



**Univerzitet u Novom Sadu  
Prirodno-matematički fakultet**

**Radmila Kovačević  
Nebojša Andrić  
Jelena Marković Filipović  
Kristina Pogrmić-Majkić  
Svetlana Fa Nedeljković  
Stevan Milatović  
Dragan Stajić  
Danijela Kirovski  
Vladislav Volarević  
Marina Gazdić Janković**

---

# **BIOLOGIJA ŽENSKOG REPRODUKTIVNOG SISTEMA**

---

**Urednici  
Radmila Kovačević  
Nebojša Andrić**

**2024.**



---

**BIOLOGIJA  
ŽENSKOG  
REPRODUKTIVNOG  
SISTEMA**

---



**Univerzitet u Novom Sadu**  
**Prirodno-matematički fakultet**



**Radmila Kovačević  
Nebojša Andrić  
Jelena Marković Filipović  
Kristina Pogrmić-Majkić  
Svetlana Fa Nedeljković  
Stevan Milatović  
Dragan Stajić  
Danijela Kirovski  
Vladislav Volarević  
Marina Gazdić Janković**

---

# **BIOLOGIJA ŽENSKOG REPRODUKTIVNOG SISTEMA**

---

**Urednici  
Radmila Kovačević  
Nebojša Andrić**

**Novi Sad, 2024.**

Naziv: BIOLOGIJA ŽENSKOG REPRODUKTIVNOG SISTEMA

Autori: Radmila Kovačević, Nebojša Andrić, Jelena Marković Filipović,  
Kristina Pogrmić-Majkić, Svetlana Fa Nedeljković,  
Stevan Milatović, Dragan Stajić, Danijela Kirovski,  
Vladislav Volarević, Marina Gazdić Janković

Recenzenti: dr Artur Bjelica, redovni profesor,  
*Univerzitet u Novom Sadu Medicinski fakultet*  
dr Snežana Vidaković, redovni profesor  
*Univerzitet u Beogradu Medicinski fakultet*  
dr Milica Manojlović Stojanoski, naučni savetnik  
*Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković –  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju*

Izdavač: Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet

Za izdavača: Prof. dr Milica Pavkov Hrvojević, dekan  
*Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet*

Oblikovanje Veljko Damjanović  
knjige: *Grafička radionica Sputnik, Novi Sad*

Udžbenik je odobren za objavljivanje i upotrebu odlukom  
Nastavno-naučnog Veća Prirodno-matematičkog fakulteta,  
Univerziteta u Novom Sadu, rešenje broj 0602-07-452/23-8 od 21. 2. 2024.

CIP – Каталогизација у публикацији  
Библиотека Матице српске, Нови Сад

ISBN 978-86-7031-668-3

COBISS.SR-ID 143895049

AUTORI:

dr Radmila Kovačević, profesor emeritus,  
*Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet*

dr Nebojša Andrić, vanredni profesor,  
*Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet*

dr Jelena Marković Filipović, vanredni profesor,  
*Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet*

dr Kristina Pogrmić-Majkić, naučni savetnik,  
*Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet*

dr Svetlana Fa Nedeljković, viši naučni saradnik,  
*Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet*

dr Stevan Milatović, docent,  
*Univerzitet u Novom Sadu Medicinski fakultet*

dr Dragan Stajić, docent,  
*Univerzitet u Novom Sadu Medicinski fakultet*

dr Danijela Kirovski, redovni profesor,  
*Univerzitet u Beogradu Fakultet veterinarske medicine*

dr Vladislav Volarević, redovni profesor,  
*Univerzitet u Kragujevcu Fakultet medicinskih nauka*

dr Marina Gazdić Janković, docent,  
*Univerzitet u Kragujevcu Fakultet medicinskih nauka*





# PREDGOVOR

Ženski reproduktivni sistem je složen i fascinantant sistem ljudskog tela. Od davnina, ljudi su pokušali da razumeju njegovu čudesnu sposobnost stvaranja i podržavanja novog života. Poslednjih nekoliko decenija razumevanje strukture i funkcije ženskog reproduktivnog sistema napreduje zahvaljujući trudu i naporu istraživača iz velikog broja disciplina i oblasti uključujući razvojnu i reproduktivnu biologiju, fiziologiju, endokrinologiju, genetiku, ginekologiju, imunologiju, pedijatriju, neurobiologiju, veterinarsku medicinu i mnogo drugih. Ovaj multidisciplinarni pristup pokušali smo da sledimo prilikom pisanja teksta udžbenika.

Udžbenik je prvenstveno namenjen studentima koji slušaju predmet Fiziologija i endokrinologija ženskog reproduktivnog sistema na master akademskim studijama Reproductivna biologija koje zajedno organizuju od 2012. godine Departman za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta i Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu. Program predmeta kao i program studijskog programa je 2019. koncipiran uz podršku domaćih i evropskih partnera kroz EARSMUS+ projekat pod nazivom "Curricula Development in the fields of Reproductive Biology/Assisted Reproductive Technologies and Regenerative Medicine in Serbia" (ART-REM). Ovaj međunarodni projekat je udahnuo savremen koncept i izgled master akademskih studija Reproductivna biologija kroz obogaćivanje nastavnih sadržaja i unapređenje praktičnih veština. Rukopis je pripremljen kao deo realizacije projekta ART-REM (<https://erasmus-plus.ec.europa.eu/projects/search/details/586181-EPP-1-2017-1-RS-EPPKA2-CBHE-JP>).

Pored osnovne ciljne grupe, studenata master akademskih studija Reproductivna biologija, ovaj udžbenik može biti od velike koristi svim drugim studentima koji u svojim kurikulumima imaju programske sadržaje u kojima se izučavaju procesi u ženskom reproduktivnom sistemu.

# SADRŽAJ

Jelena Marković Filipović

<b>1. STRUKTURA I FUNKCIJA ŽENSKOG REPRODUKTIVNOG SISTEMA</b>	<b>1</b>
1.1. JAJNIK ( <i>OVARIUM</i> )	3
1.2. JAJOVOD ( <i>TUBA UTERINA</i> )	15
1.3. MATERICA ( <i>UTERUS</i> )	16
1.4. RODNICA ( <i>VAGINA</i> )	22
1.5. MLEČNA ŽLEZDA ( <i>GLANDULA MAMMARIA</i> )	23
1.6. LITERATURA	27

Svetlana Fa Nedeljković

<b>2. PRENATALNI RAZVOJ ŽENSKOG REPRODUKTIVNOG SISTEMA</b>	<b>29</b>
2.1. RAZVOJ GONADA	31
2.2. RAZVOJ UNUTRAŠNJIH GENITALIJA	44
2.3. RAZVOJ SPOLJAŠNJIH GENITALIJA	49
2.4. LITERATURA	53

Radmila Kovačević, Nebojša Andrić

<b>3. GONADOTROPNI HORMON – OSLOBAĐAJUĆI HORMON, GONADOTROPNI HORMONI I PROLAKTIN</b>	<b>55</b>
3.1. HIPOTALAMO-HIPOFIZNI SISTEM	57
3.2. GONADOTROPNI HORMON – OSLOBAĐAJUĆI HORMON	63
3.3. GONADOTROPNI HORMONI	75
3.4. PROLAKTIN	92
3.5. LITERATURA	100

Nebojša Andrić

<b>4. STEROIDOGENEZA</b>	<b>103</b>
4.1. PREUZIMANJE, SKLADIŠTENJE I UNUTARĆELIJSKI TRANSPORT HOLESTEROLA	106
4.2. TRANSLOKACIJA HOLESTEROLA OD SPOLJAŠNJE DO UNUTRAŠNJE MEMBRANE MITOHONDRIJA	110
4.3. STEROIDOGENI ENZIMI	113
4.4. STEROIDOGENEZA U JAJNICIMA	126
4.5. RECEPTORI ZA STEROIDNE HORMONE	128
4.6. FAKTORI KOJI UTIČU NA AKTIVNOST STEROIDNIH HORMONA	131
4.7. NEGENOMSKI EFEKTI STEROIDNIH HORMONA	136
4.8. METABOLIZAM STEROIDNIH HORMONA	139
4.9. LITERATURA	142

Radmila Kovačević, Nebojša Andrić

<b>5. PROSTAGLANDINI I ŽENSKI REPRODUKTIVNI SISTEM</b>	<b>145</b>
5.1. BIOSINTEZA PROSTAGLANDINA	147
5.2. ULOGA PROSTAGLANDINA U REPRODUKCIJI KOD ŽENA	151
5.3. LITERATURA	156

Nebojša Andrić

<b>6. FOLIKULOGENEZA</b>	<b>157</b>
6.1. JAJNA ČELIJA	159
6.2. GRANULOZA ČELIJE	164
6.3. TEKA ČELIJE	167
6.4. STROMA I POVRŠINSKI EPITEL JAJNIKA	168
6.5. RAZVOJ FOLIKULA	169
6.6. REGRUTOVANJE, SELEKCIJA I ODABIR DOMINANTNOG FOLIKULA	175
6.7. LITERATURA	187

Nebojša Andrić

<b>7. ČELIJSKI I MOLEKULSKI MEHANIZMI U OVULACIJI</b>	<b>189</b>
7.1. ČELIJSKI I MOLEKULSKI MEHANIZMI U MURALNIM GRANULOZA ČELIJAMA	192
7.2. ČELIJSKI I MOLEKULSKI MEHANIZMI U KUMULUSNIM GRANULOZA ČELIJAMA	198
7.3. MOLEKULSKI MEHANIZMI U JAJNOJ ČELIJI	205
7.4. LITERATURA	216

Nebojša Andrić, Jelena Marković Filipović

<b>8. ŽUTO TELO</b>	<b>219</b>
8.1. LUTEINIZACIJA	221
8.2. STEROIDOGENEZA U ŽUTOM TELU	226
8.3. HORMONSKA REGULACIJA ŽUTOG TELA	229
8.4. REGRESIJA ŽUTOG TELA	235
8.5. LITERATURA	240

Radmila Kovačević

<b>9. NEUROENDOKRINE OSNOVE MENSTRUALNOG CIKLUSA</b>	<b>243</b>
9.1. REGULACIJA LUČENJA FSH I LH	246
9.2. MENSTRUALNI CIKLUS	252
9.3. ESTRUSNI CIKLUS PACOVA	257
9.4. LITERATURA	261

Kristina Pogrmić Majkić, Radmila Kovačević

<b>10. FERTILIZACIJA I IMPLANTACIJA</b>	<b>263</b>
10.1. TRANSPORT SPERMATOZOIDA I JAJNE ČELIJE	266
10.2. KAPACITACIJA SPERMATOZOIDA	272
10.3. INTERAKCIJA SPERMATOZOIDA I JAJNE ČELIJE	278
10.4. DOGAĐAJI NAKON SPAJANJA MEMBRANE SPERMATOZOIDA I JAJNE ČELIJE	285
10.5. PRIPREMA MATERICE ZA IMPLANTACIJU PREEMBRIONA	289
10.6. IMPLANTACIJA	295
10.7. LITERATURA	301

Stevan Milatović, Dragan Stajić

<b>11. TRUDNOĆA, POROĐAJ, LAKTACIJA</b>	<b>303</b>
11.1. TRUDNOĆA	305
11.2. POROĐAJ	327
11.3. LAKTACIJA	340
11.4. LITERATURA	341

Vladislav Volarević, Marina Gazdić

<b>12. IMUNOLOGIJA TRUDNOĆE</b>	<b>343</b>
12.1. KARAKTERISTIKE UROĐENOG IMUNSKOG ODGOVORA U TRUDNOĆI	345
12.2. STEČENI IMUNSKI ODGOVOR U TRUDNOĆI	321
12.3. LITERATURA	356

Radmila Kovačević

<b>13. NEUROENDOKRINE OSNOVE PUBERTETA</b>	<b>361</b>
13.1. UVOD	363
13.2. FAZE RAZVOJA PUBERTETA	366
13.3. ADRENARHA	368
13.4. GONADARHA	369
13.5. POSTNATALNI RAZVOJ OSOVINE HIPOTALAMUS-HIPOFIZA-GONADE	370
13.6. MEHANIZAM NASTANKA PUBERTETA	374
13.7. POREMEĆAJI PUBERTETA	382
13.8. LITERATURA	384

Kristina Pogrmić-Majkić

<b>14. MENOPAUZA</b>	<b>387</b>
14.1. HORMONSKE PROMENE TOKOM FAZE TRANZICIJE U MENOPAUZI	392
14.2. HORMONSKE PROMENE TOKOM POSTMENOPAUZE	395
14.3. PREVREMENA MENOPAUZA	397
14.4. PROMENE NA RAZLIČITIM SISTEMIMA ORGANA TOKOM MENOPAUZE	401
14.5. LITERATURA	412

Danijela Kirovski

<b>15. KOMPATIVNA FIZIOLOGIJA REPRODUKTIVNOG CIKLUSA KOD DOMAĆIH ŽIVOTINJA SISARA</b>	<b>413</b>
15.1. RAZLIKA IZMEĐU MENSTRUALNOG CIKLUSA PRIMATA I ESTRUSNOG CIKLUSA NEPRIMATA	415
15.2. KARAKTERISTIKE ESTRUSNOG CIKLUSA RAZLIČITIH VRSTA DOMAĆIH ŽIVOTINJA	426
15.3. LITERATURA	433
<b>SKRAĆENICE</b>	<b>435</b>



**Jelena Marković Filipović**

---

**1.  
STRUKTURA  
I FUNKCIJA  
ŽENSKOG  
REPRODUKTIVNOG  
SISTEMA**

---





Ženski reproduktivni sistem čine spoljašnji i unutrašnji polni organi. U unutrašnje polne organe spadaju jajnici, jajovodi, materica i vagina, dok spoljašnje polne organe čine vestibulum vagine, male i velike usne i klitoris. U ženskom reproduktivnom sistemu nastaju ženski gameti (ovocite), sintetišu se ženski polni hormoni estrogene i progesteron, i u njemu dolazi do oplodjenja. Takođe, ovaj sistem obezbeđuje sredinu u kojoj se odvija embrionalni i fetalni razvoj ploda sve do porođaja. Tokom reproduktivnog doba, ženski polni organi prolaze kroz strukturne i funkcionalne ciklične promene svakog meseca. Ove promene čine reproduktivni ciklus, koji ima ulogu da obezbedi zrelu jajnu ćeliju, omogući uslove za oplodjenje i pripremi matericu za prihvatanje ploda ukoliko dođe do oplodjenja. Cikličnost i pravilnost ovih promena regulisani su neurohumoralnim putem. Reproductivni ciklus je primarno regulisan od strane dva hormona koje izlučuje adenohipofiza: folikulostimulišući hormon (eng. *follicle-stimulating hormone*, FSH) i luteinizirajući hormon (eng. *luteinizing hormone*, LH) koji regulišu funkciju jajnika. Oslobođanje LH i FSH iz adenohipofize se odvija pod kontrolom gonadotropnog hormona-oslobođajućeg hormona (eng. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) koji se sintetiše u hipotalamusu. U jajnicima se sintetišu estrogene i progesteron koji regulišu i usklađuju promene na ostalim polnim organima. Jedan reproduktivni ciklus u proseku traje 28 dana, uz male individualne varijacije.

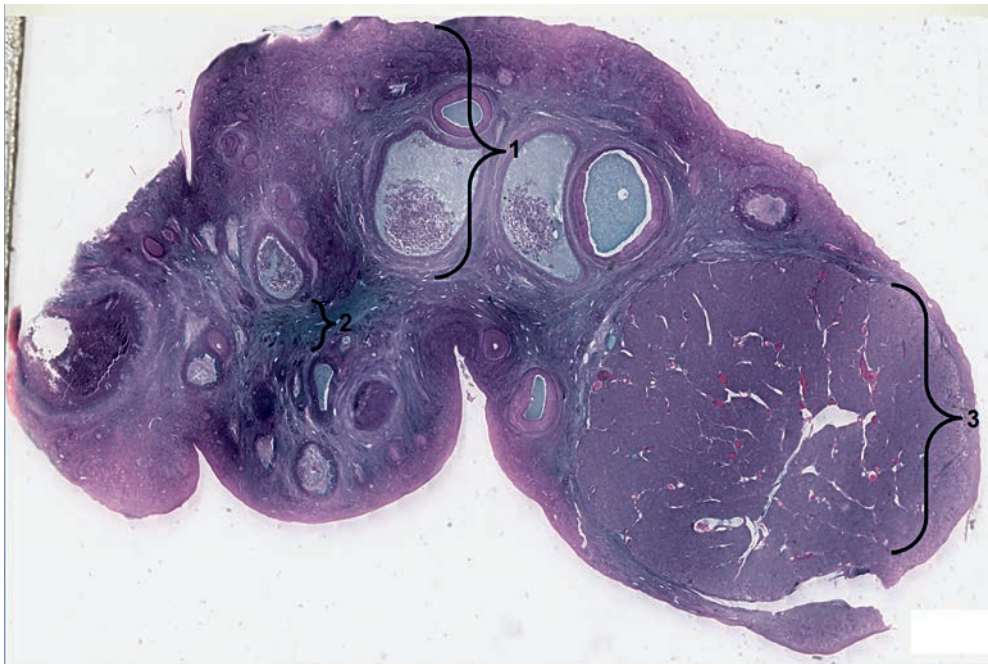
## 1.1. JAJNIK (OVARIUM)

Jajnik je žlezda sa dvojakom, endokrinom i egzokrinom funkcijom. Endokrina funkcija se ogleda u sintezi i sekreciji ženskih polnih hormona, estrogene i progesterona, dok rast, sazrevanje i oslobođanje jajne ćelije predstavljaju njegovu egzokrinu ulogu.

Jajnici su parni organi oblika i veličine badema. Njihove dimenzije u proseku su: dužina 3 cm, širina 1,5 cm i debljina 1 cm. Nalaze se u karličnoj duplji, bočno od materice. Obavijeni su mezovarijumom, koj predstavlja nabor trbušne maramice (peritoneuma) kroz koji prolaze nervi, krvni i limfni sudovi jajnika.

Površina jajnika je pokrivena jednoslojnim izoprizmatičnim epitelom – germinativnim epitelom, koji predstavlja nastavak epitela peritoneuma.

Naziv ovog epitela potiče od pogrešne pretpostavke da predstavlja izvor jajnih ćelija. Ispod germinativnog epitela nalazi se kapsula jajnika izgrađena od neuređenog gustog vezivnog tkiva koja se naziva *tunica albuginea*. Sačinjena je od snopova kolagenih vlakana koja se pružaju u različitim pravcima, mnogobrojnih fibrocita i pojedinačnih miofibroblasta; slabo je vaskularizovana i daje beličastu boju jajniku. Ispod *tunica albuginea* nalazi se tkivo jajnika koje je podeljeno na periferni širi region označen kao kora jajnika (lat. *cortex ovarii*) i središnji uži deo koji se naziva srž jajnika (lat. *medulla ovarii*) (Slika 1.1).



**Slika 1.1.** Histološki presek jajnika. 1 kora jajnika; 2 srž jajnika; 3. žuto telo

### 1.1.1. Srž jajnika

Srž predstavlja središnji deo jajnika. Izgrađena je od rastresitog vezivnog tkiva, većih ogranaka krvnih i limfnih sudova i nervnih vlakana. U blizini kore nalaze se spiralne arterije, koje omogućuju brzo prilagođavanje uslovima tokom folikulogeneze, ovulacije i nastanka žutog tela.

### 1.1.2. Kora jajnika

Kora jajnika sačinjena je od rastresitog vezivnog tkiva sa mnogobrojnim ćelijama koje formiraju stromu. Fibroblasti strome nazivaju se stromalne ćelije. Zahvaljujući prisustvu receptora, ove ćelije reaguju na ženske polne hormone.

U kori jajnika sazrevaju jajne ćelije. Proces nastanka jajnih ćelija naziva se ovogeneza. Počinje u petom mesecu intrauterinog života kada se ovogonije diferenciraju u primarne ovocite. Oko svake primarne ovocite nalazi se jedan sloj sitnih folikulskih (granuloza) ćelija, koje zajedno sa ovocitom obrazuju jajne folikule. Tokom fetusnog perioda primarne ovocite započinju prvu mejotičku deobu, ali se zaustavljaju u profazi, u kojoj ostaju sve do puberteta kada se ovogeneza nastavlja. Najviše primarnih ovocita, oko 5 miliona, ima u petom mesecu intrauterinog života. Nakon toga, njihov broj se neprestano smanjuje pošto veliki broj ovocita umire apoptozom. Za razliku od muških polnih ćelija, jajne ćelije se više ne stvaraju tokom života. Na rođenju žensko dete ima 1–2 miliona jajnih ćelija, a do puberteta preživi ih oko 400 000. Od puberteta svakog meseca po jedna primarna ovocita završava prvu mejotičku deobu i nastaje sekundarna ovocita koja se otpušta iz jajnika. Tokom reproduktivnog doba žene, koje traje 35–40 godina, iz jajnika se otpusti oko 400–450 zrelih jajnih ćelija u formi sekundarne ovocite. Ostale jajne ćelije propadaju bez dostizanja pune zrelosti.

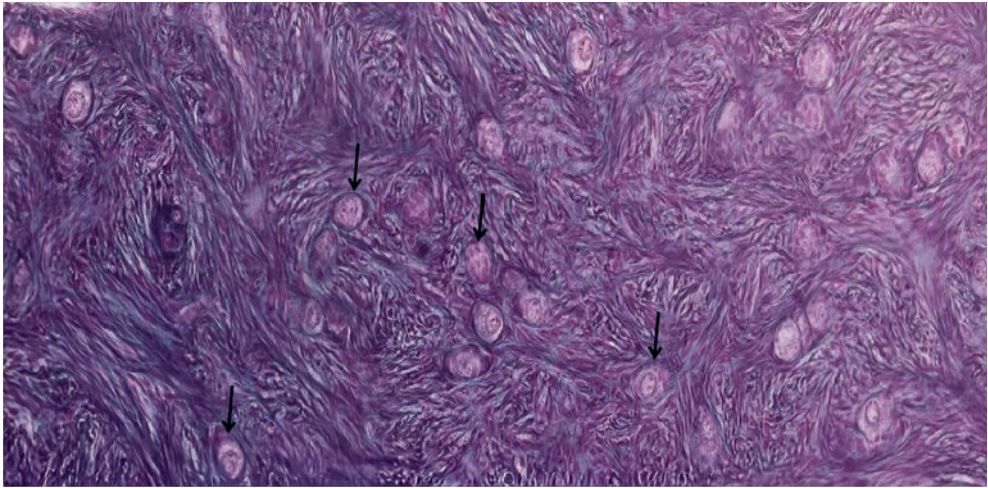
### 1.1.3. Ciklus jajnika (Ovarijalni ciklus)

Ovarijalni ciklus je deo reproduktivnog ciklusa koji se odnosi na promene na jajnicima. Početak ovarijalnog ciklusa stimulisan je povišenim nivoom FSH hipofize, pod čijim uticajem 5–12 folikula iz kore nastavlja sazrevanje. Dolazi do buđenja primarne ovocite koja je zaustavljena u profazi prve mejotičke deobe. Folikulske ćelije dobijaju izoprizmatičan oblik, proliferišu i luče estrogene. Estrogen dominira u prvoj polovini ciklusa i sinhronizuje aktivnost ostalih polnih organa. Od folikula koji su nastavili folikulogenezu, samo jedan sazreva dok ostali propadaju tj. podležu atreziji. Oko 13. ili 14. dana ciklusa FSH i LH dostižu svoj maksi-

malan nivo. Povišen nivo ovih hormona stimuliše primarnu ovocitu da završi prvu mejotičku deobu pri čemu nastaju sekundarna ovocita i prvo polarno telo. Sekundarna ovocita odmah započinje drugu mejotičku deobu, ali biva zaustavljena u metafazi. U procesu ovulacije, pod dejstvom hormona LH, dolazi do prskanja zrelog jajnog folikula, prilikom čega se oslobađa sekundarna ovocita. Od ostataka prsnutog folikula pod dejstvom LH nastaje privremena žlezdana struktura koja se naziva žuto telo (lat. *corpus luteum*). Ukoliko ne dođe do oplođenja žuto telo propada, i time se završava jedan ovarijalni ciklus. Kod žena dužina ovarijalnog ciklusa je individualna, ali u proseku traje oko 4 nedelje. Novi ovarijalni ciklus poklapa se sa prvim danom menstruacije i počinje završetkom prethodnog ciklusa. Period ovarijalnog ciklusa do ovulacije naziva se folikulska faza, dok se period nakon ovulacije do pojave menstrualnog krvarenja označava kao luteinska faza. Ovarijalni ciklusi izostaju tokom trudnoće i ponovo se javljaju posle porođaja.

#### 1.1.4. Folikuli jajnika

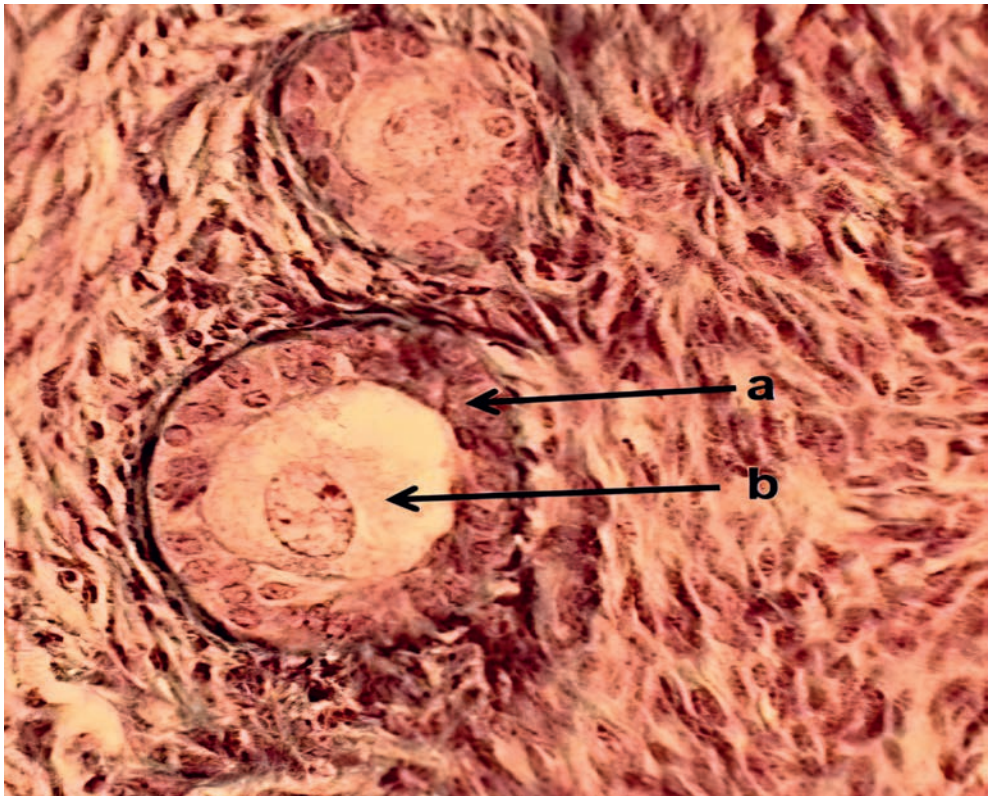
U kori se nalazi parenhim jajnika sačinjen od jajnih folikula u različitim razvojnim (primordijalni, primarni, sekundarni i tercijarni) i regresivnim stadijumima, žutog tela i intersticijskih ćelija. Jajni folikuli su loptaste avaskularne strukture, izgrađene od jedne jajne ćelije i jednog ili više slojeva folikulskih (granuloza) ćelija. Najveći broj folikula se nalazi u fazi mirovanja (mirujući folikul) i nikada ne počnu sa razvojem. Mali broj folikula raste i sazreva (sazrevajući folikul), od kojih najčešće samo jedan tokom meseca dostigne punu zrelost (zreli ili preovulacioni folikul).



**Slika 1.2.** Primordijalni folikuli (strelice)

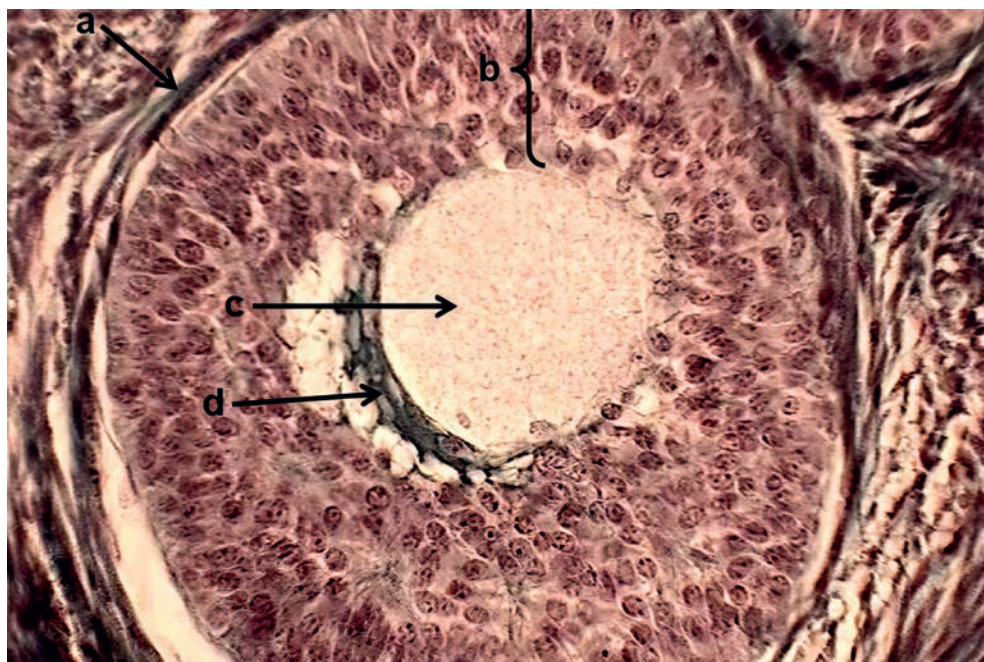
Razvoj folikula se odvija kroz nekoliko razvojnih stadijuma i naziva se folikulogeneza. U kori, neposredno ispod kapsule nalaze se primordijalni folikuli (Slika 1.2). To su najmanji i najbrojniji folikuli, koji se nalaze u fazi mirovanja. Kod žene u reproduktivnom dobu, oni čine 90–95% jajnih folikula. Primordijalni folikuli se sastoje od jajne ćelije, koja se nalazi u stadijumu primarne oocite, i jednog sloja pločastih folikulskih ćelija oko kojih se nalazi bazalna lamina. Jajna ćelija je okruglog oblika, prečnika 25–30  $\mu\text{m}$ , sa svetlom citoplazmom, velikom jedrom i slabo razvijenim organelama. Jedro je krupno, ekscentrično postavljeno sa izraženim jedarcem. Od organela ovde su prisutni retki ribozomi, pojedinačne tubule granuliranog endoplazmatičnog retikuluma, slabo razvijen Goldžijev aparat, pojedinačne lipidne kapi i malobrojne mitohondrije. Ultrastrukturalne karakteristike jajne ćelije ukazuju na niži nivo metaboličke aktivnosti. Folikulske ćelije su spljoštenog oblika, sa pljosnatim jedrom i slabo razvijenim organelama. Međusobno su povezane dezmozomima koji im pružaju stabilnost. Sa spoljašnje strane folikulske ćelije naležu na bazalnu laminu koja odvađa folikul od strome jajnika. Na rođenju, u svakom jajniku nalazi se oko 2.000.000 primordijalnih folikula. Njihov broj se tokom života stalno smanjuje, pri čemu najveći broj ovih folikula propada i od njih nastaju atretični folikuli.

Sazrevanjem primordijalnog folikula nastaje primarni folikul. Za razvoj ovih folikula nije potrebna hormonska stimulacija, tako da se oni nalaze i kod devojčica pre puberteta. Kod primarnog folikula ovocita raste i dostiže prečnik od oko 100  $\mu\text{m}$ . Jedro raste proporcionalno jajnoj ćeliji, a u citoplazmi se uvećava broj organela: cisterne Goldžijevog aparata i granuliranog endoplazmatičnog retikuluma se umnožavaju, a takođe raste i broj mitohondrija i slobodnih ribozoma. Ovocita sintetizuje glikoproteinski omotač – *zona pellucida*, koji se nalazi između nje i folikulskih ćelija. Folikulske ćelije se izdužuju i dobijaju kockast oblik. U *zona pellucida* filopodije folikulskih ćelija stupaju u kontakt sa mikrovilima jajne ćelije, pri čemu se na mestu dodira obrazuju komunikacijske veze preko kojih folikulske ćelije snabdevaju ovocitu hranljivim materijama i prenose joj signalne molekule. Primarni folikul izgrađen od primarne ovocite i sloja folikulskih ćelija naziva se primarni unilamelarni folikul (Slika 1.3.).



**Slika 1.3.** Primarni unilamelarni folikul. a folikulska ćelija; b jajna ćelija

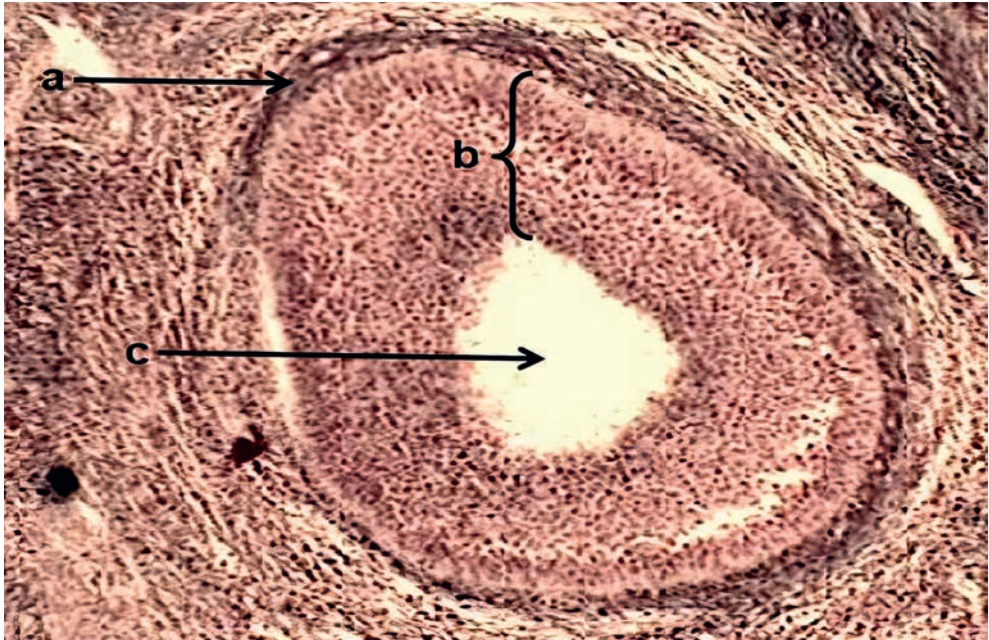
Folikulske ćelije se brzo dele formirajući višeslojni avaskularni omotač koji se označava kao granulozni sloj (lat. *stratum granulosum*), a folikulske ćelije sada se nazivaju granulosa ćelije. Ovako formiran folikul, koji se sastoji od primarne oocite okružene granuloznim slojem naziva se primarni multilamelarni folikul (Slika 1.4). Stroma jajnika oko bazalne lamine folikula diferencira se u omotač *theca folliculi*, koja se s vremenom raslojava na unutrašnji rastresiti i spoljašnji kompaktan sloj.



**Slika 1.4.** Primarni multilamelarni folikul.

a *theca folliculi*; b granulozni sloj; c jajna ćelija; d *zona pellucida*

Tokom sazrevanja primarni folikuli se spuštaju u dublje regione kore. Rast primarnog multilamelarnog folikula se odvija zahvaljujući intenzivnoj deobi i sekreciji granulosa ćelija. Naime, ove ćelije počinju da luče folikulsku tečnost (lat. *liquor folliculi*) koja se nakuplja u intercelularnim prostorima granuloznog omotača, koji se postepeno spajaju u jedinstvenu šupljinu – *antrum folliculi*. Folikulska tečnost se sastoji od neorganskih jona, glikozaminoglikana i proteina koji vezuju progesteron, estrogene i androgene, zbog čega je koncentracija ovih hormona visoka u folikulskoj tečnosti.



**Slika 1.5.** Sekundarni folikul.

a *theca folliculi*; b granulozni sloj; c *antrum folliculi*

Folikul sa formiranim antrumom naziva se sekundarni ili antralni folikul (Slika 1.5). Prečnik sekundarnog folikula je oko 200  $\mu\text{m}$ . Usled pojave antruma dolazi do raslojavanja granulosa ćelija, tako da granulosa ćelije koje se nalaze između antruma i bazalne membrane folikula obrazuju omotač – *stratum granulosum*, dok se deo granulosa ćelija koji okružuje jajnu ćeliju potiskuje na periferiju folikula gde formira jajni brežuljak (lat. *cumulus oophorus*). Sloj granulosa ćelija koji neposredno okružuje jajnu ćeliju naziva se *corona radiata*. Sekundarni folikul okružuje *theca folliculi*, koju čine dva sloja: unutrašnji vaskularni – *theca interna* i spoljašnji fibrozni – *theca externa*. Teška interna je izgrađena od sekretnih ćelija i bogate kapilarne mreže, dok teku eksternu čine mnogobrojna kolagena vlakna i retke glatkomišićne ćelije. Između dva sloja teke, kao i između teke eksterne i okolne strome jajnika ne postoji jasna granica. Sekretne ćelije teke interne imaju citološke odlike steroid-sekretujućih ćelija: dobro razvijen glatki endoplazmatski retikulum, mitohondrije sa cevastim kristama i veliki broj lipidnih kapi u citoplazmi. Na njihovoj plazmalem



nalaze se receptori za LH. Pod dejstvom LH, ove ćelije luče muški polni hormon androstendion, koji prolazi kroz bazalnu membranu folikula, i stiže do granuloza ćelija koje poseduju enzim aromatazu. Aromataza prevodi androstendion u estradiol, koji se preko kapilara teke interne raznosi po čitavom organizmu.



**Slika 1.6.** Tercijarni folikul. a *theca folliculi*; b *antrum folliculi*; c granulozni sloj; d jajni brežuljak; e *corona radiata*; f jajna ćelija

Tercijarni folikul predstavlja poslednji razvojni stadijum u folikulogenezi (Slika 1.6.). Naziva se još i zreli, preovulacioni ili De Grafov (De Graaf) folikul. Prečnik ovog folikula jeste 2–2,5 cm i nalazi se neposredno ispod

površine jajnika, gde se formira ispupčenje koje se naziva stigma. Rast tercijarnog folikula se odvija u najvećoj meri zahvaljujući rastu antruma koji se povećava usled punjenja folikulskom tečnošću. Granuloza ćelije nastavljaju da proliferišu, ali manjim intenzitetom u odnosu na stvaranje folikulske tečnosti tj. rasta antruma, što stvara stanjivanje granuloznog sloja. U tom delu stanjuju se i *theca folliculi* i *tunica albuginea*. Ovocita u tercijarnom folikulu je krupna ćelija, prečnika oko 150  $\mu\text{m}$ . Pred ovulaciju granuloza ćelije *corona radiata* luče hijaluronsku kiselinu usled čega dolazi do širenja međućelijskih prostora. Ova pojava se označava kao ekspanzija jajnog brežuljka.

### 1.1.5. Ovulacija

Ovulacija je fiziološki proces oslobađanja ovocite iz zrelog jajnog folikula koji se odvija 12–24 sata nakon što vrednost LH dostigne svoj maksimalan nivo. Prilikom ovulacije dolazi do prskanja tercijarnog folikula pri čemu sekundarna ovocita zajedno sa zonom pelucidom i koronom radiatom napušta jajnik i prelazi u jajovod, gde je u narednih 12–24 sata vitalna i sposobna za oplodnju.

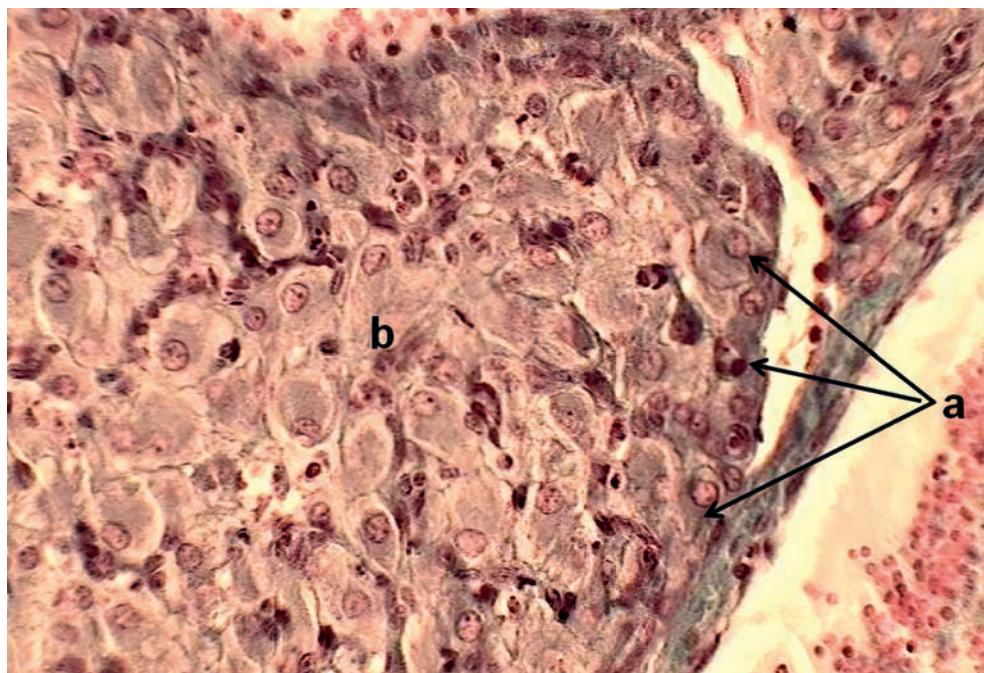
### 1.1.6. Žuto telo

Nakon prskanja tercijarnog folikula, od njegovih ostataka pod dejstvom hormona LH nastaje dobro vaskularizovana nova endokrina struktura jajnika – žuto telo (Slika 1.1). Dolazi do morfofunkcionalne transformacije granuloza i teka ćelija koja se označava kao luteinizacija. U ovom procesu ćelije se uvećavaju i dobijaju sve osobine steroid-sekretujućih ćelija: razvijen glatki endoplazmatični retikulum i Goldžijev aparat, brojne lipidne kapi i mitohondrije sa tubularnim kristama. Prilikom luteinizacije granuloza ćelije se diferenciraju u luteinske granuloza ćelije, a ćelije teke u luteinske ćelije teke (Slika 1.7). Krvni i limfni sudovi teke interne urastaju u unutrašnjost žutog tela i u njemu obrazuju gustu vaskularnu mrežu.

Luteinske granuloza ćelije se nalaze u središnjem delu žutog tela i čine oko 80% žlezdanih ćelija. Na svojoj površini imaju mikrovile u koje su ugrađeni receptori za LH. Ove ćelije izlučuju progesteron i peptid inhi-

bin koji inhibira oslobađanje FSH iz gonadotropnih ćelija hipofize tokom luteinske faze ovarijalnog ciklusa. Pored toga, one konvertuju androgene izlučene od strane luteinskih ćelija teke u estrogene.

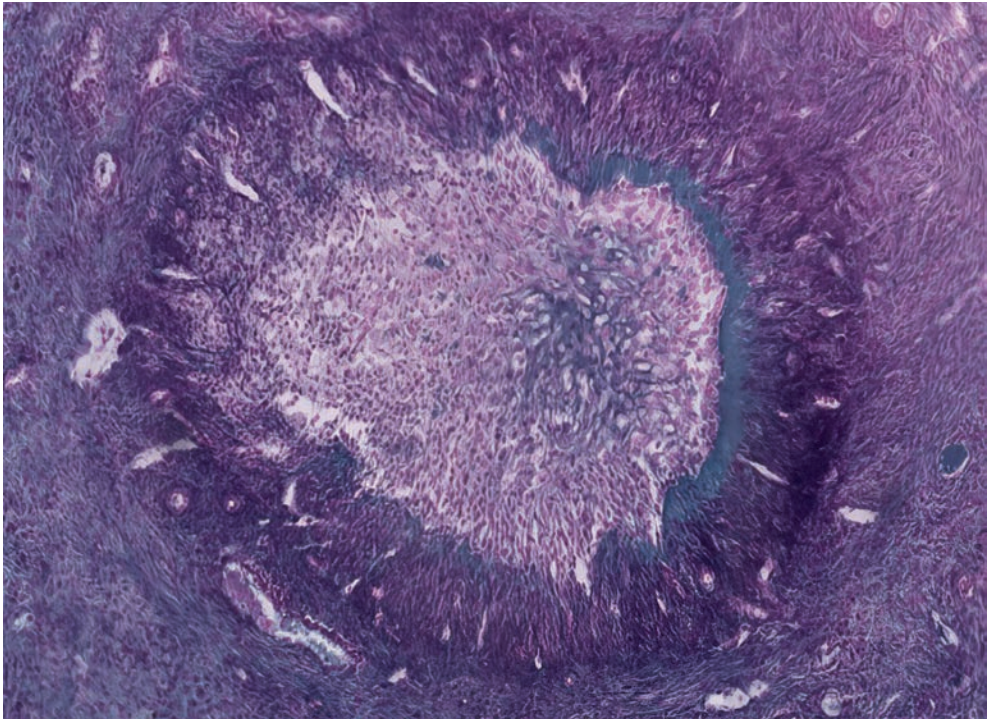
Luteinske ćelije teke čine oko 20% populacija žutog tela i nalaze se na njegovoj periferiji gde obrazuju tanak omotač oko luteinskih granuloza ćelija. Sitnije su od luteinskih granuloza ćelija i imaju tamniju citoplazmu od njih. Ove ćelije sintetišu androgene, progesteron i estrogene. Izlučivanjem hormona progesterona, žuto telo priprema matericu za trudnoću, a dojke za laktaciju. Dužina trajanja žutog tela zavisi od jajne ćelije tj. od njene oplodnje. Kod žena ako dođe do oplodjenja žuto telo deluje 4–5 meseci i tada se naziva gravidno žuto telo (lat. *corpus luteum graviditatis*). Ukoliko ne dođe do oplodnje, delovanje žutog tela prestaje nakon 2–3 nedelje i onda se naziva menstrualno žuto telo (lat. *corpus luteum menstruations*). Gravidno žuto telo je veće od menstrualnog. Nakon što završe svoju ulogu, obe vrste žutog tela propadaju i zamenjuju se vezivnim tkivom koje obrazuje ožiljno (belo) telo (lat. *corpus albicans*). Gravidno žuto telo ostavlja veći ožiljak od menstrualnog.



**Slika 1.7.** Žuto telo. a luteinske ćelije teke; b luteinske granuloza ćelije

### 1.1.7. Atrezija folikula jajnika

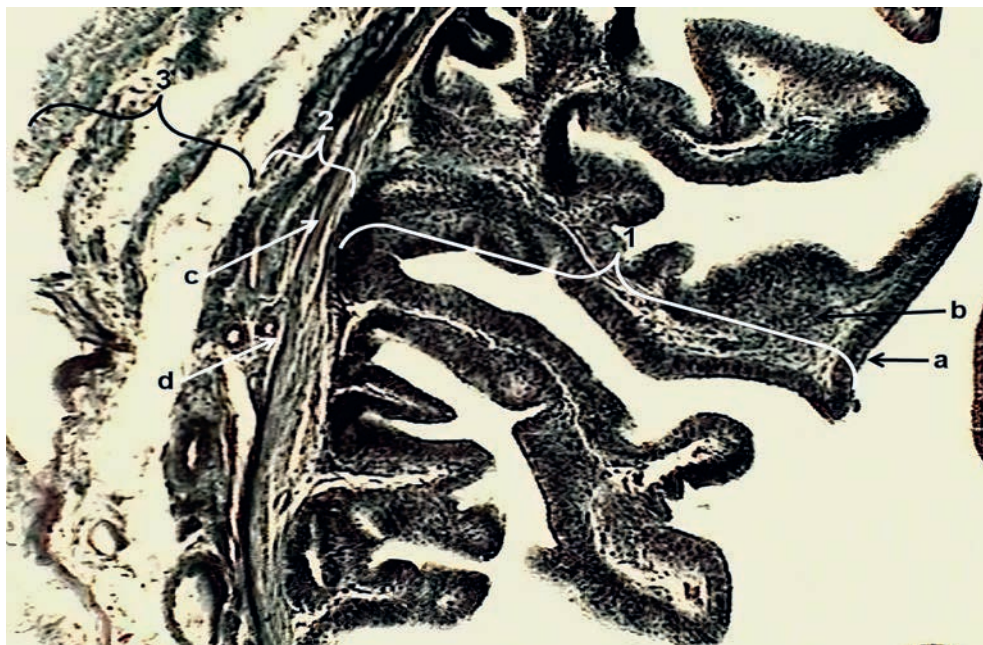
Atrezija je fiziološki proces prilikom kog dolazi do propadanja jajnih folikula. Atrezija zahvata sve razvojne stadijuma folikula, od primordijalnih do tercijarnih. Što je folikul u višem stadijumu razvoja, proces atrezije je složeniji. Prilikom atrezije primordijalnih i primarnih folikula, ovocita i folikulske ćelije umiru apoptozom, a njihove ostatke fagocitiraju makrofazi. Kod tercijarnog folikula atretične promene se prvo odvijaju u zidu, gde granuloza ćelije umiru apoptozom, raskidaju se međućelijske veze između njih, i one otpadaju u antrum. Ćelije teke interne hipertrofišu, a bazalna membrana folikula zadebljava i sada se naziva staklasta membrana. Ubrzo zatim propada i sama ovocita. Atretični folikul (Slika 1.8) se polako smežurava, a u njegov antrum migriraju fibroblasti. Staklasta membrana se razlaže, a hipertrofične ćelije teke interne koje se sada nazivaju intersticijske ćelije, ostaju trajno u stromi jajnika gde pod dejstvom LH luče steroidne hormone, u najvećoj meri androstendion.



**Slika 1.8.** Atretični folikul

## 1.2. JAJOVOD (TUBA UTERINA)

Jajovodi su parni cevasti organi koji se pružaju od materice do blizine površine jajnika. Kroz njih se ovocita prenosi iz jajnika ka materici, kao i spermatozoidi od materice prema jajniku. Oplođenje se odvija u jajovodu, koji peristaltikom svog zida, prenosi zametak do materice. U anatomskom smislu, na jajovodima se razlikuju četiri dela između kojih je nejasna granica. Materični (intramuralni) deo se nalazi unutar zida materice. To je najkraći i najuži deo jajovoda. Na njega se nadovezuje tesnac (lat. *isthmus*), uzak i nešto duži segment, koj se nalazi neposredno uz matericu. Treći segment je ampula, najduži i prošireni deo u kome se odvija oplođenje. Četvrti deo je levak (lat. *infundibulum*), spoljni prošireni deo jajovoda koji se otvara u trbušnu duplju neposredno u blizini jajnika. Sa njegovog oboda pružaju se prstasti produžeci, fimbrije, koji za vreme ovulacije obuhvataju jajnik i pomažu prihvatanje jajne ćelije. U histološkom smislu, zid jajovoda izgrađuju tri ovojnice: sluznica (lat. *tunica mucosa*), mišićni sloj (lat. *tunica muscularis*) i seroza (lat. *tunica serosa*) (Slika 1.9).



**Slika 1.9.** Histološki presek jajovoda. 1 sluznica; 2 mišićni sloj; 3 seroza; a epitel; b lamina propria; c kružni mišićni sloj; d uzdužni mišićni sloj

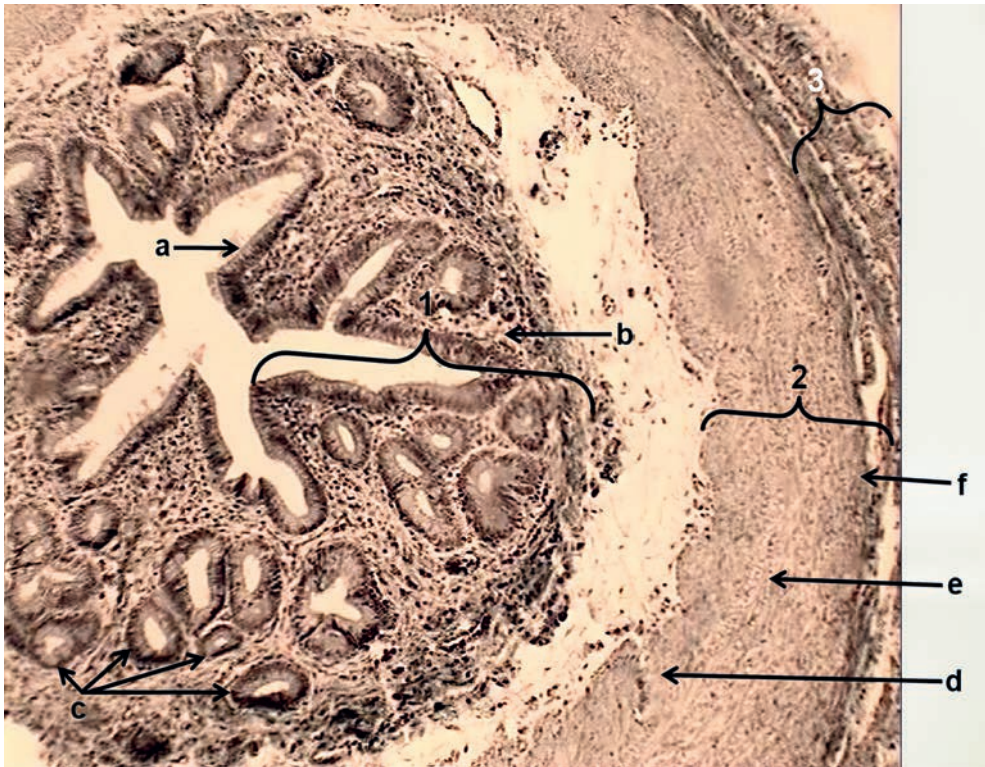
Sluznica ima razgranate nabore koji su posebno izraženi u regionu ampule. Izgrađena je od epitela i lamine proprije. Epitel je jednoslojan i cilindričan, a čine ga dve vrste ćelija: sekretne i trepljaste. Sekretne ćelije imaju kupolast apikalni deo sa kratkim mikrovilima, dobro razvijene sekretne organele (granulirani endoplazmatični retikulum i Goldžijev aparat) i sekretne granule. Procesom egzocitoze sadržaj sekretnih granula se izbacuje u lumen jajnika. Ovaj sekret sadrži hranljive materije koje ishranjuju jajnu ćeliju i spermatozoid, kao i zametak prilikom trodnevnog transporta kroz jajovod. Trepljaste ćelije imaju slabije razvijene organele i brojne kinocilije na apikalnoj površini koje se zamahuju prema materici. Svojim pokretima kinocilije rasprostiru sekret iz sekretnih ćelija po površini epitela. Ispod epitela nalazi se lamina proprija, koju čini tanak sloj rastresitog vezivnog tkiva.

Mišićni sloj izgrađen je od dva sloja glatkih mišićnih ćelija: unutrašnjeg kružno i spoljašnjeg uzdužno postavljenog. Ključnu ulogu u transportu oplođene jajne ćelije prema materici ima peristaltika mišićnog sloja, a ne pokreti kinocilija trepljastih ćelija. Kontrakcije mišićnog sloja se pojačavaju za vreme ovulacije. Snopovi glatkih mišićnih ćelija prodiru u fimbrije i omogućuju im pokretljivost i približavanje jajnicima prilikom prihvatanja ovocite tokom ovulacije.

**Seroza** je visceralni list peritoneuma i sastoji se od male količine rastresitog vezivnog tkiva i prostog pločastog epitela, mezotela, na površini.

### 1.3. MATERICA (*UTERUS*)

Materica je šupalj kruškast organ koji prihvata zametak i obezbeđuje uslove za njegov rast i razvoj. Izgrađena je od proširenog dela koji se naziva telo (lat. *corpus uteri*) i užeg dela koji se označava kao vrat ili grlić materice (lat. *cervix uteri*). Preko tela, materica je u kontaktu sa jajvodima, dok je grlić preko materičnog otvora u kontaktu sa vaginom. Zid materice izgrađen je od sluznice, mišićnog sloja i seroze, koji se zbog dobre razvijenosti nazivaju endometrijum, miometrijum i perimetrijum (Slika 1.10).



**Slika 1.10.** Histološki presek materice. 1 endometrijum; 2 miometrijum; 3 perimetrijum; a funkcionalni sloj; b bazalni sloj; c materične žlezde; d *stratum submucosum*; e *stratum vasculare*; f *stratum subserosum*

Endometrijum (sluznica, lat. *tunica mucosa*) sastoji se od jednoslojnog cilindričnog epitela i lamine proprije izgrađene od rastresitog vezivnog tkiva. Epitel ponire u laminu propriju obrazujući tako materične žlezde (lat. *glandulae uterinae*). To su tubularne žlezde, koje se prostiru celom dužinom endometrijuma. U njihovoj građi se razlikuju baza, telo i vrat. Na površini materice epitel se sastoji od trepljastih ćelija sa kinocilijama i sekretnih ćelija, dok je epitel materičnih žlezda izgrađen uglavnom od sekretnih ćelija. Rastresito vezivo lamine proprije je bogato fibroblastima i intercelularnom osnovnom supstancom u kojoj se nalaze kolagena i elastična vlakna. U vezivnom tkivu se nalaze brojne materične žlezde i krvni sudovi, od kojih su od posebnog značaja arteriole spiralnog pravca pružanja tzv. spiralne arteriole.

Od puberteta do menopauze, svakog meseca pod dejstvom polnih hormona jajnika, menja se histoarhitektura endometrijuma, pri čemu njegova debljina varira od 1 do 6 mm. Ove ciklične promene endometrijuma predstavljaju menstrualni ciklus.

Endometrijum je podeljen na dva sloja: površinske dve trećine čine funkcionalni sloj (lat. *stratum functionale*), dok donja trećina predstavlja bazalni sloj (lat. *stratum basale*). Funkcionalni sloj obuhvata deo endometrijuma u kome su smešteni vratovi i tela materičnih žlezda. Ovaj sloj menja izgled tokom menstrualnog ciklusa. Naime, pod uticajem polnih hormona funkcionalni sloj se prvo obnavlja, zatim zadebljava, i ukoliko ne dođe do oplodjenja u potpunosti se ljušti tokom menstruacije. U bazalnom delu endometrijuma nalaze se baze materičnih žlezdi. Ovaj sloj ne podleže cikličnim promenama, i iz njega se nakon menstruacije obnavlja funkcionalni sloj.

Miometrijum (mišićni sloj, lat. *tunica muscularis*) je najdeblji sloj zida materice i neposredno se nadovezuje na mišićni sloj jajovoda. Sastoji se debelih slojeva glatkih mišića koji su razdvojeni rastresitim vezivnim tkivom bogatim elastičnim vlaknima. Mišićni snopovi obrazuju tri nejasno odvojena podsloja (lat. *stratum*): unutrašnji submukozni (lat. *stratum submucosum*), srednji vaskularni (lat. *stratum vasculare*) i spoljašnji subserozni (lat. *stratum subserosum*). *Stratum submucosum* je u kontaktu sa endometrijumom, i izgrađen je od longitudinalno i cirkularno postavljenih mišićnih snopova. *Stratum vasculare* je najdeblji podsloj miometrijuma. Ovde se nalaze brojni krvni sudovi većeg lumena, od kojih se posebno ističu arterije sa debelim zidovima. Snopovi glatkih mišićnih ćelija su cirkularno i koso postavljeni. Glatke mišićne ćelije ovog podsloja učestvuju u hemostazi posle porođaja. *Stratum subserosum* nalazi se ispod perimetrijuma. To je najtanji podsloj miometrijuma, u kome su snopovi glatkih mišićnih ćelija longitudinalno orijentisani.

U trudnoći materica se povećava, što je pre svega posledica povećanja zapremine (hipertrofija) i broja (hiperplazija) glatkih mišićnih ćelija miometrijuma. U negravidom uterusu one su dugačke oko 50  $\mu\text{m}$ , dok u trudnoći one mogu dostići dužinu i do 500  $\mu\text{m}$ . Broj ćelija se povećava zahvaljujući mitotskoj deobi postojećih glatko mišićnih ćelija, i diferencijaciji nediferenciranih ćelija mezenhimnog porekla. Hipertrofija i hiperplazija ćelija su posledica dejstva estrogenih hormona. Takođe, pod uticajem estrogena



glatke mišićne ćelije sintetišu kolagen i retikularna vlakna. Na ovaj način se uvećava količina vezivnog tkiva što omogućuje rastezanje tela materice. Tokom trudnoće, sve do porođaja uvećava se broj neksusa (pukotina-stih veza) između glatkih mišićnih ćelija. Za vreme trudnoće kontrakcije miometrijuma su sprečene dejstvom progesterona i relaksina. Prilikom porođaja, pod uticajem oksitocina i prostaglandina mišići miometrijuma se snažno kontrahuju čime se plod potiskuje niz porođajni kanal. Prisustvo neksusa omogućuje sinhronizovane kontrakcije muskulature. Nakon porođaja, mišićne ćelije se smanjuju do prvobitne veličine, a neke od njih i propadaju procesom apoptoze. Stvorena kolagena i retikularna vlakna se enzimski razgrađuju i njihove ostatke uklanjaju makrofazi. U starosti mišićne ćelije atrofiraju i zamenjuje ih vezivno tkivo.

Perimetrijum (lat.) se sastoji od mezotela i male količine submezotel-nog rastresitog vezivnog tkiva. Pokriva celu zadnju i deo prednje površine materice. Deo prednje površine, koji je u kontaktu sa mokraćnom bešikom oblaže adventicija.

### 1.3.1. Vaskularizacija materice

Krv se u matericu doprema preko materične arterije (lat. *a. uterina*), od koje se odvaja 6–10 međusobno povezanih vijugavih grana koje predstavljaju lučne arterije (lat. *a. arcuatae*), smeštene u vaskularnom podsloju miometrijuma. Lučne arterije daju ogranke – radijalne arteriole koje ulaze u endometrijum. Po ulasku, od njih se odvajaju bazalne arteriole, koje vaskularizuju bazalni sloj endometrijuma. Stabla radijalnih arteriola prodiru u funkcionalni sloj i spiralno se uvijaju, formirajući na taj način spiralne arteriole koje ishranjuju funkcionalni sloj endometrijuma. U lamini proprijii od ogranaka spiranih arteriola obrazuje se površni kapilarni splet. Spiralne arteriole su osetljive na dejstvo polnih hormona, i reaguju na periodične promene estrogena i progesterona. Ciklično širenje i skupljanje ovih arteriola odgovorno je za iniciranje menstrualnog krvarenja. Nakon porođaja, obilno krvarenje je sprečeno snažnim kontrakcijama materičnih arteriola. Vijugav tok arteriola omogućuje njihovo izduživanje u trudnoći kada se zapremina materice povećava. Vene materice se ulivaju u lučne vene koje na svom putu prate lučne arterije.

### 1.3.2. Menstrualni ciklus

Periodične varijacije u nivou polnih hormona jajnika tokom ovarijalnog ciklusa dovode do promena i na drugim delovima reproduktivnog sistema žene. Ove promene su najizraženije na endometrijumu, koji podleže nizu morfofunkcionalnih promena pod uticajem estrogena i progesterona. Ciklične promene strukture i funkcije endometrijuma predstavljaju menstrualni ciklus. Njegov biološki značaj je priprema endometrijuma za nidaciju blastociste ili ljuštenje funkcionalnog sloja endometrijuma ukoliko oplodjenje izostane. Dužina ciklusa u proseku traje 28 dana. Menstrualni ciklus izostaje pre menarhe i posle menopauze, kao i tokom trudnoće. Podeljen je u četiri faze: proliferativna (folikulska), sekretna (luteinska), ishemična i menstrualna.

Proliferativna faza počinje nakon završetka prethodne menstruacije, i obuhvata prvu polovinu menstrualnog ciklusa. Ova faza se poklapa sa rastom ovarijalnih folikula i lučenjem estrogena od strane folikulskih ćelija, zbog čega se još naziva i estrogena tj. folikulska faza. Pod dejstvom estrogena dolazi do proliferacije sekretnih ćelija epitela i vezivnih ćelija lamine proprije, što ima za posledicu zadebljavanje endometrijuma i njegovo obnavljanje iz bazalnog sloja. Deobom sekretnih ćelija materične žlezde se proširuju i izdužuju. Sekret materičnih žlezdi je vodenast i oskudan. Spiralne arteriole koje su uništene u prethodnoj menstruaciji izrastaju iz radijalnih arteriola. Ova faza traje do ovulacije, kada počinje dejstvo hormona žutog tela, i naredna sekretna faza.

Sekretna (luteinska) faza počinje nakon oslobađanja ovocite iz zrelog jajnog folikula tj. ovulacije. Ova faza se poklapa sa stvaranjem i funkcionisanjem žutog tela u jajniku. Pod dejstvom progesterona sintetisanog u žutom telu, endometrijum dalje zadebljava i sprema se da primi oplodenu jajnu ćeliju. U ranoj luteinskoj fazi sekretne ćelije endometrijuma se povećavaju. U njihovom bazalnom delu nagomilava se glikogen, čime se jedro potiskuje ka apikalnom delu ćelije. Ispod plazmaleme nalaze se sekretne granule ispunjene glikoproteinom, koji se egzocitozom oslobađa u lumen materičnih žlezdi. Materične žlezde se pune sekretom, izdužuju i proširuju. U lamini propriji, između ćelija vezivnog tkiva nakuplja se veća količina tkivne tečnosti (edem) što ima za posledicu dodatno zadebljanje endometrijuma. Spiralne arteriole se izdužuju i postaju vijugave. U kasnoj

sekretnoj fazi, sekretne ćelije se dodatno povećavaju, granule glikogena se premeštaju u apikalni deo ćelije, potiskujući jedro ka bazalnom delu. Neposredno pred sledeću menstruaciju, apikalna plazmalema se dezintegriše pri čemu se glikogen oslobađa u materične žlezde. Ako dođe do oplodjenja sekretna faza prelazi u gravidnu, dok ukoliko oplodjenje izostane nastupa ishemična faza menstrualnog ciklusa.

Ishemična faza je kratkotrajna i traje svega nekoliko sati pre menstrualne faze. Nastaje kao posledica snažne kontrakcije mišićnih ćelija spiralnih arteriola koje vaskularizuju funkcionalni sloj. Zbog smanjenog dotoka krvi, prvo dolazi do ishemije, a nakon toga i do nekroze funkcionalnog sloja. Bazalni sloj ostaje neoštećen jer je vaskularizovan pravim arteriolama iz miometrijuma.

Menstrualna faza nastupa kada usled popuštanja kontrakcija spiralnih arteriola nadolazeći mlaz krvi oljušti nekrotični funkcionalni sloj. Krv prodire u kapilarnu mrežu funkcionalnog sloja, i preko oštećenih kapilara stiže u vezivno tkivo lamine proprije, odakle kroz oštećeni žlezdani epitel dospeva u materične žlezde i lumen materice. Kao posledica raspadanja žlezdanih ćelija, iz njih se oslobađaju enzimi koji razgrađuju tkivo funkcionalnog sloja koje se raspada u fragmente, i zajedno sa sekretom žlezda, tkivnom tečnosti i menstrualnom krvi stiže u lumen materice, odakle se izbacuje kroz vaginu što se manifestuje kao menstruacija (menzes). Ova krv ne koaguliše pošto je njen hemijski sastav promenjen pod dejstvom oslobođenih enzima. U menstrualnoj fazi se odbacuje ceo funkcionalni sloj, a ostaje bazalni sloj sa ostacima žlezda od koga se regeneriše kompletni endometrijum. Drugi dan nakon prestanka krvarenja lumen materice je obložen epitelom, i regenerisan endometrijum ulazi u folikulsku fazu novog menstrualnog ciklusa.

### 1.3.3. Grlić materice (*Cervix uteri*)

Grlić je tubulozna struktura preko koje materica komunicira sa vaginom. Deo grlića koji prominira u lumen vagine označava se kao vaginalni deo grlića (lat. *portio vaginalis uteri* -PVU). U središnjem delu grlića nalazi se centralni kanal (lat. *canalis cervicalis*) koji se završava u vagini materičnim otvorom (lat. *ostium uteri*). Zid grlića je izgrađen od tri sloja (sluznica, mišićni sloj i seroza), ali se u histološkoj građi ova tri sloja

znatno razlikuju od tela materice. Sluznica vaginalnog dela grlića označava se kao *ectocervix* (*exocervix*), a sluznica centralnog kanala naziva se *endocervix*. Epitel ektocerviksa je pločastoslojevit bez orožavanja, sličan epitelu vagine na koji se nastavlja, dok je epitel endocerviksa jednoslojni cilindrični, izgrađen od sekretnih ćelija i trepljastih ćelija sa kinocilijama, i predstavlja produžetak epitela endometrijuma. Sekretne ćelije izlučuju mukus koji kinocilije trepljastih ćelija pomeraju prema materičnom otvoru i vagini. U sluznici se nalaze veoma razgranate cervikalne žlezde (lat. *glandulae cervicales uteri*). Sekretne ćelije ovih žlezdi luče sluzav sekret koji oblaže cervikalni kanal i vaginu. U prvoj polovini ciklusa ovaj sekret je vodenast i obilan i olakšava kretanje spermatozoida ka telu materice, dok je u drugoj polovini ciklusa i u trudnoći sekret gust i obilan, i njegova uloga je da spreči prodor bakterija iz vagine u matericu. Lamina proprija cerviksa ima više vezivnih vlakana, a manje ćelija u odnosu na telo materice, zbog čega je čvršća. Sluznica cerviksa se ne odlubljuje tokom menstruacije, već se uticaj hormona ogleda u cikličnim promenama količine i viskoznosti sekreta cervikalnih žlezda. Miometrijum grlića je slabo razvijen. Tokom porođaja se širi i omogućuje izlazak ploda. Površinu grlića sa zadnje i bočnih strana oblaže perimetrijum, dok se na prednjoj strani prema mokraćnoj bešici nalazi adventicija.

## 1.4. RODNICA (VAGINA)

Rodnica je kopulacini organ žene i deo porođajnog kanala. Ima oblik spljoštene cevi i pruža se od *portio vaginalis uteri* do *vestibulum vagine*. Zid vagine izgrađen je od tri sloja: sluznice, mišićnog sloja i adventicije.

Sluznica (lat. *tunica mucosa*) ima brojne poprečne nabore (lat. *rugae vaginales*), a sastoji se od pločastoslojevitog epitela bez orožavanja i debele lamine proprije. Epitel je izgrađen od jednog reda izoprizmatičnih ćelija koje čine bazalni sloj, zatim nekoliko redova poligonalnih ćelija koje obrazuju intermedijalni sloj, i na kraju od nekoliko redova tankih pločastih ćelija koje formiraju površni (preorožali) sloj. Pre puberteta epitel je tanak i njegove ćelije su poređane u nekoliko redova (6–8). U reproduktivnom dobu broj redova ćelija u epitelu zavisi od faze reproduktivnog ciklusa tj. od nivoa estrogena i progesterona. Pod dejstvom estrogena povećava se visina epitela, tako da se u proliferativnoj fazi epitel sastoji od oko 45 redova ćelija,

a u sekretnoj fazi od oko 30. Epitel je najdeblji dan pred ovulaciju. Nakon menopauze epitel postaje tanji. Estrogen stimulira epitelne ćelije da sintetišu i nagomilavaju glikogen. Pred ovulaciju površne ćelije se ljušte i otpadaju u lumen vagine, gde ih razgrađuju apatogeni laktobacili, pri čemu se oslobađa glikogen. Ove bakterije metabolišu glikogen do mlečne kiseline koja održava nizak pH vagine. Na ovaj način sprečava se razmnožavanje patogenih mikroorganizama koji rastu pri višim pH vrednostima. Takođe, pre ovulacije pod dejstvom estrogena, u površnim epitelnim ćelijama javljaju se keratohijalinske granule, ali pravi keratin se nikad ne pojavljuje, i ove ćelije zadržavaju jedra, zbog čega se ovaj površni sloj naziva još i preorožali. Nakon ovulacije površni sloj ćelija se ljušti stanjujući epitel. U bazalnom i intermedijalnom sloju nalaze se i Langerhansove antigen prezentujuće ćelije. Lamina propria je izgrađena od vezivnog tkiva bogatog kolagenim i elastičnim vlaknima. Ovde se nalaze vene, nervna vlakna i limfni folikuli. U površinskom sloju lamine proprie nalazi se debeo sloj elastičnih vlakana. U lamini propriji vagine nema žlezda, već se sluznica vlaži sekretom žlezda grlića materice.

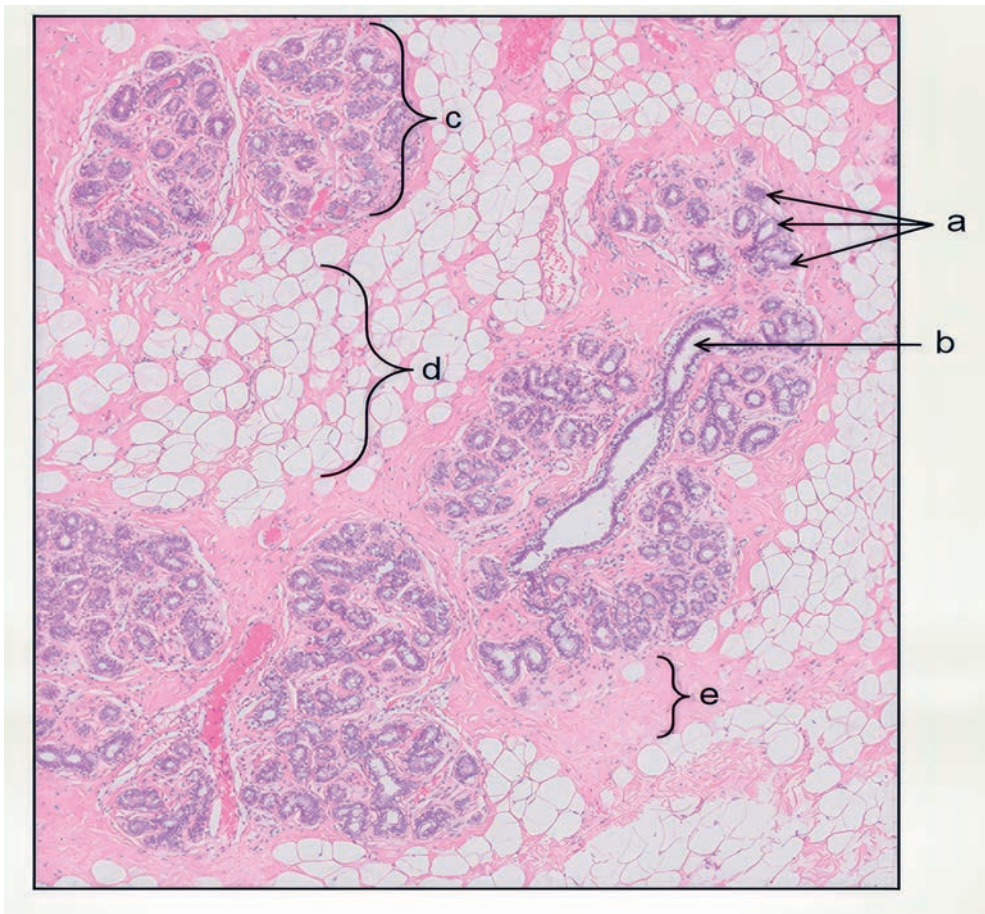
Mišićni sloj (lat. *tunica muscularis*) izgrađen je od unutrašnjeg kružno i spoljašnjeg uzdužno postavljenog podsloja glatkih mišićnih ćelija između kojih ne postoji jasna granica. U nivou spoljašnjeg otvora (lat. *ostium uteri*) kružno postavljeni poprečnoprugasti mišići obrazuju vaginalni sfinkter.

Adventicija (lat. *tunica adventitia*) je debeo sloj rastresitog vezivnog tkiva u kome se nalaze nervna vlakna, krvni i limfni sudovi. Spaja vaginu sa okolnim strukturama u maloj karlici, pre svega sa mokraćnom bešikom i mokraćnom cevi.

## 1.5. MLEČNA ŽLEZDA (*GLANDULA MAMMARIA*)

Mlečne žlezde su modifikovane znojne žlezde. Uloga im je stvaranje mleka kojim se hrani novorođenče. Građa mlečne žlezde varira u zavisnosti od pola, starosti i fiziološkog statusa (faze menstrualnog ciklusa ili trudnoće). Kod žena, mlečne žlezde su najrazvijenije nakon puberteta, dok kod muškarca ostaju nerazvijene. Mlečne žlezde su izgrađene od parenhima i strome. Parenhim čine žlezdani epitel tubuloalveola i epitel izvodnih kanala, dok je stroma izgrađena od masnog i gustog vezivnog tkiva. Pre puberteta parenhim dojke se sastoji isključivo od odvodnih mlečnih ka-

nala, laktifernih kanala, koji se završavaju proširenjima, laktifernim sinusima. Tokom puberteta, kod ženskog pola pod dejstvom polnih hormona laktiferni kanali se izdužuju i granaju, i povećava se količina strome što ima za posledicu rast grudi. Prilikom grananja laktifernih kanala, svaki ogranak se završava proširenom sekretnom jedinicom tj. tubuloalveolom. Nekoliko tubuloalveola, zajedno sa okolnim rastresitim vezivnim tkivom formira jedan lobules (Slika 1.11).



**Slika 1.11.** Histološki presek dojke.

a tubuloalveola; b izvodni kanal; c lobulus; d masno tkivo; e gusto vezivno tkivo

Svi lobulusi koji se ulivaju u zajednički laktiferni kanal obrazuju jedan lobus. Mlečna žlezda žene se sastoji 15–25 lobusa. Između lobusa nalaze

se septe od interlobularnog gustog vezivnog tkiva. Izvodni kanali koji odvođe sekret iz tubuloalveola spajaju se u zajednički intralobularni izvodni kanal, koji izlazi iz lobulusa kao interlobularni izvodni kanal. Više interlobularnih izvodnih kanala se spaja u glavne izvodne kanale – interlobarne ili laktiferne kanale koji se usmeravaju prema bradavici. U blizini areole laktiferni kanali se proširuju u laktiferni sinus, u kome se deponuje mleko. Laktiferni sinusi se dalje nastavljaju uskim i kratkim papilarnim kanalčićima koji se povezuju i spajaju, otvarajući se na bradavici dojke. Intra- i interlobularni izvodni kanali su obloženi jednoslojnim kubičnim ili prizmatičnim epitelom, oko koga se nalaze mioepitelne ćelije. Laktiferni kanali su izgrađeni od jednoslojnog cilindričnog epitela, koji u laktifernim sinusima prelazi u dvoslojni kubični epitel. Početni deo papilarnih kanalčića je pokriven dvoslojnim kubičnim epitelom, a završni deo epidermisom bradavice.

Bradavica predstavlja modifikovanu kožu, konusnog je oblika, i može biti ružičaste ili smeđe boje. Sa spoljašnje strane je pokrivena lako nabornim pločastoslojevitim epitelom sa orožavanjem, odnosno epidermisom, koji se nastavlja na okolnu kožu. Oko bradavice nalazi se tamnije obojen kružni region kože koji se naziva areola. Tamna nijansa areole je posledica intenzivnije pigmentacije bazalnog sloja epidermisa u odnosu na okolnu kožu. Tokom trudnoće areola potamni zbog dodatnog nagomilavanja melanina. Posle porođaja areola postaje svetlija, ali retko se vraća prvobitna obojenost. Na obodu areole smeštene su modifikovane znojne žlezde – areolarne (Mongomerijeve) žlezde. Uloga njihovog sekreta je da prilikom dojenja vlaži bradavicu koju prihvata odojče, i tako onemogućiti uvlačenje vazduha. Ispod epidermisa bradavice nalazi se vezivno tkivo – dermis sa velikom količinom elastičnih vlakana i kružno postavljenim snopovima glatko mišićnih ćelija. Hladnoća, dodir ili psihički stimuli mogu izazvati kontrakciju ovih mišićnih ćelija, što dovodi do erekcije bradavica. U bradavici nalaze se i brojni senzitivni nervni završeci.

Struktura i funkcija mlečne žlezde su pod kontrolom većeg broja hormona, kao što su estradiol, progesteron, testosteron, laktogen posteljice, prolaktin i oksitocin. Tokom puberteta i trudnoće grudi rastu. Estradiol stimuliše rast i grananje izvodnih kanala, dok progesteron dovodi do rasta tubuloalveola i povećanja količine strome. Intenzivan rast mlečne žlezde tokom trudnoće odvija se pod uticajem nekoliko hormona: estradiola, pro-

gesterona, prolaktina i laktogena posteljice. Androgeni imaju antiestrogeni efekat, budući da inhibiraju rast dojke.

Kod polno zrele žene dojka se može nalaziti u dva funkcionalna stanja: u mirovanju (neaktivna dojka) i u laktaciji (aktivna dojka). Dojka u mirovanju ima male lobuluse između kojih se nalazi velika količina masnog i gustog vezivnog tkiva sa brojnim B-limfocitima i plazmocitima. Tubuloalveole su slabo razgranate, i obložene su epitelnim ćelijama koje se nazivaju laktociti. Kod neaktivne dojke, oni su kockastog ili cilindričnog oblika sa centralno postavljenim ovalnim jedrom. Sekretne organele su slabo razvijene, a na apikalnoj površini se nalaze mikrovili. Između bazalne površine laktocita i bazalne lamine nalaze se mioepitelne ćelije.

Tokom menstrualnog ciklusa, dolazi do malih promene u citološkoj građi mlečne žlezde. U ranoj folikularnoj fazi, epitelne ćelije izvodnih kanala počinju da se umnožavaju, i njihova proliferacija se nastavlja tokom ostatka ciklusa. U lutealnoj fazi ciklusa, progesteron stimuliše grananje izvodnih kanala, proliferaciju epitelnih ćelija tubuloalveola i ćelija vezivnog tkiva strome. Ove proliferativne promene dovode do edema strome i vakuolizaciju epitelnih ćelija. Povećana hidratacija vezivnog tkiva strome u kasnoj lutealnoj fazi izaziva uvećanje dojke pred menstruaciju. Tokom menstruacije kao posledica pada nivoa estradiola i progesterona smanjuje se proliferacije ćelija, edem strome, i veličina tubuloalveola i izvodnih kanala.

Kod dojke u laktaciji dolazi do strukturnih promena i maksimuma sekretne aktivnosti. Lobulusi se povećavaju, tubuloalveolarni sekretni delovi rastu i granaju se, dok se količina strome smanjuje. Povećava se broj mioepitelnih ćelija, oko tubuloalveola i izvodnih kanala. Njihovom kontrakcijom pospešuje se pražnjenje sekreta iz žlezde. Izvodni kanali su prošireni što omogućuje lakše i brže proticanje mleka. Aktivni laktociti stvaraju mleko koje se skladišti u lumenu tubuloalveola i u izvodnim kanalima. Za vreme dojenja ove ćelije su kockastog oblika sa centralno postavljenim jedrom. U citoplazmi se nalazi dobro razvijeni grER i Goldžijev aparat. U apikalnom regionu ćelije prisutne su krupne lipidne kapljice, koje sadrže uglavnom neutralne trigliceride, i sitne kazeinske granule. Lipidne kapljice se oslobađaju u lumen tubuloalveola po apokrinom tipu sekrecije, a kazeinske granule po merokrinom tipu. Po završetku sekrecije, laktocit se smanjuje, postaje spljošten, i započinje novi ciklus sekrecije.



## 1.6. LITERATURA

- Anđelković Z, Somer Lj, Avramović V, Milosavljević Z, Tanasković I, Matavulj M, Perović M, Nikolić I, Rančić G, Lalošević D, Milenkova Lj, Danilović V, Petrović A (2009) Histologija, Impressum, Niš.
- Duančić V, Posinovec J (1986) Osnove histologije čovjeka: za studente opće medicine i stomatologije, 9. izdanje, Medicinska knjiga, Beograd–Zagreb.
- Eroschenko V (2008) DiFiore's atlas of histology with functional correlations, 11. izdanje, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Barbieri L B (2009) The Breast, U: Strauss JF I Barbieri RL, ur., Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology, 6. izdanje, Elsevier
- Junqueira L C, Carneiro J (2005) Osnovi histologije: tekst i atlas, 11. izdanje, Data status, Beograd.
- Junqueira L C, Mescher A (2013) Junqueira's basic histology: text & atlas, 13. izdanje, McGraw-Hill Medical, New York.
- Milin J, Grubor-Lajšić G, Vojinović J (1994) Histologija, Visio mundi academic press, Novi Sad.
- Nikolić I, Rančić G, Radenković G, Lačković V, Todorović V, Mitić D, Mihailović D (2010) Embriologija čoveka: tekst i atlas, 4. izdanje, Data status, Beograd.
- Pantić V (1995) Histologija, 4. izdanje, Medicinska knjiga, Beograd, Grigorije Božović, Priština.
- Pawlina W, Ross (2016) Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology, 7. izdanje, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Ross M, Pawlina W (2011) Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology, 6. izdanje, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Trpinac D (1994), Histologija za studente farmacije, 2. izdanje, Ecolibri, Beograd



**Svetlana Fa Nedeljković**

---

**2.  
PRENATALNI  
RAZVOJ ŽENSKOG  
REPRODUKTIVNOG  
SISTEMA**

---



Razvoj reproduktivnog sistema se najvećim delom odigrava rano u toku embriogeneze i podrazumeva razvoj gonada, kao i razvoj unutrašnjih i spoljašnjih genitalija. Nakon formiranja, dalji prenatalni kao i postnatalni rast su jako spori, a krajnje sazrevanje reproduktivnog sistema se dešava u pubertetu. Reproductivni sistem većinom vodi poreklo od mezoderma, međutim u formiranju unutrašnjih genitalija učestvuje u manjoj meri i endoderm, a u formiranju spoljašnjih genitalija udeo imaju sva tri klicina lista. Sam razvoj započinje formiranjem primitivne bipotencijalne gonade, koja se dalje razvija i polno diferencira uporedo sa razvojem unutrašnjih i spoljašnjih genitalija.

