prosečna zapreminska gustina kolagena tipa IV (A), adrenokortikotropnih ćelija (B) i folikulostelatnih ćelija (C) kod imunohistohemijski analiziranih slučajeva muškog i ženskog pola.

# DISKUSIJA

---

U toku poslednjih decenija sve je više istraživača koji pretpostavljaju da su endokrine žlezde odgovorne za nastanak pojedinih promena koje se uočavaju u čovečijem organizmu tokom starenja. Potporu za te svoje tvrdnje su našli u sličnoj kliničkoj slici i patološkom supstratu različitih endokrinih poremećaja i određenih kliničkih sindroma koji se češće uočavaju kod starih individua. Šezdesetih godina XX veka značajan napredak u razumevanju hipotalamusnih regulatornih sistema je doprineo razvoju teorija koje su isticale u prvi plan ulogu alteracija neuroendokrinih regulatornih sistema u procesu starenja, što je bilo praćeno serijom eksperimenata u cilju njihovog daljeg širenja i potvrde. Tako su prikupljeni dokazi o uticaju hormona iz cirkulacije na pojavu starosnih promena u mozgu. Među njima se ističe i podatak da je kod pacova ustanovljena veza između obima starosnih promena mozga i intenziteta aktivnosti kore nadbubrežne žlezde tokom starenja. Napred navedene interakcije mozga i endokrinog sistema mogu rezultirati njegovim ubrzanim oštećenjem i pojavom posledičnih neuroendokrinih poremećaja. Uprkos velikom interesovanju za izdvajanje onih endokrinih faktora čija bi uloga bila ključna u starenju prvenstveno sisara, pokušaji da se to i eksperimentalno potvrdi su bili retki (Landfield i sar., 1980).

Endokrina, kao i sva ostala tkiva trpe tokom starenja strukturalne promene sličnog karaktera koje na kraju dovode do promena sekrecije odgovarajućih hormona. Pri tome, obrazac sekrecije hipotalamusnih i perifernih hormona se bitno razlikuje. Nivoi nekih hormona sa starenjem rastu, drugih opadaju, dok se nivoi ostalih hormona tokom starenja bitnije ne menjaju. Starenje hipofize se u funkcionalnom pogledu uglavnom manifestuje padom njene sekretorne aktivnosti, što potvrđuju rezultati pojedinih studija koje su detektovale snižene nivoe hormona rasta, prolaktina, tireostimulišućeg hormona i gonadotropina u krvi. Takav poremećaj ravnoteže u funkcionisanju endokrinih žlezda vodi ka pojavi sindroma zbog kojih se on predominantno karakteriše padom fizioloških funkcija (Landfield i sar., 1980; Rudman i sar., 1990; Herman i sar., 2001; Smith i sar., 2005).

Tokom starenja, značajne morfološke i funkcionalne promene se mogu uočiti na različitim nivoima HPA osovine. Značajan pad broja neurona i kompenzatorna gliosa se mogu uočiti u delovima hipotalamusa, hipokampusu i limbičkog sistema. Degenerativne promene na nivou hipokampusu koje se javljaju tokom fiziološkog starenja, mogu biti odgovorne za njegovu slabiju osetljivost na glikokortikoide, što za rezultat ima određeni stepen hiper-

aktivnosti HPA osovine kod zdravih starih ljudi (Ferrari i sar., 2001). HPA osovina u starosti postaje manje fleksibilna i manje senzitivna na signale negativne povratne sprege koji bi normalno doveli do efikasnog završetka odgovora na inicijalni stimulus. To može rezultirati sinergističkom kaskadom promena tokom kojih prolongacija povišenih nivoa glikokortikoida u krvi poreklom iz nadbubrežne žlezde može povećati rizik za nastanak pojedinih patoloških stanja koja se češće javljaju sa starenjem (Seeman i Robbins, 1994).

Uprkos velikom značaju koji se pridaje adenohipofizi za održavanje homeostaze celokupnog ljudskog organizma, studije o njenim strukturnim promenama tokom procesa starenja su veoma oskudne. Još su ređe kvantitativne studije koje bi ukazale na intenzitet istih. Adekvatne studije sprovedene na humanom materijalu napred navedenih promena hipofize su retke, tako da se u savremenoj literaturi mogu pronaći rezultati sličnih studija ali sprovedenih na eksperimentalnim životinjama. Među njima dominiraju kvantitativne imunohistohemijske, kao i elektronomikroskopske studije hipofize pacova (Takahashi i sar., 1983; Console i sar., 1994, 1995, 1997, 1998; Jurado i sar., 1998).

Makroskopski, ispitivanje starosnih promena hipofize vršeno je *in vivo* pomoću kompjuterizovane tomografije (CT). Tako su Peyster i sar. (1983) proučavajući volumen hipofize otkrili da je ona kod adolescenata krupnija u odnosu na osobe mlađe i starije životne starosti, kao i to da su njena prosečna zapremina i visina više kod žena u odnosu na muškarce. Prema njima, visina hipofize je pokazivala pad sa starenjem. Slične rezultate su dobili i Suzuki i sar. (1990) tokom svog istraživanja. Elster i sar. (1990) su tokom svog istraživanja došli do saznanja da je zapremina hipofize značajno viša kod adolescenata i odraslih u odnosu na decu. Lurie i sar. (1990) su koristeći magnetnu rezonancu (MRI) detektovali pad visine, volumena i poprečnog prečnika hipofize sa starenjem, dok polne razlike nisu uočili. Doraiswamy i sar. (1992) su merili visinu i poprečni prečnik hipofize, pri čemu su takođe došli do zaključka da vrednosti ovih parametara opadaju sa starenjem. Najviše vrednosti visine hipofize izmerene su kod ženskih osoba starosti od 20-40 godina. Najviše vrednosti visina hipofize dostiže kod muškaraca i žena u drugoj deceniji života. Argyropoulou i sar. (1991) su ispitivali visinu hipofize mladih osoba na sagitalnim MRI snimcima i uočili linearni porast njenih vrednosti počev od prve godine do puberteta, nakon čega se njene vrednosti nisu značajno menjale. U najvećoj studiji do tada sprovedenoj na preko hiljadu slučajeva starosti od 10-78 godina, Tsunoda i sar. (1997) su pratili visinu hipofiza na sagitalnim MRI snimcima. Generalno, rezultati ove studije su pokazali da je visina hipofize viša kod žena u odnosu na muškarce i da raste do 29. godine, nakon čega njene vrednosti opadaju. Najviši porast visine hipofize, napred navedeni autori su uočili kod žena starosti od 50-59 godina, što može da predstavlja posledicu



promena sekrecije gonadotropin rilizing hormona koje nastaju u tom periodu. Takano i sar. (1999) su proučavali volumen hipofiza osoba različite starosti i zabeležili nagli porast njegovih vrednosti tokom puberteta i to posebno kod žena. Volumen zadnjeg režnja hipofize nije se menjao sa starenjem. Tien i sar. (1992) su ispitivali vrednosti istog parametra kod dece i nisu zabeležili značajne razlike u odnosu na pol. MacMaster i sar. (2007) su u svojoj studiji naveli da mlađe žene imaju signifikantno viši volumen hipofize u odnosu na mlađe muškarce (starosti 14-17 godina). U ostalim starosnim grupama, nisu uočili razlike među polovima. Kod slučajeva muškog, kao i ženskog pola, mlađi subjekti su se karakterisali značajno nižim vrednostima kvantitativnih parametara hipofize u odnosu na starije slučajeve i to znatno izrazitije kod ženskog u odnosu na muški pol. Statistički značajna pozitivna korelacija između volumena hipofize i godina starosti uočena je i kod mlađih i kod starijih slučajeva ženskog pola. Kod muškaraca ova korelacija nije uočena. Ovi rezultati su saglasni sa rezultatima većine prethodnih istraživanja (Peyster i sar., 1983, 1986; Suzuki i sar., 1990; Doraiswamy i sar., 1992; Tsunoda i sar., 1997), osim u slučaju studije sprovedene od strane Lurie-a i sar. (1990), koji nisu pronašli razlike u volumenu hipofize među polovima. Polne razlike u volumenu hipofiza tokom odrastanja mogu biti objašnjene različitim hormonskim promenama kod muškog i ženskog pola u detinjstvu i adolescenciji. Ranija pojava puberteta kod ženskog pola može predstavljati osnovu za nastanak razlika u volumenu hipofize u odnosu na slučajeve muškog pola istog uzrasta (Hayakawa i sar., 1989; Elster i sar., 1990; Argyropoulou i sar., 1991; Takano i sar., 1999). Za razliku od prethodnih studija, Terano i sar. (1996) su ispitivali predominantno starosne promene hipofize primenom MRI metode. Njihovi rezultati su ukazali da su visina, širina i volumen hipofize starijih subjekata značajno niži u odnosu na iste mlađih slučajeva. Prazna sella turcica je mnogo češće registrovana kod starih, i to naročito osoba ženskog pola (19%) u odnosu na mlađe. U funkcionalnom smislu, nije ustanovljena veza između veličine ili volumena hipofize i bazalnih nivoa njenih hormona.

Kunihiko i sar. (2002) su se u svojoj kliničkoj MRI studiji bavili morfološkim promenama hipofize kod slučajeva različitog uzrasta i pola. Njihovi rezultati su potvrdili da tokom puberteta dolazi do porasta njene visine, sa najvišim vrednostima tokom perioda od treće do pete decenije života. To su objasnili činjenicom da su u prvoj i drugoj deceniji života dimenzije kranijuma manje, što neposredno uslovljava manje dimezije svih struktura unutar njega, pa samim tim i hipofize. Drugo, hipofiza je endokrinološki najaktivnija kod žena za vreme reproduktivnog perioda između treće i pete decenije života. Konačno, kod starijih osoba dolazi do pojave ishemijske degeneracije adenohipofize (Roppolo i sar., 1983; Elster i sar., 1990; FitzPatrick i sar., 1999). Visina hipofize može da se menja i usled pritiska anatomskih stru-

ktura u okolini turskog sedla. Kunihiro i sar. (2002) su proučavali i oblik hipofize. Kod 88% muškaraca mlađih od 20 godina hipofize su bile zaravnjene. Učestalost ovakve njene forme je padala tokom starenja i uočena je kod 52% muškaraca starosti od 20-49 godina, dok je konveksni tip hipofize nađen u 26% slučajeva. U grupi muškaraca starijih od 50 godina konkavni tip hipofize je uočen kod 50%, dok je zastupljenost zaravnjenog tipa rasla i dostigla 35%. Kod žena, oko polovina individua starosti ispod 20 godina karakterisalo je prisustvo konveksnog tipa hipofize, čemu je prethodio porast njene visine. On se može objasniti disproporcijom između izrazitog povećanja endokrinološke aktivnosti u tom periodu života, a nedovoljnim uvećanjem volumena intraselarnog prostora. Distribucija ostalih morfoloških tipova hipofize u drugim starosnim grupama bila je ista kao kod muškaraca.