## 2.1. RAZVOJ GONADA

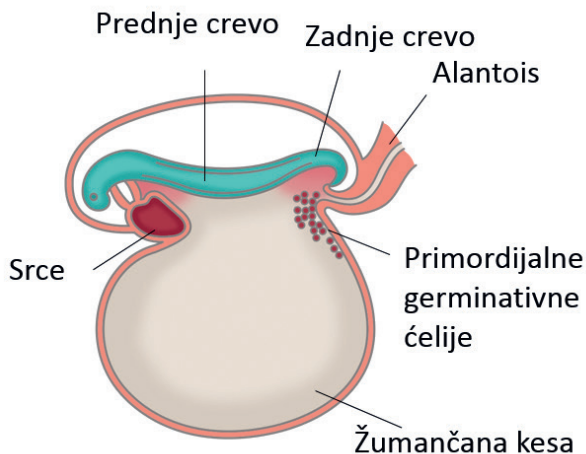
### 2.1.1. Razvoj primitivne bipotencijalne gonade

Razvoj gonada počinje formiranjem parnih genitalnih grebena sa bočnih strana centralno i dorzalno postavljene aorte, u torako-lumbalnom regionu. Genitalni grebeni predstavljaju somatski mezenhim nastao proliferacijom dorzalnog epitela celomske duplje i grupisanjem mezenhimskih ćelija ispod epitela, oko 3. nedelje nakon fertilizacije, u neposrednoj blizini mezonefrosa. Genitalni greben i mezonefrosni greben zajedno čine urogenitalni greben. Kod miševa je pokazano da je za otpočinjanje formiranja genitalnog grebena neophodno eksprimiranje gena za transkripcioni faktor GATA4 u ćelijama celomskog epitela, a koje prethodi inicijalnom zadebljanju epitela. Za dalji razvoj i održavanje genitalnog grebena neophodno je da se u grebenu eksprimiraju geni kao što je *Nr5a1* (engl. *nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*, ranije poznat kao steroidogeni faktor 1 (engl. *steroidogenic factor 1, Sf-1*), *Lhx9* (engl. *lim homeobox protein 9*), *Wt1* (engl. *Wilms tumor suppressor gene*) i *Emx2* (engl. *empty spiracles homeobox 2*). Smatralo se da i *Lhx1* (engl. *Llm homeobox protein 1*) mora biti eksprimiran da bi se formirao genitalni greben, međutim kasnije je pokazano da nije neophodan. WT1 aktivira gen *Sf-1* i ukoliko se ne eksprimiraju geni *Sf-1* i *Wt1* dolazi do propadanja somatskih ćelija unutar grebena. U nedostatku proteina LHX9 čiji se gen takođe nalazi uzvodno i aktivira gen *Sf-1*, izostaje proliferacija somatskih ćelija. Transkripcioni faktor EMX2 omogućava

prodiranje epitelnih ćelija u greben, podstiče rast i učestvuje u održavanju grebena. U nedostatku bilo kojeg od navedenih transkripcionih faktora, izostaje formiranje genitalnog grebena.

Nakon formiranja, sledi ulazak dva tipa ćelija u genitalni greben: primordijalnih germinativnih ćelija (engl. *primordial germinative cells*, PGC) i epitelnih ćelija samog genitalnog grebena, što rezultuje formiranjem primitivne bipotencijalne gonade. Kod ljudi, ćelije mezonefrosa ulaze u gonadu tek prilikom polne diferencijacije.

PGC predstavljaju embrionalne prekursore gameta. To su velike ćelije sfernog oblika, prečnika oko 20  $\mu\text{m}$ , a od okolnih somatskih ćelija se razlikuju i po tome što im citoplazma sadrži manje organela. Formiraju se od određene grupe ćelija epiblasta, u regionu od kojeg će se formirati ekstraembrionalni mezoderm, posteriorno, na poziciji u blizini baze alantoisa. Ukoliko se kod embriona miša ukloni taj region ne dolazi do formiranja PGC. Odatle se PGC premeštaju u ekstraembrionalni endoderm koji formira žumančanu kesu, takođe u blizini baze alantoisa, što predstavlja proksimalni deo žumančane kese, a gde se uočavaju oko 3. nedelje nakon fertilizacije kod čoveka i oko 8–9 dana nakon fertilizacije kod miša (Slika 1).



**Slika 2.1.** Položaj primordijalnih germinativnih ćelija kod 3 nedelje starih embriona čoveka (ilustrovala Biljana Čurná Roman)

Nastanak PGC je stimulisan sa proteinom morfogeneze kostiju 4 (engl. *bone morphogenic protein 4*, BMP4) iz superfamilije transformišućeg faktora rasta- $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ), koji potiče iz okolnog tkiva. Da bi se razjasnio mehanizam nastanka PGC, najveći deo istraživanja je urađen na miševima gde je, između ostalog, pokazano da transkriptom PGC miša i čoveka pokazuje visoku podudarnost, ali da ipak postoje i neke razlike. Kod miša je pokazano da geni *Bmp2* i *Bmp8b* takođe doprinose razvoju PGC, jer kod jedinki kod kojih su ti geni mutirani, smanjen je i broj PGC, dok u nedostatku ekspresije *Bpm4* ne dolazi do formiranja PGC. BMP4 i BMP8b potiču od ekstraembrionalnog ektoderma, a BMP2 iz visceralnog endoderma. Čelije koje su prekursori PGC moraju da eksprimiraju transkripcione faktore SMAD1, SMAD4 i SMAD5 (engl. *mothers against decapentaplegic homolog 1, 4, 5*) da bi mogle da odgovore na signale BMP. SMAD1 i SMAD5 učestvuju u specifikaciji PGC, dok je SMAD4 neophodan za održavanje i migraciju PGC. U nedostatku SMAD4, PGC se formiraju, međutim nastale PGC ostaju u blizini alantoisa i ne započinju migraciju. Nedostatak SMAD1 i SMAD5 značajno redukuje broj PGC koje će nastati. Takođe, odnos količine proteina BMP i SMAD je kritičan za pravilno formiranje linije PGC. Da bi ćelije epiblasta mogle da odgovore na signale BMP, moraju eksprimirati i signalni molekul WNT3 (engl. *Wnt family member 3*) i aktivirati signalni put WNT3 –  $\beta$ -katenin.

Signalni putevi BMP-SMAD i WNT3- $\beta$ -katenin zajedno dovode do eksprimiranja gena neophodnih za specifikaciju PGC uključujući *Prdm1* (engl. *PR/SET domain 1*, poznat i kao *Blimp1*), *Prdm14* i *Tfap2c* (engl. *transcription factor AP-2 gamma*). Produkti ovih gena imaju za cilj da pokrenu transkripciju gena potrebnih za ponovno uspostavljanje pluripotentnosti PGC, da izvrše supresiju metilacije DNK uporedo sa celokupnim genomskim brisanjem metilacije DNK, kao i da stimulišu proliferaciju i migraciju PGC do genitalnog grebena. Tako se dalje eksprimira *Ifitm1* (engl. *interferon-induced transmembrane protein 1*) i *Ifitm3* (poznat i kao *Fragilis*), koji zajedno sa *Prdm1* označavaju pojavu PGC, dok su *Prdm14* i *Dppa3* (engl. *developmental pluripotency associated 3*, ranije poznat kao *Stella*), glavni markeri PGC. Drugi markeri PGC su tkivno nespecifična alkalna fosfataza (engl. *alkaline phosphatase*, AP) kao i *Pou5f1* (engl. *POU class 5 home-*

*obox 1*, ranije poznat kao *Oct4*), koji je marker matičnih ćelija embriona i samih PGC. Kod miševa sa mutiranim genima *Prdm1* i *Prdm14* ne dolazi do formiranja PGC. Pokazano je i da geni *Prdm1* i *Prdm14* imaju ulogu u održavanju pluripotentnosti PGC. *Ifitm1* i *Ifitm3* imaju ulogu u migraciji, dok *Dppa3* i *Prdm14* imaju i ulogu u epigenetskom reprogramiranju PGC. Osim DPPA3 i OCT4, PGC eksprimiraju i druge markere pluripotentnosti kao što su NANOG i SOX-2 (engl. *Sry-related high mobility group box 2*). PGC čoveka ne eksprimiraju SOX-2, već SOX-17. PGC čoveka takođe nastaju od ćelija epiblasta, indukcijom od strane BMP4, pri čemu specifikacija počinje oko 12. dana od fertilizacije. 24–48 h od početka delovanja BMP4, kod prvih ćelija se javlja ekspresija markera PGC, kao što je to TFAP2C, NANOG, SOX17, NANOS3 (engl. *nanos C2HC-type zinc finger 3*). PRDM1 je bitan za PGC, ali nije isključivo marker PGC, jer se eksprimira i u endodermalnim ćelijama. Pokazano je da TFAP2C deluje uzvodno od PRDM1 putem kojeg reguliše ekspresiju SOX17, a što ima za cilj da očuva germinativnu liniju i spreči prekursore PGC da postanu somatske ćelije.

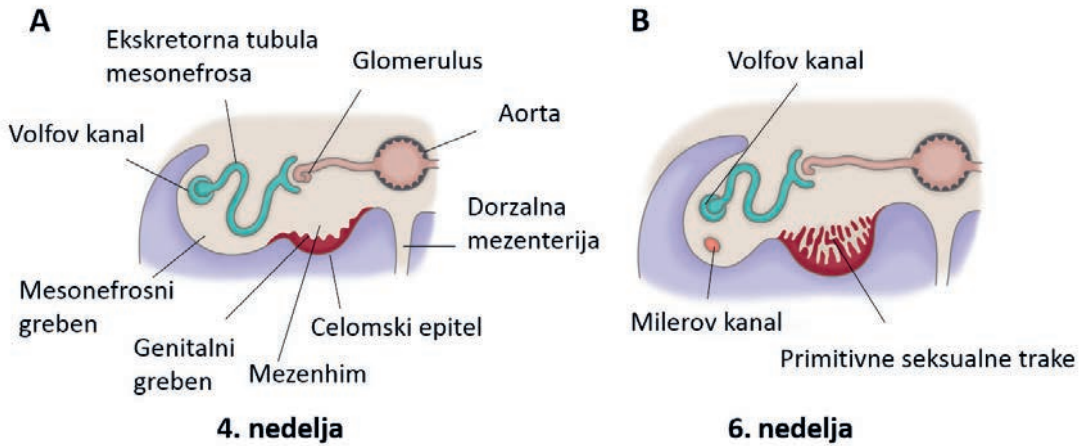
Nakon što se uspostavi linija PGC, one počinju da proliferišu i da migriraju do genitalnog grebena. Proliferacija se dešava i prilikom migracije i nakon pristizanja u greben, a odlikuje se nepotpunom citokinezom pri čemu se formiraju takozvana oocitna gnezda. Kod miševa je pokazano da je za proliferaciju potrebno eksprimiranje gena *Tiar1* (engl. *T-cell intracellular antigen 1 (TIA1)-related*) koji kodira protein TIAR 23 i gena *Fancl* (engl. *Fanconi anemia, complementation group L*, poznat i kao *Pog*) koji kodira subjedinicu u kompleksu proteina uključenih u popravku DNK. Citokini kao što je leukemija inhibišući faktor (LIF) i slični takođe utiču na proliferaciju PGC.

Kod čoveka migracija počinje u 4. nedelji od fertilizacije, kada PGC počinju da se pomeraju iz proksimalnog dela žumančane kese prema zadnjem crevu, prelazeći preko crevnog endoderma i zatim kroz dorzalnu mezenteriju i putem nervnih vlakana i Švanovih ćelija stižu do parnih germinativnih grebena. Migracija je moguća, jer PGC menjaju oblik, ispuštaju pseudopodije i pomeraju se ameboidnim kretanjem, koje je uslovljeno hemijskim signalima iz okolnog tkiva duž puta kojim idu, kao i iz grebena. U 5. nedelji većina PGC stiže do genitalnog grebena i u 6. nedelji nastanjuju greben,



dok kod miševa PGC stižu u germinativni greben sa 10.5 dana. Kod miševa je pokazano koji su to geni, tj. proteini i receptori neophodni za migraciju i proliferaciji PGC. Tako je pokazano da PGC eksprimiraju receptor sa aktivnošću tirozin kinaze, c-kit, koji vezuje kit-ligand (poznat i kao engl. *stem cell factor*, SCF). Kit-ligand se eksprimira duž putanje migracije i u samom grebenu, što omogućava migraciju, ali i preživljavanje PGC. Sličnu ulogu u migraciji ima i receptor CXCR4 (engl. *CXC chemokine receptor 4*) i njegov ligand, CXCL12 (engl. *CXC chemokine ligand 12*, poznat i kao engl. *stroma derived factor 1 $\alpha$* , SDF1 $\alpha$ ), koji se takođe eksprimira duž putanje migracije i u samom grebenu. Ekspresija adhezivnog proteina, integrina  $\beta 1$  na površini PGC je takođe neophodna za migraciju, dok transkripcijski faktor LHX1 reguliše lokalizaciju PGC kada se one nalaze u predelu zadnjeg creva, putem delovanja na gen *Ifitm1*. Produkti gena *Ifitm1* i *Ifitm3* regulišu migraciju, ali nisu neophodni, dok *Wnt5a* daje protein koji takođe usmerava PGC u pravcu grebena.

PGC ne mogu da prežive izvan genitalnog grebena, a isto tako ni razvoj gonade nije moguć bez njih. PGC su neophodne za indukciju formiranja gonada i održavanje pregranuloza ćelija. Do momenta kada nastanu gonade, broj PGC je oko 10 000, da bi, sa 8 nedelja, njihov broj porastao na 600 000. Nakon ulaska u genitalni greben PGC se transformišu u oogonije. U tom momentu se dešava i genomsko utiskivanje (engl. *genomic imprinting*). Utisnuti geni su oni geni čija se ekspresija odvija samo sa jednog alela, majčinog ili očevog, pri čemu je drugi alel utišan epigenetskim modifikacijama. Kod ženskog pola jedan od dva X hromozoma je potpuno utišan epigenetskim modifikacijama. Genomsko utiskivanje u ovoj fazi ima za cilj da se uspostave nove epigenetske modifikacije koje bi odgovarale polu fetusa u razvoju (stare modifikacije su obrisane prilikom nastanka PGC).



**Slika 2.2.** Razvoj bipotencijalne gonade.

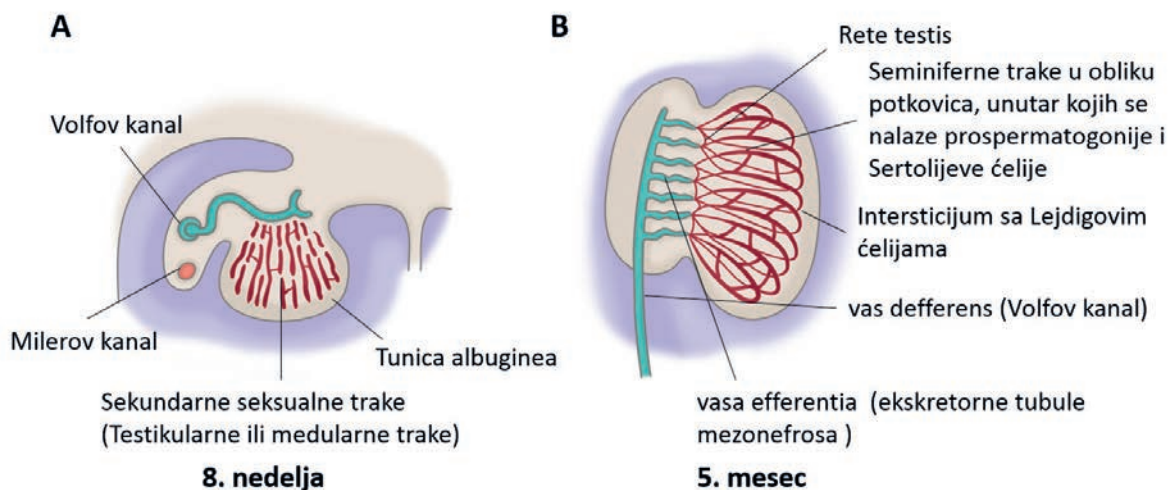
Na slikama je prikazan transverzalni presek u lumbalnom regionu (ilustrovala Biljana Čurná Roman)

Nakon ulaska PGC u genitalni greben dešava se proliferacija epitela grebena i ulazak epitelnih ćelija u sam greben pri čemu se formiraju trake nepravilnog oblika koje obuhvataju germinativne ćelije. To su takozvane primitivne seksualne trake, koje se protežu od epitela prema srži. Nastala struktura predstavlja polno nediferenciranu bipotencijalnu gonadu, koja izgleda jednako kod XX i XY embriona čoveka (Slika 2.2).

### 2.1.2. Polna diferencijacija gonada

Polna diferencijacija gonada započinje u 7. nedelji od oplodnje, a zavisi od prisustva Y hromozoma i na njemu prisutnog gena *SRY* (engl. *sex-determining region Y*), koji se eksprimira u ćelijama seksualnih traka od kojih će nastati Sertolijeve ćelije. PGC ne eksprimiraju ovaj gen. Gen *SRY* počinje da se eksprimira 41. dana od oplodnje, a maksimum ekspresije dostiže 44. dana od oplodnje kod čoveka, nakon čega ekspresija opada. Pokazano je da je neophodno da se *SRY* aktivira u kritičnom periodu, koji traje oko 6 h kod miša, i verovatno više kod čoveka, jer se inače propušta prilika za formiranjem testisa i dolazi do formiranja jajnika. Smatra se da transkripcioni faktor SF-1 (NR5A1) vremenski reguliše ekspimiranje gena *SRY*.

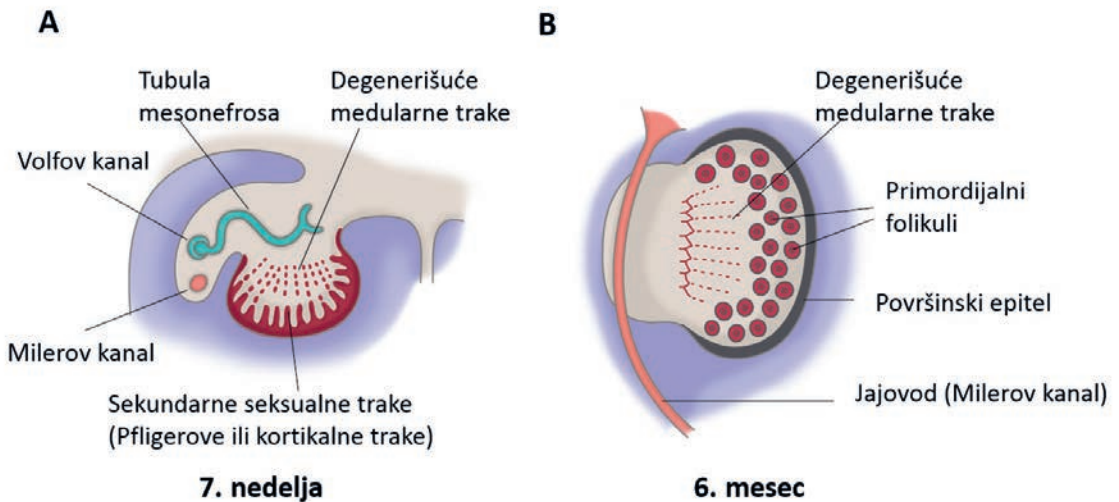
U prisustvu transkripcionog faktora SRY, primitivne seksualne trake dodatno proliferišu i prodiru dublje u medulu, formirajući testikularne ili medularne trake (sekundarne seksualne trake) oko 52. dana od oplodnje. Ove trake će tek u pubertetu dobiti lumen i rezultovati u stvaranju seminifernih kanalića. Trake gube kontakt sa epitelom i između traka i epitela se stvara sloj vezivnog tkiva, *tunica albuginea*, koja će učestvovati u formiranju buduće kapsule testisa. Između medularnih traka se pojavljuje intersticijum u kojem se razvijaju Lejdigove ćelije koje već u 8. nedelji sintetišu testosteron. Prisustvo odnosno odsustvo testosterona i njegove potentnije forme, dihidrotestosterona (DHT), reguliše polnu diferencijaciju unutrašnjih i spoljašnjih genitalija. Lejdigove ćelije nastaju od ćelija mezonefrosa koje u periodu polne diferencijacije ulaze u gonadu. Neke od ćelija mezonefrosa formiraju krvne sudove, dok neke daju mioidne ćelije seminifernih tubula. Polna diferencijacija testisa je prikazana na Slici 2.3.



**Slika 2.3.** Polna diferencijacija testisa. Na slici je prikazan transverzalni presek testisa u (A) 8. nedelji od oplodnje i (B) u toku 5. meseca fetalnog razvića (ilustrovala Biljana Čurná Roman)

Kod XX jedinki, u nedostatku gena *SRY* dolazi do razvoja jajnika. Primarne seksualne trake se povlače u korteks ili degenerišu i proliferacijom epitela se stvaraju nove trake u predelu korteksa, sekundarne seksualne

trake, koje se još nazivaju i Pfligerove trake, ili kortikalne trake. U središnjem delu više ne postoje ni trake ni germinativne ćelije, stroma se vaskularizuje i stvara se medula jajnika. U 4. mesecu ćelije traka počinju da opkoljavaju grupice oogonija, koje se nalaze u oocitnim gnezdima. Ovaj proces stimuliše proces stvaranja primordijalnih folikula. U periodu polne diferencijacije u gonadu ulaze i ćelije mezonefrosa koje će formirati krvne sudove i teka ćelije koje opkoljavaju granuloza ćelije. Formirani jajnik ima jasno definisan kortikalni deo gde su smešteni primordijalni folikuli i medularni deo. Nakon formiranja jajnik se samo malo pomera kaudalno unutar abdomena, spuštajući se u karlični deo. Za posteriorni zid je vezan mezenterijom jajnika koja se još naziva i *mezovarijum*. Razvoj jajnika je prikazan na slici 2.4.



**Slika 2.4.** Polna diferencijacija jajnika. Na slici je prikazan transverzalni presek jajnika u (A) 7. nedelji od oplodnje i (B) u toku 6. meseca (ilustrovala Biljana Čurná Roman)

Ranije se smatralo da je samo odsustvo gena *SRY* dovoljno za formiranje jajnika, ali je kasnije pokazano da je potrebna aktivacija pojedinih gena koji usmeravaju razvoj u pravcu jajnika. Tako je pokazano da je neophodno prisustvo oba X hromozoma da bi se pravilno razvio jajnik. Kod ženskih osoba sa normalnim brojem autozomalnih hromozoma i aneuploidijom

polnih hormozoma XO (Turnerov sindrom), dešava se da se jajnik normalno razvija, međutim za rast oocita neophodna su oba X hromozoma, i nedostatak jednog dovodi do njihovog propadanja, što dalje dovodi do propadanja folikula, a sam jajnik ulazi u regresiju. Slična pojava se dešava kod muških jedinki sa aneuploidijom polnih hromozoma XXY (Klinefelterov sindrom), kod kojih se takođe dešava propadanje većine germinativnih ćelija, ali u kasnijem periodu, kada ulaze u proces mejoze.

Pokazano je da postoji signalni put koji reguliše nastanak testisa i signalni put koji reguliše nastanak jajnika. SRY kao glavni regulator u nastanku testisa, u prisustvu SF1 kao kofaktora stimuliše ekspresiju SOX9 (engl. *SRY-box transcription factor 9*), sledećeg najbitnijeg gena u kontroli formiranja testisa. Ekspimiranje SOX9 kod čoveka počinje 41. dana od oplodnje, a dostiže maksimum 44. dana od oplodnje (kao i ekspresija SRY), a zatim nastupa plato koji traje 18 nedelja i pored toga što nivo SRY opada. Plato je moguć jer SOX9 sam održava svoju ekspresiju putem pozitivne povratne sprege, stimulišući prvo ekspresiju SOX8, koji zatim zajedno sa SOX9 stimuliše ekspresiju SOX10, nakon čega SOX10 u sadejstvu sa SF-1 stimuliše SOX9. Čak i u odsustvu SRY, SOX9 zauzima glavno mesto u kontroli razvoja testisa. U slučaju mutacije gena SOX9 kod čoveka, javlja se ovo-testis ili čak jajnik umesto testisa kod XY jedinki. Duplikacija gena SOX9 kod XX jedinki dovodi do razvića testisa i muške jedinke i kod čoveka i kod miša.

SOX9 u sadejstvu sa SF-1 stimuliše proliferaciju pre-Sertolijevih ćelija i njihovu organizaciju u tubule, kao i ekspimiranje anti-Milerovog hormona (engl. *Anti-Mullerian hormone, AMH*) kod Sertolijevih ćelija. SOX9 dalje stimuliše ekspimiranje faktora rasta fibroblasta 9 (engl. *fibroblast growth factor 9, FGF9*), enzima prostaglandin D2 sintaze (engl. *prostaglandin D2 synthase, PTGD2S*) i direktno i indirektno još oko 1000 drugih gena potrebnih za formiranje testisa. FGF9 stimuliše ulazak ćelija mezonefrosa u testis, kao i pozitivnu povratnu spregu za nastanak SOX9. Prostaglandin D2, koji nastaje delovanjem PTGD2S, stimuliše ulazak SOX9 u jedra pre-Sertolijevih ćelija, omogućavajući tako njegovo delovanje u ovim ćelijama ali i pozitivnu spregu koja će dovesti do nastanka nove količine SOX9. Za formiranje testisa takođe je značajan gen *DHH* (engl. *Desert hedgehog*) koji stimulišući *SF-1* omogućava proliferaciju Lejdigovih ćelija. Takođe je

potrebna i ekspresija *DAX-1*, ali samo u jednoj kopiji, tj sa jednog X hromozoma. U slučaju mutacije gena *DAX-1*, dolazi do hipogonadotropnog hipogonadizma, a u slučaju duplikacije kod XY jedinki dolazi do gonadalne disgeneze. Nakon formiranja testisa ekspresiranje *Sry* kod miševa potpuno prestaje, dok se kod čoveka i koze samo smanji.

Kada je u pitanju signalni put koji kontroliše stvaranje jajnika, tu ne postoji jedan glavni gen već se pretpostavlja da nekoliko gena deluje sinergistički, kao što su *Wnt4* (engl. *wingless type MMTV intergration site family, member 4*), *Rspo1* (engl. *root-plate specific spondin 1*), *Foxl2* (engl. *forkhead box protein L2*), *Ctnnb1* (engl. *catenin beta-1,  $\beta$ -catenin*). Ovi geni su inhibisani u prisustvu *SRY* i *SOX9*. *WNT4* i *RSPO* stimulišu i stabilizuju produkt gena *Ctnnb1*,  $\beta$ -katenin, koji je značajan anti-testis faktor u toku razvića. S druge strane *FOXL2* je takođe anti-testis faktor, ali koji deluje nakon inicijalnog razvića jajnika, kako je pokazano kod miševa. Brisanje *Wnt4* i/ili *Rspo* kod XX embriona dovodi do pojave parcijalne ili potpune maskulinizacije gonada, dok suvišna ekspresuju *Wnt4* i *Rspo* kod XY embriona, dovodi do rođenja ženske jedinke. Takve pojave se dešavaju usled antagonističkog dejstva signalnih puteva koji dovode do stvaranja testisa i jajnika, gde *SOX9* inhibiše ekspresiju *Wnt4*, *Rspo*, *Foxl2* kao i ekspresiju *Ctnnb1*, dok s druge strane  $\beta$ -katenin (produkt gena *Ctnnb1*) inhibiše ekspresiju *Sox9*.

### 2.1.3. Prenatalna oogeneza

Nakon polne diferencijacije gonade, oogonije imaju mogućnost da nastave dalje da proliferišu procesom mitoze, mogu da uđu u proces mejoze, dok neke od njih, već na ovom stepenu, podležu atreziji. Prve oogonije postepeno ulaze u proces mejoze u periodu od 8. do 13. nedelje, dok ostale u to vreme nastavljaju da proliferišu. Ulaskom u mejozu, oogonije postaju primarne oocite. Proliferacija oogonija se završava u 7. mesecu, a oogonije koje do tog momenta nisu ušle u process mejoze podležu atreziji. Atrezija oogonija je na vrhuncu u 5. mesecu, a atrezija folikula počinje u 6. mesecu. Kao rezultat toga u 20. nedelji broj germinativnih ćelija je na najvišem nivou i iznosi oko 6–7 miliona, pri čemu je dve trećine germinativnih ćelija ušlo u process mejoze, dok jedna trećina (oogonije) nije. Nakon tog perio-

da sledi trend konstantnog opadanja broja germinativnih ćelija. Prilikom rođenja taj broj je oko 700 000–1 000 000, pri čemu više nema oogonija, a do puberteta broj se smanji na 300 000–400 000.

Mejoza je proces redukcione deobe koji ima za rezultat stvaranje germinativnih ćelija sa haploidnim brojem hromozoma, 22 autozomalna i jednim polnim hormozomom kod ljudi. Odvija se putem dve uzastopne deobe, pri čemu je prva deoba, mejoza 1, redukciona, a druga, mejoza 2 ide po modelu mitoze. Mejozu karakterišu i dva perioda mirovanja. U prvom periodu jajna ćelija je zaustavljena u profazi 1 – započinje prenatalno i traje do pokretanja ovulacije kod adulta. Završetak prvog i početak drugog perioda mirovanja se dešavaju pred samu ovulaciju. Izlazak iz profaze 1 iniciran je preovulatornim talasom luteinizirajućeg hormona (LH), a jajna ćelija nakon završetka mejoze 1, ulazi u mejozu 2 i zaustavlja u metafazi 2. Mejoza se nastavlja i završava formiranjem ženskog pronukleusa samo ukoliko dođe do oplodnje.

Na osnovu eksperimenata na miševima, smatra se da je ulazak oogonija u process mejoze stimulisan proteinom STRA8 (engl. *stimulated by retinoic acid 8*) za koji se ranije smatralo da se indukuje retinoičnom kiselinom (RK) koja dolazi u germinativni greben iz mezonefrosa. Danas se smatra da je u pitanju neki drugi molekul, ne RK, a koji takođe dolazi iz mezonefrosa i stimuliše početak mejoze. Pokazano je i da germinativne ćelije moraju da eksprimiraju *Dazl* (engl. *deleted in azoospermia-like*) da bi bile kompetentne za mejozu, kao i da postoji gen *Meioc* (engl. *meiosis specific with coiled-coil domain protein*) čiji protein stabilizuje RNK transkripte za proteine koji učestvuju u mejozi.

U toku prenatalne mejoze germinativne ćelije prolaze samo kroz profazu mejoze 1, uključujući prolazak kroz faze leptoten, zigoten, pahiten i zaustavljajući se u diplotenu. Profaza 1 je značajna jer se tu dešava rekombinacija, tj izmena genetskog materijala između homologih hromozoma koji potiču od majke i oca. Tako u leptotenu započinje kondenzacija hromatina, a hromozomi se sastoje iz dve sestrinske hromatide nastale replikacijom. Hromatin je i dalje u obliku tankih niti, vide se samo tamnije i svetlije tačkice, kao mesta manje i veće kompaktnosti hromatina. U zigotenu se uzdužno povezuju homologe hromozomi proteinskim strukturama, tzv. sinaptonemskim kompleksima, koji označavaju mesta na kojima će se

desiti pucanje duplog heliksa. Povezani homologni hromozomi se nazivaju bivalenti ili tetrade (sastoje se od 4 hromatide). Nastavlja se kondenzacija hromatina. U pahitenu se dešava isecanje, pucanje duplog heliksa DNK, a kao mehanizam za reparaciju koristi se uparivanje sa nesestrinskom hromatidom homolognog hromozoma koja služi kao matrica za reparaciju, pri čemu se formiraju tzv. hijazme i na tim mestim počinje razmena genetskog materijala – rekombinacija. Rekombinacija se dešava samo na po jednoj od sestrinskih hromatida, tako da nakon rekombinacije sestrinske hromatide više nisu iste i otuda potiče varijabilnost genetskog materijala koji nose germinativne ćelije. Rekombinacija se, u populaciji ljudi, prvi put zapaža u 10–11. nedelji od oplodnje. U diplotenu se razgrađuju sinaptonemski kompleksi, a homologni hromozomi ostaju povezani samo hijazmama, koje ostaju sve do anafaze 1. Zadnja faza profaze 1, dijakineza se karakteriše značajnom kondenzacijom hromozoma i stvaranjem deobnog vretena, ali ti procesi se dešavaju tek u reproduktivno zreлом periodu. Primarne oocite se zaustavljaju u diplotenu mejoze 1 i ostaju tako sve do momenta ulaska u proces ovulacije, pri čemu neke od njih miruju i 40–50 godina. Ovo stanje mirovanja se naziva diktioten. U jajnicima žena diktioten se prvi put zapaža u 14–15. nedelji nakon oplodnje. Prilikom mirovanja hromozomi su i dalje okruženi jedarnom membranom, nalaze se u jedru koje se naziva germinativna vezikula. Mirovanje oocita je uslovljeno inhibirajućim stimulusom iz granuloza ćelija, tj visokim nivoom cikličnog guanozinmonofosfata (cGMP) prisutnim u granuloza ćelijama koji uslovljava visok nivo cikličnog adenozinmonofosfata (cAMP) u oociti. U *in vitro* uslovima primarne oocite koje nisu okružene granuloza ćelijama nastavljaju mejozu. Greške u rekombinaciji dovode do nastanka aneuploidnih oocita ukoliko se one ne detektuju u nastavku mejoze u adultnom periodu. Smatra se da je prosečno 10–20% ovuliranih oocita u odraslom periodu aneuploidno, pri čemu taj procenat ide i do 40–60%. Različiti faktori, uključujući starost majke, dovode do slabije detekcije i eliminacije aneuploidnih oocita, čime njihov broj raste.

Oogonije ulaze u mejotičku deobu dok se još nalaze u oocitnim gnezdim. Smatra se da su oocite unutar jednog gnezda nastale proliferacijom jedne oogonije, mada nije isključeno da se priključuju i oogonije koje nemaju isto poreklo. One su međusobno povezane intercelularnim



mostovima putem kojih razmenjuju ćelijski sadržaj, što im omogućava i sinhronizovano funkcionisanje. Na osnovu eksperimenata na miševima, unutar oocitnog gnezda samo 1–2 oogonije su predodređene da se razvijaju do oocite, dok su ostale oogonije takozvane ćelije negovateljice (engl. *nurse cells*), koje će putem međućelijskih mostova do oocite dopremiti svoje organele, centrozome i citoplazmu. U tom procesu oocite rastu, dok se negovateljice smanjuju i na kraju podlegnu specifičnoj programiranoj ćelijskoj smrti. Pojava formiranja germinativnih gnezda ili cisti je evolucijski očuvan mehanizam za zaštitu i rast germinativnih ćelija, koji je dobro izučen kod vinske mušice (lat. *Drosophila melanogaster*), a kasnije je opisan i kod kičmenjaka, uključujući miša.

Nastale primarne oocite se oslobađaju raspadanjem oocitnih gnezda, koje kod sisara podrazumeva nestajanje međućelijskih mostova, izumiranje većine germinativnih ćelija apoptozom i prodiranje ćelija Pfligerovih traka, tj pre-granuloza ćelija u gnezdo. Pljosnate granuloza ćelije opkoljavaju primarnu oocitu pri čemu se formiraju primordijalni folikuli. Kod čoveka se prvi primordijalni folikuli primećuju od 13. nedelje, dok se velik broj primordijalnih folikula zapaža u periodu od 16–20. nedelje trudnoće. Formiranje primarne oocite prethodi formiranju primordijalnog folikula. Primarne oocite kod kojih izostane okruživanje granuloza ćelijama i formiranje primordijalnih folikula podležu atreziji.

Atrezija se dešava na svim koracima, počinjući od atrezije PGC koje migriraju, zatim atrezije oogonija, atrezije primarnih oocita u toku same mejoze ili usled nemogućnosti zaustavljanja u diplotenu prve mejotičke deobe. Takođe većina oogonija iz jednog oocitnog gnezda podleže atreziji, dok samo 1–2 preživi. Određen broj primordijalnih folikula ne uspeva da miruje i počinje da raste perinatalno i u prepubertalnom periodu, pri čemu ti folikuli postaju atretični jer ne postoji podrška od strane osovine hipotalamus-hipofiza. Posledica je smanjivanje broja germinativnih ćelija od oko 700.000 na rođenju do oko 300.000 pri ulasku u pubertet. Pretpostavlja se da veliki gubitak germinativnih ćelija nastaje kao rezultat propadanja ćelija neodgovarajućeg kvaliteta, međutim postoji mogućnost da su i kod čoveka veliki gubici germinativnih ćelija u prenatalnom periodu rezultat uklanjanja oogonija koje su postojale samo sa ciljem da doprinesu ishrani i kvalitetu odabranih oocita, kako je opisano kod drugih vrsta.

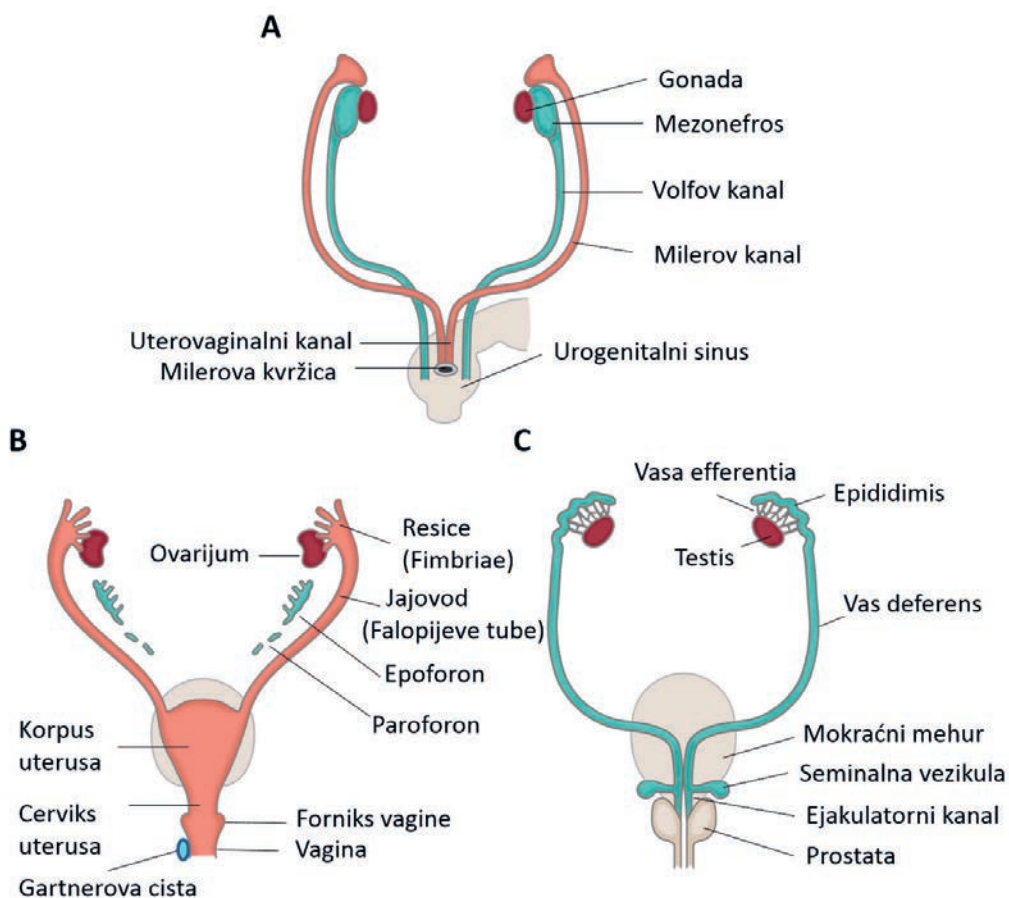
## 2.2. RAZVOJ UNUTRAŠNJIH GENITALIJA

Razvoj ženskih genitalija isto kao i razvoj jajnika ide kao osnovni urođeni put razvoja reproduktivnog sistema bez potrebe za prisustvom ili eksprimiranjem odgovarajućih faktora ili hormona. Za razliku od razvoja ženskog reproduktivnog sistema, razvoj muških gonada i genitalija, zavisi od aktivacije gena *SRY* koji usmerava razvoj bipotencijalnih gonada u pravcu testisa. Nakon formiranja testisa, gen *SRY* više nema ulogu u polnoj diferencijaciji reproduktivnog sistema, već tu ulogu preuzimaju hormoni nastali u testisima, androgeni u Lejdigovim ćelijama i AMH iz Sertolijevih ćelija koji usmeravaju razvoj muških genitalija. Iako za razvoj ženskih genitalija nisu potrebni hormoni, ipak estrogeni, bilo da su nastali u jajnicima fetusa ili posteljici, odnosno da dolaze iz krvotoka majke, su potrebni za formiranje ženskih genitalija.

### 2.2.1. Razvoj unutrašnjih genitalija – polno nediferencirani stadijum

Uporedo sa razvojem bipotencijalne gonade razvijaju se parni primordijumi koji će dati unutrašnje genitalije. U početku se, kod oba pola, od mezoderma razvijaju primordijumi koji će dati i muške i ženske unutrašnje genitalije, parni Volfovi kanali od kojih će se formirati muške genitalije i parni Milerovi kanali od kojih će se formirati ženske genitalije. Volfovi kanali se još nazivaju i kanali mezonefrosa jer su to kanali koji funkcionišu kao odvodni kanali primitivnog bubrega mezonefrosa koji spajaju primitivni bubreg sa kloakom, a kasnije sa urogenitalnim sinusom. Funkcionišu kao primordijum unutrašnjih genitalija i nakon degeneracije mezonefrosa. Volfovi kanali se razvijaju u periodu od 25–32 dana od oplodnje unutar urogenitalnog grebena. Milerovi kanali koji se još nazivaju i kanali paramezonefrosa se razvijaju u periodu od 37–48 dana od oplodnje, lateralno od svakog Volfovog kanala, kao tubularne invaginacije epitela celomske duplje na lateralnim površinama parnih urogenitalnih grebena. Na mestima gde se stvaraju invaginacije, formiraće se budući ostiumi jajovoda prilikom formiranja ženskih genitalija. Milerovi kanali se pružaju kaudalno kroz urogenitalni greben prateći Volfove kanale koji im služe kao

vodilje. Prilikom rasta i izduživanja, najkaudalniji proliferativni vrh Mile-rovih kanala dolazi u fizički kontakt sa Volfovim kanalima. Uloga Volfovih kanala kao vodilje se vidi na eksperimentalnom primeru kod miševa koji eksprimiraju gen *Lhx1* i u Milerovim i u Volfovim kanalima. Nedostatak *Lhx1* samo u Volfovim kanalima, dovodi do gubitka i Volfovih i Milerovih kanala, dok utišavanje *Lhx1* u Milerovim kanalima, dovodi samo do gubitka endometrijuma.



**Slika 2.5.** Razvoj ženskih i muških unutrašnjih genitalija. Na slici je prikazan (A) polno nediferencirani stadijum u razvoju unutrašnjih genitalija, gde je prisutan i primordijum od kojeg se razvijaju ženske unutrašnje genitalije – Milerovi kanali i primordijum od kojeg se razvijaju muške unutrašnje genitalije – Volfovi kanali. (B) formirane ženske unutrašnje genitalije (C) formirane muške unutrašnje genitalije. Na osnovu boja se može pratiti poreklo genitalija. (ilustrovala Biljana Čurná Roman)

Kod parnih Milerovih kanala možemo razlikovati tri odvojena regiona: kranijalne delove koji su otvoreni prema abdomenu, središnje delove koji idu paralelno sa Volfovim kanalima, a zatim se spuštaju više ventralno i nastavljaju kaudomedijalno, i kaudalne delove gde se parni kanali približavaju međusobno i razdvojeni su samo septumom. Kaudalni vrh pripojenih Milerovih kanala se završava na posteriornom zidu urogenitalnog sinusa, a mesto kontakta se naziva Milerova kvržica (engl. *sinus tubercle*, *paramesonefric tubercle*, *Mullerian tubercle*). Pravilno uspostavljanje kontakta je bitan korak u formiranju ženskih unutrašnjih genitalija. Prema tome, rani embrion je u početku polno nediferenciran, i ima mogućnost da se kod njega formiraju i muške i ženske genitalije, međutim primordijumi od kojih se razvijaju muške i ženske unutrašnje genitalije su različiti, a polna diferencijacija počinje sa polnom diferencijacijom gonada.

Pokazano je da su za razvoj Volfovih i Milerovih kanala posebno značajni pojedini transkripcioni faktori, kao što su PAX2 i PAX8 (engl. *Paired box family 2 i 8*). Ova dva transkripciona faktora deluju u sadejstvu u ranim fazama razvoja Milerovih i Volfovih kanala, a svaki od njih je neophodan za kasnije stadijume u razvoju kanala. Eksperimenti na miševima su pokazali značajnost gena *Emx2* za razvoj kanala. Kod mužjaka miševa kod kojih je utišan *Emx2* dolazi do degeneracije Volfovih kanala u kasnijoj fazi razvića, dok kod ženskih jedinki sa nedostatkom ovog faktora, potpuno izostaje formiranje Milerovih kanala. Transkripcioni faktor LHX1 je takođe od izuzetnog značaja, a njegova uloga je pomenuta ranije.

Za razvoj unutrašnjih ženskih genitalija od ključnog značaja su i signalni glikoproteini, WNT4 i WNT7a. WNT4 se eksprimira u mezenhimu u okolini Milerovih kanala, ali ne i u okolini Volfovih kanala. Pored već pomenutog značaja za razvoj jajnika, WNT4 je bitan i za razvoj i diferencijaciju Milerovih kanala, dok nema uticaj na razvoj Volfovih kanala. Kod miševa sa utišanim genom *Wnt4* ne dolazi do formiranja Milerovih kanala. Kod ženskog fetusa čoveka sa mutacijom gena *WNT4*, osim maskulinizovane gonade, javljaju se maskulinizovane unutrašnje genitalije, dok spoljašnje genitalije deluju normalno. WNT7a se ekspresuje u Milerovim kanalima kao i u unutrašnjim ženskim genitalijama koje nastaju kasnije. U slučaju mutacije, dolazi do nepravilnog razvoja Milerovih kanala kod ženskih jedinki, dok se kod muških jedinki dešava nepravilna regresija Milerovih kanala, što narušava oslobađanje sperme i time fertilitnost.

### 2.2.2. Razvoj unutrašnjih genitalija – polna diferencijacija

Regresija jednih odnosno drugih kanala je uslovljena prisustvom, odnosno odsustvom hormona sintetisanih od strane testisa. Kod muških jedinki, prisustvo androgena omogućava opstanak i dalju diferencijaciju Volfovih kanala do epididimisa (kranijalni deo), vas deferensa (medijalni deo), seminalnih vezikula i ejakulatornog kanala (kaudalni deo), dok prisustvo AMH dovodi do regresije Milerovih kanala oko 10. nedelje od oplodnje. Do 12. nedelje od fertilizacije razvoj unutrašnjih muških genitalija je završen. S druge strane, kod ženskih jedinki odsustvo testosterona dovodi do regresije Volfovih kanala oko 12. nedelje nakon fertilizacije, a odsustvo AMH omogućava opstanak i dalju diferencijaciju Milerovih kanala do ženskih unutrašnjih genitalija.

Uporedo sa spuštanjem jajnika dolazi i do promena na Milerovim kanalima. Od kranijalnih i središnjih delova Milerovih kanala nastaju parni jajovodi (Falopijeve tube ili ovidukti) otvoreni prema abdomenu, na čijim vrhovima se nalaze resičasti izdanci (lat. *fimbriae*) koji nastaju od nepravilnih otvora na jajovodima. Kaudalni delovi Milerovih kanala se spajaju, i u 8. nedelji još je prisutan septum između pripojenih Milerovih kanala, dok u 9. nedelji nestaje septum i formira se jedinstveni uterovaginalni kanal. Od uterovaginalnog kanala će nastati telo i grlić materice koji se okružuju slojem mezenhima koji formira mišićni sloj ili miometrijum i peritonealni sloj ili perimetrijum. Miometrijum se počinje formirati već u 9. nedelji, a značajna količina miometrijuma se detektuje u 18. nedelji. Osnovni oblik tela materice se detektuje u periodu između 9–10. nedelje, nakon čega se dodatno izdužuje i uvećava. Međutim, značajno povećanje se dešava tek postnatalno, a finalno sazrevanje i aktivacija materice se dešavaju tek u pubertetu, prilikom menarhe. Žlezde materice (unutar tela i grlića) se počinju razvijati u 14–15. nedelji, a u 21. nedelji one su izdužene i razgranate po stromi materice. Gornji deo vagine se takođe formira od uterovaginalnog kanala, međutim središnji i donji deo vagine vode poreklo od urogenitalnog sinusa. Na mestima gde se Milerovi kanali spajaju sa urogenitalnim sinusom, proliferacijom endoderma formira se Milerova kvržica, od čijih se distalnih delova formiraju parni sinovaginalni pupoljci.

Sinovaginalni pupoljci se dalje razvijaju i dolazi do formiranja *vaginalne ploče* koja raste kaudalno, udaljavajući matericu od urogenitalnog sinusa. Stvaranje kanala u vaginalnoj ploči počinje u 3. mesecu, a završava se u 5. mesecu, pri čemu se smatra da rast i kanalizacija vaginalne ploče teku istovremeno. Prema tome, veći deo vagine je poreklom od urogenitalnog sinusa, a samo gornji deo, kao krilaste strukture u blizini materice je poreklom od Milerovih kanala. Epitel čitave vagine je poreklom od urogenitalnog sinusa. Lumen vagine ostaje odvojen od urogenitalnog sinusa tankim slojem tkiva koji se naziva himen, a koji se sastoji od epitelnog sloja sinusa i tankog sloja vaginalnih ćelija. Obično se na njemu pojavi mali otvor perinatalno. Izostanak spajanja Milerovih kanala sa urogenitalnim sinusom dovodi do izostanka formiranja donjih delova vagine, što se dešava kod miševa sa mutiranim genom za protein LHFPL2 (engl. *lipoma HMGIC fusion partner-like 2*).

Moguće je da kod ženskih jedinki zaostanu delovi mezonefrosa, i to kranijalne i kaudalne ekskretorne tubule koje se ulivaju u Volfov kanal, a koje su dobile naziv *epoforon* i *paroforon*, redom. Strukture su smeštene u blizini jajnika i jajovoda, tačnije u mezovarijumu – ligamentu koji pridržava jajnike. Takođe mogu da zaostanu kranijalni i kaudalni delovi Volfovih kanala, pri čemu kranijalni deo ulazi u sastav epoforona, a kaudalni može da se nađe u zidu materice i vagine i da kasnije formira *Gartnerovu cistu*.

Ukoliko bi se ženskom fetusu odstranili jajnici, unutrašnje genitalije bi se normalno formirale što ukazuje da jajnik nije potreban za normalan fetalni razvoj ženskih unutrašnjih genitalija. Stimulacija androgenima kod ženskih fetusa bi dovela do formiranja muških unutrašnjih genitalija. Volfovi kanali postaju senzitivni na delovanje testosterona oko 54. dana posle oplodnje kada se stimuliše njihova diferencijacija. Regresija Milerovih kanala pod uticajem AMH počinje oko 51. dana od oplodnje kada su ovi kanali senzitivni na delovanje AMH. Senzitivnost je prisutna samo u kratkom vremenskom intervalu, nakon čega AMH više nije u mogućnosti da stimuliše regresiju Milerovih kanala. Testosteron ostvaruje svoje dejstvo putem androgenog receptora (AR), a AMH koji pripada TGF $\beta$  familiji, putem specifičnih receptora sa aktivnošću serin/treonin kinaze tip 1 i tip 2 povezanih sa signalnim putem posredovanim proteinima SMAD.

Volfovi i Milerovi kanali ne poseduju navedene receptore, već su receptori smešteni u okolnom mezenhinu, pri čemu je regulacija indirektna. Hormoni deluju na okolni mezenhim koji parakrino reguliše razvoj ili regresiju kanala.

Regulacija ženskih unutrašnjih genitalija od strane steroidnih hormona, dolazi do izražaja kasnije u toku razvića. AR i estrogenski receptor 1 (ER $\alpha$ ) su prvi put detektovani u epitelu humanih jajovoda u 14. nedelji. U mezenhimu uterusa ER $\alpha$  se detektuje u 16. nedelji, a njegova značajnija ekspresija u epitelnim ćelijama uterusa se detektuje tek u 21. nedelji, što se poklapa sa početkom sinteze estrogena. U vaginalnom epitelu ER $\alpha$  je takođe prvi put detektovan u 14. nedelji, dok je u 16. nedelji ravnomerno prisutan u čitavoj vagini. U 21. nedelji, u epitelu vagine koji je pod uticajem estrogenih hormona, ekspresprimiranje ER $\alpha$  je na visokom nivou. Progesteronski receptor (PR) nije detektovan u ženskom reproduktivnom traktu od 8. do 21. nedelje. Međutim moguće ga je indukovati sa estrogenom supstancom, dietilstilbestrolom (DES), u eksperimentalnim uslovima. ER $\alpha$  je takođe moguće stimulisati u epitelu materice sa DES oko 14–16. nedelje.

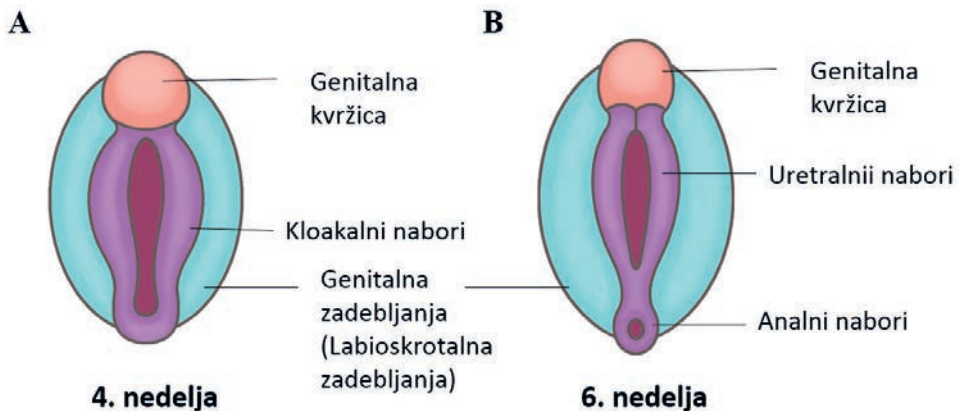
Za razvoj ženskog reproduktivnog trakta od ključnog značaja su pojedini geni *HOX* koji regulišu na kojoj anteriorno-posteriornoj poziciji se razvija koji organ. *HOXA9* reguliše razvoj jajovoda, *HOXA10* i *HOXA11* razvoj materice, a *HOXA13* reguliše razvoj vagine.

## 2.3. RAZVOJ SPOLJAŠNJIH GENITALIJA

### 2.3.1. Razvoj spoljašnjih genitalija – polno nediferencirani stadijum

Početni stadijum u razvoju spoljašnjih genitalija je takođe polno nezavisan, isti primordijum se javlja kod oba pola. Za razliku od ostatka reproduktivnog sistema, sva tri klicina lista ektoderm, mezoderm i endoderm, učestvuju u formiranju spoljašnjih genitalija. U trećoj nedelji se oko membrane kloake grupisanjem ćelija mezenhima formiraju dva uzdignuća, kloakalni nabori. Kranijalno u odnosu na membranu kloake, nabori se sjedinjuju i formiraju genitalnu kvržicu oko 4. nedelje. Genitalna kvržica

sadrži ćelije koji potiču od sva tri klicina lista. Unutar kloake se formira urorektalni septum u toku 6. i 7. nedelje, čime se odvaja urogenitalni sinus i anorektalni kanal, a membrana kloake se deli na urogenitalnu membranu i analnu membranu. Kaudalno, kloakalni nabori se dodatno dele i anteriorno formiraju uretralne nabore, a posteriorno analne nabore. Prostor između urogenitalne i analne membrane je budući perineum. Genitalna zadebljanja (labioskrotalna zadebljanja) se formiraju sa obe strane uretralnih nabora u 4. nedelji. Tako da, kod 6 nedelja starih embriona može se videti bipotencijalni primordijum od kojeg mogu nastati i muške i ženske spoljašnje genitalije, a kojeg čine genitalna kvržica, uretralni nabori, genitalna zadebljanja i deo urogenitalnog sinusa (Slika 2.6). Do 9. nedelje spoljašnje genitalije su jednake kod oba pola.



**Slika 2.6** Razvoj spoljašnjih genitalija – polno nediferencirani stadijum (ilustrovala Biljana Čurná Roman)

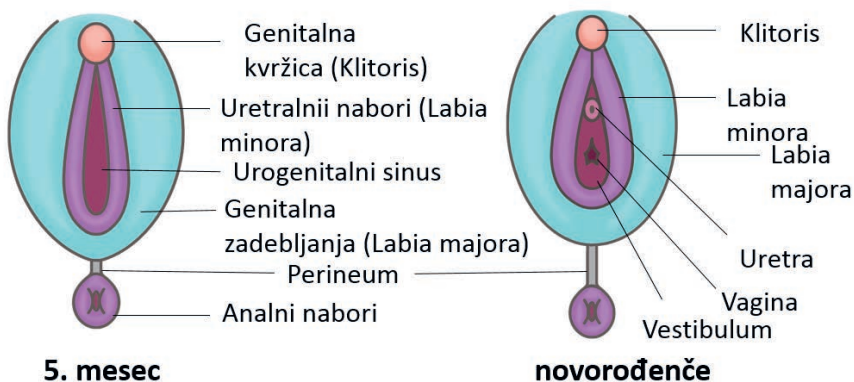
### 2.3.2. Razvoj spoljašnjih genitalija – polna diferencijacija

Kod XY jedinki genitalna kvržica se značajno izdužuje i formira *falus*. Izduživanjem, falus povlači napred uretralne nabore tako da oni formiraju lateralne zidove uretralnog žleba. Uretralni žleb se prevlači ćelijama endoderma koje dolaze iz urogenitalnog sinusa, formirajući uretralnu ploču.

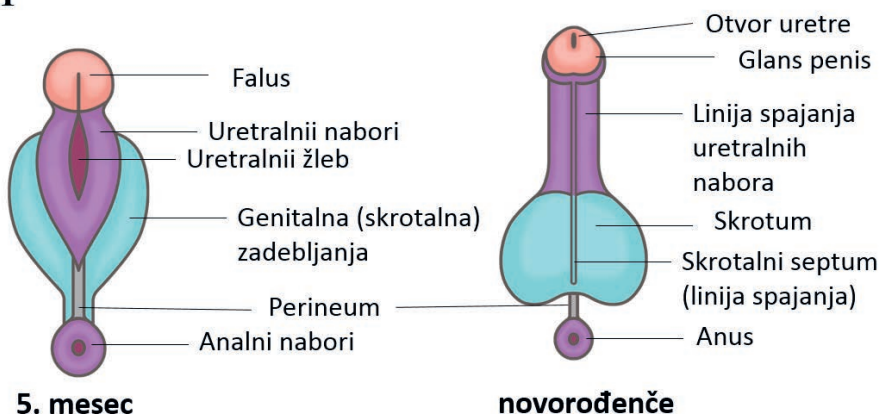


Krajem trećeg meseca uretralni nabori zatvaraju prostor preko uretralne ploče, pri čemu se formira penilna uretra. Ranije se smatralo da tako formirana penilna uretra ne stiže do samog vrha falusa, već da ćelije ekto-derma sa vrha falusa prodiru unutra formirajući prvo trakastu strukturu koja kasnije dobija lumen, postaje kanal i spaja se sa ostatkom penilene uretre. Međutim, kasnije je pokazano da je čitava uretra endodermalnog porekla. Genitalna zadebljanja se izdužuju kaudalno i spajaju formirajući skrotum u periodu od 9. do 12. nedelje. Dva dela skrotuma ostaju odvojeni septumom (Slika 2.7).

### A XX



### B XY



**Slika 2.7** Razvoj spoljašnjih genitalija – polna diferencijacija (ilustrovala Biljana Čurná Roman)

Kod XX jedinki genitalna kvržica se samo malo uvećava i formira klitoris (*clitoris*). Uretralni nabori se ne spajaju već formiraju male usne (*lat. labia minora*), dok se genitalna zadebljanja samo dodatno uvećavaju i formiraju velike usne (*lat. labia majora*). Od urogenitalnog sinusa se formira uretra i donje dve trećine vagine, a od distalnog dela koji ostaje otvoren se formira vestibulum koji je deo spoljašnjih genitalija. Vestibulum predstavlja prostor između malih usana. U vestibulumu je anteriorno smešten otvor uretre (uretralni orificijum), posteriorno otvor vagine, Skeneove žlezde u neposrednoj blizini otvora uretre, kao i Bartolinijeve žlezde u neposrednoj blizini vagine koje su takođe poreklom od urogenitalnog sinusa. Kod fetusa starog 11 nedelja jasno se uočava klitoris, a kod fetusa starog 20 nedelja jasno se vidi klitoris koji ima ograničen rast, dobro definisane velike usne, manje razvijene male usne kao i uretralni i vaginalni otvor u vestibulumu. Razvoj ženskih spoljašnjih genitalija je prikazan na slici 2.7.

### 2.3.3. Regulacija razvoja spoljašnjih genitalija

Spoljašnje genitalije se razvijaju pod uticajem hormona. U prisustvu androgena se razvijaju muške genitalije, dok odsustvo androgena izaziva formiranje ženskih genitalija. Smatra se da su estrogene bitni za razvoj spoljašnjih genitalija, bilo da oni potiču od fetusa, placente ili cirkulacije majke, jer je detektovana ekspresija AR, ER $\alpha$  i estrogenog receptora  $\beta$  (ER $\beta$ ) u fetalnom penisu i klitoris. Međutim mehanizam regulacije nije poznat. Pokazano je i da je ekspresiranje ER $\beta$  značajno veće i javlja se ranije u toku razvića u odnosu na ER $\alpha$ , što navodi na zaključak da je ER $\beta$  značajniji za normalan razvoj. Pretpostavlja se da se ER $\alpha$  može aktivirati hemikalijama iz spoljašnje sredine koje imaju estrogenu aktivnost i da tako posreduje u nepravilnom formiranju genitalija pod uticajem hemikalija sa hormonskom aktivnošću. Ako bi se kod XX fetusa otklonili jajnici, ženske spoljašnje genitalije bi se i dalje formirale, ukazujući da je razvoj nezavisan od hormona jajnika, dok dodatak androgena XX fetusima, uzrokuje pojavu muških spoljašnjih genitalija. Takođe, ukoliko bi se kastrirali XY fetus ili izvršila inhibicija sinteze androgena, došlo bi do feminizacije spoljašnjih genitalija.

Pored hormonske regulacije, otkriveni su i geni koji su ključni za pravilan razvoj spoljašnjih genitalija. Geni koji koordinišu razvoj organa se

nazivaju morfogeni i u tu grupu spada gen *SHH* (eng. *Sonic hedgehog*) za kojeg je pokazano da je ključan za inicijaciju i održavanje rasta genitalne kvržice, kao i za formiranje septuma unutar kloake tj. formiranje urogenitalnog sinusa i anorektalnog kanala. Nizvodno od *SHH* je nađeno još nekoliko morfogena koji su ključni za razvoj spoljašnjih genitalija, kao što su *FGF8*, *FGF10*, *BMP2*, *BMP4* i *WNT5A*. Kod miševa je pokazano da je signalni put *WNT*, koji se nalazi nizvodno od *SHH*, neophodan za rast genitalne kvržice. Genitalna kvržica miša eksprimira više liganda *WNT* od kojih je *WNT5A* najznačajniji. Mutacija *WNT5A* kod ljudi uzrokuje pojavu Robinovog sindroma, koji se karakteriše mikropenisom i slabo razvijenim skrotumom kod muških jedinki, kao i slabo razvijenim klitorisom i labijama kod ženskih jedinki. Nađeno je i da je signalni put faktora rasta poreklom iz trombocita (engl. *platelet derived growth factor*, *PDGF*) ključan za pravilnu podelu kloake, razvoj urogenitalnih nabora i tubulizaciju uretre i kod muških i ženskih jedinki, kao i da stimuliše rast genitalne kvržice.

## 2.4. LITERATURA

- Biason-Lauber, A (2010). Control of sex development. *Best Practice Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 24:163–86.
- Chen D, Sun N, Hou L, Kim R, Faith J, Aslanyan M, Tao Y, Zheng Y, Fu J, Liu W, Kellis M, Clark A (2019) Human Primordial Germ Cells Are Specified from Lineage-Primed Progenitors. *Cell Rep* 29:4568-4582.e5.
- Cunha GR, Robboy SJ, Kurita T, Isaacson D, Shen J, Cao M, Baskin LS (2018) Development of the human female reproductive tract. *Differentiation* 103:46–65.
- Délot EC, Vilain E (2019) Disorders of Sex Development. U: Strauss JF i Barbieri RL, ur., *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology*, 8. izdanje, Elsevier, 365–393.
- Feldman Witchel S, Lee PA (2014) Chapter 5 – Ambiguous genitalia. U: *Pediatric Endocrinology*, 4. izdanje
- Gunesdogan U, Magnusdottir E, Surani MA (2014) Primordial germ cell specification: a context-dependent cellular differentiation event. *Phil Trans R Soc B* 369: 20130543.
- Haller M, Ma L (2019) Temporal, spatial, and genetic regulation of external genitalia development. *Differentiation* 110:1–7.
- Hartshorne GM, Lyrakou S, Hamoda H, Oloto E, Ghafari F (2009) Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection? *Mol Hum Reprod* 15:805–819.

- Hu YC, Okumura LM, Page DC (2013) Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. PLoS Genet 9:e1003629.
- Johnson, Martin H (2018) Essential reproduction, 8. izdanje, Wiley-Blackwell, 38–52.
- Parker KL, Schimmer BP (2006) Embryology and Genetics of the Mammalian Gonads and Ducts. U: Neil JD, ur., Knobil and Neill's physiology of reproduction, 3. izdanje, Elsevier, 313–336.
- Niu W, Spradling AC (2022) Mouse oocytes develop in cysts with the help of nurse cells. Cell 185: 2576-2590.e12.
- Rodrigez A, Matzuk MM, Pangas SA (2019) Growth factors and reproduction. U: Strauss JF I Barbieri RL, ur., Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology, 8. izdanje, Elsevier, 132–148.
- Sadler TW (2003) Langman's Medical Embriology, 9. izdanje, Lippincott Williams & Wilkins.
- Seifert AW, Harfe BD, Cohn MJ (2008) Cell lineage analysis demonstrates an endodermal origin of the distal urethra and perineum. Dev Biol 318:143–52.
- Spradling AC, Niu W, Yin Q, Pathak M, Maurya B (2022) Conservation of oocyte development in germline cysts from *Drosophila* to mouse. E-life 11:e83230.
- Strauss JF III, Williams CJ (2019) Ovarian Life Cycle. U: Strauss JF i Barbieri RL, ur., Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology, 8. izdanje, Elsevier, 167–205.
- Xie Y, Wu C, Li Z, Wu Z, Hong L (2022) Early Gonadal Development and Sex Determination in Mammals. Int J Mol Sci 23:7500.

**Radmila Kovačević  
Nebojša Andrić**

---

**3.  
GONADOTROPNI  
HORMON –  
OSLOBAĐAJUĆI  
HORMON,  
GONADOTROPNI  
HORMONI I  
PROLAKTIN**

---



## 3.1. HIPOTALAMO-HIPOFIZNI SISTEM

### 3.1.1. Hipotalamus i organizacija jedara

Hipotalamus je deo međumozga i predstavlja integrativni centar nervnog i endokrinog sistema. Iako nema jasne granice, opisuje se kao struktura koja formira lateralne zidove i pod treće moždane komore. Sa prednje strane (rostralno) je oivičen optičkom hijazmom i anteriornom komisurinom, a sa zadnje strane (kaudalno) mamilarnim telima. Lateralno, hipotalamus je okružen prednjim mezencefaličnim snopom, glavnom vezom preko koje su svi medijalno locirani nukleusi povezani sa ostatkom mozga. Neuroni hipotalamusa se formiraju od ventralnog dela diencefalona embriona tokom 2. i 3. meseca trudnoće žene, odnosno 2. nedelje embriogeneze kod glodara.



**Slika 3.1.** Hipotalamus i hipofiza. Uzdužni presek, rostralno-kaudalno. (Slika je preuzeta sa wikimedia commons i modifikovana u Biorenderu na osnovu licence Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International)

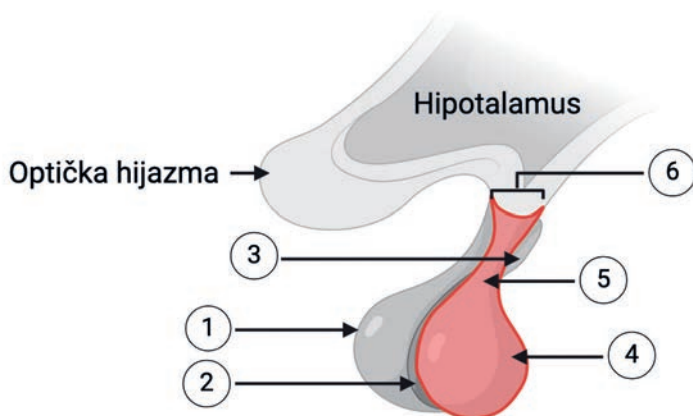
Neuroni hipotalamusa organizovani su u jedra u kojima se nalaze tela neurona. U zavisnosti od veličine tela razlikuju se magnocelularna (velika tela neurona) i parvicelularna (mala tela neurona) jedra. Primeri magnocelularnih jedara su supraoptičko jedro i paraventrikularno jedro. Hipotalamus je bilateralna simetrična struktura i na frontalnom preseku se razlikuju tri zone: periventrikularna zona koja predstavlja tanak sloj malih neurona lociranih u zidu treće moždane komore, zatim medijalna i lateralna zona. Kod čoveka je periventrikularna zona slabije razvijena u odnosu na druge vrste. Kod sisara su periventrikularna i medijalna zona predstavljene gusto raspoređenim telima neurona organizovanim u jedra koja su odgovorna za regulaciju funkcija prednjeg i zadnjeg režnja hipofize. Medijalna zona hipotalamusa je važna i za regulaciju i kontrolu žeđi, gladi, termoregulaciju, ciklus budnost-san i reproduktivno ponašanje.

Hipotalamus posmatran od rostralnog ka kaudalnom delu podeljen je na 3 regiona: anteriorni (ili supraoptički) koji se nalazi iznad optičke hijazme; tuberalni koji je smešten između optičke hijazme o mamilarnih tela i posteriorni (ili mamilarni) region koji se nalazi iznad mamilarnih tela. U anteriorni region uključen je i deo koji se nalazi rostralno od optičke hijazme i neki autori ga izdvajaju kao poseban preoptički region (engl. *preoptic area*, POA). Glavna jedra hipotalamusa u periventrikularnoj zoni su periventrikularno jedro u preoptičkom regionu i suprashijazmatično jedro i paraventrikularno jedro u anteriornom regionu. U medijalnoj zoni, glavna jedra su medijalno preoptičko jedro u preoptičkom regionu, dorzomedijalno i ventromedijalno jedro u tuberalnom regionu i premamilarno i mamilarno jedro u posteriornom regionu. U lateralnoj zoni se nalaze u preoptičkoj zoni lateralno preoptičko jedro i supraoptičko jedro. Tuberalni region zajedno sa paraventrikularnim jedrom sadrži najveći deo neurona hipotalamusa koji regulišu rad ćelija hipofize i označen je kao mediobazalni deo hipotalamusa. Deaferentacija mediobazalnog dela hipotalamusa, hirurški zahvat koji prekida veze sa ostalim delovima hipotalamusa, ostavlja očuvanu većinu funkcija adenohipofize. To ukazuje da se u ovoj oblasti nalazi najveći broj neurona koji kontrolišu produkciju hormona adenohipofize (Slika 31).



### 3.1.2. Hipofiza

Hipofiza je smeštena u turskom sedlu sfenoidne kosti, koštanoj strukturi na bazi lobanje. To je mali organ i kod čoveka ima masu od oko 0.5 g. Sastoji se od adenohipofize i neurohipofize. Adenohipofiza obuhvata prednji režanj (*pars distalis*), srednji režanj (*pars intermedia*), kao i *pars tuberalis*, deo koji sa anteriorne strane oblaže eminenciju medijanu i infundibulum (hipofiznu dršku). Neurohipofiza se sastoji od zadnjeg reznja (*pars posterior*, ili *pars nervosa*), infundibuluma i eminencije medijane (Slika 3.2).



**Slika 3.2.** Šema hipofize.

1. prednji režanj; 2. srednji režanj; 3. *pars tuberalis*; 4. zadnji režanj; 5. infundibulum;  
6. eminencija medijana (Slika je napravljena u Biorenderu)

Adenohipofiza nastaje od ektoderma primitivne usne šupljine, a neurohipofiza nastaje od neuroektoderma. Neurohipofiza počinje da se razvija u 3. nedelji trudnoće kod žene kao divertikulum ventralnog dela poda diencefalona koji se u vidu levka (infundibulum) spušta ka krovu primitivne usne šupljine. Donji deo infundibuluma formira zadnji režanj čije se ćelije diferenciraju u specifične glija ćelije pituicite. Adenohipofiza nastaje u 4. nedelji života zadebljanjem i evaginacijom određenog dela ektoderma primitivne usne šupljine tzv. Ratkeova vreća koja se usmerava ka infundibulumu. Kada Ratkeova vreća stigne do infundibuluma, odvaja se od

ektoderma usne duplje, prednji deo zadebljava i lumen vreće se svodi na pukotinu. Srednji režanj i *pars tuberalis* kod čoveka su slabo razvijeni, tako da je endokrina aktivnost adenohipofize vezana za prednji režanj hipofize. Termini adenohipofiza i prednji (anteriorni) režanj se često izjednačavaju, kao i zadnji režanj i neurohipofiza.

Adenohipofiza obuhvata oko 75% zapremine hipofize. Sadrži parenhimske ćelije organizovane u acinuse, bogatu mrežu sinusoidnih kapilara, nervna vlakna vegetativnog nervnog sistema i mrežu kolagenih vlakana. Klasičnim histološkim bojenjem, u adenohipofizi se razlikuju hromofobne i hromofilne (acidofilne i bazofilne) parenhimske ćelije. Acidofilne ćelije su somatotropne (produkuju hormon rasta, čine oko 50% od ukupnog broja ćelija adenohipofize) i mamotropne (produkuju prolaktin) ćelije. Bazofilne ćelije su tireotropne (produkuju tireostimulirajući hormon), kortikotropne (produkuju adrenokortikotropni hormon) i gonadotropne ćelije koje produkuju gonadotropne hormone, folikulostimulišući hormon (FSH) i luteinizirajući hormon (LH). Gonadotropne ćelije su najveće ćelije adenohipofize, čine oko 10–15% od ukupnog broja ćelija. Imunohistohemijska ispitivanja pokazuju da oko 70% gonadotropnih ćelija kod pacova produkuje i FSH i LH, dok ostale produkuju jedan ili drugi hormon. Među hromofobnim ćelijama koje su sitnije od hromofilnih, nalaze se degranulirane hromofilne ćelije, folikulostelatne ćelije i matične (stem) ćelije. Folikulostelatne ćelije imaju zvezdast oblik, međusobno su povezane neksusima, pripadaju glija ćelijama, smatra se da imaju nutritivnu i potpornu ulogu i sintetišu folikulostatin. Od matičnih ćelija diferencijacijom nastaju ostale ćelije adenohipofize.

Neurohipofiza luči dva hormona: oksitocin i antidiuretski hormon (poznat i kao vazopresin). Veza između hipotalamusa i neurohipofize je nervne prirode, jer aksoni neurona čija se tela nalaze u supraoptičkom i paraventrikularnom jedru grade tzv. hipotalamo-hipofizni nervni trakt, odnosno završeci aksona se nalaze u neurohipofizi i u njima se nalaze vezikule sa hormonima koji se sintetišu u telima neurona.

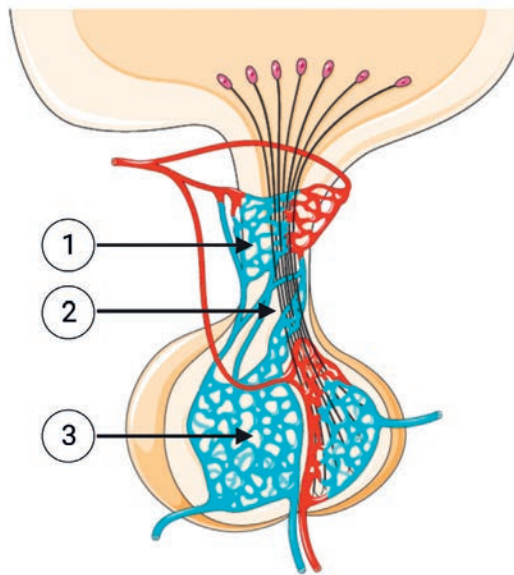
### 3.1.3. Eminencija medijana

Eminencija medijana se nalazi u bazi hipotalamusa ventralno od treće moždane komore pored arkuatnog jedra. Eminencija medijana je jedan od pet cirkumventrikularnih organa u mozgu. Karakteristika ovih organa je bogata kapilarna mreža sa fenestriranim endotelom. Zajedno sa prisustvom nervnih elemenata u ovim organima, fenestrirani kapilari omogućavaju da se signalne molekule nastale u mozgu nađu u perifernoj cirkulaciji, a s druge strane da određeni molekuli iz opšte cirkulacije dospeju do neurona u mozgu. Eminencija medijana je sastavljena od tri zone: endodimalne, spoljašnje i unutrašnje. Endodimalna zona formira pod treće moždane komore, ćelije su povezane tesnim vezama, a među njima se nalaze i specijalizovane endodimalne ćelije označene kao taniciti. Taniciti su polarne ćelije čiji apikalni kraj sadrži mikrovile i dugačke izraštaje koji ulaze u treću moždanu komoru, a bazalni kraj je izdužen i pruža se ventralno kroz eminenciju medijanu do fenestriranih kapilara. Zadatak endodimalne zone je formiranje krvno moždane barijere, odnosno da se spreči da hormoni hipotalamusa koji se oslobađaju u blizini kapilara u eminenciji medijani dospeju u cerebrospinalnu tečnost. Tesne veze se sreću i prema arkuatnom jedru, tako da hormoni hipotalamusa oslobođeni u eminenciji medijani ostaju locirani u tom prostoru. U jednom delu granice prema arkuatnom jedru ne postoji krvno-moždana barijera što omogućava da određeni molekuli iz krvi dospeju u ovo jedro.

### 3.1.4. Hipotalamo-hipofizni portni sistem

Hipotalamo-hipofizni portni sistem obezbeđuje vezu hipotalamusa sa prednjim režnjem hipofize (Slika 3.3). Portalni sistem sadrži dva kapilarna spleta, jedan u eminenciji medijani označen kao primarni, a drugi u prednjem režnju hipofize označen kao sekundarni. Gornja hipofizna arterija, ogranak unutrašnje karotidne arterije, grana se u nivou eminencije medijane u bogat splet fenestriranih kapilara koji je podeljen na spoljašnji pleksus smešten u spoljašnjem delu eminencije medijane i unutrašnji pleksus sastavljen od kapilarnih petlji koje se pružaju kroz spoljašnji deo i urastaju u gornji deo unutrašnje zone eminencije medijane. Kapilarni

sudovi koji se prostiru u tkivo eminencije medijane, a zatim vraćaju na površinu, spajaju se i grade portne vene koje prolaze ventralnom stranom hipofizne drške i u nivou adenohipofize granaju se u splet sinusoidnih kapilara. Dve kapilarne mreže i portne vene koje ih spajaju čine hipotalamo-hipofizni portni sistem. Kroz portne sudove, krv koja dolazi iz primarnog kapilarnog spleta stiže u kapilarni splet prednjeg režnja hipofize. Gornja hipofizna arterija pored eminencije medijane, ishranjuje i infundibulum, *pars tuberalis*, a posebnim ograncima i srednji režanj hipofize. Prednji režanj hipofize nema dotok arterijske krvi od ogranaka unutrašnje karotidne arterije. Zadnji režanj je snabdeven arterijskim anastomozama koje potiču od donjih hipofiznih arterija. Krv iz kapilara neurohipofize i sekundarne kapilarne mreže adenohipofize odlazi u hipofizne vene koje se nastavljaju u kavernozi sinus. Hormoni hipotalamusa se oslobađaju u nivou eminencije medijane i putem portnog krvotoka dospevaju do prednjeg režnja hipofize.



**Slika 3.3.** Hipofiza sa prikazom hipotalamo-hipofizno portnog sistema. (plavo).

1. Primarni kapilarni splet; 2. Portni sudovi; 3. Sekundarni kapilarni splet.

Crvenom bojom je prikazan krvotok koji snabdeva krvlju neurohipofizu.

(Slika je preuzeta sa wikimedia commons i modifikovana u Biorenderu na osnovu licence Creative Commons Attribution 3.0 Unported licence u Biorenderu)

## 3.2. GONADOTROPNI HORMON – OSLOBAĐAJUĆI HORMON

### 3.2.1. Struktura gonadotropnog hormona – oslobađajućeg hormona

Gonadotropni hormon – oslobađajući hormon (engl. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) je dekaeptid čija je struktura otkrivena 1971. kada je izolovan iz hipotalamusa svinje. Do sada je izolovano preko 25 izoformi. Izoforme GnRH1 i GnRH2 razlikuju se u aminokiselinskim ostacima na pozicijama 5, 7 i 8 i prisutne su kod primata, uključujući čoveka. GnRH1 se dominantno eksprimira u centralnom nervnom sistemu (CNS), posebno hipotalamusu, dok se GnRH2 eksprimira mnogo više van CNS, posebno u bubrezima, prostati i jajnicima. Postoje različita mišljenja da li kod čoveka gen za GnRH2 daje funkcionalan protein. Kod čoveka se eksprimira receptor za GnRH1, dok gen za receptor za GnRH2 ne daje funkcionalan protein. Danas postoje brojni sintetički analozi GnRH1 sa povećanom biološkim delovanjem, koji se koriste u tretmanima različitih reproduktivnih poremećaja, kao i u kontrolisanoj stimulaciji jajnika kod vantelesne oplodnje.

Gen za GnRH1 (u daljem tekstu GnRH) lociran je na hromozomu 8 kod čoveka i produkt ovog gena je polipeptidni lanac od 92 aminokiseline koji predstavlja prekursorsku molekulu, odnosno prepro-GnRH. Obradom ove molekule nastaju dekaeptid GnRH i GnRH-povezani protein (engl. *GnRH-associated protein*, GAP) koji sadrži 56 aminokiselina. U GnRH neuronima, proteini GnRH i GAP su lokalizovani u tamnim vezikulama, dok svetle sekretne vezikule sadrže druge neurohormone koje nastaju u GnRH neuronima i oslobađaju se zajedno sa GnRH i GAP. Kod pacova i miševa, neuropeptid galanin se luči zajedno sa GnRH, i oko 70% GnRH neurona kod ženki eksprimira galanin. Postoje podaci da galanin olakšava lučenje GnRH u nivou eminencije medijane kao i lučenje LH koje je stimulirano sa GnRH direktno na nivou hipofize. Međutim, pokazano je da kod miševa galanin izlučen zajedno sa GnRH nije neophodan za dejstvo GnRH, pošto kod životinja sa utišanim genom za ovaj neurohormon ne dolazi do poremećaja reproduktivne funkcije. Neki od neurona koji su u sinaptič-

koj vezi sa neuronskom mrežom GnRH takođe luče galanin. Kod ovce, svi GnRH neuroni u oba pola eksprimiraju galanin. Zajedničko eksprimiranje galanina i GnRH nije utvrđeno kod svih sisarskih vrsta. Sličan slučaj je i sa peptidom koji uzrokuju sporo-talasno (delta) spavanje (engl. *delta sleep-inducing peptid*, DSIP). Veći broj studija je ukazao da vlakna GnRH neurona eksprimiraju DSIP i da ta supstanca stimuliše lučenje LH. Takođe je zabeležen efekat DSIP na lučenje hormona rasta.

U hipotalamusu sisara, uključujući čoveka, postoje peptidi koji su ortolozi gonadotropnom hormonu inhibirajućem hormonu (engl. *gonadotropin-inhibitory hormone*, GnIH) koji je prvo otkriven kod ptica. Ovi peptidi pripadaju RFamid sličnim peptidima (RF je oznaka za aminokiseline arginin i fenilalanin sa slobodnom amino-grupom, engl. *RFamid related peptides*, RFRPs). Kod čoveka su pronađeni RFRP-1 i RFRP-3. Postoje rezultati koji ukazuju da su GnIH i RFRP uključeni u regulaciju unosa hrane (povećavaju), seksualnu motivaciju (smanjuju) kao i dejstva stresa na reprodukciju (smanjuju). Iako postoje podaci da su RFRPs i GnIH bitni za kontrolu lučenja GnRH i gonadotropnih hormona kod većeg broja sisarskih vrsta, uloga kod čoveka zahteva dalja istraživanja. RFRPs se luči u portalnu cirkulaciju, a njihov receptor, receptor 147 koji deluje preko G-proteina, nalazi se u ćelijskoj membrani GnRH neurona i gonadotropnih ćelija.