Kada su u pitanju studije koje su se bavile ispitivanjem starosnih promena hipofize na mikroskopskom nivou, kao i kod sličnih studija sprovedenih na drugim endokrinim i neendokrinim strukturama, u centru njihove pažnje nalazili su se dinamika celularnosti, zatim prisustva vezivnog tkiva i prokrvljenosti hipofize tokom ovog procesa.

Što se celularnosti tiče, tokom našeg istraživanja vršena je kvantifikacija veličine i oblika ćelija adenohipofize, kao i merenje optičke gustine tkiva adenohipofize. Rezultati su ukazali da veličina endokrinih ćelija adenohipofize značajno raste tokom starenja, što se može pripisati njihovoj kompenzatornoj hipertrofiji. Porast njihove veličine nije praćen značajnijom promenom njihovog oblika. Paralelno sa ovim promenama, uočen je i porast optičke gustine tkiva adenohipofize starijih slučajeva, što bi moglo indirektno da ukaže na povećano prisustvo bazofilnih ćelija kod njih. Kada su u pitanju polne razlike, slučajevi ženskog pola se karakterišu krupnijim endokrinim ćelijama, pravilnijeg oblika u odnosu na iste muškog pola, dok više vrednosti optičke gustine kod muškog pola mogu indirektno da ukažu na veće prisustvo bazofila u odnosu na slučajeve ženskog pola. Porast broja bazofila adenohipofize starih životinja uočili su i Danilova i sar. (1988). Oni takođe navode da je taj porast praćen istovremenim smanjenjem broja acidofila. Isti autori ne navode u rezultatima svoje studije prisustvo polnih razlika, kao ni moguće razloge porasta prisustva bazofila tokom starenja. Kako bazofili predstavljaju heterogenu populaciju ćelija, Danilova i sar. (1988) ne navode dalje da li je taj porast posledica porasta broja kortikotropa, tireotropa ili gonadotropa. Porast zapreminske gustine kortikotropa koji je tokom našeg istraživanja uočen kod najstarijih slučajeva može delimično da objasni napred navedeni porast bazofila od strane Danilova i sar. (1988). Značajne razlike između slučajeva ženskog i muškog pola, kada je u pitanju zapreminska gustina ACTH ćelija nisu uočene ni tokom naše studije. Uočeni porast prisustva kortikotropnih ćelija kod starih slučajeva tokom našeg istraživanja indirektno podupire i porast nivoa ACTH

u serumu zdravih starih individua od strane Herman-a i sar. (2001). Prema njima, porast sekrecije ACTH sa starenjem, a samim tim i porast broja kortikotropa, nastaje kao posledica poremećene sekrecije CRH iz parvocelularnog dela PVN-a hipotalamusa, koje predstavlja u hijerarhijskom smislu najviši centar HPA osovine. Njegovi neuroni pokazuju brojne starenjem izazvane funkcionalne promene među kojima je smanjena sinteza i sekrecija CRH od značaja za funkcionisanje HPA osovine. Isti autori (Herman i sar., 2001) pretpostavljaju da je povišena sekrecija ACTH posledica povišene osetljivosti adenohipofize na CRH. Napred navedeni pad sekrecije CRH bi mogao da predstavlja i stimulus za paralelni kompenzatorni porast prisustva kortikotropnih ćelija adenohipofize, mehanizmom hiperplazije ili njihove hipertrofije, uočen tokom našeg istraživanja. To bi dodatno moglo da objasni porast nivoa ACTH tokom starenja registrovan od strane Herman-a i sar. (2001). Dodatno, Landfield i sar. (1980) navode da vrednosti ACTH rastu nakon dejstva akutnog stresa. Taj fenomen je praćen hipersenzitivnošću adrenalnog korteksa na izlučeni hormon, što na kraju onemogućava adekvatnu regulaciju i prekid sekrecije glikokortikoida mehanizmom negativne povratne sprege. Hipertrofija zone fascikulate i zone retikularis nadbubrežne žlezde registrovana od strane Hauger-a i sar. (1994) verovatno bi mogla da predstavlja krajnju kariku u čitavom procesu. Starenje predstavlja proces tokom koga je čovečiji organizam izložen dejstvu hroničnog stresa. Uočena pozitivna korelacija između nivoa ACTH, kortikosterona i težine nadbubrežne žlezde sa jedne i starosti eksperimentalnih životinja, sa druge strane od strane Landfield – a i sar. (1980) bi indirektno mogla da ukaže da slični mehanizmi mogu biti odgovorni za pojačanu aktivaciju HPA osovine kod zdravih starih individua.

U savremenoj literaturi prisutni su podaci i o dinamici prisustva ostalih funkcionalnih tipova endokrinih ćelija adenohipofize tokom procesa starenja. Tako su Sun i saradnici (1984) tokom svog istraživanja na humanim hipofizama konstatovali značajan pad broja i veličine somatotropa sa starenjem. Console i saradnici (1993) su proučavali starosne promene morfologije i funkcije somatotropa (STH) kod pacova. Oni su kvantitativnom imunohistohe-mijskom analizom ustanovili signifikantan pad broja, volumenske i površinske gustine, kao i blaži ali takođe signifikantan pad aree i perimetra somatotropa. Console i sar. (1994) su proučavali prisustvo gonadotropa tokom procesa starenja. Gonadotrope su opisali kao jasno definisan tip ćelija sa heterogenom distribucijom u pars distalis-u hipofize svih starosnih grupa. Dobjijene vrednosti stereoloških parametara (numerička, volumenska i površinska gustina) oba tipa gonadotropnih ćelija (FSH i LH) pokazale su značajan pad tokom starenja. Area i perimetar gonadotropa starijih pacova su bili statistički značajno niži u odnosu na iste ćelija mlađih životinja. Ipak, zabeleženi pad prisustva napred navedenih ćelija nije bio praćen odgo-

varajućim padom nivoa LH i FSH. U narednoj svojoj studiji, Console i sar. (1995) su izučavali starosne promene tirotropa pacova. Rezultati imunohistohemijske i radioimunološke analize adenohipofize ukazali su na značajan pad broja, volumenske i površinske gustine, kao i pad aree i perimetra ovih ćelija tokom procesa starenja. Nasuprot ćelijama, bazalni nivoi TSH u serumu su tokom starenja pokazali porast. Konačno, Console i sar. (1997; 1998) su dokazali i signifikantan pad celularne i volumenske gustine laktotropa kod pacova muškog pola. Kod pacova ženskog pola zabeležen je značajan pad samo celularne gustine istih. Ultrastrukturalna analiza laktotropa starih pacova ukazala je na hiperstimulaciju ovih ćelija kod njih, sa prisustvom prolaktotropa u fazi involucije. Nivoi prolaktina u serumu su tokom starenja pokazali značajan porast kod ženskog, dok se kod muškog pola nisu značajno menjali. Prema tome, na osnovu napred navedenog, može se zaključiti da kod većine funkcionalnih tipova endokrinih ćelija adenohipofize dolazi do pada prisustva tokom starenja. Ipak, sekrecija odgovarajućih hormona ostaje stabilna, što ukazuje na moguću hipertrofiju preostalih ćelija i saglasno je porastu veličine ćelija adenohipofize koji je uočen kod starijih slučajeva tokom naše studije.

Danilova i sar. (1988) su analizirali ultrastrukturne promene tokom starenja svih funkcionalnih tipova endokrinih ćelija adenohipofize pacova. Kortikotropne ćelije starih slučajeva karakterisale su se krupnim euhromatskim jedrima unutar kojih su se uočavala jedarca sa razvijenom granularnom komponentom. Endoplazmatski retikulum je bio sačinjen od sitnih vakuola, koje su u pojedinim ćelijama bile veoma distendirane. Goldžijev aparat je bio dobro razvijen i u njegovoj okolini su se uočavale novoformirane sekretorne granule. Normalno, kod mlađih životinja u kortikotropnim ćelijama uočavao se veći broj mitohondrija. Sekretorne granule su im bile raspoređene u vidu nizova, neposredno do plazma membrane, pri čemu je njihov broj bio donekle viši u odnosu na starije slučajeve. Takođe su uočena i mnogobrojna lizosomalna telašca i lipidne kapi. Dodatno, adenohipofize starih životinja sadržale su veći broj tamnih i distrofično izmenjenih endokrinih ćelija, što govori u prilog njihovoj progresivnoj degeneraciji tokom starenja. Ostale, morfološki normalne ćelije su većinom ispoljavale ultrastrukturne znake pojačane funkcije. To je imalo za posledicu očuvanje bazalnih nivoa sekrecije hormona, ali i iscrpljivanje funkcionalne rezerve adenohipofize starih u poređenju sa mlađim slučajevima. Prema tome, u hipofizi se tokom starenja uočava kompenzatorna strukturalna reorganizacija usmerena ka održavanju njene normalne funkcije, što omogućava održavanje osnovnih homeostatskih mehanizama organizma koji stari i saglasno je rezultatima naše studije.

Prema tome, iz gore navedenog može se zaključiti da tokom procesa starenja dolazi do značajnog pada broja većine funkcionalnih tipova endokrinih ćelija adenohipofize. To je praćeno paralelnim procesom porasta veličine preostalih ćelija istog funkcionalnog tipa i može da se objasni procesom kompenzatorne hipertrofije kojim ljudski organizam pokušava da nadoknadi gubitak funkcionalnih ćelija. Na taj način, nivoi hormona koji predstavljaju produkt sekrecije adenohipofize se uglavnom ne menjaju značajno kod zdravih starih individua u odnosu na iste mlađeg uzrasta. Rezultati linearne regresione analize naše studije ukazali su na prisustvo statistički značajne pozitivne korelacije između starosti ispitanih slučajeva i veličine ćelija adenohipofize, što je saglasno sa rezultatima napred navedenih studija.

Proliferacija vezivno tkivnih struktura predstavlja veoma bitnu komponentu starosnih promena većine organa ljudskog organizma. Studije koje su se bavile proučavanjem vezivnog tkiva i komponentama ekstracelularnog matriksa adenohipofize tokom procesa starenja su malobrojne.

Danilova i sar. (1988) su sprovedi ultrastrukturnu analizu adenohipofize više vrsta eksperimentalnih životinja tokom procesa starenja. U hipofizi starih životinja svih proučavanih vrsta uočene su suštinske strukturalne promene strome. Njena kapsula se sastojala iz većeg broja slojeva vezivnog tkiva, uz prisutna žarišta hijalinoze. Vaskularizacija žlezde je bila slabija u odnosu na mlađe slučajeve, dok su perikapilarni prostori bili prošireni, a bazalne membrane krvnih sudova zadebljane. Broj pseudofolikula sa sadržajem sličnim koloidu glikoproteinske prirode je bio viši kod starih životinja.