### 3.2.2. GnRH neuroni

GnRH neuroni ne formiraju jasno definisana jedra. Obzirom na način formiranja GnRH neurona tokom embriogeneze kod sisara (videti kasnije), tela ovih neurona se nalaze od olfaktornih kvržica do mediobazalnog hipotalamusa. Međutim, postoje razlike među vrstama u pogledu veće prisutnosti tela GnRH neurona u pojedinim delovima hipotalamusa. Kod čoveka i nižih primata najviše tela je prisutno u dorzalnom hipotalamusu, mediobazalnom delu hipotalamusa, u arkuatnom (infundibularnom) jedru i periventirkularnom regionu, dok su kod glodara više koncentrisana u rostralnom delu, u preoptičkom i anteriornom regionu.

GnRH neuroni imaju neuobičajenu morfologiju i u eminenciju medianu šalju dugačka vlakna koji imaju osobine i dendrita (trnolike izraštaje

sa mnoštvo ostvarenih sinapsi) i aksona (prostiranje akcionog potencijala). Stoga su označeni kao dendroni. Mogu da imaju dužinu od nekoliko milimetara i u blizini eminencije medijane granaju se u kratke aksone. Postojanje dendrona pokazano je kod pacova i miša, a pretpostavlja se da su prisutni i kod ostalih sisarskih vrsta. S obzirom na funkcionalne karakteristike dendrona moguće je postojanje sinaptičkih i drugih vidova kontakata koji regulišu lučenje GnRH neurona. Pokazano je postojanje bliskih kontakata sa drugim aksonima, ali bez klasičnih sinapsi. Primer za to su kontakti sa kispeptin neuronima (videti kasnije). U nivou eminencije medijane GnRH završeci su locirani nekoliko mikrona dalje od bazalne lamine i obuhvaćeni su tancitima što formira mehaničku barijeru između završetaka i portalnih kapilara. Stoga se smatra da GnRH ne dospeva direktno u portalni krvotok, što bi predstavljalo dodatni mehanizam za kontrolu nivoa ovog hormona u portalnoj cirkulaciji.

Električna aktivnost GnRH neurona je rezultat aktivnosti različitih jonskih kanala koji su prisutni u ćelijskoj membrani. Kanali koji izazivaju depolarizaciju i omogućavaju stvaranje akcionih potencijala su različiti  $\text{Ca}^{2+}$ - i  $\text{Na}^+$ -kanali. Prisutni su voltažno-zavisni  $\text{Ca}^{2+}$ -kanali, T-kanali koji se aktiviraju pri manjoj depolarizaciji i kratko vreme su aktivni (T potiče od engl. *transient*) i L-kanali koji se aktiviraju pri većoj depolarizaciji i duže ostaju otvoreni (L potiče od engl. *long lasting*). Od voltažno-zavisnih  $\text{Na}^+$ -kanala prisutni su kanali osetljivi na tetradotoksin (engl. *tetrodotoxin*, TTX). Postoje neselektivni katjonski kanali TRPC (engl. *transient receptor potential, C-cannonical*) koji omogućavaju ulazak jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , kao i katjonski kanali za  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  koji se aktiviraju cikličnim nukleotidima. Oni takođe mogu da doprinesu depolarizaciji membrane i okidanju akcionih potencijala. Od kanala za jone  $\text{K}^+$  prisutni su voltažno-zavisni A-kanali koji se brzo inaktiviraju. Takođe, prisutni su  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisni  $\text{K}^+$ -kanali sa velikom propustljivošću (engl. *big conductance calcium-dependent potassium channels*,  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) i sa malom propustljivošću (engl. *small conductance calcium-dependent potassium channels*,  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ). Oba ova kanala aktivira povećana koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  u citosolu. Takođe, visoko su eksprimirani  $\text{K}^+$ -kanali tzv. obrnuti ispravljači (engl. *inward rectifier*,  $\text{K}_{\text{ir}}$ ) i to kanali  $\text{K}_{\text{ATP}}$  i GIRK.  $\text{K}_{\text{ATP}}$  ima domen za vezivanje unutarćelijskog ATP pri čemu dolazi do zatvaranja pore kanala. Kanali GIRK se aktiviraju receptorima koji su povezani

sa G-proteinima. U ćelijskoj membrani GnRH neurona postoje i kanali za jone Cl<sup>-</sup> koji se aktiviraju neurotransmiterom gama-aminobuternom kiselinom (engl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA).

### 3.2.3. Embriogeneza GnRH neurona

GnRH neuroni nastaju od epitela nosne plakode i odatle migriraju do krajnjeg cilja – hipotalamusa. Diferencijacija GnRH neurona dešava se između 39. i 44. dana trudnoće kod žene, a oko 6. nedelje trudnoće započinje kretanje GnRH neurona zajedno sa olfaktornim i vomeronazalnim nervnim vlaknima kroz nosni odeljak. U toj fazi specifični faktori omogućavaju adheziju GnRH neurona za pomenute aksone što omogućava njihovo zajedničko kretanje. Aksoni prolaze kroz kribiformnu kost i ulaze u mozak u blizini olfaktornih bulbusa. Odatle nastavljaju da migriraju uz olfaktorna nervna vlakna do bazalnog dela prednjeg mozga, a zatim šalju svoje projekcije do eminencije medijane. Na kraju svog puta, GnRH neuroni se odvajaju od olfaktornih aksona i raspoređuju se na krajnje pozicije u hipotalamusu.

Ovaj proces migracije uključuje nekoliko stotina neurona po hemisferi kod miševa (odnosno nekoliko hiljada neurona kod primata i čoveka), a završava se u vreme rođenja jedinke kod svih do sada ispitanih vrsta uključujući i čoveka. Diferencijacija GnRH neurona, migracija do prednjeg mozga, lokalizacija u hipotalamusu i formiranje nastavaka do eminencije medijane, kao i njihova funkcija rezultat su dejstva velikog broja faktora: proteina citoskeleta, adhezionih molekula, faktora rasta i njihovih receptora, neurotransmitera i transkripcionih faktora. Neki od ovih učesnika deluju na više lokacija, a mogu da imaju različite efekte u zavisnosti od miljea u kome deluju.

Kretanje GnRH neurona zajedno sa olfaktornim i vomeronazalnim nervnim vlaknima podrazumeva prisustvo adhezionih molekula kao i odgovarajućih signalnih molekula i specifičnih receptora na GnRH neuronima, odnosno olfaktornim i vomeronazalnim nervnim vlaknima. Adhezioni molekuli koji omogućavaju vezivanje za olfaktorna vlakna su površinski ćelijski glikoproteini sa laktozaminom. Kalmanov sindrom koji predstavlja urođeni hipogonadotropni hipogonadizam praćen nedostatkom čula



mirisa (anosmia) jeste primer povezanosti migracije GnRH neurona sa normalnim razvojem olfaktornog sistema. Uzrok Kalmanovog sindroma je mutacija gena *KAL 1* (odnosno *ANOS 1*) koji je lociran na X hromozomu. Ovaj gen nosi informaciju za protein anosmin-1, vanćelijski glikoprotein matriksa koji ima adhezivne karakteristike. Smatra se da anosmin usmerava olfaktorne neurone do olfaktornih bulbusa. Histološka ispitivanja humanih fetusa koji su imali X-zavisani Kalmanov sindrom pokazala su da su GnRH neuroni i olfaktorni aksoni zaustavljeni ispred kribiformne kosti. Pokazano je da su sa Kalmanovim sindromom povezani i defekti nekih drugih gena kao što su geni za faktor rasta fibroblasta-8 i njegovog receptora, kao i za nervni faktor migracije. U okviru prednjeg mozga, za migraciju su od značaja neurotransmiteri glutamat i GABA.

Po pristizanju u hipotalamus, GnRH neuroni formiraju difuznu mrežu i već u 10. nedelji trudnoće u hipofizi fetusa prisutna je produkcija FSH i LH. Pretpostavlja se da se oko 15. nedelje trudnoće uspostavlja kontrola gonadotropne funkcije hipofize od strane hipotalamusa.

### 3.2.4. Kontrola aktivnosti GnRH neurona

Veliki broj istraživanja je ukazao na ključnu ulogu kisseptina u kontroli pulsativnog lučenja GnRH. Kisseptin je produkt gena *KISS1*, a njegov receptor je G-protein zavisni receptor *KISS1R* (označava se i kao *GPR54*). Kisseptin je 2001. godine bio identifikovan kao metastatin 1-54, a prvobitni naziv je dobio po svojoj ulozi u supresiji metastaza melanoma i raka dojke. Produkt gena *KISS1* sadrži 145 aminokiselina i odvajanjem lanca od 54 aminokiseline sa C-kraja koji poseduje amidnu-grupu nastaje kisseptin. Fragmentacijom se mogu dobiti i kraći biološki aktivni peptidi, kao što su kisseptin-10 i kisseptin-14, ali se postavlja pitanje u kojoj meri se to dešava *in vivo*. Receptor za kisseptin, *KISS1R*, otkriven je 1999, a 2003. na osnovu studija mutacije u genu *KISS1R* utvrđeno je da sistem kisseptin-*KISS1R* ima značajnu ulogu u nastanku puberteta. GnRH neuroni imaju u ćeljskoj membrani *KISS1R* i pretpostavlja se da kisseptin deluje direktno na GnRH neurone povećavajući oslobađanje GnRH.

Vezivanje kisseptina za *KISS1R* dovodi do aktivacije  $G_{q/11}$  što aktivira membransku fosfolipazu C (engl. *phospholipase C*, PLC) koja katališe hidrolizu

zu fosfatidilinozitol-4,5-bifosfata (engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP<sub>2</sub>) na inozitol-trifosfat (engl. *inositol trisphosphate*, IP<sub>3</sub>) i diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> stimuliše mobilizaciju Ca<sup>2+</sup> iz endoplazmatičnog retikuluma. Za pulsativno lučenje GnRH, neophodni su i joni Ca<sup>2+</sup> iz vanćelijskog prostora. Naime, uklanjanje Ca<sup>2+</sup> iz medijuma u eksperimentima *in vitro*, kao i blokada voltažno-zavisnih Na<sup>+</sup>-kanala osetljivih na TTX i voltažno-zavisnih L-Ca<sup>2+</sup>-kanala sprečava egzocitozu GnRH. To ukazuje da je ulazak Ca<sup>2+</sup> u ćeliju neophodan da, uz sadejstvo sa oslobođenim jonima Ca<sup>2+</sup> iz endoplazmatičnog retikuluma, obezbedi egzocitozu GnRH. Ovaj proces se naziva egzocitoza regulisana kalcijumom. Dosadašnji publikovani rezultati ukazuju da kispeptin izaziva aktivaciju neselektivnih katjonskih kanala TRPC i inhibiciju K<sup>+</sup>-kanala K<sub>ir</sub> što vodi produženoj depolarizaciji membrane i povećanom okidanju akcionih potencijala. Pokazano je da primena blokatora PLC gasi efekat kispeptina, ali za sada nema jednoznačnog odgovora o tome na koji način se menja aktivnost navedenih jonskih kanala, odnosno koji su elementi aktiviranog signalnog puta za to odgovorni.

U ćelijskoj membrani GnRH neurona nalaze se receptori za neurotransmitere čija aktivacija dovodi do povećanja unutarćelijske koncentracije kalcijuma, kao što su norepinefrin (aktivira α1-adrenergički receptor) i endotelin (aktivira receptor za endotelin, ET<sub>A</sub>). Glutamat je ekscitatorna aminokiselina i preko receptora N-metil-D-aspartat (NMDA), koji je jonski kanal za natrijum i kalcijum, stimuliše lučenje GnRH. Na membrani GT1 neurona (imortalizovana ćelijska linija dobijena iz tumora koji luče GnRH) prisutni su β1-adrenergički receptori i D1-dopaminergički receptori čija aktivacija preko adenilil ciklaze (AC) stimuliše lučenje GnRH. Endogeni opiodi ispoljavaju direktan inhibitoryni efekat na aktivnost GnRH neurona, smanjujući njihov odgovor na stimulatorne neurotransmitere. GT1 ćelije poseduju i receptore sa aktivnošću tirozin kinaze kao što su receptori za faktore rasta slične insulinu (engl. *insulin-like growth factor*), IGF-1 i IGF-2, epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF), insulin, faktor rasta fibroblasta, kao i citokinski receptor za prolaktin. IGF-1 i insulin regulišu preživljavanje, migraciju i povezivanje GnRH neurona. Pokazano je da aktivacija svih ovih receptora nije neophodna za pulsativno lučenje GnRH. Naime pulsativno lučenje GnRH je očuvano u kulturi GT1 ćelija, ili fetalnih GnRH neurona, u odsustvu drugih neurona u kulturi.

Na membrani GnRH neurona se nalaze receptori za neurotransmiter GABA, receptori GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>B</sub>. GABA<sub>A</sub> je jonski kanal za Cl<sup>-</sup> i njegovom aktivacijom dolazi uglavnom do hiperpolarizacije membrane i inhibicije nervne aktivnosti. Međutim, u embrionalnom i neonatalnom dobu, kao i kod adultnih neurona, aktivacija ovog kanala može da dovede do depolarizacije membrane. Naime, GABA<sub>A</sub> je jonski kanal za Cl<sup>-</sup> sa propustljivošću u oba smera što zavisi od unutarćelijske koncentracije Cl<sup>-</sup>, odnosno ravnotežnog potencijala za Cl<sup>-</sup> u odnosu na vrednost membranskog potencijala. U GnRH neuronima pojedinih vrsta prisutni su receptori GABA<sub>B</sub>. Ovi receptori pripadaju grupi receptora spregnutih sa G proteinom. Njihova stimulacija aktivira G<sub>i/o</sub> protein, što rezultira inhibicijom spontane električne aktivnosti usled aktivnosti K<sup>+</sup>-kanala GIRK.

Postoji bliska fizička i funkcionalna veza između GnRH neurona i glija ćelija (astrocita i tanicita), između samih GnRH neurona kao i između glija ćelija, GnRH nervnih završetaka i endotelnih ćelija na nivou eminencije medijane. Glija ćelije su posebno prisutne između presinaptičkih završetaka interneurona i postsinaptičkih membrana GnRH neurona, što ukazuje da glija ćelije možda kontrolišu/modulišu funkcionalnost GnRH neuronske mreže. Pokazano je da transformišući faktor rasta alfa (engl. *transforming growth factor alpha*, TGFα) i neuroregulin (NRG) koji pripada familiji EGF imaju značajnu ulogu u komunikaciji između glija ćelija i GnRH neurona. Astrociti proizvode faktore iz familije EGF, TGFα i NRG koji u autokrinom maniru ostvaruju dejstvo na nivou samih astrocita aktivacijom odgovarajućih receptora, erbB1/erbB2 i erbB4/erbB2. Glutamat olakšava signalizaciju TGFα-NRG u astrocitima, jer aktivira odgovarajuće metaloproteinaze koje obezbeđuju procesovanje TGFα i NRG. Autokrini regulacija aktivnosti astrocita dovodi zatim do sinteze i oslobađanja prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), koji deluje na GnRH neurone i stimuliše lučenje GnRH. Takođe, GnRH neuroni ostvaruju kontakte sa tanicitima. Tela tanicita formiraju pod i bočne zidove treće moždane komore, a izraštaji tanicita koji se nalaze u podu treće moždane komore pružaju nastavak u spoljnu zonu eminencije medijane gde se nalaze i nervni završeci GnRH neurona koji bivaju obuhvaćeni terminalnim stopalom tanicita. Taniciti proizvode PGE<sub>2</sub> koji indukuje njihovu retrakciju, a to omogućava usmeravanje završetaka GnRH neurona u perikapilarni prostor i olakšava oslobađanje GnRH.

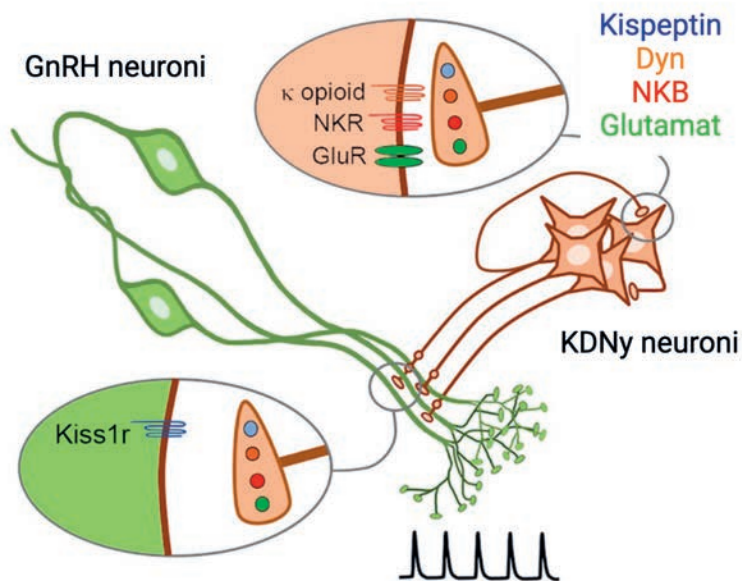
### 3.2.5. Pulsativno lučenje GnRH

GnRH neuroni formiraju složenu funkcionalnu mrežu zajedno sa populacijama drugih neurona. Pulsativno lučenje GnRH u portalni krvotok je karakteristika više sisarskih vrsta uključujući čoveka. Po oslobađanju u krv, GnRH se brzo razgrađuje ( $t_{1/2}$  je 2–4 minuta) tako da su gonadotropne ćelije izložene isprekidanom delovanju GnRH. Više istraživanja pokazuje da je pulsativno lučenje svojstvo samih GnRH neurona koji poseduju receptore za GnRH (engl. *GnRH receptor*, GnRHR) u ćelijskoj membrani. Postojanje GnRHR je potvrđeno i u imortalizovanim mišjim GT1 ćelijama i primena GnRH menja frekvencu i amplitudu pulsativnog lučenja GnRH. GT1 neuroni u odsustvu drugih tipova ćelija pokazuju pulsativno lučenje, što ukazuje na autokrinu kontrolu ovih neurona od strane GnRH. Pulsativno lučenje pokazano je, takođe, u kulturi fetalnih GnRH neurona pacova, ovce i majmuna. Ovi podaci ukazuju da bi mreža GnRH neurona mogla da predstavlja generator pulseva GnRH (GnRH pulsni generator).

Ako je pulsativno lučenje unutrašnje svojstvo samih GnRH neurona, ukidanje aferentnih ulaza ne bi trebalo da ukine pulsativnost. Međutim, kod miševa sa utišanim genom za receptor KISS1R dolazi do smanjenja lučenja LH i poremećaja reproduktivnog ciklusa. Studije na ljudima takođe pokazuju da kisleptin ima važnu ulogu u stvaranju pulseva GnRH, a primena kisleptina u folikularnoj fazi povećava frekvencu oslobađanja LH. Od otkrića uloge kisleptina u kontroli reprodukcije, rezultati velikog broja istraživanja ukazuju na suštinsku ulogu kisleptina u pulsativnom lučenju GnRH.

Kisleptin neuroni prisutni su u arkuatnom jedru kod više životinjskih vrsta i čoveka, kao i u anteroventralnom periventralnom jedru kod glodara. Ispitivanja na nekoliko vrsta (glodari, ovce, koze) pokazala su da kisleptin neuroni u arkuatnom jedru pored kisleptina, eksprimiraju i neurokinin B (NKB) i dinorfin (engl. *dynorphin*, Dyn). Stoga se ovi neuroni označavaju kao KD<sub>Ny</sub> neuroni. Ovi neuroni ostvaruju međusobne sinaptičke kontakte i poseduju receptore za NKB i receptore za Dyn (Slika 3.4). Dok NKB stimuliše, Dyn inhibiše oslobađanje kisleptina iz ovih neurona što omogućava pulsativno lučenje kisleptina, odnosno isprekidanu stimulaciju GnRH neurona. Pretpostavljeni molekularni mehanizam koji

dovodi do aktivacije pulsativnog lučenja GnRH predviđa vezivanje NKB za svoj receptor na membrani KDNy neurona što će dovesti do aktivacije katjonskih kanala i ulaska kalcijuma u ćeliju putem voltažno zavisnih kalcijumovih kanala. U isto vreme NKB aktivira PLC što će povećati nivo  $IP_3$  i omogućiti oslobađanje kalcijuma iz endoplazmatskog retikuluma.



**Slika 3.4.** Šematski prikaz KDNy neuronske mreže i kontakta sa dendronima GnRH neurona. U gornjem delu prikazano je prisustvo receptora za Dyn ( $\kappa$  opioid), NKB (NKR) i glutamat (GluR) na membrani KDNy neurona što omogućava isprekidano oslobađanje kispeptina u nivou dendrona GnRH neurona. U donjem umetku je prikazano da su u membrani dendrona prisutni samo receptori za kispeptin (Kiss1r).

Preuzeto iz Liu X, Yeo SH, James H, McQuillan, Herde MK, Hessler S, Cheong I, Porteous R, Herbison AE (2021) Highly redundant neuropeptide volume co-transmission underlying episodic activation of the GnRH neuron dendron. *eLife* 2021;10:e62455. DOI: <https://doi.org/10.7554> i modifikovano u Biorenderu.

Ova dva događaja koja se javljaju pod dejstvom NKB će dovesti od ritmičnih oscilacija u nivou kalcijuma u ćeliji i pulsativnog oslobađanja kispeptina iz KDNy neurona. Pokazano je da se u KDNy neuronima koji se nalaze u arkuatnom jedru javljaju ritmične oscilacije u unutarćelijskom

nivou kalcijuma koje odgovaraju pulsativnom lučenju LH. U ovoj pulsativnoj regulaciji važnu ulogu ima i Dyn koji vezivanjem za opioidni receptor kappa aktivira inhibitorni protein G koji koči aktivnost KNDy neurona. Smatra se da je za pulsativno lučenje kisperptina iz KNDy neurona kao i pulsativno oslobađanje GnRH odgovorna promena balansa između stimulatornog (NKB) i inhibitornog (Dyn) signala kao što su promena odnosa nivoa NKB i Dyn ili različito vreme oslobađanja ova dva peptida u sinapsi.

Veći broj istraživačkih grupa ukazuje da bi mreža KNDy neurona mogla da bude osnovna komponenta generatora pulseva GnRH. Podaci o prisustvu KNDy neurona u hipotalamusu ljudi su limitirani, i baziraju se na histohemijskim ispitivanjima tokom autopsije. Pokazano je ko-ekspimiranje kisperptina i NKB. Međutim, veći broj autora smatra da kisperptin, NKB i Dyn, bez obzira da li se ekspimiraju u istom ili različitim neuronima, imaju suštinsku ulogu u aktivnosti GnRH pulsog generatora i kod ljudi.

Ispitivanja na različitim sisarskim vrstama su pokazala da se električna aktivnost javlja u blizini arkuatnog jedra unutar mediobazalnog hipotalamusa i da je praćena karakterističnim obrascem: pulsativnim lučenjem GnRH. Ovaj obrazac lučenja se dešava kod svih sisarskih vrsta na kojima su vršena ispitivanja. Postoji sinhronizacija između nivoa GnRH u portalnom krvotoku i nivoa LH u perifernoj cirkulaciji, i oba hormona se karakterišu pulsativnim lučenjem.

Pulsativno lučenje GnRH je neophodno za normalan odgovor gonadotropnih ćelija. Kontinuirana infuzija GnRH životinjama sa lezijama hipotalamusa koje blokiraju endogeno lučenje GnRH prouzrokuje početno povećano lučenje LH, ali tokom produžene primene, lučenje LH postepeno opada do bazalnog nivoa, jer gonadotropne ćelije gube sposobnost da odgovore na GnRH nakon dugotrajne stimulacije. Dolazi do smanjenja osetljivosti GnRH (desenzitizacije). Takav odgovor gonadotropnih ćelija se koristi u kontroli ovulacije. Kontinuirani tretman analogima GnRH blokira ovulaciju, dok periodična primena imitira pulsativni obrazac lučenja GnRH da bi se postigla stimulirana ovulacija.

### 3.2.6. Regulacija lučenja GnRH povratnom spregom

Podaci kod glodara, ovce i majmuna ukazuju da se povratna sprega steroidnih hormona na lučenje GnRH odvija posredstvom kisseptin (KDNy) neurona. Pretpostavlja se da kisseptin neuroni poseduju receptore za steroidne hormone i da steroidni hormoni regulišu aktivnost ovih neurona. Takođe je pokazano da estradiol i testosteron, delujući na kisseptin neurone koji se nalaze u arkuatnom jedru i anteroventralnom periventralnom jedru (kod glodara), kontrolišu lučenje GnRH. Kod ženki majmuna prepisivanje kisseptina značajno je smanjeno delovanjem estradiola, ili i estradiola zajedno sa progesteronom. Kisseptin neuroni koji se nalaze u arkuatnom jedru uključeni su u negativnu povratnu spregu, a oni locirani u anteroventralnom periventralnom jedru u pozitivnu povratnu spregu steroidnih hormona na aktivnost GnRH neurona kod glodara. Ekspimiranje gena *Kiss1* u anteroventralnom periventralnom jedru je pozitivno regulisano polnim hormonima, a gonadektomija izaziva dramatično smanjenje broju neurona u kojima se ekspimiraju gen *Kiss1* kod glodara. Testosteron uspostavlja normalan nivo iRNK prepisane sa gena *Kiss1* u anteroventralnom periventralnom jedru gonadektomisanih životinja, a taj efekat zavisi od aromatizacije testosterona u estradiol i aktivacije estrogenih receptora alfa (engl. *estrogen receptor alpha*, ER $\alpha$ ).

Dat je i pretpostavljeni mehanizam koji objašnjava suprotan efekat polnih steroida, prvenstveno estradiola, na prepisivanje iRNK za *Kiss1* u arkuatnom i anteroventralnom periventralnom jedru. Pretpostavka je da u arkuatnom jedru, po vezivanju estradiola za ER $\alpha$ , dolazi do interakcije ER $\alpha$  sa, za sada nepoznatim, transkripcionim faktorima (korepresorima) koji koče ekspimiranje kisseptina. Drugi pretpostavljeni mehanizam delovanje estradiola podrazumeva epigenetske promene u promotorskom regionu gena za kisseptin. Vezivanje estradiola za ER $\alpha$  dovodi do deacetilacije histona H3 u promotorskom regionu gena za kisseptin što će sprečiti formiranje hromatinske petlje između promotorskog regiona gena za kisseptin i intergenskog regiona lokusa *Kiss1* i time onemogućiti prepisivanje gena za kisseptin.

U neuronima lociranim u anteroventralnom periventralnom jedru se odigravaju suprotni procesi od onih opisanih u arkuatnom jedru. Vezni-

vanje estradiola za ER $\alpha$  regrutuje transkripcijske faktore (koaktivatore) koji će omogućiti ekspimiranje gena za kisseptin. Takođe je pokazano da vezivanje estradiola za svoj receptor dovodi do acetilacije histona H3 na promotorskom regionu gena za kisseptin, formiranje petlje između promotorskog i intergenskog regiona što će dovesti do stimulacije prepisivanja gena za kisseptin. Može se reći da intergenski region lokusa *Kiss1* omogućava pozitivan efekat estradiola na prepisivanje gena *Kiss1* u neuronima lociranim u anteroventralnom periventralnom jedru. Aktivacija neurona u anteroventralnom periventralnom jedru neophodna je za ovulatorni talas LH kod glodara koje je rezultat pozitivne povratne sprege estradiola na nivou hipotalamusa. Literaturni podaci sugerišu da su kisseptin neuroni neophodna komponenta neuroendokrine kontrole reprodukcije i da su uključeni u regulaciju lučenja gonadotropina povratnom spregom steroidnih hormona. Pored toga, postoje podaci o mogućoj ulozi kisseptin neurona kao posrednika u efektima metaboličkog statusa organizma na reprodukciju. Poznato je da gladovanje i restrikcija hrane dovode do smanjenja reproduktivne funkcije, smanjenja nivoa gonadotropnih hormona, anovulatornog ciklusa. Literaturni podaci pokazuju da gladovanje smanjuje ekspimiranje gena *Kiss1*.

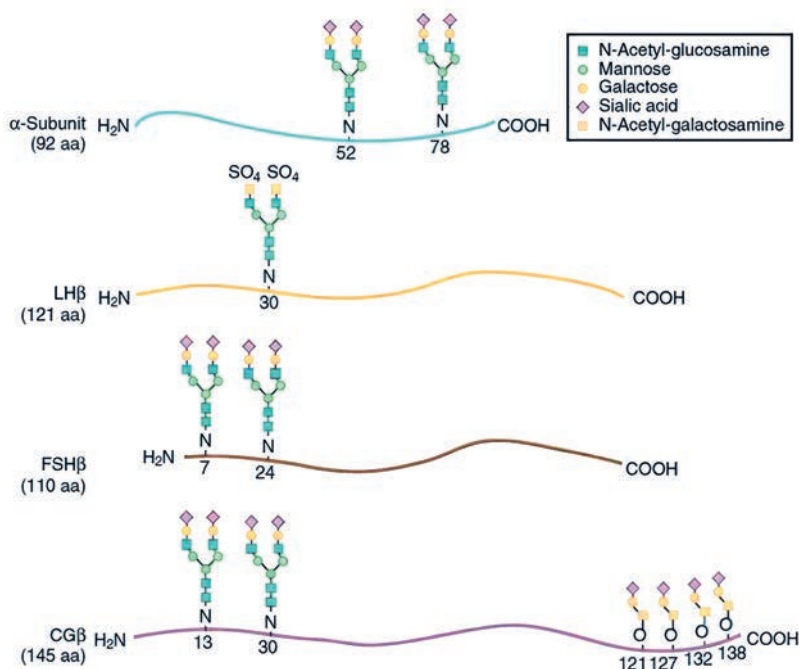
Za sada ostaje nejasno da li populacija kisseptin neurona prisutna u preoptičkom delu hipotalamusa kod majmuna i ljudi ima sličnu ulogu kao populacija ovih neurona u anteroventralnom periventralnom jedru kod glodara. Pokazano je da ženke majmuna zadržavaju sposobnost preovulatornog oslobađanja LH posle deaferentacije mediobazalnog hipotalamusa, odnosno isključenja uticaja preoptičkog dela hipotalamusa na oslobađanje GnRH.



### 3.3. GONADOTROPNI HORMONI

#### 3.3.1. Struktura gonadotropnih hormona

Gonadotropni hormoni, LH i FSH, kao i tireostimulirajući hormon i humani horion gonadotropin (engl. *human chorionic gonadotropin*, hCG), su glikoproteini sastavljeni od dve subjedinice međusobno povezane disulfidnim vezama.  $\alpha$ -subjedinica je ista za sva četiri hormona, dok  $\beta$ -subjedinica nosi imunološku i biološku aktivnost. Posttranslacijskom modifikacijom dolazi do glikozilacije obe subjedinice, pa tako  $\alpha$ -subjedinica i  $\beta$ -subjedinice dobijaju jednu ili dve oligosaharidne komponente povezane N-glikozidnom vezom, dok  $\beta$ -subjedinica hCG ima, pored N- i O-glikozidnom vezom povezane oligosaharidne komponente (Slika 3.5).



**Slika 3.5.** Glikozilacija subjedinica gonadotropnih hormona.

Slika je preuzeta iz rada Smitz J i Platteau P (2020) Influence of human chorionic gonadotrophin during ovarian stimulation: an overview. *Reprod Biol Endocrinol.* 6,18(1):80 na osnovu Creative Commons Attribution 4.0 International licence.

Detalji u tekstu.

Izoforme FSH mogu da sadrže 3 ili 4, a LH 2 ili 3 oligosaharidna ostatka (N-glikana) u jednoj molekuli. Taj broj zavisi od prisustva N-glikana na  $\beta$ -subjedinici, jer su na  $\alpha$ -subjedinici prisutna oba oligosaharidna ostatka.  $\beta$ -subjedinica FSH ima dva potencijalna mesta za glikozilaciju, ostatke asparagina u polipeptidnom lancu, Asn7 i Asn24, dok  $\beta$ -subjedinica LH ima jedno mesto, Asn30.

Postoji više izoformi ova dva hormona koji se razlikuju po sastavu oligosaharidne komponente na  $\alpha$ - i  $\beta$ -subjedinici. Krajnji ostaci monosaharida na N-glikanu mogu da budu sijalinska kiselina (engl. *sialic acid*, SA) ili N-acetilgalaktozamin-sulfat (engl. *N-acetylgalactosamine sulfat*, SU) i njihovo prisustvo određuje ukupno naelektrisanje molekule. Kod molekula FSH dominantne su izoforme sa ostacima SA, dok izoforme LH više karakteriše prisustvo SU, mada je zastupljena i SA. Izoforme hormona sa ostacima SA imaju duži poluživot u odnosu na izoforme sa ostacima SU. Naime, SU prepoznaje specifičan heparinski receptor i dolazi do brzog uklanjanja ovih izoformi iz cirkulacije. Lučenje FSH i LH je pulsativne prirode i sastav izoformi se menja posle svakog pulsa, te stoga koncentracija hormona u serumu zavisi od stope lučenja i brzine kojom se pojedine izoforme uklanjaju iz cirkulacije.

Nedavno je dokazano i postojanje nekoliko glikoziliranih formi hCG koje mogu da pokazuju različite fiziološke uloge. Na početku trudnoće javlja se hiperglikozilirana forma hCG poreklom iz trofoblasta, koja se kasnije zamenjuje hipoglikoziliranim hCG. Pretpostavlja se da hiperglikozilirana forma hCG ima ulogu u invaziji trofoblasta i angiogenezi u prve dve nedelje trudnoće. Takođe, hiperglikozilirana forma hCG je pronađena kod pacijenata sa određenim tumorima. Na osnovu ovih zapažanja može se pretpostaviti da je primarna funkcija hiperglikoziliranog hCG da aktivira proliferativne signale vezane za angiogenezu i invaziju trofoblasta u prvim nedeljama trudnoće kao i proliferativne signale koji omogućavaju rast tumora, a manje u sintezi progesterona. Sa druge strane hipoglikozilirani hCG ima kraći životni vek, ali je potentniji u aktivaciji receptora za LH.

Gonadotropni hormoni imaju po jedan gen za zajedničku  $\alpha$ -subjedinicu i po jedan gen za odgovarajuće  $\beta$ -subjedinice. Medjutim,  $\beta$ -subjedinica hCG koja se eksprimira kod primata i konja, kodira se sa šest gena (*CGB*, *CGB1*, *CGB2*, *CGB5*, *CGB7*, *CGB8*). Svih šest  $\beta$ -subjedinica hCG daju transkripte

različite dužine. Pokazano je da se geni *CGB5* i *CGB8* eksprimiraju u posteljici, dok su transkripti gena *CGB1* i *CGB2* nađeni u posteljici, hipofizi i testisu, ali njihovi proteini nisu identifikovani. S obzirom na postojanje introna u genu za FSH i dužine poli-A repa pri obradi iRNK, postoje četiri transkripta gena za FSH.

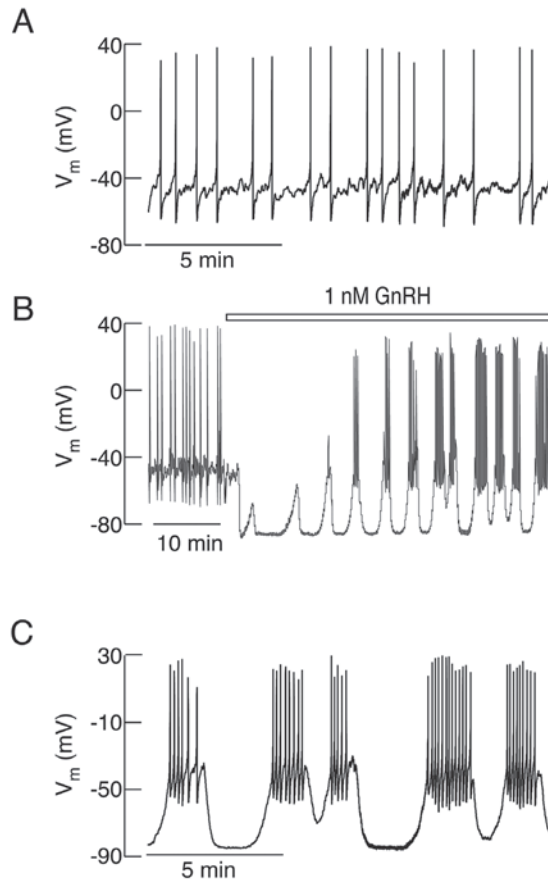
### 3.3.2. Gonadotropne ćelije

#### 3.3.2.1. Spontana električna aktivnost

Gonadotropne ćelije, kao i ostale ćelije hipofize, eksprimiraju veliki broj različitih jonskih kanala za jone kalcijuma, natrijuma i kalijuma čija aktivnost omogućava nastanak akcionih potencijala. Membranski potencijal izolovanih ćelija *in vitro* nije stabilan nego oscilira oko membranskog potencijala mirovanja koji iznosi između -60 mV i -50 mV. Ove oscilacije predstavljaju balans između aktivnosti kanala koji izazivaju depolarizaciju, odnosno hiperpolarizaciju membrane. Smatra se da su za depolarizaciju odgovorni Na<sup>+</sup>-kanali koji su konstitutivno aktivni. Naime, ukoliko se joni Na<sup>+</sup> u medijumu koji okružuje ćelije zamene nekim drugim katjonima, koji ne prolaze membranu, membrana se hiperpolarise i približava ravnotežnom potencijalu za K<sup>+</sup>. U uslovima kada membranski potencijal oscilira između -60 mV i -50 mV, većina voltažno-zavisnih Na<sup>+</sup>-kanala osjetljivih na TTX je inaktivisana, pa u slučaju spontane aktivnosti glavnu ulogu u depolarizaciji membrane tokom akcionog potencijala imaju voltažno-zavisni T- i L- Ca<sup>2+</sup>-kanali.

Ne ispoljavaju sve ćelije spontanu aktivnost, a frekvencija okidanja akcionih potencijala varira od ćelije do ćelije. U *in vitro* uslovima, akcioni potencijali se ne javljaju samo na izolovanim ćelijama nego i na preparatima *in situ*. Obrazac električne aktivnosti varira zavisno od tipa ćelije. Oko 50% gonadotropnih ćelija izolovanih iz hipofize ženke pacova pokazuju spontanu aktivnost. Kod gonadotropnih ćelija pacova, javljaju se pojedinačni akcioni potencijali relativno velike amplitude, veće od 60 mV (Slika. 3.6). Spontana električna aktivnost u gonadotropnim ćelijama nije praćena oscilacijama unutarćelijske koncentracije Ca<sup>2+</sup>, kao što se to dešava kod laktotropa. Tokom pojedinačnih akcionih potencijala, volta-

žno-zavisni  $\text{Ca}^{2+}$ -kanali su otvoreni kratko vreme, te stoga dolazi samo do lokalnog povećanja unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u blizini jonskih kanala. Oscilacije unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , javljaju se kao odgovor na dejstvo GnRH.



**Slika 3.6.** Spontana električna aktivnost gonadotropnih ćelija (A) i aktivnost izazvana primenom GnRH (B i C). Vremenska skala pod C je uvećana u odnosu na B, kako bi se jasnije uočila serija akcionih potencijala koji slede nakon hiperpolarizacije membrane. Preuzeto iz rada Stojilkovic SS (2006) Pituitary cell type-specific electrical activity, calcium signaling and secretion. Biol Res 39: 403–423, sa dozvolom autora.

Nakon stimulacije gonadotropnih ćelija sa GnRH dolazi do značajnih promena u električnoj aktivnosti pojedinačnih gonadotropnih ćelija u *in*

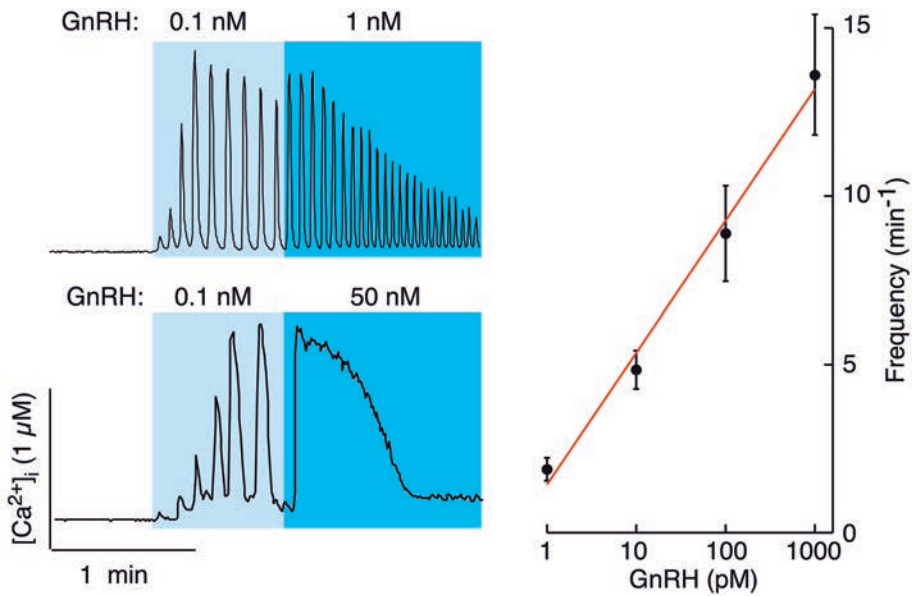
*vitro* uslovima. To uključuje prolazni prekid spontane aktivnosti, nakon čega se javljaju kompleksne oscilacije membranskog potencijala po tipu “*bursting*” aktivnosti (Slika. 3.6C). Svakom ciklusu oscilacija prethodi brza hiperpolarizacija. Naime, povećanje koncentracije jona  $\text{Ca}^{2+}$  u citosolu aktivira kanale  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ , što rezultira izlaznom strujom  $\text{K}^+$  koja hiperpolariše membranu i prekida nastajanje akcionih potencijala, a time i ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  iz vanćelijskog prostora. Smanjenje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  zatvara kanale  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ , što omogućava ponovnu depolarizaciju membrane i nastanak serije akcionih potencijala, odnosno periodične oscilacije električne aktivnosti.

### 3.3.2.2. Kalcijum kao signalni glasnik

Gonadotropni hormoni oslobađaju se iz gonadotropnih ćelija procesom koji je označen kao egzocitoza regulisana kalcijumom. GnRH treba da izazove povećanje unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , kako bi ostvario svoje dejstvo. Vezivanje GnRH za GnRHR u ćelijskoj membrani aktivira PLC koja vrši hidrolizu  $\text{PIP}_2$  i sintezu  $\text{IP}_3$  i DAG. DAG aktivira PKC koja se nalazi vezana sa unutrašnje strane ćelijske membrane.  $\text{IP}_3$  vezivanjem za receptor u membrani endoplazmatičnog retikuluma, omogućava izlazak  $\text{Ca}^{2+}$  iz ove organele. Povećanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  je takođe neophodno za aktivaciju PKC koja katalizuje fosforilaciju različitih proteina.

Aktivacija GnRHR izaziva, zavisno od koncentracije GnRH, različite tipove odgovora u pogledu promene koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  koji se oslobađa iz endoplazmatičnog retikuluma. Pokazano je da primena različitih koncentracija GnRH izaziva kod individualnih gonadotropnih ćelija gajenih u medijumu bez  $\text{Ca}^{2+}$  različite odgovore od oscilatornih do bifazičnih (Slika. 3.7). To ukazuje da su promene u koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  rezultat oslobađanja iz endoplazmatičnog retikuluma. Izlazak  $\text{Ca}^{2+}$  iz ove organele rezultira oscilacijama njegove koncentracije u citosolu zbog negativne povratne sprege preko koje  $\text{Ca}^{2+}$  utiče na osetljivost receptora za  $\text{IP}_3$ . Pri niskim koncentracijama  $\text{Ca}^{2+}$  povećava se osetljivost receptora za  $\text{IP}_3$  dok se pri većim koncentracijama osetljivost smanjuje, pa se smanjuje izlazak  $\text{Ca}^{2+}$  što dovodi do oscilacija u njegovoj koncentraciji u citosolu. U membrani endoplazmatičnog retikuluma postoji pumpa za  $\text{Ca}^{2+}$  koja vraća ove katione u lumen endoplazmatičnog retikuluma što takođe doprinosi poja-

vi oscilacija. Mitohondrije takođe imaju kapacitet da akumuliraju  $\text{Ca}^{2+}$  i oslobađanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz mitohondrija u uslovima niske koncentracije unutar ćelije pomaže njegovom zadržavanju u ćeliji i postepenom vraćanju u endoplazmatski retikulum.



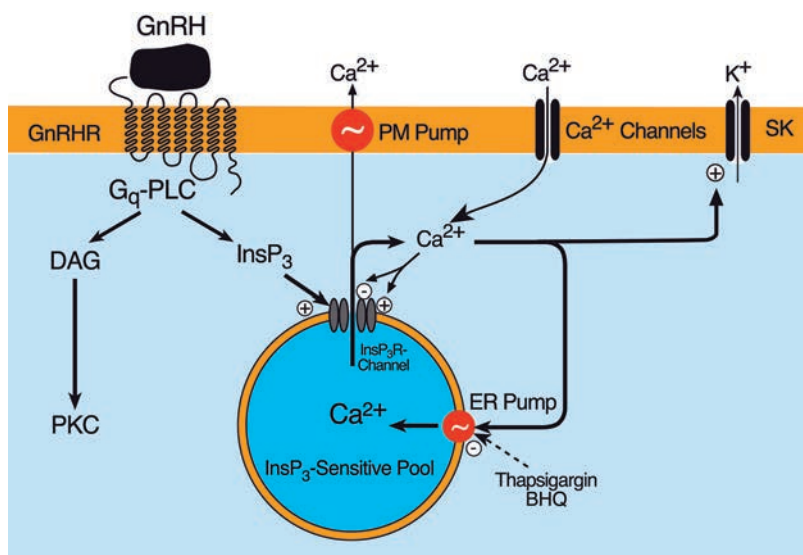
**Slika. 3.7.** Oscilacije  $\text{Ca}^{2+}$  u individualnim gonadotropnim ćelijama izazvane primenom različitih koncentracija GnRH. Pri koncentraciji GnRH od 1 nM povećava se frekvencija oscilacija, a ne menja se obrazac signala (levo gore). Primena koncentracije GnRH od 50 nM menja oscilatorni tip signala u bifazni (levo dole). Desno je prikazana linearna zavisnost frekvence oscilacija jona  $\text{Ca}^{2+}$  od koncentracije GnRH.

Uz dozvolu autora, slika je nastala modifikacijom slika iz radova Stojilkovic i sar. (1992) Calcium signaling and secretory responses in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:453–467, i Tomic i sar., (1994).

Developmental and physiological aspects of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 135:1762–1771.

Ukoliko se izolovane gonadotropne ćelije stimulišu sa GnRH duže od 10–15 minuta u medijumu bez  $\text{Ca}^{2+}$ , dolazi do gašenja oscilacija  $\text{Ca}^{2+}$  što ukazuje da, u fiziološkim uslovima, promene u koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  u ćeliji ne zavise samo od aktivnosti receptora za  $\text{IP}_3$  i pumpe za  $\text{Ca}^{2+}$  u endopla-

zmatičnom retikulumu nego da je neophodan ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  u ćeliju iz vanćelijskog prostora kroz voltažno-zavisne T- i L-kanale. Uloga ovih kanala se može pokazati u eksperimentima sa nametnutom voltažom. Ukoliko se membrana drži u hiperpolarisanom stanju, ovi kanali se neće aktivirati i gonadotropne ćelije će se ponašati pri stimulaciji sa GnRH kao da se drže u medijumu bez  $\text{Ca}^{2+}$ . Naime, javljaju se oscilacije u koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  u citosolu pri čemu amplituda oscilacija postepeno opada. To ukazuje da vezivanje  $\text{IP}_3$  za receptor u endoplazmatičnom retikulumu pod uplivom GnRH omogućava započinjanje oscilacija, a da je za održavanje oscilacija tokom produžene stimulacije neophodna aktivnost voltažno-zavisnih kalcijumovih T- i L-kanala. U ćelijskoj membrani postoji pumpa za  $\text{Ca}^{2+}$  koja izbacuje jone  $\text{Ca}^{2+}$  iz ćelije, što takođe doprinosi oscilacijama u koncentraciji ovog jona (Slika. 3.8).



**Slika 3.8.** Šema modela dva mehanizma koji izazivaju oscilacije  $\text{Ca}^{2+}$  u gonadotropnim ćelijama. Početak oscilacija zavisi od aktivacije receptora za  $\text{IP}_3$  u membrani endoplazmatičnog retikuluma, dok je ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  iz vanćelijskog prostora kroz voltažno-zavisne  $\text{Ca}^{2+}$ -kanale neophodno za održavanje oscilacija. GnRHR – receptor za GnRH; Gq-PLC – G-protein-fosfolipaza C;  $\text{InsP}_3$  – inozitol trifosfat; DAG – diacil glicerol; PKC – protein kinaza C;  $\text{InsP}_3\text{R}$  – receptor za  $\text{IP}_3$ ; Thapsigargin BHQ – blokator pumpe u endoplazmatičnom retikulumu (ER). Preuzeto iz rada Stojilkovic SS i Tomic M (1996). GnRH-induced calcium and current oscillations in gonadotrophs. Trends Endocrinol Metab 7: 379–384, sa dozvolom autora.

Joni  $\text{Ca}^{2+}$  su primarni unutarćelijski signalni molekul koji obezbeđuje lučenje hormona iz endokrinih ćelija. Ovaj proces se označava kao egzocitoza regulisana kalcijumom i posredovana je kompleksnom mašinerijom proteina koja obezbeđuje prenos sekretne vezikule do ćelijske membrane i spajanje membrane vezikula sa ćelijskom membranom. Smatra se da lučenje LH predstavlja egzocitozu regulisanu jonima  $\text{Ca}^{2+}$  koja zavisi od frekvence oslobađanja GnRH, dok se FSH oslobađa najvećim delom konstitutivnom egzocitozom koja ne zavisi od GnRH. Kako GnRH reguliše i sintezu  $\beta$ -subjedinice LH i FSH, može da se pretpostavi da se u slučaju sinteze LH, formirane molekule pakuju u sekretne vezikule, koje su dostupne za akutno oslobađanje u odgovor na dejstvo GnRH odgovarajuće frekvence. S druge strane, pod uplivom, ne samo GnRH, već u drugih faktora koji regulišu eksprimiranje  $\beta$ -subjedinice FSH kao što su aktivin, inhibin i folistatin dolazi do pakovanja formiranih molekula FSH u sekretne vezikule koje se odmah oslobađaju egzocitozom. Drugim rečima dinamika oslobađanja FSH je usklađena sa stvaranjem  $\beta$ -subjedinice FSH. Takođe ova različita dinamika oslobađanja LH i FSH bi značila da se ova dva hormona pakuju u posebne sekretne vezikule.

### 3.3.3. Regulacija sinteze FSH i LH

Gonadotropne ćelije stvaraju LH i FSH, pod uplivom GnRH. Međutim, postavlja se pitanje kako jedna ćelija može da sintetiše više LH od FSH, i obrnuto, što je posebno izraženo kod ženskog pola. Rezultati studija ukazuju da je frekvencija oslobađanja GnRH jedan od faktora koji određuje koji će se gonadotropni hormon više stvarati. Brzina prepisivanja  $\alpha$ -subjedinice srazmerna je frekvenciji oslobađanja GnRH. Pri srednjoj frekvenciji pulseva GnRH više se prepisuje  $\beta$ -subjedinica LH, a pri niskoj frekvenciji pulseva GnRH intenzivnije se prepisuje  $\beta$ -subjedinica FSH. Drugim rečima, niska frekvencija pulseva GnRH favorizuje sintezu FSH, dok povećanje frekvencije pulseva GnRH favorizuje sintezu LH.

Kao što je već rečeno, GnRH se vezuje za GnRHR koji zatim preko  $G_{q/11}$  aktivira PLC dovodeći do formiranja  $\text{IP}_3$  i oslobađanja  $\text{Ca}^{2+}$  iz endoplazmatičnog retikuluma. Takođe, aktivacija PLC dovodi i do formiranja DAG i aktivacije PKC što će dalje dovesti do aktivacije većeg broja signal-



nih puteva kao što su vanćelijskim signalima regulisana kinaza 1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK1/2), Jun N-terminalna kinaza (engl. *Jun N-terminal kinase*, JNK) i mitogenim stimulusima aktivirana kinaza p38 (engl. *mitogen-activated protein kinase p38*, MAPKp38). Aktivacija ERK1/2 od strane PKC se odvija putem signalizacije Src-Ras, dok se fosforilacija JNK i MAPKp38 odvija putem signalizacije Src i Rac1/Cdc42. GnRH će takođe dovesti i do aktivacije  $G_s$  koji će aktivirati AC što dovodi do povećanja unutarćelijskog sekundarnog glasnika cikličnog adenosin-monofosfata (engl. *cyclic adenosin monophosphate*, cAMP) koji, takođe, može da aktivira ERK1/2.

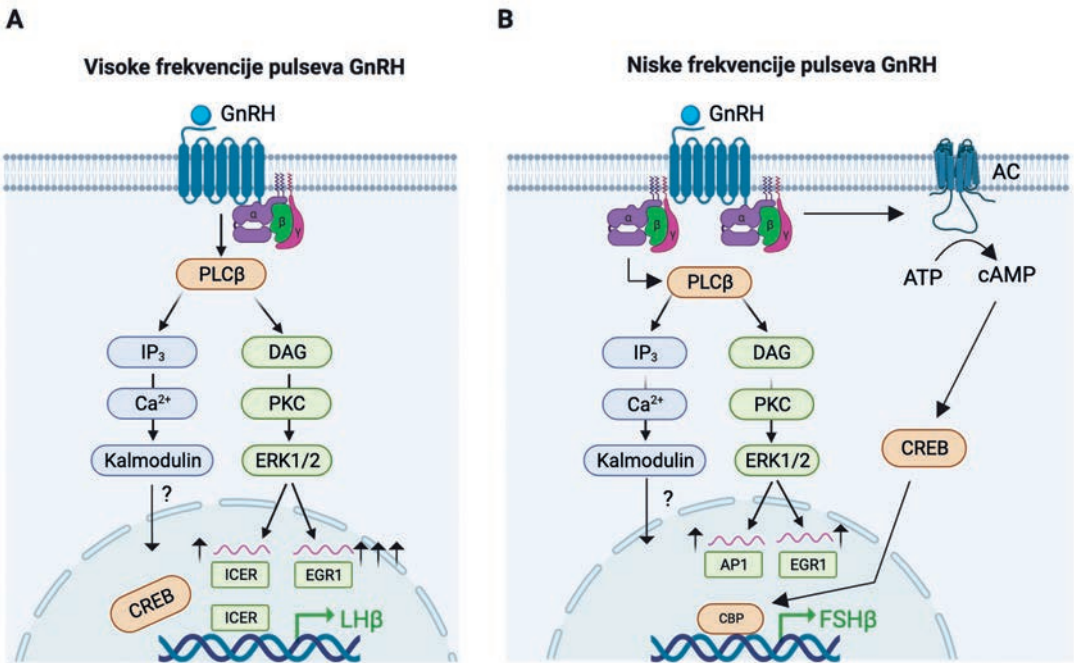
Iako je GnRH spregnut sa  $G_{q/11}$  i  $G_s$  pokazano je da različite frekvencije pulseva GnRH mogu da različito aktiviraju ova dva G proteina. Visoke frekvencije pulseva GnRH aktiviraju  $G_{q/11}$ , dok niske frekvencije pulseva GnRH mogu da aktiviraju oba proteina  $G_{q/11}$  i  $G_s$ . Pošto niske frekvencije pulseva GnRH favorizuju sintezu  $\beta$ -subjedince FSH za pretpostaviti je da aktivacija  $G_s$ , ima značajnu ulogu u eksprimiranju FSH. Pored uticaja frekvencije pulseva GnRH na aktivaciju G proteina, istraživanja na primarnoj kulturi i modelu mišjih gonadotropnih ćelija L $\beta$ T2 su pokazala da aktivacija ERK1/2 takođe zavisi od frekvencije pulseva GnRH. ERK1/2 se fosforiliše i pri visokim i niskim frekvencijama pulseva GnRH, ali je pri visokim frekvencijama pulseva GnRH, aktivacija ERK1/2 prolazna, dok se pri niskim frekvencijama pulseva fosforilacija ove kinaze javlja brže i traje znatno duže. Takođe, količina fosforilisane forme ERK1/2 u jedru je veća pri niskim u odnosu na visoke frekvencije pulseva GnRH. Ove razlike u aktivaciji ERK1/2 mogu da objasne razlike u eksprimiranju gena za  $\beta$ -subjedince FSH i LH nakon primene različitih frekvencija pulseva GnRH.

Značajnu ulogu u regulaciji prepisivanja  $\beta$ -subjedince LH ima transkripcioni faktor EGR1 (engl. *early growth response-1 protein*, EGR1) koji je zavisen od kinaze ERK1/2. Pokazano je da je prepisivanje EGR1 veće pri visokim frekvencijama pulseva, kada se javlja prolazna aktivacija ERK1/2 i kada je manje količina fosforilisane forme ERK1/2 u jedru. Smatra se da kinetika fosforilacije ERK1/2, a ne jačina signala ove kinaze utiče na stimulaciju prepisivanja EGR1. U promotorskom regionu  $\beta$ -subjedince LH se nalaze dva vezna mesta za EGR1. Pored veznih mesta za EGR1, u promotorskom regionu  $\beta$ -subjedince LH se nalaze vezna mesta za steroidogeni

faktor 1 (engl. *steroidogenic factor 1*, SF-1) i PITX1 (engl. *paired like homeo-domain 1*). Interakcija EGR1, SF1 i PITX1 dovodi do povećanja ekspimiranja  $\beta$ -subjedinice LH nakon stimulacije sa GnRH. Eksperimenti na L $\beta$ T2 ćelijama su pokazali da visoke frekvence pulseva, koje dovode do povećanja prepisivanja  $\beta$ -subjedinice LH, stimulišu i prepisivanje EGR1. Potvrdu uloge EGR1 u kontroli transkripcije  $\beta$ -subjedinice LH nakon stimulacije ćelije visokom frekvencijom pulseva GnRH pokazana je u eksperimentima sa proteinom represorom koji blokira prepisivanje iRNK za EGR1. Ovaj represor se stimuliše niskim frekvencijama pulseva GnRH i sprečava prepisivanje iRNK za EGR1, a time remeti prepisivanje gena koji kodira  $\beta$ -subjedinicu LH. Model koji opisuje prepisivanje  $\beta$ -subjedinice LH nakon pulsativnog delovanja GnRH podrazumeva da se pri visokim frekvencijama pulseva GnRH aktivira PKC koja će dovesti do prolazne aktivacije ERK1/2, zatim do povećanog ekspimiranja EGR1 i stimulacije prepisivanja iRNK za  $\beta$ -subjedinicu LH (Slika 3.9A.). Pri niskim frekvencijama pulseva GnRH takođe dolazi do aktivacije PKC-ERK1/2, ali prepisivanje EGR1 nije dovoljno da pokrene transkripciju  $\beta$ -subjedinice LH.

Prepisivanje  $\beta$ -subjedinice FSH nakon stimulacije ćelija sa niskim frekvencijama GnRH pulseva stoji pod kontrolom signalizacije  $G_s$ -AC-cAMP-PKA koja će aktivirati transkripcioni faktor CREB fosforilacijom na serinu 133. Promotorski region  $\beta$ -subjedinice FSH sadrži delimično vezno mesto koje odgovara na cAMP (engl. *cAMP response element*, CRE/AP1) i za koje će se vezati transkripcioni faktor CREB i zajedno sa koaktivatorim povećati prepisivanje  $\beta$ -subjedinice FSH. U regulaciji prepisivanja  $\beta$ -subjedinice FSH nakon stimulacije sa GnRH značajnu ulogu ima i ICER (engl. *inducible cAMP early repressor*). Ovaj faktor se stimuliše visokim frekvencijama pulseva GnRH i kompetituje sa CREB za vezno mesto CRE na promotoru  $\beta$ -subjedinice FSH kočeci njeno prepisivanje. Pored CREB i ICER, pokazano je da familija transkripcionih faktora AP1 (engl. *activator protein 1*, AP1) koju čine cFOS, cJUN i ATF mogu da stimulišu prepisivanje  $\beta$ -subjedinice FSH. Nivo ovih transkripcionih faktora u ćeliji se povećavaju delovanjem kinaza kao što su ERK1/2, JNK ili MAPKp38. Međutim, tačan mehanizam putem kojeg članovi familije AP1 regulišu transkripciju gena za  $\beta$ -subjedinicu FSH nije u potpunosti razjašnjen. Naime, neki od članova AP1 familije se aktiviraju i pri niskim i pri visokim frekvencijama pulseva

GnRH što je u suprotnosti sa načinom stimulacije gena za  $\beta$ -subjedinicu FSH od strane GnRH. Model koji opisuje prepisivanje  $\beta$ -subjedinice FSH nakon pulsativnog delovanja GnRH podrazumeva da pri niskim frekvencijama pulseva GnRH dolazi do aktivacije puta cAMP-PKA i fosforilacije CREB koji će pokrenuti transkripciju  $\beta$ -subjedinice FSH. Pri niskim frekvencija GnRH dolazi i do aktivacije ERK1/2 koja može da doprinese prepisivanju  $\beta$ -subjedinice FSH preko stimulacije prepisivanje familije proteina AP1 (Slika 3.9B.). Takođe, pri niskim frekvencija pulseva GnRH ne dolazi do povećanog prepisivanja ICER te izostaje kompeticija ovog faktora sa CREB za vezno mesto na promotoru  $\beta$ -subjedinice FSH što će omogućiti prepisivanje  $\beta$ -subjedinice FSH.



**Slika 3.9.** Signalni mehanizmi uključeni u eksprimiranje  $\beta$ -subjedinice LH i  $\beta$ -subjedinice FSH nakon visokih (A) i niskih (B) frekvencija pulseva GnRH. Detalji u tekstu. (Slika je napravljena u Biorenderu)

Pored kontrole regulacije aktivnosti gonadotropnih ćelija od strane hipotalamusa, pokazana je i parakrina/autokrina kontrola ovih ćelija. Ova

kontrola je posebno usmerena na produkciju FSH, odnosno eksprimiranju gena za  $\beta$ -subjedinicu FSH i može da predstavlja jedan od faktora koji dovodi do različite produkcije LH i FSH. Naime, stvaranje LH zavisi dominantno od GnRH, dok su u regulaciju sinteze FSH, pored GnRH, uključeni i drugi faktori, kao što su aktivin, inhibin i folistatin. Inhibin i folistatin su negativni regulatori transkripcije gena za  $\beta$ -subjedinicu FSH, dok je aktivin pozitivni regulator.

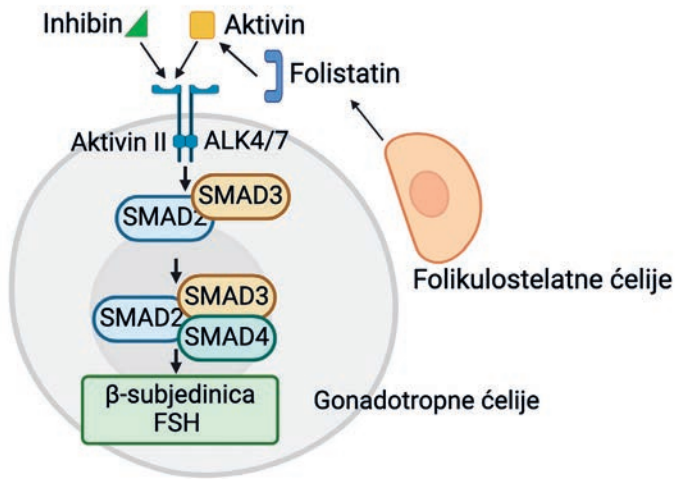
Aktivin je homodimer sastavljen od dve  $\beta$ -subjedinice i može da budu homo- ili heterodimer sastavljen od subjedinica  $\beta A$  i  $\beta B$ . Kombinacijom ove dve subjedinice nastaju aktivin A, aktivin B, ili aktivin AB. Sintetiše se u gonadotropnim ćelijama i deluje kao autokrini/parakrini faktor. Aktivin se vezuje za receptor za aktivin tip II (engl. *activin receptor type 2*, ActRII) što dovodi do odgovarajuće konformacione promene na aktivinu i omogućava njegovo vezivanje za receptor tip I koji je sličan kinazi 4 (engl. *activin like kinase 4*, ALK4). Heteromerni kompleks aktivira unutarćelijski signalni put u gonadotropnim ćelijama koji kontroliše transkripciju gena za  $\beta$ -subjedinicu FSH. Ovaj unutarćelijski signalni put je predstavljen proteinima SMAD koji se aktiviraju preko receptora za članove familije TGF $\beta$ . Ovi receptori imaju unutarćelijski domen sa aktivnošću serin/treonin kinaze. Fosforilacija proteina SMAD od strane receptora dovodi do njihove aktivacije i vezivanje za druge proteine SMAD formirajući trimerni transkripcioni kompleks koji se premešta u jedro gde reguliše prepisivanje određenih gena uključujući i gen za  $\beta$ -subjedinicu FSH (Slika 3.10). Pored povećanja eksprimiranja gena za  $\beta$ -subjedinicu FSH, aktivin povećava eksprimiranje gena za GnRH, te na taj način potencira delovanje GnRH na stvaranje FSH.

Inhibin je heterodimerni protein koji se sintetiše u gonadama, mozgu, hipofizi i nadbubrežnim žlezdama. Inhibin poreklom iz gonada je primarni inhibitor sinteze i lučenje FSH. Inhibin se sastoji od  $\beta$ -subjedinice i  $\alpha$ -subjedinice koje su povezane disulfidnim mostom. Postoje dve izoforme  $\beta$ -subjedinice  $\beta A$  i  $\beta B$  i svaka može da se poveže sa  $\alpha$ -subjedinicom dajući inhibin A ili inhibin B. Član je superfamilije TGF $\beta$  u koju spadaju i aktivini. Inhibin deluje kao specifični antagonist stimulatornom delovanju aktivina. Uklanjanjem stimulatornog dejstva aktivina na transkripciju gena za  $\beta$ -subjedinicu FSH, inhibin sprečava produkciju FSH. Mehanizam putem

kojeg inhibin koči dejstvo aktivina do sada nije u potpunosti razjašnjen. Po jednoj pretpostavci produkcija inhibina u pojedinim tkivima prevazilazi produkciju aktivina. Ova se javlja zbog toga što aktivin i inhibin dele  $\beta$ -subjedinicu i u slučaju da je produkcija  $\alpha$ -subjedinice veća, doći će do stvaranja veće količine inhibina, a manje aktivina. Pošto inhibin i aktivin kompetituju za isti receptor, a zbog veće količine nastalog inhibina, ovaj molekul će se vezivati za receptor i tako blokirati dejstvo aktivina. Međutim, ovakvo antagonističko delovanje inhibina na aktivin ne može uvek da objasni sve efekte inhibina koji se javljaju u tkivima.

Istraživanja su pokazala da postoje molekuli koji specifično vezuju inhibin. Jedan od takvih molekula je betaglikan, proteoglikan vezan za membranu, za koji je pokazano da vezuje  $\alpha$ -subjedinicu inhibina sa velikim afinitetom, a ne vezuje aktivin. Betaglikan deluje kao ko-receptor odnosno po vezivanju  $\alpha$ -subjedinice inhibina on dalje pospešuje vezivanje  $\beta$ -subjedinice inhibina za receptor za aktivin i time sprečava delovanje aktivina.

Međutim postoje i pretpostavke da inhibin i njegov receptor aktiviraju inhibitorne proteine I-SMAD. To je grupa inhibitornih proteina koji stupaju u interakciju sa receptorom tip I i drugim proteinima SMAD kočeći unutarćelijsku signalizaciju koja se aktivira članovima familije TGF $\beta$ . I folistatin koji se sintetiše u folikulostelatnim i gonadotropnim ćelijama adenohipofize pod dejstvom GnRH, blokira dejstvo aktivina. Vezuje se ireverzibilno za aktivno mesto preko koga se aktivin vezuje za svoj receptor ActRII na membrani gonadotropnih ćelija. To ukazuje da je pri većim koncentracijama folistatina manja koncentracija slobodnih molekula aktivina koje mogu da se vežu za svoje receptore na gonadotropnim ćelijama, što negativno deluje na sintezu FSH.



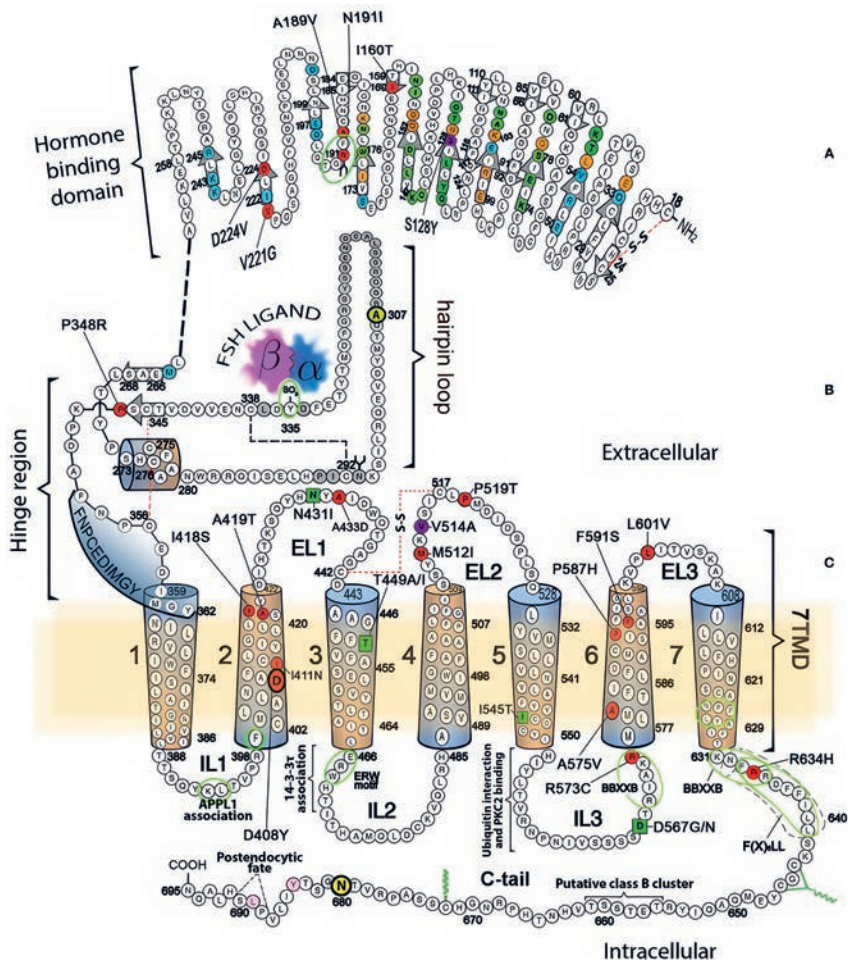
**Slika 3.10.** Mehanizam dejstva aktivina i folistatina. Detalji u tekstu. (Slika je napravljena u Biorenderu)

U regulaciju produkcije gonadotropnih hormona je uključen i polipeptid koji aktivira adenilil ciklazu (engl. *pituitary adenylil-cyclase-activating polypeptide*, PACAP). Glavni izvor ovog neuropeptida su gonadotropne i folikulostelatne ćelije. Prvobitno je izolovan kao faktor iz hipotalamusa koji stimuliše signalni put cAMP-PKA u adenohipofizi. Ranije studije su ukazale da PACAP, samostalno ili zajedno sa GnRH, stimuliše oslobađanje LH i FSH. PACAP, takođe, utiče na eksprimiranje GnRH, dok GnRH utiče na povećanje transkripta za PACAP. Međutim, neke kasnije studije su pokazale da PACAP ne utiče na LH, dok su druge pokazale da primena PACAP u treću moždanu komoru dovodi do inhibicije LH talasa. Ovi i drugi kontradiktorni rezultati o efektima PACAP na gonadotropnu osovину ukazuju na vrlo kompleksnu prirodu interakcije između PACAP, gonadotropina i GnRH koja tek treba da bude razjašnjena.

### 3.3.4. Receptori za FSH i LH

Receptori za FSH i LH predstavljaju membranske receptore i nose zajednički naziv gonadotropni receptori. FSH ostvaruje efekte vezujući se za receptor za FSH (eng. *follicle-stimulating hormone receptor*, FSHR) dok

se LH vezuje za receptor za LH (eng. *luteinizing hormone receptor*, LHR). LHR ima 675 aminokiselina, dok FSHR sadrži 678 aminokiselina. Ova dva receptora zajedno sa receptorom za TSH čine familiju glikoproteinskih hormonskih receptora. Na slici 3.11. je prikazana struktura FSHR.



**Slika 3.11.** Struktura receptora za FSH. Detalji u tekstu.

(preuzeto iz Structure-Function Relationships of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:707, na osnovu licence Creative Commons Attribution 4.0 International)

Na LHR i FSHR se razlikuju tri domena. Vanćelijski, N-domen koji je velik, sadrži oko 300 aminokiselina i učestvuje u procesu prepoznavanja

i vezivanja hormona. FSHR i LHR dele 46% sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci ovog domena. Sam vanćelijski domen se može podeliti na tri regiona, N-region koji sadrži dve grupe cisteina, zatim region koji je bogat leucinom (engl. *leucine-rich repeats*, LRRs) i koji je odgovoran za prepoznavanje hormona odnosno formiranje elektrostatičke interakcije između para hormon-receptor i C-terminalnog regiona koji se još naziva i region šarke. Šarka se nalazi na spoju između vanćelijskog i transmembranskog domena i takođe učestvuje u vezivanju hormona za receptor, ali ne putem jonskih interakcija već preko ostataka tirozina. Drugi domen receptora je transmembranski i sastoji se od sedam segmenata koji prolaze kroz membranu i povezani su sa tri vanćelijske petlje. FSHR and LHR dele 72% sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci ovog domena. Treći, unutarćelijski domen, ima tri unutarćelijske petlje i jedan C-terminalni rep i pokazuje vrlo malo sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci između ova dva receptora (oko 27%).

Receptori za LH i FSH pripadaju porodici receptora spregnutih sa G proteinom (eng. *G protein-coupled receptors*, GPCRs). GPCR porodica je podeljena na nekoliko subporodica, a gonadotropni receptori pripadaju subporodici receptora koji su slični receptorima za rodopsin i beta-adrenergičkim receptorima. Kao što je rečeno, aktiviraju se vezivanjem hormona za vezno mesto koje se nalazi u LRR regionu vanćelijskog domena. Nakon kontakta sa LRR regionom, dolazi do konformacione promene receptora što će dalje omogućiti kontakt  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice hormona sa tirozinskim ostatkom na regionu šarke i stabilizaciju receptora. Ove konformacione promene su neophodne za dalju aktivaciju G proteina. Po aktivaciji dolazi do povezivanja receptora sa G proteinom koji sadrži vezan guanozin-difosfat (GDP). Receptor predstavlja faktor za razmenu nukleotida odnosno omogućava zamenu GDP za guanozin-trifosfat (engl. *guanosine-5'-triphosphate*, GTP) na G proteinu. Ova zamena će dovesti do odvajanja subjedinice  $\beta$  i  $\gamma$  od  $\alpha$  koja za sebe ima vezan GTP.

Geni za humane gonadotropne receptore se nalaze na hromozomu 2 i razdvojeni su sa oko 200 kb. Gen za LHR je 70 kb dugačak i sadrži 11 exona, dok je gen za FSHR dugačak oko 190 kb sa 10 egzona. Interesantno je zapažanje o postojanju više transkripata za FSHR i LHR. Studije na miševima i ovcama su identifikovale četiri transkripta za FSHR koji for-



miraju funkcionalne proteine sa različitim signalnim osobinama. Takođe su identifikovani različiti transkripti za LHR. Važnu ulogu u regulaciji funkcije gonadotropnih receptora ima proces posttranslacione modifikacije. Tokom ovog procesa dolazi do procesovanja nezrelog receptora i nakon toga, njegovog transporta na površinu ćelijske membrane. Poremećaj u post-translacionoj modifikaciji može da bude osnov za nastanak nekih oboljena kod čoveka. Tako, mutacije na genu za LHR koje onemogućavaju pravilno formiranje ovog receptora rezultiraju njegovim zadržavanjem unutar ćelije što dovodi do nastanka rezistencije na gonadotropne hormone. Pored transporta do ćelijske membrane, internalizacija gonadotropnih receptora takođe predstavlja jedan od mehanizama koji određuje njihovu funkciju.

Internalizacija gonadotropnih receptora je posredovana specifičnom familijom proteina koji se nazivaju arestini. Ova familija proteina je odgovorna ne samo za internalizaciju receptora već i za aktivaciju većeg broja signalnih puteva u ćeliji. Sudbina internalizovanog receptora nakon vezivanja hormona je veoma značajna jer određuje odgovor ćelije na hormone. Internalizovan receptor može da bude degradiran što je posredovano lizozomima ili recikliran što je posredovano endozomima. U početku internalizacije gonadotropni receptor se nalazi u ranom endozomu koji u sebi ima protein RAB (eng. *Ras-related protein*) 5. Zamena RAB5 sa RAB7, usmerava kompleks u put degradacije. Put degradacije je veoma značajan za proces desenzitizacije ćelija koji se javlja nakon stimulacije hormonom. Sa druge strane, recikliranje je povezano sa proteinom RAB4 i tzv. PDZ ligand-vezujućim domenom na LHR i FSHR. Većina kompleksa FSH-FSHR kod sisara se reciklira i vraća na ćelijsku membranu, a samo mali deo ide u put degradacije te ne dolazi do smanjenja odgovora ćelija na delovanje FSH. Međutim u slučaju LHR situacija je nešto drugačija. Kod čoveka, vezivanje agoniste za LHR usmerava kompleksa agonist-LHR na put recikliranja, te se većina receptora ponovo pojavljuje na površini ćelije i ne dolazi do smanjenja osetljivosti na hormon. Sa druge strane, kod pacova, vezivanje agoniste za LHR usmerava ovaj kompleks na put degradacije što će dovesti do smanjenja broja receptora na površini ćelije i time osetljivosti ćelija na hormon.

### 3.4. PROLAKTIN

Prolaktin (PRL) se produkuje u laktotropnim ćelijama adenohipofize. Kod odrasle zdrave osobe laktotropi predstavljaju 15–25% od ukupnog broja ćelija. Broj laktotropa je sličan kod oba pola i ne menja se značajno tokom godina. Tokom trudnoće i laktacije dolazi do hiperplazije laktotropa, a do involucije dolazi nekoliko meseci nakon porođaja. Pored produkcije u adenohipofizi, PRL se kod ljudi produkuje u velikom broju tkiva, gde deluje kao autokrini/parakrini faktor. PRL ima raznovrsne funkcije, pa pored efekta na reprodukciju, utiče i na metabolizam, osmoregulaciju, imunoregulaciju i ponašanje. Sa nekoliko izuzetaka, kod životinja je produkcija PRL ograničena na hipofizu, gde PRL funkcioniše kao klasičan hormon koji se oslobađa u cirkulaciju.

Tokom embrionalnog razvoja laktotropi i somatotropi se razvijaju od jedne zajedničke progenitor ćelije koja se naziva mamosomatotrop, pod uticajem većeg broja transkripcionih faktora. Međutim, postoji i mogućnost da se pojedini laktotropi razvijaju od posebne ćelijske linije. U formiranju laktotropa značajnu ulogu ima transkripcioni faktor POU1F1 (engl. *POU class 1 homeobox 1*). POU1F1 reguliše diferencijaciju prekursorskih ćelija u laktotrope, somatotrope i tireotrope i eksprimiranje gena koji kodiraju PRL, GH i  $\beta$ -subjedinicu tireostimulišućeg hormona (TSH). Važnost POU1F1 je prikazana kod pacijenta koji imaju mutaciju ovog transkripcionog faktora i kod kojih nedostaju laktotropi, somatotropi i tireotropi, a time i hormoni koje produkuju ove ćelije. Transkripciju POU1F1 kontroliše transkripcioni faktor PROP1 (engl. *PROP paired-like homeobox 1*), a njegova mutacija dovodi do istog fiziološkog efekta, kako i mutacija POU1F1.

PRL pripada velikoj proteinskoj porodici koja obuhvata hormon rasta (engl. *growth hormone*, GH), laktogen posteljice (horionski somatotropin) i proteine slične PRL. Gen za PRL sadrži pet egzona i četiri velika introna, a kao rezultat prepisivanja se formira prekursor PRL od 227 aminokiselina. Nakon uklanjanja signalne sekvence nastaje zreli protein PRL od 199 aminokiselina sa tri disulfidne veze i mestima za glikozilaciju i fosforilaciju. Molekuli PRL mogu da se polimerizuju tokom postranslacione modifikacije. Većina PRL u cirkulaciji se nalazi kako monomer, 10% nalazi kao dimer, a oko 5% PRL je u formi multimernog proteina.

Polimerizovan PRL se naziva makroPRL. Pacijenti koji imaju povećan bazalni nivo PRL i normalnu reprodukciju imaju povećan procenat polimerizovanog PRL. Polimerizovana forma PRL ima manju biološku aktivnost, međutim povećani nivoi PRL u cirkulaciji kompenzuju umanjenu biološku funkciju tako da ne dolazi do poremećaja u reproduktivnoj funkciji.

Laktotropi se karakterišu spontanom električnom aktivnošću sa salvama akcionih potencijala ("bursting" tip aktivnosti) koje traju nekoliko sekundi. Membranski potencijal retko pređe -10 mV tokom platoa 'bursting' aktivnosti, a akcioni potencijali imaju malu amplitudu.

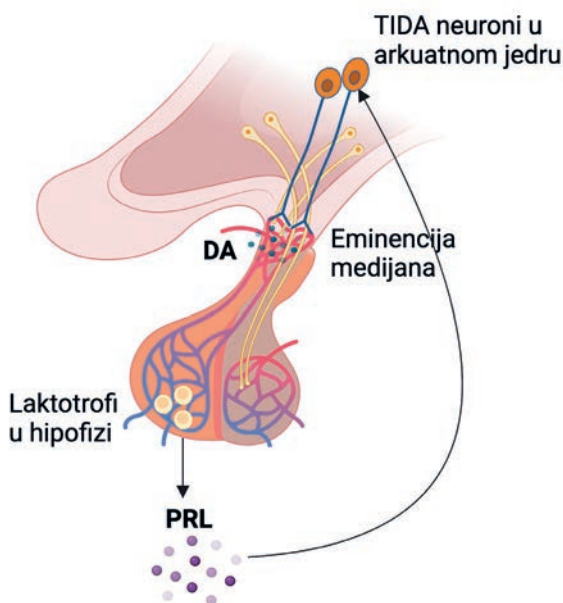
### 3.4.1. Regulacija lučenja prolaktina

PRL se luči epizodično. Postoji 13 do 14 pikova/dan kod mladih osoba koji traju oko 70 minuta, a nivo PRL dostiže 3–4 ng/ml. Između dva pika je interval oko 95 minuta. Na početku spavanja postoji porast PRL u trajanju od oko 90 minuta, a pulsevi PRL se povećavaju sa non-REM spavanjem, da bi nivo opao pre sledećeg perioda REM spavanja. Postoji povećanje nivoa PRL u plazmi 50–100% 30 minuta nakon obroka zbog aminokiselina koje nastaju hidrolizom proteinske komponente obroka. Fenilalanin, tirozin i glutaminska kiselina su najpotentniji stimulatori. Nivo PRL se menja i tokom odrastanja i starenja. Zbog estrogena majke, nivo PRL novorođenčeta je oko 10 puta veći, a spušta se postepeno na normalan nivo u trećem mesecu života. Umereno raste tokom puberteta i u adultnom dobu. Kod žena, PRL opada za 50% tokom 18 meseci nakon menopauze, dok je taj pad manji kod žena koje uzimaju hormonsku terapiju estrogenima. Sa druge strane, kod žena sa hiperprolaktinemijom, uzimanje estrogenih preparata ne izaziva promene nivoa PRL. Kod muškaraca nivo u starijem dobu je za oko 50% manji u odnosu na mlađe osobe.

Tokom menstrualnog ciklusa, neke, ali ne sve osobe, imaju povećan nivo PRL u sredini ciklusa i niži nivo u folikulskoj fazi. Tokom trudnoće, bazalni nivo PRL se postepeno povećava tokom trudnoće. To se tumači stimulišućim delovanjem estrogena i pojavom hiperplazije laktotropa. Pred porođaj, PRL može da poraste i više od 10 puta i do 200 ng/ml seruma. Tokom laktacije, u prvih 4–6 nedelja PRL je povišen, i svako sisanje

izaziva refleksno i brzo oslobađanje PRL. U sledećih 4–12 nedelja, bazalni nivo PRL se postepeno smanjuje do normale.

PRL je hormon stresa, odnosno faktori koji izazivaju stres dovode do povećanog lučenja PRL u cirkulaciji, zajedno sa adrenokortikotropnim hormonom i GH. Lučenja PRL koje se indukuje stresom može da dostigne 2–3 puta veće vrednosti u odnosu na bazalne nivoe u roku od nekoliko minuta po dejstvu faktora stresa. Akutno vežbanje takođe indukuje prolazno povećanje lučenja PRL.