Ayisi i sar. (1982) su takođe u svojoj studiji naveli da, kao direktna posledica starenja, dolazi do redukcije parenhima adenohipofize sa smanjenjem broja i atrofijom preostalih endokrinih ćelija, i istovremene proliferacije vezivnog tkiva, posebno kolagena. Osim perivaskularne fibroze, autori napred navedene studije navode da u hipofizama slučajeva starijih od 90 godina se mogu uočiti i sporadično prisustvo fokalne nekroze, ožiljnog tkiva, adenoma, depozita gvožđa ili amiloida, bazofilne invazije, nakupina skvamoznih ćelija, kao i granularnih ćelija nalik tumorskim. Mi tokom naše studije nismo uočili promene takve prirode u izučavanom materijalu.

Sano i sar. (1993) su primenom semikvantitativnih metoda ustanovili prisustvo najpre intersticijalne i perivaskularne fibroze koja se zatim širila i zahvatala i parenhimalne strukture hipofize kod 88% slučajeva starosti preko 90 godina i to predominantno muškog pola. Isti autori čak navode da je kod nekoliko slučajeva praktično cela žlezda je bila zahvaćena fibrozom. Proliferacija vezivnog tkiva je bila najintenzivnija u središnjem (medijalnom) delu žlezde, koji inače karakteriše veće prisustvo vezivnog tkiva u odnosu na njene lateralne delove

(“krila”). Zato su Sano i sar. (1993) procenu stepena fibroze adenohipofize vršili na osnovu intenziteta prisustva vezivnog tkiva u lateralnim delovima pars distalis-a. Umerenije forme fibroze karakterisale su se blagom proliferacijom perivaskularnog vezivnog tkiva. Teže forme karakterisalo je prisustvo ekstenzivnije proliferacije vezivno tkivnih komponenti i u preostalim delovima parenhima adenohipofize, što je bilo praćeno narušavanjem njegove normalne arhitekture i na kraju degeneracijom i gubitkom plemenitog tkiva žlezde. Napred navedene promene su prema Sano-u i saradnicima (1993) bile najupadljivije u onim partijama lateralnih “krila” pars distalis-a, u kojima su normalno smeštene laktotropne ćelije. Izrazita fibroza, uočena kod najstarijih slučajeva, je prema njima bila udružena sa znatnim povećanjem rastojanja između krvnih sudova i parenhimskih ćelija u odnosu na slučajeve sa blažom fibrozom. Citoarhitektura hipofiza slučajeva muškog pola starosti preko 60 godina bila je u značajno većoj meri narušena intenzivnom fibrozom u odnosu na iste ženskog pola. Kada su u pitanju funkcionalni tipovi endokrinih ćelija, progresivna fibroza je bila praćena istovremenim padom broja somatotropa u lateralnim delovima adenohipofize, dok se broj ćelija ostalih tipova nije menjao značajnije tokom procesa starenja (Sano i sar., 1993). Podaci o eventualnom prisustvu hipertrofije preostalih ćelija koje sekretuju hormon rasta nisu prikazani od strane gore navedenih autora.

Kada je u pitanju proliferacija vezivnog tkiva u adenohipofizi tokom starenja, Alves i sar. (2002) su tokom svog istraživanja ustanovili da ona potiče predominantno od porasta kako međućelijskog, tako i perivaskularnog vezivnog tkiva, sačinjenog pretežno od kolagenih vlakana. Nishimura i sar. (2004) su analizirali trodimenzionalnu strukturu kolagena adenohipofize eksperimentalnih životinja, pri čemu su zaključili da kolagena vlakna, slično drugim endokrinim žlezdama, formiraju gnezda u kojima se nalaze grupe parenhimnih ćelija. Oni su u imunohistohemijskom delu svog istraživanja ispitivali prisustvo kolagena tipa I, III, IV, V i VI u različitim delovima adeno- i neurohipofize. Prisustvo kolagena tipa IV je detektovano u bazalnim membranama, dok su ostali tipovi kolagena registrovani u preostalim delovima parenhima hipofize i ispoljavali sličnu distribuciju vlakana. Trodimenzionalna organizacija kolagena je u endokrinom tkivu do tada bila dobro proučena jedino u nadbubrežnoj (Kikuta i sar., 1991) i tiroidnoj žlezdi (Morita i sar., 1994). Nishimura i sar. (2004) su prvi prezentovali podatke o postojanju trodimenzionalne strukture kolagenih vlakana u pars distalis-u adenohipofize, slične onoj opisanoj u meduli nadbubrežne i u okolini folikula tiroidne žlezde. Na osnovu svega navedenog, oni su zaključili da je arhitektura kolagenih vlakana zajednička za različite endokrine žlezde. Dalje, Nishimura i sar. (2004) su uočili da se u pars distalis-u gustina rasporeda kolagenih vlakana koja oblažu površinu krvnih sudova menja u zavisnosti od

veliĉine krvnog suda. Zadebljanje bazalnih membrana, naroĉito sinusoidnih kapilara nastaje kao posledica proliferacije kolagenih vlakana i to naroĉito kod krvnih sudova veĉeg kalibra, a neĉto reĉe kada su u pitanju krvni sudovi manjeg kalibra ili sinusoidi. Dodatno, ova studija je pokazala da se arhitektura kolagenih vlakana razlikuje u razliĉitim delovima adeno- i neurohipofize. Snopovi kolagenih vlakana koji su okruŹivali velike grupe ćelija pars intermedia su posedovali atipičnu strukturu i razlikovali se od istih u ostalim delovima hipofize. Naime, mreŹa kolagenih vlakana središnjeg dela je bila znatno grublja u odnosu na npr. dorzalni region, dok je njihova konfiguracija u neurohipofizi poprimala sunderoliku konformaciju sa vlaknima koja su imala spiralan ili talasast pravac pruŹanja.

Bailey i sar. (1998) su se bavili izuĉavanjem mehanizama maturacije i starenja kolagena. Prema njima, sa starenjem dolazi do fiziĉkih promena kolagene mreŹe u razliĉitim delovima tela, Źto rezultira slabijom elastiĉnošću koŹe, ligamenata, tetiva i kostiju. Tkiva postaju rigidnija, krta i lomljiva. Promene ovog tipa oteŹavaju optimalnu funkciju lokomotornog sistema, negativno utiĉu na elastiĉnost krvnih sudova i filtracionu sposobnost bazalnih membrana. Takoĉe, slabljenje interakcija izmeĉu ćelija i ekstracelularnog matriksa kod starih individua izaziva smanjenje efikasnosti bazalnih membrana. Gore navedeni autori takoĉe navode da sa starenjem raste otpornost kolagenih vlakana pri istezanju, dok njihov dijametar moŹe da opada. Sa starenjem je moguća i promena hemijskog sastava vlakana (Mays i sar., 1991). Od posebnog znaĉaja je glikozilacija kolagena i elastina, Źto predstavlja ključni momenat u patologiji vaskularnog sistema (Newton i Dixit, 2012). Bailey i sar. (1998) navode da glikozilacijom kolagena on postaje slabije rastvorljiv i rezistentan na dejstvo enzima. Bazalne membrane saĉinjene od kolagena tipa IV postaju krute zbog pojaĉanog unakrsnog povezivanja kolagenih vlakana. To rezultira njihovom povećanom permeabilnošću i slabijim priĉvršćivanjem endotelnih ćelija za njihovu površinu. Smanjenje elastiĉnosti retinalnih kapilara, renalnih glomerula i zidova arterijskih krvnih sudova predstavljaju fenomene koji nastaju kao posledica napred navedenih procesa prisutnih tokom procesa starenja. Ayisi i sar. (1982) su naveli da kada je u pitanju proliferacija vezivnog tkiva u adenohipofizi tokom starenja, uglavnom se radi o kolagenu tipa IV. Ovi autori su biohemijski, u oviru fibroze hipofize starih sluĉajeva dokazali znaĉajan porast nivoa hidroksiprolina u sastavu kolagena. Prema njima, sa starenjem, izrazitije promene ovog karaktera se detektuju u adeno- u odnosu na neurohipofizu, ali uprkos svemu navedenom ne remete ozbiljnije sekreciju hipofiznih hormona. Izmenjene fiziĉke osobine kolagenih vlakana hipofize naroĉito remete funkciju bazalnih membrana krvnih sudova dovodeći do poremećaja njihove permeabilnost i smanjenja priĉvršćenosti endotela, ta-

ko da proliferacija vezivnog tkiva pored redukcije parenhima adenohipofize, povlači za sobom i poremećaj funkcije njenih krvnih sudova.

Rezultati stereološke analize histohemijski i imunohistohemijski obrađenih tkivnih preseka adenohipofize sprovedene tokom našeg istraživanja (Pavlović i sar., 2013b) saglasni su sa rezultatima studija koje su se bavile analizom promena njenog vezivnog tkiva tokom procesa starenja (Sano i sar., 1993; Ayisi i sar., 1982). Zapreminska gustina vezivnog tkiva, kao i kolagena tipa IV u adenohipofizi je pozitivno korelirala sa starošću ispitanih slučajeva. Prednji režanj adenohipofize starijih slučajeva karakterisao se upadljivom proliferacijom vezivnog tkiva, kao i kolagena tipa IV, znatno debljim vezivno-tkivnim pregradama sačinjenim od znatno gušće raspoređenih vezivno-tkivnih i vlakana kolagena tipa IV između kojih su uočavana retka vretenasta jedra fibrocita. Unutar pregrada uočavani su krvni sudovi okruglog lumena sa zadebljalim zidom unutar koga je uočavana znatno intenzivnija imunoreaktivnost na kolagen tipa IV u odnosu na mlađe slučajeve. Kalibar takvih krvnih sudova je bio znatno manji u odnosu na isti mlađih slučajeva. Poremećaj vaskularizacije adenohipofize je bio povezan sa proliferacijom vezivnog tkiva, što je primenom stereološke analize kvantifikovano statistički značajnim padom zapreminske i površinske gustine njenih krvnih sudova. Sve to je indirektno ukazivalo na mogući pad funkcije adenohipofize sa starenjem i bilo saglasno promenama opisanim od strane već pomenutih autora (Ayisi i sar., 1982; Bailey i sar., 1998).

Brojne studije su ukazale na mogući funkcionalni pad sintetske i sekretorne aktivnosti pars distalis-a sa starenjem (Crew i sar., 1987; Ho i sar., 1987; Parenti i sar., 1987; Rudman i sar., 1990; Spik i sar., 1989; Urban i sar., 1988; Zbuzek i sar., 1991). Prema njima, proces starenja direktno dovodi do pada sekrecije hormona sa starenjem, što je praćeno i slabijim odgovorom ćelija koje ih luče na sekretagoge. Stavovi o nivoima adenohipofiznih hormona tokom starenja su protivurečni. Tako su Goldman i sar. (1988) našli da tokom starenja dolazi do uvećanja mase hipofize pacova pri čemu broj hormon sekretujućih ćelija ostaje uglavnom nepromenjen. Samo je blagi porast broja laktotropa uočen kod slučajeva ženskog pola tokom procesa starenja. Ovaj podatak može da objasni činjenicu da napred navedeni autori (Goldman i sar., 1988) nisu uočili značajne promene koncentracije hormona u prve dve godine života eksperimentalnih životinja. U kasnijim periodima života, uočena je redukcija parenhima adenohipofize i prateće sniženje koncentracija pojedinih hormona. Ipak ukupni sadržaj hormona ostaje konstantan, što napred navedeni autori (Goldman i sar., 1988) objašnjavaju mogućom relokacijom i proliferacijom gonadotropa i tirotopa. Konačno, promene funkcije hipofize tokom starenja neminovno utiču na rad brojnih target organa, kao i drugih endokrinih žlezda, što na kraju rezultira poremećajem mehanizma negativne povratne sprege.



Otkriće FS ćelija u adenohipofizi sredinom prošlog veka dovelo je do porasta interesovanja istraživača za njihovu strukturu i funkciju, kao i njihovu ulogu u funkciji hipofize tokom procesa starenja. Cardin i sar. (2000) su utvrdili da FS ćelije čine 3-8% ćelija u adenohipofizi. Primenom anti – S-100 antitela uočena je pozitivna reakcija jedra i citoplazme u perinuklearnom regionu, dok su njene periferne zone bile slabo pozitivne, što smo i mi uočili tokom našeg istraživanja. Kada je u pitanju distribucija FS ćelija u parenhimu hipofize, Sato i sar. (2005) navode da su FS ćelije pretežno lokalizovane u bazalnoj regiji i tranzitornoj zoni hipofize pacova, istovremeno pokazavši povezanost između distribucije FS ćelija i krvnih sudova adenohipofize, što je u skladu sa navodima Soji i sar. (1994). Mi smo tokom našeg istraživanja uočili najveću zastupljenost S-100 pozitivnih ćelija u intermedijarnom i u znatno manjoj meri u lateralnim delovima adenohipofize.

Marin i sar. (1989) su ukazali na postojanje različitih tipova FS ćelija u humanoj hipofizi na osnovu njihove lokalizacije i tinktorijalnih karakteristika. U pars intermedia hipofize pacova, FS ćelije su posedovale iregularna jedra, zvezdast oblik i duge citoplazmatske produžetke preko kojih su ove ćelije bile u kontaktu sa melanotropima, folikulima ili sa Rathke-ovim špagom. U ovom delu hipofize vaskularizacija je bila oskudna, a prisutni folikuli široki (Acosta i sar., 2009), nasuprot sitnijim folikulima opisanim od strane Mohamed-a i sar. (2000) u pars distalis-u hipofize. Acosta i sar. (2010) su u pars distalis-u kao celini uočili postojanje pleomorfnih FS ćelija sa kratkim citoplazmatskim produžecima koji su bili u kontaktu sa endokrinim ćelijama i krvnim sudovima. Manja veličina folikula i kratki citoplazmatski produžeci FS ćelija su, prema njima, verovatno povezani sa bogatom vaskularizacijom ovog dela hipofize. Folikulostelatne ćelije su pored S-100 proteina, eksprimirale GFAP (anti-glijal fibrillary acidic protein) i vimentin, koji su poznati kao markeri zrelih i nezrelih glijalnih ćelija i astrocita. Ovakve imunohistohemijske karakteristike FS ćelija upućuju na njihovo moguće neuroektodermalno poreklo (Acosta i sar., 2009). Shodno tome, različita ekspresija navedenih proteina u različitim fazama ćelijskog ciklusa FS ćelija, prema Marin-u i sar. (1989), Cardin-u i sar. (2000) i Acosta-i i sar. (2009) navode na mogućnost postojanja različitih funkcionalnih stadijuma u njihovom ćelijskom ciklusu, koji su praćeni ekspresijom različitih produkata njihove sintetske aktivnosti i manifestuju se njihovim različitim imunohistohemijskim karakteristikama. Cardin i sar. (2000) su tokom svog istraživanja na lasicama definisali prisustvo 2 tipa FS ćelija na osnovu njihovih morfoloških i imunohistohemijskih karakteristika. U tip 1 su svrstali ćelije koje su se karakterisale zvezdastim oblikom i dugim citoplazmatskim nastavcima koji su okruživali endokrine ćelije. Tip 2 su predstavljale okrugle ćelije sa bledo ili tamno prebojenim okruglim jedrom, bez uočljivih citoplazmatskih nastavaka. Slične re-

zultate su prethodno u svojim radovima dali Kagayama (1965) i Orgnero i sar. (1993). Brojnost ćelija ova dva tipa je bila srazmerna sa nivoom prolaktina i obrnuto srazmerna sa nivoom gonadotropina i ispoljavala je sezonski karakter. Tako su ćelije tipa 1 bile mnogo brojnije i ispoljavale su jaku S-100 imunoreaktivnost tokom proleća, u vreme reproduktivnog perioda sa visokim nivoom prolaktina i niskim nivoom gonadotropina. Nasuprot njima, ćelije tipa 2 su bile organizovane u klastere koji su se uvećavali tokom zime, izvan reproduktivnog perioda koji se karakterisao niskim nivoom prolaktina i visokim nivoom gonadotropina. Ukupan broj FS ćelija se nije značajno menjao tokom oba perioda, što navodi na zaključak da dva napred navedena tipa FS ćelija predstavljaju, u stvari, dva različita morfološka i funkcionalna stadijuma jedne iste vrste ćelija, što je zavisilo od endokrinog statusa jedinke (Cardin i sar., 2000).

Kada je u pitanju starenje, Danilova i sar. (1988) su izučavali ultrastrukturne starosne promene FS ćelija. Folikulostelate ćelije starih životinja su ispoljavale umeren stepen hipertrofije i sadržale povećan broj slobodnih ribozoma i polizoma. Jedro je bilo euhromatično i ispoljavalo je strukturalne znake biosintetske aktivnosti. Endoplazmatski retikulum je bio blago vakuoliziran. Sekretorne granule poreklom od Goldžijevog aparata, lizosomalna telašca i lipidne kapi su retko uočavani. U citoplazmi su uočavane brojne sitne mitohondrije. U pojedinim FS ćelijama, sitne sekretorne granule su bile prisutne u citoplazmatskim nastavcima lokalizovanim u neposrednoj okolini kapilara. Egzocitoza je uočavana mestimično.

Uprkos sve većem interesovanju istraživača i otkrićima bitnih funkcija koje FS ćelije imaju, u savremenoj literaturi retki su podaci o kvantifikaciji njihovog prisustva tokom starenja kod čoveka. Istraživanja takvog karaktera su izvođena isključivo na eksperimentalnim životinjama i njihovi rezultati su kontradiktorni (Weiss i sar., 1953; Sasaki, 1988; Allaerts i sar., 1997; Console i sar., 2000). Console i sar. (2000) su proučavali broj S-100 pozitivnih ćelija u adenohipofizi pacova tokom starenja. Njihova studija je pokazala progresivni pad prisustva FS ćelija kod starih u odnosu na mlađe eksperimentalne slučajeve. Naime, morfometrijska analiza je ukazala na signifikantan pad volumenske i numeričke gustine ovih ćelija tokom procesa starenja kod slučajeva oba pola. Nasuprot napred navedenoj, druge studije su fokusirale svoju pažnju na dinamiku prisustva S-100 pozitivnih ćelija tokom postnatalnog perioda života eksperimentalnih životinja. Tako su Allaerts i sar. (1997) otkrili upečatljiv porast broja S-100 pozitivnih ćelija tokom ovog perioda. Oni takođe navode porast broja S-100 pozitivnih ćelija i tokom procesa starenja. Soji i sar. (1994) su u svojoj studiji pokazali da tokom postnatalnog perioda raste gustina FS ćelija. Populacija S-100 pozitivnih ćelija u njihovim slučajevima bila je distribuirana unutar prednjeg režnja hipofize kod mladih životinja

dok je broj ćelija na periferiji žlezde rastao sa starenjem. Soji i sar. (1994) su takođe ustanovili da se kod starijih životinja S-100 imunoreaktivne ćelije nalaze u neposrednoj okolini krvnih sudova u hipofizi. Scanes i sar. (2005) su tokom svoje eksperimentalne studije sprovedene na pacovima takođe zaključili da postoji veza između prisustva FS ćelija i starenja. Oni su naveli da u adenohipofizi tokom starenja značajno raste broj folikula obloženih napred navedenim ćelijama ispunjenih koloidom. Oni dalje navode da FS ćelije verovatno učestvuju u produkciji dela folikularnog koloida i da postoji bliska povezanost ovih ćelija, folikularnog koloida i hormon-sekretujućih ćelija. Prema njima, FS ćelije nisu nasumično razbacane u pars distalis-u. One okružuju folikule i locirane su neposredno do laktotropa, gonadotropa i kortikotropa, što navodi na pretpostavku da postoji dinamička komunikacija FS ćelija i gore navedena tri tipa endokrinih ćelija i parakrina regulacija sekrecije njihovih hormona od strane FS ćelija (Luziga i sar., 2006; Luziga i sar., 2009; Kagayama, 1965; Kameda, 1991; Ogawa i sar., 1996; Ogawa i sar., 1997). Somatotropi, iako široko rasprostranjeni unutar parenhima pars distalis-a, nisu lokalizovani u blizini folikula. Tirotropi, koji su uglavnom prisutni u medijalnom regionu, nisu uočeni u blizini FS ćelija ili folikula. Folikulostelatne ćelije poseduju duge citoplazmatske nastavke preko kojih su ove ćelije u kontaktu sa sekretornim ćelijama i krvnim sudovima. Međusobno su povezane međućelijskim vezama tipa dezmozoma, a kod onih koje oblažu lumen folikula, veliki broj mikrovila pružao se od njihovog apikalnog pola do folikularnog lumena (Acosta i sar., 2010).

Console i sar. (2000) su se bavili kvantitativnom imunohistohemijskom analizom progresivnih promena koje se javljaju na FS ćelijama pacova tokom starenja uopšte ili tokom određenog perioda u toku starenja. Oni su zaključili da je tokom starenja prisutan progresivan pad broja FS ćelija eksperimentalnih životinja oba pola. Analiza morfoloških parametara pokazala je signifikantan pad njihove volumenske i numeričke gustine kod starih pacova u poređenju sa mlađim životinjama oba pola. Oni su registrovali homogenu distribuciju FS ćelija u hipofizi, zatim njihov blizak odnos sa sekretornim ćelijama, što je u skladu sa navodima gore pomenutih autora. U završnom delu svoje studije, Console i sar. (2000) navode da proces starenja značajno utiče na pojavu umerenih ultrastrukturnih promena FS ćelija, sličnih onim koje su registrovane i na njenim endokrinim ćelijama.

Nasuprot prethodnoj studiji, Soji i sar. (1994) su u rezultatima svoje studije prezentovali značajan porast broja FS ćelija kod pacova sa starenjem, dodatno sugerišući da stepen ekspresije S-100 proteina predstavlja indikator stadijuma njihovog morfološkog sazrevanja. Slično tome, nekoliko studija je na osnovu morfoloških karakteristika i imunofenotipa demonstriralo

postojanje različitih fizioloških stadijuma FS ćelija (Cardin i sar., 2000; Marin i sar., 1989; Kagayama, 1965).