**Slika 3.12.** TIDA put i kratka negativna povratna sprega prolaktina na nivou hipotalamusa. Detalji u tekstu (Slika je napravljena u Biorenderu)

Lučenje PRL i proliferacija laktotropa je pod kontrolom dopamina (DA) iz hipotalamusa (Slika 3.12). DA se smatra inhibirajućim faktorom jer sprečava oslobađanje PRL iz laktotropa. Koncentracija DA u portalnoj cirkulaciji je 5–10 puta veća u odnosu na perifernu cirkulaciju. Akutna stimulacija lučenja PRL je obično praćena smanjenjem nivoa DA u portalnoj cirkulaciji. U najvećem broju fizioloških uslova koji izazivaju povećanje nivoa PRL u serumu, kao što je na primer laktacija, najverovatnije dolazi

do smanjenja oslobađanja DA iz hipotalamusa uz istovremeno povećanje nekog stimulativnog faktora (tzv. PRL oslobađajući faktori). Aksoni odgovorni za oslobađanje DA potiču iz neurona koji se nalaze u arkuatnom jedru i inferiornom delu ventromedijalnog jedra. Ovi neuroni se još nazivaju tuberoinfundibularni dopaminski (engl. *tuberoinfundibular dopamine*, TIDA) neuroni. Aksoni ovih neurona se završavaju u eminenciji medijani i formiraju put koji je označen kao tuberoinfundibularni dopaminergički put. DA koji se sintetise u TIDA neuronima, luči se na nivou eminencije medijane i putem portalnog krvotoka dolazi do laktotropa. Na membrani laktotropa, DA se vezuje za receptore D2. Receptori D2 su spregnuti sa  $G_{i\alpha}$  proteinom koji inhibiše AC i tako blokira aktivnost signalnog puta cAMP-PKA, koji pokazuje pozitivan efekat na oslobađanje PRL. Veza između DA iz TIDA neurona i PRL se odvija pomoću negativne povratne sprege koje se naziva prolaktinska kratka negativna povratna sprega. Naime, PRL deluje na TIDA neurone na kojima se nalaze receptori za PRL što dovodi do povećanog oslobađanja DA. Oslobođeni DA će ponovo delovati na laktotrope smanjujući oslobađanje PRL (Slika 3.12). Takođe, PRL može da ispoljava i autokrinu ili parakrinu aktivnost na same laktotropne ćelije. Miševi kojima je uklonjen receptor za PRL na laktotropima su pokazivali normalni nivo PRL, ali tonična inhibicija od strane DA je bila znatno povećana u odnosu na kontrolnu grupu.

Eksperimenti na miševima kod kojih je mutacijom utišan dopaminski D2 receptor, potvrđuju rezultate dobijene primenom farmakoloških supstanci ili lezijama odgovarajućih jedara hipotalamusa. Miševi sa nedostatkom DA ili njegovog receptora pokazuju hiperplaziju laktotropa sa prisutnim multifokalnim PRL tumorima i povećanim nivoima PRL u cirkulaciji. Kod ljudi, infuzija DA izaziva brzu blokadu bazalnog i stimulisanog lučenja PRL. S druge strane blokada dopaminergičkih D2 receptora različitim farmakološkim blokatorima izaziva povećanje PRL u serumu.

Pored inhibitornog uticaja DA, postoje i hormoni koji stimulišu oslobađanje PRL. Hormoni koji stimulatивно deluju na oslobađanje PRL (mogu se označiti uslovno kao PRL stimulišući hormoni ili faktori) su tireotropni-oslobađajući hormon (engl. *thyrotropin-releasing hormone*, TRH), vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), peptid histidin izoleucin (PHI-27), peptid histidin metionin (PHM-27), angiotenzin II, oksitocin, ATP, acetyl-

holin i serotonin. Takođe, estradiol ima stimulišuće dejstvo na lučenje PRL delujući direktno na nivou adenohipofize. TRH izaziva brzo oslobađanje PRL, a koncentracije koje izazivaju oslobađanje TSH kod ljudi izazivaju i oslobađanje PRL. S druge strane, stimulus sisanja izaziva povećanje oslobađanja PRL, ali nije praćeno povećanim lučenjem TSH. Miševi kod kojih je utišan gen za TRH imaju smanjen TSH, ali ne i PRL. Ti rezultati ukazuju da uloga TRH nije dominantna u odnosu na promene u nivou DA koje prate promene nivoa PRL. VIP se sintetiše u hipotalamusu (VIP-pozitivna tela neurona nalaze se u paraventrikularnom jedru), adenohipofizi, u digestivnom traktu, kao i različitim delovima mozga. Budući da se sintetiše u adenohipofizi, može da se posmatra kao parakrini faktor koji utiče na lučenje PRL. Primena antitela na VIP delimično blokira lučenje PRL tokom sisanja, kao i tokom stresa izazvanog etrom. U okviru prekursorske molekule za VIP (prepro-VIP) nalazi se i sekvenca za PHM-27, pa se smatra da se VIP i PHM-27 oslobađaju kao kotransmiteri. Peptid PHM-27 se samo u dve aminokiseline razlikuje od PHI-27 koji se takođe označava kao potencijalni stimulišući faktor u pogledu lučenja PRL. Serotonin i njegov prekursor, 5-hidroksitriptofan, izazivaju oslobađanje PRL ako se primene sistemski, ili u treću moždanu komoru. Korišćenjem blokatora serotonina pokazano je da ovaj faktor učestvuje jednim delom u oslobađanju PRL u različitim fiziološkim situacijama, na primer sisanje, a smatra se da učestvuje i u povećanju lučenja PRL tokom noći. Kod ljudi, infuzija serotonina izaziva brzo oslobađanje PRL.

Endogeni opiodi kod pacova mogu da dovedu do povećanog oslobađanja PRL. Pretpostavlja se da efekat nije direktan nego preko inhibicije metabolizma DA. Morfin i analozi morfina izazivaju akutno i hronično povećano oslobađanje PRL. Oksitocin može da stimuliše oslobađanje PRL. GnRH može da izazove oslobađanje PRL u nekim situacijama, na primer kod žena sa anoreksijom i anovulacijom. U postmenopauzi, GnRH takođe izaziva pozitivan odgovor PRL koji se pojačava ako žena uzima estrogenu terapiju.

### 3.4.2. Receptori za prolaktin

PRL se vezuje za receptor za PRL (engl. *prolactin receptor*, PRLR) koji se nalazi na ćelijskoj membrani. PRLR su članovi klase I citokinskih receptora koji su široko rasprostranjeni u organizmu i nalaze se u mlečnoj žlezdi, hipofizi, jetri, bubrežnim kanalićima, kori nadbubrežne žlezde, crevima, koži, pankreasnim ostrvcima, limfocitima, plućima, miokardu i mozgu. Ovaj receptor se sastoji od vanćelijskog domena koji vezuje ligand, transmembranskog i unutarćelijskog domena. PRLR kod čoveka vezuje PRL ali i laktogen iz posteljice kao i GH. Sisanje dovodi do povećanja nivoa PRLR što omogućava veću biološku aktivnost PRL kod životinja koje sisaju. Vezivanje i aktivacija PRL dovodi do dimerizacije receptora, a potom i aktivaciju signalnog puta JAK-STAT. Na osnovu nekih studija, PRLR može da aktivira i signalni put ERK1/2. Biološki efekti PRL u tkivima gde se nalazi PRLR nisu dobro razjašnjeni. Pored poznate uloge u laktaciji, PRL preko aktivacije svog receptora može da učestvuje u regulaciji metabolizama, homeostazi kostiju, funkciji nadbubrežne žlezde i dr.

### 3.4.3. Efekti prolaktina u organizmu

#### 3.4.3.1. Prolaktin i metabolizam

PRL može da utiče na povećanje telesne težine, nastanak gojaznosti, pojavu metaboličkog sindroma i remećenje gluko-insulinskog i lipidnog statusa. Receptori za PRL i DA se eksprimiraju na beta ćelijama pankreasa i adipocitima što daje dodatnu potvrdu o značajnosti PRL u regulaciji metabolizma. Tretmani sa agonistima DA smanjuju pojavu metaboličkog sindroma i gojaznosti u populaciji, dok kod muškaraca sa hiperprolaktinijom i hipogonadizmom dolazi do uravnoteženja metabolizma nakon korekcije ova dva stanja. Međutim, niske koncentracije PRL takođe mogu da dovedu do poremećaja u metabolizmu utičući na pojavu metaboličkog sindroma. Danas se veruje da se samo određeni nivoi PRL u cirkulaciji (25–100 mg/L) smatraju fiziološkim granicama neophodnim za održavanje metaboličke homeostaze.

Interesantan je i efekat PRL na beta ćelije pankreasa tokom embriogeneze i postnatalnog perioda. Naime, tokom trudnoće beta ćelije pankreasa prolaze kroz određene promene kako bi se organizam adaptirao na insulinsku rezistenciju koja se javlja u trudnoći. Tokom adaptacije beta ćelije pankreasa proliferišu što dovodi do uvećanje mase pankreasnih ostrvaca i povećanja lučenja insulina. Ove promene na beta ćelijama pankreasa se brzo gube nakon porođaja. Eksperimenti na glodarima u uslovima *in vivo* i *in vitro* su pokazali da je za ove promene na beta ćelijama pankreasa odgovoran PRLR, kao i hormoni koji se vezuju za njega, PRL i laktogen posteljice. Kod miševa sa nedostatkom PRLR dolazi do smanjenje mase pankreasnih ostrvaca, umanjenje funkcije beta ćelija pankreasa i stvaranja insulina što stvara predispoziciju za razvoj diabetesa. Stoga se može pretpostaviti da je PRL važan za homeostazu beta ćelije pankreasa kao i da pruža zaštitu od diabetesa. Međutim, ostaje pitanje da li PRL ispoljava slično dejstvo kod žena tokom trudnoće. Pokazana je razlika u strukturi pankreasnih ostrvaca, sposobnosti beta ćelije pankreasa da uđu u ćelijski ciklus kao i signalizaciji PRL između glodara i čoveka. Stoga se podaci o delovanju PRL na beta ćelije pankreasa dobijeni na studijama koje su rađene na miševima ne mogu preneti na čoveka.

### 3.4.3.2. Prolaktin i GnRH

Efekat PRL na lučenja GnRH nije poznat, ali miševi kojima je utišan gen za PRL ili receptor za PRL pokazuju poremećaj u reprodukciji kao što je sterilnost ili nepravilnost u estrusnom ciklusu. Miševi sa nedostatkom PRLR pokazuju manji broj primordijalnih folikula i ovuliranih jajnih ćelija, zatim dolazi do poremećaja u prelasku oplođene jajne ćelije u stadijum blastociste, a materica postaje manje osetljiva na implantaciju blastociste. Hiperprolaktinemija kod osoba može da posluži kao dobar pokazatelj veze između PRL i GnRH. Kod osoba sa ovim poremećajem dolazi do smanjenja pulsativnog lučenja LH što može da ukaže da PRL utiče na pulsativno lučenje GnRH. Kod miševa sa hiperprolaktinijom meren je nivo GnRH u portalnom krvotoku i uočeni su manji nivoi ovog hormona u odnosu na kontrolne životinje. Pretpostavlja se da se efekat PRL na GnRH ostvaruje direktno dejstvom na generator pulseva GnRH u hipotalamusu. Ovo



je potvrđeno u eksperimentima na ćelijskoj liniji neurona hipotalamusa gde je pokazano da PRL smanjuje oslobađanje GnRH iz ovih ćelija. Prvo se smatralo da PRL direktno deluje na GnRH neurone dovodeći do smanjenje lučenja GnRH, međutim samo mali broj GnRH neurona eksprimira PRLR. Takođe, PRL ne menja nadražljivost GnRH neurona. Ovi podaci ukazuju da neka druga populacija neurona prenosi efekta PRL na GnRH neurone. Novija istraživanja su pokazala da PRL utiče na neurone koji eksprimiraju kipeptin. Kipeptin neuroni eksprimiraju PRLR, a stimulacija receptora u ovim neuronima dovodi do aktivacije signalnog puta STAT što ukazuju na funkcionalnost PRLR. Takođe, pokazano je i da infuzija PRL u cirkulaciju ili treću moždanu komoru koči ekspimiranje kipeptina u hipotalamusu i pulsativno oslobađanja LH. Iz ovih podataka se može jasno pretpostaviti da PRL, preko efekata na kipeptin utiče na pulsativno oslobađanje GnRH.

### 3.4.3.3. Prolaktin i jajnici

Uloga PRL na nivou jajnika nije jasno definisana. U nekim istraživanjima je pokazano da PRL dovodi do povećanja produkcije progesterona, ali samo pri malim koncentracijama. Veće koncentracije ovog hormona dovode do inhibicije sinteze progesterona. Takođe, PRL deluje stimulišuće na ekspimiranje enzima koji su uključeni u sintezu progesterona. Kod pacova, PRL daje podršku žutom telu, odnosno deluje kao luteotropni hormon. Međutim, kod žena, smanjenje nivoa PRL korišćenjem farmakološke supstance bromokriptina ne dovodi do poremećaja u funkciji žutog tela. Povećanje PRL u folikulske tečnosti je dovelo do smanjenja estradiola i proliferacije granulosa ćelija. Smatra se da PRL sprečava stimulatorni efekat FSH na aktivnost aromataze, enzima koji učestvuje u sintezi estradiola. Epidemiološke studije su takođe pokazale potencijalnu vezu između PRL i funkcije jajnika. Osobe sa hiperprolaktinemijom pokazuju skraćenu lutealnu fazu, a može da se javi i infertilnost.

### 3.5. LITERATURA

- Bernard DJ, Chapman SC, Woodruff TK (2001) Mechanisms of inhibin signal transduction. *Recent Prog Horm Res.* 56:417–450.
  - Bernard V, Young J, Binart N (2019) Prolactin – a pleiotropic factor in health and diseases. *Nature Reviews Endocrinology* 15:356–365.
  - Casarini i Simoni (2021) Recent advances in understanding gonadotropin signaling. *Fac Rev* 10:411–18.
  - Colledge WH (2008) Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *TEM* 20:115–121.
  - Rennekleiv OK i Kelly MJ (2013) Kisspeptin excitation of GnRH neurons. *Adv Exp Med Biol* 784:113–131.
  - Costagliolai S, Panneels V, Bonomi M, Koch J, Many MC, Smits G, Vassart G (2002) Tyrosine sulfation is required for gonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *EMBO J* 21:504–513.
  - De Pascali F, Reiter E (2018)  $\beta$ -arrestins and biased signaling in gonadotropin receptors. *Minerva Ginecol* 70:525–538.
  - Donato J Jr, Frazão R (2016) Interactions between prolactin and kisspeptin to control reproduction. *Arch Endocrinol Metab.* 60:587–595.
  - Feldman SF i Topaloglu AP (2019) Puberty: Gonadarche and Adrenarche. U: JF Strauss i RL Barbieri, ur., *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* 8. izdanje, Elsevier, 395–466.
  - Galet C, Hirakawa T, Ascoli M (2004) The postendocytotic trafficking of the human lutropin receptor is mediated by a transferable motif consisting of the C-terminal cysteine and an upstream leucine. *Mol Endocrinol.* 18:434–446.
  - Hall JE (2019) Neuroendocrine control of the menstrual cycle. U: Strauss JF i Barbieri RL, ur., *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology*, 8. izdanje, Elsevier, 149–166.
  - Herbison AE (2018) The gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Endocrinology* 159, 3723–3736.
- Herbison AE (2021) The dendron and episodic neuropeptide release. *J Neuroendocr* 33:e13024.
- Herbison EA (2015) Physiology of the Adult Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. U: Plant TM i Zeleznik AJ, ur., *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, Elsevier, 399–467.
  - Herde MK, Iremonger KJ, Constantin S i Herbison AE (2013) GnRH Neurons Elaborate a Long-Range projection with Shared Axonal and Dendritic Function. *J Neurosci* 33:12689–12698.
  - Ikegami K, Watanabe Y, Nakamura S, Goto T, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H (2022) Cellular and molecular mechanisms regulating the KNDy neuronal activities to generate and modulate GnRH pulse in mammals. *Front Neuroendocrinol* 64:100968.

- Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*. 23;404(6776):411–414.
- Kanasaki H, Bedecarrats GY, Kam KY, Xu S, Kaiser UB (2005) Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase pathways in perfused LbetaT2 cells. *Endocrinology*. 146:5503–5513.
- Koppan M, Nagy Z, Bosnyak I, Reglodi D (2022) Female reproductive functions of the neuropeptide PACAP. *Front Endocrinol (Lausanne)* 20:982551.
- Krsmanovic L, Stojilkovic SS, Catt KJ (1996) Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release and its regulation. *Trends Endocrinol Metab* 7:56–59.
- Krsmanovic L, Hu L, Leung PK, Feng H, Catt KJ (2009) The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 20:402–408.
- Liu X, Yeo SH, James H, McQuillan, Herde MK, Hessler S, Cheong I, Porteous R, Herbison AE (2021) Highly redundant neuropeptide volume co-transmission underlying episodic activation of the GnRH neuron dendron. *eLife* 10:e62455.
- McCartney CR i Marhall JC (2019) *Neuroendocrinology of Reproduction*, U: JF Strauss i RL Barbieri, ur., Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology 8. Izdanje, Elsevier, 1–24.
- Moore AM, Prescott M, Czielesky K, Desroziers E, Yip SH, Campbell RE and Herbison AE (2018) Synaptic Innervation of the GnRH Neuron Distal Dendron in Female Mice, *Endocrinology* 159:3200–3208.
- Narayan P, Ulloa-Aguirre A i Dias JA (2019). The gonadotropin hormones and their receptors. U: Strauss JF I Barbieri RL, ur., Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology, 8. izdanje, Elsevier, 25–57.
- Pirchio R, Graziadio C, Colao A, Pivonello R, Auriemma RS (2022) Metabolic effects of prolactin. *Front Endocrinol (Lausanne)* 27;13:1015520.
- Renekleiv OK i Kelly MJ (2013) Kisseptin excitation of GnRH neurons. *Adv Exp Med Biol* 784:113–131.
- Ramos-Martínez E, Ramos-Martínez I, Valencia J, Ramos-Martínez JC, Hernández-Zimbrón L, Rico-Luna A, Pérez-Campos E, Pérez-Campos Mayoral L, Cerbón M (2022) Modulatory role of prolactin in type 1 diabetes. *Horm Mol Biol Clin Investig* 19:79–88.
- Stamatiades i Kaiser (2018) Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 5, 463:131–141.
- Stojilkovic SS (2006) Pituitary cell type-specific electrical activity, calcium signaling and secretion. *Biol Res* 39:403–423.
- Stojilkovic SS (2012) Molecular mechanisms of pituitary endocrine cell calcium handling. *Cell Calcium* 51:212– 221.

- Stojilkovic SS & Tomic M (1996). GnRH-induced calcium and current oscillations in gonadotrophs. *Trends Endocrinol Metab* 7:379–384.
- Stojilkovic SS, Krsmanovic LZ, Spergel DJ, Catt KJ (1994) Gonadotropin-releasing hormone neurons: intrinsic pulsatility and receptor-mediated regulation. *TEM* 5:201–209.
- Stojilkovic SS, Torsello A, Iida T, Rojas E, Catt KJ (1992) Calcium signaling and secretory responses in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:453–467.
- Tomic M, Cesnjaj M, Catt KJ & Stojilkovic SS (1994). Developmental and physiological aspects of Ca<sup>2+</sup> signaling in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 135:1762–1771.
- Tomikawa J, Uenoyama Y, Ozawa M, Fukanuma T, Takase K, Goto T, Abe H, Ieda N, Minabe S, Deura C, Inoue N, Sanbo M, Tomita K, Hirabayashi M, Tanaka S, Imamura T, Okamura H, Maeda K, Tsukamura H (2012) Epigenetic regulation of Kiss1 gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(2):E1294–301.
- Thompson IR i Kaiser UB (2014) GnRH Pulse Frequency-dependent Differential Regulation of LH and FSH Gene Expression. *Mol Cell Endocrinol.* 25; 385(0): 28–35.
- Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Steiner RA, Okamura H (2010) Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 30, 3124–3132.
- Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H (2021) Kisspeptin Neurons and Estrogen-Estrogen Receptor  $\alpha$  Signaling: Unraveling the Mystery of Steroid Feedback System Regulating Mammalian Reproduction. *Int J Mol Sci.* 26;22(17):9229.
- Wide L i Eriksson K (2018) Low-glycosylated forms of both FSH and LH play major roles in the natural ovarian stimulation. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 123, 100–108.

**Nebojša Andrić**

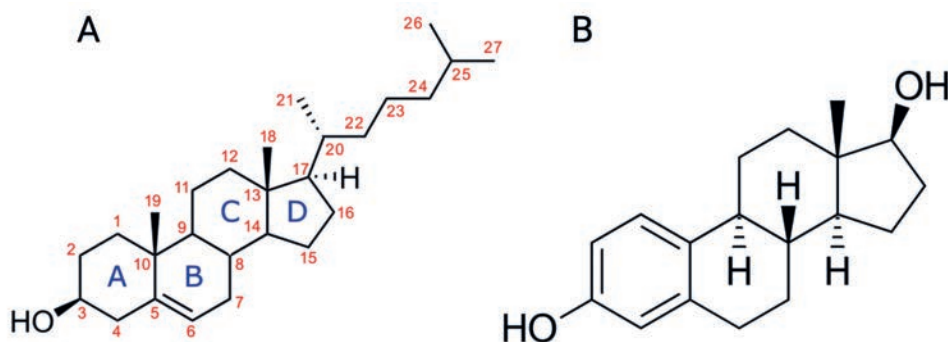
---

## **4. STEROIDOGENEZA**

---



Steroidni hormoni su signalni molekuli koji učestvuju u velikom broju razvojnih i fizioloških procesa u organizmu uključujući i regulaciju funkcije ženskog reproduktivnog sistema. Steroidni hormoni nastaju od holesterola, lipida koji se nalazi u ćelijskoj membrani, organelama i citosolu. Svi steroidni hormoni imaju ciklopentano-perhidrofenantrensko jezgro koje se sastoji od četiri prstena označenih sa A, B, C i D (Slika 4.1).



**Slika 4.1** Holesterol (A) i 17 $\beta$ -estradiol (B). Prsteni su označeni slovima A, B, C i D, a atomi ugljenika brojevima od 1–27. U položaju 18 i 19 nalaze se metil grupe.

Kod estradiola nedostaje metil grupa vezana za C atom na poziciji 10, jer je A prsten aromatičan. Na poziciji 3 kod svih steroidnih hormona postoji hidroksilna ili keto grupa. Ako se atom vezan za asimetrični centar nalazi ispod ravni ciklične strukture označava se kao alfa (isprekidanom linijom), a ako se nalazi iznad ravni kao beta (punom linijom).

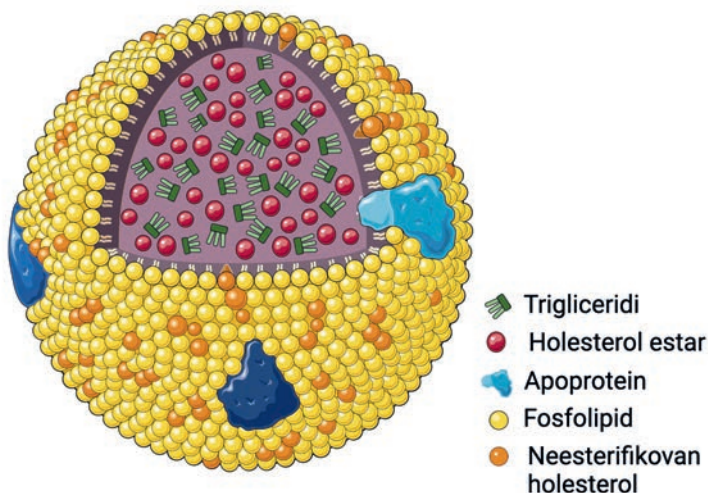
Na osnovu broja C atoma steroidni hormoni se mogu svrstati u različite grupe. Estrani kojima pripadaju estrogenski hormoni imaju 18 C atoma (C18 steroidi), androstani kojima pripadaju androgenski hormoni imaju 19 C atoma (C19 steroidi) i pregnani kojima pripadaju progesteron i kortikosteroidi i imaju 21 C atom (C21 steroidi). Prisustvo keto ili hidroksilne grupe na odgovarajućim C atomima (3, 7, 11 i 17), utiče na biološku aktivnost i na metabolizam steroidnih hormona.

## 4.1. PREUZIMANJE, SKLADIŠTENJE I UNUTARĆELIJSKI TRANSPORT HOLESTEROLA

Holesterol neophodan za sintezu steroidnih hormona dolazi iz tri izvora (i) cirkulacije, (ii) *de novo* sinteze i (iii) iz membrana ili lipidnih kapi. Najvažniji izvor holesterola iz cirkulacije su lipoproteini male gustine (engl. *low-density lipoproteins*, LDL). LDL je sferična struktura koja se sastoji od apolipoproteina, fosfolipidnog sloja, triacilglicerola i esterifikovanog i u manjoj meri slobodnog holesterola (Slika 4.2). Na ćelijskoj membrani se nalazi receptori za LDL koji preuzimaju ovaj lipoprotein iz cirkulacije putem endocitoze. Vezikula koja nosi LDL se spaja sa lizozomima u kojima dolazi do razgradnje apolipoproteinskog dela molekule LDL. Holesterol estar koji se oslobodi ovom prilikom se razgrađuje enzimom kiselom lipazom (engl. *acid lipase A*, LIPA) pri čemu nastaje slobodni holesterol. Holesterol se zatim oslobađa iz lizozoma uz pomoć sterol vezujućih proteina, odnosno NPC transportera unutarćelijskog holesterola (engl. *NPC intracellular cholesterol transporter*, NPC), NPC1 i NPC2. NPC2 unutar lizozoma vezuje slobodni holesterol i transportuje ga do NPC1 koji se nalazi na membrani lizozoma i reguliše izlazak holesterola u citosol, gde može pomoću odgovarajućih nosača da bude usmeren u različite organele, ili izbačen iz ćelije. Genetske mutacije proteina NPC dovode do Niemann-Pick tip C oboljenja koji se karakteriše akumulacijom holesterola u lizozomima.

Lipoproteini velike gustine (engl. *high-density lipoproteins*, HDL) takođe predstavljaju izvor holesterola iz cirkulacije koji se koristi za produkciju steroidnih hormona u ćeliji. Receptor SR-B1 (engl. *scavenger receptor type B, class 1*) na ćelijskoj membrani je odgovoran za preuzimanje HDL iz cirkulacije. Proces preuzimanja HDL je drugačiji u poređenju sa LDL. Holesterol ester iz HDL se unosi u ćeliju, a apolipoprotein ostaje na površini ćelije. Nakon toga, dve neutralne sterol esteraze koje se nalaze u citosolu, lipaza stimulisana hormonom (engl. *hormone-stimulated lipase*, LIPE) i neutralna holesterol-estar hidrolaza (engl. *neutral cholesterol ester hydrolase*, NCEH1) oslobađaju holesterol iz holesterol estera.



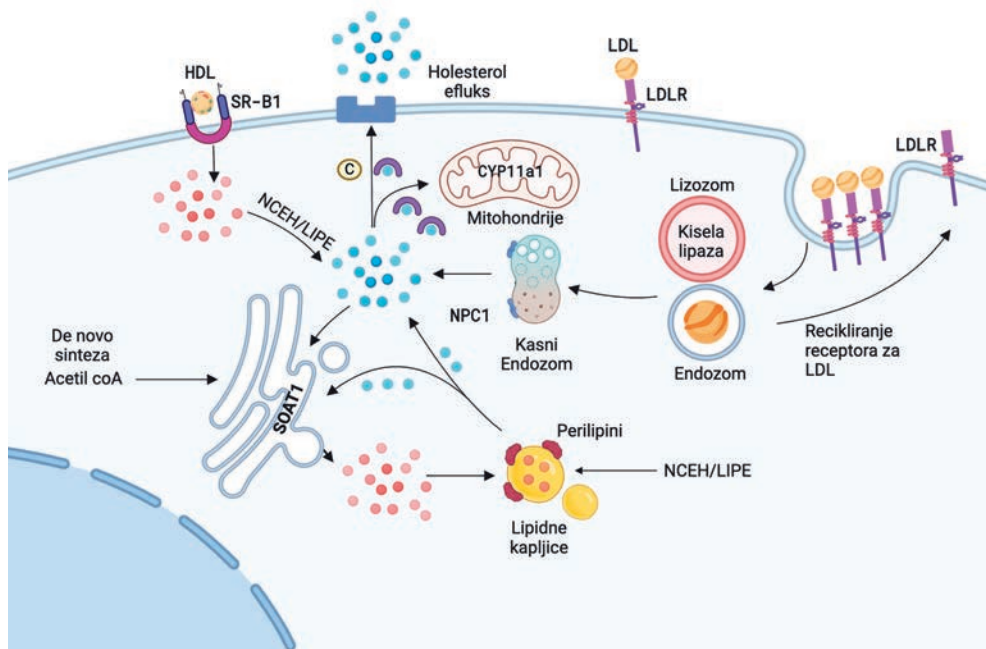


**Slika 4.2.** Struktura LDL molekula

(preuzeto iz *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 159, 2020, pages 94–119 i modifikovano u Biorenderu na osnovu licence CC BY-NC-ND 4.0)

*De novo* sinteza holesterola se odvija u glatkom endoplazmatičnom retikulumu i uključuje veliki broj enzima. Čelije koje proizvode steroidne hormone imaju deset puta više razvijen glatki u poređenju sa hrapavim endoplazmatičnim retikulumom. *De novo* sinteza holesterola počinje od acetil CoA koji se dalje transformiše do 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, a zatim do mevalonata, skuelena, lanosterola i na kraju do holesterola.

Značaj holesterola dobijenog iz lipoproteina u poređenju sa *de novo* sintezom za steroidogenezu za sada nije u potpunosti razjašnjen. Kod hipobetalipoproteinemije, stanja gde ne postoji LDL u cirkulaciji, javlja se smanjenje sinteze steroidnih hormona u kori nadbubrežnih žlezda, a primećeno je i smanjenje nastajanja progesterona u žutom telu i tokom trudnoće. Međutim, nivo progesterona kod ovog oboljenja je dovoljan za održavanje normalne trudnoće. Osobe sa mutacijom receptora za LDL razvijaju hiperholesterolemiju, međutim, produkcija steroidnih hormona ostaje netaknuta ukazujući na sposobnost ćelija da kompenzuju nedostatak preuzimanja LDL iz cirkulacije. Preuzimanje, skladištenje i unutarćelijski transport holesterola je prikazan na slici 4.3.



**Slika 4.3.** Preuzimanje, skladištenje i unutarćelijski transport holesterola.

Plave kuglice predstavljaju slobodni holesterol, dok roze kuglice predstavljaju holesterol ester (Slika je napravljena u Biorenderu) HDL – lipoproteini velike gustine; SR-B1 – receptor za vezivanje HDL; LDL – lipoproteini male gustine; LDLR – receptor za LDL; NCEH1 – neutralna holesterol ester hidrolaza; LIPE – hormon-senzitivna lipaza; NPC1 – transporter za holesterol u membrani lipozoma; SOAT1 – sterol O-acetiltransferaza 1.

#### 4.1.1. Lipidne kapi

Lipidne kapi u citoplazmi predstavljaju značajan izvor holesterola za sintezu steroidnih hormona. Oko 80% ukupnog holesterola u ćeliji se nalazi esterifikovan u lipidnim kapima. Lipidne kapi se formiraju kada se slobodni holesterol poreklom iz lipoproteina ili dobijen sintezom *de novo* esterifikuje u glatkom endoplazmatičnom retikulumu uz pomoć enzima sterol O-acetiltransferaze 1 (SOAT1). Nastali holesterol estri se nakupljaju, a zatim i odvajaju od glatkog endoplazmatičnog retikuluma u vidu lipidnih kapi. Mutacija enzima SOAT1 kod miševa dovodi do smanjenja nakupljanja holesterol-estra u kori nadbubrežnih žlezda, međutim, nije primećeno

smanjenje produkcije kortikosterona u bazalnim uslovima kao i nakon stimulacije sa adrenokortikotropnim hormonom (engl. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH).

Na površini lipidnih kapi su identifikovani površinski proteini perilipini. Identifikovano je pet glavnih perilipina kod sisara. Perilipini 2 i 3 se eksprimiraju gotovo u svim ćelijama, dok ostale tri grupe imaju ograničenu tkivnu ekspresiju. Perilipini prepoznaju lipidne kapi u ćeliji i vezuju se za njihovu površinu, odnosno za fosfolipidni sloj lipidne kapi. Njihova uloga je da regulišu lipolizu i da spreče pristup enzima lipaza sadržaju lipidnih kapi. Ovaj efekat perilipina se uočava samo kada ćelija nije stimulisana hormonima ili nekim faktorima. Međutim, kada je ćelija stimulisana hormonima ili faktorima koji omogućavaju sintezu cikličnog adenzin-monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) i aktiviraju protein kinazu A (PKA) dolazi do fosforilacije perilipina, a zatim i njihovog odvajanja od površine lipidne kapi što omogućava dejstvo lipaza i oslobađanje holesterola.

Lipaze koje oslobađaju holesterol iz lipidnih kapi su LIPE i NCEH1. LIPE je regulisana pro-lipolitičkim i antilipolitičkim hormonima. Prolipolitički hormoni kao što su kateholamini aktiviraju signalni put cAMP-PKA fosforilišući serin 649 i 650 na enzimu LIPE. Time pospešuje translokaciju ovog enzima iz citoplazme do lipidne kapi. Takođe, antilipolitički hormoni, kao što je insulin, stimulišu fosforilaciju serina 554 od strane AMP-aktivirane kinaze što dovodi do smanjenja aktivnosti enzima. Uloga LIPE u oslobađanju holesterola iz lipidnih kapi je pokazana kod miševa kod kojih je utišan gen za ovu lipazu. Ovi miševi pokazuju nakupljanje lipidnih kapi u kori nadbubrežnih žlezda. Sličan fenotip, odnosno nakupljanje lipida i uvećanje nadbubrežnih žlezda je primećeno kod miševa kod kojih nedostaju LIPE i NCEH1. Treba napomeniti da lipidne kapi mogu direktno da reaguju sa organelama. Tako, lipidne kapi stupaju u interakciju sa mitohondrijama kako bi omogućile transport masnih kiselina u mitohondrije gde dolazi do njihove oksidacije. Studije su pokazale da se perilipin 5, koji se eksprimira u mišićnim ćelijama, nalazi na površini lipidnih kapi i mitohondrija i tako omogućava direktan prenos masnih kiselina iz lipidne kapi u mitohondrije.

## **4.2. TRANSLOKACIJA HOLESTEROLA OD SPOLJAŠNJE DO UNUTRAŠNJE MEMBRANE MITOHONDRIJA**

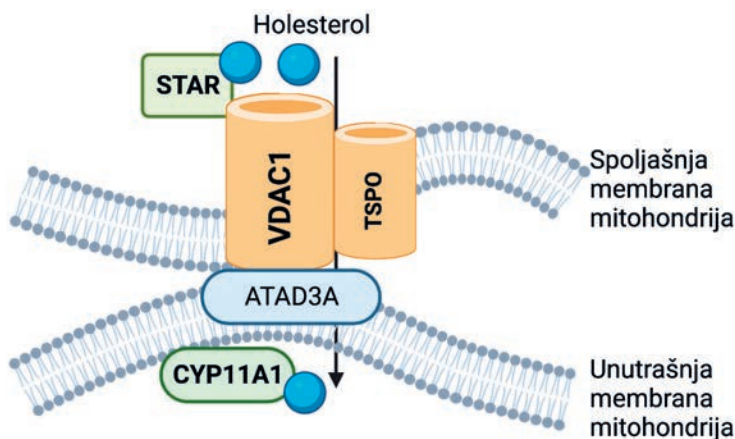
Hormonska stimulacija ćelija dovodi do brze produkcije steroidnih hormona koja se može sprečiti dodatkom inhibitora sinteze proteina što ukazuje da proteini imaju ulogu u ovom procesu. Orme-Džonson (Orme-Johnson) i saradnici su 1986. godine pokazali da je produkcija steroidnih hormona povezana sa sintezom proteina veličine 37 kDa, da bi nakon toga, Stoko (Stocco) i saradnici 1996. godine klonirali protein i nazvali ga steroidogeni akutni regulatorni protein (STAR).

### **4.2.1. Steroidogeni akutni regulatorni protein (STAR)**

STAR ima ulogu u transportu holesterola do unutrašnje membrane mitohondrija. Sintetiše se kao prekursor protein od 37 kDa koji zatim odlazi do mitohondrija gde se dalje obrađuje u protein od 30 kDa. Prekursor od 37 kDa ima veoma kratak poluživot (u minutima), dok je obrađeni protein od 30 kDa dugoživeći (u satima) i predstavlja biološki aktivnu formu. STAR sadrži na poziciji 57 i 195 aminokiselinu serin koji fosforiliše PKA. Kod čoveka serin 195 mora biti fosforilisan da bi se postigla maksimalna aktivnost proteina STAR. Značaj fosforilacije serina 57 i 195 je pokazana u eksperimentima u kojima je serin na ovim pozicijama u proteinu STAR zamenjen alaninom. Zamena serina na poziciji 195 je dovela do smanjenja produkcije pregnenolona za 50%, dok zamena serina na poziciji 57 nije imala efekat na sintezu ovog steroida.

Ranije se smatralo da ulazak STAR u mitohondrije stvara privremeno mesto kontakta između spoljašnje i unutrašnje membrane koji omogućava prenos holesterola do unutrašnje membrane mitohondrija. Takođe je predložen i mehanizam po kome STAR dovodi do promena u konformaciji membrana mitohondrija i na taj način omogućava prolazak holesterola od spoljašnje do unutrašnje membrane. Međutim, istraživanja su pokazala da interakcija proteina STAR sa spoljašnjom membranom mitohondrija nije dovoljna za transport holesterola što je dovelo do traganja za novim modelom transporta holesterola u mitohondrije. Široko prihvaćen model

pretpostavlja da, pored proteina STAR, nekoliko drugih molekula učestvuje u ovom procesu. Jedan od njih je protein translokator (engl. *translocator protein*, TSPO) poznat i kao periferni tip receptora za benzodiazepin. Važnost ovog molekula za proces transporta holesterola u mitohondrije je pokazana kod miševa sa utišanim genom za TSPO. Kod ovih miševa se nije odvijao proces steroidogeneze, iako je bio prisutan STAR.



Slika 4.4. Šematski prikaz kompleksa transduceosom. VDAC1 – voltažno-zavisni anjonski kanal 1, TSPO – protein translokator, ATAD3A – *ATPase family AAA domain-containing protein 3A*, STAR – steroidogeni akutni regulatorni protein, CYP11A1 – enzim koji seče bočni lanac holesterola (Slika je napravljena u Biorenderu)

Model transporta holesterola opisuje postojanje proteinskog kompleksa od 800 kDa. Ovaj pretpostavljeni kompleks je nazvan transduceosom i u njega, pored TSPO, ulaze i voltažno-zavisni anjonski kanal 1 (engl. *voltage-dependent anion channel 1*, VDAC1), enzim koji seče bočni lanac holesterola (P450<sub>scc</sub> ili CYP11A1) i protein ATAD3A (engl. *ATPase family AAA domain-containing protein 3A*) (Slika 4.4). TSPO i VDCA1 se nalaze na spoljašnjoj, dok se CYP11A1 nalazi na unutrašnjoj membrani mitohondrija. ATAD3A je protein koji omogućuje interakciju između ove dve membrane. Ovakav raspored proteina u kompleksu omogućava prenos holesterola do unutrašnje membrane gde se odmah i prevodi u pregnenolon aktivnošću CYP11A1. Tačan mehanizam interakcije između STAR, TSPO, VDAC1 ostaje

i dalje nerazjašnjen. Model pretpostavlja da se kolesterol vezuje za STAR u citoplazmi, a zatim se ovaj kompleks premešta do TSPO koji ga zatim, zajedno sa VDCA1, transportuje do unutrašnje membrane mitohondrija. Međutim, ovaj mehanizam nije potvrđen u drugim studijama. Za razliku od napred navedenog modela, Stocco i sar (2018) dovode u pitanje ulogu TSPO u transportu holesterola do unutrašnje membrane mitohondrija i steroidogenezi. U nekoliko studija sprovedenih na miševima kojima je utišan TSPO samo u Lejdigovim ćelijama je pokazano da je transport holesterola kao i steroidogeneza u ovim ćelijama očuvana. Ova grupa autora pretpostavlja da TSPO nema direktnu ulogu u transportu holesterola do unutrašnje membrane mitohondrija već da utiče na steroidogenezu, indirektno, preko metabolizma masnih kiselina i regulacije energetskog statusa mitohondrija.

Istraživanja vezana za regulaciju eksprimiranja proteina STAR nakon stimulacije sa luteinizirajućim hormonom (LH) su pokazala značaj signalnog puta cAMP-PKA kao i većeg broja transkripcionih faktora. Region u promotoru gena za STAR koji se nalazi 150 baznih parova uzvodno od mesta početka transkripcije je visoko konzervisan i odgovoran za prepisivanje STAR kod miševa, pacova i čoveka. Ovaj region sadrži sekvencu koja odgovara na cAMP (engl. *cAMP-responsive element*, CRE). Povećanje cAMP koji se javlja pod uplivom LH dovodi do aktivacije PKA koji će zatim aktivirati nekoliko transkripcionih faktora kao što su CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*) i članovi familije AP1 kojima pripadaju FOS, JUN kao i neki članovi familije CREB/ATF koji će se vezivati za CRE. Međutim, efekat transkripcionih faktora koji se vezuju za sekvencu CRE zavisi od transkripcionih faktora, steroidogenog faktora 1 (SF-1) i GATA vezujućeg proteina 4 (engl. GATA4). Ovi faktori se vezuju po bokovima sekvence CRE/AP1 i omogućavaju punu transkripcionu aktivnost promotora gena za STAR. Efekat SF-1 na prepisivanje gena za STAR se razlikuje kod miševa i čoveka. Kod miševa, promotorski region STAR sadrži vezno mesto za transkripcioni faktor NURR77 koje se preklapa sa veznim mestom za SF1. Zato vezivanje SF-1 kod miševa nije potrebno za maksimalno prepisivanje STAR dok je kod čoveka ova interakcija neophodna. Pokazano je da se NURR77 aktivira  $Ca^{2+}$  u Lejdigovim ćelijama miša što ukazuje da ovaj signalni put može da reguliše eksprimiranje

gena za STAR. Pored napred navedenih transkripcijskih faktora promotor gena za STAR sadrži sekvencu za koju se vezuje familija transkripcijskih faktora CEBP (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein*) prvenstveno CEBP $\beta$ .

### 4.3. STEROIDOGENI ENZIMI

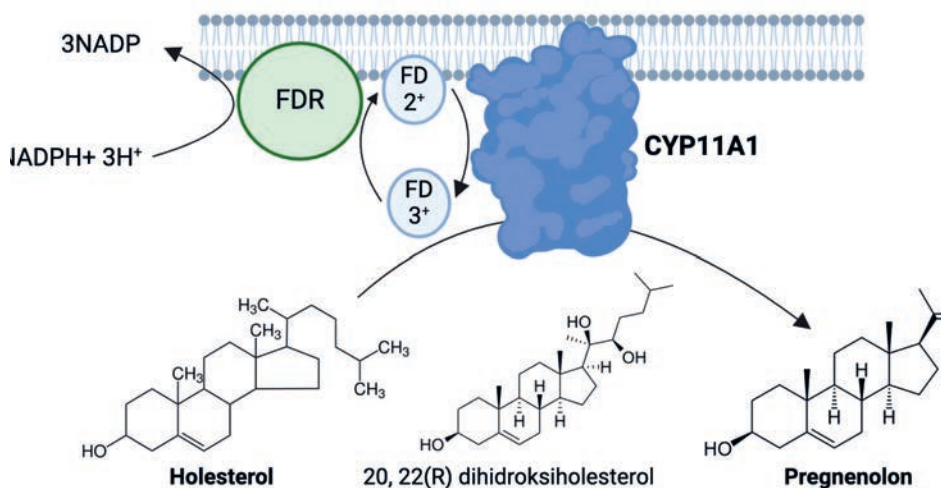
Produkcija steroidnih hormona je kompleksan proces u kome učestvuje veći broj enzima koji se mogu svrstati u nekoliko klasa: (i) citohrom P450 ili CYP enzimi, (ii) hidrosisteroid- dehidrogenaze i (iii) reduktaze.

Enzimi citohrom P450 (ili CYP enzimi) sadrže hem grupu i upijaju svetlost na 450 nm kada se nalaze u redukovanom stanju. Ovi enzimi su membranski vezani proteini koji zahtevaju molekulski kiseonik i redukcione ekvivalente. Enzimi koji pripadaju ovoj klasi se označavaju sa CYP, arapskim brojem koji označava prirodnost familiji, slovom koje označava podfamiliju i arapskim brojem koji označava individualni protein. Koriste redukovani nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) kao donor elektrona za redukciju molekulskog kiseonika, pri čemu se jedan atom kiseonika uvodi u supstrat, kao hidroksilna grupa, a drugi se redukuje do vode. Elektroni se od NADPH transportuju do supstrata preko dva različita sistema za transfer. U mitohondrijama, transfer se odvija preko feredoksin reduktaze i feredoksina i oni su deo elektron transportnog lanca svih P450 enzima u mitohondrijama. U mikrozomu, elektroni se prenose putem citohrom P450 reduktaze (NADPH:citohrom P450 reduktaza), proteina koji u svom sastavu sadrži flavinadenin-dinukleotid (FAD) i flavinadenin-mononukleotid (FMN). Elektroni se transportuju od NADPH do FAD, a zatim do FMN, CYP enzima i supstrata.

Hidrosisteroid dehidrogenaze nemaju hem grupu i za svoju aktivnost zahtevaju prisustvo koenzima nikotinamid-adenin dinukleotida (fosfata) (NADH/NAD<sup>+</sup> ili NADPH/NADP<sup>+</sup>) da oksidišu ili redukuju steroide. Pored uloge u produkciji steroida, hidrosisteroid dehidrogenaze, zajedno sa reduktazama, steroid sulfotransferazama i steroid sulfatazama regulišu nivoe bioaktivnih hormona u tkivima.

### 4.3.1. Enzim koji seče bočni lanac holesterola (CYP11A1)

CYP11A1 seče bočni lanac holesterola pri čemu nastaje pregnenolon. Ova konverzija uključuje tri reakcije: prve dve reakcije dovode do ubacivanja hidroksilne grupe na pozicijama C22 i C20 i formiranja 20, 22(R) dihidroksiholesterola, dok treća reakcija dovodi do presecanja bočnog lanca između ova dva C atoma i formiranja pregnenolona i izokarpoaldehida. Svaka od ovih reakcija zahteva jedan molekul NADPH i jedan molekul kiseonika. Pošto se reakcija formiranja pregnenola odvija u tri koraka, a međuprodukti ove reakcije se mogu izolovati iz tkiva, prvo se pretpostavljalo da tri različita enzima učestvuju u ovom procesu. Međutim, prečišćavanje proteina i rekonstrukcija enzimske aktivnosti je pokazala da jedan protein vrši konverziju holesterola u pregnenolon. Sve tri reakcije se odvijaju na jednom aktivnom mestu na unutrašnjoj membrani mitohondrija.



**Slika 4.5.** Konverzija holesterola u pregnenolon pomoću CYP11A1 na unutrašnjoj membrani mitohondrija. FDR–ferodoksin reduktaza, FD–ferodoksin (Slika je napravljena u Biorenderu)

U procesu konverzije holesterola u pregnenolon, CYP11A1 se nalazi na kraju elektron transportnog lanca. U ovom elektron transportnom lancu NADPH predaje elektrone ferodoksin reduktazi, flavoproteinu koja se na-



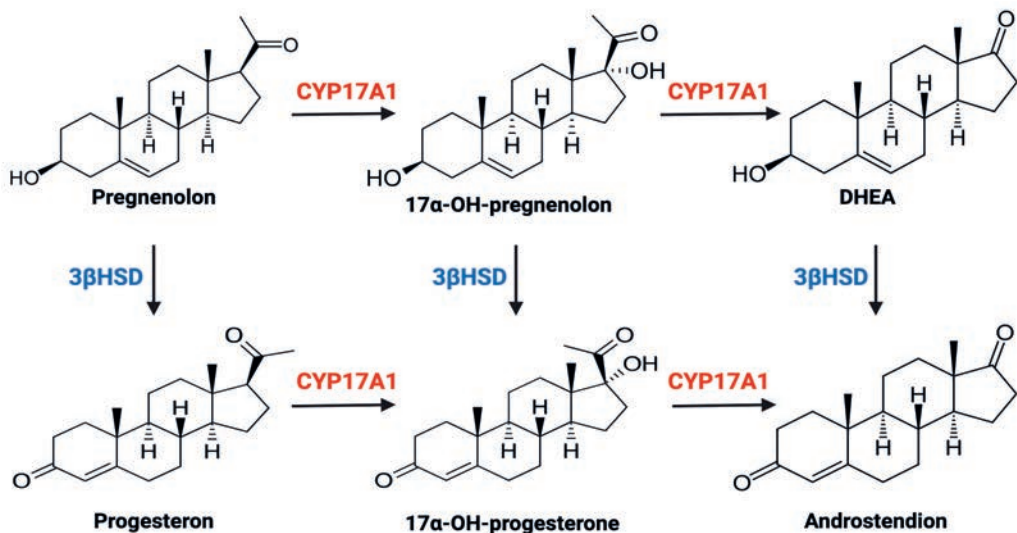
lazi na unutrašnjoj membrani mitohondrija, koja zatim predaje elektrone ferodoksinu. Ferodoksin je protein koji sadrži gvožđe i sumpor i labavim vezama je vezan za unutrašnju membranu mitohondrija ili se nalazi u matriksu. Ferodoksin, dalje predaje elektrone enzimu CYP11A1 (Slika 4.5).

Gen za CYP11A1 se nalazi na hromozomu 15q23-q24 i sadrži devet egzona. Mutacije ovog gena dovode do smanjene konverzije holesterola u pregnenolon i povezane su sa insuficijencijom nadbubrežnih žlezda. Stoga je za očekivati da su mutacije CYP11A1 nespojive sa trudnoćom kod žene, jer posteljica treba da stvara progesteron oko 8. nedelje kako bi se sprečile kontrakcije materice i pobačaj. Međutim, pokazano je da fetusi sa određenim mutacijama gena za CYP11A1 preživljavaju trudnoću. Ispitivanja dece sa mutacijama u genu za CYP11A1 kod kojih su konstatovani ozbiljni poremećaji steroidogeneze u nadbubrežnim žlezdama i gonadama do poremećaja samo u sintezi glukokortikoida, pokazuju da su neka rođena u normalnom terminu za porođaj, a neka pre termina. Takođe, rođenje bez poremećaja u trudnoći, utvrđeno je kod homozigotnih miševa kojima je utišan CYP11A1. Iz ovih podataka bi se moglo pretpostaviti da CYP11A1 nije esencijalan za preživljavanje fetusa. Međutim, većina miševa kojima nedostaje CYP11A1 umire 1 do 2 dana nakon rođenja.

Eksprimiranje CYP11A1 je regulisano sa cAMP u jajnicima, testisima i u retikularnoj zoni nadbubrežnih žlezda, dok je u glomerularnoj zoni nadbubrežnih žlezda regulisano protein kinazom C (PKC). Transkripcija CYP11A1 određuje količinu ovog proteina, a time i kapacitet ćelija za produkciju steroidnih hormona. U nadbubrežnoj žlezdi i gonadama, transkripcioni faktor SF1 ima važnu ulogu u eksprimiranju CYP11A1, dok je u posteljici čoveka transkripcija zavisna od transkripcionog faktora CP2. U jajnicima, CYP11A1 se uglavnom eksprimira u ćelijama žutog tela, a nešto manje u granulosa ćelijama. U ćelijama žutog tela LRH-1 je glavni transkripcioni faktor koji reguliše CYP11A1, dok su LRH-1, GATA4 i CREB glavni transkripcioni faktori koji regulišu CYP11A1 u granulosa ćelijama. Istraživanja su takođe pokazala da modifikacija histona i hromatinsko remodelovanje mogu da imaju značajnu ulogu u regulaciji CYP11A1 u granulosa ćelijama tokom luteinizacije i ovulacije. Ove epigenetske promene na promotoru CYP11A1 mogu da se jave tokom stimulacije sa LH, a pokazana je značajna uloga transkripcionog faktora CEBP $\beta$ .

### 4.3.2. 17 $\beta$ -hidroksilaza/17,20-liaza (CYP17A1)

CYP17A1 je enzim koji ima dve aktivnosti hidroksilaznu i liaznu. Ovaj enzim katališe hidroksilaciju pregnenolona i progesterona na C17 atomu (17 $\alpha$ -hidroksilazna aktivnost), a zatim i konverziju ovih hidroksi derivata do C19 steroida, odnosno, dehidroepiandrosterona (DHEA) i androstendiona (17,20-liazna aktivnost) (Slika 4.6).



**Slika 4.6.** Enzimska aktivnost CYP17A1 (Slika je napravljena u Biorenderu)

Ranije se smatralo da 17 $\alpha$ -hidroksilazna i 17,20-liazna aktivnost pripadaju različitim enzimima. Ova pretpostavka je bila bazirana na činjenici da je hidroksilazna aktivnost u nadbubrežnoj žlezdi stalna tokom života, dok se liazna aktivnost javlja između 8. i 10. godine života. Takođe, klinički nalazi pacijenta koji pokazuju nedostatak 17,20-liazne aktivnosti, ali očuvane 17 $\alpha$ -hidroksilazne aktivnosti su govorile u prilog pretpostavci o postojanju dva enzima. Međutim, kloniranje CYP17A1 govečeta i testiranje njegove enzimске aktivnosti je pokazalo da jedan enzim ispoljava obe aktivnosti što je dovelo do promene pretpostavke o dva enzima. Kasnije se ustanovilo da postoji jedan gen za CYP17A1 koji se nalazi na hromozomu 10q24.3. CYP17A1 se eksprimira u najvećoj meri u nadbubrežnoj žlezdi i gonadama, ali se može naći i u koži, mozgu, placenti i srcu.

Različiti transkripcijski faktori kao što su SF-1, SP1 i SP3 (engl. *specificity protein*) i GATA4 i GATA 6 regulišu ekspimiranje CYP17A1 u nadbubrežnoj žlezdi. Članovi porodice proteina koji se vezuju za sterol regulatorni element (engl. *sterol regulatory element binding proteins*, SREBP) također mogu da regulišu ekspimiranje CYP17A1. S obzirom da ovi faktori kontrolišu i biosintezu holesterola može se pretpostaviti da ova porodica povezuje kontrolu steroidogeneze sa kontrolom produkcije holesterola.

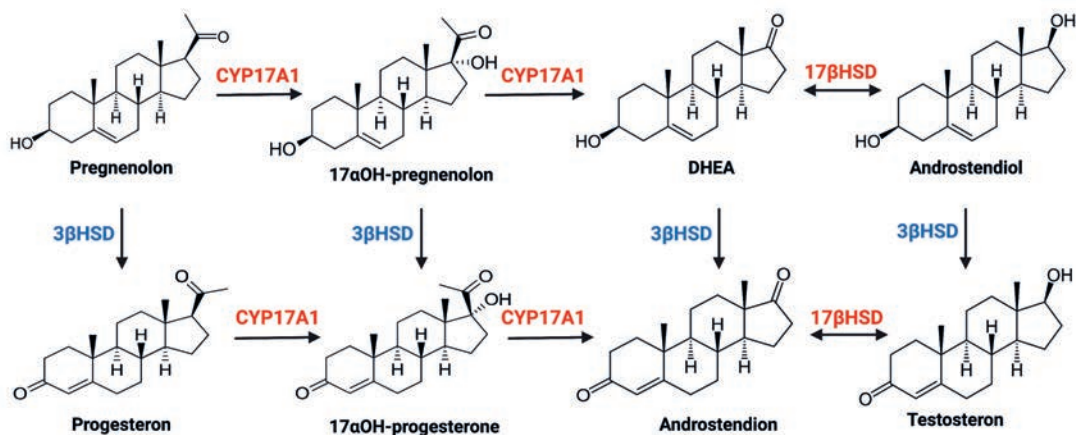
CYP17A1 kod čoveka podjednako efikasno konvertuje pregnenolon i progesteron u njihove hidroksi derivate, međutim postoji razlika u 17,20-liaznoj aktivnosti. 17,20-liazna aktivnost je mnogo efikasnija prema 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolonu, nego prema 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteronu. Stoga, kod čoveka 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron nije bitan prekursor za sintezu steroidnih hormona. Postojanje dve enzimске aktivnosti CYP17A1 također određuje steroidne produkte u određenom tkivu. Tako, u glomerularnoj zoni nadbubrežnih žlezda nije prisutna ni jedna aktivnost CYP17A1 što dovodi do kompletne konverzije pregnenolona u mineralokortikoide. Sa druge strane, fascikulatna zona pokazuje 17 $\alpha$ -hidroksilaznu aktivnost ali ne i 17,20-liaznu aktivnost što dovodi do produkcije glukokortikoida. U retikularnoj zoni prisutne su obe aktivnosti enzima pa se stoga pregnenolon konvertuje u prekursore androgena i estrogena.

Hidroksilazna i liazna aktivnost CYP17A1 zahtevaju elektrone i molekularni kiseonik. U elektron transfer lancu redukcioni ekvivalenti idu od NADPH na CYP17A1 preko NADPH:citohrom P450 reduktaze. To je membranski vezan flavoprotein koji se razlikuje od flavoproteina mitohondrija, feredoksina, koji učestvuje u transferu elektrona od NADPH do CYP11A1. Sastoji se od dva domena. Prvi domen sadrži FAD, a drugi FMN i terminalne aminokiseline koje vezuju enzim za endoplazmatični retikulum. FMN stupa u interakciju sa odgovarajućim veznim mestom na CYP17A1. Značaj NADPH:citohrom P450 reduktaze u metabolizmu steroidnih hormona je pokazan kod osoba koje imaju nedostatak ovog enzima. Kod njih dolazi do hiperplazije nadbubrežnih žlezda. Takođe, miševi kod kojih je onemogućeno ekspimiranje ovog enzima umiru tokom fetalnog razvoja. Pored ove reduktaze, citohrom-b5 (engl. *cytochrom b5*, cyt-b5) također predstavlja važnu komponentu u aktivnosti CYP17A1. Cyt-b5 je mali hemoprotein koji se nalazi vezan za membranu endoplazmatičnog retikuluma. Stupa

u interakciju sa CYP17A1 i stimuliše 17,20 liaznu aktivnosti ovog enzima. Prvo se smatralo da cyt-b5 deluje kao alternativni donor elektrona za CYP enzime, međutim redoks potencijal cyt-b5 i CYP enzima je nepovoljan za transfer elektrona. Dalja istraživanja su pokazala da cyt-b5 ima ulogu alosteričnog regulatora 17,20-liazne aktivnosti CYP17A1. Pokazano je da cyt-b5 stimuliše promenu konformacije enzima koji omogućava repositioniranje steroidnih supstrata, jer liazna aktivnost zahteva poravnanje C20, a ne C17, sa gvožđe-kiseonik kompleksom na molekulu CYP17A1.

### 4.3.3. $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza / $\Delta^5$ - $\Delta^4$ izomeraza ( $3\beta$ HSD)

$3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze / $\Delta^5$ - $\Delta^4$  izomeraza ( $3\beta$ HSD) su membranski vezani enzimi koji se nalazi na membrani endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija i koriste  $\text{NAD}^+$  kao koenzim. Ovaj enzim katališe dve reakcije, oksidaciju hidroksilne grupe steroida na atomu C3 u keto grupu i izomerizaciju dvostruke veze ( $\Delta^5$ - $\Delta^4$ ). Stoga,  $3\beta$ HSD konvertuje pregnenolon u progesteron,  $17\alpha$ -hidroksipregnenolon u  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron, DHEA u androstendion i androstendion u testosteron (Slika 4.7). Tokom reakcije međuproizvod,  $\Delta^5$  ketosteroid, ostaje vezan za  $3\beta$ HSD gde vezivanje kofaktora aktivira drugu enzimsku reakciju i dolazi do  $\Delta^5$ - $\Delta^4$  izomerizacije.



Slika 4.7. Enzimski aktivnost  $3\beta$ HSD (Slika je napravljena u Biorenderu)

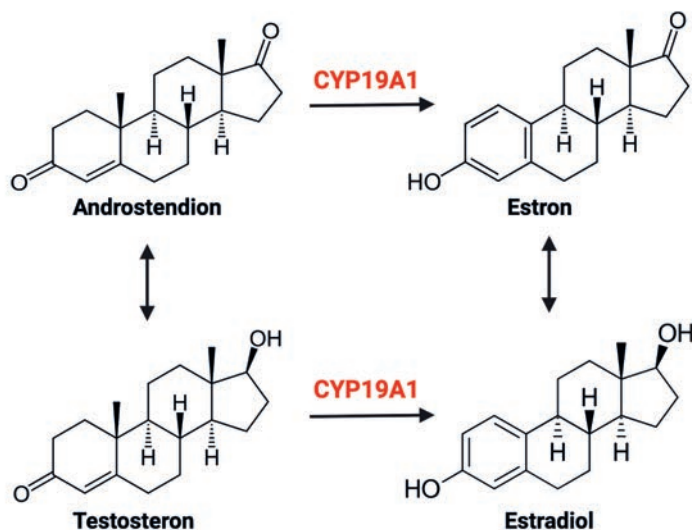
Kod čoveka postoje dva aktivna gena  $3\beta$ HSD koji se nalaze na hromozomu 1p13.1. Prvi gen koji se označava sa  $3\beta$ HSD1 daje produkt od 372 aminokiselina i dominantno se eksprimira u posteljici, jetri, mozgu i mlečnoj žlezdi. Drugi gen koji daje produkt od 371 aminokiselina se dominantno eksprimira u gonadama i nadbubrežnim žlezdama i nosi oznaku  $3\beta$ HSD2. Ova dva gena dele 93,5% sličnosti u sekvenci. Genom čoveka takođe ima pet pseudogena koji su blisko povezani sa  $3\beta$ HSD ali se ne prepisuju (nemaju *open reading frame*). Poređenjem enzimskih aktivnosti ova dva aktivna gena je pokazano da  $3\beta$ HSD1 ima veći afinitet ka supstratima od  $3\beta$ HSD2. Razlika u afinitetima ova dva enzima ka supstratima mogla bi se objasniti činjenicom da se  $3\beta$ HSD1 dominantno eksprimira u perifernim tkivima gde katališe konverziju relativno male količine supstrata u odnosu na gonade ili nadbubrežne žlezdu gde se nalaze veće količine supstrata.

Većina tkiva koja proizvode steroide pokazuju veliki kapacitet za produkciju progesterona kada im se ponudi pregnenolon, te se smatra da  $3\beta$ HSD nije ograničavajući enzim u steroidogenezi. Međutim, mutacije koje uslovljavaju smanjenje aktivnosti ovog enzima dovode do određene forme nadbubrežne hiperplazije koja se karakteriše nemogućnosti ove žlezde da proizvodi steroide te dolazi do akumulacije  $\Delta 5$  steroida u cirkulaciji.

Regulacije transkripcije  $3\beta$ HSD2 koja se eksprimira u gonadama je kompleksna i uključuje veći broj signalnih puteva i transkripcionih faktora. Neke studije su pokazale da je transkripcioni faktor SF-1 neophodan za stimulaciju prepisivanja  $3\beta$ HSD2 nakon aktivacije signalnog puta cAMP. Međutim tačan mehanizma preko kojeg cAMP i SF-1 dovode do povećanja transkripcije  $3\beta$ HSD2 nije razjašnjen. Pored SF-1, STAT5 (engl. *signal transducer and activator of transcription*) je identifikovan kao transkripcioni faktor koji učestvuje u regulaciji  $3\beta$ HSD2. Ovakva uloga STAT5 je proizišla iz dva nalaza: prvi je da se nivo STAT5 povećava u jajnicima nakon 5 dana kod pseudotrudnih pacova, a drugi da je regulatorna sekvenca za STAT5 pronađena u promotorskom regionu gena za  $3\beta$ HSD2. Takođe je opisana i uloga DAX-1 (engl. *dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome 1*), GATA4 i GATA6 koji samostalno ili zajedno sa SF-1 aktiviraju transkripciju gena za  $3\beta$ HSD2.

### 4.3.4. Aromataza (CYP19A1)

CYP19A1 je vezan za endoplazmatski retikulum i vrši aromatizaciju androgena u estrogene. Kao supstrati se najčešće koriste androstendion i testosteron (Slika 4.8), a proces se odvija u nekoliko uzastopnih reakcija i zahteva prisustvo tri molekula kiseonika i tri molekula NADPH. Sve tri reakcije se dešavaju na jednom aktivnom mestu na enzimu i praćene su prenosom elektrona na CYP19A1 preko NADPH:citohrom P450 reduktaze.



**Slika 4.8.** Enzimska aktivnost CYP19A1 (Slika je napravljena u Biorenderu)

Gen za CYP19A1 se nalazi na hromozomu 15q21.1. Ovaj gen ima različite promotorske sekvence koje omogućavaju specifično prepisivanje u tkivima pod uplivom različitih hormona. Promotor II kontroliše transkripciju CYP19A1 u jajnicima, odnosno preovulatornim folikulima i žutom telu kao i u stromi endometrijuma. U posteljici, alternativni promotori I.1, I.2 i I.2a kontrolišu prepisivanje CYP19A1, dok promotor I.4 reguliše prepisivanje ovog gena u masnom tkivu i koži. U mlečnoj žlezdi, promotor I.4 u većoj meri i promotori I.3 i II u manjoj meri regulišu prepisivanje CYP19A1. Transkripcija CYP19A1 u podkožnom masnom tkivu i ćelijama kancera mlečne žlezde je pod kontrolom promotora I.7.

Prisustvo različitih promotorskih sekvenci u genu za CYP19A1 omogućava da različiti hormoni i signalni putevi regulišu prepisivanje ovog gena. U jajnicima, cAMP signalni put reguliše transkripciju ovog gena nakon stimulacije granulosa ćelija sa folikulostimulišućim hormonom (FSH). Međutim, pokazano je da protein kinaza B (PKB ili AKT) učestvuje u kontroli transkripcije CYP19A1 u granulosa ćelijama koje su stimulirane sa FSH. Efekat AKT ostvaruje preko aktivacije transkripcionog faktora FOXO1 (engl. *forkhead box O1*) odnosno uklanjanja inhibitornog delovanja ovog transkripcionog faktora na CYP19A1. Identifikovani su i drugi transkripcioni faktori koji regulišu prepisivanje CYP19A1 u jajnicima kao što su receptori za estradiol, zatim SF-1, GATA4 i drugi.

Nešto drugačija regulacija transkripcije CYP19A1 se javlja tokom stimulacije granulosa ćelija sa LH. Naime, aktivacija receptora za LH (LHR) dovodi do smanjenja transkripta za CYP19A1, a ovaj inhibicioni efekat se ostvaruje aktivacijom signalnog puta vanćelijskim stimulusima aktivirane kinaze 1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, ERK1/2). Inhibicioni efekat na CYP19A1, ERK1/2 ostvaruje aktivacijom transkripcionog faktora CEBP $\beta$ . Pored ERK1/2 i CEBP $\beta$  pokazana je i važna uloga inducibilnog ranog represora cAMP u inhibiciji prepisivanja CYP19A1 gena. U mlečnim žlezdama, glukokortikoidi, zatim faktor nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF $\alpha$ ) i interleukin 11 regulišu prepisivanje CYP19A1 delujući na transkripcione faktore c-FOS i c-Jun koji se potom vezuju za AP-1 vezno mesto na promotoru I.4 gena za CYP19A1. Međutim, citokini i kortikoidi mogu da ostvaruju svoj efekat i preko kinaze JAK (engl. *janus kinase/signal transducers*) i transkripcionog faktora STAT (JAK/STAT). Promotor I.3/II se stimuliše signalnim putem čiji su elementi prostaglandin-E<sub>2</sub>-PKA-PKC koji zatim aktivira tri glavna puta regulacije prepisivanja gena za CYP19A1. Prvi signalni put predstavlja aktivaciju LRH-1 koji se zatim vezuje za SP-1 mesto na promotoru I.3/II gena za CYP19A1. Drugi signalni put čini PKA-CREB koji se vezuje za CRE mesto na promotoru I.3/II, dok u trećem signalnom putu učestvuje mitogenim stimulusima aktivirana kinaza p38 (engl. *mitogen activated protein kinase p38*, MAPKp38), JNK i faktor aktivacije transkripcije 2 (engl. *activating transcription factor 2*, ATF2) i c-JUN koji se aktiviraju putem PKA ili PKC i takođe se vezuju za promotor I.3/II.

Iako se dugo smatralo da je aktivnost CYP19A1 važna za razvoj fetusa, prisustvo nefunkcionalnog enzima kod odraslih osoba je ukazalo da formiranje estrogena tokom trudnoće nema veći značaj za razvoj fetusa. Međutim, u ovim trudnoćama nedostatak CYP19A1 aktivnosti dovodi do smanjenja koncentracije estrogena u urinu majke, virilizacije majke (razvoj sekundarnih muških karakteristika) i ženskog pseudohermafroditizma kod ženskih fetusa. Virilizacija fetusa i majke u stvari opisuje značaj posteljice u konverziji androgena u estrogene. U odsustvu CYP19A1 aktivnosti u posteljici, androgeni koji se sintetišu u nadbubrežnoj žlezdi fetusa prelaze u cirkulaciju majke dovodeći do virilizacija majke. Iz ovog se može uočiti da CYP19A1 obavlja aromatizaciju androgena u placenti u cilju zaštite fetusa i majke od visokih koncentracija ovih steroida.

#### 4.3.5. 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehidrogenaza (17 $\beta$ HSD)

17 $\beta$ HSD su grupa membranski vezanih enzima koja učestvuje u većem broju reakcija u različitim tkivima. U gonadama, nadbubrežnim žlezdama i posteljici, 17 $\beta$ HSD redukuju 17-ketosteroide u biološki mnogo aktivnije 17-hidroksisteroide, dok u drugim ciljnim tkivima 17 $\beta$ HSD oksiduju 17-hidroksisteroide i tako umanje njihovu biološku aktivnost. Kod čoveka je identifikovano 7 od 14 poznatih sisarskih 17 $\beta$ HSD (označenih od 1 do 14). Svaka od ovih izoformi ima svoj supstrat i drugačiji koenzim, lokalizaciju u ćeliji kao i specifično prepisivanje u tkivima.

17 $\beta$ HSD1 konvertuje slab estrogen, estron, u mnogo potentniji estradiol i zbog toga je dobio naziv estrogeni 17 $\beta$ HSD. 17 $\beta$ HSD1 može da konvertuje i 16 $\alpha$ -hidroksiestron u estriol. Ovaj enzim se nalazi u citoplazmi i koristi NADH ili NADPH kao koenzime. Gen se nalazi na hromozomu 17q11-q21 i daje produkt od 34 kDa. Prepisuje se primarno u sinciciotrofoblastu posteljice i u granuloza ćelijama. 17 $\beta$ HSD1 se takođe eksprimira u tumorima mlečne žlezde i njegovo pristustvo je povezano sa manjom stopom preživljavanja od ove bolesti.

Za razliku od 17 $\beta$ HSD1, 17 $\beta$ HSD2 je izoenzim koji se nalazi u endoplazmatičnom retikulumu i inaktiviše hormone u ciljnim tkivima. Tako, 17 $\beta$ HSD2 inaktiviše steroide gonada tako što ih oksidiše u 17-keto jedinjenja koja imaju manju biološku aktivnost. U endometrijum materice



kod žene, ovaj enzim inaktivira estradiol tako što ga konvertuje u manje potentan estron. Takođe, ovaj enzim konvertuje testosteron u androstendion i dihidrotestosteron u  $5\alpha$ -androstendion. Njegova uloga u smanjenju biološke aktivnosti hormona je u skladu sa tkivnom ekspresijom.  $17\beta$ HSD2 se eksprimira u endotelijalnim ćelijama kapilara i većih krvnih sudova posteljice, endometriju, jetri i drugim tkivima. U kapilarima endometrija,  $17\beta$ HSD2 konvertuje estradiol poreklom iz sinciciotrofoblasta u manje potentan estron, a od testosterona koji je izbegao aromatizaciju formira androstendion i na taj način štiti fetus od delovanja ovih steroidnih hormona. U mlečnoj žlezdi prepisivanje  $17\beta$ HSD2 je veće nego  $17\beta$ HSD1.

$17\beta$ HSD3 se naziva i androgena  $17\beta$ HSD jer katališe finalni korak u biosintezi androgena u Lejdigovim ćelijama, odnosno redukciju androstendiona u testosteron. Takođe, ovaj enzim može da redukuje estron do estradiola.  $17\beta$ HSD3 se nalazi u endoplazmatičnom retikulumu testisa. Gen je lociran na hromozomu 9q22 i sastoji se od 11 egzona. Za  $17\beta$ HSD3 je ustanovljena uloga u fiziologiji čoveka jer su pronađene osobe sa sindromom nedostatka ovog enzima. Kod muškaraca se javlja pseudohermafroditizam. Testisi ovih osoba ne mogu da prevode androstendion u testosteron što dovodi do značajne razlike u koncentraciji androstendiona u odnosu na testosteron u cirkulaciji. Primećeno je prisustvo malih količina testosterona kod ovih osoba što ukazuje da druge  $17\beta$ HSD mogu da kompenzuju nedostatak  $17\beta$ HSD3 ali ne u dovoljnoj meri. Ženske osobe sa nedostatkom  $17\beta$ HSD su asimptomatične i stvaraju normalne količine estrogena i androgena.

Aktivnost  $17\beta$ HSD4 je slična aktivnosti enzima  $17\beta$ HSD2. U peroksimima pored konverzije estradiola u manje aktivni estron, ovaj enzim učestvuje i u beta-oksidaciji masnih kiselina. Nedostatak ovog enzima dovodi do sindroma kod koga se uočava poremećaj u sintezi žučnih kiselina ali ne i steroidogenezi (Zellweger sindrom). Zbog toga se smatra da primarna fiziološka uloga  $17\beta$ HSD4 nije u steroidogenezi.

$17\beta$ HSD5, za razliku  $17\beta$ HSD1 i  $17\beta$ HSD4 koje pripadaju familiji dehidrogenaza reduktaza kratkog lanca, pripada familiji aldo-keto reduktaza. Ovaj enzim katališe redukciju androstendiona do testosterona. Prepisuje se u tkivima koja produkuju steroidne hormone ali i u tkivima koja ne-

maju tu ulogu. U teka ćelijama jajnika ovaj enzim predstavlja androgeni  $17\beta$ HSD. U nadbubrežnim žlezdama fetusa  $17\beta$ HSD5 se mnogo više prepisuje u odnosu na  $17\beta$ HSD3 te značajno doprinosi formiranju testostetona u ovim žlezdama, a naročito u virilizaciji koja je izazvana urođenom nadbubrežnom hiperplazijom.

$17\beta$ HSD6 je mikrozomalni enzim koji pripada familiji dehidrogenaza kratkog lanca, gen se nalazi na hromozomu 12q13.3 i eksprimira se u prostati.  $17\beta$ HSD6 pokazuju oksidoreduktaznu i epimeraznu aktivnost. Oksidoreduktazna aktivnost je usmerena na konverziju 3-alfa-diola kao što je androstendiol u dehidrotetosteron dok epimerazna aktivnost konvertuje androsteron u epiandrosteron.

#### 4.3.6. 21-hidroksilaza (CYP21A2)

CYP21A2 se nalazi u nadbubrežnoj žlezdi i katališe hidroksilaciju C atoma na poziciji 21 na progesteronu i  $17\alpha$ -hidroksiproprogesteronu što je prvi korak u sintezi mineralokortikoida i glukokortikoida. Da bi ostvario svoju aktivnost, ovaj enzim zahteva molekulski kiseonik i redukcionu ekvivalente koji se dobijaju od NADPH preko elektron transportnog sistema NADPH:citohrom P450 reduktaze.

Postoje dva lokusa za CYP21A2, jedan, koji daje funkcionalni protein i ima naziv CYP21A2, i drugi, pseudogen, koji ima oznaku CYP21A1P i ne formira funkcionalni protein, iako se lokus prepisuje. Aktivni gen CYP21A2 i pseudogen dele 98% sličnosti u sekvenci odnosno razlikuju se u 65 nukleotida. CYP21A2 i pseudogen se nalazi u regionu ljudskog leukocitnog antigena klasa II (engl. *human leukocyte antigene class II*, HLA class II) (kraći krak hromozoma 6p21.3). Pošto HLA lokus lako podleže rekombinacijama, to dovodi i do rekombinacija između CYP21A2 i pseudogena. Stoga oko 75–80% slučajeva nedostatka aktivnosti enzima CYP21A2 nastaje zbog prenosa većih ili manjih sekvenci nukleotida sa pseudogena na CYP21A2 što dovodi do smanjenog prepisivanja ili aktivnosti ovog enzima.

Nedostatak 21-hidroksilazne aktivnosti koja nastaje kao posledica mutacija u genu za CYP21A2 dovodi do urođene hiperplazije nadbubrežnih žlezda koja se manifestuje smanjenjem formiranja kortizola i aldosterona. Takođe dolazi i do nakupljanja androgena u nadbubrežnim žlezdama zbog

povećanog nivoa ACTH koji nastaje usled nedostatka negativne povratne sprege regulisane kortizolom. ACTH i cAMP signalni put su glavni regulatori prepisivanja gena *CYP21A2* u nadbubrežnim žlezdama.

#### **4.3.7. 11 $\beta$ hidroksilaza i aldosteron sintaza (CYP11B1 i CYP11B2)**

CYP11B1 i CYP11B2 su enzimi koji katališu poslednji korak u sintezi glukokortikoida i mineralokortikoida. Kortizol, koji je glavni glukokortikoid kod čoveka, formira se 11 $\beta$  hidroksilacijom supstrata 11-deoksikortizola. Kod čoveka, tri poslednja koraka u sintezi najvažnijeg mineralokortikoida, aldosterona, su 11 $\beta$ -hidroksilacija supstrata 11-deoksikortikosterona koja dovodi do formiranja kortikosterona. Kortikosteron se zatim 18-hidroksilacijom prevodi u 18-hidroksikortikosteron, a ovaj međuprodukt se dalje oksiduje do aldosterona. U *in vitro* uslovima je pokazano da CYP11B1 (11 $\beta$ -hidroksilaza) i CYP11B2 (aldosteron sintaza) mogu da vrše 11 $\beta$  hidroksilaciju 11-deoksikortikosterona i 11-deoksikortizola. Međutim, CYP11B1 ima isključivo 11 $\beta$ -hidroksilaznu aktivnost, i ne pokazuje 18-hidroksilaznu ili 18-oksida-znu aktivnost. Sa druge strane CYP11B2 ima slabiju 11 $\beta$ -hidroksilaznu aktivnost ali poseduje značajnu 18-hidroksilaznu i 18-oksida-znu aktivnost koje su važne za sintezu aldosterona. Drugačije, CYP11B1 dominantno katališe sintezu kortizola od 11-deoksikortizola, odnosno kortikosterona od 11-deoksikortikosterona. Za razliku od čoveka, goveda poseduju jedan enzim koji je kodiran jednim genom i koji katališe sve reakcije u formiranju kortizola i aldosterona, dok pacovi imaju tri funkcionalna gena za CYP11B.

Geni za ove enzime su locirani na hromozomu 8q24.3, razdvojeni su 40 kb, pokazuju 93% sličnosti i svaki ima devet egzona. Oba enzima se nalaze na unutrašnjoj membrani mitohondrija i koriste feredoksin reduktazu i feredoksin za transfer elektrona od NADPH. CYP11B1 je više zastupljen u fascikulatnoj zoni, u manjoj meri ga ima u retikularnoj zoni, a potpuno je odsutan u glomerularnoj zoni nadbubrežnih žlezda. Stoga je i produkcija kortizola ograničena na ove dve zone. Za razliku od njega, CYP11B2 se isključivo prepisuje u glomerularnoj zoni gde je i mesto produkcije mineralokortikoida. Ekspimiranje CYP11B1 je stimulirano sa ACTH i cAMP signalnim putem. Sa druge strane, CYP11B2 je regulisan Ca<sup>2+</sup>, aktivacijom

PKC koja je zavisna od angiotenzina II, a u ovoj regulaciji učestvuje i nekoliko transkripcionih faktora kao što su SF-1, NURR1 i NUR77.

Mutacije u genu za CYP11B1 dovode do nedostatka 11 $\beta$ -hidroksilazne aktivnosti. Oko 5–8% urođenih nadbubrežnih hiperplazija u Evropi se karakteriše nedostatkom ove aktivnosti. Kod pacijenata se javljaju visoki nivoi 11-deoksikortizola i 11-deoksikortikosterona što dovodi do retencije soli i visokog krvnog pritiska. Kod žena se javlja virilizacija zbog visokog nivoa androgena koji se produkuju u nadbubrežnim žlezdama. Nedostatak aktivnosti enzima CYP11B2 dovodi do prekida u sintezi aldosterona, ali sa normalnom produkcijom kortizola i kortikosterona.

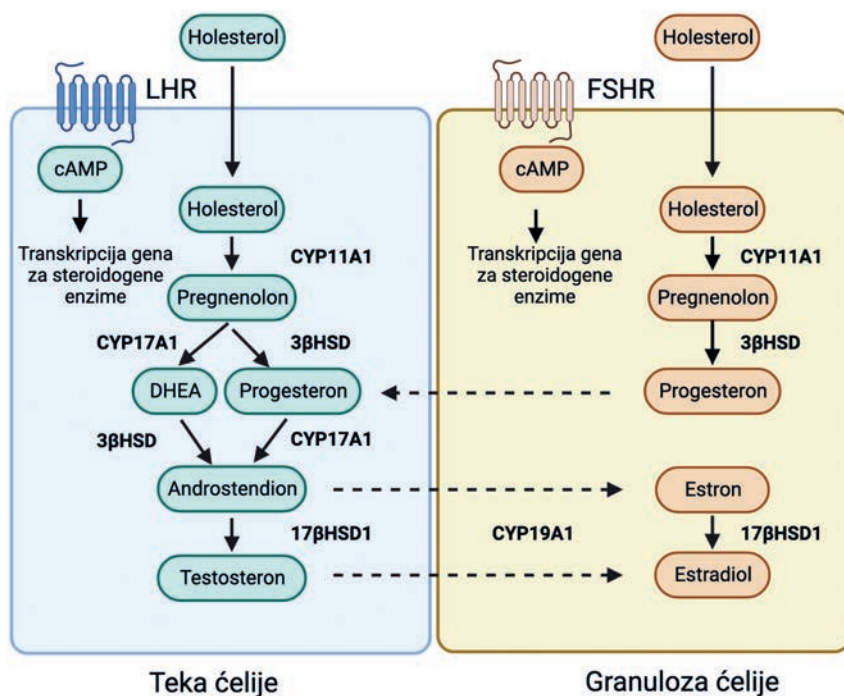
## 4.4. STEROIDOGENEZA U JAJNICIMA

Biološki aktivni steroidi koji se luče iz jajnika su estradiol i progesteron. Produkcija estradiola i progesterona je kontrolisana sa FSH i LH. Preovulatorni folikuli, pod uticajem FSH, luče estradiol, dok se produkcija i lučenje progesterona javlja nakon stimulacije sa LH. Jajnici mobilišu holesterol iz lipidnih kapi za produkcije steroidnih hormona. Dokazano je da LH povećava ekspimiranje receptora za LDL na površini ćelija aktivacijom signalnog puta cAMP-PKA. Iz ovog se može pretpostaviti da jajnici izdvajaju holesterol iz LDL, a zatim ga i skladište u lipidnim kapima odakle se koristi za produkciju progesterona u granuloza ćelijama i žutom telu.

### 4.4.1. Model dve ćelije

Model koji objašnjava steroidogenezu u jajnicima se naziva teorija ili model dve ćelije (Slika 4.9). Dobio je naziv po saradnji dve grupe ćelija, teka i granuloza u sintezi biološki aktivnih steroidnih hormona u folikulima. U preovulatornim folikulima, estradiol je glavni steroidni hormon koji se produkuje. Produkcija estradiola zahteva saradnju granuloza i teka ćelija. Pod uticajem LH u teka ćelijama dolazi do povećanja prepisivanja i aktivnosti proteina STAR koji dovodi holesterol do unutrašnje membrane mitohondrija gde se dalje vrši njegova transformacija u pregnenolon pod dejstvom enzima CYP11A1. Pregnenolon se zatim prevodi do androstendiona aktivnošću dva enzima 3 $\beta$ HSD2 i CYP17A1, odnosno do testosterona.

na uz pomoć  $17\beta\text{HSD1}$ . Nastali androgeni prelaze u granulosa ćelije gde dolazi do njihove aromatizacije u estradiol. Naime, aktivacijom receptora za FSH na granulosa ćelijama dolazi do povećanja prepisivanja i aktivnosti enzima CYP19A1 i  $17\beta\text{HSD1}$ . CYP19A1 će prevesti testosteron u estradiol odnosno androstendion u estron, dok će  $17\beta\text{HSD1}$  prevesti estron u estradiol. Međutim, nameće se pitanje zašto granulosa ćelije dobijaju androgene iz teka ćelija odnosno, zašto ove ćelije ne mogu same da prave androgene. Naime, u granulosa ćelijama čoveka, FSH može da stimuliše sintezu STAR, CYP11A1 i  $3\beta\text{HSD}$  što omogućava sintezu pregnenolona i progesterona. Međutim, FSH ne stimuliše prepisivanje gena za CYP17A1 što onemogućava dalju konverziju pregnolona do androstendiona. Stoga, nastali progesteron prelazi iz granulosa u teka ćelije i tamo se dalje konvertuje do androstendiona. Prema tome, granulosa ćelije čoveka nisu u mogućnosti da same proizvode supstrat za estradiol već ga dobijaju iz teka ćelija.