Mi smo tokom naše studije, slično Soji-u i sar. (1994) detektovali signifikantan rast zapremine gustine FS ćelija kod najstarijih slučajeva. Odsustvo statistički značajnog porasta kod slučajeva srednje životne dobi može se objasniti prisustvom individualnih razlika u procesu starenja. U tom svetlu, veće prisustvo FS ćelija u III i najstarijoj starosnoj grupi može da predstavlja bilo komponentu uspešnog starenja ili neposredan znak predstojeće smrti. Linearna regresiona analiza je pokazala da starost u umerenoj meri objašnjava varijansu prisustva FS. Ista analiza je dodatno ukazala da prisustvo FS u umerenoj meri objašnjava varijansu prisustva ACTH ćelija. Kako je tokom naše studije ustanovljena pozitivna korelacija između prisustva ACTH ćelija i starosti ispitanih slučajeva, može se zaključiti da postoji međusobna povezanost starenja, FS i ACTH ćelija u adenohipofizi i da se razjašnjenjem mehanizama koji stoje u njenoj osnovi mogu delimično objasniti promene funkcije HPA osovine koje se javljaju sa godinama.

Mnogi autori smatraju da imuni sistem čoveka trpi izvesne promene tokom procesa starenja (Salminen i Kaarniranta, 2010). Najpre se javljaju epigenetske promene pod uticajem faktora sredine (Bayarsaihan, 2011). Ponavljani antigeni stres tokom života individue podstiče odbrambene mehanizme u aktivaciji inflamatorne mreže, što rezultira pojavom hronične inflamatorne aktivnosti niskog intenziteta u pojedinim ili svim organima i tkivima. Ovaj fenomen istovremeno prate i omogućavaju njegovu detekciju povišeni nivoi inflamatornih komponenti u krvi, kao što su IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1Ra, sTNFR, proteina akutne faze kao što su CRP i serumski amiloid A, i na kraju porast broja neutrofila (Franceschi i sar., 2000; Bruunsgaard i sar., 2001; Salminen i sar., 2012). Iako su nivoi navedenih medijatora značajno viši kod zdravih starih individua u odnosu na mlađe, mehanizmi odgovorni za nastanak tog fenomena, kao i posledice i promene koje oni izazivaju tokom starenja su, u najvećem broju slučajeva, ostali nerazjašnjeni (Gilmore i Wolenski, 2012). Osim učešća NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B) sistema u aktivaciji i održanju ovog fenomena tokom starenja (Newton i Dixit, 2012), otkriveno je da njegovo prisustvo kod starih individua prati sve teže odstranjivanje antigena iz organizma (Candore i sar., 2010), kao i povećan rizik od nastanka srčanog udara, karcinoma, ateroskleroze, metaboličkog sindroma, Alchajmerove bolesti, vaskularne demencije i drugih degenerativnih bolesti (Balistreri i sar., 2009; de Gonzalo-Calvo i sar., 2010). Pojava ovih bolesti, zajedno sa već prisutnim starosnim promenama imunog sistema, dalje slabi odbrambene sposobnosti starije populacije čineći ih vulnerabilnijim na inače banalne infe-

kcije. Imuni odgovor na prisutni patogen traje duže odnosu na mlađe individue i može dovesti do masivnog tkivnog oštećenja i lošeg ishoda kod bolesti kao što su influenza ili pneumokokna pneumonija. Starenjem izazvan inflamatorni proces niskog intenziteta ubrzava progresiju hroničnih bolesti, a takođe ima i imunosupresivni efekat na celularni imuni odgovor (Chung i sar., 2009; Lang i sar., 2010).

Kod jako starih osoba uočen je linearni porast serumskih vrednosti TNF- $\alpha$ , CRP i IL-6 (Bruunsgaard i sar., 2003). To je praćeno čitavom kaskadom promena u organizmu koji stari koje se označavaju kao inflamatorno starenje (“inflamm – aging”) (Franceschi i sar., 2000; Candore i sar., 2010). Bitni modulator imune funkcije i inflamacije prisutne tokom starenja predstavlja odgovor neuroendokrinog sistema na stres. Ustanovljeno je da stare osobe karakterišu povišeni nivoi kortizola u krvi. Disfunkcionalna HPA osovina može da oslabi imuni sistem prilikom odgovora na stresore kao što je infekcija (Butcher i Lord, 2004; Meyer, 2005). Povezanost funkcije imunog sistema i HPA osovine može indirektno da potvrdi činjenica da IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  mogu da utiču na sekreciju ACTH u kultivisanim fragmentima adenohipofize pacova (Turnbull i Rivier, 1999). Ovi autori takođe smatraju da FS ćelije, čiji se broj, kao što smo to mi tokom našeg istraživanja ustanovili, tokom starenja povećava, verovatno predstavljaju komponentu adenohipofize koja je umešana u proces regulacije funkcije HPA osovine medijatorima imunog sistema kod starih individua. Ovaj uticaj može biti objašnjen delovanjem FS ćelija na endokrine ćelije preko povišenog nivoa IL-6 i drugih produkata njihove parakrine aktivnosti kao što su IL-11, cilijarni neurotrofni faktor (Gerez i sar., 2007), insulinu sličan faktor rasta I (IGF-1) i kalcitonin gen-zavisni peptid (CGRP) (Schwartz, 2000), čiji su efekti na oslobađanje ACTH ostali nerazjašnjeni. Saglasno navodima Vankelecom-a i sar. (1993), imuni i neuroendokrini sistem formiraju integrisanu funkcionalnu mrežu. Postoje neuroendokrini mesendžeri (hormoni i neuropeptidi) koji su prisutni u odgovarajućim ćelijama imunog sistema i, sa druge strane, odgovarajući limfokini i monokini (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) prisutni u organima neuroendokrinog sistema, kao što su hipotalamus i hipofiza. Allaerts i sar. (1997) tvrde da intersticijalne FS ćelije adenohipofize miševa i pacova pokazuju 10-20% preklapanja sa MHC-klasom II dendritičnih ćelija, što ukazuje na imunohistohemijsku heterogenost ove ćelijske grupe i njenu moguću povezanost sa ćelijama imunog sistema. Takođe, u normalnoj adenohipofizi, najveći izvor IL-6 su, najverovatnije, FS ćelije koje mogu biti indukovane da sekretuju ovaj citokin prisustvom LPS-a, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i agenasa koji podižu nivo cAMP-a (Vankelecom i sar., 1993; Turnbull i Rivier, 1999). Po navodima Franceschi i sar. (2000), IL-6, glavni citokin parakrine aktivnosti FS ćelija adenohipofize definisan je kao „citokin gerontologa“. Njegovi

nivoi u plazmi, koji su niski ili nedetektovani kod većine mladih ljudi, počinju da rastu kod zdravih ljudi starosti oko 50-60 godina, što korespondira sa prelaznim periodom između prve i druge starosne grupe u našem istraživanju. Ovaj porast je prisutan tokom fiziološkog starenja kod zdravih osoba, kao i kod visokog procenta stogodišnjaka očuvanog zdravlja ali i onih kod kojih je prisutno patološko starenje. Kod ovih subjekata, ostali proteini kao što su proteini akutne faze, lipoprotein a, fibrinogen i ostali koagulacioni faktori i proinflamatorni citokini takođe su povišeni. Povrh svega, u skladu sa navodima gore citiranih autora, ova situacija može biti očekivana u poslednjoj fazi života kod ekstremno starih osoba, čija je verovatnoća nastanka smrti veoma visoka.

Porast parakrine aktivnosti FS ćelija, koji je povezan sa povećanjem njihovog prisustva kod starijih slučajeva, nameće dilemu o uticaju ove njihove funkcije (pre svega sekrecije IL-6) na funkciju kortikotropa i sekreciju ACTH. Rezultati studija koje su se bavile ovim problemom mogu biti klasifikovni u dve grupe. Prve i starije studije tvrde da FS ćelije svojom parakrinom aktivnošću imaju uglavnom inhibicioni efekat na kortikotrope, tačnije na oslobađanje ACTH i, na kraju, na funkciju HPA osovine (Vankelecom i sar., 1990, 1993, 1997; Allaerts i Vankelecom, 2005). Druga grupa studija obuhvatala je predominantno one ređe studije koje su isticale stimulatorni efekat parakrine aktivnosti FS ćelija na kortikotrope, oslobađanje ACTH i funkciju HPA osovine (Johnson i sar., 1990; Schwartz, 2000; Bilezikjian i sar., 2003; Herkenham, 2005; Gerez i sar., 2007). Statistički značajan porast prisustva ACTH ćelija tokom starenja, paralelni porast prisustva FS ćelija i njihova međusobna povezanost idu u prilog stavovima onih autora (Johnson i sar., 1990; Schwartz, 2000; Bilezikjian i sar., 2003; Herkenham, 2005; Gerez i sar., 2007) koji pretpostavljaju postojanje stimulatornog efekta parakrine aktivnosti FS ćelija na kortikotrope, oslobađanje ACTH i funkciju HPA osovine.

Rezultati našeg istraživanja će delimično pružiti uvid u obim prisustva razmatranih starosnih promena adenohipofize i indirektno ukazati na njihovu moguću vezu sa literaturnim podacima o postojanju funkcionalnog dizbalansa HPA osovine kod zdravih starih osoba. Sve napred navedeno bi zajedno sa rezultatima prethodnih istraživanja o funkcionalnim aspektima starosnih promena HPA sistema, pružilo moguće objašnjenje za češću pojavu pojedinih bolesti tokom procesa starenja. Unapređeno znanje i procena endokrinih funkcija tokom starenja će sledstveno dovesti do uspešnog poboljšanja farmakoloških terapija i unapređenja kvaliteta života u starosti i borbi protiv bolesti povezanih sa disfunkcijom endokrinog sistema u celini kod starijih pacijenata i neminovno produžiti životni vek. Zbog toga su endokrine funkcije u kontekstu starenja u fokusu mnogih budućih kliničkih i bazičnih naučnih istraživanja.

# ZAKLJUČAK

---

1. Celularni sastav adenohipofize se ne menja značajno sa godinama života; prisustvo bazofila je značajno više kod slučajeva muškog u odnosu na slučajeve ženskog pola.
2. Proces starenja je praćen generalno slabijom prokrvljenošću parenhima adenohipofize.
3. Starenje je praćeno proliferacijom vezivnog tkiva i prisustvom fibroze adenohipofize najstarijih slučajeva.
4. Fibroza je najizrazitija u intermedijarnom delu žlezde, ali se uočava i u njenim lateralnim delovima i manifestuje se zadebljanjem vezivno-tkivnih pregrada i posledičnim narušavanjem normalne arhitekture adenohipofize.
5. Veličina endokrinih ćelija adenohipofize značajno raste tokom procesa starenja ukazujući na njihovu hipertrofiju.
6. Porast veličine endokrinih ćelija distalnog dela prednjeg režnja nije praćen značajnijom promenom njihovog oblika tokom procesa starenja.
7. Endokrine ćelije slučajeva ženskog pola su krupnije i pravilnijeg oblika u odnosu na iste slučajeva muškog pola.
8. Proliferacija vezivnog tkiva i posledična fibroza adenohipofize tokom procesa starenja je delom posledica porasta prisustva kolagena tipa IV.
9. Prisustvo kortikotropnih ćelija raste tokom procesa starenja, a samim tim i njihov udeo u ukupnoj masi bazofilnih ćelija prednjeg režnja hipofize.
10. Prisustvo folikulostelatnih ćelija prednjeg režnja prati trend prisustva kortikotropnih ćelija i značajno raste tokom procesa starenja.
11. Prisustvo folikulostelatnih ćelija značajno pozitivno korelira i predstavlja značajan prediktor prisustva kortikotropnih ćelija.
12. Sadržaj kolagena tipa IV, kortikotropnih i folikulostelatnih ćelija se ne razlikuje značajno između slučajeva muškog i ženskog pola.

# LITERATURA

---

1. Acosta M, Mohamed F. Pituitary pars intermedia of male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): a morphometric study of seasonal and age-related changes in immunohistochemistry. *Cells Tissues Organs*. 2009;190:219–29.
2. Acosta M, Filippa V, Mohamed F. Folliculostellate cells in pituitary pars distalis of male viscacha: immunohistochemical, morphometric and ultrastructural study. *Eur J Histochem*. 2010;54(1):e1.
3. Allaerts W, Salomon B, Leenen PJ, van Wijngaardt S, Jeucken PH, Ruuls S, Klatzmann D, Drexhage HA. A population of interstitial cells in the anterior pituitary with a hematopoietic origin and a rapid turnover: a relationship with folliculo-stellate cells? *J Neuroimmunol*. 1997;78(1-2):184–97.
4. Allaerts W, Vankelecom H. History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. *Eur J Endocrinol*. 2005;153(1):1–12.
5. Alves LM, Werneck CC, Martins RC, Silva L-CF, Taffarel M, Borojevic R, Nasciutti LE. A continuous lineage of rat adenohypophysis stromal cells: characterization and effects on GH<sub>3</sub>B<sub>6</sub> prolactin-secreting cell behaviour. *Biol Cell*. 2002;94(7–8):519–33.
6. Anđelković Z, Somer Lj, Avramović V, Milosavljević Z, Tanasković I, Matavulj M, i dr. *Histologija*. Osmo izdanje. Niš: Impresum; 2009.
7. Argyropoulou M, Perignon F, Brunelle F, Brauner R, Rappaport R. Height of normal pituitary gland as a function of age evaluated by magnetic resonance imaging in children. *Pediatr Radiol*. 1991;21(4):247–9.
8. Ayisi K, Schmiegelow P, Lindner J, Sames K. Connective tissue ageing in the human hypophysis – gonadal system. *Path Res Pract*. 1982;173(3):294–302.
9. Babović SS, Ivanov D, Mijatov-Ukropina L, Toyonaga T, Dimitrijević I, Dorđević M. Cytoarchitecture of the human paraventricular hypothalamic nucleus. *Med Pregl*. 2009;62(9-10):417–20.
10. Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. Review. *Mech Ageing Dev*. 1998;106(1–2):1–56.
11. Balistreri CR, Colonna-Romano G, Lio D, Candore G, Caruso C. TLR4 polymorphisms and ageing: implications for the pathophysiology of age-related diseases. *J Clin Immunol*. 2009;29(4):406–15.



12. Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res*. 2011;90(1):9–17.
13. Bilezikjian LM, Leal AM, Blount AL, Corrigan AZ, Turnbull AV, Vale WW. Rat anterior pituitary folliculostellate cells are targets of interleukin-1beta and a major source of intrapituitary follistatin. *Endocrinology*. 2003;144(2):732–40.
14. Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature*. 2000;408(6808):53–6.
15. Brokken LJ, Leendertse M, Bakker O, Wiersinga WM, Prummel MF. Expression of adenohipophyseal-hormone receptors in a murine folliculo-stellate cell line. *Horm Metab Res*. 2004;36(8):538–41.
16. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol*. 2001;8(3):131–6.
17. Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Hjelmberg JB. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *AM J Med*. 2003;115(4):278–83.
18. Butcher SK, Lord JM. Stress responses and innate immunity: aging as a contributory factor. *Aging Cell*. 2004;3(4):151–60.
19. Candore G, Caruso C, Colonna-Romano G. Inflammation, genetic background and longevity. *Biogerontology*. 2010;11(5):565–73.
20. Campisi J. Cellular senescence and cell death. In: *Physiological Basis of Aging and Geriatrics* (3rd ed.), edited by Timiras PS. Boca Raton, FL: CRC, 2003, p. 47–59.
21. Cardin J, Carbajal ME, Vitale ML. Biochemical and morphological diversity among folliculo-stellate cells of the mink (*Mustela vison*) anterior pituitary. *Gen Comp Endocr*. 2000;120(1):75–87.
22. Carlson JC, Riley JC. A consideration of some notable aging theories. *Exp Gerontol*. 1998;33(1-2):127–34.
23. Chesnokova V, Melmed S. Pituitary senescence: The evolving role of Pttg. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;326:55–9.
24. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2009;8(1):18–30.
25. Cizza G, Calogero AE, Brady LS, Bagdy G, Bergamini E, Blackman MR, Chrousos GP, Gold PW. Male Fischer 344/N rats show a progressive central impairment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with advancing age. *Endocrinology*. 1994;134(4):1611–20.

26. Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Impact of aging on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Ageing Dev.* 1993;70(1–2): 45–51.
27. Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological study of pituitary gonadotrophs during aging in male rats. *Mech Ageing Dev.* 1994; 73(2):87–95.
28. Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the pituitary of aging rats. *Acta Anat.* 1995; 152(1): 28–32.
29. Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev.* 1997;95(3): 157–66.
30. Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural age-related changes in rat lactotroph cells. *Biocell.* 1998; 22(3):197–205.
31. Cónsole GM, Jurado SB, Riccillo FL, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural study of pituitary folliculostellate cells during aging in rats. *Cells Tissues Organs.* 2000;167(1):25–32.
32. Correa-de-Santana E, Fröhlich B, Labeur M, Páez-Pereda M, Theodoropoulou M, Monteserin JL, Renner U, Stalla GK. NOD2 receptors in adenopituitary folliculostellate cells: expression and function. *J Endocrinol.* 2009;203(1):111–22.
33. Crew MD, Spindler SR, Walford RL, Koizumi A. Age-related decrease of growth hormone and prolactin gene expression in the mouse pituitary. *Endocrinology.* 1987; 121(4):1251–5.
34. Cross PC, Mercer KL. *Cell and tissue ultrastructure.* First edition. New York: W.H. Freeman and company; 1993.
35. Danila DC. The folliculostellate cells in the pituitary gland. *Acta Endo (Buc).* 2005;I(1):86–93.
36. Данилова ОВ, Козирицкий ВГ, Гордиенко ВМ, Баймут ФТ. Сравнительная ультраструктурная характеристика передней доли гипофиза, щитовидной железы и гонад у некоторых млекопитающих при старении. *Цитология и генетика.* 1988; 22(2):11–7.
37. Devnath S, Inoue K. An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(6):687–91.
38. Doraiswamy PM, Potts JM, Axelson DA, Husain MM, Lurie SN, Na C, Escalona PR, McDonald WM, Figiel GS, Ellinwood Jr EH. MR assessment of pituitary gland

- morphology in healthy volunteers: age- and gender-related differences. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1992;13(5):1295–9.
39. Elster AD, Chen MY, Williams DW 3rd, Key LL. Pituitary gland: MR imaging of physiologic hypertrophy in adolescence. *Radiology.* 1990;174(3 Pt 1):681–5.
  40. Eroschenko VP. *di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations.* 11th ed. Baltimore: Wolters Kluwer|Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
  41. Fauquier T, Lacampagne A, Travo P, Bauer K, Mollard P. Hidden face of the anterior pituitary. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(7):304–9.
  42. Ferrari E, Cravello L, Muzzoni B, Casarotti D, Paltro M, Solerte SB, Fioravanti M, Cuzzoni G, Pontiggia B, Magri F. Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. *Eur J Endocrinol.* 2001;144(4):319–29.
  43. FitzPatrick M, Tartaglino LM, Hollander MD, Zimmerman RA, Flanders AE. Imaging of sellar and parasellar pathology. *Radiol Clin North Am.* 1999;37(1):101–21.
  44. Franceschi C, Bonafe' M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:244–54.
  45. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology.* Third edition. Baltimore: Saunders Elsevier; 2007.
  46. Gerez J, Bonfiglio J, Sosa S, Giacomini D, Acuña M, Nagashima AC, Perone MJ, Silberstein S, Renner U, Stalla GK, Arzt E. Molecular transduction mechanisms of cytokine-hormone interactions: role of gp130 cytokines. *Exp Physiol.* 2007;92(5):801–6.
  47. Gilmore TD, Wolenski FS. NF- $\kappa$ B: where did it come from and why? *Immunol Rev.* 2012;246(1):14–35.
  48. Gloddek J, Lohrer P, Stalla J, Arzt E, Stalla GK, Renner U. The intrapituitary stimulatory effect of lipopolysaccharide on ACTH secretion is mediated by paracrine-acting IL-6. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109(8):410–5.
  49. Goldman JM, Cooper RL, Rehnberg GL, McElroy WK, Hein JF, Booth KC. Age-related changes in the regional distribution of hormones in the male rat anterior pituitary. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;152(3):1213–20.
  50. Goncharova ND, Lapin BA. Effects of aging on hypothalamic-pituitary-adrenal system function in non-human primates. *Mech Ageing Dev.* 2002;123(8):1191–201.
  51. de Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernández M, Vega-Naredo I, Caballero B, García-Macía M, Suárez FM, Rodríguez-Colunga MJ, Solano JJ, Coto-Montes A. Differential

- inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(5):733–7.
52. Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C. Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(22):7466–74.
  53. Grillo MA, Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids.* 2008;35:29–36.
  54. Gust DA, Wilson ME, Stocker T, Conrad S, Plotsky PM, Gordon TP. Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is altered by aging and exposure to social stress in female rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2556–63.
  55. Guyton A, Hall J. *Medicinska fiziologija*. 11. izdanje. Beograd: Savremena administracija; 2008.
  56. Hauger RL, Thiruvikraman KV, Plotsky PM. Age-related alterations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male Fischer 344 rats. *Endocrinology.* 1994;134(3):1528–36.
  57. Hayakawa K, Konishi Y, Matsuda T, Kuriyama M, Konishi K, Yamashita K, Okumura R, Hamanaka D. Development and aging of brain midline structures: assessment with MR imaging. *Radiology.* 1989;172(1):171–7.
  58. Henderson HL, Hodson DJ, Gregory SJ, Townsend J, Tortonese DJ. Gonadotropin-releasing hormone stimulates prolactin release from lactotrophs in photoperiodic species through a gonadotropin-independent mechanism. *Biol Reprod.* 2008;78(2):370–7.
  59. Henrikson RC, Kaye GI, Mazurkiewicz JE. *Histology*. First edition. London: Williams & Wilkins. The science of review; 1997.
  60. Herkenham M. Folliculo-stellate (FS) cells of the anterior pituitary mediate interactions between the endocrine and immune systems. *Endocrinology.* 2005;146(1):33–4.
  61. Herman JP, Larson BR, Speert DB, Seasholtz AF. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. *Neurobiol Aging.* 2001;22(2):323–32.
  62. Ho KY, Evans WS, Blizzard RM, Veldhuis JD, Merriam GR, Samojlik E, Furlanetto R, Rogol AD, Kaiser DL, Thorner MO. Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(1):51–8.
  63. Ilić S. *Interna medicina*. Drugo izdanje. Niš: Galaksija; 2009.
  64. Inoue K, Couch EF, Takano K, Ogawa S. The structure and function of folliculostellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol.* 1999;62(3):205–18.