**Slika 4.9.** Steroidogeneza u jajnicima – model dve ćelije  
(Slika je napravljena u Biorenderu)

Kod granulosa ćelija pacova situacija je nešto drugačija. Kod ovih ćelija aktivnost CYP17A1 je prisutna i one mogu da produkuju estrogene od progesterona, odnosno ne zahtevaju upliv androgena iz teka ćelija. U granulosa ćelijama ovulatornih folikula i ćelijama žutog tela progesteron postaje glavni steroidni hormon. Upliv LH, kod ovih ćelija, dovodi do smanjenja prepisivanja i aktivnosti CYP19A1, a time i smanjenja produkcije estradiola. Istovremeno se stimuliše prepisivanje i aktivnost enzima koji učestvuju u sintezi progesterona, a tako se povećava produkcija ovog steroida. Može se reći da granulosa ćelije tokom razvoja folikula menjaju program steroidogeneze, te od ćelija koje produkuju estradiol, tokom preovulatarne faze, postaju ćelije koje produkuju progesteron tokom ovulatorne faze i faze žutog tela.

## 4.5. RECEPTORI ZA STEROIDNE HORMONE

Steroidi su mali lipofilni molekuli koji prolaze kroz ćelijsku membranu. U ćeliji, steroidi se vezuju za svoje receptore, koji se nazivaju steroidni receptori i na taj način menjaju funkciju ćelije. Kao što je već istaknuto, postoji veliki broj steroidnih hormona. Gonade su mesto produkcije polnih steroidnih hormona estrogena, progesterona i androgena dok su nadbubrežne žlezde mesto sinteze mineralokortikoida i glukokortikoida. Iako ovi hormoni imaju zajednički prekursor holesterol i pokazuju strukturnu sličnost svaki od njih se vezuje za svoj specifičan receptor. Interakcija između steroidnog hormona i receptora omogućava da svaki od ovih hormona kontroliše određenu funkciju ćelije.

Steroidni receptori pripadaju velikoj familiji evolutivno i strukturno sličnih proteina koji se nazivaju nuklearni receptori. Svi nuklearni receptori imaju modularnu strukturu, sa nekoliko domena: (i) varijabilni, terminalni domen koji se nalazi na amino-kraju, N-terminalni domen (A/B), (ii) visoko konzerviran domen koji se vezuje za DNK (C), (iii) visoko varijabilan vezni domen u okviru koga se nalazi signal za lokalizaciju u jedru (D) i (iv) delimično konzerviran domen koji vezuje hormon ili ligand (E). Neki od nuklearnih receptora mogu da imaju F domen na karboksilnom C-kraju molekule (Slika 4.10).



**Slika 4.10.** Strukturna organizacija nuklearnih receptora  
(Slika je napravljena u Biorenderu)

Receptori sadrže i dva subdomena koji su važni za aktivaciju transkripcije. Označeni su kao AF-1 i AF-2 (engl. *activation function 1 and 2*). AF-1 se nalazi u N-terminalnom domenu i nezavisan je od vezivanja liganda, dok se AF-2 nalazi u domenu koji vezuje ligand i aktivira se vezivanjem liganda. Domen koji se vezuje za DNK sadrži dva karakteristična motiva koji se označavaju kao cinkani prsti. Svaki jon cinka je vezan koordinativno za četiri ostatka cisteina između kojih se nalazi lanac od 10 do 15 aminokiselina. Prvi cinkani prst koji se nalazi bliže N-kraju važan je za pozicioniranje receptora u odnosu na sekvencu DNK koja predstavlja HRE (engl. *hormone responsive element*), dok je drugi cinkani prst koji je bliže C-kraju važan za dimerizaciju receptora. Naime,  $\alpha$ -heliks 1 koji sadrži ostatke aminokiselina označene kao P-kutija, u osnovi prvog prsta uključen je u prepoznavanje HRE dok je  $\alpha$ -heliks 2 sa ostacima aminokiselina označenim kao D-kutija u osnovi drugog prsta važan je za dimerizaciju.

Pored domena koji vezuju DNK i domen koji vezuje ligand E je važan za proces dimerizacije jer su svi nuklearni receptori aktivni samo u formi homo- ili heterodimera. Neki nuklearni receptori imaju dobro definisane ligande, dok ih neki nemaju i zbog toga se nazivaju orfanski receptori (engl. *orphan receptors*).

Steroidni receptori u odsustvu hormona lokalizovani su i u citoplazmi i u jedru. U citoplazmi se nalaze u obliku heterokompleksa u čiji sastav ulaze određeni proteini toplotnog stresa i imunofilini koji mogu da obezbede konformaciju receptora optimalnu za vezivanje liganda. Vezivanje hormona izaziva disocijaciju proteina toplotnog stresa iz kompleksa i otkrivanje signala za lokalizaciju u jedru. Dolazi do transporta aktiviranog receptora u jedro.

### 4.5.1. Receptori za estrogene

Estrogeni svoje efekte ostvaruju vezujući se za estrogene receptore alfa i beta (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ). U početku se smatralo da postoji samo jedan ER, ER $\alpha$ , ali je kasnije otkriveno postojanje i ER $\beta$ . ER $\alpha$  i ER $\beta$  su produkti različitih gena, a takođe ispoljavaju različitu ekspresiju u tkivima. ER $\alpha$  se najviše eksprimira u materici, hipofizi i jajnicima, a nađen je i u jetri, hipotalamusu, kostima, mlečnim žlezdama, bubrezima, nadbubrežnim žlezdama, grlicu materice i vagini. ER $\beta$  se u većoj meri eksprimira u jajnicima, plućima i prostati. Oba ER imaju sva četiri domena koji su karakteristični za nuklearne receptore, ali poseduju i peti F domen čija funkcija nije do sada razjašnjena. Domeni C i E pokazuju visok stepen homologije između ova dva receptora dok su domeni A/B i E različiti.

Receptori za estrogene mogu da deluju preko dva osnovna mehanizma: promene u transkripciji gena (genomski efekat) i brzi negenomski efekti. Genomski efekti receptora za estrogene se odvijaju preko klasičnog direktnog vezivanja za odgovarajući HRE ili indirektnog vezivanja za druge transkripcione faktore koji se već nalaze vezani za DNK. Negenomski efekti ER bi podrazumevali aktivaciju određenih signalnih puteva u ćeliji kao što su cAMP, ERK1/2 ili fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinases*, PI3K) signalni put.

Jajnici ekspimiraju oba tipa receptora, međutim lokalizacija u delovima jajnika je drugačija. ER $\beta$  se visoko eksprimira u granulosa ćelijama, dok se ER $\alpha$  nalazi u intersticijumu i teka ćelijama. Podaci o ulozi ER u jajnicima su dobijeni iz eksperimenata sa miševima kojima nedostaje jedan od ova dva tipa receptora. Nedostatak ER $\alpha$  dovodi do izostanka ovulacije, jajnici pokazuju pristustvo malih antralnih folikula ali ne i žutog tela, a miševi su infertilni. Sa druge strane, nedostatak ER $\beta$  kod miševa izaziva subfertilnost, jajnici izgledaju relativno normalno i primećuje se prisustvo folikula u svim fazama razvoja. U materici, nedostatak ER $\alpha$  dovodi do razvoja hipoplastične materice, a takođe izostaje rast i sazrevanje materice tokom puberteta kao i odgovor na estradiol. Za razliku od ovog fenotipa, miševi kod kojih nedostaje ER $\beta$  pokazuju normalan razvoj materice kao i odgovor na estradiol. Iz svih ovih podataka se može zaključiti da ER $\alpha$  predstavlja primarni receptor koji je odgovoran za efekte estrogenih hormona u jajni-



cima i materici. Pored uloga u jajnicima i materici, ER učestvuju u regulaciji oslobađanja gonadotropina i u razvoju i diferencijaciji mlečnih žlezdi.

### 4.5.2. Receptori za progesteron

Progesteron svoje efekte ostvaruje vezivanjem za receptore za progesteron (*engl. progesterone receptor*, PR). Identifikovana su dva tipa receptora za progesteron koji su produkt jednog gena: PR-A kod kojeg nedostaje deo od 164 aminokiselina na N-terminalnom domenu i PR-B koji ima potpuna sva četiri domena. Kao i ER, PR može da ostvaruje genomske i negenomske efekte. Genomski efekat se ostvaruje nakon vezivanja progesterona za PR i translokacije receptora u jedro gde se vezuje za specifičan region na molekulu DNK. Takođe ovaj receptor može da se vezuje i za mesta na DNK koji nemaju sekvencu za vezivanje PR. Negenomski efekat se ostvaruje putem aktivacije različitih signalnih puteva u ćeliji bez vezivanja za DNK.

Mutacije gena za obe forme PR su pokazale njihovu važnu ulogu u funkciji ženskog reproduktivnog sistema. Miševi kod kojih su utišane obe forme PR pokazuju izostanak ovulacije zbog nemogućnosti prskanja folikula kao odgovor na stimulaciju gonadotropinima. Na nivou materice, PR reguliše receptivnost endometrijuma, decidualizaciju, a takođe igra ulogu u porođaju. Pored uloga u jajnicima i materici, nedostatak PR dovodi i do poremećaja u seksualnom ponašanju, neuroendokrinoj regulaciji gonadotropina, kao i razvoju i diferencijaciji mlečne žlezde. Eksperimenti u kojima su ispitivali pojedinačne uloge oba izoforme PR su pokazali da PR-A i PR-B ostvaruju različit fiziološki efekat nakon vezivanja progesterona. Takođe, PR-A inhibiše transkripcionu aktivnost PR-B što ukazuje da PR-A može da smanjuje efekat progesterona na određenom tkivu.

## 4.6. FAKTORI KOJI UTIČU NA AKTIVNOST STEROIDNIH HORMONA

Veći broj faktora može da utiče na interakciju steroidnih hormona i njihovih receptora. Ovi faktori mogu da deluju na različite procese kao što su vezivanje steroidnog hormona za receptor ili na interakciju steroidnog receptora sa molekulom DNK. Preko uticaja na ove i slične procese,

ti faktori utiču na efekte steroidnih hormona u ćeliji. U ovom delu će biti ukratko opisani najvažniji faktori koji mogu da menjaju aktivnost steroidnih receptora.

#### 4.6.1. Dostupnost hormona

Aktivacija steroidnog receptora zavisi od količine steroidnog hormona u samoj ćeliji. Koliko će steroidnog hormona biti dostupno zavisi opet od velikog broja različitih faktora. Jedan od njih je aktivacija enzima koji učestvuju u produkciji steroidnih hormona. Ukoliko je aktivnost enzima niska, koncentracija dostupnog hormona će biti mala što će uticati na sposobnost datog hormona da aktivira receptor. Tako, variranje u koncentraciji estrogena je posebno izraženo kod ženki tokom ciklusa i kreće se od koncentracija koje nisu dovoljne da aktiviraju ER, pa do koncentracija koje se javljaju sredinom ciklusa i koje su dovoljne da aktiviraju ovaj receptor. Još jedan primer kako dostupnost hormona utiče na aktivaciju receptora je njegova konverzija iz neaktivne u aktivnu formu. Napred je navedeno da je uloga određenih steroidogenih enzima da prevode steroidne hormone iz aktivne u neaktivnu formu i obrnuto.  $17\beta$ HSD1 konvertuje manje biološki aktivan hormon kao što je estron u formu koja je biološki potentnija, estradiol. Sa druge strane  $17\beta$ HSD2 konvertuje biološki aktivan estradiol u manje aktivan estron. Ova lokalna promena steroidnih hormona na nivou tkiva utiče na koncentraciju biološki aktivnog hormona što dovodi ili do aktivacije ili odsustva aktivacije steroidnog receptora.

#### 4.6.2. Transport steroidnih hormona u krvi

Na dostupnost steroidnih hormona za ciljane ćelije utiče i njihovo vezivanje za proteine iz krvi. Steroidni hormoni se vezuju za proteine u krvi i to za albumine, globuline koji vezuju polne hormone (engl. *sex hormone-binding globulin*, SHBG) i globuline koji vezuju kortikosteroide (*corticosteroid-binding globulin*, CBG). Na ovaj način steroidni hormoni se transportuju kroz krv do ćelija i tkiva. Deo hormona se transportuje u slobodnoj formi. Tako, estradiol može biti vezan za SHBG ili albumine ili u slobodnoj formi. Proces vezivanja steroidnih hormona za ove proteine je od važno-

sti za njihovu dostupnost za ćelije. Naime, smatra se da samo slobodni hormoni koji nisu vezani za neke od ovih proteina mogu da prolaze kroz ćelijsku membranu odnosno da budu dostupni ćeliji. Tako je pokazano da je količina SHBG u krvi tokom detejnstva visoka što onemogućava preuranjeno dejstvo polnih hormona na osovinu hipotalamus-hipofiza-gonade pre pojave puberteta. Jetra je odgovorna za sintezu SHBG i CBG, ali su geni za ove proteine nađeni i u nekim drugim tkivima u kojima produkti ovih gena nemaju istu ulogu kao i u krvi.

### 4.6.3. Ekspimiranje receptora za steroidne hormone

Prisutnost receptora za steroidne hormone ima značajnu ulogu u delovanju steroidnih hormona na određene ćelije. Ćelije koje nemaju receptore za steroidni hormon ne mogu da odgovore na isti, dok ćelije koje imaju veću količinu receptora mogu da odgovore i na male koncentracije steroidnih hormona. Nekoliko mehanizama reguliše prisutnost receptora za steroidne hormone. Prvi mehanizam podrazumeva delovanje na iRNK za steroidni receptor. Ovo je jedan od najbolje okarakterisanih mehanizama koji omogućava povećanje ili smanjenje količine receptora za steroidne hormone u ćeliji. Jedan od primera je efekat na iRNK za PR u ventromedijalnom hipotalamusu. Naime, PR se ne ekspimirira u ventromedijalnom hipotalamusu pre ovulacije i zbog toga ova struktura nije osetljiva na delovanje progesterona. Estradiol, čija koncentracija raste pre ovulacije, deluje na svoj receptor u ventromedijalnom hipotalamusu povećavajući ekspimiranje iRNK većeg broja gena uključujući i iRNK za PR. Na taj način nivo PR počinje da raste u ventromedijalnom hipotalamusu što rezultira povećanom osetljivošću ovog dela hipotalamusa na dejstvo progesterona. Drugi mehanizam je efekat na stabilnost iRNK koji može da utiče na količinu određenog receptora u ćeliji. Tako recimo, talas LH koji se javlja pre ovulacije dovodi do smanjenja iRNK za ER $\beta$  u granulosa ćelijama. Ovo smanjenje nije posledica delovanja LH na prepisivanje receptora za ER $\beta$  već na poluživot iRNK za ovaj receptor koji se smanjuje sa 18 h na 5 h. Kraći poluživot iRNK dovodi do smanjenja količine proteina što će uticati na odgovor ćelija na stimulaciju estrogenima. Treći mehanizam

koji utiče na količinu receptora u ćeliji je delovanje na degradaciju receptora. Naime, u nekim slučajevima, dolazi do smanjenja nivoa receptora u ćeliji nakon delovanja steroidnog hormona. Ovaj proces se naziva homologa regulacija na dole (engl. *homologous down-regulation*) i omogućava ćeliji da bude manje osetljiva na ponovnu stimulaciju istim steroidnim hormonom. Proces degradacija receptora se odvija preko aktivacije ubikvitin proteaza i može biti praćena ili povećanjem transkripcije iRNK za taj receptor, kao što je slučaj sa GR, ili smanjenja transkripcije u slučaju degradacije ER i PR.

#### **4.6.4. Vezivanje hormona i promena konformacije receptora**

U većem broju eksperimenata je pokazano da su konformacione promene na receptoru važne za odgovor ćelija nakon stimulacije sa steroidnim hormonom. Neke od prvih studija koje su istraživale ovaj problem su dokazale da tripsin, koji izaziva digestiju proteina, ima različit efekat na aktivni i neaktivni receptor. Ovakav efekat tripsina se može objasniti promenom konformacije steroidnog receptora nakon vezivanja liganda. Konformaciona promena u receptoru može da otkrije ili sakrije mesta na koje tripsin deluje i time ili omogući ili spreči dejstvo tripsina na receptor u odnosu na receptor kod koga nije došlo do konformacione promene. Jedna od značajnih konformacionih promena koje se javljaju prilikom vezivanja hormona za steroidni receptor je i razdvajanje proteina toplotnog stresa. Naime, u neaktivnom stanju, za steroidni receptor su vezani proteini toplotnog stresa. Po vezivanju liganda dolazi do konformacionih promena i slabljenja veza između receptora i ovih proteina, a rezultat je oslobađanje receptora od proteina toplotnog stresa. Vezivanje hormona za receptor takođe dovodi do promene strukture koja se nalazi na ligand-vezujućem domenu receptora. Ova struktura se pomera tako da zatvori ligand koji se nalazi u hidrofobnom džepu. Ova nova pozicija omogućava interakciju receptora sa koaktivatorima koji su važni za proces transkripcije gena. Vezivanje antagonista za isto mesto na receptoru onemogućava pokretanje ove strukture u poziciju koja omogućava interakciju receptora sa koaktivatorima i time sprečava delovanje receptora u ćeliji.

### 4.6.5. Fosforilacija receptora

Steroidni receptori su proteini koji mogu da se fosforilišu na određenim mestima. Fosforilacija može da aktivira ali i da inhibiše receptor, da promeni njegovu stabilnost, lokalizaciju ili da utiče na protein-protein interakcije. Pokazano je da se steroidni receptori obično fosforilišu na serinskim ostacima, ali neki mogu biti fosforilisani i na tirozinskim ili treoninskim ostacima. Fosforilacija receptora može da se javlja u bazalnim uslovima, odnosno u odsustvu liganada ali i tokom vezivanja steroidnih hormona za receptor. Tako recimo, GR se fosforiliše u bazalnim uslovima u S fazi ćelijskog ciklusa, ali se može fosforilisati i tretmanom glukokortikoidama. Fosforilacija GR delovanjem glukokortikoida povećava transkripcioni potencijal ovog receptora. Identifikovane su kinaze koje fosforilišu receptore za steroidne hormone, a to su ERK1/2, MAPKp38, JNK, ciklin zavisne kinaze i druge serin-treonin kinaze.

### 4.6.6. Interakcija sa DNK

Steroidni receptori stupaju u interakciju sa DNK, aktivirajući ili inhibišući prepisivanje ciljnih gena. Receptori prepoznaju specifičnu sekvencu na DNK, odnosno HRE. Ova struktura se sastoji od dve sekvence sa šest nukleotida koji su palindromi i koje su razdvojeni sa tri baze (primer sekvence za ER: AGGTCA<sup>nnn</sup>TGACCT). Kada se receptor vezuje kao homodimer onda se svaki receptor u homodimeru vezuje za jednu stranu sekvence. Međutim, to nije uvek slučaj, pa tako receptor za progesteron, glukokortikoide, mineralokortikoide i androgene se vezuje za isti HRE koji je originalno opisan kako HRE za glukokortikoide. U ovoj HRE, sekvenca od šest nukleotida nije esencijalna za specifično vezivanje receptora. Takođe, sekvenca za vezivanje oba ER se ne razlikuje mnogo od sekvence za vezivanje GR. GR i PR se vezuju za svoju sekvencu na osnovu prepoznavanja metil-grupe na timinu koji se nalazi na poziciji tri u sekvenci od šest nukleotida, a koja nije prisutna u sekvenci za vezivanje ER. Receptori za androgene hormone se vezuje za motiv od šest nukleotida u sekvenci, a ne za palindrom sekvencu.

#### 4.6.7. Interakcija sa koaktivatorima i korepresorima

Sposobnost receptora za steroide da aktiviraju ili inhibišu prepisivanje ciljnog gena zavisi od interakcije između receptora i proteina pod imenom koaktivatori i korepresori. Uloga ovih proteina je da menjaju strukturu hromatina oko ciljnog gena i na taj način omogućavaju ili sprečavaju pristup receptora promotorskom regionu gena. Koaktivatori vrše acetilaciju specifičnih lizina na histonima, modifikujući njihovu strukturu i tako olakšavaju pristup genu. Sa druge strane, vezivanje određenih proteina može da ima suprotan efekat, odnosno da menja hromatin tako da onemogućuje pristup transkripcionim faktorima sprečavajući prepisivanje gena. Vezivanje antagoniste za receptor može da regrutuje korepresore, a takođe može regrutovati i proteine koji vrše deacetilaciju histona što će, u oba slučaja, onemogućiti prepisivanje gena. Pored koaktivatora ili korepresora, pronađeni su i drugi proteini koji stupaju u interakciju sa receptorima za steroidne hormone, a čije uloge mogu biti vrlo različite. Identifikovani su proteini koji vrše metilaciju, demetilaciju, fosforilaciju, ubikvitinaciju receptora, zatim koaktivatore ili korepresore histona i druge. Proces regrutovanja koaktivatora ili korepresora je cikličan, odnosno vezivanje jednog faktora dovodi do vezivanja drugog dok se ne formira regulatorni kompleks koji će omogućiti ili sprečiti početak transkripcije.

### 4.7. NEGENOMSKI EFEKTI STEROIDNIH HORMONA

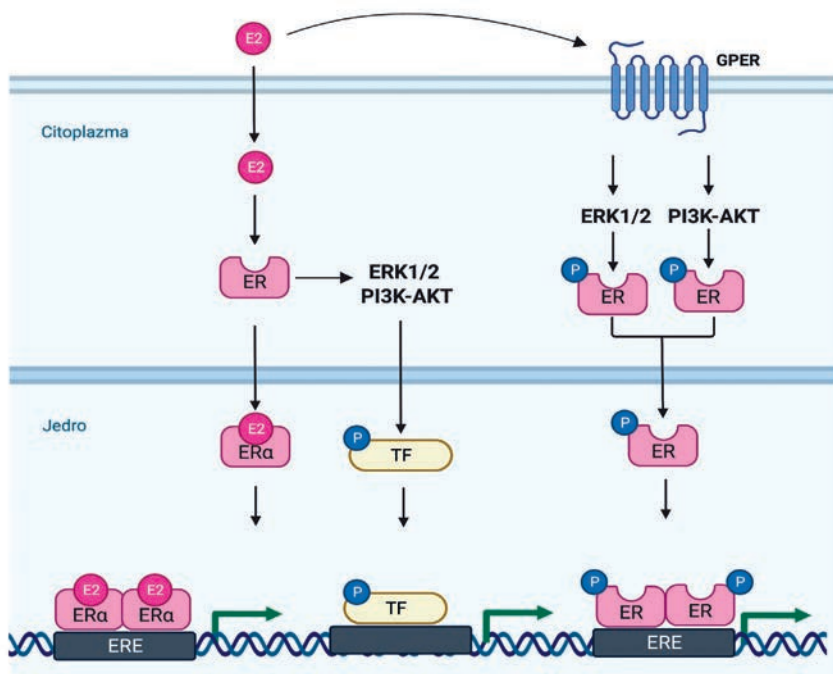
Još 1942 godine, Hans Selije (Hans Selye) je primetio da neki steroidni hormoni pokazuju efekat samo nekoliko minuta nakon njihove primene. Ovo zapažanje, odnosno sposobnost steroidnih hormona da pokazuju brze efekte je otvorilo nove polje istraživanja o načinima delovanja steroidnih hormona. Nakon 1942. godine istraživanja su potvrdila da steroidni hormoni mogu da ispoljavaju brze efekte koji nisu vezani za promene na nivou DNK. Jedan od prvih dokaza u prilog ovoj hipotezi je bio eksperiment u *in vitro* uslovima u kojem je aldosteron uticao na kanale za Na<sup>+</sup> u ćelijskoj membrani eritrocita. Pošto eritrociti nemaju jedro, efekat ovog

steroida nije mogao biti ostvaren na nivou DNK, odnosno transkripcije, već preko nekog drugog mehanizma. Dodatne potvrde o postojanju negenomskih efekata steroidnih hormona su pokazane u eksperimentima gde primena blokatora transkripcije nije sprečila efekat steroidnih hormona. Ovi i mnogi drugi eksperimenti su doveli do hipoteze o negenomskom delovanju steroidnih hormona. Za razliku od genomskog delovanja koji se ostvaruje vezivanjem za steroidni receptor, premeštanje u jedro i zatim vezivanjem za odgovarajuću sekvencu na DNK menjajući transkripciju ciljnog gena, negenomsko delovanje steroidnih hormona se ostvaruje preko uticaja na unutarćelijske sekundarne glasnike kao što su cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$ , protein kinaze i druge. Na primeru progesterona i estrogena će se prikazati neki od mehanizama koji su odgovorni za negenomsko delovanje steroidnih hormona.

Progesteron kod čoveka povećava koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  i akrozomalnu reakciju u spermatozoidima. Ovaj efekat je negenomski jer se ostvaruje vrlo brzo, a zreli spermatozoidi imaju vrlo kondenzovan hromatin koji onemogućava transkripciju gena. U prilog negenomskog delovanja progesterona jeste i činjenica da aplikacija RU486 koji je antagonist klasičnog PR, samo minimalno deluje na promene u  $\text{Ca}^{2+}$  koje su izazvane delovanjem progesterona. Fluorescentnom mikroskopijom je identifikovan protein koji se aktivira progesteronom. U pitanju su takozvani *KatSper* kanali koji se nalaze samo u membrani spermatozoida. *KatSper* kanali su katjonski kanali sa velikim afinitetom za  $\text{Ca}^{2+}$ . Aktiviraju se povećanjem pH, a kod sperme čoveka i progesteronom koji deluje kao hemoatraktant iz kumulusnih ćelija. Antitela protiv ovog proteina su dovela do smanjenja efekta progesterona na akrozomalnu reakciju spermatozoida. Prisustvo membranskog proteina koji vezuje progesteron je pokazano i u jajnicima ribe tačkaste mare gde ima značajnu ulogu u sazrevanju jajne ćelije. Ovaj membranski protein pripada familiji receptora adipoQ (PAQR), i široko je rasprostranjen u reproduktivnim tkivima. Iako je strukturno različit od klasičnog GPCR, efekti membranskog PR se ostvaruju vezivanjem za protein G. Pored uticaja na nivo  $\text{Ca}^{2+}$  u ćeliji, vezivanje progesterona za membranski PR, može da dovede do promena u aktivnosti adenilil ciklaze i nivoa cAMP kao i promena u aktivnosti protein kinaza kao što su ERK1/2 ili PI3K-AKT.

Estradiol takođe može da dovede do povećanja unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  u kulturi ćelija endometrija i zreloj jajnoj ćeliji. Ovi efekti estradiola nisu mogli da budu sprečeni dodatkom inhibitora klasičnog ER ili blokadom transkripcije. Ovi i slični eksperimenti su ukazali da estrogeni takođe ispoljavaju negenomski efekat aktivacijom različitih signalnih puteva ili sekundarnih glasnika u ćeliji. Istraživanja su dovela do otkrića membranskog receptora za estrogene (engl. *G protein-coupled estrogen receptor*, GPER). Ovaj receptor pripada porodici GPCR i svoje efekte ostvaruje preko aktivacije većeg broja proteina G. Vezivanje estrogena za GPER dovodi do promena u aktivnosti AC i nivoa cAMP u ćeliji, aktivaciju protein kinaza kao što su fosfolipaza C (engl. *phospholipase C*, PLC), ERK1/2 ili PI3K-AKT. GPER može da menja aktivnost EGFR, enzima azot-oksida sintaze kao i nekih jonskih kanala kao što su kanali za  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  ili  $\text{K}^+$ . Treba još istaći da estrogeni, pa i neki drugi steroidni hormoni, mogu da ostvaruju svoje efekte putem interakcija između negenomske i genomske signalizacije. U ovom načinu delovanja steroidni hormoni mogu da aktiviraju ciljane gene koji u svom promotorskom regionu nemaju sekvence za vezivanje steroidnog receptora. Važnu ulogu imaju protein kinaze i njihovi zavisni transkripcioni faktori. Tako, aktivacija klasičnih ER sa estrogenim hormonima može da aktivira protein kinazu ERK1/2, ili signalnu put PI3K-AKT koja će zatim dovesti do fosforilacije njihovih transkripcionih faktora. Ovi transkripcioni faktori će se vezivati za svoje sekvence na DNK i aktivirati transkripciju ciljnih gena. Takođe, aktivacija GPER može da dovede do povećanja aktivnosti protein kinaza kao što su ERK1/2 ili PI3K-AKT koje mogu da fosforilišu ER i time aktiviraju transkripciju gena koja je zavisna od ER (Slika 4.11).





**Slika 4.11.** Interakcija između negenomske i genomske signalizacije tokom delovanja estradiola, E2 (Slika je napravljena u Biorenderu)

## 4.8. METABOLIZAM STEROIDNIH HORMONA

Zbog svoje lipofilnosti metabolizam steroidnih hormona je usmeren ka povećanju rastvorljivosti u vodi kako bi se lakše mogli ukloniti iz organizma. Metabolizam steroidnih hormona je podeljen u dve faze koje su označene kao prva i druga faza metabolizma. Prva faza utiče na biološku aktivnost steroidnih hormona, dodavajući ili otkrivajući određene funkcionalne grupe na steroidnom hormonu koje zatim postaju ciljane grupe za drugu fazu metabolizma. U drugoj fazi vrši se potpuna inaktivacija steroidnih hormona, povećava se njihova rastvorljivost u vodi što će olakšati izbacivanje putem urina ili žuči. Jetra predstavlja centralno mesto gde se obavlja metabolizam steroidnih hormona, međutim periferna tkiva takođe poseduju enzime prve i druge faze metabolizma što omogućuje lokalnu kontrolu aktivnosti steroidnih hormona u zavisnosti od potreba samog tkiva.

### 4.8.1. Prva faza metabolizma

U prvoj fazi metabolizma steroidnih hormona učestvuje veći broj enzima koji vrše reakcije redukcije A prstena i hidrosilacije. Redukcija A prstena je važan korak u inaktivaciji glukokortikoida i mineralokortikoida kao i u kontroli aktivnosti androgena u perifernim tkivima. Redukcija A prstena se sastoji od dve uzastopne reakcije. Prva reakcija je redukcija  $\Delta^4$  dvostruke veze, koju zatim prati druga reakcija, redukcija 3-keto do hidrosilne grupe. Prvu reakciju vrše steroid 5 $\alpha$ -reduktaze (SRD5A). Identifikovane su tri izoforme ovog enzima od kojih SRD5A1 i SRD5A2 funkcionišu kao 5 $\alpha$ -reduktaze, dok treća izoforma SRD5A3 ima ulogu u glikozilaciji proteina. SRD5A1 se prepisuju u jetri i perifernim tkivima dok se SRD5A2 uglavnom eksprimira u muškim reproduktivnim organima. Drugu reakciju vrše aldo-keto reduktaze (AKR) kao što su AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 i AKR1C.

Hidrosilacija steroidnih hormona katališu enzimi CYP superfamilje iz jetre. Za razliku od steroidogenih CYP enzima, enzimi iz jetre pokazuju manju specifičnost prema steroidnim hormonima tako da više CYP enzima može da katališu jednu reakciju. Reakcije koja ova superfamilja enzima katališu uključuju hidrosilaciju, oksidaciju i presecanje C-C veze. Hidrosilacija steroidnih hormona inaktivise ove molekule i povećava njihovu polarnost i rastvorljivost u vodi. U nekim slučajevima dodatne hidrosilne grupe služe kao mesta za konjugaciju za koji su zaduženi enzimi druge faze metabolizma. Reakciju 6 $\beta$ -hidrosilacije koja se katališu enzimom CYP3A4 je najčešća reakcija za  $\Delta^4$  steroidne hormone dok je reakcija 16 $\alpha$ -hidrosilacija uobičajna za  $\Delta^5$  steroidne hormone. Hidrosilacija estrogenih hormona se može izvršiti na nekoliko pozicija, a katališu je veći broj CYP enzima jetre. Formiranje kateholoestrogena hidrosilacijom na pozicijama 2 i 4 predstavlja dominantnu reakciju.

### 4.8.2. Druga faza metabolizma

Druga faza metabolizma obuhvata dve reakcije konjugacije: sulfatacija i glukuronidacija. Ove reakcije imaju za cilja da povećaju rastvorljivost steroidnih hormona u vodi kako bi se eliminisali iz organizma putem uri-

na ili žuči. Reakcija konjugacije se odvija u dva koraka. Prvi korak predstavlja aktivacija funkcionalne grupe koja treba da se doda na steroidni hormon, dok drugi predstavlja transfer funkcionalne grupe sa donora na hidroksilnu grupu steroidnog hormona. Važno je istaći da je, kod čoveka, sulfatacija steroidnih hormona reverzibilna, odnosno steroidni hormoni mogu biti hidroksilacijom vraćeni u slobodnu formu, dok je glukuronizacija ireverzibilan proces.

Sulfatacija i desulfatacija igraju važnu ulogu u metabolizmu  $\Delta^5$  steroida koji se uglavnom izlučuju konjugovani sa sulfatima. Reakcija sulfatacije obuhvata dva koraka. Aktivacija sulfatnog anjona, a zatim transfer ove grupe na hidroksilnu ili amino-grupu steroidnog hormona. Sulfatacije katališu enzimi sulfotransferase (SULT). Identifikovane su dve klase enzima SULT: membranski vezani enzimi koji vrše sulfataciju peptida, proteina, lipida i drugih molekula i citosolne forme koje su odgovorne za metabolizam ksenobiotika, steroida, žučnih kiselina i neurotransmitera. Citosolne SULT se mogu podeliti u nekoliko familija SULT1, SULT2, SULT3 i SULT4, a svaka familija se sastoji od više članova. SULT familija ima značajnu ulogu u metabolizmu estrogena u perifernim tkivima i tako utiču na koncentraciju hormona. U granulosa ćelijama žena je pokazano konstitutivno pristustvo iRNK za SULT1A3 i SULT1A4. Povećana sulfatazna aktivnost je i kod nekih ginekoloških oboljenja.

Glukuronidacija je posebno izražena u metabolizmu  $\Delta^4$  steroida. U ovoj reakciji, glukuronska kiselina sa prenosi sa UDP-glukuronata na hidroksilnu grupu steroidnog hormona formirajući steroid-glukuronid. Ova reakcija je katalisana enzimima koji pripadaju superfamiliji UDP-glukuronosulfotransferaze (UGT). Identifikovane su dve familije ovih enzima UGT1 i UGT2 od kojih UGT2B katališu glukuronidaciju steroidnih hormona. U tkivima koja su pod uticajem steroida kao što je prostata pokazana je veća ekspresija enzima UGT koji metabolišu androgene, UGT2B15 i UGT2B17. Takođe je pokazano da neki od članova UGT familije, kao što je UGT2B7, mogu da selektivno metabolišu estrogene. Polimorfizam u ovom enzimu je povezan sa visokim rizikom za razvoj policističnih jajnika. UGT1A1 je takođe označen kao enzim koji ima visok afinitet ka estrogenima. Ekspriimiranje ova dva enzima koji učestvuju u metabolizmu estrogena može da utiče na hormonski status dojki menjajući rizik za nastanak kancera.

U metabolizmu estrogena važnu ulogu ima O-metilacija, reakcija kojom se kateholestrogen prevodi u metoksiestrogen. Ova reakcija je katalisana enzimima katehol-O-metiltransferaze (engl. *catechol-O-methyltransferase*, COMT). Molekul donor je S-adenosin metionin koji nastaje od metionina uz sadejstvo ATP. COMT vrši transfer ove funkcionalne grupe na pozicije 2 i 4 katehol supstrata. Metilacija katehol supstrata ima važnu ulogu u njihovoj inaktivaciji, ali ovaj proces dovodi do smanjenja rastvorljivosti u vodi. Enzimi COMT su prisutni u većem broju tkiva kao što su jetra, mozak, bubrezi, pluća i druga tkiva. COMT je detektovan u granulosa ćelijama žena gde učestvuje u metabolizmu estrogena. Polimorfizam u genu za COMT je povezan sa preranom insuficijencijom jajnika, dok je povećano prepisivanje ovog enzima povezana sa sindromom policističnih jajnika.

## 4.9. LITERATURA

- Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Straus 3rd JF (1997) Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 272:32656–32662.
- Beato M, Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6:225–236.
- Belanger A, Pelletier G, Labire F, Barbier O, Chouinard S (2003) Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans. *Trends Endocrinol Metab* 14:473–479.
- Bogan RL, Davis TL, Niswender GD (2007) Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) aggregation and absence of steroidogenic acute regulatory protein (StAR)/PBR association in the mitochondrial membrane as determined by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *J Steroid Biochem Mol Biol* 104:61–67.
- Conneely OM (2010). Progesterone receptors and ovulation. *Handb Exp Pharmacol* 198:37–44.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP (2003) Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68:771–778.
- Cope DI, Monsivais D (2022) Progesterone Receptor Signaling in the Uterus Is Essential for Pregnancy Success. *Cells* 11:1474.
- Cordts EB, Castro Santos M, Peluso C, Azuma Kayaki E, Bianco B, Barbosa CP, Christofolini DM (2014) COMT polymorphism influences decrease of ovarian follicles and emerges as a predictive factor for premature ovarian insufficiency. *J Ovarian Res* 7:47.
- Stocco DM, Clark BJ (1996) Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 51:197–205.

- Fan H-Y, Liu Z, Shimada M, Sternceck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS (2009) MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 324(5929):938–941.
- Guillemette C, Millikan RC, Newman B, Housman DE (2000) Genetic polymorphisms in uridine diphospho -glucuronosyltransferase 1A1 and association with breast cancer among African Americans. *Cancer Res* 60:950–956.
- Hamilton KJ, Arao Y, Korach KS (2014) Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reprod Biol* 14:3–8.
- Hsu H-J, Hsu N-C, Hu M-C, Chung B-C (2006) Steroidogenesis in zebrafish and mouse models. *Mol Cell Endocrinol* 248:160–163.
- Kim CJ, Lin L, Hunag N, Quigley CA, AvRusikin TW, Achermann JC, Miller WL (2008) Severe combined adrenal and gonadal deficiency caused by novel mutations in the cholesterol side chain cleavage enzyme, P450scc. *J Clin Endocrinol Metab* 93:696–702.
- Lanišnik Rižner Rižner T (2016) The Important Roles of Steroid Sulfatase and Sulfotransferases in Gynecological Diseases. *Front Pharmacol* 7:30.
- Liza AP, Hartigan JA, Orme-Johnson NR (1986) Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. *J Biol Chem* 261:13309–13316.
- Luo Y, Nie Y, Tang L, Xu CC, Xu L (2020) The correlation between UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms and environmental endocrine disruptors levels in polycystic ovary syndrome patients. *Medicine (Baltimore)* 99:e19444.
- Manna PR, Dyson MT, Stocco DM (2009) Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 15:321–333.
- Missaghian E, Kempna P, Dick B, Hirsch A, Alikhani-Koupaei R, Jegou B, Mulli PE, Frey BM, Fluck CE (2009) Role of DNA methylation in the tissue-specific expression of the CYP17A1 gene for steroidogenesis in rodents. *J Endocrinol* 202:99–109.
- Okada M, Lee L, Maekawa R, Sato S, Kajimura T, Shinagawa M, Tamura I, Taketani T, Asada H, Tamura H, Sugino N (2016) Epigenetic Changes of the Cyp11a1 Promoter Region in Granulosa Cells Undergoing Luteinization During Ovulation in Female Rats. *Endocrinology* 157:3344–3354.
- Oktem O, Akin N, Bildok G, Yakin K, Alper E, Balaban B, Urman B (2017) FSH Stimulation promotes progesterone synthesis and output from human granulosa cells without luteinization. *Hum Reprod* 32: 643–652.
- Prossnitz ER, Barton M (2023) The G protein-coupled oestrogen receptor GPER in health and disease: an update. *Nat Rev Endocrinol* 19: 407–424.
- Rasmussen MK, Ekstrand B, Zamaratskaia G (2013) Regulation of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase: a review. *Int J Mol Sci* 14: 17926–17942.
- Salih S, Xu X, Veenstra TD, Duleba AJ, Fouad H, Nagamani M, Al-Hendy A (2007) Lower levels of urinary 2-hydroxyestrogens in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3285–3291.

- Samardzija Nenadov D, Pogrmic-Majkic K, Tesic B, Kokai D, Fa Nedeljkovic S, Stanic B, Andric N (2022) Impact of *In Vitro* Long-Term Low-Level DEHP Exposure on Gene Expression Profile in Human Granulosa Cells. *Cells* 11: 2304
- Selvaraj V, Stocco DM, Clark BJ (2018) Current knowledge on the acute regulation of steroidogenesis. *Biol Reprod* 99:13–26.
- Shih M-CM, Chiu Y-N, Hu M-C, Guo I-C, Chung B-C (2011) Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. *Mol Cell Endocrinol* 336: 80–84.
- Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH (2005). Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev* 26: 525–582.
- Stocco C (2008) Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids* 73: 473–87.
- Storbeck K-H, Swart AC, Fox CL, Swart P (2015) Cytochrome b5 modulates multiple reactions in steroidogenesis by diverse mechanisms. *J Steroid Biochem Mol Biol* 151:66–73.
- Storbeck K-H, Swart AC, Goosen P, Swart P (2013) Cytochrome b5: novel roles in steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 371:87–99.
- Sztalryd C, Brasaemle DL (2017) The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 1862(10 Pt B):1221–1232.
- Thomas P (2022). Membrane Progesterone Receptors (mPRs, PAQRs): Review of Structural and Signaling Characteristics. *Cells* 11: 1785.
- Vanier MT (2010) Niemann-Pick C disease: history, current research topics, biological and molecular diagnosis. *Arch Pediatr* 17 Suppl 2:S41–4.
- West LA, Horvat RD, Roess DA, Barisas BG, Juengel JL, Niswender GD (2001) Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane. *Endocrinology*. 142:502–505.
- Zeleznik AJ, Saxena D, Little-lhirc L (2003) Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology*. 144: 3985–3994.
- Zhao H, Zhou L, Shangguan AJ, Bulun SE (2016) Aromatase expression and regulation in breast and endometrial cancer. *J Mol Endocrinol* 57: R19–33.

**Radmila Kovačević**  
**Nebojša Andrić**

---

# **5.** **PROSTAGLANDINI** **I ŽENSKI** **REPRODUKTIVNI** **SISTEM**

---





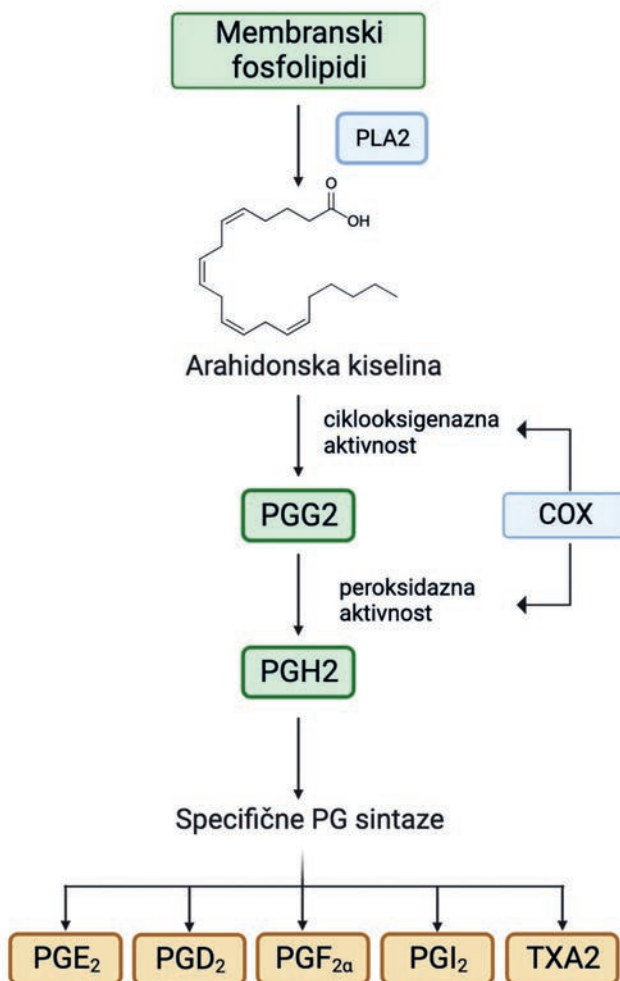
Počeci istraživanja na polju prostaglandina (PGs) vezani su za reproduktivnu biologiju. Godine 1930. Ulf fon Ojler (Ulf von Euler) je pronašao da semena tečnost i semene vezikule od najvećeg broja životinja uključujući i čoveka sadrže supstancu koja izaziva kontrakcije glatke muskulature materice. Toj supstanci je dao naziv prostaglandin jer se prvobitno mislilo da je poreklom iz prostate. Kasnije se saznalo da su prostaglandini prisutni u semenoj tečnosti i da se sintetišu u semenim vezikulama. Tokom 50-ih i 60-ih godina dvadesetog veka, tri naučnika Sun Bergstrom (Sune K. Bergström), Beng Samjulsen (Bengt I. Samuelsson) i Džon Vejn (John R. Vane) su otkrili strukturu, način sinteze, ulogu prostaglandina i drugih eikosanoida u različitim biološkim procesima. Ukazali su na široku rasprostranjenost ovih molekula u većini tkiva, kao i mehanizam delovanja nesteroidnih antiinflamatornih lekova na njihovu sintezu. Za svoja otkrića ova tri naučnika su 1982. godine dobili Nobelovu nagradu. Ulf fon Ojler je takođe dobitnik Nobelove nagrade koju je dobio zajedno sa još dva naučnika za otkriće noradrenalina 1970. godine.

Zajednički naziv za prostaglandine i druge relevantne lipidne medijatore je eikosanoidi (od eicos, grčki koren reči označava "20"), a označava da su to derivati nastali od polinezasićenih masnih kiselina sa 20 C atoma. Kod sisarskih vrsta, to je, pre svega, arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*, AA). Prostaglandine proizvode skoro sve ćelije u organizmu. Izazivaju različite efekte u različitim tkivima, uključujući reproduktivna tkiva, a deluju u ekstremno malim koncentracijama. Tkivna specifičnost eikosanoida se obezbeđuje selektivnim prepisivanjem enzima koji učestvuju u sintezi ovih jedinjenja, kao i membranskih receptora za eikanoide. Smatra se da su to kratkoživeći molekuli jer podležu spontanoj ili metaboličkoj inaktivaciji. Deluju kao autokrini i parakrini faktori.

## 5.1. BIOSINTEZA PROSTAGLANDINA

U eikanoide spadaju prostaglandini, tromboksani (engl. *thromboxane*, TXs) i leukotrijeni (engl. *leukotrienes*, LTs). Prvi korak u sintezi eikanoide je oslobađanje AA iz membranskih fosfolipida. AA se zatim može metabolisati preko dva osnovna puta: (1) cikličnog i (2) linearnog. Cikličnim putem nastaju prostanoidi, PGs i TXs, a linearnim putem se formiraju

LTs. Svi PGs imaju karakterističan ciklopentanski prsten i dva bočna lanca orijentisana u *trans* poziciju u odnosu na ciklopentanski prsten. Svaka grupa PGs se označava odgovarajućim slovom (F, D, itd.) koja označavaju određenu funkcionalnu grupu na poziciji 9 i 11 u okviru ciklopentanskog prstena. Stepenn nezasićenosti bočnog lanca označava se brojem u subskriptu (pr. PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, itd). U slučaju PGE<sub>2α</sub>, α označava stereochemiju hidroksilne grupe na položaju 9 u ciklopentanskom prstenu.



**Slika 5.1.** Sinteza PG, TXs i prostaciklina (PGI<sub>2</sub>) od arahidonske kiseline (Slika je napravljena u Biorenderu)

Oslobađanje AA iz fosfolipida koji se nalaze u membranama ćelija katališu enzimi fosfolipaze A2 (engl. *phospholipase A2*, PLA2). PLA2 mogu biti sekretne, vanćelijske PLA2 zavisne od  $\text{Ca}^{2+}$  (sPLA2), citosolne PLA2 zavisne od  $\text{Ca}^{2+}$  (cPLA2) i citosolne PLA2 koje su nezavisne od  $\text{Ca}^{2+}$  (iPLA2). iPLA2 u bazalnim uslovima omogućava oslobađanje AA i drugih polinezasićenih masnih kiselina iz membranskih fosfolipida, međutim enzimi acilaze vraćaju AA u fosfolipide. Smatra se da je iPLA2 više uključena u remodelovanje membrane, nego u sintezu eikosanoida. Uključivanje drugih PLA2 u oslobađanje AA pomera sistem u smeru nastanka PGs. Kod miševa jedna forma sekretne PLA2 je uključena u kapacitaciju spermatozoida. AA se dalje konvertuju u različite eikosanoide preko enzimskih puteva koji su specifični za određena tkiva (Slika 5.1).

### 5.1.1. Ciklični put

Ciklični put započinje delovanjem enzima ciklooksigenaze (engl. *cyclooxygenase*, COX), na AA, a krajnji produkti dejstva ovog enzima su prostanoidi, PGs i TXA2. Prvi ciklični produkt u ovom putu je PGG<sub>2</sub> u kome se peroksid na poziciji 15 redukuje do hidroksilne grupe i nastaje PGH<sub>2</sub>. PGG<sub>2</sub> i PGH<sub>2</sub> su nestabilni intermedijeri sa vrlo kratkim poluživotom. Pretvaranje PGH<sub>2</sub> u pojedinačne prostanoide je specifično za pojedina tkiva i zavisi od prisutnosti odgovarajućih enzima sintaza u njima. Za svaki prostaglandin i TXA2 postoji specifična sintaza. Na primer, TXA2 se sintetiše u trombocitima i makroflagima, prostaciklin, odnosno PGI<sub>2</sub> je glavni produkt u ćelijama endotela velikih krvnih sudova, dok PGE<sub>2</sub> luče kumulusne granulosa ćelije jajnika.

### 5.1.2. Linearni put

U linearnom putu nastaju LTs. Oni nastaju od AA delovanjem 5-lipoksigenaza i proteina koji aktivira 5-lipoksigenazu. Leukociti stvaraju najviše LTs, a nivoi nastalih LTs zavisi od količine AA koja se oslobodi iz membranskih fosfolipida delovanjem PLA2, proteina koji učestvuju u putu formiranja LTs i njihovoj katalitičkoj aktivnosti kao i prisustvom drugih molekula koji mogu da menjaju funkciju 5-lipoksigenaze. Moguća je trans-

formacija AA dejstvom enzima citohrom P450 pri čemu mogu da nastanu različiti derivati masnih kiselina. Takođe, postoji i neenzimska spontana transformacija AA katalizovana slobodnim radikalima, što podrazumeva ciklizaciju u molekule slične prostaglandinima (izoprostani). Ovi derivati mogu da nastanu *in situ* na fosfolipidima, a zatim da se oslobode dejstvom fosfolipaza. Nivo izoprostana u urinu i plazmi može da bude biomarker lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa *in vivo*.

### 5.1.3. Enzimi COX

Formalni naziv enzima COX je prostaglandin edoperoksidaza sintaza (engl. *prostaglandin-endoperoxide synthase*, PTGS), a nosi i naziv prostaglandin endoperoksidaza H sintaza. Godine 1976. je prvi put izolovan i prečišćen COX-1 iz semenih vezikula ovce i govečeta što je dovelo do kloniranja ovog enzima 1988. godine. Dugo se smatralo da je COX-1 jedini enzim u eukariotskim ćelijama da bi 1991. godine došlo do identifikacije još jednog enzima koji ima ciklooksigenaznu aktivnost i koji je dobio naziv COX-2. Kod svih kičmenjaka, uključujući i čoveka postoje ove dve izoforme enzima, COX-1 koja je konsitutivna forma i COX-2 koja je inducibilna forma. Ove dve izoforme pokazuju 60% sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci iako se njihovi geni nalaze na različitim hromozomima. COX enzimi su membranski proteini koji imaju 4 domena: (i) amino-terminalni domen koji usmerava protein ka membrani, (ii) domen koji služi za vezivanje za membranu, (iii) domen koji omogućava dimerizaciju i (iv) katalitički domen. Enzimi COX-1 i COX-2 sazrevaju u endoplazmatičnom retikulumu, a zatim se transportuju do ćelijske membrane gde obavljaju svoju funkciju.

Kod čoveka COX-1 se konstitutivno eksprimira u velikom broju tkiva i odgovoran je za bazalnu sitnezu PGs. Sa druge strane COX-2 stimulišu različiti faktori kao što su citokini, faktori rasta i hormoni. Međutim, u nekim organima, na primer, u bubrezima, mozgu, testisima COX-2 se takođe konstitutivno eksprimira. Enzimi COX su bifunkcionalni enzimi, odnosno pokazuju ciklooksigenaznu i peroksidaznu aktivnost. Kao što je navedeno ciklooksigenazna aktivnost dovodi do oksigenacije AA i nastanka PPG<sub>2</sub>. Peroksidazna aktivnost enzima COX redukuje PPG<sub>2</sub> do PGH<sub>2</sub>. Enzimi COX su glavne mete farmakoloških inhibitora koji se nazivaju nesteroidni an-

tinflamatorni lekovi (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) kao što su aspirin, indometacin, ibuprofen i drugi. Ovi lekovi se koriste za tretmane akutnih i hroničnih zapaljenskih bolova. Tradicionalni NSAIDs pokazuju različitu selektivnost za enzim COX-1 kao i veći broj neželjenih efekata uglavnom vezanih za gastrointestinalni trakt. Takođe su razvijeni i selektivni COX-2 inhibitori koji su trebali da budu sigurnija alternativa tradicionalnim NSAIDs. Međutim, neki od njih su povučeni sa tržišta zbog neželjenih interakcija sa kardiovaskularnim sistemom. Celebreks (celecoxib) je specifični COX-2 inhibitor koji je odobren od Evropske unije i SAD i koristi se kod artitisa i drugih stanja koja prate simptomi bola.

#### 5.1.4. Receptori za prostaglandine

PG se vezuje za receptore koji su spregnuti sa G proteinom (engl. *G protein-coupled receptors*, GPCRs) i koji aktiviraju ciklični adenzin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) i protein kinazu A (PKA). Takođe, ovi receptori preko  $G_{q/11}$  proteina mogu da aktiviraju fosfolipazu C (engl. *phospholipase C*, PLC) i inozitol 3-fosfat (engl. *inositol 3-phosphate*, IP3) oslobađajući unutarćelijski  $Ca^{2+}$  iz endoplazmatičnog retikuluma.  $PGF_{2\alpha}$  se vezuje za receptor F, dok se  $PGE_2$  se vezuje za receptor E koji se sastoji od nekoliko podgrupa receptora (PTGER1, PTGER2, PTGER3 i PTGER4).  $PGI_2$  se vezuje za receptor za prostaciklin koji je označen kao PTGIR, međutim pokazano je da se  $PGI_2$  može vezati i za nuklearni receptor koji se aktivira proliferatorom peroksizoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR).

## 5.2. ULOGA PROSTAGLANDINA U REPRODUKCIJI KOD ŽENA

### 5.2.1. Ovulacija

COX-2 enzim je prisutan u granuloza ćelijama preovulatornog folikula pacova i drugih sisarskih vrsta, a njegova sinteza se povećava preovulatornim talasom lutenizirajućeg hormona (LH). Vreme prepisivanja COX-2 u preovulatornom folikulu, nakon LH stimulacije, varira kod različitih

vrsta (2–4 h kod pacova, 18 h kod krave, 30 h kod kobile), međutim, kod svih navedenih vrsta prepisivanje COX-2 započinje 10 h pre ovulacije što ukazuju na značajnost PG za ovulaciju kod ovih vrsta. Prisustvo transkrip-ta i proteina za COX-2 je pokazano u folikulskoj tečnosti preovulatornih folikula žena koje su bile podvrgnute proceduri vantelesne oplodnje. Kod rezus majmuna, koji pokazuje 40-satni proces ovulacije, povećanje ek-sprimiranja COX-2 i PG se javlja 24 h ili 36 h nakon stimulacije sa hCG. Takođe, primena indometacina (blokator COX-2) skoro kompletno blokira oslobađanje jajne ćelije kod rezus majmuna.

Kod primata, glodara i domaćih životinja, COX-2 predstavlja “alarm” signal za ovulaciju. PGE<sub>2</sub>, glavni produkt enzima COX-2, ima značajnu ulogu u ekspanziji kumulusnih granuloza ćelija. Naime, studije su pokazale da PGE<sub>2</sub> povećava prepisivanje većeg broja gena uključenih u ekspanziju kumulusnih ćelija pre svega amfiregulina (AREG), epiregulina (EREG), enzima hijaluronin sintaze 2 (Has2) i Tnfaip6 (engl. *tumor necrosis fac-tor-inducible gene 6*). Pored uloge u ekspanziji kumulusnih ćelija, poka-zano je da PGE<sub>2</sub> reguliše i mejotičko sazrevanje jajne ćelije. PGE<sub>2</sub> preko svojih receptora PTGER2 i PTGER4 koji se eksprimiraju na muralnim i kumulusnim granuloza ćelijama, povećava nivo cAMP što dovodi zajedno sa LH do sazrevanja jajne ćelije (u poglavlju 7 će biti više reči o mehani-zmima sazrevanja jajne ćelije). Uloga PGE<sub>2</sub> u ekspanziji kumulusnih ćelija i sazrevanju jajne ćelije pokazana je na modelu miševa kojima je utišan receptor PTGER2 i kod kojih nije došlo do ekspanzija kumulusnih ćelija i sazrevanja jajne ćelije. Ove studije ukazuju da je receptor PTGER2 ključni za sazrevanje jajne ćelije i ekspanziju kumulusnih granuloza ćelija nakon ovulacije, što je važno za proces fertilizacije.

### 5.2.2. Žuto telo i luteoliza

Iako je uočeno da su COX-2 i PG značajni za ovulaciju, nedostatak COX-2 i PG nije značajno uticao na diferencijaciju granuloza ćelija ili na formiranje žutog tela. Naime, morfologija jajnika i produkcija steroidnih hormona nije bila značajno promenjena kod miševa kojima nedostaje COX-2 u odnosu na miševe divljeg tipa 24 h ili 30 h nakon stimulacije sa gonadotropinima.

$\text{PGF}_{2\alpha}$  predstavlja PG sa pokazanom ulogom u luteolizi kod velikog broja neprimata kod kojih luteoliza zavisi od prisustva materice.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se produkuje u materici, a zatim deluje na žuto telo dovodeći do luteolize. Međutim, miševi sa mutacijom receptora PTGFR, koji vezuje  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , su dali novi značaj ovom prostaglandinu za proces luteolize. Naime, iako prisutan u vreme estrusnog ciklusa i u žutom telu, nedostatak receptora PTGFR nije doveo do poremećaja u estrusnom ciklusu ili žutom telu. Sa druge strane, primećen je poremećaj porođaja kod skotnih ženki miševa sa nedostatkom PTGFR usled izostanka luteolize neposredno pre porođaja. Ovi rezultati ukazuju da je za porođaj bitna interakcija  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sa svojim receptorom na lutealnim ćelijama što dovodi do luteolize.

Za razliku od neprimata, kod primata dolazi do luteolize i u odsustvu materice, te važnost PG za luteolizu kod primata nije potpuno jasna. Postoje, međutim, podaci da lokalno (u jajniku) produkovani PG mogu da deluju kao medijatori luteolize. Na primer,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se produkuje u žutom telu žene, a postoje i receptori za ovaj prostaglandin u ovom organu. Visoke doze  $\text{PGF}_{2\alpha}$  date direktno u žuto telo žene *in vivo* izazivaju preranu regresiju žutog tela i skraćenje menstrualnog ciklusa.

### 5.2.3. Fertilizacija, implantacija, decidualizacija

Važnost PG za sazrevanje jajne ćelije i fertilizaciju potvrđeno je u eksperimentima na miševima kojim nedostaje enzim COX-2. U ovuliranom kompleksu kumulus-jajna ćelija može da se detektuje prisustvo COX-2 primenom odgovarajućih antitela. Pretpostavlja se da se lokalno produkovani  $\text{PGE}_2$  vezuje sa receptore PTGER i u autokrinom maniru izaziva ekspanziju kumulusa što je neophodno za uspešnu fertilizaciju. Sa druge strane COX-1 nije važan za implantaciju embriona i decidualizaciju materice.

Uloga COX-2 u procesima implantacije i decidualizacije ispitivana je na miševima kojima nedostaju COX-2 i receptori za prostaciklin (PTGIR). Ove studije su ukazale na moguću ulogu prostaciklina i  $\text{PGE}_2$  u implantaciji i decidualizaciji. Pokazano je, da se tokom transfera, 50% embriona

uspešno implantira kod kontrolnih miševa dok samo 2% kod miševa kojima je utišan gen za COX-2. Primećeno je da prepisivanje COX-2 u materici počinje naglo da raste 2 h nakon decidualizacije da bi se potom vratilo na kontrolni nivo nakon 8 h. Takođe, embrioni u razvoju pokazuju povećanu produkciju PG. Tokom razvoja embriona od stadijuma dve ćelije do blastociste dolazi do postepenog povećanja nivoa PGE<sub>2</sub> koji pospešuje "hatching" blastociste i proliferaciju trofoblasta. PGE<sub>2</sub> takođe može da stimuliše mitozu, angiogenezu i da sprečava apoptozu, omogućavajući proliferaciju i preživljavanje ćelija koje su neophodne za proces implantacije. Takođe, PGE<sub>2</sub> stimuliše eksprimiranje različitih hemokina i njihovih receptora kao što su receptor CXCR4 (engl. *CXC chemokine receptor 4*) i ligand CXCL12 (engl. *CXC chemokine ligand 12*). Visoki nivoi ovog receptora i liganda su nađeni u stromalnim ćelijama endometrijuma na mestu apozicije embriona za vreme implantacije.

Pored PGE<sub>2</sub>, neka istraživanja su pokazala da PGI<sub>2</sub> učestvuje u implantaciji embriona i decidualizaciji materice. Ova pretpostavka je podržana visokim nivoima produkcije ovog PG na mestima implantacije i decidualizacije. Pretpostavlja se da, PGI<sub>2</sub>, vezivajući se za nuklearni receptor PPARdelta, utiče na implantaciju i decidualizaciju. Naime, koordinisano eksprimiranje PPARdelta i COX-2 i podatak da PGI<sub>2</sub> agonisti omogućavaju implantaciju embriona i decidualizaciju materice kod miševa koji nemaju gen za COX-2 govori u prilog o važnoj ulozi PGI<sub>2</sub> i PPARdelta u ovim procesima.

#### 5.2.4. Menstruacija i dismenoreja

Poremećaj u sintezi PG je povezan sa pojavom dismenoreje kod žena. Povećani nivoi PGF<sub>2α</sub> i PGE<sub>2α</sub> su pokazani u endometrijumu i menstrualnoj tečnosti kod žena koje imaju dismenoreju, uz povećan odnos PGF<sub>2α</sub> prema PGE<sub>2</sub>. Takođe je detektovan i povećan nivo PGI<sub>2</sub>. Pokazano je da primena NSAIDs značajno smanjuje bol kod dismenoreje. COX-2 inhibitori (celecoxib) se koriste kod primarne dismenoreje.



### 5.2.5. Porodaj

Uloga PG u porođaju i preranom porođaju je predmet velikog interesovanja. Pre više od 30 godina je pokazano da aspirin odlaže porođaj i da NSAIDs odlažu prerani porođaj kod velikog broja vrsta.  $\text{PGE}_{2\alpha}$  i  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se proizvode u tkivu majke i fetusa tokom trudnoće. Dovode do kontrakcije materice i utiču na procese slične zapaljenskim procesima koji omogućavaju da se grlić materice stanji i dilatira. Pokazano je da je COX-1 bitan za normalno započinjanje i progresiju porođaja kod miševa. Kod žena je utvrđeno da se različiti PG proizvode u grliću materice i da povećanje njihove produkcije omogućava sazrevanje grlića materice. Lokalno dati PG omogućavaju omekšavanje grliću materice i njegovu dilataciju tokom indukcije porođaja. Mada je COX-1 uključen u sled događaja tokom normalnog porođaja, smatra se da je COX-2 uključen u prerani porođaj. Na modelu miševa je pokazano da prerani porođaj izazvan lipopolisaharidima može efikasnije da se predupredi istovremenom primenom selektivnog COX-2 inhibitora, u odnosu na primenu COX-1 inhibitora.

### 5.2.6. Drugi lipidi uključeni u reprodukciju

Pored eikosanoida, drugi lipidi uključeni u reproduktivne procese su lizofosfatidna kiselina (engl. *lysophosphatidic acid*, LPA) i sfingozin-1-fosfat (engl. *sphingosine-1-phosphate*, SIP). 80-ih godina prošlog veka je pokazano da LPA stimuliše kontrakcije glatke muskulature materice. Prisustvo receptora za LPA (receptor sregnut sa G-proteinom) ustanovljeno je u jajovodima, posteljici, materici, ali ne u jajniku i jajnoj ćeliji. Najveće prepisivanje receptora za LPA kod miša se javlja u ranoj trudnoći, a pokazano je i da progesteron stimuliše, a estradiol inhibiše ekspresiju ovog receptora. Ženke miševa sa nedostatkom receptora sa LPA imaju produženu trudnoću i manji okot. Kod ovih ženki je takođe uočeno i smanjenje ekspresiranja COX-2 i PG, što može da dovede u vezu LPA sa sintezom PG. Postoje podaci o mogućoj ulozi SIP u kontroli apoptoze germinativnih ćelija kod oba pola.

### 5.3. LITERATURA

- Chandrasekharan NV, Simmons DL (2004) The cyclooxygenases. *Genome Biology* 5:241.
- Matsumoto H, Ma W, Smalley W, Trzaskos J, Breyer RM, Dey SK (2001) Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation. *Biol Reprod* 64:1557–65.
- Niringiyumukiza JD, Cai H and Xiang W (2018) Prostaglandin E2 involvement in mammalian female fertility: ovulation, fertilization, embryo development and early implantation. *Rep Biol Endocrinol* 16:43.
- Peters-Golden M, Henderson WR Jr (2007). Leukotrienes. *N Engl J Med* 357:1841–1854.
- Stiller C-O, Hjemdahl P (2022) Lessons from 20 years with COX-2 inhibitors: Importance of dose-response considerations and fair play in comparative trials. *J Intern Med* 292:557–574
- Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T, Oida H, Yoshida N, Tanaka T, Katsuyama M, Hasumoto K, Murata T, Hirata M, Ushikubi F, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S (1997) Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* 277(5326):681–683.
- Takahashi T, Morrow JD, Wang H, Dey SK (2006) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways *J Biol Chem* 281:37117–37129.

**Nebojša Andrić**

---

## **6. FOLIKULOGENEZA**

---



Folikulogeneza predstavlja proces razvoja folikula. Tokom folikulogeneze dolazi do razvoja različitih odeljaka folikula, odnosno jajne ćelije, granulosa ćelija, teka ćelija, strome i površinskog epitela. Interakcija između ovih odeljaka omogućava, ne samo neometani rast folikula, već utiče i na embrion tokom rane faze embriogeneze. U prvom delu ovog poglavlja će biti predstavljen razvoj svakog odeljka folikula, a zatim će biti opisan i sam proces folikulogeneze.

## 6.1. JAJNA ĆELIJA

Razvoj jajne ćelije je složen proces koji se odvija u nekoliko faza uz stalne interakcije sa ostalim odeljcima folikula. Danas je prihvaćena ideja o obostranoj komunikaciji koja se odvija između jajne ćelije i granulosa ćelija koje okružuju jajnu ćeliju, jer je pokazano da jajna ćelija eksprimira veći broj gena koji su neophodni ne samo za razvoj folikula već i za oplodjenje i preimplantacioni razvoj preembriona. Razvoj jajne ćelije počinje u fetalnom periodu kada dolazi do formiranja oogonije od primordijanih germinativnih ćelija. Kod čoveka, oogonije se brzo dele dajući veliki broj germinativnih ćelija od kojih većina propada dok ostatak ulazi u prvu mejotičku deobu (mejoza I). Ove ćelije nazivaju se primarne jajne ćelije, a njihova deoba biva zaustavljena u diplotenu profaze mejoze I sve do puberteta. Razvoj jajne ćelije prati i formiranje vanćelijske strukture koja okružuje jajnu ćeliju i naziva se zona pelucida (ZP). ZP formiraju četiri glikoproteina ZP1, ZP2, ZP3 i ZP4. Uloga ZP je da štiti jajnu ćeliju, da omogući proces oplodjenja, da spreči polispermiju i da štiti preembrion tokom preimplantacionog perioda. ZP1 nije tako dobro okarakterisan kao ZP2 ili ZP3. Kod miševa kod kojih nedostaje ZP1 dolazi do formiranja ZP ali od ZP2 i ZP3. Smatra se da je ZP1 neophodan za formiranje strukturnog integriteta ZP. ZP2 je nešto bolje opisan glikoprotein. ZP2 se smatra sekundarnim receptorom za spermatozoide. Miševi kod kojih je utišan ZP2 razvijaju vrlo tanku ZP koja se sastoji samo od ZP1 i ZP3. Kod čoveka je pronađen protein ZP2 koji je homolog mišjem ZP2 sa ulogom u vezivanju i penetraciji spermatozoida. ZP3 je najbolje proučen glikoprotein. Miševi kojima je utišan ZP3 pokazuju folikule sa intaktnom jajnom ćelijom, međutim primećen je nedostatak matriksa ZP i poremećaj u organizaciji sloja granulosa ćelija koja se nalaze

uz jajnu ćeliju. ZP3 omogućava akrozomalnu reakciju spermatozoida i oslobađanje enzima koji olakšavaju penetraciju kroz matriks kao i otkrivanje molekula koje su zadužene za vezivanje spermatozoida za ZP2. Dugo se smatralo da je ZP3 jedini receptor za spermatozoide, međutim dokazano je da ulogu u vezivanju spermatozoida vrši i ZP2. Danas postoji uverenje da spermatozoidi ne prepoznaju specifičan protein ZP, već trodimenzionalnu strukturu koje se formira od svih proteina koji čine ZP. ZP4 je tek nedavno otkriven glikoprotein čija uloga do sada nije razjašnjena. ZP4 je pronađen kod čoveka i pacova ali ne i kod miševa. Ekspresira se u jajnoj ćeliji i vrlo je sličan ZP1. Zbog svoje sličnosti sa ZP1 pretpostavlja se da ovaj protein ima ulogu u održavanju integriteta matriske ZP.

### 6.1.1. Faktori jajne ćelije koji kontrolišu razvoj preembriona

Za vreme rasta jajne ćelije i razvoja folikula, jajna ćelija nakuplja proteine, produkte gena koji se nazivaju *maternal-effect genes*. U odsustvu transkripcione aktivnosti genoma roditelja tokom rane embriogeneze ovi faktori će omogućiti razvoj embriona tokom preimplantacionog perioda. *Maternal effects genes* su veoma dobro opisani kod nižih vrsta kao što je *Drosophila melanogaster* ili *Xenopus laevis*, dok je relativno mali broj ovih gena opisan kod sisara. Do sada je identifikovano 8 ovakvih gena kod sisara, a njihova uloga u procesima rane embriogeneze je pokazana korišćenjem miševa kod kojih su utišani ovi geni. MATER (engl. *the maternal antigen that embryo required* ili *NACHT leucin-rich repeat and PYD containinig 5, NLRP5*) je protein identifikovan kao produkt *maternal effects genes*, a čije je utišavanje dovelo do zastoja embriogeneze u stadijumu dve ćelije. FILIA je protein koji je takođe produkt ovih gena. Vezuje se za MATER i formiraju kompleks koji je važan tokom procesa brazdanja embriona. Miševi kojima nedostaje ovaj faktor pokazuju poremećaj u preimplantacionom razvoju preembriona; javlja se aneuploidija zbog poremećaja u formiranju deobnog vretena, postavke hromozoma u centralnu ravan kao i inaktivacija kontrolnih tačaka koje su odgovorne za formiranje deobnog vretena. Embriogeneza kod miševa nakon brisanja faktora toplotnog šoka-1 (engl. *heat-shock factor-1, HSF-1*) je bila zaustavljena u stadijumu jedne

ćelije. DNMT1o (engl. *DNA methyltransferase 1o*) je metiltransferaza koji se prepisuje tokom preimplantacionog perioda i nalazi se u citoplazmi. U stadijumu osam ćelija DNMT1o je identifikovana u jedru. Uklanjanje ovog proteina iz jajne ćelije miševa dovodi do gubitka metilacije na molekulu DNK. OOEP (engl. *oocyte-expressed protein*) poznat i kao FLOPED ima ulogu u formiranju citoplazmatične rešetke u kojoj se skladište faktori majke neophodni za proces ranog razvoja preembriona. Gubitak ovog faktora dovodi do zaustavljanja razvoja u stadijumu dve ćelije. Nedavno su identifikovani i ZAG1 (engl. *zygote arrest 1*) i NPM2 (engl. *nucleoplasmin 2*). ZAG1 se pojavljuje tokom nastavka mejoze jajne ćelije, prisutan je u preembrionima u stadijumu jedne ćelije ali ga u stadijumu dve ćelije više nema. Preembrioni miševa kojima nedostaje ovaj faktor ostaju zarobljeni u stadijumu jedne ili dve ćelije ukazujući na važnost ovog faktora za fazu preimplantacionog razvoja. NPM2 nosi informaciju za protein jedra koji utiče na organizaciju heterohromatina i deacetilaciju histona H3. U odsustvu ovog faktora, ovulacija i oplodjenje se odvijaju normalno, ali ne dolazi do razvoja preembriona što dovodi do infertiliteta.

### 6.1.2. Faktori jajne ćelije koji kontrolišu razvoj i sazrevanje folikula

Dokazi da jajna ćelije kontrolišu razvoj folikula su proizašli iz velikog broja eksperimenata koji su uključivali i eksperimente u kojima je jajna ćelija presađivana u folikule koji se nalaze u različitim stadijumima razvika. Ovi istraživanja su identifikovala nekoliko faktora iz jajne ćelije koji su odgovorni za rast i razvoj folikula. Tako su FIGLA, SOHLH1 (engl. *spermatogenesis- and oogenesis- specific basic helix-loop-helix 1*) i LXH8 (engl. *LIM homeobox 8*) važni za formiranje primordijalnih folikula od gule jajne ćelije dok je NOBOX (engl. *newborn ovary homeobox*) odgovorna za tranziciju od primordijalnog do primarnog folikula. DAZ1 (engl. *deleted in azoospermia-like*), CPEB1 (engl. *cytoplasmatic polyadenylation element binding protein 1*) i YBX2 (engl. *Y-box binding protein 2*) su odgovorni za eksprimiranje iRNK u jajnoj ćeliji.

Tokom 1993. i 1998. godine su pronađena dva faktora koji se luče iz jajne ćelije i koji utiču na funkciju granuloza i teka ćelija. To su faktor

rasta i diferencijacije 9 (engl. *growth differentiation factor 9*, GDF9) i protein morfogeneze kostiju 15 (engl. *bone morphogenetic protein*, BMP15). Ovi faktori pripadaju superfamiliji transformišućih faktora rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF $\beta$ ). GDF9 i BMP15 se sintetišu kao preproteini koji sadrže signalnu sekvencu i domene za dimerizaciju i sazrevanje. Nakon uklanjanja signalne sekvence, dolazi do procesovanja preproteina u zreli homodimer koji se potom luči iz jajne ćelije. Pošto ovi faktori dele aminokiselinsku sekvencu, i ekspimiraju se u istoj ćeliji i u isto vreme, dugo se pretpostavljalo da GDF9 i BMP15 mogu da formiraju heterodimer. Pokazano je postojanje GDF9-BMP15 heterodimera za koji je, mnogo godina kasnije, utvrđeno da ostvaruje funkcije u jajnoj ćeliji i nazvan je kumulin. Kumulin može da reguliše proliferaciju granulosa ćelije kao i ekspimiranje gena koju učestvuju u ekspanziji kumulusnih ćelija.

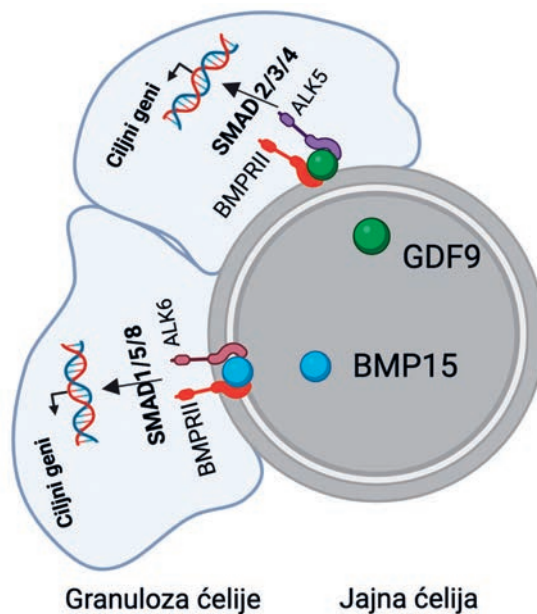
### 6.1.2.1. GDF9

GDF9 se ekspimirira u jajnoj ćeliji i u manjoj meri u granulosa ćelijama. Nedostatak ovog faktora dovodi do infertiliteta usled zaustavljanja rasta primarnih folikula. Jajnici miševa kojima nedostaje GDF9 imaju veću količinu primordijalnih i primarnih folikula i ne pokazuju prisustvo žutog tela. Takođe, ne formiraju se teka ćelije, ukazujući da GDF9 utiče i na razvoj ovog odeljka jajnika. Kod čoveka i ovaca sa mutacijom gena za GDF9 javlja se zastoj u rastu i razvoju folikula. GDF9 ostvaruje efekte vezivanjem za dva receptora, TGF $\beta$  tip I receptor kinaza (engl. *TGF $\beta$  type I receptor kinase*, poznat i kao ALK5) i BMP receptor tip II (BMPRII) koji se nalaze na granulosa i teka ćelijama. Aktivacijom ovih receptora dolazi do fosforilacije proteina SMAD 2,3 i 4 i stimulacije prepisivanja različitih gena u granulosa ćelijama (Slika 6.1). U granulosa ćelijama koje okružuju jajnu ćeliju, GDF9 dovodi do povećanja ekspimiranja gena koji učestvuju u ekspanziji ovih ćelija kao što su geni za enzim hijaluronin sintazu (HAS2), faktor nekroze tumora alfa stimulisani gen 6 (engl. *TNF $\alpha$  stimulated gene-6*, TSG-6) i pentraksina 3 (engl. *pentraxin 3*, PTX3). GDF9 takođe stimuliše i ekspimiranje enzima ciklooksigenaze-2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2) (učestvuje u sintezi prostaglandina) kao i stvaranje prostaglandina i



progesterona. Interesanto je napomenuti da u granuloza ćelijama koje okružuju jajnu ćeliju, GDF9 inhibiše eksprimiranje receptora za luteinizirajući hormon (LHR) i na taj način onemogućava odgovor ovih ćelija na luteinizirajući hormon (LH) odnosno sprečava njihovu luteinizaciju. GDF9 stimuliše proliferaciju teka ćelija i dovodi i do povećanja eksprimiranja enzima 17 $\alpha$ -hidroksilaze/17, 20 liaze (CYP17A1). Takođe, ovaj faktor dovodi do povećanja produkcije androstendiona u primarnoj kulturi teka-intersticijelne ćelije.

### 6.1.2.2. BMP15



**Slika 6.1.** Šematski prikaz interakcije između GDF9 i BMP15 poreklom iz jajne ćelije i kumulusnih granuloza ćelija. Detalji u tekstu. (Slika je napravljena u Biorenderu)

Miševi kojima nedostaje BMP15 imaju delimično poremećen fertilitet. Ženke daju manji broj mladunčadi, međutim jajnici su vrlo slični jajnicima kontrolnih životinja. Miševi kod kojih su izbrisani i GDF9 i BMP15 pokazuju sličan fenotip kao i miševi sa nedostatkom gena za GDF9. Miševi sa potpunim nedostatkom BMP15 koji imaju samo jednu kopiju GDF9 takođe pokazuju poremećaj folikulogeneze i smanjenu plodnost u odnosu

na miševе koji imaju samo nedostatak BMP15 što ukazuje na neku vrstu doznog efekta ovih faktora. BMP15 se vezuje sa kompleks receptora koji se sastoji od BMP receptora tip 1B (poznat i kao ALK6) i BMPRII. Ovaj kompleks receptora aktivira SMAD1, 5 i 8 signalizaciju u ćeliji i prepisivanje gena u granulosa ćelijama (Slika 6.1). Mutacija na receptoru ALK6 kod ovce dovodi do povećanja stope ovulacije koja zavisi od broja kopija alela sa mutacijom. Utišavanje gena za receptor BMPRII kod miševa ne dovodi do poremećaja u folikulogenezi, ali su životinje infertilne zbog poremećaja u ekspanziji ćelija koje okružuju jajnu ćeliju. Značajno je pomenuti da se uloge BMP15 i GDF9 razlikuju kod mono- i poli-ovulatornih vrsta. BMP15 je mnogo značajniji za proces folikulogeneze kod ovaca (monoovulatorna vrsta) nego kod miševa (poliovulatorna vrsta). Naime, nedostatak BMP15 usled homozigotne mutacije gena kod ovaca dovodi do poremećaja u folikulogenezi i sterilnosti. Međutim, miševi kojima nedostaje ovaj faktor imaju poremećaj fertiliteta (smanjen broj mladunčadi) ali se folikulogeneza odvija normalno. Jedan od razloga za različite efekte BMP15 kod ovih vrsta može da se nađe u činjenici da se zreli protein BMP15 kod miševa ne detektuje pre stadijuma ovulacije. Tri dana pre ovulacije dolazi do pojave zrelog BMP15 koji dovodi do ekspanzije ćelija koje okružuju jajnu ćeliju. Pojava zrelog BMP15 pred sam proces ovulacije može da objasni normalnu folikulogenezu kod miševa sa nedostatkom ovog proteina. Takođe, odnos količine iRNK za BMP15 i GDF9 manji je kod miševa, u poređenju sa ovcama što takođe može da objasni različitu ulogu BMP15 kod ovih vrsta.

## 6.2. GRANULOZA ĆELIJE

Pretpostavlja se da granulosa ćelije vode poreklo od površinskog epitela jajnika. Granulosa ćelije u folikulu imaju oligoklonalno poreklo, odnosno nastale su od tri do pet roditeljskih (stem) ćelija. U folikulima, granulosa ćelije nisu u direktnom kontaktu sa krvnim sudovima jer bazalna lamina odvaja granulosa ćelije od vaskularizovane teka interne. Bazalna membrana formira krvno-folikulsku barijeru koja onemogućava ulazak većih molekula unutar folikula.

### 6.2.1. Komunikacija između granuloza ćelija i jajne ćelije

Granulozne ćelije u folikuli su povezane preko mreže pukotinastih veza (engl. *gap junction*). Ove veze predstavljaju međućelijske konekcije, odnosno kanale koje povezuju citoplazme dve susedne ćelije omogućavajući difuziju različitih molekula i jona između ćelija. Broj pukotinastih veza raste kako se folikul razvija formirajući funkcionalni sincicijum. Međućelijski kanali koji čine pukotinaste veze se formiraju od integralnih membranskih proteina, koneksina (engl. *connexins*, CX). CX37 je najviše zastupljen u pukotinastim vezama između granuloza i jajne ćelije, dok je koneksin CX43 više zastupljen u pukotinastim vezama između granuloza ćelija. Prepisivanje CX43 je regulisano gonadotropinima. Količina CX43 se povećava u velikim antralnim folikulama i prati porast koncentracije folikulostimulišućeg hormona (FSH). Sa druge strane, ovulatorni talas LH dovodi do smanjenja broja pukotinastih veza. Značaj CX za funkciju jajnika je pokazan kod miševa kod kojih su utišani geni za CX37 i CX43. Nedostatak CX37 dovodi do zastoja u razvoju folikula u preantralnog stadijumu. Takođe, dolazi i do zastoja u razvoju jajne ćelije pre dostizanja mejotičke kompetencije dovodeći do gubitka jajne ćelije i pojave lutenizacije. Utišavanje CX43 dovodi do smanjenja broja jajnih ćelija, a razvoj folikula je zaustavljen u stadijumu primarnog folikula.

Granuloza ćelije eksprimiraju veliki broj membranskih receptora što im omogućava da odgovaraju na veliki broj hormona i faktora rasta. Signali mogu da budu parakrini, iz jajne ćelije, autokrini iz samih granuloza ćelija, odnosno endokrini iz osovine hipotalamus-hipofiza, ali i iz drugih organa. Pored dva hipofizna hormona, FSH i LH, koji su najznačajniji za razvoj, rast, diferencijaciju i maturaciju folikula, na granuloza ćelije mogu da utiču i gonadotropin oslobađajući hormon iz hipotalamusa, drugi adenohipofizni hormoni kao što su hormon rasta i prolaktin, zatim veliki broj faktora rasta kao što su članovi familije epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF), familije TGF ili faktori rasta slični insulinu (engl. *insulin-like growth factor*, IGF). Na granuloza ćelije mogu da utiču i insulin, citokini, adipokini i drugi hormoni.