65. Kagayama M. The follicular cell in the pars distalis of the dog pituitary gland: an electron microscope study. *Endocrinology*. 1965;77(6):1053–60.
66. Kahle W, Frotscher M. *Color Atlas of Human Anatomy. Nervous System and Sensory Organs Vol 3*. 5th ed. New York: Thieme; 2002.
67. Kališnik M. *Temelji stereologije*. Prvo izdanje. Stereološka sekcija Zveze društev anatomov Jugoslavije. Ljubljana, SFRJ, 1985.
68. Kameda Y. Occurrence of colloid-containing follicles in the pars distalis of pituitary glands from aging guinea pigs. *Cell Tissue Res*. 1991;263:115–24.
69. Keenan DM, Licinio J, Veldhuis JD. A feedback-controlled ensemble model of the stress responsive hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 27;98(7):4028–33.
70. Kikuta A, Ohtani O, Murakami T. Three-dimensional organization of the collagen fibrillar framework in the rat adrenal gland. *Arch Histol Cytol*. 1991;54(2):133–44.
71. Kirkwood TB. New science for an old problem. *Trends Genet*. 2002;18(9):441–2.
72. Kirkwood TB. Understanding the Old Science of Aging. *Cell*. 2005;120(4):437–47.
73. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. 1998;19(3):269–301.
74. Koutcherov Y, Mai JK, Ashwell KW, Paxinos G. Organization of the human paraventricular hypothalamic nucleus. *J Comp Neurol*. 2000;423(2):299–318.
75. Kuehnel W. *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy*. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2003.
76. Kunihiro K, Naokatsu S, Akira Y. Morphological changes on MR imaging of the normal pituitary gland related to age and sex: main emphasis on pubescent females. *J Clin Neurosci*. 2002;9(1):53–6.
77. Landfield PW, Sundberg DK, Smith MS, Eldridge JC, Morris M. Mammalian aging: Theoretical implications of changes in brain and endocrine systems during mid- and late-life in rats. *Peptides*. 1980;1(1):185–96.
78. Lang PO, Mitchell WA, Lapenna A, Pitts S, Aspinall R. Immunological pathogenesis of main age-related diseases and frailty: role of immunosenescence. *Eur Geriatr Med*. 2010;1(2):112–21.
79. Lohrer P, Gloddek J, Nagashima AC, Korali Z, Hopfner U, Pereda MP, Arzt E, Stalla GK, Renner U. Lipopolysaccharide directly stimulates the intrapituitary interleukin-6 production by folliculostellate cells via specific receptors and the p38alpha mitogen-

- activated protein kinase/nuclear factor-kappaB pathway. *Endocrinology*. 2000;141(12):4457–65.
80. Lurie SN, Doraiswamy PM, Husain MM, Boyko OB, Ellinwood EH Jr, Figiel GS, Krishnan KR. In vivo assessment of pituitary gland volume with magnetic resonance imaging: the effect of age. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71(2):505–8.
81. Luziga C, Yoshimi Y, Yoichiro H, Gabriel M, Koichi M. Phagocytotic removal of apoptotic endocrine cells by folliculostellate cells and its functional implications in clusterin accumulation in pituitary colloids in helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) *Acta Histochem*. 2006;108(1):69–80.
82. Luziga C, Kipanyula MJ, Mbassa G, Koichi M. Colloid in the anterior pituitary of helmet guinea fowl (*Numida meleagris galeata*): morphometric analysis and pattern of occurrence in relation to apoptosis. *Vet Res Commun*. 2009;33(7):681–91.
83. Johnson MD, Gray ME, Pepinsky RB, Stahlman MT. Lipocortin-1 immunoreactivity in the human pituitary gland. *J Histochem Cytochem*. 1990;38(12):1841–5.
84. Junqueira LC, Carneiro J. *Osnovi histologije – Tekst i atlas*. Jedanaesto izdanje. Beograd: Data status; 2005.
85. Jurado SB, Cónsole GM, Gómez Dumm CLA. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotroph cells. An immunohistochemical and ultrastructural study. *J Vet Med Sci*. 1998;60(6):705–11.
86. Mabuchi Y, Shirasawa N, Sakuma E, Hashimoto Y, Kuno M, Coombs RJ, Herbert DC, Soji T. Intercellular communication within the rat anterior pituitary: relationship between LH-RH neurons and folliculo-stellate cells in the pars tuberalis. *Cell Tissue Res*. 2004;317(1):79–90.
87. MacMaster FP, Keshavan M, Mirza Y, Carrey N, Upadhyaya AR, El-Sheikh R, Buhagiar CJ, Taormina SP, Boyd C, Lynch M, Rose M, Ivey J, Moore GJ, Rosenberg DR. Development and sexual dimorphism of the pituitary gland. *Life Sci*. 2007;80(10):940–4.
88. Mandavilli BS, Santos JH, and Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res*. 2002;509(1-2):127–51.
89. Manoonkitiwongsa PS, McMillan PJ, Schultz RL, Jackson-Friedman C, Lyden PD. A simple stereologic method for analysis of cerebral cortical microvessels using image analysis. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2001;8(1):45–57.

90. Marin F, Boya J, López-Carbonell A, Borregón A. Immunohistochemical localization of intermediate filament and S-100 proteins in several non-endocrine cells of the human pituitary gland. *Arch Histol Cytol.* 1989;52(3):241–8.
91. Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, Laurent GJ. Age-related-changes in collagen-synthesis and degradation in rat tissues-importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J.* 1991;276(Pt 2):307–13.
92. Meyer KC. Aging. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(5):433–9.
93. Mills SE. *Histology for pathologists.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
94. Milošević V, Brkić B, Velkovski S, Starčević V. Somatostatin-induced changes of the ACTH and STH cells in the hypophysis of the male rats. *J Med Biochem.* 1994; 13:102–6.
95. Mohamed F, Fogal T, Dominguez S, Scardapane L, Guzmán J, Piezzi RS. Colloid in the pituitary pars distalis of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): ultrastructure and occurrence in relation to season, sex, and growth. *Anat Rec.* 2000;258(3):252–61.
96. Mollard P, Hodson DJ, Lafont C, Rizzoti K, Drouin J. A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(6):261–9.
97. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. *Clinically Oriented Anatomy.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
98. Morita M, Ogata T, Araki K. Scanning electron microscopic study of the collagen sheath of the human thyroid gland and its disorders. *Scanning Microsc.* 1994;8(3):695–704.
99. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(3).
100. Nishimura S, Tabata S, Nakamura Y, Okano K, Iwamoto H. Three-dimensional architecture and distribution of collagen components in the goat hypophysis. *Anat Rec.* 2004; 277(2):275–86.
101. Ogawa S, Couch EF, Kubo M, Sakai T, Inoue K. Histochemical study of follicles in the senescent porcine pituitary gland. *Arch Histol Cytol.* 1996;59(5):467–78.
102. Ogawa S, Ishibashi Y, Sakamoto Y, Kitamura K, Kubo M, Sakai T, Inoue K. The glycoproteins that occur in the colloids of senescent porcine pituitary glands are clusterin and glycosylated albumin fragments. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;234(3):712–8.
103. Ooi GT, Tawadros N, Escalona RM. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;228(1–2):1–21.

104. Orgnero de Gaisán EM, Maldonado CA, Aoki A. Fate of degenerating lactotrophs in rat pituitary gland after interruption of lactation: a histochemical and immunocytochemical study. *Histochem J.* 1993;25(2):150–65.
105. Parenti M, Dall'ara A, Rusconi L, Cocchi D, Müller EE. Different regulation of growth hormone-releasing factor-sensitive adenylate cyclase in the anterior pituitary of young and aged rats. *Endocrinology.* 1987;121(5):1649–53.
106. Pavlović M, Jovanović I, Ugrenović S, Vasović Lj, Krstić M, Bakić M, Živković V, Stojanović V. Morphometric analysis of the human anterior pituitary's folliculostellate cells during the aging process. *Ann Anat.* 2013;195(3):231–7.
107. Pavlović M, Jovanović I, Pavlović S, Stojanović V, Živković V, Bakić M, Kundalić B, Antić V. Morphometric study of connective tissue in the human pituitary during aging process. *Acta Facultatis Medicae Naissensis.* 2013;30(2):79–84.
108. Perez-Castro C, Renner U, Haedo MR, Stalla GK, Arzt E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol Rev.* 2012;92(1):1–38.
109. Perls TT, Wilmoth J, Levenson R, Drinkwater M, Cohen M, Bogan H, Joyce E, Brewster S, Kunkel L, and Puca A. Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(12):8442–7.
110. Peyster RG, Hoover ED, Viscarello RR, Moshang T, Haskin ME. CT appearance of the adolescent and preadolescent pituitary gland. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1983;4(3):411–4.
111. Peyster RG, Adler LP, Viscarello RR, Hoover ED, Skarzynski J. CT of the normal pituitary gland. *Neuroradiology.* 1986;28(2):161–5.
112. Raskind MA, Peskind ER, Wilkinson CW. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation and human aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;30;746:327–35.
113. Roppolo HMN, Latchaw RE, Meyer JD, Curtin HD. Normal pituitary gland. *AJNR.* 1983;4:170–99.
114. Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J, Capen CC. Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol.* 2001;29(1):41–8.
115. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology - A text and atlas.* Fourth edition. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins; 2003.
116. Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW, Mattson DE. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Eng Med J.* 1990; 323(1):1–6.
117. Russ JC. *Image Analysis of Food Microstructure.* CRC Press, Boca Raton, FL; 2004.