## 6.2.2. Različitość fenotipa granuloza ćelija

Granuloza ćelije ispoljavaju različiti fenotip u zavisnosti od lokacije u samom folikulu. Granuloza ćelije koje se nalaze u blizini bazalne lamine i teka ćelija pokazuju drugačiji fenotip u odnosu na ćelije koje okružuju samu jajnu ćeliju. Zbog toga su granuloza ćelije podeljene na dve populacije, muralne granuloza ćelije i kumulusne granuloze ćelije. Muralne granuloza ćelije se nalaze u blizini bazalne lamine i imaju izraženu endokrinu, odnosno steroidogenu aktivnost, dok kumulusne granuloza ćelije okružuju jajnu ćeliju i daju podršku za njen razvoj i funkciju. Razlika u fenotipu između ove dve populacije granuloza ćelije je pokazana na nivou ekspimiranja gena. Tako se u kumulusnim granuloza ćelije prepisuje gen *Slc38a3* (engl. *solute carrier family 38 member 3*) koji nosi informaciju za nosač neutralnih aminokiselina zavisan od  $\text{Na}^+$ , zatim anti-Milerov hormon i receptor za androgene (AR). Kod muralnih granuloza ćelija ovi transkripti su slabo ekspimirani. Sa druge strane, u muralnim granuloza ćelijama prepisuje se iRNK koje nose informaciju za LHR, zatim za enzim koji seče bočni lanac holesterola (CYP11A1) i protein Cd34 koji je uključen u imunski odgovor. Pored razlike u ekspimiranju gena uočava se i razlika u odgovoru ove dve populacije ćelija na LH. Odgovor kumulusnih granuloza ćelija je usmeren na formiranje vanćelijskog matriksa koji će dovesti do ekspanzije kumulusnih granuloza ćelija što predstavlja jedan od važnih koraka u procesu ovulacije (više detalja o ekspanziji kumulusnih granuloza ćelija se nalazi u poglavlju 7). Takođe, kumulusne granuloza ćelije ekspimiraju receptore za prostaglandine i stiču sposobnost odgovora na ove lipidne molekule. Muralne granuloza ćelije podležu terminalnoj diferencijaciji i transformišu se u ćelije žutog tela. Ove ćelije počinju da sintetišu progesteron u većoj meri, a takođe zadržavaju i sposobnost sinteze estrogena i androgena (više detalje o žutom telu se nalaze u poglavlju 8).

Razlog formiranja različitog fenotipa granuloza ćelija jeste u faktorima koji se luče iz jajne ćelije, pre svega GDF9 i BMP15. Ovi faktori deluju na granuloza ćelije koje okružuju jajnu ćeliju, ali ne deluje na granuloza ćelije koje su udaljene od jajne ćelije. Ustvari, faktori iz jajne ćelije se suprotstavljaju delovanju FSH na granuloza ćelije što dovodi do formiranja tzv gradijenta ekspimiranja pojedinih gena u granuloza ćelijama i podele

granuloza ćelija na muralne i kumulusne granuloza ćelije. Tako je ekspresija LHR ili enzima aromataze (CYP19A1) pod delovanjem FSH najizraženije u granuloza ćelijama udaljenim od jajne ćelije jer na taj efektat FSH ne utiču faktori iz jajne ćelije. Kod granuloza ćelija koje okružuju jajnu ćeliju, faktori iz jajne ćelije sprečavaju ekspresiju LHR ili CYP19A1 koje je stimulirano sa FSH, te se u tim ćelijama ovi transkripti ne ekspresiraju. Nisu samo geni za LHR i CYP19A1 koji pokazuju različito ekspresiranje u granuloza ćelija pod uticajem faktora iz jajne ćelije. U eksperimentima na miševima kod kojih su utišani GDF9 i BMP15, došlo je do promene u ekspresiranju oko 700 transkripta u kumulusnim granuloza ćelijama uključujući i transkripte vezane za glikolizu, biosintezu sterola, metabolizam inozitola i druge. Antagonistički efekat faktora iz jajne ćelije je pokazan i u eksperimentima u kojima je uklanjanje jajne ćelije dovelo do stimulacije prepisivanja muralnih transkripta u kumulusnim granuloza ćelijama nakon delovanja FSH. Stoga se može pretpostaviti da faktori iz jajne ćelije, a pre svega GDF9 i BMP15, utiču na formiranje različitog fenotipa granuloza ćelija. Međutim, uočeno je da GDF9 i BMP15 nisu jedini faktori, već da jajna ćelija luči koktel faktora koji dovodi do formiranja različitog fenotipa granuloza ćelija.

### 6.3. TEKA ĆELIJE

Smatra se da su teka ćelije poreklom od mezenhimalnih ćelija koje su slične fibroblastima i koje se nalaze u stromi jajnika. Tokom formiranja folikula teka ćelije se pojavljuju oko folikula koji već ima nekoliko slojeva granuloza ćelija. U formiranju teka ćelija značajnu ulogu igra GDF9 iz jajne ćelije. Naime, miševi kojima nedostaje GDF9, ne formiraju sloj teka ćelija, a folikuli ostaju zarobljeni u stadijumu primarnih ili malih preantralnih folikula. Iako ovi eksperimenti jasno ukazuju da je GDF9 kritičan za razvoj teka ćelija, do sada nije objašnjen mehanizam pomoću koga ovaj faktor utiče na teka ćelije. Novija saznanja ukazuju da aktivacija signalnog puta hedgehog (engl. *hedgehog*) ili sinteza inhibitora signalizacije BMP faktora, gremlina, možda učestvuju u ovom procesu.

Teka ćelije imaju stalnu komunikaciju sa granuloza ćelijama. U granuloza ćelijama se sintetise i otpušta KIT ligand, koji deluje na svoj receptor

na teka ćelijama. Po vezivanju KIT liganda za receptor dolazi do dimerizacije i fosforilacije tirozinskih ostataka na receptoru, a zatim i aktivacije protein kinase B (PKB, poznate i kao AKT) i janus kinaze (JAK). Aktivacija ovih signalnih molekula utiče na nekoliko funkcija u teka ćelijama kao što su organizacija ćelija oko folikula, proliferacija i steroidogeneza. KIT ligand takođe pozitivno utiče na eksprimiranje dva faktora rasta u teka ćelijama, faktora rasta keratinocita (engl. *keratonocyte growth factor*, KGF) i faktora rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor*, HGF) koji pozitivno utiču na eksprimiranje KIT liganda u granulosa ćelijama. Pored KIT liganda, IGF koji luče granulosa ćelije stimulira proliferaciju, diferencijaciju i steroidogenezu teka ćelija. Eksprimiranje LHR kao i produkcija androgena u teka ćelijama može da se stimulira dodatkom IGF.

## 6.4. STROMA I POVRŠINSKI EPITEL JAJNIKA

Svaki organ se sastoji od dve komponente, parenhima, specijalizovanog tkiva koji je nosilac funkcije organa i strome, tkiva koji daje podršku. U jajniku, parenhim čine folikuli, dok stromu čine sve nefolikulske komponente. U stromu jajnika ulaze imunske ćelije, krvni sudovi, nervi, limfni sudovi i druge specifične komponente jajnika. U ove specifične komponente spadaju površinski epitel jajnika, tunica albuginea, stem ćelije, hilar ćelije *rete ovarii* i slabo okarakterisane ćelije strome kao što su ćelije slične fibroblastima, intersticijalne i druge ćelije.

Uloga strome je da pruži zaštitu folikulima i žutom telu od drugih struktura. Takođe, stroma eksprimira androgeni receptor (AR) i može da proliferira pod uplivom androgenih hormona. Stroma otpušta i neke faktore rasta kao i proteine koji vezuju faktore rasta. Tako se, u stromi produkuje veća količina gremlina, proteina koji vezuje i inaktivira BMP, a takođe i folistatina, proteina koji sprečava delovanje aktivina kao i druge faktore.

Površinski epitel jajnika ili mezotelijum predstavlja nastavak epitela peritoneuma. Ovaj epitel se naziva još i germinativni epitel jer se smatralo da za vreme razvoja jajnika, površinski epitel može da formira granulosa ćelije. Međutim novija istraživanja su pokazala da površinski epitel jajnika ima zajedničku progenitor ćeliju sa granulosa ćelijama. Kod odraslih žena, površinski epitel jajnika je jednoslojan skvamozne do kubične mor-

fologije. Karakteriše se prisutstvom keratina 7, 8, 18 i 19 i lučenjem mucin antigena, MUC1, i enzima 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze. Prisustvo veće količine keratina u ovim ćelijama omogućava brži popravak površinskog epita nakon ovulacije. Komunikacija između ćelija površinskog epitela se ostvaruje preko dezmozoma, nekompletnih pukotinastih veza, integrina i kadherina. Uloga površinskog epitela je u transportu materija u ili iz peritonealne duplje, cikličnoj rupturi folikula tokom ovulacije i popravci nakon ovulacije. Popravka površinskog epitela nakon ruptore zahteva proliferaciju ćelija. Proliferativna aktivnost ćelija se javlja u blizini mesta ovulacije, a najintenzivnija je za vreme i neposredno posle ovulacije. Invaginacije površinskog epitela jajnika unutar samog jajnika može da dovede do formiranja inkluzivnih cisti. Ove ciste mogu da podlegnu metaplastičnim i neoplastičnim promenama. Iako neka istraživanja ukazuju da se ove inkluzione ciste formiraju oko mesta ovulacije, pokazano je da se one javljaju i kod stanja oligoovulacije ili anovulacije kao što su policistični jajnici. Takođe, smatra se da su ciste koje imaju epitel Milerovih kanala glavni uzročnici epitelnog kancera jajnika.

## 6.5. RAZVOJ FOLIKULA

Razvoj folikula (folikulogeneza) je proces razvoja primordijalnih folikula u primarne, pa zatim u sekundarne koji formiraju antralne folikule. Na tom putu razvoja najveći deo folikula podleže atreziji, dok nekoliko antralnih folikula nakon puberteta, tokom svakog menstrualnog/estrusnog ciklusa pod uplivom gonadotropnih hormona nastavljaju sazrevanje kroz negativnu i pozitivnu selekciju. Jedan ili više folikula (zavisno od vrste) dostiže preovulatorni stadijum. U odgovor na LH u svakom ciklusu preovulatorni, odnosno De Grafov (*De Graaf*) folikul, oslobađa zrele jajne ćelije za oplodnje, dok se muralne granuloza i teka ćelije diferenciraju u ćelije žutog tela.

Regrutovanje (engl. *recruitment*) je termin koji se često koristi kada se opisuje razvoj folikula. Termin regrutovanje se koristi za opisivanje (I) inicijalne aktivacije primordijalnih folikula iz rezervoara folikula koji se nalaze u mirovanju do preantralnih folikula, (II) ciklično regrutovanje kohorte antralnih folikula za vreme menstrualnog ciklusa (III) rast i razvoj dominantnog ovulatornog folikula. Folikulogeneza se može podeliti u tri

faze: prva faza koja je nezavisna od gonadotropnih hormona i koja obuhvata razvoj od primordijalnih do sekundarnih folikula, druga faza zavisna od gonadotropnih hormona koja obuhvata razvoj preantralnih do ranih antralnih folikula i treća faza koja je takođe zavisna od gonadotropnih hormona i u kojoj dolazi do daljeg rasta antralnih folikula, njihove selekcije i na kraju ovulacije. Razvoj primarnih folikula od primordijalnih traje kod žene više od 150 dana, prelaz primarnih u sekundarne oko 120 dana, a sekundarnih u rane antralne oko 65 dana. To znači da je u menstrualnom ciklusu dominantni folikul koji ovulira regrutovan iz pula primordijalnih folikula skoro jednu godinu ranije.

Folikulogeneza započinje aktivacijom primordijalnih folikula koja se dešava neprekidno od 5. ili 6. meseca razvoja ženskog fetusa čoveka i traje do menopauze. Individualni folikuli izlaze iz stanja mirovanja i započinju svoj put razvoja, pri čemu na tom putu najveći broj doživi atreziju. Primordijalni folikuli nastaju tokom gestacijskog perioda kod čoveka, odnosno posle rođenja kod glodara. Proces formiranja primordijalnih folikula počinje razgradnjom oocitnih gnezda u kome se nalaze primordijalne germinativne ćelije (eng. *primordial germinative cells*, PGC) koja je praćena apoptozom i razgradnjom veza između ovih ćelija. Jajne ćelije koje nisu podlegle procesu apoptoze se okružuju slojem pljosnatih pregranuloza ćelija i nastaju primordijalni folikuli. Većina primordijalnih folikula se nalaze u stanju mirovanja dok se samo mali broj njih regrutuje iz rezervoara primordijalnih folikula u mirovanju formirajući rezervoar aktivnih primordijalnih folikula. Razvoj folikula tokom folikulogeneza prate promene na granuloza ćelijama koje menjaju svoju morfologiju od pljosnatih do kubičnih i dolazi do njihove proliferacije. Folikuli koji formiraju više slojeva granuloza ćelija oko jajne ćelije se nazivaju sekundarni folikuli. Prelazak iz primarnih u sekundarne folikule prati formiranje pukotinastih veza između granuloza ćelija i jajne ćelije. Takođe dolazi i do promena na jajnoj ćeliji koja se uvećava i formira se ZP. U stadijumu sekundarnih folikula, granuloza ćelije pokazuju prisustvo receptora za FSH (FSHR), receptora za estrogene (ER) i AR. Pri kraju razvoja sekundarnih folikula dolazi do formiranja teke interne, i takav folikul se naziva preantralni folikul. Takođe se formira i teka eksterna od debelih slojeva kolagenih vlakana usled ekspanzije folikula i pritiska na okolnu stromu. Zajedno sa formiranjem teka ćelija dolazi i do



razvoja krvnih sudova koji formiraju mrežu kapilara koji se nalaze u tesnom kontaktu sa bazalnom membranom. Teka ćelije eksprimiraju LHR na membrani i stiču sposobnost steroidogeneze.

Tokom rasta i razvoja sekundarnih folikula dolazi i do značajnih promena u jajnoj ćeliji. Rast jajne ćelije u ovoj fazi karakteriše značajna metabolička aktivnost i sinteza većeg broja proteina koji će omogućiti rast i razvoj preembriona tokom preimplantacione faze. Rast jajne ćelije je takođe omogućen i transportom različitih hranljivih materija, faktora ili molekula kroz pukotinaste veze između granulosa ćelija i jajne ćelije. Dolazi do formiranja kompletne ZP, a i do povećanja broja ćelijskih organela, u prvom redu mitohondrija, dok se centriole koje su prisutne u ooniji gube. Takođe dolazi do grupisanja mitohondrija, endoplazmatičnog retikuluma i Goldži aparata oko germinativne vezikule. Jajna ćelija stiče mejotičku kompetenciju, koja predstavlja sposobnost jajne ćelije da izađe iz profaze prve mejotičke deobe. Kao što je navedeno, jajne ćelije bivaju zaustavljene u profazi mejoze I. U ovoj fazi one ostaju sve do ovulacije kada će ovulatorni talas LH omogućiti nastavak mejoze u jajnoj ćeliji koja će ovulirati (više detalje o ovom procesu se nalazi u poglavlju 7). Da bi LH omogućio nastavak mejoze jajna ćelija mora biti pripremljena za taj proces, odnosno mora da stekne mejotičku kompetenciju. Mehanizam koji je odgovoran za sticanje mejotičke kompetencije za sada nije poznat, ali se smatra da jajna ćelija povećava količinu proteina koji su važni za proces nastavka mejoze kao što su ciklin zavisna kinaza 1 (engl. *cyclin dependent kinase 1*, CDK1), ciklin B i ciklin CDC25 (uloga ovih proteina će biti detaljnije opisana u poglavlju 7). Pretpostavlja se da će povećanje količine ovih proteina iznad nekog određenog nivoa omogućiti nastavak mejoze pod uplivom LH. Pored mejotičke kompetencije, jajna ćelija, tokom razvoja, stiče i razvojnu kompetenciju, odnosno javlja se sposobnost da podrži razvoj preembriona tokom preimplantacione faze. Kako jajna ćelija formira ovu vrste kompetencije nije u potpunosti objašnjeno, ali se smatra da dolazi do akumulacije molekule i organela kao što su iRNK, ribozomi, proteini, citoplazmatične organele (mitohondrije, mikrotubule i druge) koje će se kasnije koristiti u toku oplođenja i ranog razvoja preembriona. Takođe je primećeno da se volumen jajne ćelije povećava za oko 300 puta, a istraživanja su pokazala pozitivnu korelaciju između veličina jajne ćelija i njene razvojne kompetencije.

## 6.5.1. Faktori koji dovode do rasta folikula

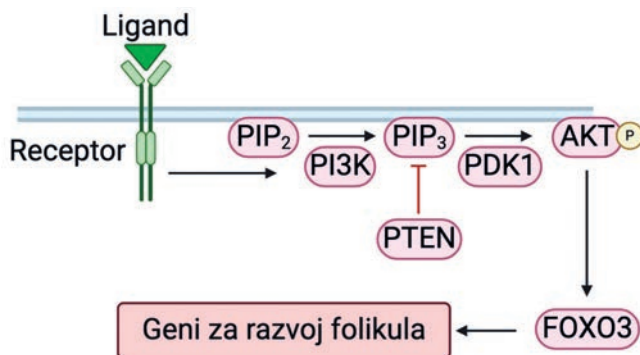
Većina primordijalnih folikula se nalazi i stanju mirovanja, dok jedan određeni deo ovih folikula podleže aktivaciji. Dva signalna puta igraju važnu ulogu u procesu aktivacije primordijalnih folikula: signalni put fosfatidilinozitol-3 kinaze (engl. *phosphatidylinositol-3-kinase*, PI3K)-AKT i signalni put mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*).

### 6.5.1.1. PI3K-AKT

U većem broju eksperimenata je pokazana uloga PI3K-AKT u aktivaciji primordijalnih folikula. Proces započinje vezivanjem liganda za receptor koji zatim aktivira PI3K te dolazi do formiranja malog lipidnog molekula fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfata (engl. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*, PIP<sub>3</sub>) fosforilacijom odgovarajućeg difosfata PIP<sub>2</sub>. PIP<sub>3</sub> potom regrutuje fosfoinozimid zavisnu kinazu 1 (engl. *3-phosphoinositide-dependent kinase-1*, PDK1) i AKT na ćelijsku membranu, gde PDK1 fosforiliše AKT. AKT zatim fosforiliše transkripcioni faktor FOXO3 (engl. *fork-head3*) koji je glavni efektor signalnog puta PI3K-AKT u regulaciji aktivacije primordijalnih folikula. Naime, inaktivni FOXO3 se nalazi u jedru gde sprečava aktivaciju gena koji učestvuju u razvoju folikula. Fosforilacija FOXO3 od strane AKT dovodi do izlaska ovog transkripcionog faktora iz jedra pri čemu se aktiviraju geni koji će omogućiti razvoj folikula. U kontroli i aktivaciji signalnog puta PI3K-AKT važnu ulogu igraju enzimi koji učestvuju u razgradnji PIP<sub>3</sub> kao što je PTEN (engl. *tensin homologue deleted on chromosome 10*). PTEN sprečava aktivaciju PIP<sub>3</sub> i na taj način onemogućava aktivaciju AKT i izlazak transkripcionog faktora FOXO3 iz jedra što će, na kraju, sprečiti aktivaciju folikula (Slika 6.2).

Važnost ovog signalnog puta u aktivaciji primordijalnih folikula je pokazana kod miševa kod kojih je utišan ili FOXO3 ili PTEN u jajnoj ćeliji. Utišavanje FOXO3 je dovelo do povećanja prepisivanja gena koji su odgovorni za aktivaciju primordijalnih folikula, dok su miševi sa utišanim PTEN imali sličan fenotip, odnosno pokazivali su povećanu aktivaciju signalnog puta PI3K-AKT što je dovelo do premeštanja FOXO3 iz jedra u citoplazmu i prepisivanja gena zaduženih za aktivaciju primordijalnih folikula. Takođe

je zapaženo da se kod miševa sa utišanim PTEN javlja i prerana aktivacija primordijalnih folikula što je dovelo do stanja koje se kod čoveka označava kao prerana insuficijencija jajnika (smanjenje ovarijalne rezerve). Kada se PTEN utiša u jajnoj ćeliji primarnih folikula ili folikula u kasnijim fazama razvoja, ne dolazi do poremećaja u njihovom razvoju, a fertilitet kod ovih životinja je očuvan.

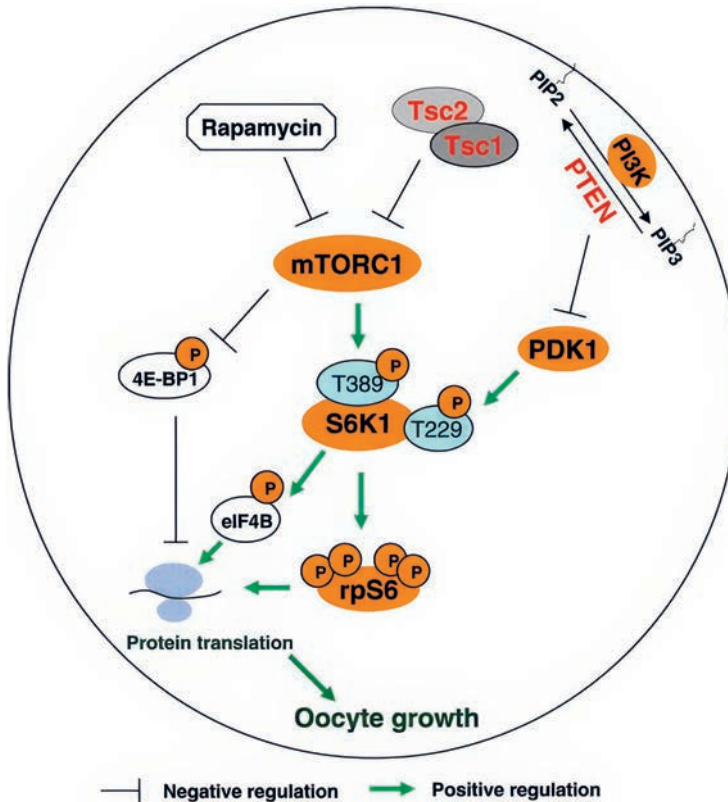


**Slika 6.2.** Signalni put PI3K-AKT u aktivaciji primordijalnih folikula. Detalji u tekstu.  
(Slika je napravljena u Biorenderu)

### 6.5.1.2. mTOR

mTOR je serin-treonin kinaza koja, sa drugim proteinima, formira dva kompleksa, mTORC1 i mTORC2. mTOR1 integriše signale poreklom od faktora rasta, stresa, energetskeg statusa ćelije i drugih, delujući na sintezu proteina i lipida kao i na proces autofagije. Za razliku od mTORC1, mTORC2 ne odgovara na nutritivni status ćelije već na stimulaciju insulinom. mTORC1 kontroliše stvaranje proteina pomoću fosforilacije transkripcionih faktora 4E-BP1 (engl. *phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor*) i kinaze S6K1 (engl. *S6 kinaze 1*). Funkciju mTORC1 kontrolišu dva proteina TSC1 i TSC2 (engl. *tuberous sclerosis protein 1 i 2*), koji predstavljaju negativne regulatore aktivacije mTORC1. Uloga TSC i mTORC1 u regulaciji aktivacije primordijalnih folikula je pokazana kod miševa sa utišanim genima *Tsc1* i *Tsc2* u jajnim ćelijama. Ovi miševi pokazuju sličan fenotip kao miševi kod kojih nedostaje PTEN, odnosno dolazi do prerane aktivacije rezervoara primordijalnih folikula i infertiliteta ukazujući da je

mTORC1 važan za proces aktivacije primordijalnih folikula. Novija saznanja takođe ukazuju da je i mTORC2 važan za razvoj folikula, ali njegova tačna uloga u procesu folikulogeneze ostaje da se odredi. Folikuli čoveka koji su bili tretirani rapamicinom, inhibitorom mTOR, su pokazivali delimično smanjenje rasta folikula. Iz ovih rezultata se može zaključiti da mTOR učestvuje u aktivaciji primordijalnih folikula, dok TSC1 i TSC2 sprečavaju aktivnost mTOR i time omogućavaju mirovanje primordijalnih folikula. Regulacija aktivnosti primordijalnih folikula putem signalnog puta TSC-mTOR je kompleksan proces jer uključuje i signalni put PI3K-AKT. PTEN koji učestvuje u regulaciji PI3K inhibicijom aktivnosti PDK1 može da dovede i do smanjenja forsforilacije S6K1 (Slika 6.3).



**Slika 6.3.** Signalni put TSC-mTOR u aktivaciji primordijalnih folikula (preuzeto iz Adhikari i sar. 2010, Hum Mol Genet. 19(3):397–410 na osnovu licence Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/uk/>). Detalji u tekstu.

## 6.5.2. Formiranje antralnih folikula

Prelazak iz preantralnog do antralnog folikula je pod kontrolom FSH. FSH stimuliše proliferaciju i rast granuloza ćelija kao i njihovu diferencijaciju na muralne granuloza ćelije koje oblažu zid folikula i kumulusne granuloze ćelije koje okružuju jajnu ćeliju. Takođe, pod uplivom FSH dolazi do formiranja antruma koji je ispunjen tečnošću. Za ovaj proces je veoma važan unos vode koji se ostvaruje kanalima za vodu, akvaporini 7, 8 i 9. FSH dovodi i do povećanja ekspimiranja LHR na muralnim granuloza ćelijama što je kritičan korak u sticanju sposobnosti ovih ćelija da odgovore na ovulatorni talas LH. Pet do šest dana pre ovulacije dolazi do ekspanzije folikula koja nastaje kao posledica proliferacije granuloza ćelija i akumulacije folikulske tečnosti u antrumu. Na kraju ove faze, preovulatorni folikul je spreman za ovulaciju.

## 6.6. REGRUTOVANJE, SELEKCIJA I ODABIR DOMINATNOG FOLIKULA

### 6.6.1. Regrutovanje antralnih folikula

Antralni folikuli dijametra 2–5 mm su detektovani tokom menstrualnog ciklusa kod čoveka, međutim, način njihovog pojavljivanja je upitan. Postoje tri teorije koje objašnjavaju pojavu antralnih folikula tokom menstrualnog ciklusa. Prema najranijoj teoriji ovi folikuli se razvijaju kontinuirano, dok drugi istraživači zastupaju teoriju talasa (engl. *wave theory*) odnosno da se antralni folikuli pojavljuju ciklično tokom menstrualnog ciklusa. Dok se ranije smatralo da postoji jedan talas (engl. *single recruitment episode*), novija istraživanja ukazuju na postojanje više talasa (engl. *follicular waves*).

#### 6.6.1.1. Kontinuirano regrutovanje (Teorija 1)

Kontinuirano regrutovanje, bazirano na histološkim nalazima, podrazumeva da se razvoj antralnih folikula vrši stalno tokom menstrualnog ili estrusnog ciklusa. Prema ovoj teoriji, mali antralni folikuli se regrutuju

i rastu kontinuirano. Odabir folikula koji će postati ovulatorni folikul je više stvar slučaja tj. folikuli koji se nađu u pravom stadijumu razvoja i koji u tom trenutku mogu da odgovore na rastuće nivoe FSH će biti odabrani da postanu dominantni folikuli.

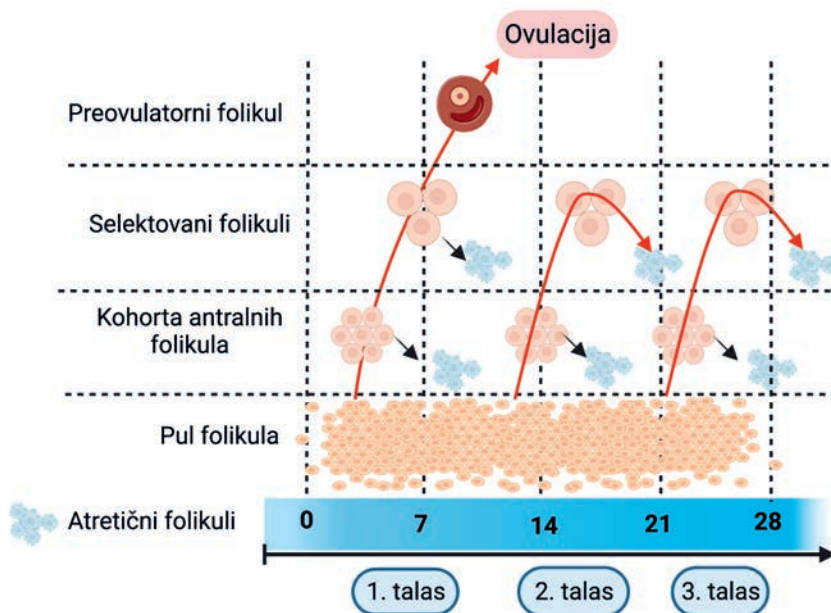
### **6.6.1.2. Ciklično regrutovanje – jedan talas (Teorija 2)**

Ciklično regrutovanje – jedan talas podrazumeva da se kohorta antralnih folikula dijametra 2–5 mm regrutuje iz rezervoara antralnih folikula, samo jednom tokom menstrualnog ciklusa. Ova teorija je nastala jer je na ultrazvuku primećen jednokratni porast u broju antralnih folikula dijametra 2–5 mm kod žene. Ovakav porast u broju antralnih folikula od 2 do 5 mm koji je detektovan nakon regresije žutog tela ili tokom rane folikulske faze menstrualnog ciklusa se naziva privilegovana faza razvoja folikula. Smatra se da se kohorta ovih antralnih folikula nalazi u sličnoj, ali ne i u identičnoj fazi razvoja folikula i verovatno nastaje kao posledica istovremenog napuštanja rezervoara primordijalnih folikula u mirovanju.

### **6.6.1.3. Ciklično regrutovanje – više talasa (Teorija 3)**

Ciklično regrutovanje – više talasa podrazumeva postojanje više talasa antralnih folikula tokom jednog menstrualnog ciklusa (Slika 6.4). Ovi talasi antralnih folikula se pojavljuju u pravilnim intervalima, a folikuli koji pripadaju istom talasu su sličnog, ali ne i identičnog dijametra. Teorija cikličnog regrutovanja antralnih folikula u više talasa tokom jednog menstrualnog ciklusa je podržana sa više studija. Naime, pokazano je da se prvi talas antralnih folikula javlja tokom folikulske faze, dok se drugi javlja u luteinskoj fazi menstrualnog ciklusa. Dva talasa antralnih folikula su bila detektovana i kod žena koje imaju ciklus 30–35 dana u poređenju sa jednim talasom kod žena koje imaju ciklus 26–30 dana. Takođe, neke žene mogu da imaju i tri talasa antralnih folikula tokom jednog menstrualnog ciklusa. Kod žena sa dva talasa antralnih folikula, jedan talas je ovulatorni i javlja se u ranoj folikulske fazi, dok je drugi talas neovulatorni i javlja se u vreme ovulacije. Kod tri talasa jedan je ovulatorni,

a dva su neovulatorna. Ovulatorni talas se javlja tokom rane folikulske faze, a neovulatorni talasi se javlju za vreme ovulacije i tokom luteinske faze.



**Slika 6.4.** Rekrutovanje, selekcija i odabir dominantnog folikula kod cikličnog regrutovanja u više talasa. Detalji u tekstu. (Slika je napravljena u Biorenderu).

### 6.6.2. Selekcija folikula

Termin selekcija se koristi za opisivanje rasta i razvoja velikih antralnih folikula iz kohorte regrutovanih folikula. Selekcija može biti negativna prema folikulima koji nisu dominantni, odnosno pozitivna prema folikulima koji će postati dominantni.

Selekcija folikula se može označiti kao proces u kojem se jedan folikul, koji postaje dominantan, izabere iz kohorte regrutovanih folikula tokom menstrualnog ciklusa. Ovaj proces se obično dešava jedanput, tokom rane i srednje folikulske faze menstrualnog ciklusa. U vreme selekcije, folikul koji će postati dominantan, počinje da se razlikuje od drugih osta-

lih regrutovanih folikula jer nastavlja sa rastom, dok ostali regrutovani folikuli podležu atreziji. Dominantni folikul ima veću koncentraciju FSH u folikulskoj tečnosti, veliki indeks mitoze granuloza ćelija kao i značajne nivoe sintetisanog estradiola. Odvajanje dominantnog od ostalih regrutovanih folikula počinje kada dominantni folikul dostigne dijametar od oko 10 mm što se događa u periodu od 6 do 9 dana tokom folikulske faze. Koncept postojanja dominantnog folikula koji će formirati preovulatorni folikul je pokazan u eksperimentima ablacije. Naime, ablacija dominantnog folikula kod majmuna je dovela do odlaganja ovulacije za dve nedelje. Odlaganje ovulacije je objašnjeno činjenicom da u trenutku ablacije dominantnog folikula, nijedan drugi folikul nije stekao kompetentnost da odgovori na ovulatorni talas LH. Takođe, dve nedelje je bilo potrebno da se regrutuje nova kohorta folikula iz koje će jedan folikul biti selektovan i postati dominantan. Ovaj podatak kao i slična istraživanja na čoveku i životinjama su potvrdila koncept selekcije dominantnog folikula koji se morfološki i funkcionalno razlikuje od ostalih regrutovanih folikula.

U procesu regrutacije kohorte folikula i odabira dominantnog folikula, važnu ulogu ima FSH. FSH je neophodan za prelaz od sekundarnih do antralnih folikula. Takođe, FSH omogućava preživljavanje antralnih folikula. Regrutacija kohorte folikula i njihov rast zavise od povećanja koncentracije FSH u kasnoj luteinskoj fazi menstrualnog ciklusa. Pokazano je da postoji takozvani prag koncentracije FSH koji se mora dostići da bi došlo do rasta folikula. Smatra se da povećanje od 10% ili 30% predstavlja taj prag koji će omogućiti rast folikula. Takođe, postoji i prag FSH koji određuje broj dominantnih folikula koji će se regrutovati iz kohorte regrutovanih folikula. Ovaj koncept se naziva FSH prag/prozor/kapija (engl. *FSH threshold/window/gate*). Prema ovom konceptu, ako koncentracije FSH u kratkom periodu bude iznad praga doći će do selekcije samo jednog dominantnog folikula. Međutim, ako je vreme kada je koncentracija FSH iznad praga duže, onda dolazi do selekcije većeg broja folikula u isto vreme. Produženje vremena kada je koncentracije FSH iznad praga se javlja kod poliovulatornih vrsta i za vreme stimulacije jajnika tokom vantelesne oplodnje.



### 6.6.3. Efekat FSH na folikule

FSH dovodi do proliferacije granuloza ćelija. Ovaj efekat je verovatno posredovan faktorima rasta koji se oslobađaju iz granuloza ćelija ili iz jajne ćelije. Tako, estrogini hormoni koji se oslobađaju iz granuloza ćelija pod uticajem FSH pokazuju proliferativni efekat na same granuloza ćelije. Povećanje količine estradiola je posledica stimulišućeg delovanja FSH na eksprimiranja enzima CYP19A1 i 17 $\beta$ -hidroskosteroid dehidrogenazu 1 (17 $\beta$ HSD1) u granuloza ćelijama. Proliferacija granuloza ćelija je jedan od prvih znakova da će folikul postati dominantan. Ostali regrutovani folikuli ne odgovaraju na FSH i stoga podležu atreziji. Koncept selekcije i odabira dominantnog folikula se može posmatrati i kao sposobnost izbegavanja atrezije. Najmanji folikuli koji imaju umanjenu sposobnost kompeticije za FSH podležu atreziji. U daljem procesu odabira i veći folikuli podležu atreziji sve dok ne ostane jedan folikul koji će postati dominantan. U dominantnom folikulu, FSH stimuliše eksprimiranje LHR na membrani granuloza ćelija. iRNK za ovaj receptor se može detektovati u antralnim folikulama dijametra 3–10 mm, a maksimalne nivoe dostiže u preovulatornim folikulima. Za razliku od LHR, nivoi FSHR se smanjuju kako se povećava dijametar folikula. Iako nivoi FSH i FSHR opadaju, LH, delujući na svoj receptor, omogućava završno sazrevanje folikula.

### 6.6.4. Signalni putevi u granuloza ćelijama aktivirani sa FSH

U granuloza ćelijama, FSH deluje preko FSHR koji pripada familiji receptora koji su vezani za G protin (engl. *G protein-coupled receptor*, GPCR). Nakon vezivanja FSH za FSHR dolazi do aktivacije većeg broja signalnih puteva (Slika 6.5), među kojima je dominantan signalni put cikličnog adenzin-monofosfata (engl. *cyclic adenosin monophosphate*, cAMP). Povećanje nivo cAMP dovodi do aktivacije protein kinaze A (PKA). PKA je tetramerni enzim koji se sastoji od dve regulatorne i dve katalitičke subjedince. Dok se nalaze u kompleksu katalitička jedinica PKA je neaktivna. Vezivanjem cAMP za regulatornu subjedinicu PKA dolazi do razdvajanja katalitičke subjedince koja postaje aktivna kinaza i može da fosforiliše

različite proteine. Pored PKA, pokazano je da cAMP može da aktivira još jedan signalni molekul, cAMP aktiviran faktor razmene guanin-nukleotida (engl. *cAMP-activated guanine nucleotide exchange factors*, EPAC) u granulosa ćelijama pacova i čoveka. Međutim, aktivacija EPAC je slaba, a nekad i izostaje. Takođe, aktivacija EPAC sa odgovarajućim analogom ne dovodi do povećanja eksprimiranja CYP19A1 koj je glavni pokazatelj aktivacije signalnog puta cAMP u granulosa ćelijama. Primena inhibitora proteina PKA sprečava prepisivanje velikog broja proteina u granulosa ćelijama koji su stimulisani sa FSH što ukazuje na značaj signalnog puta cAMP-PKA u delovanju FSH na granulosa ćelije.

Treba i istaći da je delovanje PKA u granulosa ćelijama usmereno na određene ćelijske odeljke. PKA se može naći lokalizovana kod mitohondrija, Goldžijevog aparata, centrozoma, jedrove membrane kao i kod drugih ćelijskih struktura. Ova lokalizacija PKA je omogućena vezivanjem regulatorne subjedinice za veliku familiju proteina AKAP (engl. *A-kinase anchoring proteins*) koji usmeravaju A-kinazu u odgovarajuće odeljke u ćeliji. Smatra se da se oko 75% PKA nalazi u asocijaciji sa AKAP u specifičnim ćelijskim odeljcima. Pored uloge u lokalizaciji PKA, AKAP služe i kao neka vrsta platforme za integraciju više signalnih molekula. Tako, AKAP može da vezuju fosfodiesteraze (engl. *phosphodiesterase*, PDE) koji razrgrađuju cAMP i time regulišu nivo ovog molekula u ćeliji, zatim protein-fosfataze, kinaze i druge signalne molekule. Aktivirani PKA će dovesti do fosforilacije transkripcionog faktora CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*). PKA fosforiliše CREB (Ser133), a ova fosforilacija se može sprečiti primenom PKA inhibitora, ali ne inhibitorima drugih signalnih puteva. Samo mali broj gena, koji su regulisani sa FSH, u svom promotorskom regionu ima cAMP regulatornu sekvencu za koje se vezuje CREB. Međutim u elegantnoj studiji u kojoj su poređeni odgovori granulosa ćelja pacova na stimulaciju sa FSH i granulosa ćelija pacova kod kojih je bila stalno aktivna kinaza PKA je pokazano da je 85% transkripta koji su povećani i 75% transkripta koji su smanjeni bilo zajedničko između ove dve grupe ćelija. Ovi rezultati ukazuju da je PKA glavna kinaza koje je odgovorna za diferencijaciju nezrelih granulosa ćelija pacova nakon stimulacije sa FSH.

Jedan od signalnih puteva koji se takođe aktivira nakon stimulacije granulosa ćelija sa FSH je vanćelijskim signalima regulisana kinaza 1/2

(engl. *extracellular-signal regulated kinase*, ERK1/2). FSH dovodi do brze fosforilacije ERK1/2 u granulosa ćelijama, ali mehanizam aktivacije ove kinaze sada nije u potpunosti razjašnjen. Jedna od pretpostavki je da FSH uklanja toničan inhibični efekat fosfotirozin-fosfataze na ERK1/2 što će dovesti do povećanja fosforilacije ove kinaze. Neki eksperimenti su pokazali da PKA dovodi do inaktivacije fosfataza, povećavajući aktivaciju ERK1/2 u granulosa ćelijama pacova. U većini studija je pokazana uloga PKA u aktivaciji ERK1/2 u granulosa ćelijama nakon stimulacije FSH, međutim u jednoj studiji primena inhibitora PKA nije mogla da spreči aktivaciju ERK1/2 od strane FSH.

Aktivacija receptora za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) predstavlja jedan od mogućih mehanizama aktivacije ERK1/2 nakon stimulacije granulosa ćelija sa FSH. Dodatnu potvrdu o ulozi EGFR u aktivaciji ERK1/2 nakon stimulacije sa FSH su pokazali eksperimenti u kojima je primena eCG (engl. *equine chorionic gonadotropin*) na miševima koji ne proizvode FSH izazvala fosforilaciju EGFR. Takođe, inhibicija fosforilacije EGFR je sprečila fosforilaciju ERK1/2 u nezrelim granulosa ćelijama pacova koje su stimulirane sa FSH. Može se, dakle, pretpostaviti da FSH, preko transaktivacije EGFR fosforiliše ERK1/2 u granulosa ćelijama.

Fosforilacija ERK1/2 pod uplivom FSH u granulosa ćelijama dovodi do aktivacije nekoliko transkripcionih faktora kao što su RSK-2 i faktor steroidogeneze-1 (SF-1). Dok ciljni geni za RSK-2 nisu u potpunosti razjašnjeni, SF-1 je neophodan za aktivaciju nekoliko gena u granulosa ćelijama kao što su  $\alpha$ -subjednica inhibina, epiregulin i drugi.

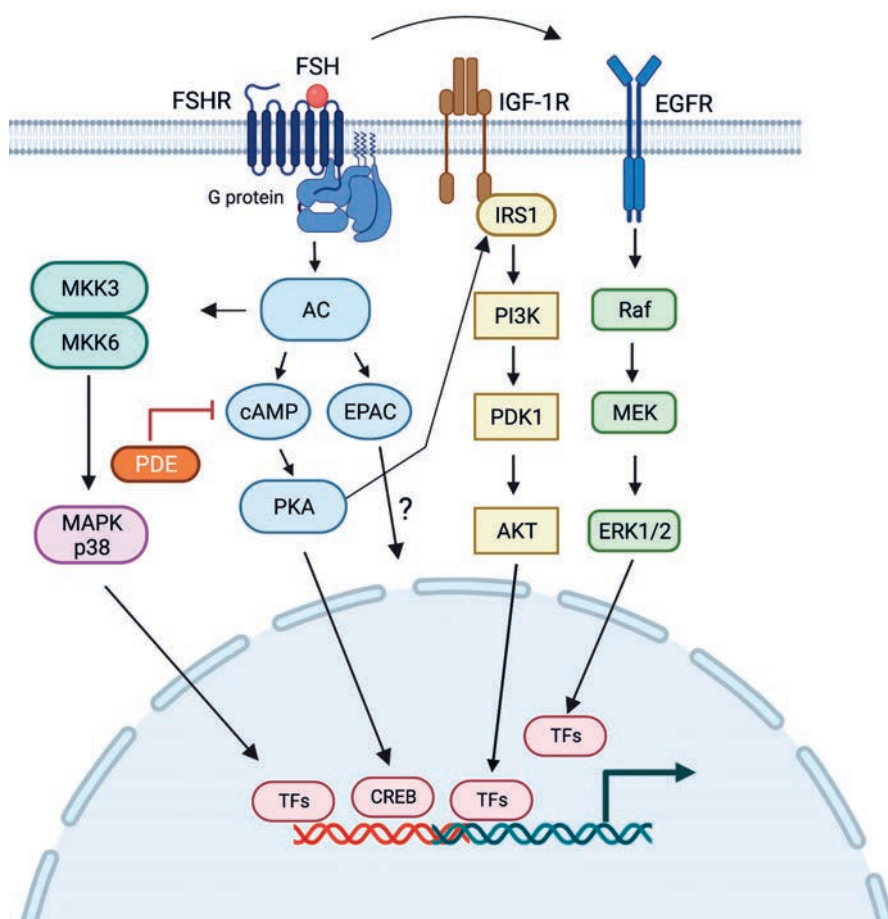
Regulacija steroidogeneze od strane ERK1/2 u nezrelim granulosa ćelijama je kompleksna. Naime, aktivacije ERK1/2, zajedno sa signalnim putem cAMP-PKA stimuliše iRNK za STAR i CYP11A1. Međutim, kontrola prepisivanja CYP19A1 je nešto složenija. Primena farmakoloških inhibitora kinaze ERK1/2 dovodi do povećanja ekspresije CYP19A1 u nezrelim granulosa ćelijama pacova nakon stimulacije sa FSH. Takođe, miševi kod kojih je izbrisana kinaza ERK1/2 u granulosa ćelijama pokazuju povećanje ekspresije CYP19A1 nakon davanja eCG. Ova dva podatka ukazuju da aktivacija kinaze ERK1/2 od strane FSH dovodi do inhibicije CYP19A1 u nezrelim granulosa ćelijama. Međutim, inhibicija uzvodnih molekula u

signalnom putu ERK1/2 kao što je RAS dovodi do smanjenja prepisivanja CYP19A1 nakon stimulacije nezrelih granulosa ćelija pacova sa FSH. Ovaj rezultat bi ukazivao da ERK1/2 stimuliše prepisivanje CYP19A1 nezrelih granulosa ćelija pacova sa FSH. Dalja istraživanja bi trebalo da rasvetle ulogu ERK1/2 u regulaciji prepisivanja CYP19A1 i nezrelim granulosa ćelijama nakon stimulacije sa FSH.

FSH dovodi do aktivacije PI3K koje će zatim dovesti do aktivacije AKT u granulosa ćelijama. Dodavanjem forskolina, aktivatora adenilil ciklaze (AC) dolazi do povećanja nivoa cAMP, aktivacije PKA i povećanja fosforilacije AKT. Ovi podaci ukazuju da se aktivacija AKT odvija preko signalnog puta cAMP-PKA i PI3K. Istraživanja su uspela da detaljnije objasne put aktivacije AKT u granulosa ćelijama koje su stimulisane sa FSH. Naime, cAMP i PKA aktiviraju protein-fosfatazu koja se nalazi u kompleksu sa receptorom za faktore rasta slične insulinu (engl. *insulin-like growth factor 1 receptor*, IGF-1R) i supstratom za insulinski receptor (engl. *insulin receptor substrate*, IRS1). Aktivacija protein-fosfataze će omogućiti defosforilaciju inhibitornih serinskih rezidua na IRS1 što će dovesti do fosforilacije IRS1 od strane IGF-1R. Aktiviran IRS1 će zatim aktivirati PI3K i AKT. Aktivacija signalnog puta PI3K-AKT je važna za proliferaciju i diferencijaciju granulosa ćelija kao i za proces sazrevanje folikula. Efekat na proliferaciju, PI3K-AKT ostvaruje delujući na transkripcioni faktor FOXO1 što omogućava prepisivanje ciklina D2. Pored ciklina D2, ovaj signalni put kontroliše prepisivanje većeg broja gena koji učestvuju u proliferaciji i diferencijaciji granulosa ćelija kao što su CYP19A1, inhibin, LHR, faktor rasta vaskularnog endotela i mnogi drugi.

FSH takođe aktivira i mitogenima aktiviranu kinazu p38 (engl. *mitogen-activated protein kinase p38*, MAPKp38) u granulosa ćelijama. Aktivacija MAPKp38 pod uplivom FSH se javlja brzo, nakon 10 minuta i traje do 1 sat. Takođe, fosforilacija ove kinaze je uočena u jajnicima nakon primene PMSG (engl. *pregnant mare serum gonadotropin*). Smatra se da fosforilacija MAPKp38 nije zavisna od PKA jer aktivacija ove kinaze nije dovela do fosforilacije MAPKp38 u granulosa ćelijama pacova. Fosforilacija MAPKp38 utiče na steroidogenezu u granulosa ćelijama. Naime, sprečavanje aktivnosti MAPKp38 u granulosa ćelijama koje su stimulisane sa FSH dovodi do povećanja produkcije STAR i progesterona dok smanjuje prepisivanje CYP19A1

i produkciju estradiola. Ovaj različiti efekat MAPKp38 na steroidogenezu se ostvaruje preko dva transkripciona faktora, LRH-1 (engl. *liver receptor homolog-1*) i DAX-1 (engl. *dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, Gene 1*) koji imaju suprotan efekat na produkciju progesterona i estradiola u granulosa ćelijama. Pored efekta na steroidogenezu, MAPKp38 fosforiliše protein toplotnog šoka 27 menjajući organizaciju citoskeleta i preživljavanje granulosa ćelija. Smatra se da veza između cAMP-PKA i MAPKp38 predstavlja mehanizam koji kontroliše apoptozu u granulosa ćelijama preovulatornih folikula.



**Slika 6.5.** Šema glavnih signalnih puteva u granulosa ćelijama koji se aktiviraju sa FSH. Detalji u tekstu. (Slika je napravljena u Biorenderu).

### 6.6.5. Efekti estradiola u granuloza ćelijama

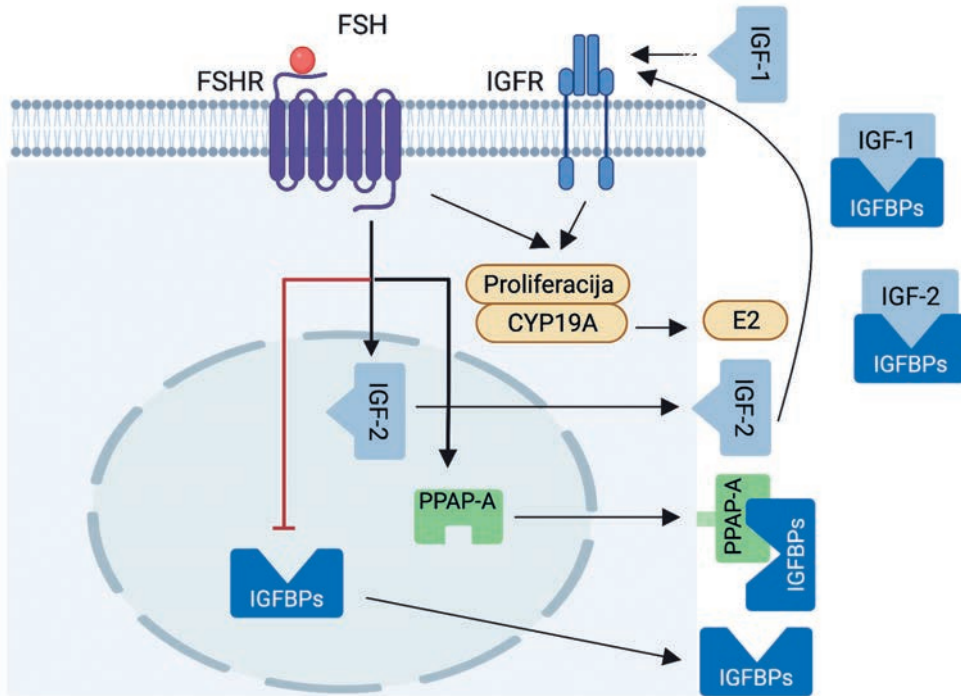
Estradiol se sintetiše u većim količinama u folikulu koji je odabran za ovulaciju u poređenju sa ostalim regrutovanim folikulima u kohorti. Folikulska tečnost dominantnog folikula sadži više estradiola, a manje androgena, dok ostali regrutovani folikuli pokazuju više androgena, a manje estrogena. U kasnoj folikulskoj fazi količina produkovanog estradiola je u korelaciji sa veličinom folikula i dostiže svoju maksimalnu vrednost od oko 1 µg/mL. Estradiol koji se proizvodi u dominantnim folikulima dovodi do negativne povratne sprege na produkciju FSH iz hipofize. Ova sprega doprinosi padu u količini FSH u sredini folikulske faze što ima značajan uticaj na atreziju ostalih regrutovanih folikula. Pad u količini FSH omogućava preživljavanje samo onih folikula koji imaju veću gustinu FSHR. Pri kraju razvoja folikula dolazi do smanjenja gustine FSHR, ali se povećava gustina LHR u dominantnom folikulu čime se osetljivost prema FSH smanjuje, a prema LH raste. Povećano stvaranje estradiola i promena osetljivosti folikula prema LH su odlike dominantnog folikula kod žena, ali i krava i kobilica.

### 6.6.6. Efekti faktora rasta slični insulinu u granuloza ćelijama

Faktori rasta slični insulinu (engl. *insulin-like growth factors*, IGFs) igraju važnu ulogu u regulaciji razvoja antralnih folikula. IGFs pripadaju faktorima rasta koji imaju jedan polipeptidan lanac male molekulske mase. Naziv su dobili jer su strukturno i funkcionalno slični insulinu. U folikulskoj tečnosti su pronađeni IGF-1 i IGF-2. IGF-1 je najverovatnije poreklom iz cirkulacije, dok se IGF-2 stvara u teka ćelijama svih folikula, teka i granuloza ćelijama malih antralnih folikula i granuloza ćelijama preovulatornih folikula. Nivoi IGF-1 i IGF-2 u cirkulaciji se ne menjaju, međutim pokazana su značajna variranja koncentracije ovih faktora u folikulskoj tečnosti tokom menstrualnog ciklusa. Receptor za IGF-1 kojeg aktiviraju i IGF-1 i IGF-2 je prisutan u granuloza ćelijama dominantnog folikula. Dokazano je i prisustvo receptora za IGF-2 u teka ćelijama ali se smatra da nema značajniju ulogu u IGF signalizaciji kod dominantnih folikula. iRNK

za IGF-1 i IGF-2 su pronađene u teka ćelijama malih antralnih folikula ali je samo iRNK za IGF-2 detektovana u granuloza ćelijama dominantnih folikula. Smatra se da IGF-2 nosi ulogu IGF signalizacije u razvoju folikula kod čoveka i primata. Značajnost IGF-2 tokom razvoja folikula je prikazana i u eksperimentima gde je infuzija IGF-1 dovela do porasta ovog faktora u cirkulaciji ali nije uticala na funkciju jajnika. Ovaj podatak takođe ukazuje da lokalno produkovani IGFs jesu dovoljni u regulaciji razvoja folikula.

IGFs dovode do proliferacije granuloza ćelija i povećanja u produkciji estradiola i progesterona u kulturi humanih granuloza ćelija ili kulturi luteinskih granuloza ćelija. Smatra se da IGF i FSH deluju sinergistički ostvarujući navedene efekte u granuloza ćelijama (Slika 6.6). Važnu ulogu u efektima IGFs imaju lokalno produkovani IGF vezujući proteini (engl. *IGF-binding proteins*, IGFbps). Postoji nekoliko tipova IGFbp od kojih su IGFbps 1-5 pronađeni ili u folikulskoj tečnosti, ili je njihova iRNK identifikovana u granuloza ćelijama. Osnovna uloga IGFbps je da vezuju IGFs i neutrališu njihovu aktivnost. Kao rezultat vezivanja IGFs od strane IGFbps dolazi do smanjenja produkcije estradiola koja je stimulisana sa FSH u granuloza ćelijama. Od posebnog značaja za razvoj folikula su IGFbp-2 i IGFbp-4. Oba IGFbps se prepisuju u zdravim i većim folikulima ili u folikulima koji se nalaze u kasnijim stadijumima razvoja, dok je njihovo eksprimiranje povećano u atretičnim folikulima. Više IGFbps proizvode folikuli koji imaju manje receptora za FSH, dok folikul koji ima više receptora za ovaj gonadotropni hormon će proizvoditi manje IGFbps. Drugačije, sinteza i lučenje IGFbps se sprečava sa FSH što će smanjiti vezivanje ovih proteina za IGFs, a time će omogućiti i veću dostupnost IGFs za granuloza ćelije. Pored inhibicije prepisivanja IGFbps od strane FSH, njihovo proteolitičko procesovanje takođe predstavlja jedan od mehanizama koji povećava dostupnost IGFs za granuloza ćelije. Posebno je značajna metaloproteazna aktivnost PAPP-A (engl. *pregnancy-associated plasma proteina A*) koji seče IGFbp4 na manje fragmente i time sprečava njegovu funkciju neutralizacije IGFs. Veća količina PAPP-A je pokazana u granuloza ćelijama dominantnih folikula što predstavlja važan mehanizam u odabiru dominantnog folikula.



**Slika 6.6.** Efekat IGF-1 i 2 na rast i razvoj folikula tokom FSH stimulacije. Detalji u tekstu. (Slika je napravljena u Biorenderu).



## 6.7. LITERATURA

- Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen T, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Ln ZJ, Liu K (2010) Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet* 19:397–410.
- Andric N i Ascoli M (2006) A delayed, gonadotropin-dependent and growth-factor mediated activation of the ERK1/2 cascade negatively regulates aromatase expression in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 20:3308–3320.
- Baird. A model for follicular selection and ovulation: lessons from superovulation. *J Steroid Biochem* 127:15–23.
- Belli i Shimasaki. Molecular Aspects and Clinical Relevance of GDF9 and BMP15 in Ovarian Function. *Vitam Horm* 107:317–348.
- Chandra V, Sharma GT (2020) *In vitro* strategies to enhance oocyte developmental competence. *Front Biosci (Schol Ed)* 12:116–136.
- Cottom J, Salvador LM, Meizels ET i sar. (2003) Follicle-stimulating hormone activates extracellular signal-regulated kinase but not extracellular signal-regulated kinase kinase through a 100-kDa phosphotyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 278:7167–7179.
- Diaz Wigglesworth K, Eppig JJ (2007) Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci* 120:1330–40.
- Donaubauer EM, Law NC, Hunzicker-Dunn ME (2016) Follicle-Stimulating Hormone (FSH)-dependent Regulation of Extracellular Regulated Kinase (ERK) Phosphorylation by the Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Phosphatase MKP3. *J Biol Chem* 291:19701–19712.
- El-Hayek S, Demestere I, Clarke HJ (2014) Follicle-stimulating hormone regulates expression and activity of epidermal growth factor receptor in the murine ovarian follicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:16778–16783.
- Gershon E, Plaks V, Dekel N (2008) Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Mol Cell Endocrinol* 282:18–25.
- Hunzicker-Dunn M, Maizels ET (2006) FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal* 18:1351–1359.
- Kinneer HM, Tommaszewski CE, Chang FI, Moravek MB, Xu M, Padmanabhan V, Shikanov A (2020) The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction* 160:R25–R39.
- Law NC (2017) How Protein Kinase A Activates Canonical Tyrosine Kinase Signaling Pathways To Promote Granulosa Cell Differentiation. *Endocrinology* 158:2043–2051.
- Liu T (2020) Where are the theca cells from: the mechanism of theca cells derivation and differentiation. *Chin Med J (Engl)* 133:1711–1718.

- Maizels ET, Mukherjee A, Sithanandam G, Peters CA, Cotton J, Mayo KE, Hunzicker-Dunn M (2001) Developmental regulation of mitogen-activated protein kinase-activated kinases-2 and -3 (MAPKAPK-2/-3) in vivo during corpus luteum formation in the rat. *Mol Endocrinol* 15:716–733.
- Maizels ET, Cotton J, Jones JC, Hunzicker-Dunn (1998) Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 139:3353–3356.
- Mazerbourg S, Hsueh AJW (2003) Growth differentiation factor-9 signaling in the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 202:31–36.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jon S-LK, Conti M (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303(5658): 682–684.
- Puri P, Little-Ihrig L, Chandran U, Law NC, Hunzicker-Dunn M, Zeleznik AJ (2016) Protein Kinase A: A Master Kinase of Granulosa Cell Differentiation. *Sci Rep* 6:28132.
- Reddy P, Liu L, Adhikari D i sar. (2008) Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 319(5863):611–613.
- Solovyeva EV, Hayashi M, Margi K, Barkats C, Klein C, Amsterdam A, Hsueh AJ, Tsafri A (2000) Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. *Biol Reprod* 63: 1214–1218.
- Su Y-Q, Sugiura K, Wigglesworth K (2008) Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135:111–112.
- Wayne CM, Fam H-Y, Cheng X, Richards JS (2007) Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol* 21:1940–1957.
- Young JM, McNeilly AS (2010) Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 140: 489–504.

**Nebojša Andrić**

---

**7.  
ĆELIJSKI I  
MOLEKULSKI  
MEHANIZMI U  
OVULACIJI**

---



Ovulacija je kompleksan proces u kome dolazi do oslobađanja zrele jajne ćelije iz jajnika. Kod većine sisara, uključujući i čoveka, uspešan proces ovulacije zavisi od dva gonadotropina, folikulostimulišućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Samo početak procesa ovulacije zavisi od značajnog, višestrukog povećanja lučenja LH (ovulatornog talasa LH). Međutim, nova saznanja u poslednjih nekoliko decenija ističu važnost velikog broja parakrinih i autokrinih faktora i signala koji su takođe neophodni za proces ovulacije. Zajedno sa FSH i LH, parakrini i autokrini signali dovode do sazrevanja i odabira kompetentne jajne ćelije koja će biti oslobođena iz jajnika.

Pre nego što se prikažu događaji tokom ovulacije i mehanizmi koji se aktiviraju nakon stimulacije sa LH u pojedinim odeljcima folikula, kratko ćemo se osvrnuti na sposobnost pojedinih ćelija da odgovore na LH. Naime, pokazano je da muralne i kumulusne granuloza ćelije pokazuju različit odgovor na stimulaciju sa LH. Stimulacija izolovanog kompleksa kumulus-jajna ćelija (engl. *cumulus-oocyte complex*, COC) primenom LH ne dovodi do ekspanzije kumulusnih granuloza ćelija. Takođe, izolovan COC pokazuje smanjeno vezivanje humanog horionskog gonadotropina (engl. *human chorionic gonadotropin*, hCG). Razlog ovakvog odgovora COC, odnosno kumulusnih ćelija na LH, je u činjenici da je eksprimiranje receptora za LH (LHR) manje kod kumulusnih granuloza ćelija u poređenju sa muralnim granuloza ćelijama. Kumulusne granuloza ćelije čoveka u nezrelim i zrelim folikulima pokazuju prisustvo LHR ali su nivoi nekoliko puta manji u poređenju sa gustinom ovog receptora na muralnim granuloza ili teka ćelijama. Vrlo malo ili potpuno odsustvo eksprimiranja LHR je takođe zapaženo kod sveže izolovanih kumulusnih granuloza ćelija miša, govečeta i konja. Ova mala gustina LHR koji se nalazi na kumulusnim granuloza ćelijama nije dovoljna da izazove odgovor na ovulatorni talas LH. U prilog ovim nalazima su i rezultati studija u kojima je pokazano da je gustina LHR na granuloza ćelijama važna za odgovor ćelija na LH stimulaciju. Granuloza ćelije sa malom gustinom LHR ne pokazuju očekivani odgovor na stimulaciju sa LH u poređenju sa granuloza ćelijama koje imaju veću gustinu LHR. Tako, u granuloza ćelijama sa malom gustinom LHR ne dolazi do smanjenja eksprimiranja aromataze (CYP19A1) nakon primene hCG. Kod granuloza ćelija sa većom gustinom LHR, hCG dovodi

do smanjenja CYP19A1. Pošto je smanjenje eksprimiranja CYP19A1 jedan od glavnih markera odgovora granuloza ćelija na ovulatorni talas LH može se zaključiti da veća gustina LHR obezbeđuje odgovarajući ovulatorni odgovor granuloza ćelija.

Ćelijski i molekularni mehanizmi tokom ovulacije se mogu posmatrati kroz događaje u različitim odeljcima jajnika: (i) muralnim granuloza ćelijama, (ii) kumulusnim granuloza ćelijama i (iii) događaji u jajnoj ćeliji.

## 7.1. ĆELIJSKI I MOLEKULARNI MEHANIZMI U MURALNIM GRANULOZA ĆELIJAMA

Prvi korak koji se dešava u muralnim granuloza ćelijama tokom ovulatornog talasa LH je aktivacija LHR koji zatim pokreće veći broj signalnih puteva (Slika 7.1).

### 7.1.1. Signalni put cAMP

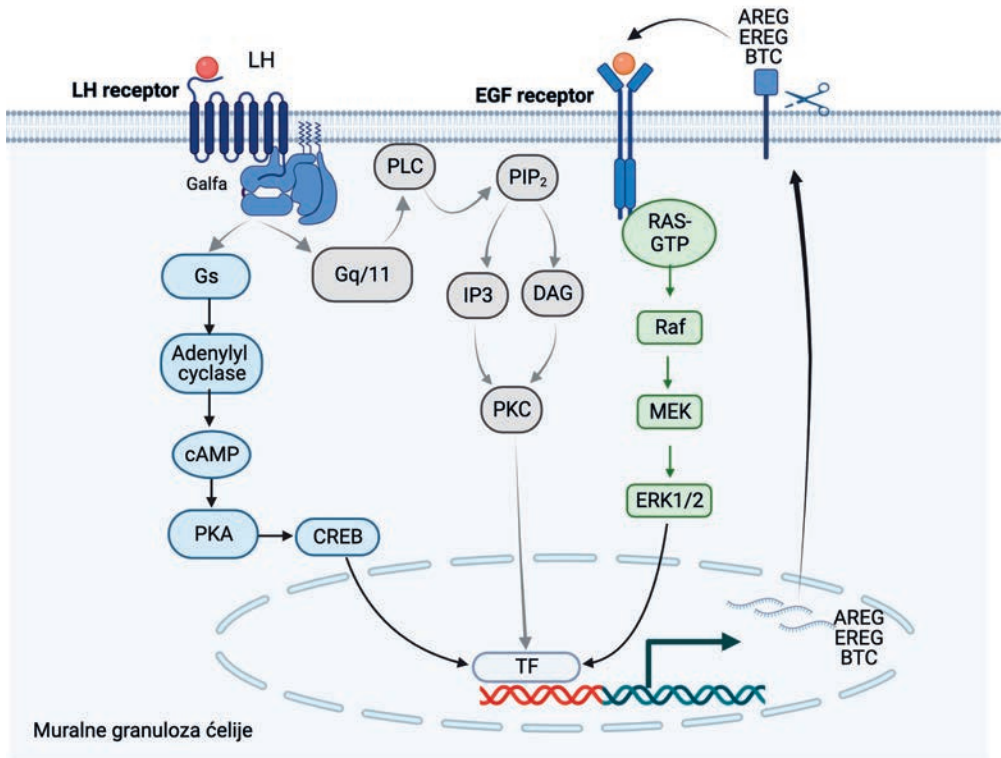
Jedan od puteva koji se aktivira u muralnim granuloza ćelijama je aktivacija proteina  $G_s$  i adenilil ciklaze (AC) koji će dovesti do povećanja cikličnog adenzin-monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP). Porast cAMP dovodi do aktivacije protein kinaze A (PKA) koja će potom aktivirati transkripcioni faktor CREB (engl. *cAMP regulatory element binding protein*) fosforilacijom na serinu 133. CREB se vezuje za regulatorne sekvence DNK koje odgovaraju na cAMP (engl. *cAMP-responsive element*, CRE). Aktivacija ovog signalnog puta će dovesti do povećanog prepisivanja većeg broja gena koji imaju značaj za proces ovulacije. Grupa gena koja se prepisuje aktivacijom signalnog puta cAMP-PKA pripada familiji faktora koji su slični epidermalnom faktoru rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF), a važnost ove grupe gena za ovulaciju će biti opisana u narednom delu ovog poglavlja.

Važnu ulogu u regulaciji aktivnosti signalnog puta cAMP igraju fosfodiesteraze (engl. *phosphodiesterases*, PDE). PDE su enzimi koje razgrađuju cAMP i na taj način regulišu nivo ovog sekundarnog glasnika u ćeliji. Do

sada je identifikovano 11 familija ovih enzima pri čemu se svaka familija sastoji od 1 do 4 člana. U jajnicima pacova, PDE4D i PDE3 igraju značajnu ulogu u ovulaciji i sazrevanju jajne ćelije. O ulozi PDE3 u sazrevanju jajne ćelije će biti više reči u narednom delu ovog poglavlja. Uloga PDE4D je usmerena na regulaciju nivoa cAMP u granuloza ćelijama nakon stimulacije gonadotropinima što omogućava adekvatni odgovor ovih ćelija na ovulatorni talas LH kao i sam proces ovulacije. Miševi kod kojih je genetski utišana ova PDE pokazuju smanjenu ovulaciju kao i eksprimiranje gena koji su uključeni u ovulaciju. Takođe, nakupljanje cAMP koje se dešava kao posledica nemogućnosti razgradnje ovog molekula usled inaktivacije PDE4D dovodi do prerane luteinizacije, a jajnici ovakvih miševa pokazuju zarobljenu jajnu ćeliju u folikulima.

### 7.1.2. Signalni put PKC

LHR, pored opisanog puta  $G_s$ -cAMP-PKA, može da aktivira i nekoliko drugih signalnih puteva u muralnim granuloza ćelijama. Naime, ovulatorna doza LH i visoka gustina LHR dovodi do aktivacije proteina  $G_{q/11}$  koje će zatim aktivirati fosfolipazu C (engl. *phospholipase C*, PLC) dovodeći do povećanja nivoa inozitol 3-fosfata (engl. *inositol trisphosphate*,  $IP_3$ ), oslobađanja  $Ca^{2+}$  i aktivacije protein kinaze C (PKC). Uloga ovog puta u ovulaciji dugo nije bila razjašnjena jer se smatralo da stimulacija LHR ne dovodi do aktivacije PKC u muralnim granuloza ćelijama. Međutim, eksperimenti na miševima koji su imali utišan gen za  $G_{q/11}$  su pokazali da aktivacija ovog G proteina nakon stimulacije LHR ipak ima značajnu ulogu tokom ovulacije. Iako ovi genetski modifikovani miševi nisu pokazali značajne promene u ekspanziji kumulusnih granuloza ćelija, ili u procesu nastavka mejotičke deobe jajne ćelije, primećen je delimičan poremećaj u prskanju folikula. Takođe je došlo i do delimično smanjene ovulacije kod ovih miševa koja je nastala zbog nemogućnosti eksprimiranja receptora za progesteron (PR) i njegovih ciljnih gena.



**Slika 7.1.** Signalni putevi u muralnim granulosa ćelijama nakon stimulacije sa LH. Detalji u tekstu. (Slika je napravljena u Biorenderu).

### 7.1.3. Signalni put ERK1/2

LHR aktivira vanćelijskim stimulusima regulisanu kinazu 1/2 (engl. *extracellular regulated kinase*, ERK1/2). Način aktivacije signalnog puta ERK1/2 nakon stimulacije LHR još nije u potpunosti razjašnjen. Fosforilacija ERK1/2 se javlja vrlo brzo nakon davanja LH i može se sprečiti inhibitorom PKA što ukazuje da ova kinaza ima značajnu ulogu u aktivaciji ERK1/2. Međutim, ostaje nejasno je da li PKA direktno dovodi do aktivacije ERK1/2 ili indirektno, aktivacijom ili inhibicijom nekog drugog signalnog puta. Fosfataze mogu biti jedne od tih indirektnih signalnih molekula preko kojih PKA utiče na ERK1/2. U nezrelim granulosa ćelijama pacova



PKA inaktiviše fosfataze i time sprečava defosforilaciju ERK1/2. Međutim, ovaj put kontrole aktivacije ERK1/2 nije opisan u granulosa ćelijama posle stimulacije sa LH. Eksperimenti u poslednjoj deceniji su ukazali na mehanizam koji može da dovede do aktivacije kinaze ERK1/2 u ovim ćelijama nakon stimulacije sa LH. Naime, pokazana je važna uloga receptora za EGF (engl. *EGF receptor*, EGFR) u fosforilaciji ERK1/2 nakon stimulacije sa LH. Iz većeg broja eksperimenata je zaključeno da aktivacija LHR dovodi do transaktivacije EGFR u autokrinom maniru na membrani muralnih granulosa ćelija. Aktiviran EGFR će potom dovesti do fosforilacije ERK1/2 putem klasičnog signalnog puta Ras-MAPK. Opisan je i mehanizam kako LHR transaktivira EGFR na muralnim granulosa ćelijama. Stimulacija LHR dovodi do oslobađanja nekoliko faktora koji imaju sposobnost da aktiviraju EGFR. Radi se o tri proteina koji pripadaju velikoj porodici faktora rasta sličnih EGF, a to su amfiregulin (AREG), epiregulin (EREG) i betacelulin (BTC). Ova velika porodica transmembranskih proteina poseduje signalnu sekvencu, transmembranski domen i barem jedan EGF domen i mogu da se vezuju za EGFR.

Pod uplivom ovulatornog talasa LH, u periodu 1–3 sata, dolazi do ekspresiranja AREG, EREG i BTC, a njihovo ekspresiranje je regulisano signalnim putem cAMP-PKA. U promotorskom regionu gena za AREG se nalazi sekvencija koja vezuje CREB. U promotorskom regionu EREG ne postoji ova sekvencija, ali se zato nalaze mesta za vezivanje transkripcionog faktora Sp1. Ovaj transkripcioni faktor ima veći broj mesta koja se mogu fosforilisati od strane PKA. Nakon ekspresiranja, AREG, EREG i BTC, ugrađuju se u membranu muralnih granulosa ćelija. Da bi ovi faktori bili aktivni mora se izvršiti sečenje odnosno, oslobađanje EGF domena sa ovih molekula. Alfa-konvertujućim enzimom nekroze tumora, (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme*, TACE, poznat i kao ADAM17) je metaloproteinaza koja prepoznaje cisteinom bogate domene na ovim molekulima, seče ih i oslobađa EGF domen. Ovaj enzim se takođe prepisuje u muralnim granulosa ćelijama pod uticajem ovulatornog talasa LH. Dakle, mehanizam aktivacije kinaze ERK1/2 u muralnim granulosa ćelijama nakon stimulacije sa LH uključuje aktivaciju signalizacije LHR-G<sub>s</sub>-cAMP-PKA. PKA dovodi do povećanja prepisivanja AREG, EREG i BTC koji se ugrađuju u membranu, a zatim se odvajaju EGF domeni aktivnošću metalopro-

teinaze TACE. EGF domeni ova tri faktora aktiviraju EGFR na membrani muralnih granulosa ćelija u autokrinom maniru dovodeći do aktivacije ERK1/2 u ćeliji (Slika 71). U poglavlju posvećenom ćelijskim i molekulskim događajima u kumulusnim ćelijama tokom ovulacije će se objasniti značaj AREG, EREG i BTC za odgovor kumulusnih granulosa ćelija na ovulatorni talas LH.

Kinaza ERK1/2 ima veoma važnu ulogu u odgovoru muralnih granulosa ćelija na ovulatorni talas LH. Važnost ERK1/2 u delovanju LH na jajnike je pokazana kod miševa kod kojih je specifično utišana ova kinaza. Muralne granulosa ćelije kod ovih miševa nisu bile u stanju da odgovore na dejstvo LH. Više od 75% gena koji su zavisni od LH pokazuje promene, uključujući gene koji kontrolišu steroidogenezu kao i gene koji učestvuju u ekspanziji kumulusnih granulosa ćelija. Naime, kod kontrolnih miševa, uplivom LH, dolazi do kočenja eksprimiranja CYP19A1, a povećanja iRNK za steroidogeni akutni regulatorni protein (engl. *steroidogenic acute regulatory protein*, STAR) i enzim koji seče bočni lanac holesterola (CYP11A1) što dovodi do pada nivoa estradiola, a povećanja nivoa progesterona. Međutim, kod miševa sa nedostatkom ERK1/2 je primećeno da LH ne može da smanji CYP19A1 i nivo estradiola, a ni da poveća sintezu progesterona. Takođe je pokazano da ERK1/2 ima značajnu ulogu u zaustavljanju proliferacije i diferencijacije granulosa ćelija koji su stimulisani sa FSH. Kod miševa sa utišanom kinazom ERK1/2, granulosa ćelije i dalje proliferišu, odnosno ne dolazi do terminalne diferencijacije ćelija pod delovanjem LH. Stoga se pretpostavlja da ERK1/2 ima ulogu prekidača u muralnim granulosa ćelijama, odnosno da aktivacija ove kinaze sa LH dovodi do zaustavljanja ćelijskih i molekulskih događaja koje reguliše FSH (sinteza estradiola i proliferacija granulosa ćelija), a pokreće one koji su zavisni od LH (sinteza progesterona i terminalna diferencijacija ćelija). Pored ovih promena na granulosa ćelijama, nedostatak kinaze ERK1/2 vodi do izostanka oslobađanja jajne ćelije iz jajnika i javlja se infertilitnost.

### 7.1.4. Trankripcioni faktori

Identifikovano je i nekoliko transkripcionih faktora koji takođe igraju značajnu ulogu u odgovoru muralnih granuloza ćelija na LH. Oni predstavljaju krajnje efektore navedenih signalnih puteva. Neki od tih transkripcionih regulatora su prisutni u ćelijama i pre ovulatornog talasa LH, međutim, većina njih se eksprimira tokom ovulatornog procesa regulišući veći broj gena važnih za ovulaciju. Neki od značajnijih transkripcionih faktora su PR, nuklearni receptor ko-aktivator RIP140 i CCAAT-vezujući protein (engl. *CCAAT/Enhancer binding protein, C/EBP*). PR se nalazi pod kontrolom signalnih puteva PKA-cAMP i ERK1/2 i eksprimira se nekoliko sati nakon LH talasa. Posle povećanja nivoa u ćeliji, ovaj receptor se aktivira visokom koncentracijom lokalno nastalog progesterona, premešta u jedro i pokreće transkripciju gena koji učestvuju u ovulaciji. Značaj PR u ovulaciji je pokazan kod miševa kojima je utišan ovaj receptor. Iako su ovi miševi imali normalni rast folikula, luteinizaciju, ekspanziju kumulusnih granuloza ćelija i nastavak mejoze jajne ćelije, primećen je poremećaj u oslobađanju jajne ćelije iz folikula zbog izostanka prskanja folikula. Stoga je uloga PR isključivo vezana za proces prskanja folikula. Ovaj receptor reguliše veliki broj gena koji se stimulišu sa LH, a uključeni su u proces prskanja folikula kao što su različite proteaze, zatim veći broj transkripcionih faktora, kao i faktora odgovornih za ćelijsku adheziju, vaskularnu aktivnost i inflamaciju. Nuklearni receptor koaktivator RIP140 se visoko eksprimira u granuloza ćelijama. Kod miševa koji nemaju ovaj receptor izostaje ovulacija nakon upliva LH. Luteinizacija se normalno odvija, ali jajna ćelija ostaje zarobljena unutar folikula koji su luteinizirali. Mehanizam koji dovodi do ovakvog fenotipa se ogleda u nemogućnosti ekspresije gena koji su odgovorni za prskanje folikula. Sličan fenotip, odnosno normalna luteinizacija uz odsustvo prskanja folikula kod miševa kojima nedostaju RIP140 i PR, ukazuje da su ova dva transkripciona faktora možda deo istog signalnog puta koji kontroliše prskanje folikula tokom procesa ovulacije. C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$  su transkripcioni faktori koji se ekspimiraju nekoliko sati nakon ovulatornog talasa LH u granuloza ćelijama. Ovi faktori pripadaju familiji leucin zip proteina i regulišu proliferaciju i diferencijaciju velikog broja različitih ćelija. Aktivacija C/EBP $\alpha$  i  $\beta$  zavisi od kinaze ERK1/2 uka-

zujući da ovi transkripcioni faktori predstavljaju efektore signalnog puta ERK1/2. Utišavanja samo gena za C/EBP $\beta$  u granulosa ćelijama dovodi do delimičnog smanjenja ovulacije dok utišavanje gena za oba transkripciona faktora dovodi do potpunog izostanka ovulacije, a ovakvi miševi su infertilni. Fenotip miševa kod kojih nedostaju oba transkripciona faktora je vrlo sličan fenotipu miševa kojima nedostaje kinaza ERK1/2. Miševi kod kojih nedostaju CEBP $\alpha$  i  $\beta$  pokazuju poremećaje u sterodiogenezi, vaskularizaciji i održavanju žutog tela. Međutim, pokazuju određeni stepen ekspanzije kumulusnih ćelija i normalno sazrevanje jajne ćelije.

## **7.2. ĆELIJSKI I MOLEKULSKI MEHANIZMI U KUMULUSNIM GRANULOZA ĆELIJAMA**

Kumulusne granulosa ćelije su somatske ćelije koje okružuju jajnu ćeliju. Ove ćelije imaju važnu ulogu u razvoju, rastu i sazrevanju jajne ćelije kao i u fertilizaciji. Kumulusne granulosa ćelije obezbeđuju fizičku podršku i sredinu koja omogućava razvoj i sazrevanje jajne ćelije. Prvi sloj kumulusnih granulosa ćelija koji okružuje jajnu ćeliju se naziva korona radijata. Ovaj sloj direktno naleže na zonu pelucidu jajne ćelije. Kumulusne granulosa ćelije formiraju pseudostratifikovan epitel koji je povezan sa jajnom ćelijom pomoću membranskih ekstenzija oko korone radijate. Morfološka struktura kumulusnih granulosa ćelija se menja tokom razvoja folikula i različita je od morfološke strukture muralnih granulosa ćelija. Kumulusne ćelije u kompleksu sa jajnom ćelijom, pre stimulacije sa gonadotropinima, pokazuju nediferenciranu formu. Nakon stimulacije sa LH, kumulusne granulosa ćelije pokazuju diferenciranu formu, nisu kompaktne, imaju jasnu citoplazmu i okrugao oblik. Kao što je rečeno na početku ovog poglavlja, citoplazme kumulusnih granulosa ćelije i jajne ćelije komuniciraju preko pukotinastih veza koje omogućavaju efikasnu razmenu signalnih molekula. Kumulusne granulosa ćelije i jajna ćelija pokazuju takozvanu metaboličku kooperativnost. Ova vrsta interakcije prikazana je 1960. godine kada je uočena nemogućnost jajne ćelije da koristi glukozu kao izvor energije za sazrevanje. Dalji eksperimenti ukazuju da sazrevanje jajne ćelije u stvari zavisi od sposobnosti kumulusnih granu-

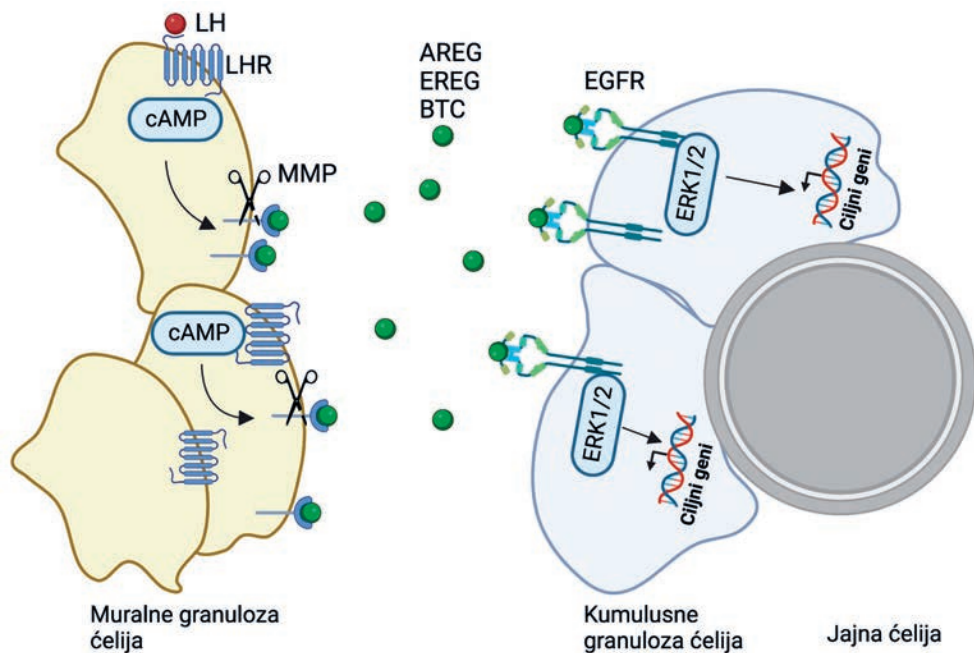
loza ćelija da metabolišu glukozu u piruvat koji potom jajna ćelija koristi kao izvor energije tokom procesa sazrevanja.

Napomenuto je da kumulusne granulosa ćelije nemaju ili imaju vrlo malo receptora za LHR u poređenju sa muralnim granulosa ćelijama. Takođe, ove ćelije pokazuju drugačiji odgovor na stimulaciji gonadotropinima u poređenju sa muralnim granulosa ćelijama. Iako muralne i kumulusne granulosa ćelije imaju FSHR, odgovor na FSH stimulaciju je drugačiji. Razlog tome leži u činjenici da su kumulusne granulosa ćelije izložene parakrinim faktorima koji se luče iz jajne ćelije. Ovi faktori, pre svega, faktor diferencijacije rasta 9 (engl. *growth differentiation factor 9*, GDF9) i protein morfogeneze kostiju 15 (engl. *bone morphogenetic protein 15*, BMP15) koji pripadaju familiji transformišućih faktora rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF $\beta$ ) utiču na formiranje karakteristika kumulusnih granulosa ćelija. GDF9 se vezuje za kinazni TGF $\beta$  receptor tip I (engl. *TGF $\beta$  type I receptor kinase*, poznat i kao ALK5) i za receptor za BMP tip II (engl. *morphogenetic protein receptor type II*, BMPRII), dok se BMP15 vezuje za receptor za BMP tip 1B (poznat i kao ALK6) i za BMPRII. Aktivacijom ovih receptora na kumulusnim granulosa ćelijama dolazi do inhibicije eksprimiranja gena koji su karakteristični za muralne granulosa ćelije, a aktivacije prepisivanje transkripta koji su karakteristični za kumulusne granulosa ćelije. Tako, GDF9 i BMP15 inhibišu prepisivanje iRNK za LHR, PR, CYP19A1 i CYP11A1, dok se u većoj meri eksprimiraju transkripti za transporter SLC38A3 (engl. *solute carrier family 38 member 3*), koji učestvuje u transportu specifičnih aminokiselina iz kumulusnih granuloznih ćelija u jajnu ćeliju, kao i za anti-Milerov hormon (engl. *anti-Millerian hormone*, AMH) i još mnogi drugi. Da faktori jajne ćelije regulišu eksprimiranje gena u kumulusnim granulosa ćelijama su potvrdili i eksperimenti odvajanje jajne ćelije od kumulusnih granulosa ćelija. U kumulusnim granulosa ćelijama koje su bile odvojene od jajne ćelije došlo je do povećanja eksprimiranja LHR i drugih transkripta koji se nalaze u muralnim granulosa ćelijama kao što su transkripti odgovorni za steroidogenezu nakon stimulacije sa FSH. Pošto se LHR kao i geni koji učestvuju u steroidogenezi, pre svega u sintezi progesterona, smatraju markerima luteinizacije, delovanje jajne ćelije može se posmatrati kao inhibitorno na proces luteinizacije u kumulusnim granulosa ćelijama.

### 7.2.1. Ekspanzija kumulusnih ćelija

Tokom ovulatornog talasa LH se uočava ekspanzija kumulusnih granulosa ćelija. Ekspanzija nastaje zbog stvaranja i lučenja velikog broja strukturnih proteina, proteoglikana i enzima koji na kraju dovode do formiranja vanćelijskog matriksa koji okružuje kumulusne granulosa ćelije. Premda kumulusne granulosa ćelije pokazuju delimično ili potpuno odsustvo LHR, postavlja se pitanje, na koji način ove ćelije odgovaraju na LH. Napomenuto je da LH deluje na muralne granulosa ćelije povećavajući stvaranje AREG, EREG i BTC, faktore rasta, koji mogu da aktiviraju receptor za EGF. Ova tri faktora imaju veoma značajnu ulogu i u aktivaciji kumulusnih granulosa ćelija tokom ovulatornog talasa LH. Naime, oslobođeni AREG, EREG i BTC sa muralnih granulosa ćelija nakon stimulacije sa LH, deluju na EGFR koji se nalazi na kumulusnim granulosa ćelijama. Aktiviran EGFR će dalje aktivirati kinazu ERK1/2 koje će pokrenuti prepisivanje ciljnih gena (Slika 7.2). Ovaj način aktivacije kumulusnih granulosa ćelija na stimulus LH je pokazan i eksperimentalno gde je dodatak AREG i EREG u kulturu preovulatornih folikula doveo do ekspanzije kumulusnih granulosa ćelija. Sa druge strane, miševi kojima nedostaje EGFR i AREG pokazuju odsustvo ekspanzije kumulusnih granulosa ćelija. Ovi podaci jasno ukazuju da faktori rasta slični EGF putem parakrinog signala omogućavaju odgovor kumulusnih granulosa ćelija na LH.

Među ciljnim genima koji se aktiviraju u kumulusnim granulosa ćelijama su i oni koji učestvuju u formiranju kumulusnog matriksa kao što su hijaluronin sintaza (engl. *hyaluronin sythase 2*, HAS2), TNF $\alpha$  stimulisani gen 6 (engl. *TNF $\alpha$  stimulated gene-6*, TSG-6) i pentraksin (engl. *pentraxin*, PTX-3). Ekspimiranje ovih gena je pod kontrolom AREG, EREG i BTC kao i signalnog puta EGFR-ERK1/2. Davanje AREG, EREG ili BTC kumulusnim ćelijama je dovelo do povećanja ekspimiranja gena za HAS2 i TSG-6, dok je sprečavanje aktivacije EGFR na kumulusnim ćelijama smanjilo ekspimiranje ovih gena tokom stimulacije sa LH.

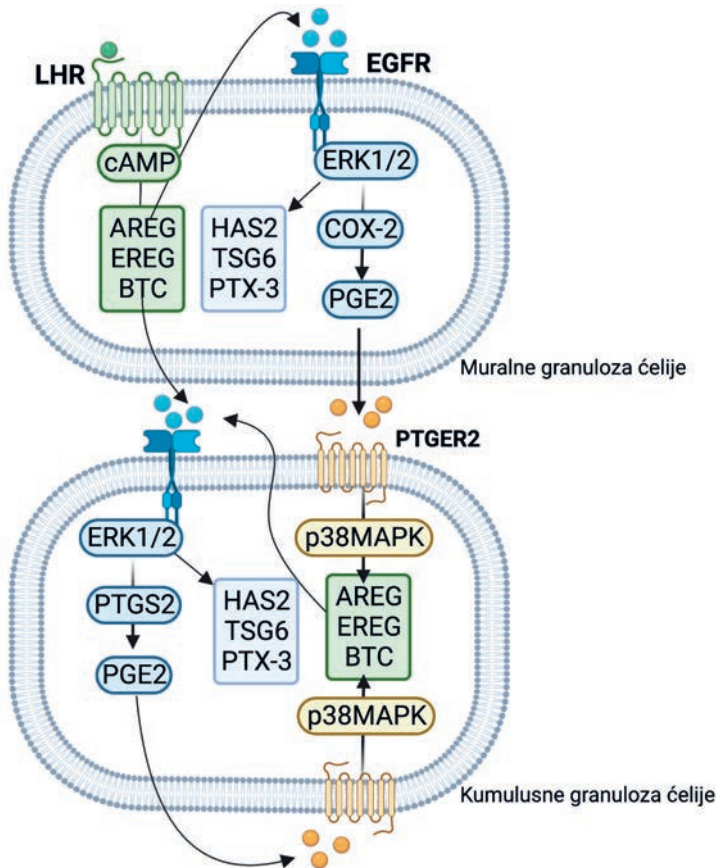


**Slika 7.2.** Model regulacije odgovora kumulusnih granuloza ćelija na ovulatorni talas LH. MMP–matriks metaloproteaze. Detalji u tekstu.

(Slika je napravljena u Biorenderu)

Aktivacija EGFR i ERK1/2 u kumulusnim granuloza ćelijama, pored povećanja ekspimiranja faktora neophodnih za formiranje kumulusnog matriksa, dovodi i do povećanja ekspimiranja enzima ciklooksigenaze-2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2) koji učestvuje u sintezi prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Povećan nivo COX-2 kod pacova se javlja 2–4 h nakon stimulacije sa LH, što povećava produkcije PGE<sub>2</sub> u kumulusnim granuloza ćelijama. Produkcija PGE<sub>2</sub> je značajna za proces ekspanzije kumulusnih ćelija i ovulaciju jer miševi kojima nedostaje enzim COX-2 pokazuju poremećenu ekspanziju kumulusa, smanjenu ovulaciju i fertilitet. Predložen je i model povezanosti faktora rasta sličnih EGF i PGE<sub>2</sub> u odgovoru kumulusnih granuloza ćelija na ovulatorni talas LH (Slika 7.3). AREG, EREG i BTC oslobođeni iz muralnih granuloza ćelije aktiviraju EGFR i ERK1/2 u muralnim i kumulusnim granuloza ćelijama što će povećati sintezu PGE<sub>2</sub>. Nastali PGE<sub>2</sub> se oslobađa iz muralnih i kumulusnih granuloza ćelija i potom aktivira receptor za

prostaglandin E2 (eng. *prostaglandin E2 receptor*, PTGER) koji se nalazi na membrani kumulusnih granuloza ćelija. Ovaj receptor je G protein spregnuti receptor koji se sastoji od četiri forme PTGER1, PTGER2, PTGER3, PTGER4. PTGER2 se eksprimira na kumulusnim granulocitima i aktivacija ovog receptora sa  $PGE_2$  će povećati fosforilacije MAPKp38 i ekspimiranje AREG, EREG i BTC u kumulusnim granuloza ćelijama. Ovi faktori će dovesti do ponovne stimulacije signalnog puta EGFR-ERK1/2, povećanog ekspimiranja COX-2 i produkcije  $PGE_2$ . Tim mehanizmom se pojačava delovanje faktora rasta sličnih EGF na kumulusne granuloza ćelije. Ovakva regulacija je dobila naziv autokrini signalna petlja.



**Slika 7.3.** Parakrini i autokrini mehanizmi u kontroli ekspimiranja faktora rasta sličnih EGF i produkcije  $PGE_2$  u granuloza ćelijama. Detalji u tekstu.

(Slika je napravljena u Biorenderu)



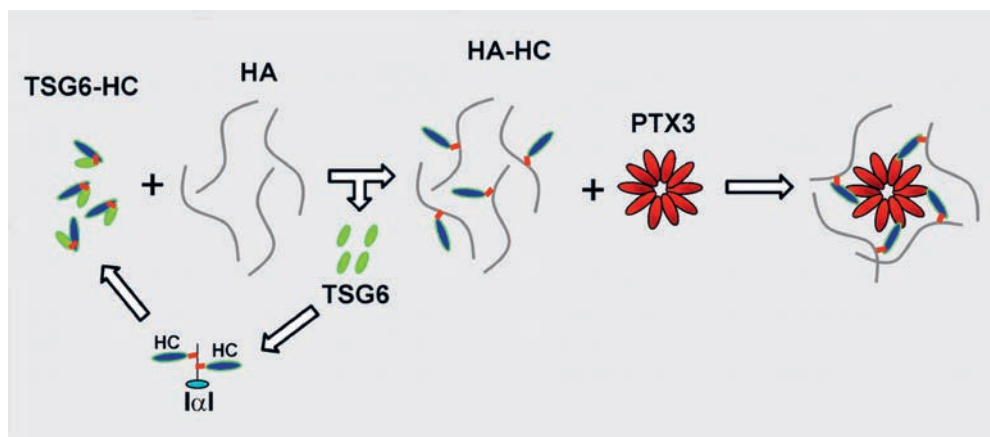
Pretpostavlja se i da faktori iz jajne ćelije GDF-9 i BMP-15 takođe omogućavaju prepisivanje gena koji učestvuju u ekspanziji kumulusnih ćelija. GDF-9 putem aktivacije ALK5 i BMPRII i signalnog puta SMAD2, 3 i 4 može da regulišu prepisivanje gena koji učestvuju u ekspanziji kumulusnih ćelija. Međutim, nije poznato da li ovi geni imaju sekvencu za vezivanje proteina SMAD ili ove signalne molekule služe kao koaktivatori u procesu njihove transkripcije. Moguće je da GDF-9 pojačava signalizaciju ERK1/2 u kumulusnim granulosa ćelijama, ili čak direktno aktivira ovaj signalni put koji će zatim pokrenuti prepisivanje gena odgovornih za ekspanziju kumulusnih ćelija. Za sada je mali broj istraživanja rađen na tu temu.

### 7.2.2. Vanćelijski matriks

Osnova za formiranje vanćelijskog matriksa je hijaluronska kiselina (engl. *hyaluronic acid*, HA) koja nastaje aktivnošću enzima hijaluronan sintaza 2. Sinteza HA se brzo povećava nakon stimulacije sa LH. Uloga HA je popunjavanje vanćelijskog prostora gde se molekuli HA postavljaju u obliku mreže. Ova mreža služi i kao osnov za vezivanje ostalih proteina i molekula koji učestvuju u formiranju kumulusnog matriksa. HA može da menja i funkciju same ćelije aktivirajući neke od signalnih puteva. Tako HA može da aktivira receptor CD44 na površini tumorskih ćelija dovodeći do fosforilacije ERK1/2 ili protein kinaze B (PKB ili AKT). Pošto se receptor CD44 eksprimira na kumulusnim granulosa ćelijama kod mnogih organizama uključujući i čoveka, sasvim je moguće da HA i CD44 mogu da interaguju menjajući funkciju kumulusnih ćelija. Međutim, za sada ne postoji puno podataka o efektima interakcije HA i CD44 na funkciju kumulusnih granulosa ćelija. Jedna studija ističe da HA koči apoptozu granulosa ćelija putem aktivacije CD44. Međutim, dalja istraživanja su neophodna da se potpuno rasvetli uloga HA i CD44 u funkciji kumulusnih granulosa ćelija.

U vanćelijskom matriksu, pored HA, proteini iz seruma ili proteini koji su lokalno sintetisani predstavljaju takođe neophodne molekule za formiranje matriksa. To su pre svega inter-alfa-tripsin inhibitor (IaI), proteoglikani i već spomenuti TSG-6 i PTX-3. IaI proizvode hepatociti i nalazi se u serumu. Za vreme preovulatornog perioda IaI ulazi u folikul i njegova koncentracija raste zbog povećane propustljivosti zida folikula tokom

stimulacije sa gonadotropinima. Važnost IaI u formiranju vanćelijskog matriksa je pokazana u eksperimentima u kojima je COC stimulisan bez prisustva seruma. Iako je došlo do sinteze HA, nije se formirao kumulusni matriks zbog izostanaka faktora iz seruma. Za vreme formiranja matriksa, teški lanac molekula IaI koji je spojen estarskom vezom za lanac bikunina se prebacuje na HA. Kao rezultat ove reakcije formira se HC-HA kompleks, a oslobađa slobodni bikunin. TSG-6 je drugi protein koji je neophodan za formiranje matriksa. Dakle, sintetiše se u kumulusnim granulosa ćelijama tokom ovulatornog talasa LH i vezuje se za HA molekule. Kod miševa kod kojih nedostaje ovaj protein dolazi do ovulacije, ali takozvane ogoljene jajne ćelije. TSG-6 učestvuje u prenosu HC na HA delujući kao kofaktor i katalizator ove reakcije. PTX-3 je kompleks sastavljen od 10 monomera koji se sintetiše u kumulusnim granulosa ćelijama. Kod miševa kod kojih je utišan PTX-3 dolazi do ovulacije, međutim, COC se brzo raspada iako je IaI prisutan u normalnim količinama. PTX-3 se ne vezuje direktno za HA već za druge molekule u matriksu kao što su TSG-6. Pretpostavlja se da PTX3 ima regrutujuću ulogu, odnosno da posreduje u vezivanju TSG-6 za HA omogućavajući stabilizaciju HA mreže (Slika 7.4).



**Slika 7.4.** Organizacija kumulusnog matriksa  
(preuzeto iz Organizing the Egg Matrix, Journal of Biological Chemistry,  
Volume 282, Issue 41, 12 October 2007, Page e99942). Detalji u tekstu.

Versikan je proteoglikan koji je srodan agrekanu koji se vezuje za HA u hrskavici. Versikan se sintetiše u ovulatornim jajnicima, tj. u muralnim

granuloza ćelijama i vezuje se za kumulusni matriks. Pretpostavlja se da se versikan vezuje za HA, međutim važnost ovog molekula za stabilnost i formiranje matriksa još nije u potpunosti razjašnjena. Za ugradnju versikana u kumulusni matriks neophodna je aktivnost proteaze ADAMTS1 (engl. a *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs type 1*) koja seče versikan na mestima gde se nalazi glikozaminglukan. ADAMTS1 se eksprimira u muralnim granuloza ćelijama uplivom LH i aktivacijom  $G_{q/11}$ . Takođe je uočeno da nedostatak PR dovodi do smanjenja prepisivanja ADAMTS1 i formiranja versikana. Stoga se može pretpostaviti da LH putem aktivacije  $G_{q/11}$  i PR kontroliše prepisivanje ADAMTS-1 u granuloza ćelijama. Miševi kojima nedostaje ADAMTS1 ispoljavaju smanjenu ovulaciju što ukazuje na važnost ne samo ove proteaze već i versikana za formiranje kumulusnog matriksa i ovulacije COC.

### 7.3. MOLEKULSKI MEHANIZMI U JAJNOJ ĆELIJI

U poglavlju 6 je napomenuto da se jajna ćelija nalazi zaustavljena u profazi mejoze I. Da bi mogla da bude oplodena, jajna ćelija, mora da završi proces mejotičke deobe. Veći broj istraživanja je rađen na temu mehanizma koji dovode do zastoja, odnosno nastavka deobe jajne ćelije i danas su događaji koji se dešavaju tokom ova dva procesa rasvetljeni. U ovom delu će prvo biti opisani mehanizmi koji dovode do zaustavljanja jajne ćelije u profazi mejoze I, a zatim i mehanizmi koji dovode do nastavka mejoze jajne ćelije.

#### 7.3.1. Zastoj jajne ćelije u mejozi

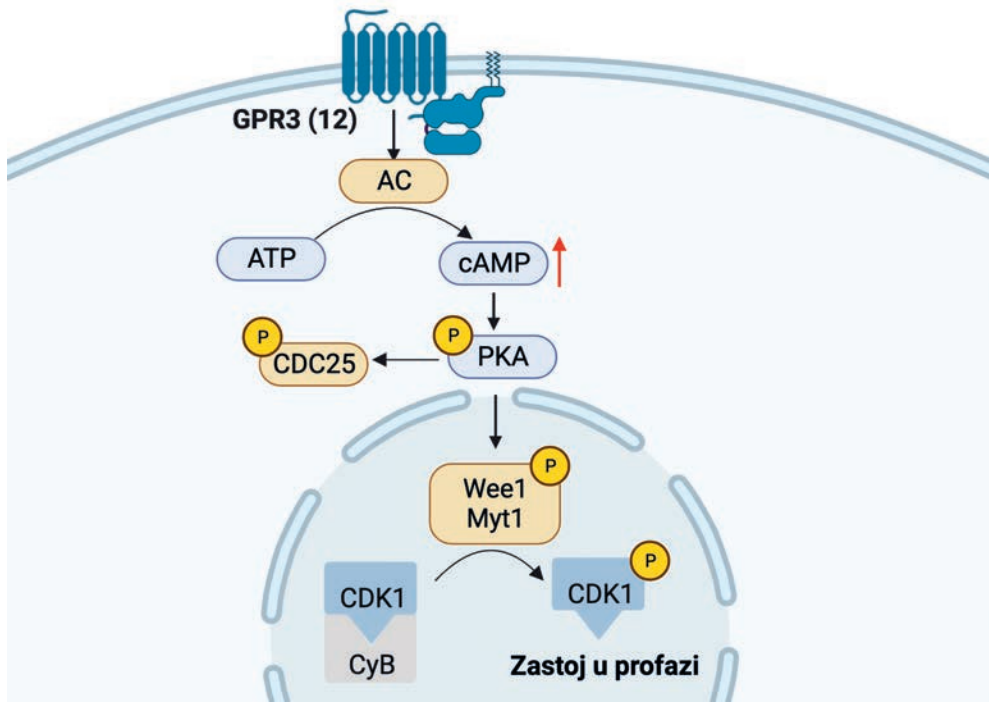
Primećeno je da kada se jajna ćelija izvadi iz folikula dolazi do pada u nivou cAMP koji je praćen spontanom nastavkom mejoze. Spontani nastavak mejoze jajne ćelije može biti sprečen dodavanjem 8-bromo-cAMP (analog cAMP) koji dovodi do povećanja nivoa cAMP u jajnoj ćeliji. Sličan efekat, odnosno zadržavanje jajne ćelije u profazi mejoze I, može se postići i inhibicijom PDE, enzima koji razgrađuju cAMP. Iz ovih eksperimenata se može jasno zaključiti da je stalan povišen nivo cAMP osnovni mehanizam koji dovodi do zastoja jajne ćelije u profazi mejoze I.

cAMP može nastati ili u samoj jajnoj ćeliji ili preći iz granuloza ćelija. Hipoteza koja je dugo bila prisutna je pretpostavljala da granuloza ćelije obezbeđuju cAMP za održavanje zastoja jajne ćelije u mejozi. Međutim, jajna ćelija može da obezbedi dovoljne količine cAMP za održavanje zastoja u mejozi. Naime, u jajnoj ćeliji su pronađeni membranski receptori GPR3 i GPR12 koji su spregnuti sa proteinom  $G_s$  i koji aktiviraju AC dovodeći do produkcije cAMP u koncentracijama dovoljnim za održavanje zastoja jajne ćelije u mejozi. Uloga GPR3 u održavanju zastoja jajne ćelije u mejozi je potvrđena kod miševa kojima nedostaje ovaj receptor i koji su pokazivali spontani nastavak mejoze u ranim antralnim folikulima. U jajnoj ćeliji *Xenopus leavis*, kao i jajnoj ćeliji miševa i pacova je pokazano prisustvo i drugog G vezujućeg proteina GPR12. Povećanje eksprimiranja ovog receptora je sprečilo nastavak mejoze koja je bila stimulisana dodavanjem progesterona. Međutim, miševima kojima je utišan GPR12 u jajnoj ćeliji nisu pokazivali očekivan nastavak mejoze što ukazuje da konstitutivna aktivnost ovog receptora nije dovoljna za održavanje zastoja jajne ćelije u mejozi. Prirodni ligandi za GPR3 i GPR12 nisu poznati, ali je pokazano da je GPR3 blisko povezan sa lipidnim i peptidnim receptorima. Inkubacija jajnih ćelija miševa sa sfingozin 1-fosfatom dovodi do odlaganja spontanog sazrevanja jajne ćelije ukazujući da lipidi mogu biti prirodni ligandi za ova dva receptora.

Nivo cAMP u jajnoj ćeliji takođe zavisi i od njegove razgradnje od strane PDE. Dok su PDE4D i PDE4B pronađeni u muralnim i kumulusnim granuloza ćelijama miševa, PDE3 je prisutan u jajnoj ćeliji pacova, miševa i svinja. Ova izoforma PDE nije detektovana u granuloza ćelijama folikula. Zbog pretpostavke da jajna ćelija može da obezbedi dovoljne količine cAMP za održavanje mejoze, PDE3 izoforma je bila posebno proučavana. Pokazano je da PDE3 vrši hidrolizu cAMP koji je nastao aktivnošću GPR3. Važnost razgradnje cAMP za procese održavanja ili nastavka mejoze je dokazana kod miševa kod kojih je utišan enzim PDE3 u jajnoj ćeliji. Kod ovih miševa ne dolazi do nastavka mejoze, odnosno sazrevanja jajne ćelije, zbog nemogućnosti razgradnje cAMP od strane PDE3.

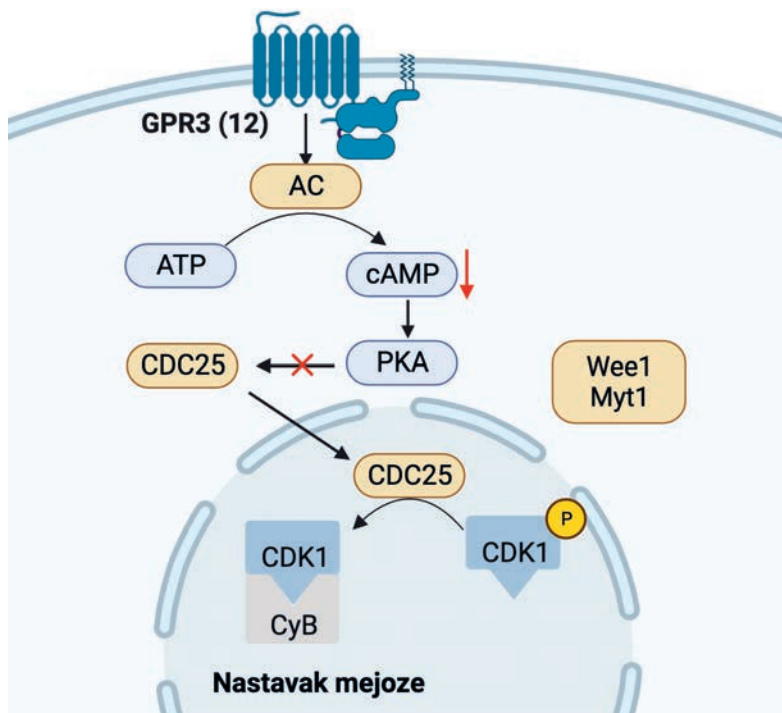
Pored GPR3 i PDE3, u procesu održavanja jajne ćelije u profazi mejoze I i njenog kasnijeg sazrevanja značajnu ulogu ima i faktor promocije sazrevanja (engl. *maturation-promoting factor*, MPF). MPF je heterodimer

koji se sastoji od ciklin zavisne kinaze 1 (engl. *cyclin-dependent kinase 1*, CDK1) i ciklina B (engl. *cycline B*, CyB). CDK1 zahteva vezivanje CyB kako bi ova kinaza mogla da fosforiliše specifične ostatke serina i treonina na ciljnim proteinima. Međutim, fosforilacija i defosforilacija odgovarajućih aminokiselinskih ostataka u molekuli CDK1 može da menja aktivnost ove kinaze utičući i na aktivnost celog kompleksa MPF. Tako, fosforilacija CDK1 tirozina na poziciji 15 i treonina na poziciji 14 inhibiše, dok defosforilacija ovih aminokiselinskih ostataka aktivira ovu kinazu, a time i ceo MPF. Mehanizam zastoja jajne ćelije u profazi mejoze I podrazumeva kontrolu aktivnosti MPF kompleksa preko regulacije fosforilacije i defosforilacije CDK1. Tokom zastoja jajne ćelije u mejozi, visok nivo cAMP će aktivirati PKA koja će potom fosforilisati dve kinaze WEE1 i MYT1. Aktivne WEE1 i MYT1 fosforilišu navedene aminokiselinske ostatke u CDK1 i tako inhibišu ceo MPF. PKA takođe fosforiliše i fosfatazu ćelijskog ciklusa 25B (engl. *cell division cycl 25 B*, CDC25B). Uloga CDC25B je da uklanja inhibitorne fosforilacije na CDK1 i tako aktivira ovu kinazu. Međutim, kada je fosforilisana od strane PKA, CDC25B se vezuje za specifične proteine koji ovu fosfatazu zadržavaju u citoplazmi i na taj način je sprečavaju da dođe u kontakt sa CDK1, koja se nalazi u jedru, i da je defosforiliše, odnosno aktivira. Stoga visok nivo cAMP preko aktivacije PKA i kinaza WEE1 i MYT1 inhibiše CDK1 i ceo MPF kompleks što drži jajnu ćeliju zarobljenu u profazi mejoze I (Slika 7.5.).



**Slika 7.5.** Mehanizam održavanja jajne ćelije u profazi mejoze I.  
Detalji u tekstu. (Slika je napravljena u Biorenderu)

Pad nivoa cAMP u jajnoj ćeliji smanjuje aktivnost PKA što dovodi, sa jedne strane do inaktivacije kinaza WEE1 i MYT1 i njihove translokacije iz jedra u citoplazmu, a sa druge do translokacije CDC25B u jedro. CDC25B u jedru defosforiliše ostatke treonina i tirozina na CDK1 što dovodi do aktivacije ove kinaze, odnosno celog MPF, prepisivanje ciljnih proteina i nastavka mejoze (Slika 7.6). Pored ove regulacije, pokazano je da se aktivnost CDK1 može kontrolisati i preko sinteze i degradacije CyB. Količina CyB se menja tokom ćelijskog ciklusa, pri čemu je najviša tokom S faze, a najmanja na kraju mitoze. Sprečavanje razgradnje CyB može da dovede do nastavka mejoze jajne ćelije.



**Slika 7.6.** Mehanizam nastavka mejoze jajne ćelije. Detalji u tekstu. (Slika je napravljena u Biorenderu)

### 7.3.1.1. Signalni put NPPC/NPR2

Sasvim je jasno da je signalni put GPR3/GPR12-Gs-AC-cAMP neophodan za održavanje jajne ćelije u profazi prve mejotičke deobe, međutim kao što je već rečeno, jajna ćelija izvađena iz folikula spontano sazreva, odnosno dolazi do nastavka mejoze. Drugim rečima, kod jajne ćelije izdvojene iz folikula dolazi do pada nivoa cAMP što će omogućiti nastavak mejoze. Zaključak je da granuloza ćelije imaju značajnu ulogu u regulaciji nivoa cAMP u jajnoj ćeliji i time utiču na blokadu ili nastavak mejoze. Veći broj istraživanja je pokazao da je ciklični guanozin-monofosfat (engl. *cyclic guanosin monophosphate*, cGMP) iz granuloza ćelija ključan molekul, učesnik u regulaciji nivoa cAMP u jajnoj ćeliji. cGMP nastaje od guanozin-trifosfata aktivnošću enzima guanilil ciklaze. cGMP koji je nastao u muralnim

i kumulusnim granuloza ćelijama prelazi u jajnu ćeliju kroz pukotinaste veze. Kada dospe u jajnu ćeliju cGMP inhibiše aktivnost PDE3 i na taj način sprečava razgradnju cAMP što održava visoki nivo ovog sekundarnog glasnika, a time i jajnu ćeliju u profaze mejoze I.

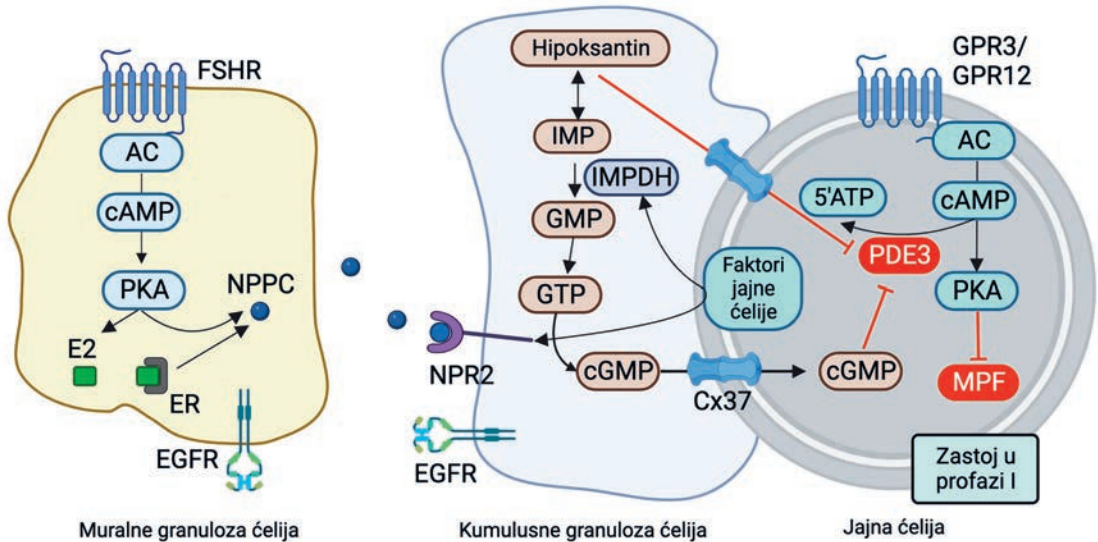
Produkcija cGMP u granuloza ćelijama zavisi od natriuretičkog peptida tipa C (engl. *C-type natriuretic peptide*, NPPC ili CNP) i njegovog receptora (engl. *natriuretic peptide receptor 2*, NPR2). NPPC se eksprimira u muralnim granuloza ćelijama, dok je receptor NPR2 pronađen samo na kumulusnim granuloza ćelijama. Model zaustavljanja jajne ćelije u mejozi putem aktivacije NPPC-NPR2 sistema uključuje lučenje NPPC iz muralnih granuloza ćelija koji će zatim u parakrinom maniru aktivirati NPR2 na kumulusnim granuloza ćelijama. Pošto NPR2 poseduje aktivnost guanilil ciklaze, doći će do formiranja cGMP od GTP. Nastali cGMP će preći iz kumulusnih ćelija u jajnu ćeliju dovodeći do inhibicije PDE3. Ovaj model regulacije nivoa cAMP od strane cGMP u jajnoj ćeliji je pokazan u eksperimentima u kojima je primena NPPC inhibisala spontano sazrevanje COC u *in vitro* uslovima. Primena NPPC nije ispoljavala ovaj efekat na ogoljenu jajnu ćeliju zbog nedostatka receptora NPR2 na kumulusnim granuloza ćelijama. Takođe, kod miševa koji nemaju NPR2, 50% jajnih ćelija ispoljava rano sazrevanje u ranim antralnim folikulima.

### 7.3.1.2. Efekat FSH na signalni put NPPC-NPR2

Pošto se jajna ćelija nalazi zarobljena u profazi mejoze I tokom rasta antralnih folikula pod uticajem FSH, jasno je da ovaj gonadotropin aktivira signalni put NPPC-NPR2. U eksperimentima je pokazano da *in vivo* aktivacija FSHR sa konjskim horionskim gonadotropinom (engl. *equine chorionic gandotropin*, eCG) stimuluše prepisivanje iRNK za NPPC u muralnim granuloza ćelijama. Smatra se da FSHR aktivacijom signalnog puta cAMP-PKA dovodi do povećanog prepisivanja NPPC. NPPC će se osloboditi iz muralnih granuloza ćelija i vezati za NPR2 na kumulusnim granuloza ćelijama što omogućava sintezu cGMP. Nastali cGMP će putem pukotinastih veza Cx37 preći u jajnu ćeliju gde će sprečiti aktivnost PDE3, a i time razgradnju cAMP. Visok nivo cAMP u jajnoj ćeliji će držati MPF kompleks u neaktivnom stanju što će onemogućiti sazrevanje jajne ćelije



pre ovulatornog talasa LH. Takođe, FSHR dovodi i do povećanja prepisivanja NPR2 u kumulusnim granuloza ćelijama čime dodatno pozitivno utiče na aktivnost signalnog puta NPPC-NPR2. Smatra se da u ovom procesu važnu ulogu ima i estradiol. Estradiol povećava eksprimiranje NPPC i NPR2 u granuloza ćelijama miša i pacova što će pozitivno uticati na stvaranje cGMP u kumulusnim granuloza ćelijama. Stoga se pretpostavlja da aktivacija signalnog puta NPPC-NRP2 od strane FSH tokom rasta i razvoja folikula uključuje povećanja eksprimiranja NPPC i NPR2 putem aktivacije signalnog puta estrogena (Slika 7.7).



**Slika 7.7.** Uloga FSH, estrogena i faktora iz jajne ćelije u zastoju jajne ćelije u profazi mejoze I. FSHR- receptor za folikulostimulišući hormon; AC- adenilil ciklaza; cAMP- ciklični adenozinin monofosfat; PKA- protein kinaza A; E2-estradiol; ER- receptor za estrogene; NPPC- natriuretički peptid tipa C; EGFR-receptor za epidermalni faktor rasta; NPR2 – receptor za natriuretički peptid tip C; IMP- inozin-5-monofosfat; IMPDH – inozin-5-monofosfat dehidrogenaza; GMP- guanozin monofosfat; GTP- guanozin trifosfat; cGMP- ciklični guanozin monofosfat; Cx37- koneksin 37; PDE3- fosfodiesteraza 3; 5'ATP- adenozin 5'-trifosfat; MPF-faktor promocije sazrevanja. Detalji u tekstu.

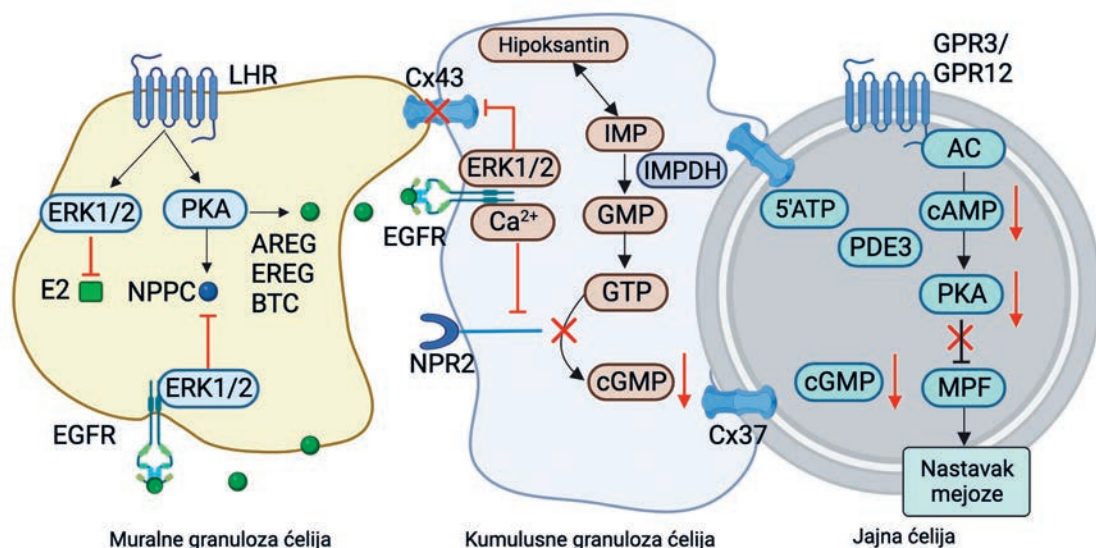
(Slika je napravljena u Biorenderu)

Studije su pokazale da enzim inozin-5-monofosfat dehidrogenaza (engl. *inosine-5'-monophosphate (IMP) dehydrogenase*, IMPDH) ima važnu ulogu u održavanju jajne ćelije zarobljene u profazi mejoze I. Ovaj enzim katališe formiranje GMP iz inozin-5-monofosfata (IMP), koji se zatim, serijom enzimskih reakcija, konvertuje u GTP, supstrat za NPR2. IMP može da se formira *de novo* ili od hipoksantina u granulosa ćelijama. Ovaj mehanizam kontrole produkcije cGMP otvara nove pravce u razumevanju regulacije održavanja jajne ćelije u profazi mejoze I. Smatra se da enzim IMPDH ima dvojaku ulogu. Jedna je da obezbeđuje supstrat za NPR2 putem stvaranja GMP od IMP u kumulusnim granulosa ćelijama, a druga je da reguliše nivo hipoksantina. Postojanje određenih nivoa hipoksantina je važna jer je pokazano da ovaj molekul može da pređe u jajnu ćeliju pumoću pukotinastih veza i spreči aktivnost PDE3 u jajnoj ćeliji. Tako hipoksantin doprinosi već postojećoj inhibiciji PDE3 aktivnosti od strane cGMP održavajući visok nivo cAMP u jajnoj ćeliji. Interesantno je i da jajna ćelija može da reguliše enzim IMPDH i signalni put NPPC-NPR2. Naime, u eksperimentima ko-kulture kumulusnih granulosa ćelija i jajne ćelije je primećeno povećanje iRNK za NPR2 u kumulusnim granulosa ćelijama do nivoa koji su nađeni u COC. Isti efekat je postignut stimulacijom kumulusnih granulosa ćelija sa faktorima koji se oslobađaju iz jajne ćelije, GDF-9 i BMP-15. Takođe, smanjenje eksprimiranja iRNK za IMPDH je pokazano u kumulusnim granulosa ćelijama miševa kada im je uklonjena jajna ćelija. Ovi podaci pokazuju da jajna ćelija preko svojih parakrinih faktora može da utiče na funkciju enzima IMPDH i signalnog puta NPPC-NRP2, i time kontroliše nivo cGMP, međutim detaljni mehanizam delovanja jajne ćelije na ovaj signalni mehanizam nije poznat.

### 7.3.2. Nastavak mejoze u jajnoj ćeliji

LH dovodi do nastavka mejoze jajne ćelije i uključuje sledeće događaje: LH smanjuje nivo cGMP u granuloza ćelijama što će smanjiti nivo ovog signalnog molekula u jajnoj ćeliji. Usled pada u nivou cGMP u jajnoj ćeliji dolazi do uklanjanja inhibitornog uticaja ovog molekula na PDE3 što će omogućiti hidrolizu cAMP i time smanjenje nivoa ovog sekundarnog glasnika. Pad nivoa cAMP smanjuje aktivnost PKA što će omogućava aktivaciju MPF i nastavak mejoze jajne ćelije.

Glavni uzrok koji će dovesti do smanjenja nivoa cGMP je smanjenje aktivnosti signalnog puta NPPC-NPR2 u muralnim i kumulusnim granuloza ćelijama. Pokazano je da faktori rasta slični EGF učestvuju u regulaciji signalnog puta NPPC-NPR2 u granuloza ćelijama koje su stimulisane sa LH. Tako je primena EGF je dovela do smanjenja iRNK za NPPC i smanjenja nivoa cGMP u kumulusnim granuloza ćelijama. Takođe EGF i AREG smanjuju transkripciju NPR2 kao i njegovu aktivnost guanilil ciklaze. Dakle, model koji opisuje regulaciju signalnog puta NPPC-NPR2 i produkciju cGMP od strane LH podrazumeva aktivaciju LHR na muralnim granuloza ćelijama i oslobađanje faktora rasta sličnih EGF koji zatim aktiviraju EGFR na muralnim granuloza ćelijama sprečavajući prepisivanje NPPC (autokrina regulacija). Istovremeno ovi faktori aktiviraju EGFR na kumulusnim granuloza ćelijama smanjujući aktivnosti NPR2 u ovim ćelijama (parakrina regulacija). Smanjenje eksprimiranja NPPC u muralnim granuloza ćelijama i smanjenje aktivnosti NPR2 na kumulusnim granuloznim ćelijama dovodi do pada u produkciji cGMP. Međutim, način na koji faktori rasta slični EGF smanjuju nivo cGMP nije u potpunosti razjašnjen. Jedno od mogućih objašnjenja je da dolazi do defosforilacije receptora NPR2 nakon stimulacije EGFR što bi dovelo do inhibicije njegove aktivnosti guanilil ciklaze. Smatra se da povećanje nivoa  $Ca^{2+}$  u kumulusnim granuloza ćelijama nakon aktivacije EGFR utiče na pad aktivnosti NPR2 i smanjenja nivoa cGMP (Slika 7.8.).



**Slika 7.8.** Mehanizmi koji učestvuju u nastavku mejoze jajne ćelije nakon stimulacije sa LH. SHR- receptor za folikulostimulišući hormon; AC- adenilil ciklaza; cAMP- ciklični adenzinin monofosfat; PKA- protein kinaza A; E2-estradiol; ER- receptor za estrogene; NPPC- natriuretički peptid tipa C; EGFR-receptor za epidermalni faktor rasta; NPR2 – receptor za natriuretički peptid tipa C; IMP- inozin-5-monofosfat; IMPDH – inozin-5-monofosfat dehidrogenaza; GMP- guanozin monofosfat; GTP- guanozin trifosfat; cGMP- ciklični guanozin monofosfat; Cx37- koneksin 37; PDE3- fosfodiesteraza 3; 5'ATP- adenzin 5'-trifosfat; MPF-faktor promocije sazrevanja. Detalji u tekstu.  
(Slika je napravljena u Biorenderu)

Smanjenje cGMP u muralnim, kumulusnim i jajnoj ćeliji se detektuje vrlo brzo, već 20 minuta posle stimulacije sa LH. Ovaj brz efekat se ne može objasniti smanjenjem aktivnosti signalnog puta NPPC-NPR2 ćelija koje se javlja 2–3 sata nakon primene LH. Podatak ukazuje da postoji i neki drugi mehanizam koji dovodi do brzog pada cGMP u granulosa ćelijama.

Mehanizam koji dovodi do brzog pada cGMP u granulosa i jajnim ćelijama podrazumeva efekat LH na pukotinaste veze. LH zatvara, odnosno smanjuje, permeabilnost pukotinastih veza. LH utiče na fosforilaciju Cx43 čime menja konformaciju ovog proteina blokirajući transporte kroz

taj kanal. Pokazan je i mehanizam putem kojeg LH zatvara pukotinaste veze. Naime, kinaza ERK1/2 vrši defosforilaciju Cx43 smanjujući permeabilnost ovog kanala. Iz ovoga se pretpostavlja da aktivacija EGFR koju izazivaju faktori rasta sličnih EGF dovode do fosforilacije ERK1/2 koja će zatim defosforilisati Cx43 i time smanjiti permeabilnost kanala i protok cGMP u folikulu. Pošto cGMP preko pukotinastih veza prelazi iz jedne u drugu ćeliju, zatvaranje ovih veza sprečava transport ovog molekula između različitih odeljaka folikula. Na taj način se cGMP ne može razmenjivati između kumulusnih granuloza ćelija i jajne ćelije. Takođe je primećeno da je kretanje cGMP kroz folikul dvosmerno. Tokom održavanja jajne ćelije u profazi mejoze I, cGMP se difuzijom kreće od granuloza ćelija koja ga proizvode i gde ga ima više do jajne ćelije gde je koncentracija ovog molekula manja. Međutim, stimulacija sa LH vodi do obrnutog načina kretanja cGMP. Smanjenje koncentracije cGMP se prvo uočava u granuloza ćelijama, a tek posle i u jajnoj ćeliji. Ovo specifično smanjenje cGMP po odeljcima jajnika dovodi do toga da se sada veća količina cGMP nalazi u jajnoj ćeliji, te ovaj molekul počinje da se kreće sa mesta veće koncentracije (jajna ćelija) ka mestu manje koncentracije (granuloza ćelije).

Samo se jedan deo cGMP smanjuje defosforilacijom NRP2 i/ili inhibicijom njegove guanil- ciklazne aktivnosti pod uticajem ovulatornog talasa LH. Ovakvo delimično smanjenje koncentracije cGMP nije dovoljno za nastavak mejoze što ukazuje da postoji i drugi mehanizam koji takođe dovodi do smanjenja nivoa ovog signalnog molekula u granuloza ćelijama. U granuloza ćelijama miševa i pacova je identifikovano nekoliko PDE koji mogu da hidrolizuju cGMP. Aktivnošću ovih enzima dolazi do razgradnje cGMP u granuloza ćelijama što može da doprinese smanjenju nivoa ovog molekula u jajnoj ćeliji i nastavku mejoze. Posebna je PDE5 jer se aktivira sa LH i PKA ali je pokazano da povećanje aktivnosti ove kinaze ima skroman efekat na smanjenje nivoa cGMP od strane LH. Sasvim je moguće da aktivacija PDE5, zajedno sa još nekim drugim PDE i defosforilacijom receptora NRP2 može da smanji nivo cGMP u takvoj meri da omogući nastavak mejoze jajne ćelije. Od drugih PDE koji mogu da zajedno deluju sa PDE5 u cilju smanjenja nivoa cGMP je i PDE1A. Ova fosfodiesteraza je regulisana signalnim putem  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmmodulin. Iako LH može da poveća koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  u granuloza ćelijama svinja, takav efekat nije uočen kod

granuloza ćelija miševa. Pošto EGF povećava nivo  $\text{Ca}^{2+}$  u izolovanom COC kod miševa pretpostavljamo da LH može da poveća nivo  $\text{Ca}^{2+}$  i aktivnost PDE1A preko aktivacije signalnog puta EGF.

## 7.4. LITERATURA

- Andric N, Ascoli M (2006) A delayed, gonadotropin-dependent and growth-factor mediated activation of the ERK1/2 cascade negatively regulates aromatase expression in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 20:308–3320.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP (1967) The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 58:560–567.
- Breen SM, Andric N, Ping T, Xie F, Offermans S, Gossen JA, Ascoli M (2013) Ovulation involves the luteinizing hormone-dependent activation of G(q/11) in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 27:1483–91.
- Chow JP, Poon RY, Ma HT (2011) Inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1 as a compensatory mechanism for mitosis exit. *Mol Cell Biol* 31:1478–1491.
- Cottom J, Salvador LM, Maizels ET, Reierstad S, Park Y, Carr DW, Davare MA, Hell JW, Palmer SS, Dent P, Kawakatsu H, Ogata M, Hunzicker-Dunn M (2003) Follicle-stimulating hormone activates extracellular signal-regulated kinase but not extracellular signal-regulated kinase kinase through a 100-kDa phosphotyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 278:7167–7179.
- Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ (2007) Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci* 120:1330–40.
- Egbert JR, Uliasz TF, Shuhaibar LC, Geerts A, Wunder F, Kleiman RJ, Humphrey JM, Lampe PD, Artemyev NO, Rybalkin SD, Beavo JA, Movsesian MA, Jaffe LA (2016) Luteinizing Hormone Causes Phosphorylation and Activation of the cGMP Phosphodiesterase PDE5 in Rat Ovarian Follicles, Contributing, Together with PDE1 Activity, to the Resumption of Meiosis. *Biol Reprod* 94:110, 1–11.
- Egbert JR, Yee SP, Jaffe LA (2018) Luteinizing hormone signaling phosphorylates and activates the cyclic GMP phosphodiesterase PDE5 in mouse ovarian follicles, contributing an additional component to the hormonally induced decrease in cyclic GMP that reinitiates meiosis. *Dev Biol* 435:6–14.
- Fan H-Y, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS (2009) MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 324(5929):938–41.
- Fan HY, Liu Z, Johnson PF, Richards JS (2011) CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)- $\alpha$  and - $\beta$  are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol Endocrinol* 25:253–268.
- Hinckley M, Vaccari S, Horner K, Chen R, Conti M (2005) The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev Biol* 287:249–261.

- Jeppesen JV, Kristensen SG, Nielsen ME, Humaidan P, Dal Canto M, Fadini R, Schmidt KT, Ernst E, Andersen CY (2012) LH-Receptor Gene Expression in Human Granulosa and Cumulus Cells from Antral and Preovulatory Follicles. *J Clin Endocrinol Metabol* 97:E1524–E1531.
- Kaneko T, Saito H, Toya M, Satio T, Nakahara K, Hiroi M (2000) Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44. *J Assist Reprod Genet* 17:62–167.
- Lee KB, Zhang M, Sugiura K, Wigglesworth K, Uliasz T, Jaffe LA, Eppig JJ (2013) Hormonal coordination of natriuretic peptide type C and natriuretic peptide receptor 3 expression in mouse granulosa cells. *Biol Reprod* 88: 42,1–9.
- Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA (2008) Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development* 135:3229–3238.
- Pan B, Li J (2019) The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reprod Biol Endocrinol* 17: 8, 1–12.
- Park J-Y, Richard F, Chun S-Y, Park J-H, Law E, Horner K, Jin S-LC, Conit M (2003) Phosphodiesterase regulation is critical for the differentiation and pattern of gene expression in granulosa cells of the ovarian follicle. *Mol Endocrinol* 17:1117–1130.
- Park J-Y, Su Y-Q, Ariga M, Law E, Jin S-LC, Conti M (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303 (5658):682–684.
- Russel DL, Robker RL (2007) Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human Reprod Update* 13:289–312.
- Russell DL, Doyle KM, Ochsner SA, Sandy JD, Richards JS (2003) Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J Biol Chem* 278: 42330–42339.
- Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonazalez-Robayna I, Richards JS (2006) Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 20:1352–1365.
- Shimada M, Umehara T, Hoshino Y (2016) Roles of epidermal growth factor (EGF)-like factor in the ovulation process. *Reprod Med Biol* 15:201–216.
- Shuhaibar LC, Egbert JR, Edmund AB, Uliasz TF, Dickey DM, Yee SP, Potter LR, Jaffe LA (2016) Dephosphorylation of juxtamembrane serines and threonines of the NPR2 guanylyl cyclase is required for rapid resumption of oocyte meiosis in response to luteinizing hormone. *Dev Biol* 409:194–201.
- Tsuji T, Kiyosu C, Akiyama K, Kunieda T (2012) CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. *Mol Reprod Dev* 79:795–802.
- Vaccari S, Horner K, Mehlmann LM, Conti M (2008) Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Dev Biol* 316:124–134.

- Wang Y, Kong N, Li N, Hao X, Wei K, Xiang X, Xia G, Zhang M (2013) Epidermal growth factor receptor signaling-dependent calcium elevation in cumulus cells is required for NPR2 inhibition and meiotic resumption in mouse oocytes. *Endocrinology*. 154:3401–3409.
- Yamashita Y, Kawashima I, Yanai Y, Nishibori M, Richards JS, Shimada M (2007) Hormone-induced expression of tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/A disintegrin and metalloprotease-17 impacts porcine cumulus cell oocyte complex expansion and meiotic maturation via ligand activation of the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology*. 148:6164–6475.
- Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, Xia G, Eppig JJ (2011) Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. *Endocrinology* 152:4377–4385.



**Nebojša Andrić**  
**Jelena Marković Filipović**

---

## **8.** **ŽUTO TELO**

---



Žuto telo (lat. *corpus luteum*) je endokrini organ/žlezda koji se javlja u jajnicima odraslog organizma nakon ovulacije. Žuto telo poseduje tri osobine: (I) privremeni organ sa ograničenim životnim vekom koji zavisi od sudbine jajne ćelije oslobođene iz jajnika, (II) izvor je steroidnih hormona odnosno sintetiše progesteron, estradiol i androgene i (III) kod svih sisara i mnogih reptila i nekih riba koji rađaju žive mladunce, žuto telo je povezano sa viviparnošću.

Na osnovu trajanja funkcionalnog žutog tela nakon ovulacije i uticaja trudnoće na njegovu funkciju, kod sisara su identifikovana tri tipa žutog tela. Kod sisarskih karnivora kao što su vukovi, lisice, psi i sve monoe-strusne životinje se javlja dugoživeće žuto telo. Ovakvo žuto telo se razvija odmah posle ovulacije, ali njegov funkcionalni životni vek ne zavisi od trudnoće. Žuto telo kod ovih vrsta može da traje od dve nedelje do šest meseci. Tako, kod pasa luteinska faza traje 64–66 dana bez obzira da li je došlo do trudnoće. Drugi tip žutog tela se javlja kod poliestrusnih životinja, kao i kod primata i čoveka, i naziva se kratkoživeće žuto telo. Ovakvo žuto telo se javlja u kratkom periodu ciklusa jajnika ali se funkcionalnost produžava ukoliko dođe do trudnoće. Žuto telo obavlja svoju funkciju oko dve nedelje što omogućava da se preembrion spusti kroz jajovod i da se materica pripremi za implantaciju. Ako ne dođe do trudnoće, žuto telo će brzo propasti. Ukoliko dođe do trudnoće, žuto telo će biti funkcionalno sve do formiranja posteljice. Treći tip žutog tela je vrlo kratko-živeće žuto telo. Vrste koje imaju ovaj tip žutog tela ne formiraju funkcionalni organ tokom ciklusa jajnika. Do formiranja žutog tela dolazi jedino u slučaju ako parenje rezultira ovulacijom. U ovu grupu spadaju refleksni ovulatori kao što je zec. Nakon ovulacije formira se struktura koja ima karakteristike žutog tela, ali do formiranja funkcionalne žlezde ne dolazi jer se ne produkuje dovoljna količina progesterona.

## 8.1. LUTEINIZACIJA

Žuto telo kod čoveka je sastavljeno od ćelija koje stvaraju steroidne hormone, a to su granulosa i teka ćelije kao i od ćelija koje nemaju ulogu u steroidogenezi, a to su ćelije imunskog sistema, endotelne ćelije i fibroblasti. Oko 30% ćelija žutog tela čine ćelije koje stvaraju steroidne hormone.

Proces luteinizacije započinje oslobađanjem ovulatornog talasa luteinizirajućeg hormona (LH) i stimulacijom receptora za luteinizirajući hormon (LHR) na membrani granuloza i teka ćelija. To je praćeno aktivacijom niza signalnih molekula i puteva koji će dovesti do formiranja luteinskog fenotipa. Nastanak žutog tela od ćelija folikula obuhvata nekoliko različitih procesa koji zahvataju ne samo granuloza i teka ćelije nego i druge ćelije u folikulu. Mogu se podeliti u sledeće procese: izlazak granuloza ćelija iz ćelijskog ciklusa, formiranja luteinskog fenotipa, remodelovanje tkiva i vaskularizacija.

### 8.1.1. Izlazak iz ćelijskog ciklusa

Prvi korak u luteinizaciji je prestanak proliferacije granuloza ćelija koja je stimulisana folikulostimulišućim hormonom (FSH). Ovaj hormon pozitivno deluje na proliferaciju ćelija tako što stimuliše eksprimiranje faktora koji omogućavaju ovaj proces kao što su ciklin i ciklin zavisne kinaze (engl. *cyclin-dependent kinase*, CDKs). Ovi faktori omogućavaju prolazak ćelija kroz  $G_1$  i ulazak u S fazu. Značajnu ulogu u tom procesu ima i protein retinoblastoma (RB) koji se fosforiliše ovim kinazama i aktivira gene koji omogućavaju ulazak ćelije u S fazu. Prestanak proliferacije ćelija nastaje kao rezultat gubitka ovih faktora, a istovremeno dolazi i do eksprimiranja i aktivacije faktora koji inhibišu CDKs, kao što su  $p21^{cip1}$  i  $p27^{kip}$ . Inhibicija CDKs sprečava fosforilaciju RB što dovodi do prestanka proliferacije i ćelije ostaju zarobljene u  $G_1$  fazi ćelijskog ciklusa. Zbog toga se sve luteinske ćelije nalaze zaustavljene u  $G_0/G_1$  fazi ćelijskog ciklusa. LH je glavni signal koji dovodi do prestanka proliferacije granuloza ćelije tako što smanjuje prepisivanje ciklina D2, a povećava eksprimiranje  $p21^{cip1}$  i  $p27^{kip}$ . Dokazano je da se povećano eksprimiranje  $p21^{cip1}$  javlja nekoliko sati posle stimulacije sa LH dok se iRNK za  $p27^{kip}$  pojavljuje 12 h ili 24 h nakon dodavanja LH u kulturu granuloza ćelija pacova. U jajnicima miševa, utišavanje  $p27^{kip}$  dovodi do hiperproliferacije granuloza ćelija, dok utišavanje  $p21^{cip1}$  i  $p27^{kip}$  dovodi do nastavka proliferacije granuloza ćelija i 96 h nakon davanja LH. Ovi podaci ukazuju da su  $p21^{cip1}$  i  $p27^{kip}$  značajni za prestanak proliferacije granuloza ćelija nakon stimulacije sa LH.

### 8.1.2. Formiranje luteinskog fenotipa

Pored zaustavljanja proliferacije, dolazi do procesa diferencijacije granulosa i teka ćelija. Procesom diferencijacije od granulosa i teka ćelija se formiraju luteinske ćelije. Od granulosa ćelija nastaju velike luteinske ćelije koje se još nazivaju luteinske granulosa ćelije, dok se od teka ćelija formiraju male luteinske ćelije koje se još nazivaju luteinske ćelije teke. U procesu diferencijacije, LH utišava gene karakteristične za preovulatorni fenotip, a stimuliše prepisivanje gena koji su karakteristični za luteinski fenotip. Tako, jedna od značajnih promena u granulosa ćelijama tokom procesa diferencijacije je promena u steroidogenezi. Granulosa ćelije koje su do tada sintetisale estradiol prekidaju produkciju ovog hormona, a počinju da sintetišu progesteron. Ova promena je pre svega omogućena, sa jedne strane, inhibitornim delovanjem LH na prepisivanje gena za aromatazu (CYP19A1), a sa druge stimulacijom prepisivanja proteina koji učestvuju u sintezi progesterona kao što su steroidogeni akutni regulatorni protein (STAR) i enzima koji seče bočni lanac holesterola (CYP11A1). Tokom diferencijacije, samo granulosa ćelije podležu hipertrofiji i zbog toga značajno doprinose rastu žutog tela. Kod primata je uočena i funkcionalna razlika između ove dve grupe ćelija. Luteinske granulosa ćelije su mesto stvaranja estrogena dok luteinske ćelije teke prvenstveno sintetišu androgene. Ovakva razlika u produkciju steroidnih hormona ukazuje da je model dve ćelije, koji objašnjava sintezu estradiola u folikulu, očuvan i u žutom telu. Međutim, kod glodara, iako se mogu uočiti velike i male luteinske ćelije ne postoje dokazi da su potekle od granulosa i teka ćelije. Na ovu mogućnost ukazuje i profil ekspimiranja proteina koji učestvuju u steroidogenezi, a koji je vrlo sličan između ove dve grupe ćelije. Obe grupe ćelije ekspimiraju enzime  $17\alpha$ -hidroksilazu/17,20-liazu (CYP17A1) i CYP19A1 i stvaraju estrogene i androgene. Primećena je još jedna razlika u velikim i malim luteinskim ćelijama između primata i drugih vrsta. Kod žutog tela primata, ove dve populacije luteinskih ćelija su jasno određene po lokaciji, dok kod većina vrsta, one nisu odvojene nego se nalaze pomešane i u neposrednom kontaktu u samom žutom telu.

### 8.1.3. Remodelovanje tkiva

Zajedno sa formiranjem luteinskih ćelija dolazi do remodelovanja tkiva, odnosno promena u vanćelijskom matriksu (engl. *extracellular matrix*, ECM). ECM predstavlja kompleksnu strukturu koja se sastoji od kolagena, proteoglikana i glikoproteina. Pored ECM, u procesu remodelovanja učestvuje bazalna lamina, elementi membrane granulosa ćelija i ECM teke interne i eksterne.

Nakon ovulacije dolazi do kolapsa antruma folikula koji nastaje kao posledica savijanja zida folikula i razgradnje bazalne membrane koja odvajaju granulosa od teka ćelija. Ova stanja su praćena invazijom vaskularnih ćelija, kao i drugih ćelija koje pomažu u procesu vaskularizacije, u sloj granulosa ćelija koje pre toga nisu bile vaskularizovane. U ECM dolazi do zamene kolagena tipa IV sa kolagenom tipa I koji ima fibrilarnu strukturu kako je primećeno u žutom telu govečeta. U procesu remodelovanja tkiva značajnu ulogu imaju i proteaze i njihovi inhibitori. Komponente ECM se seku delovanjem proteaza kao što su matriks metaloproteaze (MMPs), a njihova aktivnost se inhibiše endogenim inhibitorima metaloproteaza (engl. *tissue inhibitors of metalloproteases*, TIMPs). Postoji veći broj MMP, međutim MMP-2 i MMP-9 su posebno značajne za formiranje žutog tela. Ovulatorni talas LH povećava eksprimiranje MMPs i TIMPs, a odnos između proteaza i njihovih inhibitora je važan za formiranje i održavanje ECM. Pored remodelovanja tkiva ima i promena na ćelijskom nivou. Dolazi do hipetrofije granulosa ćelije što utiče na povećanje mase žutog tela. Menja se odnos jedra i citoplazme, a volumen ćelije raste i do deset puta. Pukotinaste veze između granulosa ćelije nestaju, količina endoplazmatičnog retikula se povećava, a mitohondrije postaje okrugle dok se kriste transformišu iz lamelarnih u tubularne. Takođe dolazi i do razvoja Goldži aparata, lipidnih kapi i sekretiranih granula. Ove promene su karakteristične za ćelije koje su veoma aktivne u sintezi steroidnih hormona i proteina.

### 8.1.4. Vaskularizacija

Promena u vaskularizaciji je veoma uočljiva promena tokom formiranja žutog tela. Pre ovulacije, granulosa ćelije su potpuno avaskularne, dok posle formiranja žutog tela svaka ćelija u ovom organu jeste u bliskom kontaktu sa vaskularnim elementima. Razvoj vaskulature je toliko izražen da žuto telo predstavlja jedan od organa sa najvećim protokom krvi. Vaskulatura omogućava efikasno snabdevanje žutog tela hranljivim materijama, hormonima, lipoproteinima koji za sebe imaju vezan holesterol, ali i efikasno transportuje progesteron i druge materije van žutog tela.

Prvi korak u formiranju vaskulature je invazija pericita, mikrovaskularnih elemenata, iz odeljka u kome se nalaze teka ćelije u sloj granulosa ćelija. Takođe, dolazi i do proliferacije endotelskih ćelija koja su odgovorna za ekspanziju kapilara u žutom telu. Regulacija vaskularizacije je kompleksan proces u kome učestvuje veliki broj faktora među kojima su najznačajniji faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), osnovni faktor rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF), angiopoetin (Ang) kao i mnogi drugi.

Pet izoformi VEGF i tri forme receptora za VEGF su identifikovani u žutom telu. Od luteinskih ćelija, luteinske granulosa ćelije pokazuju najveće eksprimiranje VEGF i njegovog receptora. Mnoge studije su pokušale da utvrde značaj VEGF i njegovog receptora za žuto telo primenom tehnike utišavanja gena za VEGF ili receptora za ovaj faktor. Međutim, ovakvi miševi umiru tokom embrionalnog razvoja, što je dovelo do razvoja novih pristupa za izučavanje uloge ovog faktora u formiranju žutog tela. Primena neutrališućih antitela za VEGF ili za receptor na miševima ili majmunima otkrivaju sledeće uloge ovog faktora: (I) deluje direktno i lokalno u folikulima ili žutom telu, a ne indirektno preko tkiva ili organa koji kontrolišu funkciju žutog tela kao što je osovina hipotalamus-hipofiza, (II) neophodan je za razvoj žutog tela, i (III) neophodan je za održavanje već formiranog žutog tela.

bFGF je prvi faktor angiogeneze koji je detektovan u jajnicima. Pokazano je da se ovaj faktor stvara u steroidogenim i endotelnim ćelijama kod pacova, čoveka i preživara. bFGF stimuliše proliferaciju i pokretljivost endotelnih ćelija, a tretman sa neutrališućim

antitelima koji sprečavaju dejstvo bFGF vodi smanjenju proliferacije ovih ćelija u žutom telu krava, ovaca i svinja. Međutim, miševi kod kojih je utišan bFGF nisu pokazivali poremećaje u razvoju niti u fertilitetu, što bi moglo da dovode u pitanje značaj ovog faktora za vaskularizaciju žutog tela.

Ang je faktor rasta, koji za razliku od VEGF, nema mitogeni efekat već je važan za razvoj i održavanje integriteta krvnih sudova. Nekoliko Ang je identifikovano kod miševa i ljudi (Ang 1-4) i svi se vezuju za receptor Tie-2. Ang-1, Ang-2 kao i receptor Tie-2 su pronađeni u luteinskim i endotelnim ćelijama žutog tela kod nekoliko vrsta. Interesantno je da vezivanje Ang-1 za Tie-2 dovodi do nastajanja i sazrevanja novih krvnih sudova, dok vezivanje Ang-2 za ovaj receptor ne aktivira signalne puteve koji se aktiviraju vezivanjem Ang-1 za receptor. Smatra se da bi uloga Ang-2 bila u destabilizaciji postojećih krvnih sudova. Uočena je moguća interakcija Ang i VEGF u vaskularizaciji žutog tela. Smatra se da VEGF stimuliše angiogenezu do faze formiranja kapilarnih tuba, dok od odnosa Ang-1 i Ang-2 zavisi dalji razvoj kapilara kao i njihova degeneracija. U prisustvu VEGF, Ang-2 dovodi do formiranja novih krvnih sudova tako što blokira dejstvo Ang-1 na Tie-2, dok u odsustvu VEGF, Ang-2 dovodi do regresije krvnih sudova. Međutim, postoji vrlo malo istraživanja koja se bave rasvetljavanjem uloge ovih faktora u vaskularizaciji žutog tela.

## **8.2. STEROIDOGENEZA U ŽUTOM TELU**

### **8.2.1. Progesteron**

Kao što je napomenuto eksprimiranje gena uključenih u procese steroidogeneze i formiranje steroidnih hormona je značajno drugačije pre i posle luteinizacije. Pre luteinizacije folikuli proizvode veće količine estradiola, dok posle luteinizacije progesteron postaje glavni steroidni hormon koji se stvara od strane žutog tela. Androgeni i estrogeni se sintetisaju u manjoj meri. Već tokom razvoja žutog tela počinje sinteza enzima koji su zaduženi za usvajanje i transport holesterola kao i enzima potrebnih za prevođenje ovog supstrata u progesteron, androgene i estrogene. Pregled enzima i receptora koji učestvuju u formiranju holesterola i njegovoj da-



ljoj transformaciji do steroidnih hormona je dat u poglavlju 4. U ovom poglavlju će biti prikazane specifičnosti steroidogeneze koja se odvija u žutom telu.

Prvi korak u sintezi progesterona je usvajanje holesterola. Još nije u potpunosti razjašnjeno koji od izvora holesterola (HDL, LDL ili sinteza *de novo*) se primarno koristi za steroidogenezu u žutom telu. Pokazano je da se LDL i HDL koriste za steroidogenezu u luteinskim ćelijama, međutim korišćenje jednog od ta dva izvora zavisi od vrste. Miševi i pacovi koriste više HDL, dok žene, rezus majmuni i svinje koriste više LDL za steroidogenezu. Definitivan odgovor koji od ova dva izvora holesterola je važan za steroidogenezu u žutom telu žena nije dat. Naime, veći broj studija ukazuje da je LDL izvor holesterola za stvaranje progesterone u žutom telu žena, međutim druge studije su pokazale da luteinske granulosa ćelije žene koriste HDL za steroidogenezu. Prema jednoj pretpostavci HDL bi mogao da služi kao izvor holesterola za ranu steroidogenezu u žutom telu. Ovo je podržano nalazima da se, u folikulskoj tečnosti, HDL nalazi u koncentracijama koje su bliske onima u serumu, dok su koncentracije LDL niske. Takođe, kratkotrajna kultura luteinskih ćelija izolovanih iz folikula rezus majmuna 12 h, 24 h i 36 h nakon LH stimulacije nisu odgovarale na prisustvo LDL u medijumu. Za razliku od ovih rezultata, luteinske ćelije izolovane iz žutog tela žene i ženke majmuna, koje su duže vreme držane u kulturi, su koristile LDL za steroidogenezu. Sasvim je moguće da luteinske ćelije koriste HDL za ranu steroidogenezu, međutim ova pretpostavka treba da se potvrdi u daljnim eksperimentima.

Transport holesterola do mitohondrija i njegov prenos do unutrašnje membrane mitohondrija u luteinskim ćelijama se vrši putem proteina STAR i kompleksa za prenos holesterola koji je opisan u poglavlju 4. Holesterol se, na unutrašnjoj membrani mitohondrija, konvertuje u progesteron u dve enzimske reakcije, prvo se holesterol prevodi do pregnenolona posredstvom enzima CYP11A1, a zatim dolazi do konverzije nastalog pregnenola u progesteron pomoću enzima  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza ( $3\beta$ HSD). Nivoi CYP11A1 i  $3\beta$ HSD u žutom telu su povišeni tokom trudnoće pa se smatra da se ova dva enzima konstitutivno eksprimiraju. Pojedina istraživanja su, međutim, pokazala da se eksprimiranje ovih gena može regulisati prolaktinom i gonadotropinima.

Nivo progesterona u žutom telu ne zavisi samo od njegove sinteze već i od razgradnje. U luteinskim ćelijama se nalazi enzim 20 $\alpha$ -hidroksisteroid dehidrogenaza (20 $\alpha$ -HSD) koji prevodi biološki aktivni progesteron u neaktivni metabolit 20 $\alpha$ -dihidropogesteron (20 $\alpha$ -DHP). Ovaj metabolit ima mnogo manji afinitet prema receptoru za progesteron (PR) i zbog toga je manje potentan u odnosu na progesteron. Povećano prepisivanje ovog enzima dovodi do pada u količini progesterona, a porasta u nivou metabolita 20 $\alpha$ -DHP. Zbog uloge u sprečavanju delovanja progesterona, 20 $\alpha$ -HSD se ne eksprimira u žutom telu tokom trudnoće već se nivoi ovog enzima povećavaju neposredno pred porođaj. Kod miševa kod kojih je utišana 20 $\alpha$ -HSD uočava se visok nivo progesterona što uslovljava odloženi porođaj. Enzim 26-holesterol hidrosilaza (P450c26) je još jedan enzim koji učestvuje u regulaciji sinteze progesterona od strane žutog tela. Ovaj enzim prevodi holesterol u 26-hidroksiholesterol i tako smanjuje dostupnost holesterola za sintezu steroidnih hormona uključujući i progesteron. iRNK za ovaj enzim je pronađena u luteinskim ćelijama pri kraju trudnoće. Smatra se da 20 $\alpha$ -DHP i P450c26 zajedno dovode do smanjenja nivoa progesterona u žutom tela na kraju luteinske faze.

Jedna od zanimljivih zapažanja u vezi sa produkcijom progesterona u žutom telu je da velike luteinske ćelije produkuju više progesterona u nestimulisanim uslovima u odnosu na male luteinske ćelije. Smatra se da ova razlika u stvaranju progesterona nastaje zbog različitog transporta holesterola do unutrašnje membrane mitohondrija. Naime, velike luteinske ćelije imaju veću količinu endozepina, koji je endogeni ligand za protein translokator (engl. *translocator protein*, TSPO). Kao što je podvučeno u poglavlju 4, ovaj receptor omogućava transport holesterola od spoljašnje do unutrašnje membrane mitohondrija. Po modelu koji opisuje različitu produkciju progesterona između ove dva tipa luteinskih ćelija, STAR vezuje holesterol i transportuje ga do spoljašnje membrane i TSPO. TSPO preuzima holesterol i transportuje ga do unutrašnje membrane mitohondrija, a endozepin, koji se nalazi u većim količinama u velikim luteinskim ćelijama pospešuje ovaj proces. Tačan mehanizam kako endozepin pospešuje aktivnost TSPO i transport holesterola do unutrašnje membrane mitohondrija nije poznat, ali se smatra da dolazi ili do promene konformacije TSPO ili do stimulacije interakcije STAR i TSPO. Na osnovu ovog modela se može

objasniti povećana produkcija progesterona u velikim luteinskim ćelijama u nestimulisanim uslovima.

### 8.2.2. Androgeni i estradiol

Kod žene i pacova, žuto telo pored progesterona, produkuje androgene i estradiol. Oba tipa luteinskih ćelija imaju enzim CYP17A1 koji prevodi C21 steroide u androgene, odnosno u dehidroepiandrosteron (DHEA) i androstendion. Nastali androstendion se dalje prevodi u estron delovanjem CYP19A1, a zatim i u estradiol delovanjem enzima  $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza ( $17\beta$ -HSD). U žutom telu je pokazano prisustvo CYP19A1, međutim enzim sa  $17\beta$ -HSD aktivnošću, tj. sposobnošću prevođenja estrona u estradiol ili androstendiona u testosteron nije bio poznat. Eksperimenti kod skotnih pacova su dokazali postojanje proteina od 32 kDa koji se eksprimira u velikim, ali ne i u malim luteinskim ćelijama. Nakon izolacije i karakterizacije, ustanovljeno je da se protein fosforiliše na tirozinskim ostacima i da je povezan sa unutarćelijskim domenom kratke forme receptora za prolaktin (PRLR). Nazvan je protein koji je asociiran sa PRLR, a kasnije je ustanovljeno da predstavlja novu formu  $17\beta$ -HSD, odnosno  $17\beta$ -HSD7. Ovaj enzim prevodi estron u estradiol, ali ne i androstendion u testosteron.  $17\beta$ -HSD7 uz  $17\beta$ -HSD1 predstavlja jedini enzim koji može da konvertuje estron, slab estrogen u mnogo potentniji estradiol i pronađen je kod svih vrsta kod kojih su rađene analize uključujući i čoveka. Regulacija enzima  $17\beta$ -HSD7 je suprotna od regulacije enzima  $17\beta$ -HSD1. LH stimuliše eksprimiranje  $17\beta$ -HSD1, ali inhibiše  $17\beta$ -HSD7. Razlog inhibitornog efekta LH na eksprimiranje  $17\beta$ -HSD7 u luteinskim ćelijama je da se spreči stvaranje velike količine estradiola tokom rane trudnoće.

### 8.3. HORMONSKA REGULACIJA ŽUTOG TELA

Funkcije žutog tela reguliše nekoliko različitih hormona koji se luče iz hipofize, decidue ili posteljice. Prolaktin (PRL) i estradiol predstavljaju glavne hormone koji učestvuju u regulaciji žutog tela. Prema novijim istraživanjima, androgeni i progesteron mogu da učestvuju u autokrinoj

regulaciji žutog tela kod glodara. LH takođe učestvuje u regulaciji funkcije žutog tela kod glodara, mada se takva uloga kod ove vrste razlikuje od uloge koju ovaj hormon ispoljava kod žutog tela ostalih sisarskih vrsta.

### 8.3.1. Prolaktin

Već tokom procesa parenja kod glodara dolazi do lučenja PRL iz adenohipofize koja se odvija u dva dnevna talasa. Pokazano je da je tokom prve nedelje trudnoće PRL iz adenohipofize odgovoran za razvoj žutog tela i za normalnu produkciju progesterona kod pacova. Sedmog dana trudnoće, PRL iz adenohipofize više nije potreban za održavanje žutog tela već tu ulogu preuzima decidua i posteljica koje počinju da sintetišu PRL.

Eksperimenti na miševima kojima je utišan gen za PRL ili PRLR su prikazali važnost ovog hormona za funkciju žutog tela. Naime, kod ovih miševa dolazi do ovulacije, fertilizacije i formiranja žutog tela koje se ne razlikuje od žutog tela kontrolnih miševa. Međutim, žuto telo miševa kod kojih je utišan PRL ili PRLR pokazuje prevremeno prepisivanje enzima  $20\alpha$ -HSD. Pošto ovaj enzim metaboliše progesteron, kod ovih miševa dolazi do smanjenja nivoa ovog steroidnog hormona i regresije žutog tela. Iz ovog se zaključuje da PRL sprečava ekspresiju  $20\alpha$ -HSD i smanjenje nivoa progesterona što ima pozitivan efekat na žuto telo.

Kod pacova promotorski region gena za  $20\alpha$ -HSD sadrži nekoliko pretpostavljenih veznih mesta za transkripcioni faktor Stat5. Genetičko utišavanje Stat5 kod miševa dovodi do preranog eksprimiranja  $20\alpha$ -HSD i regresije žutog tela ukazujući na važnost ovog transkripcionog faktora u inhibiciji prepisivanja  $20\alpha$ -HSD od strane PRL. Pored efekta na  $20\alpha$ -HSD, PRL povećava zalihe holesterola u luteinskim ćelijama. Ovaj hormon pozitivno utiče na vezna mesta za lipoprotein, pre svega na receptor SR-B1 i time stimuliše preuzimanje HDL iz cirkulacije kod pacova. PRL povećava eksprimiranje enzima uključenih u biosintetski put progesterona kao što su CYP11A1 i  $3\beta$ HSD i time direktno stimuliše njegovu produkciju u luteinskim ćelijama pacova. Pošto su u luteinskim ćelijama nivoi ovih enzima visoki, njihova regulacija od strane PRL ne predstavlja takozvani ograničavajući korak. Primarna uloga ovog hormona u kontroli nivoa progesterona u žutom telu usmerena je ka inhibiciji  $20\alpha$ -HSD.

Istraživanja ukazuju da PRL utiče na nastajanje i delovanje estradiola u žutom telu pacova. PRL dovodi do povećanog prepisivanja CYP19A1 i  $17\beta$ -HSD7 što vodi povećanju sinteze estradiola. Za razliku od CYP19A1, PRL utiče na povećanja nivoa proteina, a ne i na nivo iRNK za enzim  $17\beta$ -HSD7. Kao što je pomenuto,  $17\beta$ -HSD7 se nalazi u asocijaciji sa PRLR te vezivanje PRL dovodi do aktivacije receptora, fosforilacije tirozinskih rezidua na  $17\beta$ -HSD7 i stabilizacije enzima. PRL takođe vodi i ka eksprimiranju receptora za estrogene hormone alfa i beta ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ) kod pacova, omogućavajući odgovor žutog tela na stimulaciju estrogenima. Povećanje nivoa  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  pod uplivom PRL se odvija preko signalnog puta Jak2/Stat5 i aktivacije Stat5 veznog mesta na promotorskom regionu ova dva estrogena receptora.

PRL ima i zaštitnu ulogu u žutom telu jer stimuliše enzim superoksid dismutazu koja uklanja slobodne radikale i takođe sprečava lokalno delovanje GnRH koji stimuliše eksprimiranje aneksina 5 i apoptozu luteinskih ćelija. PRL se dovodi u vezu i sa vaskularizacijom žutog tela ali se smatra da taj efekat PRL nije direktan nego se ostvaruje preko estradiola.

### 8.3.2. Estradiol

Estradiol koji nastaje u luteinskim ćelijama ima nekoliko važnih funkcija u žutom telu. Žuto telo žene i pacova eksprimira oba receptora za estrogene hormone  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  što ukazuje na značaj estradiola za funkciju ove žlezde. Kod žena uloga estradiola u funkciji žutog tela je slabo okarakterisana, dok je kod glodara mnogo bolje opisana. Pokazano je da estradiol stimuliše sintezu progesterona kod glodara i svinja. Stimulacija produkcije progesterona od strane estradiola se ostvaruje na tri načina (I) povećanjem zaliha holesterola u ćelijama tako što deluje pozitivno na *de novo* sintezu holesterola, (II) povećanjem preuzimanja holesterola iz cirkulacije delujući na receptor SR-B1 u ćelijskoj membrani i (III) povećanjem mobilizacije holesterola iz unutarćelijskih rezervi. Pored uticaja na sintezu progesterona, estradiol može da održava visok nivo LHR u ćelijama žutog tela, i da utiče na vaskularizaciju ove žlezde kod glodara tokom sredine trudnoće. Kod glodara povećanje vaskularizacije se prvi put javlja tokom procesa luteinizacije, a drugi put u sredini trudnoće zajedno sa uvećanjem

žutog tela i povećanom sintezom progesterona. Estradiol utiče na ekspri-miranje VEGF i njegovog receptora i tako utiče na proces vaskularizacije žutog tela. Hipertrofija luteinskih ćelija koja dovodi do uvećanja žutog tela se ostvaruje preko povećanja sinteze proteina u luteinskim ćelijama koji se ostvariye aktivacijom elongacionog faktora-2.

### 8.3.3. Androgeni

Androgeni imaju ulogu supstrata za sintezu estrogenih hormona, ali takođe stimulišu sintezu progesterona u žutom telu. Receptori za androge-ne hormone su prisutni u žutom telu glodara, a tretman sa androgenima dovodi do povećanja sinteze progesterona. Blokiranje CYP19A1, odnosno sprečavanje sinteze estrogenih hormona ne utiče na sposobnost androge-na da povećavaju produkciju progesterona što je prilog direktnom de-lovanju androgena u žutom telu. Ovaj podatak može da ukaže da sinteza estradiola i progesterona koja je potpomognuta androgenim hormonina nisu povezani procesi. U dodatnim eksperimentima je potvrđena pozitiv-na uloga androgena u sintezi progesterona. Administracija dihidrotesto-sterona (DHT) je sprečila pad progesterona na kraju pseudotrudnoće kod glodara. Takođe, primena androstendiona je sprečila pad progesterona u serumu i gubitak mase žutog tela koji je izazvan antiprogesteronskim tret-manom i uz prisustvo CYP19A1. Pored efekata na progesteron, androgeni sprečavaju apoptozu luteinskih ćelija.

### 8.3.4. Progesteron

Progesteron koji se stvara u žutom telu deluje lokalno održavajući funk-ciju ovog organa kod svih sisarskih vrsta. Lokalno delovanje progesterona je vidljivo u nekoliko eksperimenata gde je primena progesterona stimu-lisala sopstvenu produkciju i sprečavala apoptozu luteinskih ćelija. Tako, primena antitela za progesteron ili antagonista progesterona kod pacova je smanjila stvaranje progesterona u žutom telu što ukazuje da ovaj steroid reguliše sopstvenu produkciju. Smatra se da kod pacova mehanizam pre-ko kojeg progesteron utiče na sopstvenu produkciju uključuje inhibiciju ekspimiranja  $20\alpha$ -HSD u bazalnim uslovima kao i nakon delovanja LH i

PGFa. Progesteron smanjuje interleukin 6, koji ima negativan efekat na steroidogenezu i takođe sprečava apoptozu žutog tela kod pacova. Važno je da se kod pacova efekti progesterona na žuto telo ostvaruju u odsustvu klasičnog PR. Naime, do sada nije detektovan protein ili iRNK za PR u žutom telu kod ovih životinja, te stoga, molekularni mehanizam preko kojih progesteron ostvaruje svoje efekte ostaje nerazrešen. Pretpostavlja se da progesteron može da deluje preko receptora za glukokortikoide. Ovo je bazirano na sledećem: (I) aplikacija glukokortikoida simulira efekte progesterona u žutom telu, (II) receptori za glukokortikoidne hormone se eksprimiraju u žutom telu, (III) progesteron ima relativno visok afinitet za receptore za glukokortikoidne hormone i (iv) aplikacija RU-486, farmakološke supstance koji inhibiše receptore za progesteron i glukokortikoide sprečava delovanje progesterona u žutom telu. Istraživanja su ukazala na postojanja i progesteronskog receptora asociranog za membranu 2 (engl. *progesterone receptor membrane component*, PGRMC2) kod pacova, međutim uloga ovog membranskog proteina u delovanju progesterona na žuto telo kod ovih životinja nije detaljnije istražena. Oglledi na luteinskim granulosa ćelijama žena i rezus majmuna su garant prisustva klasičnih receptora za progesteron, PRA i PRB. Pored klasičnih receptora za progesteron, postoji i prisustvo nekoliko izoformi membranskog receptora za progesteron koji pripadaju velikoj familiji Q receptora za adiponektin kao i PGRMC1 i PGRMC2. PGRMC1 se provereno najviše eksprimira u luteinskim granulosa ćelijama žene, a slede membranski receptor za progesteron alfa, PGRMC2 i PR. Iz ovih podataka se može pretpostaviti da progesteron u luteinskim granulosa ćelijama žene svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za neki od svojih receptora.