118. Salminen A, Kaarniranta K. Genetics vs. entropy: longevity factors suppress the NF- $\kappa$ B-driven entropic aging process. *Ageing Res Rev.* 2010;9(3):298–314.
119. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Emerging role of NF- $\kappa$ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal.* 2012; 24(4):835–45.
120. Sano T, Kovacs KT, Scheithauer BW, Young WF Jr. Aging and the human pituitary gland. *Mayo Clin Proc.* 1993;68(10):971–7.
121. Sasaki F. Changes with age in the number and size of anterior pituitary cells in female mice from suckling to adulthood. *J Endocrinol.* 1988;117(1):5–10.
122. Sato G, Shirasawa N, Sakuma, Sato Y, Asai Y, Wada I, Horiuchi O, Sakamoto A, Herbert DC, Soji T. Intercellular communications within the rat anterior pituitary XI: an immunohistochemical study of distributions of S-100 positive cells in the anterior pituitary of the rat. *Tissue Cell.* 2005;37(4):269–80.
123. Scanes CG, Jeftinija S, Glavaski-Joksimovic A, Proudman J, Arámburo C, Anderson LL. The anterior pituitary gland: lessons from livestock. Review. *Domest Anim Endocrinol.* 2005;29(1):23–33.
124. Schwartz J. Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocr Rev.* 2000; 21(5):488–513.
125. Seeman TE, Robbins RJ. Aging and hypothalamic-pituitary-adrenal response to challenge in humans. *Endocr Rev.* 1994;15(2):233–60.
126. Shringarpure R, Davies KJ. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(11):1084–9.
127. Siegel A, Sapru HN. *Essential Neuroscience*. 2nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
128. Smith RG, Betancourt L, Sun Y. Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. *Endocr Rev.* 2005;26(2):203–50.
129. Soji T, Sirasawa N, Kuroki C, Yashiro T, Herbert DC. Immunohistochemical study of the post-natal development of the folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary gland. *Tissue Cell.* 1994;26(1):1–8.
130. Spik K, Sonntag WE. Increased pituitary response to somatostatin in aging male rats: relationship to somatostatin receptor number and affinity. *Neuroendocrinology.* 1989; 50(5):489–94.
131. Standring S, editor. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 40th ed. Churchill Livingstone: Elsevier; 2008.

132. Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen–antibody complex (horseradish peroxidase–antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 1970;18:315–33.
133. Sun YK, Xi YP, Fenoglio CM, Pushparaj N, O'Toole KM, Kledizik GS, Nette EG, King DW. The effect of age on the number of pituitary cells immunoreactive to growth hormone and prolactin. *Hum Pathol.* 1984;15(2):169–80.
134. Suzuki M, Takashima T, Kadoya M, Konishi H, Kameyama T, Yoshikawa J, Gabata T, Arai K, Tamura S, Yamamoto T. Height of normal pituitary gland on MR imaging: age and sex differentiation. *J Comput Assist Tomogr.* 1990;14(1):36–9.
135. Takahashi S, Kawashima S. Age-related changes in prolactin cells in male and female rats of the Wistar/Tw strain. *J Sci Hiroshima Univ Ser B Div 1.* 1983;31:185–91.
136. Takano K, Utsunomiya H, Ono H, Ohfu M, Okazaki M. Normal development of the pituitary gland: assessment with three-dimensional MR volumetry. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1999;20(2):312–5.
137. Terano T, Seya A, Tamura Y, Yoshida S, Hirayama T. Characteristics of the pituitary gland in elderly subjects from magnetic resonance images: relationship to pituitary hormone secretion. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996;45(3):273–9.
138. Theogaraj E, John CD, Christian HC, Morris JF, Smith SF, Buckingham JC. Perinatal glucocorticoid treatment produces molecular, functional, and morphological changes in the anterior pituitary gland of the adult male rat. *Endocrinology.* 2005;146(11):4804–13.
139. Tien RD, Kucharczyk J, Bessette J, Middleton M. MR imaging of the pituitary gland in infants and children: changes in size, shape, and MR signal with growth and development. *AJR Am J Roentgenol.* 1992;158(5):1151–4.
140. Le Tissier PR, Hodson DJ, Lafont C, Fontanaud P, Schaeffer M, Mollard P. Anterior pituitary cell networks. *Front Neuroendocrinol.* 2012;33(3):252–66.
141. Traustadóttir T, Bosch PR, Cantu T, Matt KS. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response and recovery from high-intensity exercise in women: effects of aging and fitness. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(7):3248–54.
142. Tsunoda A, Okuda O, Sato K. MR height of the pituitary gland as a function of age and sex: especially physiological hypertrophy in adolescence and in climacterium. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1997;18(3):551–4.
143. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1999;79(1):1–71.

144. Urban R, Veldhuis JD. Hypothalamo-pituitary concomitants of aging. In: Sowers JR, Felicetta JV, editors. *The endocrinology of aging*. New York: Raven Press; 1988:41–74.
145. Vankelecom H, Carmeliet P, Heremans H, Van Damme J, Dijkmans R, Billiau A, Deneef C. Interferon-gamma inhibits stimulated adrenocorticotropin, prolactin, and growth hormone secretion in normal rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology*. 1990;126(6):2919–26.
146. Vankelecom H, Matthys P, Van Damme J, Heremans H, Billiau A, Deneef C. Immunocytochemical evidence that S-100-positive cells of the mouse anterior pituitary contain interleukin-6 immunoreactivity. *J Histochem Cytochem*. 1993;41(2):151–6.
147. Vankelecom H, Matthys P, Deneef C. Inducible nitric oxide synthase in the anterior pituitary gland: induction by interferon-gamma in a subpopulation of folliculostellate cells and in an unidentifiable population of non-hormone-secreting cells. *J Histochem Cytochem*. 1997;45(6):847–57.
148. Vankelecom H. Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(4):559–70.
149. Vedder H. Physiology of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis. *NeuroImmune Biology*. 2007;7:17–31.
150. Weinert BT, Timiras PS. Theories of aging. *J Appl Physiol*. 2003;95(4):1706–18.
151. Weiss J, Lansing AI. Age changes in the fine structure of anterior pituitary of the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953;82(3):460–6.
152. Wolf J, Weinberger B, Arnold CR, Maier AB, Westendorp RG, Grubeck-Loebenstien B. The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts. *Exp Gerontol*. 2012;47(9):749–53.
153. Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH. Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(9):1441–9.
154. Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. *Wheater's Functional Histology : A Text and Colour Atlas*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2007.
155. Zbuzek V, Arnetz BB, Eneroth P, Zbuzek VK. Age-related differences in concomitant hormone release from the superfused rat adenopituitary. *Gerontology*. 1991;37(5):253–61.

# BIOGRAFIJA

---

## Osnovni podaci

Ime i prezime: Miljana Ljubomirović

Datum i mesto rođenja: 24.06.1980. godine, Niš

Naučna oblast i uža specijalnost: medicina; anatomija

## Obrazovanje

Naziv završenog fakulteta: Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Studijska grupa: medicina

Diplomirala 2006. godine sa prosečnom ocenom 9.49 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

## Članstvo

Član je Udruženja anatoma Srbije, Srpskog lekarskog društva i Sekcije za kliničku anatomiju.

Učesnik je II kongresa Srpskog anatomskog društva, 2008. godine u Vrnjačkoj Banji, BH simpozijuma "Morfologija u nauci i praksi", 2009. godine u Sarajevu, III kongresa Srpskog anatomskog društva Srbije sa međunarodnim učešćem, 2012. godine u Nišu kao i Simpozijuma kliničke i funkcionalne anatomije, 2013. godine u Novom Sadu.

## LISTA IZABRANIH PUBLIKACIJA

---

1. Pešić I, **Pavlović M**, Krstić M. Hormonska senzitivnost tumora kod bolesnica sa rakom dojke u KC Niš. *Acta Medica Medianae* Vol 46, No 2, April, 2007.
2. Živković V, Stefanović N, Đurović-Filipović T, Pavlović S, Stojanović V, Bakić M, Kundalić B, **Pavlović M**. Oblici akumulacije lipofuscina u ganglijskim ćelijama gornjeg vratnog ganglionu kod čoveka, *Vojnosanitetski pregled* 2008;65(10):738-43.
3. Pavlović S, Stefanović N, Malobabić S, Babić Z, Kostić A, **Pavlović M**. Longitudinal striae of the human fornix: shape, relations and variations. *Surg Radiol Anat* 2009; 31:501-6.
4. Pavlović S, Stefanović N, **Pavlović M**, Janjić D. Cytochemical and immunocytochemical characteristics of Meckel's diverticulum with heterotopic rests of pancreatic tissue. A case report. *Vojnosanitetski pregled* 2010;67(12):953-1042.
5. Pavlović S, Zdravković D, Stefanović N, **Pavlović M**, Bakić M, Živković V. Anatomohistološke karakteristike Mekelovog divertikuluma fetusa. *Vojnosanitetski pregled*. 2008;65(8):606-11.
6. Stojanović V, Jovanović I, Ugrenović S, Vasović Lj, Živković V, Jocić M, Kundalić B, **Pavlović M**. Morphometric analysis of nonsclerosed glomeruli size and connective tissue content during the aging process. *The Scientific World Journal*. Volume 2012, Article ID 845046.
7. Antić V, Stefanović N, Antić M, Veličković M, Virijević D, **Pavlović M**, Kundalić B, Živković V, Gligorijević N. Morfološke karakteristike apendiks vermiformisa u prenatalnom periodu kod čoveka. *Acta Medica Medianae* 2012;51(4):26-31.
8. **Pavlović M**, Jovanović I, Pavlović S, Stojanović V, Živković V, Bakić M, Kundalić B, Antić V. Morphometric study of connective tissue in the human pituitary during aging process. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 2013;30(2):79-84.
9. **Pavlović M**, Jovanović I, Ugrenović S, Vasović Lj, Krstić M, Bakić M, Živković V, Stojanović V. Morphometric analysis of the human anterior pituitary's folliculostellate cells during the aging process. *Annals of Anatomy* 2013;195:231-7.
10. Bakić M, Jovanović I, Ugrenović S, Vasović Lj, Krstić M, Stefanović N, **Pavlović M**, Živković V. Parahippocampal corpora amylacea and neuronal lipofuscin in human aging. *Central European Journal of Medicine*. 2013;8(6):749-61.



---

**Прилог 1.**

**ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ**

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Морфометријска и имунохистохемијска анализа структура аденохипофизе  
укључених у систем хипоталамо-хипофизно-адреналне осовине током старења човека

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни 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, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 20. 03. 2014.

Аутор дисертације: Миљана Љубомировић

Потпис докторанда:

---



---

**Прилог 2.**

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Миљана Љубомировић

Студијски програм: ДАС - Клиничка медицина

Морфометријска и имунохистохемијска анализа структура аденохипофизе укључених  
Наслов рада: у систем хипоталамо-хипофизно-адrenalне осовине током старења човека

Ментор: Проф. др Иван Јовановић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 20. 03. 2014.

Аутор дисертације: Миљана Љубомировић

Потпис докторанда:

---



---

### Прилог 3.

#### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом: Морфометријска и имунохистохемијска анализа структура аденохипофизе укључених у систем хипоталамо-хипофизно-адреналне осовине током старења човека

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити 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 подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 20. 03. 2014.

Аутор дисертације: Миљана Љубомировић

Потпис докторанда:

---