### 8.3.5. LH

Tokom sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog veka, nekoliko studija pokazalo je važnu ulogu LH na razvoj, funkciju i održavanje žutog tela kod primata. Danas je prihvaćeno da kod primata (od majmuna Starog sveta do čoveka) razvoj, održavanje žutog tela i stvaranje progesterona zavise od lučenja LH iz adenohipofize. Ova uloga je vidljiva u nekoliko eksperimenata u kojima je neutralizacija LH i primena antagonista GnRH

sprečila normalan razvoj žutog tela i stvaranje progesterona. Pošto se LH iz adenohipofize oslobađa u pulsevima, pitanje je da li je pulsativno lučenje LH neophodno za razvoj i održavanje žutog tela. Pulsativno lučenje jeste neophodno za normalnu funkciju žutog tela kod primata, odnosno za razvoj žutog tela kod krava. Međutim, pulsativno lučenje LH nije važno za razvoj žutog tela kod odrasle ženke ovce, odnosno za održavanje žutog tela kod krava. Ovi rezultati ukazuju da kod ovih vrsta, drugi faktori imaju takođe značajnu ulogu u funkciji žutog tela. Kod pacova je ustanovljeno: (I) za održavanje steroidogeneze u žutom telu nije dovoljno produženo delovanje LH, već izlaganja PRL ili hormonima koji imaju slično dejstvo kao i PRL, (II) produženo delovanje LH nije neophodno za trudnoću i (III) produženo delovanje LH ostvaruje se preko estradiola.

Ćelijski i molekularni mehanizmi pomoću kojih LH deluje na žuto telo nisu sasvim poznati. Stimulacija luteinskih ćelija sa LH dovodi do brzog (akutnog) porasta u produkciji progesterona. Ovaj akutni efekat LH je posredovan proteinom  $G_s$  i aktivacijom adenilil ciklaze (AC) koja dovodi do povećanja nivoa cAMP i aktivacije protein kinaze A (PKA) kod luteinskih granulosa ćelija čoveka. Dokazana je uloga i faktora koji su nezavisni od PKA kao što je signalni put protein kinaze C (PKC) i faktori koji zamenjuju guanil nukleotide i koji su zavisni od cAMP. LH, preko aktivacije navedenih signalnih puteva, povećava dostupnost holesterola tako što povećava transport ovog supstrata do mitohondrija preko pozitivnog efekta na STAR, a i pozitivno utiče na nivo SR-BI i tako stimuliše preuzimanje HDL iz cirkulacije. Nepoznato je kako ovaj mehanizam utiče na sintezu progesterona i procese koji su povezani sa održavanjem funkcije žutog tela u dužem periodu. Stimulacija enzima CYP17A odgovorna je za održavanje žutog tela kod skotnih pacova. Rast eksprimiranja ovog enzima povećava količine androgena koji se dalje prevodi u estradiol aktivnošću CYP19A1. Međutim do sada nije precizno ustanovljen mehanizam za produženi efekat LH na žuto telo. Neki faktori koji se aktiviraju tokom akutnog delovanja LH kao što je CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*) se gube u žutom telu uskonosnih majmuna u dužem vremenu. Pretpostavka bi mogla biti da dolazi do aktivacije drugih signalnih molekula kao što su inozitol 3-fosfat ( $IP_3$ ) ili protein kinaza C (PKC) koji bi dugotrajnije regulisali funkcije žutog tela.



Malo se zna i o ulozi LH u formiranju ili održavanju strukture žutog tela. LH može da reguliše različite proteaze i njihove inhibitore, komunikaciju između ćelija u žutom telu, ekspimiranje faktora koji učestvuju u vaskularizaciji, hormona itd. U istraživanjima je pronađen i faktor koji se vezuje za receptor za glukokortikoide u žutom telu čoveka i rezus majmuna i koji je kontrolisan od strane LH. Ovaj faktor bi mogao da utiče na održavanje strukture žutog tela, međutim detaljnije pretrage su potrebne da se potpuno razjasni uloga LH u održavanju strukture žutog tela.

## 8.4. REGRESIJA ŽUTOG TELA

Žuto telo se eliminiše iz organizma kako bi se omogućila dalja normalna reproduktivna funkcija jedinke. Regresija žutog tela se odvija u dve faze; prva je funkcionalna regresija koja se karakteriše padom u stvaranju progesterona, pa sledi strukturna regresija koju karakteriše apoptoza luteinskih ćelija. Tokom ova dva procesa dolazi do značajnih promena u kapacitetu luteinskih ćelija za steroidogenezu, zatim vaskularizaciji i remodelovanju tkiva što na kraju formira strukturu koja se sastoji od vezivnog tkiva i naziva se belo telo (lat. *corpus albicans*).

Danas je poznato da regresiju žutog tela kontroliše nekoliko faktora koji se nazivaju luteolitički faktori. Ovaj koncept je postao aktuelan još 1923. godine kada je uočeno da uklanjanje materice vodi ka produžetku trajanja luteinske faze kod zamoraca. Kasniji eksperimenti su pokazatelj da se luteolitički faktori iz materice ne transportuju preko sistemske cirkulacije već deluju lokalno, odnosno prelaze iz vene uterusa direktno u aortu jajnika. Međutim, kod primata, čoveka i nekih drugih vrsta, uklanjanje materice ne utiče na regresiju žutog tela. Kod primata se izdvajaju estrogeni kao moguć luteolitički faktor jer se, za razliku od drugih vrsta, ovi hormoni sintetišu u većim količinama u žutom telu. Primena estradiola direktno u žuto telo izazvala je luteolizu premda dalje studije pokazuju da je ovaj efekat bio posledica izlaska estradiola u cirkulaciju koji je onda negativno uticao na lučenje LH iz adenohipofize. Istraživanja pokazuju da lipid, prostaglandin F<sub>2</sub> alfa (PGF<sub>2α</sub>), može biti jedan od luteolitičkih faktora. Luteolitička funkcija PGF<sub>2α</sub> je značajna kod većeg broja vrsta, dok kod primata uloga ovog faktora u regresiji žutog tela nije sasvim jasna. Tako,

primena inhibitora sinteze prostaglandina nije sprečila regresiju žutog tela kod rezus majmuna. Prema novijim istraživanjima, promene u sintezi, odnosno balans između luteolitičkih prostaglandina kao što je  $\text{PGF}_{2\alpha}$  i nekih lutoetropnih faktora, uključujući i prostaglandine regulišu životni vek žutog tela kod primata.

$\text{PGF}_{2\alpha}$  je značajan luteolitički faktor kod velikog broja vrsta. Kod glodara primena  $\text{PGF}_{2\alpha}$  je dovela do pada u nivou progesterona i abortusa. Sa druge strane inhibicija sinteze ovog lipida je imala obrnut efekat, tj. odložen je pad nivoa progesterona i porođaj. Podaci jasno ukazuju da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  predstavlja faktor koji dovodi do regresije žutog tela kod glodara. Ova hipoteza je potvrđena eksperimentima na miševima kod kojih je utišan  $\text{PGF}_{2\alpha}$  i kod kojih ne dolazi do pada progesterona i porođaja. Sličan efekat je i kod miševa kod kojih nedostaju enzimi koji učestvuju u stvaranju prostaglandina, ciklooksigenaza (engl. *cyclooxygenase*, COX) koja od arahidonske kiseline stvara prekursor za prostaglandine, prostaglandin H, ili citosolna fosfolipaza A2 (engl. *phospholipase A2*, cPLA2) koja je zadužena za izdvajanje arahidonske kiseline iz membranskih fosfolipida.

Kod vrsta kod kojih  $\text{PGF}_{2\alpha}$  predstavlja glavni luteolitički faktor, materica je glavno mesto produkcije  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Uloga enzima, prvenstveno COX-1, COX-2 i cPLA2 u regresiji žutog tela je dobro proučena. COX-1 se eksprimira u endometrijum, miometrijum i decidui tokom kasne trudnoće. Ekspimiranje COX-2 zavisi od pada progesterona pre porođaja i zbog toga ova forma enzima ne igra značajnu ulogu u regresiji žutog tela. Ekspimiranje cPLA2 se ne menja za vreme trudnoće u materici miševa, ukazujući da je konstitutivno ekspimiranje ovog enzima važno za luteolitičku aktivnost. Međutim, materica nije jedino mesto sinteze  $\text{PGF}_{2\alpha}$  tokom trudnoće već se određena količina stvara u samom žutom telu. Za razliku od materice, aktivnost cPLA2, a time i količina  $\text{PGF}_{2\alpha}$  u žutom telu se menja pri kraju trudnoće bez promene u nivou COX-1 pokazujući da cPLA2 u žutom telu takođe ima ključnu ulogu u sintezi i oslobađanju  $\text{PGF}_{2\alpha}$  za proces luteolize.

Predložena su dva modela koji objašnjavaju način na koji dolazi do pojačanog oslobađanja  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Prvi model pretpostavlja povećanu osetljivost hipotalamusa i materice na delovanje estrogena u kasnoj luteinskoj fazi što će dovesti do stimulacije oksitocinskog generatora u hipotalamusu i lučenje oksitocina u pulsevima. Povećana frekvencija oslobađanja oksitocina

iz hipofize kao i povećanje broja receptora za oksitocin na endometriju materice vodiće do oslobađanja male količine  $\text{PGF}_{2\alpha}$  iz materice koja će zatim uticati na oslobađanje oksitocina iz žutog tela. Oslobođeni oksitocin iz žutog tela će dalje pozitivno uticati na oslobađanje  $\text{PGF}_{2\alpha}$  što će na kraju dovesti do pojave većih količina ovog faktora i početka regresije žutog tela. Drugi model pretpostavlja da male koncentracije  $\text{PGF}_{2\alpha}$  iz materice (koje ne dovode do luteolize) deluju stimulišuće na sopstvenu sintezu u žutom telu povećavanjem aktivnosti enzima COX-2 u velikim luteinskim ćelijama. Ova pozitivna sprega između materice i žutog tela oslobodiće veće, luteolitičke, količine  $\text{PGF}_{2\alpha}$  i omogućiti regresiju žutog tela.

Postoji i nekoliko mehanizama putem kojih  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dovodi do regresije žutog tela i koji uključuje smanjenje protoka krvi kroz žuto telo, sprečavanje delovanje luteotropnih faktora kao što su PRL i LH, inhibicija steroidogeneze i stimulacija apoptoze ćelija i razgradnje tkiva. Smanjenje protoka krvi kroz žuto telo je predstavljeno kao mogući početni mehanizam delovanja  $\text{PGF}_{2\alpha}$  zbog vazokonstriktorne aktivnosti ovog lipida kao i podataka da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  smanjuje protok krvi u žutom telu ovce. Smanjenje protoka krvi bi dovelo do umanjenog priliva hranljivih materija i efikasnog uklanjanja metaboličkih produkata što bi dovelo do oštećenja ćelija i tkiva i regresije žutog tela. Međutim, istraživanja na glodarima, zečevima i domaćim životinjama nisu pokazala promenu u protoku krvi kroz žuto telo tokom regresije žutog tela izazvane sa  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Sigurno je da se smanjenje protoka krvi kroz žuto telo dešava na kraju luteolize kada se javi smanjenje funkcije žutog tela i početak regresije ovog organa. Da li onda i smanjenje protoka krvi kroz žuto telo može započeti regresiju tkiva ostaje nerazjašnjeno.

$\text{PGF}_{2\alpha}$  smanjuje produkciju progesterona u luteinskim ćelijama što može biti jedan od potencijalnih mehanizama regresije žutog tela kod pacova.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ne dovodi do inhibicije sinteze progesterona već povećava njegov metabolizam i formiranje neaktivnog  $20\alpha$ -DHP. Ovaj efekat  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se ostvaruje preko povećanja nivoa iRNK za enzim  $20\alpha$ -HSD, koji prevodi progesteron u neaktivni metabolit  $20\alpha$ -DHP. Eksperimenti na miševima i skotnim pacovima su pokazali da promotorski region gena za  $20\alpha$ -HSD sadrži mesta koja se regulišu sa  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Ova mesta obuhvataju sekvence za vezivanje transkripcionog faktora Nur77. Uloga  $\text{PGF}_{2\alpha}$  i Nur77 u regulaciji prepisivanja iRNK za  $20\alpha$ -HSD je pokazana i u većem broju eksperimenata.

ta. Utišavanje Nur77 dovodi do potpunog gubitka eksprimiranja 20 $\alpha$ -HSD nakon stimulacije sa PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Važna je i činjenica da se prepisivanje Nur77 povećava pri kraju trudnoće u žutom telu miševa kada se povećava i nivo iRNK za 20 $\alpha$ -HSD. Kod miševa kod kojih je utišan PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ne dolazi do eksprimiranja gena za Nur77 i 20 $\alpha$ -HSD. Ovi podaci ukazuju da mogući mehanizam luteolize PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  podrazumeva povećano eksprimiranje transkripcionog faktora Nur77, a i enzima 20 $\alpha$ -HSD koji će zatim smanjiti biološku aktivnost progesterona prevodeći ga u neaktivni metabolit.

Pored efekta na metabolizam progesterona, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  može da utiče na transport holesterola. PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  dovodi do smanjenja nivoa iRNK za STAR kao i enzima koji učestvuju u sintezi progesterona. Ostaje nejasan fiziološki značaj efekta PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  na transport holesterola i njegove dalje transformacije do progesterona, jer se smatra da je pad progesterona koji se javlja pri kraju trudnoće kod pacova nastaje prvenstveno kao posledica njegovog prevođenja u neaktivni metabolit, a ne smanjenje biosinteze ovog steroida.

Vidljive efekte PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ostvaruje vezujući se za svoj receptor koji pripada familiji receptora spregnutih sa G proteinom. Receptor za PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  se eksprimira u žutom telu kod mnogih vrsta i njegova količina u luteinskim ćelijama se povećava tokom razvoja žutog tela. Aktivacija receptora za PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  dovodi do formiranja inozitol trifosfata (engl. *inositol 3-phosphate*, IP<sub>3</sub>) i diacilglicerola (DAG), povećava se koncentracija unutarćelijskog Ca<sup>2+</sup> i aktivnost PKC. U žutom telu, Ca<sup>2+</sup> i PKC su povezani sa smanjenjem steroidogeneze i stimulacijom apoptoze. Takođe, u žutom telu pacova, povećanje unutarćelijskog Ca<sup>2+</sup> vodi do stimulacije Nur77 koji zatim povećava prepisivanje enzima 20 $\alpha$ -HSD koji prevodi biološki aktivni progesteron u neaktivni metabolit 20 $\alpha$ -DHP. Receptor za PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  je povezan i sa aktivacijom fosfolipaze D koja dovodi do povećanja fosfatidne kiseline i aktivacije signalnog puta vanćelijskim signalima regulisane kinaze 1/2 (engl. *extracellular signal regulated kinase 1/2*, ERK1/2). Kod luteniskih ćelija pacova, aktivacija signalnog puta ERK1/2 povećava unutarćelijski Ca<sup>2+</sup>, a takođe može da utiče i na eksprimiranje STAR i lučenje progesterona.

PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  može da sprečava delovanje luteotropnih faktora koji pokazuju pozitivan efekat na progesteron u luteinskim ćelijama kao što su LH ili PRL. Ovaj efekat PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  bi uključivao, ili smanjenje osetljivosti lutenskih ćelija na cAMP, ili smanjenje sinteze ovog sekundarnog glasnika nakon

stimulacije sa LH. Pošto  $\text{PGF}_{2\alpha}$  povećava koncentraciju unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  i aktivnost PKC, smatra se da ovi signalni molekuli mogu da inhibišu luteotropne efekte LH. Međutim, primena inhibitora PKC ili sprečavanje povećanja  $\text{Ca}^{2+}$  unutar ćelije nije uticala na efekte  $\text{PGF}_{2\alpha}$  kod luteinskih ćelija koje su stimulisane sa LH. Pored ove hipoteze, pokazan je još jedan moguć mehanizam koji bi mogao da spreči luteotropni efekat LH. Naime, rezultati su ukazali da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  povećava eksprimiranje transkripcionog faktora DAX-1 (*eng. dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X-chromosome, gene-1*). DAX-1 se vezuje za promotorski region STAR i smanjuje osetljivost ovog promotora na stimulaciju sa cAMP.

$\text{PGF}_{2\alpha}$  može da spreči i delovanje PRL na luteinske ćelije. Eksperimenti na miševima kojima je utišan receptor za  $\text{PGF}_{2\alpha}$  kao i na skotnim pacovima navode da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  koči eksprimiranje PRLR kao i da je pad u nivou PRLR koji se javlja pri kraju trudnoće kod pacova posledica delovanja  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Inhibitorski efekat  $\text{PGF}_{2\alpha}$  na PRLR je od velike važnosti i za održavanje nivoa enzima  $20\alpha\text{-HSD}$ . Stoga,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  deluje pomoću dva mehanizma u cilju povećanja nivoa  $20\alpha\text{-HSD}$ . Jedan put je aktivacija Nur77 koji će povećati nivo iRNKA za  $20\alpha\text{-HSD}$  što će pozitivno uticati na povećanje nivoa samog enzima. Međutim, transkripcioni faktor Nur77 se brzo eksprimira, ali se i njegova transkripcija brzo gasi što ne može da objasni visok nivo enzima  $20\alpha\text{-HSD}$  u dužem periodu. Smanjenje PRLR od strane  $\text{PGF}_{2\alpha}$  bi predstavljao drugi put koji  $\text{PGF}_{2\alpha}$  koristi da poveća nivo  $20\alpha\text{-HSD}$  u dužem periodu. Dakle, model koji objašnjava delovanje  $\text{PGF}_{2\alpha}$  na enzim  $20\alpha\text{-HSD}$  pa i na nivo progesterona pretpostavlja da je Nur77 potreban za rani porast nivoa enzima  $20\alpha\text{-HSD}$ , dok je smanjenje PRLR odgovorno za održavanje visokog nivoa ovog enzima na duže vreme.

Pored funkcionalne javlja se i strukturna regresija žutog tela. Karakteriše se smanjenjem veličine i mase žlezde. Nastaje zbog apoptoze luteinskih ćelija i zamene vaskulature i vezivnog tkiva sa kolagenim vlaknima, fibroblastima i makrofazima. Apoptoza luteinskih ćelija se odvija putem dva procesa: spoljašnji put apoptoze koji je uzrokovan receptorima smrti i unutrašnji put apoptoze koji se još naziva i mitohondrijski put apoptoze. U spoljašnjem putu apoptoze interakcija između liganda i receptora smrti kao što su receptor za FAS ili za faktor nekroze tumora (*eng. tumor necrosis factor, TNF*) dovode do aktivacije kaspaze 8. Unutrašnji put aktiva-

cije apoptoze ćelije uključuju oštećenje mitohondrija i izlazak citohroma c koji se vezuje za proteazu aktivirajući faktor apoptoze-1 i prokaspazu-9 koji zatim formiraju kompleks koji će aktivirati kaspazu 9. Oba puta apoptoze će aktivirati kaspaze 3, 6 i 7 koje dovode do ćelijske smrti. Apoptoza predstavlja primarni mehanizam smrti žutog tela kod žene. Kaspaze su pronađene u žutom telu pacova i miševa, i potvrđeno je da miševi kojima nedostaje kaspaza 3 pokazuju odsustvo apoptoze i produžen životni vek žutog tela. Međutim, žuto telo ovih miševa na kraju podleže regresiji, što ukazuje da kaspaza 3 nije jedini mehanizam ka regresiji ove žlezde. Tako, apoptoza endotelskih ćelija krvnih sudova dovodi do ishemije koja je praćena nekrozom luteinskih ćelija.

## 8.5. LITERATURA

- Chaffin CL, Hess DL, Stouffer RL (1999) Dynamics of periovulatory steroidogenesis in the rhesus monkey follicle after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 14(3):642–9.
- Christenson LK, Devoto L (2003) Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol* 10: 90,1–9.
- Devoto L, Kohen P, Muñoz A, Strauss JF 3rd (2009) Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. *Reproductive BioMedicine Online* 2:19–24.
- Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC (2002) Regulation of progesterone and prostaglandin F2alpha production in the CL. *Mol Cell Endocrinol* 191:65–80.
- Duan WR, Linzer DI, Gibori G (1996) Cloning and characterization of an ovarian-specific protein that associates with the short form of the prolactin receptor. *J Biol Chem* 271:15602–15607.
- Frasor J, Gibori G (2003) Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends Endocrinol Metab* 14(3):118–23.
- Galano M, Venugopal S, Papadopoulos V (2022) Role of STAR and SCP2/SCPx in the Transport of Cholesterol and Other Lipids. *Int J Mol Sci* 23:12115.
- Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277(5322):48–50.
- Irving-Rodgers HF, Roger J, Luck MR, Rodgers RJ (2006) Extracellular matrix of the corpus luteum. *Semin Reprod Med* 24:242–50.
- Jirawatnotai S, Moons DS, Stocco CO, Franks R, Hales DB, Gibori G, Kiyokawa H (2003) The cyclin-dependent kinase inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 cooperate to restrict proliferative life span in differentiating ovarian cells. *J Biol Chem* 278:17021–17027.

- Kawaminami M, Shibata Y, Yaji A, Kurusu S, Hashimoto I (2003) Prolactin inhibits annexin 5 expression and apoptosis in the corpus luteum of pseudopregnant rats: involvement of local gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 144:3625–3631.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC (1999) Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79:263–323.
- Niswender GD (2002) Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* 123:333–339.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW (2000) Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80:1–29.
- Robker RL i Richards JS (1998) Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol* 12:924–940.
- Sandhoff TW, McLean MP (1999) Repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by PGF $_{2\alpha}$  is modulated by the negative transcription factor DAX-1. *Endocrine* 10:83–91.
- Stocco C (2007) The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* 28:117–149.
- Stocco C, Djiane J, Gibori G (2003) Prostaglandin F $_{2\alpha}$  (PGF $_{2\alpha}$ ) and prolactin signaling: PGF $_{2\alpha}$ -mediated inhibition of prolactin receptor expression in the Corpus luteum. *Endocrinology* 144:3301–3305.
- Stouffer RL (2003) Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis. *Hum Reprod Update* 2:99–117.
- Stouffer RL, Bishop CV, Bogan RL, Xu F, Hennebold JD (2013) Endocrine and local control of the primate corpus luteum. *Reprod Biol* 13:259–271.
- Yakin K, Hela F, Oktem O (2023). Progesterone signaling in regulation of luteal steroidogenesis. *Mol Hum Reprod* 29(8): gaad0022
- Yoshida S, Kubota K, Sasaki H, Hasegawa T, Nishihara M, Terada M, Takahashi M (1999) 26-cholesterol hydroxylase in rat corpora lutea: A negative regulator of progesterone secretion. *Biol Reprod* 61: 557–562.
- Zhong L, Ou J, Barkai U, Mao JF, Frasier J, Gibori G (1998) Molecular cloning and characterization of the rat ovarian 20  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 797–803.





**Radmila Kovačević**

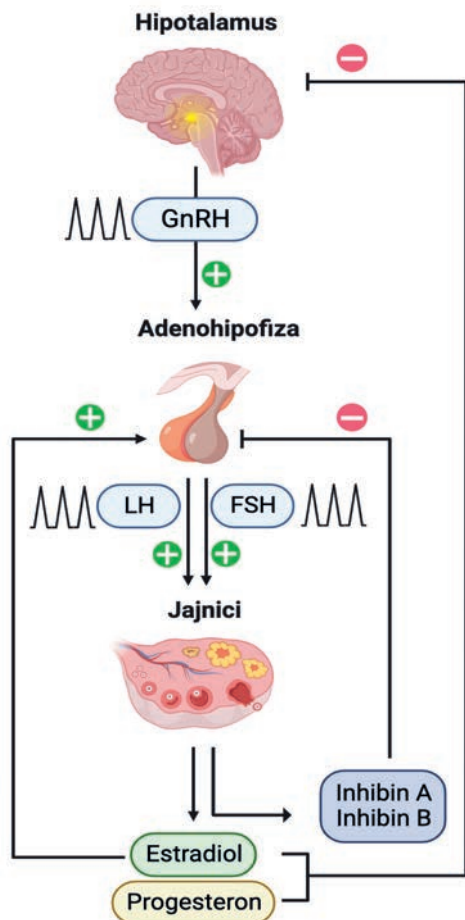
---

**9.  
NEUROENDOKRINE  
OSNOVE  
MENSTRUALNOG  
CIKLUSA**

---



Ženski reproduktivni sistem karakteriše se cikličnim promenama na nivou jajnika i materice. Razvoj folikula, ovulacija i priprema endometrijuma za implantaciju ukoliko dođe do oplodnje, odnosno pojava menstruacije, ukoliko do oplodnje ne dođe, jesu događaji koji se ciklično ponavljaju tokom menstrualnog ciklusa žene. Ove promene se odvijaju preko osovine hipotalamus-hipofiza-jajnici i uzrokovane su pulsativnim lučenjem gonadotropnog hormona-oslobađajućeg hormona (engl. *gonadotropin hormone releasing hormone*, GnRH) koji reguliše sintezu i lučenje gonadotropnih hormona, folikulostimulišućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Pod uplivom gonadotropnih hormona, koordinisano lučenje estradiola, progesterona, inhibina B i inhibina A direktno na nivou jajnika i materice, i indirektno putem negativne i pozitivne povratne sprege na nivou hipotalamusa i hipofize omogućava odvijanje menstrualnog ciklusa (Slika 9.1).



**Slika 9.1.**

Osovina hipotalamus-hipofiza-jajnici kod žene. Pozitivna povratna sprega estradiola se dešava na nivou adenohipofize (Slika je napravljena u Biorenderu)

## 9.1. REGULACIJA LUČENJA FSH I LH

FSH i LH sintetišu se u gonadotropnim ćelijama adenohipofize. Kao što je navedeno u poglavlju 3, LH i FSH pripadaju glikoproteinskim hormonima sastavljenim od  $\alpha$ - i  $\beta$ -subjedinice. Pokazano je da izoforme FSH mogu da sadrže 3 ili 4, a LH 2 ili 3 oligosaharidna ostatka (glikana) u jednoj molekuli sa terminalno vezanom sijalinskom kiselinom (SA), ili N-acetilgalaktozamin-sulfatom (SU). Izoforme sa ostacima SA imaju duži poluživot u odnosu na izoforme sa ostacima SU. Kod molekula FSH su dominantne izoforme sa ostacima SA, dok izoforme LH više karakteriše prisustvo SU, mada su zastupljene i izoforme sa ostatkom SA. Prisustvo glikana obezbeđuje stabilnost i poluživot molekula u cirkulaciji. Lučenje FSH i LH je pulsativne prirode, sastav izoformi se menja posle svakog pulsa, a koncentracija hormona u serumu zavisi od stope lučenja i brzine kojom se pojedine izoforme uklanjaju iz cirkulacije. Poluživot FSH u cirkulaciji zavisi od terminalnih ostataka SA, koji produžavaju život molekula. Nestanak LH iz cirkulacije zavisi prvenstveno od terminalnih ostataka SU na glikanu koji se brzo uklanjaju iz cirkulacije. Nedvojbeno je da različite izoforme FSH i LH koje se razlikuju u strukturi oligosaharidne komponente i naelektrisanja stižu do ciljnih tkiva. Eksperimenti sprovedeni u *in vitro* uslovima pokazuju da izoforme FSH sa manje N-glikana imaju veću biološku aktivnost, dok suprotne karakteristike pokazuju forme koje na  $\beta$ -subjedinici imaju zauzeta sva mesta za glikozilaciju. Slično se pretpostavlja i za LH.

Nivoi različitih izoformi FSH i LH variraju tokom menstrualnog ciklusa. Koncentracija izoformi sa ostatkom SA se povećava do maksimuma sredinom ciklusa, dok su one sa ostatkom SU u minimumu. Stoga je količnik SU/SA u minimumu 12. dana ciklusa za oba hormona, dok je prisustvo izoformi za ostatkom SU veće na početku i na kraju ciklusa – poluživot molekula je tada kraći. Istovremeno, pokazano je da su sredinom menstrualnog ciklusa mnogo više prisutne izoforme FSH i LH sa manje glikana, tj. izoforme sa većom biološkom aktivnošću u odnosu na potpuno glikozilirane forme. Dokazano je da se glikozilacija  $\beta$ -subjedinice FSH menja s povećanjem godina žene i u menopauzi su u većem procentu prisutne izoforme FSH i LH sa ostatkom SA, odnosno izoforme sa dužim poluživotom.

Takođe je pokazano da na lučenje gonadotropina utiču faktori povezani sa gojaznošću. Naime, kod žena koje imaju regularan ciklus i povećan indeks telesne mase smanjen je nivo LH u serumu u odnosu na žene istih godina koje nisu gojazne. Takođe, u slučaju sindroma policističnih jajnika (engl. *polycystic ovarian syndrome*, PCOS) dolazi do smanjenja nivoa LH u serumu verovatno zbog prisustva izoformi LH i FSH sa većim procentom SU, odnosno kraćim poluživotom.

Bolje poznavanje biohemijskih i farmakoloških karakteristika različitih izoformi FSH, obrasca lučenja tokom menstrualnog ciklusa i promena koje se dešavaju tokom reproduktivnog perioda, važno je sa aspekta proizvodnje komercijalnih preparata FSH. Proizvodnja preparata koji u svom sastavu sadrže odgovarajuće izoforme FSH koje se sreću u određenoj fazi menstrualnog ciklusa omogućila bi finu regulaciju prirodnog ciklusa jajnika u postupcima vantelesne oplodnje.

### 9.1.1. GnRH, aktivin, inhibin i folistatin

Gonadotropne hormone karakteriše pulsativno lučenje, što je posledica istog obrasca lučenja GnRH. Frekvencija i amplituda pulseva zavise od povratne sprege steroida na nivou hipotalamusa i hipofize. Budući da je pokazano, u eksperimentima na velikim životinjama, da pulsativno lučenje LH odražava pulsativno lučenje GnRH u portalnom krvotoku, učestalo merenje nivoa LH u serumu odslikava frekvenciju pulseva GnRH.

Prema podacima u poglavlju 3, pulsativno lučenje GnRH zavisi od stimulatornog delovanja kisseptina koji luče kisseptin neuroni u arkuatnom jedru (infundibularnom jedru). Ovi neuroni kod različitih životinjskih vrsta, pored kisseptina, sintetišu i neurokinin B (NKB) i dinorfin (Dyn), pa se označavaju i kao KNDy neuroni. Formiraju neuronsku mrežu i poseduju receptore za NKB i receptore za Dyn. Dok NKB stimuliše, Dyn inhibiše oslobađanje kisseptina iz ovih neurona što omogućava epizodično lučenje kisseptina, odnosno isprekidanu stimulaciju GnRH neurona. KNDy neuroni ekspimiraju receptore za estrogene, progesteron i androgene što omogućava negativnu povratnu spregu ovih steroidnih hormona na lučenje GnRH. Postoje podaci da Dyn koji se vezuje za kapa-opioidne receptore učestvuje u negativnoj povratnoj sprezi progesterona na pulsativ-

no lučenje GnRH. Takođe, pokazano je da gama-amino buterna kiselina (engl. *γ-aminobutyric acid*, GABA) učestvuje u negativnoj povratnoj sprezi estradiola na lučenje GnRH.

Blokada dejstva GnRH primenom antagonista dovodi do inhibicije lučenja LH od 90% dok je lučenje FSH smanjena za 40–60%. Ovi podaci ukazuje da GnRH dominantno reguliše produkciju LH, dok su za regulaciju sinteze i lučenja FSH, pored GnRH, odgovorni i drugi faktori. Dinamika sinteze i lučenja LH i FSH zavisi od frekvence i amplitude GnRH pulseva. U menstrualnom ciklusu žene najmanja frekvencija pulseva GnRH javlja se u luteinskoj fazi gde period između dva pulsa iznosi od 4 do 8 sati, a najveća frekvencija jeste sredinom folikulske faze i traje do njenog kraja, odnosno do sredine ciklusa kada su pulsevi GnRH na 60 minuta. U eksperimentima sprovedenim u *in vitro* uslovima, uočeno je da manja frekvencija pulseva GnRH dovodi do povećanog prepisivanja iRNK za  $\beta$ -subjedinicu FSH, a smanjenog prepisivanja iRNK za  $\beta$ -subjedinicu LH.

U jednoj studiji, osobe sa nedostatkom GnRH su tretirane tokom sedam dana pojedinačnim dozama GnRH (75 ng/kg) u intervalima od 90 minuta. Nakon toga započeto je uzimanje krvi u kratkim vremenskim intervalima u ukupnom vremenskom trajanju od 18 časova. Iste doze GnRH primenjene su na svakih 90 minuta u prvih 6 sati, zatim u narednih 6 sati na 60 minuta, a u poslednjih 6 sati na svakih 30 minuta. Pri najmanjoj frekvenciji GnRH amplituda pulseva LH bila je najveća, a frekvencija najmanja, zatim je došlo do povećanja frekvencije kako se povećavala i frekvencija pulseva GnRH, dok je amplituda bila manja. Pri najvećoj frekvenciji pulseva GnRH, srednji nivo lučenja LH bio je značajno povećan u odnosu na prethodna dva perioda, što nije bio slučaj sa FSH. Srednji nivo FSH ostao je nepromenjen tokom posmatranog perioda. Međutim, kada je izračunata srednja vrednost nivoa hormona normalizovana na ukupnu dozu GnRH koja je primenjena u posmatranom periodu, kod najveće frekvencije pulseva GnRH (najveća ukupna doza) nivoi LH i FSH su bili značajno smanjeni. To ukazuje da pri velikoj frekvenciji pulseva GnRH, koja je iznad fizioloških vrednosti, dolazi do desenzitizacije gonadotropnih ćelija na GnRH i smanjenog lučenja gonadotropina. U prilog tome je i podatak da pri kontinualnoj primeni GnRH dolazi do smanjenja osetljivosti gonadotropnih ćeli-

ja na GnRH. Ova i slične studije pokazuju da je manja frekvenca pulseva GnRH povezana sa smanjenom sintezom i manjim srednjim nivoima LH u serumu, uz istovremeno veću amplitudu pulseva LH. Istovremeno, manja frekvenca pulseva GnRH praćena je povećanom sintezom i lučenjem FSH kada nema inhibitornog dejstva hormona gonada na nivou hipotalamusa i hipofize.

U regulaciji lučenja FSH, pored GnRH, učestvuju i aktivin, inhibin i folistatin. Aktivin je dimer koji se sastoji od  $\beta A$  i/ili  $\beta B$  subjedinice. Kombinacijom ove dve subjedinice nastaju aktivin A, aktivin B i aktivin AB. Aktivin se sintetiše u gonadotropnim ćelijama i deluje kao autokrini/parakrini faktor i kontroliše eksprimiranje  $\beta$ -subjedinice FSH. Takođe, povećava eksprimiranje receptora za GnRH, i pospešuje delovanje GnRH na stvaranje FSH. Folistatin koji se sintetiše u folikulostelastnim i gonadotropnim ćelijama adenohipofize pod dejstvom GnRH, blokira vezivanje aktivina za receptore na membrani gonadotropnih ćelija. Pri većim koncentracijama folistatina, dostupna je manja koncentracija slobodnih molekula aktivina koji mogu da se vežu za svoje receptore na gonadotropnim ćelijama, što negativno deluje na stvaranje FSH. Sinteza aktivina se ne menja tokom menstrualnog ciklusa, dok je produkcija folistatina u pozitivnoj korelaciji sa frekvencom pulseva GnRH. Sledbeno, iako je sinteza aktivina nepromenjena tokom menstrualnog ciklusa, stimulatorno dejstvo aktivina na produkciju FSH veće je pri niskoj frekvenci GnRH, jer je tada koncentracija folistatina manja, odnosno manja je inhibicija molekula aktivina.

Inhibin je heterodimer sastavljen od  $\alpha$ - i  $\beta$ -subjedinice, pri čemu postoje subjedinice  $\beta A$  i  $\beta B$ , tj. inhibin A i inhibin B. Inhibin deluje kao antagonist aktivina, jer blokira receptor za aktivin ActRII, odnosno onemogućava vezivanje aktivina. Inhibin se takođe sintetiše u adenohipofizi, međutim, za inhibiciju stvaranja FSH više je odgovoran inhibin poreklom iz jajnika. U serumu i folikulskoj tečnosti žene prisutni su inhibin A i inhibin B. Inhibin B se najviše luči tokom folikulske faze, a minimum dostiže u luteinskoj fazi menstrualnog ciklusa. Inhibin A produkuje granuloza ćelije u folikulskoj fazi, a ćelije žutog tela u luteinskoj fazi.

### 9.1.2. Estradiol i progesteron

Lučenje FSH je veoma osjetljivo na inhibitorno dejstvo malih koncentracija estradiola. Takođe, male koncentracije ovog hormona inhibišu i lučenje LH. Nasuprot, visoke koncentracije estradiola kojima je osovina hipotalamus-hipofiza izložena određeno vreme izazivaju sredinom ciklusa značajno, višestruko povećanje lučenja LH (ovulatorni talas LH) što dovodi do ovulacije. To znači da estradiol u sistemu hipotalamus-hipofiza-jajnici ostvaruje negativnu i pozitivnu povratnu spregu u odnosu na lučenje LH.

Mesto inhibitornog dejstva estradiola je hipotalamus u kome su prisutne obe forme receptora za estrogene (ER), ER $\alpha$  i ER $\beta$ . Ispitivanja na životinjama kojima je utišan gen za ER, pokazala su da je za inhibiciju dominantno odgovoran ER $\alpha$  kao i da su KDNy neuroni uključeni u inhibitorno dejstvo estradiola. Pretpostavke su, da su neuroni iz preoptičke oblasti koji produkuju GABA takođe uključeni u inhibitorno dejstvo estradiola. Kod žena koje su u menopauzi, primena estradiola ne utiče na smanjenje frekvence pulseva GnRH. Stoga je moguće da se inhibitorno dejstvo estradiola ostvaruje smanjenjem amplitude pulseva GnRH. ER $\alpha$  i ER $\beta$  su prisutni i na nivou gonadotropnih ćelija. Ispitivanja kod glodara ukazuju da estradiol ispoljava inhibitorno dejstvo i na nivou hipofize. Takođe, kod žena u menopauzi kod kojih je hipofiza izolovana od dejstva hipotalamusa, primena estradiola smanjuje lučenje gonadotropina, pri čemu je efekat izraženiji na lučenje FSH u odnosu na LH.

Povećanje nivoa estradiola pri kraju folikulske faze ciklusa ima pozitivno dejstvo na oslobađanje LH. Ovulatorni talas LH opisan je kod velikog broja životinjskih vrsta i kod žene. Mnoga istraživanja ukazuju da visok nivo estradiola pojačava osjetljivost gonadotropnih ćelija hipofize na GnRH kod većeg broja životinjskih vrsta. Povećava se broj ćelija koje eksprimiraju gene za subjedinice gonadotropina, a takođe i broj receptora za GnRH. Istraživanja ukazuju da aktivin zajedno sa estradiolom utiče na povećanje broja receptora za GnRH na gonadotropnim ćelijama.

Pozitivno dejstvo estrogena na lučenje LH (i FSH) uključuje, u zavisnosti od životinjske vrste, i efekte na nivou hipotalamusa. Kod glodara, pozitivno dejstvo estradiola, ostvaruje se povećanjem lučenja GnRH, premda ima i pozitivnog dejstva estradiola na nivou hipofize. Kod ovce,



merenje nivoa GnRH u portalnim sudovima hipofize pokazalo je da dolazi do značajnog povećanja brzine kojom se oslobađa GnRH, do povećanja amplitude pulseva i interpulsnog lučenja, tako da se pulsativno oslobađanje menja u kontinualno tokom pika lučenja. Ispitivanja na ne-čovekolikim primatima pokazuju da ovulatorni talas LH koji izaziva ovulaciju ne zahteva povećanje lučenja GnRH. Kod žena nije neophodno ni povećanje frekvence pulseva ni ukupne količine izlučenog GnRH. Mora da postoji pulsativno lučenje GnRH i povećanje senzitivnosti gonadotropnih ćelija hipofize na GnRH što je posledica direktnog dejstva estradiola, a verovatno i inhibina A, na ove ćelije.

Estradiol ima važnu ulogu u smanjenju glikozilacije FSH i LH. U gonadotropnim ćelijama  $\alpha$ -subjedinice se sintetišu u većem obimu u odnosu na  $\beta$ -subjedinice FSH i LH. Sredinom ciklusa sinteza  $\beta$ -subjedinica naglo raste što nije praćeno adekvatnim povećanjem kapaciteta za odvijanje glikozilacije tih subjedinica. Naime, estradiol inhibitorno deluje na glikozilaciju oba hormona, najverovatnije blokadom enzima koji učestvuju u glikozilaciji u endoplazmatičnom retikulumu. Stoga povećanje nivoa ovog steroida u preovulatornom periodu negativno utiče na proces glikozilacije. Nastaju molekuli LH i FSH sa nižim sadržajem šećerne komponente, ali koji imaju mnogo veću biološku aktivnost u poređenju sa molekulima u kojima su sva mesta za glikozilaciju zauzeta. Lučenje ovih izoformi molekula gonadotropina sredinom ciklusa ima suštinsku ulogu u procesu ovulacije.

Pored estradiola, progesteron ima značajnu ulogu u kontroli lučenja FSH i LH. Efekat progesterona zavisi od faze menstrualnog ciklusa. Postoje podaci o direktnom i indirektnom delovanju progesterona na lučenje GnRH. Tokom luteinske faze progesteron deluje inhibitorno na lučenje gonadotropina, odnosno GnRH. KDNy neuroni poseduju receptore za progesteron i efekat se ostvaruje na nivou hipotalamusa i ogleda se u smanjenju frekvence pulseva GnRH. Studije ukazuju da se indirektno inhibitorno dejstvo ostvaruje preko endogenih opioida. S druge strane, malo povećanje progesterona koje se javlja nakon porasta estradiola na kraju folikulske faze, potencira oslobađanje LH.

## 9.2. MENSTRUALNI CIKLUS

Na početku svakog menstrualnog ciklusa dolazi pod uplivom FSH do regrutacije (odabira) kohorte/grupe 5–10 antralnih folikula dijametra 2–5 mm. Da bi došlo do regrutacije neophodan je porast lučenja FSH koji treba da traje određen period. U odsustvu takvog obrasca lučenja, regrutacija izostaje i folikuli ulaze u apoptozu. Taj porast nivoa FSH dešava se na prelazu luteinske u folikulsku fazu ciklusa, jer zbog regresije žutog tela dolazi do pada nivoa estrogena, progesterona i inhibina A, a time i do ukidanja inhibitornog dejstva ovih hormona na FSH. Rekrutovani folikuli kompetuju za izbor dominantnog folikula koji ima mogućnost da se razvije do stepena preovulatornog folikula. Selekcija dominantnog folikula dešava se već između 5. i 7. dana ciklusa. Razvoj dominantnog folikula i atrezija ostalih rekrutovanih antralnih folikula rezultat je sa jedne strane pozitivnog delovanja FSH i estradiola na nivou dominantnog folikula, a sa druge istovremenog inhibitornog dejstva povećanih koncentracija inhibina B i estrogena na hipotalamus i hipofizu što izaziva smanjenje lučenja FSH. U tom periodu u dominantnom folikulu dolazi do značajne proliferacije granulosa ćelija što dovodi do povećanja broja receptora za FSH. Tako, folikul postaje mnogo osetljiviji na dejstvo FSH što omogućava povećanje aktivnosti aromataze i porast koncentracije estrogena unutar folikula. Padom nivoa FSH manje razvijeni folikuli ne mogu da se dalje razvijaju i podležu atreziji. Pad koncentracije FSH u serumu sredinom folikulske faze je ključan događaj za formiranje samo jednog preovulatornog folikula u datom menstrualnom ciklusu. Takođe, rast antralnih folikula praćen je razvojem individualne kapilarne mreže oko svakog folikula koja je locirana u teki interni i teki eksterni. U dominantnom folikulu angiogeneza (formiranje krvnih sudova) je mnogo intenzivnija u odnosu na ostale folikule, a to omogućava veće dopremanje hormona i hranljivih materija. Potvrđeno je da je 9. dana ciklusa vaskulatura u odabranom folikulu dvostruko veća u odnosu na ostale koji su rekrutovani u tom ciklusu.

Sa povećanjem koncentracije estrogena, FSH počinje da stimuliše sintezu receptora za LH (LHR). LH ima kritičnu ulogu u kasnoj fazi razvoja folikula jer stimuliše sintezu androgena što omogućava dalji rast značajnih količina estradiola.

Menstrualni ciklus je na osnovu ciklusa jajnika i obrasca lučenja gonadotropnih hormona podeljen u dve faze: folikulsku i luteinsku, dok je za sredinu ciklusa karakterističan ovulatorni talas LH koji indukuje ovulaciju.

### 9.2.1. Folikulska faza

U odsustvu fertilizacije i implantacije, dolazi do regresije žutog tela koje ima ograničen životni vek, što dovodi do smanjenja nivoa progesterona, estradiola i inhibina A u serumu. Tokom luteinske faze, frekvencija pulseva GnRH je mala, pa bi se očekivalo selektivno povećanje lučenja FSH. Međutim, visoki nivoi estradiola i inhibina A blokiraju taj porast. Smanjenje nivoa estradiola i inhibina A uz povećanje frekvencije pulseva GnRH u ranoj folikulskoj fazi omogućava porast lučenja FSH. Ispitivanja kod žena sa nedostatkom GnRH su pokazala da primena GnRH u pulsevima čija frekvencija odgovara luteinskoj i ranoj folikulskoj fazi, rezultira povećanjem lučenja FSH. U ranoj folikulskoj fazi nivo FSH u serumu postiže potrebnu vrednost neophodnu za regrutaciju nove grupe folikula koji nastavljaju svoj rast. Razvoj folikula prati povećanje broja granuloza ćelija, a to inicira povećanje lučenja inhibina B koji dostiže maksimum u sredini folikulske faze. Naime, inhibin B se konstitutivno luči iz granuloza ćelija i povećanje lučenja ovog hormona posledica je povećanja broja granuloza ćelija koje se dešava pod uplivom FSH i određenih faktora rasta na nivou folikula. Konstitutivno lučenje inhibina B je pokazano u ispitivanjima na preantralnim i malim antralnim folikulima koji su dobijeni postupkom ovarijektomije, pri čemu ona nije bila uslovljena nekim sindromom jajnika. Rezultati pokazuju da je lučenje inhibina B zavisno od broja granuloza ćelija u folikulu. Takođe, utvrđeno je da je prepisivanje iRNK za  $\beta$ -subjedinicu inhibina B najveće u malim antralnim folikulima kada raste nivo FSH u serumu, odnosno na početku folikulske faze menstrualnog ciklusa.

Početkom folikulske faze, interval između dva pulsa GnRH je od 90 do 100 minuta, dok se tokom noći frekvencija usporava. Iznete su pretpostavke da ovo smanjenje frekvencije tokom noći potpomaže lučenje FSH u ovom kritičnom periodu regrutacije folikula, s obzirom na to da je lučenje FSH veće pri nižim frekvencijama pulseva GnRH. Istovremeno ovo smanjenje frekvencije tokom spavanja smanjuje lučenje LH.

Sredinom folikulske faze dolazi do smanjenja koncentracije FSH u serumu kao odgovor na inhibin B i porast estradiola i inhibina A. Istovremeno, interval između dva pulsa GnRH se smanjuje na 60 minuta. Porastom estradiola, amplituda pulseva GnRH je smanjena što prati i smanjenje amplitude pulseva LH. Dakle, smanjeno lučenje FSH je od mnogostruke važnosti za selekciju jednog dominantnog folikula i njegov razvoj u preovulatorni folikul. Uloga inhibina B u smanjenju lučenja FSH sredinom folikularne faze ispitana je korišćenjem tamoksifena koji kompetituje za ER i sprečava dejstvo estradiola. Na taj način, blokiranjem negativne povratne sprege estradiola na lučenje FSH, bilo je moguće ispitati u kojoj meri inhibin B učestvuju u smanjenju lučenja FSH. Rezultati su pokazali da je inhibin B odgovoran za smanjenje koncentracije FSH, ali je utvrđeno i sadejstvo estradiola u inhibiciji lučenja FSH u toj fazi ciklusa. Da postoji povratna sprega između inhibina i FSH, pokazuju i studije u kojima je praćen nivo FSH i inhibina tokom folikulske faze kod žena starijih od 35 godina. Dokazano je da dolazi do malog, ali značajnog porasta nivoa FSH u serumu u ranoj folikulskoj fazi, uz istovremeno smanjenja nivoa inhibina B u serumu tokom čitave folikulske faze.

Kasna folikulska faza karakteriše se dramatičnim povećanjem nivoa estradiola u serumu, koji je neophodan za izazivanje ovulatornog talasa LH. Takođe dolazi do povećanog lučenja inhibina A koje je pod kontrolom LH. Naime, sa pojavom LHR na granulosa ćelijama započinje porast lučenja inhibina A. Nivo inhibina A raste od kasne folikulske faze, a maksimum dostiže u sredini luteinske faze. Frekvencija pulseva GnRH ostaje ista i ne menja se do kraja folikulske faze. Međutim, amplituda pulseva LH počinje da raste zbog dejstva estradiola koji povećava osetljivosti gonadotropnih ćelija na dejstvo GnRH. Pretpostavlja se da je inhibin A takođe uključen u porast lučenja LH. Eksperimenti sprovedeni na kulturi ćelija hipofize izolovanih iz ovce u *in vitro* uslovima pokazuju da inhibin A povećava broj receptora za GnRH na ovim ćelijama.

### 9.2.2. Sredina ciklusa – ovulatorni talas LH

Ovulatorni talas LH koji prati i porast lučenja FSH je odgovor na višestruki porast nivoa estradiola iznad 200–400 pg/ml seruma koji treba da traje najmanje do 50 sati. Taj porast estradiola se dostiže kada dijametar dominantnog folikula dostigne 15 mm. Porast estradiola prati i mali porast progesterona koji potencira odgovor hipofize na estradiol. Progesteron luče luteinske ćelije preovulatornog folikula, a porast se dešava 12 h pre LH talasa. Koncentracija LH raste desetostruko naredna 2–3 dana, a nivo FSH raste oko četiri puta. Dan-dva nakon ovulacije javlja se nagli porast nivoa inhibina B u serumu u formi kratkotrajnog talasa. Pretpostavlja se da je to rezultat rupture folikula, nakon čega se, u luteinskoj fazi, nastavlja smanjenje nivoa inhibina B. Druga pretpostavka je da to kratkotrajno povećanje nivoa inhibina B nastaje zbog regrutacije kohorte malih antralnih folikula koji ga produkuju (videti kasnije). U sredini ciklusa kod žene nema porasta frekvencije i amplitude pulseva GnRH, obrazac lučenja se ne menja u odnosu na kasnu folikulsku fazu. Ključan faktor za ovulatorni talas LH (i FSH) jeste održavanje nivoa estradiola iznad 200–400 pg/ml seruma određen vremenski period. Estradiol, zajedno sa progesteronom i inhibinom A, deluje direktno na adenohipofizu i povećava osetljivost gonadotropnih ćelija na GnRH. Malo povećanje progesterona koje se javlja nakon porasta estradiola na kraju folikulske faze, potencira oslobađanje LH. Blokada receptora za progesteron sa RU486 odlaže oslobađanje LH do tri dana uprkos rastu dominantnog folikula i porastu estradiola, što govori u prilog ulozi progesterona. Estradiol dramatično povećava amplitudu pulseva LH i javlja se ovulatorni talas LH. Merenje nivoa LH sredinom ciklusa (tokom 36 h, svakih 5 minuta) pokazuje značajno povećanje amplitude pulseva LH od kasne folikulske faze do sredine ovulatornog talasa, bez promene frekvence pulseva. Završetak ovulatornog talasa LH prati naglo smanjenje amplitude pulseva LH, a period između dva impulsa se produžava na 70 minuta. Smatra se da je ovo rezultat inhibitornog delovanja progesterona na nivou hipotalamusa.

### 9.2.3. Luteinska faza

Tokom luteinske faze frekvencija pulseva GnRH se postepeno smanjuje u odnosu na prethodni period i u kasnoj luteinskoj fazi period između dva pulsa je 4 do 8 sati. Ovo smanjenje je posledica negativne povratne sprege progesterona, uz neophodno sadejstvo estradiola. Pokazano je da u inhibitornom dejstvu progesterona na lučenje GnRH učestvuju endogeni opiodi i da estrogeni pojačavaju stimulatorno dejstvo progesterona na aktivnost endogenih opioda u hipotalamusu. U luteinskoj fazi amplituda pulseva LH je veća nego u folikulske fazi usled dejstva progesterona koji smanjuje frekvenciju pulseva GnRH na svakih 4–8 sati, a verovatno i zbog direktnog dejstva progesterona na nivou hipofize gde povećava osetljivost gonadotropnih ćelija na GnRH.

Tokom prelaska iz luteinske u folikulske fazu zbog regresije žutog tela smanjuje se inhibitorno dejstvo progesterona, estradiola i inhibina A na lučenje GnRH i gonadotropina. Porast frekvencije GnRH prati porast lučenja FSH koji započinje dva dana pre pojave menzisa. Uklanjanje inhibitornog dejstva estradiola i inhibina A zajedno sa povećanjem frekvencije pulseva GnRH omogućava značajnije povećanje lučenja FSH iznad određenih vrednosti što omogućava regrutaciju nove kohorte malih antralnih folikula.

### 9.2.4 Regrutacija antralnih folikula tokom menstrualnog ciklusa – folikulski talasi

U prethodnom opisu menstrualnog ciklusa, govorilo se o regrutaciji jedne kohorte antralnih folikula tokom folikulske faze ciklusa. Kao što je u poglavlju 6 navedeno, metodom transabdominalne ultrasonografije potvrđeno je postojanje dva, a kod nekih žena i tri folikulska talasa u toku jednog menstrualnog ciklusa. Postoje studije koje ukazuju da su dva talasa zastupljena kod oko 68% žena, a tri kod oko 32% žena koje imaju nešto duži menstrualni ciklus. Regrutacija grupe folikula u luteinskoj fazi verovatno je posledica povećanja lučenja FSH sredinom ciklusa. Međutim, svi folikuli koji se regrutuju u tom talasu podležu atreziji u prirodnom ciklusu. Prema nekim autorima, porast nivoa inhibina B u serumu dan-

dva nakon talasa LH možda je posledica upravo ograničenog rasta folikula unutar regrutovane kohorte dok ne podlegnu atreziji.

Postojanje više folikulskih talasa u toku jednog ciklusa omogućilo je nov pristup kontrolisanoj ovarijalnoj stimulaciji u postupku vantelesne oplodnje, sa stimulacijom u folikulskoj i/ili luteinskoj fazi. Razvijen je protokol duple stimulacije unutar jednog menstrualnog ciklusa radi dobijanja što većeg broja jajnih ćelija u obe faze ciklusa, posebno kod pacijenata sa slabim odgovorom na kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju.

### 9.3. ESTRUSNI CIKLUS PACOVA

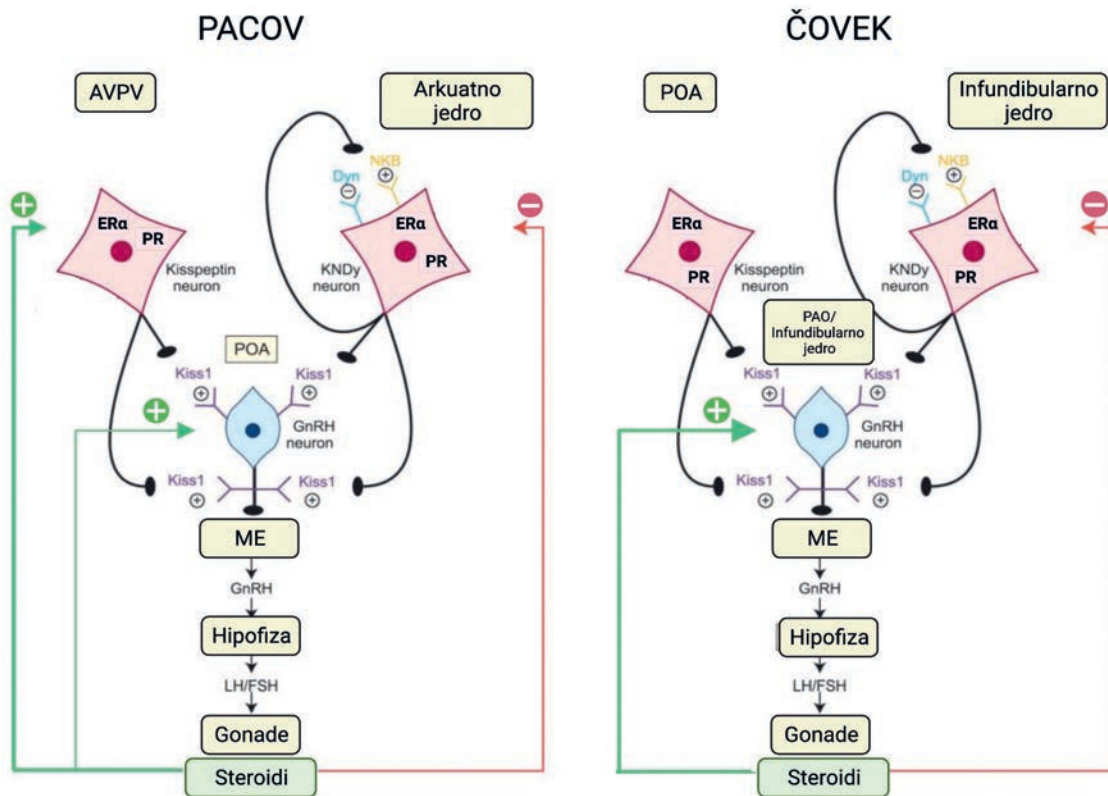
Ženke laboratorijskih pacova su nesezonske, spontano ovulirajuće životinje koje imaju estrusni ciklus tokom čitave godine. Termin estrus prvi je upotrebio Valter Hip (Walter Heape) da bi označio period takozvanog polnog žara kada su ženke prijemčive za parenje. Termin anestrus je upotrebio za period u kome ne dolazi do parenja, odnosno period mirovanja kada ženka odbija parenje. Prefikse pro-, di- i met- na reč estrus koristio je da označi faze ciklusa između dva estrusa tokom sezone parenja. Prva faza ciklusa, proestrus, vreme je kada životinja ulazi u polni žar i ostvaruje se pozitivno dejstvo estradiol na ovulatorni talas LH. Sledeća faza je estrus kada je ženka prijemčiva za mužjaka i moguće je ostvariti uspešan koitus. U odsustvu konceptusa, estrus se smenjuje sa kratkim periodom oporavka, metestrusom, tokom koga se promene u reproduktivnom traktu izazvane estrusom smanjuju. Sledeća faza je diestrus čija dužina varira kod različitih životinjskih vrsta i analogna je luteinskoj fazi.

Faze estrusnog ciklusa mogu da se odrede posmatranjem vaginalnog brisa. Proestrus se karakteriše prisustvom grupacija okruglih epitelskih ćelija sa jasno vidljivim jedrom, a može da se javi i poneka kornificirana ćelija epitela. Potom sledi estrus koji se karakteriše dominacijom kornificiranih ćelija nepravilnog oblika bez jedra, i sa izrazito granuliranom citoplazmom. Pojavljuju se u velikim grupama. Tokom metestrusa (označava se i kao diestrus-1) i diestrusa (diestrus-2) dominantni su leukociti i pojava epitelskih ćelija. Sledećeg dana u proestrusu, nema leukocita, a grupacije epitelskih ćelija dominiraju. Kod petodnevnog ciklusa, tokom dva dana mogu da se registruju kornificirane ćelije (estrus), ili se javlja

dotadni dan sa leukocitima (diestrus). Na osnovu vaginalnog brisa, utvrđeno je da kod pacova proestrus traje 12–14 h; estrus, 25–27 h; metestrus, 6–8 h; diestrus, 55–57 h.

Postoje razlike u ostvarivanju pozitivnog dejstva estradiola na lučenje LH kod glodara i primata. Naime, kod glodara pored povećane osetljivosti ćelija hipofize na dejstvo GnRH, neophodno je i povećanje lučenja GnRH da bi se ostvarilo pozitivno dejstvo estradiola. To povećanje se ostvaruje uključenjem anteroventralnog periventrikularnog jedra koji se nalazi u preoptičkom delu hipotalamusa (Slika 9.2). Eksperimenti u kojima su rađene diskretne lezije pojedinih moždanih regiona ukazali su da je anteroventralno periventralno jedro ključno za pozitivno delovanje estrogena i progesterona na oslobađanje GnRH. Aktivacija anteroventralnog periventralnog jedra povezana je sa cirkadijalnim signalima i odgovorna je za pozitivno delovanje estradiola u fazi proestrusa. Eksperimenti na slobodno pokretljivim ženka pacova kojima je vršena tkz. „*push-pull*“ perfuzija hipofize, a u uzorcima perfuzata meren nivo GnRH pokazali su da hipofiza tokom proestrusa prima značajne količine GnRH kao rezultat povećanja amplitude pulseva, ali ne i frekvence. Anteroventralno periventralno jedro prima ulazne cirkadijalne signale iz suprashijazmatičnog jedra putem neurotransmitera vazopresina i vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP). Suprashijazmatično jedro se označava kao „biološki časovnik“ koji registruje smenu dana i noći, odnosno signale koji stižu retinohipotalamičkim putem iz oka. U prilog tome su klasični eksperimenti Evereta (Everett) i Sojera (Sawyer) koji su pokazali da pomeranje perioda svetlosti kojoj su ženke pacova izložene, bez promene trajanja svetla i tame tokom 24 h, pomera ovulatorni talas LH. Takođe, izlaganje ženki pacova konstantnom svetlu, dovodi do konstantnog estrusa kod ovih životinja i izostanka ovulatornog talasa LH.





**Slika 9.2** Razlike u kontroli GnRH neurona od strane kisseptina kod glodara i čoveka.

Kod glodara pozitivna povratna sprega estradiola (i progesterona) na nivou hipotalamusa, ostvaruje se preko anteroventralno periventralnog jedra (AVPV) gde se nalaze kisseptin neuroni koji poseduju receptore za estrogene i progesteron, ERα i PR.

Estradiol deluje i na hipofizu, povećavaju osetljivost gonadotropnih ćelija na GnRH. Negativna povratna sprega estradiola (i progesterona) ostvaruje se preko arkuatnog

jedra gde se nalaze KNDy neuroni koji poseduju receptore ERα i PR. Kod čoveka, pozitivna povratna sprega estradiola (i progesterona) ostvaruje se na nivou hipofize,

a otvoreno je pitanje da li preoptička oblast (POA) gde se nalaze kisseptin neuroni ima ulogu u nastanku ovulatornog talasa LH, kao što anteroventralno periventralno

jedro ima kod glodara. Negativna povratna sprega estradiola (i progesterona) ostvaruje se kao i kod glodara preko KNDy neurona smeštenih u

infundibularnom jedru. Kiss1 – kisseptin, ME – eminencija medijana, Preuzeto iz Skorupskaita K, George JT, Anderson RA (2014) The kisseptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. Hum Reprod. Update 2014

20(4):485–500 na osnovu Creative Commons Attribution License

((<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), i modifikovano u Biorenderu.

Tokom estrusnog ciklusa lučenje LH je pulsativne prirode kao posledica pulsativnog lučenja GnRH. U popodnevним satima na dan proestrusa (između 14 i 15 h) nivo LH počinje naglo da raste i dostiže maksimum između 17 i 19 h, a zatim se smanjuje i dostiže najniže vrednosti ujutro na dan estrusa, odnosno nekoliko sati nakon ovulacije. Tokom metestrusa, diestrusa i u prepodnevnom delu proestrusa, nivo LH u serumu ostaje nizak. Obrazac lučenja FSH je sličan lučenju LH. Lučenje prolaktina tokom estrusnog ciklusa je takođe slično profilu LH, a rezultat je delovanja estradiola. Istraživanja ukazuju da je prolaktin važan za kontrolu seksualnog ponašanja ženki tokom estrusa.

Tokom estrusnog ciklusa ženke pacova, žuto telo se formira tokom metestrusa, a dostiže maksimum tokom diestrusa i traje do metestrusa narednog ciklusa. Tokom diestrusa lučenje progesterona se smanjuje i moguće je uspostavljanje sledećeg ciklusa. Dakle, luteinska faza traje vrlo kratko. Kako kod ovih životinja trudnoća traje tri nedelje, kratka luteinska faza u odsustvu parenja omogućava da brzo dođe do sledeće ovulacije i šanse za ponovno parenje. Pri parenju, zbog mehaničke stimulacije, dolazi do aktivacije aferentnih nervnih puteva kojima impulsi stižu u hipotalamus i stimulišu svakodnevno oslobađanje prolaktina koje traje oko 10 dana. Prolaktin kod pacova ima luteotropno dejstvo što obezbeđuje da žuto telo produkuje progesteron neophodan za održavanje trudnoće. Ukoliko se ženka pacova izloži parenju sa vazektomisanim mužjacom tokom proestrusa dolazi do produžavanja luteinske faze na 11–12 dana odnosno do pojave koja je označena kao pseudotrudnoća, a traje nešto kraće nego prava trudnoća. Isto se postiže i mehaničkom stimulacijom cerviksa u vreme proestrusa.

## 9.4. LITERATURA

- Baerwald AR (2009) Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine and equine models. *Animal Reproduction* 6:20–29.
- Baerwald AR, Adams GP i Pierson RA (2012) Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human Reproduction Update* 18:73–91.
- Dias JA i Ulloa-Aguirre A (2021) New human follitropin preparations: how glycan structural differences may affect biochemical and biological function and clinical effect. *Frontiers in Endocrinology* 12:636038.
- Goodman RL i Inskoop EK (2015) Control of the ovarian cycle of the sheep. U: Plant TM i Zeleznik AJ, ur., Knobil and Neill's physiology of reproduction, Elsevier, 1259–1305.
- Hall JE (2019) Neuroendocrine control of the menstrual cycle. U: Strauss JF i Barbieri RL, ur., Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology, 8. izdanje, Elsevier, 149–166.
- Kuang Y, Hong Q, Chen Q, Lyu Q, Ai A, Fu Y i Shoham Z (2013) Luteal-phase ovarian stimulation is feasible for producing competent oocytes in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment, with optimal pregnancy outcomes in frozen-thawed embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 101:105–111.
- Lanciotti L, Cofini M, Leonardi A, Penta L, Esposito S (2019) Up-to-date review about minipuberty and overview on hypothalamo-pituitary-gonadal axis activation in fetal and neonatal life. *Front Endocrinol* 9:410.
- Levine JE (2015) Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. U: Plant TM i Zeleznik AJ, ur., Knobil and Neill's physiology of reproduction, Elsevier, 1199–1257.
- McGee EA i Hsueh AJW (2000) Initial nad cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* 21: 200–214.
- Narayan P, Ulloa-Aguirre A i Dias JA (2019). The gonadotropin hormones and their receptors. U: Strauss JF i Barbieri RL, ur., Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology, 8. izdanje, Elsevier, 25–57.
- Ramirez VD i Park OK (1989) Spontaneous changes in LHRH release during the rat estrous cycle, as measured with repetitive push-pull perfusions of the pituitary gland in the same female rats. *Neuroendocrinology* 50:66–72.
- Sighinolfi G, Sunkara SK i Marca AL (2018) New strategies of ovarian stimulation based on the concept of ovarian follicular waves: from conventional to random and double stimulation. *RMBO* 37:489–496.
- Skorupskaite K, George JT, Anderson RA (2014) The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update* 20:485–500
- Taylor HS, Pal L i Seli E (2019) Regulation of the menstrual Cycle. In Speroff's Gynecological Endocrinology and Infertility, 9. izdanje, Wolters Kluwer, 137–173.
- Wide L i Eriksson K (2018) Low-glycosylated forms of both FSH and LH play major roles in the natural ovarian stimulation. *Ups J Med Sci* 123:100–108.



**Kristina Pogrmic Majkić**  
**Radmila Kovačević**

---

# **10.**

# **FERTILIZACIJA I**

# **IMPLANTACIJA**

---



Fertilizacija ili oplodnja predstavlja spajanje dve haploidne gamete, spermatozoida i jajne ćelije, pri čemu se formira nov organizam sa jedinstvenim genotipom. Da bi se oplodnja desila, spermatozoid mora da prođe kroz specifičan proces označen kao kapacitacija. Nakon toga sledi akrozomska reakcija koja omogućava spermatozoidu da se veže za ćeljsku membranu jajne ćelije. Spajanje ćeljske membrana muške i ženske gamete omogućava ulazak glave i dela repa spermatozoida u jajnu ćeliju, odnosno unošenje naslednog materijala i specifičnih proteina koji omogućavaju aktivaciju jajne ćelije i završetak druge mejotičke deobe. Dolazi do formiranja dva pronukleusa, nastanka zigota, njegovog brazdanja i dolaska preembriona u matericu. Sledi implantacija, ključni događaj u reprodukciji sisara. Uspesna implantacija zavisi od obostrane komunikacije između blastociste i materice u okviru ograničenog vremena označenog kao „prozor implantacije“.

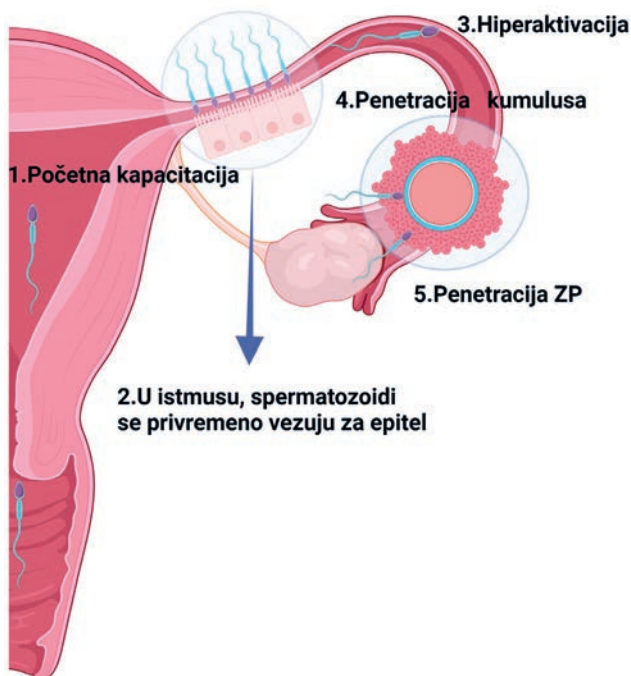
Kapacitacija, akrozomska reakcija, spajanje membrane spermatozoida i ćeljske membrane jajne ćelije, aktivacija jajne ćelije i implantacija su složeni procesi koji zahtevaju vremenski i prostorno definisanu aktivnost određenih hormona, signalnih puteva, međusobnu interakciju odgovarajućih ćelija, i ćelija i vanćeljskog matriksa. Mehanizmi kontrole sinhronizovanog odvijanja ovih procesa u prostorno-vremenskoj dimenziji nisu u potpunosti objašnjeni, posebno ako se govori o modelu kod čoveka, s obzirom na etička ograničenja, kao i direktnu primenu rezultata dobijenih na odgovarajućim životinjskim vrstama na procese kod ljudi. Postoji veliki broj podataka dobijen ispitivanjima na različitim životinjskim vrstama kao što su miš, pacov, ovca, svinja, majmun i druge. Posebno veliki broj rezultata dobijen je poslednjih godina korišćenjem tehnologije utišavanja gena koje su omogućile da se u *in vivo* uslovima testiraju rezultati *in vitro* studija. Znajući da su miševi laboratorijske životinje koje se najčešće koriste u eksperimentima utišavanja gena, najveći broj rezultata u vezi sa ispitivanjem procesa fertilizacije i implantacije dobijen je na miševima.

## 10.1. TRANSPORT SPERMATOZOIDA I JAJNE ČELIJE

Spermatozoidi se oslobađaju iz Sertolijevih ćelija u lumen semenih kanalića u kojima se nalazi tečnost koju sekretuju Sertolijeve ćelije. Odatle odlaze u *rete testis*, zatim u eferentne kanaliće gde se vrši apsorpcija preko 90% tečnosti koja nosi spermatozoide. Apсорpcija zavisi od estrogena koji se sintetišu u Lejdigovim ćelijama i prisustva estrogenih receptora  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) u epitelu eferentnih kanalića. Naime, estrogene stimulišu prepisivanje transportnih proteina koji obezbeđuju apсорpciju vode. Pokazano je da nedostatak ER $\alpha$  kod mužajaka miša ima negativne posledice na njihovu fertilitnost nakon puberteta. U pubertetu Sertolijeve ćelije počinju da izlučuju tečnost u semene kanaliće koja se kreće u smeru genitalnih kanala i služi za prenos spermatozoida. Kod miševa koji nemaju ER $\alpha$  ne vrši se apсорpcija vode na nivou eferentnih kanalića, te stoga dolazi do povećanja pritiska u semenim kanalićima što remeti spermatogenezu i može da dovede do infertilitnosti. U epididimusu, u inicijalnom segmentu se vrši dalje koncentrovanje tečnosti u kojoj se nalaze spermatozoidi i kada dođu u glavu epididimusa 99% tečnosti u kojoj su se nalazili je resorbovano. Dalji transport spermatozoida zavisi od kontrakcija glatke muskulature u zidu epididimusa.

Po izlasku iz testisa, spermatozoidi sisara prolaze kroz dve faze sazrevanja, prva se dešava tokom prolaska kroz epididimus, a druga tokom prolaska kroz ženski genitalni trakt. Ranih 50-ih prošlog veka Min Čang (Min Chueh Chang) i Kolin Ostin (Colin Russel Austin) su nezavisno jedan od drugog zaključili da sisarski spermatozoidi moraju da provedu neko vreme u ženskom genitalnom traktu da bi mogli da oplode jajnu ćeliju. Prolazak kroz ženski genitalni trakt omogućava proces kapacitacije spermatozoida (Slika 10.1.). Otkriće procesa kapacitacije omogućilo je razvoj postupka *in vitro* fertilizacije (IVF) kao jedne od procedura vantelesne oplodnje. Korišćenje *in vitro* modela fertilizacije, zajedno sa tehnikama molekularne biologije omogućilo je intenzivna istraživanja mehanizama fertilizacije.





**Slika 10.1.** Kapacitacija spermatozoida *in vivo*. (1) Tokom prolaska kroz matericu započinje sazrevanje spermatozoida, odnosno uklanjanje dekapacitacionih faktora sa površine ćelijske membrane spermatozoida; (2) U istmusu kod pojedinih vrsta dolazi do zadržavanja spermatozoida i njihovog vezivanja za mukozni epitel; (3) Hemoatraktanti iz kumulusnih ćelija i/ili folikularne tečnosti iniciraju kapacitaciju i povećanje pokretljivosti spermatozoida – hiperaktivaciju; (4) Hiperaktivni spermatozoidi se odvajaju od epitela jajovoda i stižu do kompleksa kumulus-oocita i prodiru kroz kumulus; (5) Spermatozoidi stižu do zone pelucide (ZP), dolazi do egzocitoze akrozoma i spermatozoid krči put kroz ZP.

Slika je napravljena u Biorenderu.

Spermatozoidi koji napuštaju eferentne kanaliće testisa nisu funkcionalni, nepokretni su i nemaju sposobnost oplodnje jajne ćelije. Važnu ulogu u njihovom sazrevanju ima epitel koji oblaže epididimus, jer sadržaj lumena kroz koji prolaze spermatozoidi zavisi od specifičnih apsorpcionih i sekretornih aktivnosti ćelija koje formiraju epitel. Epididimus sekretuje različite molekule koje imaju nutritivnu i zaštitnu ulogu. Među njima su različiti lipidi, proteini i joni. Takođe, pokazano je da endotelne ćelije epididimusa ne sekretuju samo pojedinačne molekule u lumen epididimusa,

nego da apokrinom sekrecijom oslobađaju i egzosome (epididimosome), vezikule koje sadrže stotine različitih proteina. U jednoj studiji na miševima pokazano je da egzosomi iz čitavog epididimusa sadrže ukupno 1640 različitih proteina koji imaju funkcije enzima, nosača, šaperona, strukturnih proteina i druge. Istraživanja na drugim životinjskim vrstama su potvrdila ogromnu raznovrsnost proteina prisutnih u egzosomima. Ispitivanja na miševima su pokazala da su među tim proteinima prisutni proteini koji imaju funkciju receptora za glikoproteine ZP, kao i proteini iz familije ADAM (engl. *a desintegrin and metalloproteinase*) koji imaju karakterističan domen prisutan u metaloproteinazama iz ove familije. Imajući u vidu da su spermatozoidi transkripciono inaktivni, bogatstvo proteina koji se sekretuju u epididimusu omogućava da remodelovanje ćelijske membrane u cilju sazrevanja spermatozoida bude rezultat interakcija sa molekulima u lumenu epididimusa, pored posttranslacijskih modifikacija postojećih proteina. Pored molekula proteina, u egzosomima se nalaze i različite vrste nekodirajućih RNK. Novija istraživanja ukazuju na različite potencijalne uloge ovih RNK uključujući komunikaciju među ćelijama epitela, podršku embriogenezi nakon oplodnje, i epigenetske uticaje. Pokazano je da se promene u ćelijskoj membrani, završno kondenzovanje jedra i redukcija citoplazme dešavaju tokom prolaska spermatozoida kroz glavu i telo epididimusa, dok se u repu epididimusa spermatozoidi magaziniraju. U lumenu epididimusa je kisela sredina (pH je oko 6.4) što je jedan od faktora neophodnih za mirovanje spermatozoida koji su prošli određenu fazu sazrevanja i stekli sposobnost kretanja i fertilizacije. Proces sazrevanja spermatozoida u epididimusu zavisi od stimulišućeg dejstva androgena. Smatra se da androgeni u epididimus stižu putem limfe, kao i iz eferentnih kanalića, a ne putem cirkulacije. U odsustvu ejakulacije, spermatozoidi odlaze kroz ampulu u uretru i zajedno sa urinom izbacuju napolje.

Ejakulirana sperma (ejakulat) se sastoji od spermatozoida i semene tečnosti koja nastaje najvećim delom aktivnošću prostate i semenih kesica. Sastojci semene tečnosti su fruktoza kao izvor energije, inozitol koji obezbeđuje adekvatnu osmolarnost semene tečnosti, limunska kiselina koja vezuje kalcijum i kontroliše brzinu koagulacije sperme nakon ejakulacije, glicerilfosforilholin kao izvor supstrata za metabolizam fosfolipida, kiselna fosfataza koja učestvuje u metabolizmu fosfolipida i drugi. Nakon

koitusa, ejakulat se kod većine vrsta izbacuje u vaginu, mada može i direktno u cerviks ili matericu.

Za pacova i hrčka se smatralo da se ejakulat ubacuje direktno u cerviks, mada postoje radovi koji pokazuju da se deponuje u vaginu, ali da vrlo brzo spermatozoidi ulaze u matericu i posle samo nekoliko minuta mogu da se detektuju u njenom lumenu. Kod svinje morfologija kopulatornog organa obezbeđuje ubacivanje sperme direktno u matericu. Kod mnogih vrsta vrlo brzo po inseminaciji dolazi do koagulacije sperme. Forma koaguluma zavisi od interakcije enzima i supstrata prisutnih u semenoj tečnosti. Tako u slučaju sperme kod čoveka koagulacija nastaje kao rezultat aktivnosti enzima poreklom iz prostate koji katališu konverziju supstrata sličnih fibrinogenu poreklom iz semenih vezikula, kao što su seminogelin i fibronektin, i nastajanje produkata koji izazivaju stvaranje koaguluma. Ovi molekuli se vezuju za zid vagine i na taj način sprečavaju gubitak ejakulata iz vagine. Pored toga, koagulum štiti spermatozoide od kisele sredine vagine (pH – 4.2-5.7). Nakon 20 do 60 minuta aktiviraju se odgovarajuće serin proteaze koje rastvaraju koagulum (likvefakcija). Antigen specifičan za prostatu (engl. *prostate-specific antigen*, PSA) prisutan je u semenoj tečnosti i ima aktivnost serin proteaze koja razlaže koagulum, a smatra se da ima ulogu i u rastvaranju sluzi u cerviksu što olakšava kretanje spermatozoida i njihov ulaz u matericu. Neposredno pre ovulacije, porast estradiola omogućava smanjenje gustine sluzi (mukusa), vlakna se razdvajaju i formira se kanal kroz koji spermatozoidi mogu da uđu u matericu.

Jajovodi imaju ključnu ulogu u uspešnoj fertilizaciji i inicijalnom razvoju ranog embriona (preembriona). Različiti regulatorni procesi kontrolišu ulaz spermatozoida u jajovod kroz utero-tubalni spoj i prolaz do ampule gde se dešava fertilizacija. Postoje podaci o važnosti proteina ADAM3 kao i proteina koji obezbeđuju pravilnu lokalizaciju ADAM3 u membrani spermatozoida. To je šaperon CLGN (engl. *calmegin*) poreklom iz endoplazmatičnog retikuluma koji reguliše pravilnu heterodimerizaciju proteina ADAM i angiotenzin I konvertujućeg enzima (engl. *angiotensin-converting enzyme 1*, ACE I) specifičnog za spermatozoide. Naime, studije na miševima koje su koristile tehnologiju utišavanja gena su pokazale da nedostatak nekog od ovih proteina remeti transport spermatozoida miša kroz utero-tubalni spoj, mada se ne zna koja je funkcija ADAM3 u ovom transportu. Kod

nekih vrsta, utero-tubalni spoj se naizmenično otvara i zatvara i na taj način reguliše ulaz spermatozoida u istmus. Najveći deo spermatozoida koji uđu u jajovod bivaju zarobljeni u istmusu. Kod torbara i insektivora spermatozoidi se zadržavaju u mukoznim kriptama, dok je kod većine sisarskih vrsta zadržavanje spermatozoida u istmusu omogućeno njihovim vezivanjem za površinu epitela jajovoda. U tom procesu veoma važnu ulogu imaju proteini BSP (engl. *binder of sperm*) koji se nalaze na površini ćelijske membrane u glavi spermatozoida, vezani za molekule fosfatidilholina. Proteini BSP1, BSP3, i BSP5 su članovi BSP familije proteina i čine oko 60% od ukupnih proteina u semenoj plazmi bika. U istmusu, proteini BSP se vezuju za aneksine prisutne u apikalnoj membrani epitelnih ćelija jajovoda. Vezivanje spermatozoida za epitel jajovoda na neki način čuva njihovu fertilnost. Naime, pokazano je da spermatozoidi konja vezani za epitel jajovoda imaju nizak nivo unutarćelijskog kalcijuma u poređenju sa slobodno plivajućim spermatozoidima, odnosno da im je kapacitacija odgođena. Kapacitacija je usporena i kod spermatozoida čoveka ukoliko se u *in vitro* uslovima inkubiraju u prisustvu vezikula membrane jajovoda u odnosu na spermatozoide koji se inkubiraju samo u medijumu koji se koristi za indukciju kapacitacije. Homologi proteini nađeni su kod čoveka (BSP Homolog 1, BSPH1) i miša, i pokazano je da se eksprimiraju isključivo u epididimusu, dok se kod bika proizvode u semenim vezikulama. Prema nekim autorima, spermatozoidi u jajovodu žene mogu da se skladište duže vremena, ali ne postoji poseban rezervoar niti je to isključivo rezultat vezivanja za površinu epitela sluznice. Kako sluzokoža (*tunica mucosa*) u jajovodu žene formira veliki broj nabora, oni takođe predstavljaju prepreke za napredovanje spermatozoida prema mestu oplodnje.

Kada dođe do ovulacije, postupno se oslobađaju spermatozoidi iz istmusa. Sekretne proizvode jajovoda, iz folikulske tečnosti ili kompleksa kumulus-jajna ćelija (engl. *cumulus-oocyte complex*, COC) izazivaju oslobađanje spermatozoida i njihovo kretanje do ampule. Najverovatnije dolazi do promena u membrani spermatozoida kao rezultat kapacitacije. Pokazano je da kod spermatozoida bika dolazi do gubitka proteina BSP sa površine membrane, kao i sposobnosti za vezivanje za epitel jajovoda. Hiperaktivacija i asimetrični pokreti biča omogućavaju oslobađanje iz istmusa. Takođe, pokazano je da miševi sa nedostatkom katjonskog kanala za kalcijum na

spermatozoidima tzv. kanala *CatSper* ne mogu da se odvoje od epitela jajovoda. Funkcionalni kanali *CatSper* kontrolišu ulaz jona kalcijuma (videti kasnije) koji stimuliše hiperaktivno stanje. Postupno oslobađanje spermatozoida iz istmusa pomaže da se redukuje broj spermatozoida koji stižu do jajne ćelije, što je jedan od faktora za sprečavanje polispermije. Hiruško uklanjanje istmusa kod svinje, rezultira povećanjem broja spermatozoida koji stižu do ampule, a polispermija se povećava za 30%.

Iz istmusa, spermatozoidi stižu u ampulu. Nakon ovulacije, COC koji čine sekundarna oocita okružena sa ZP i *cumulus oophorus* koji je sastavljen od kumulusnih ćelija i bogatog vanćelijskog matriksa, biva oslobođen iz jajnika zajedno sa folikulskom tečnošću. Prihvataju ga fimbrije, ulazi u početni deo jajovoda (infundibulum) i transportuje se, u roku od 15–20 minuta, do ampule (gornja trećina jajovoda) gde se najčešće dešava fertilizacija. Kretanje COC omogućeno je pokretima cilija trepljastih ćelija u mukoznom sloju jajovoda i kontrakcijama glatke muskulature u zidu jajovoda. Jajovod ima veoma važnu ulogu u zadržavanju jajne ćelije, kako bi se omogućilo vreme da endometrijum postane prijemčiv, a blastocista sposobna za implantaciju. Spermatozoidi hemotaksijom lociraju COC. Kao što je rečeno, hemoatraktanti su poreklom iz folikulske tečnosti i kumulusnih ćelija. U *in vitro* uslovima, spermatozoidi čoveka i zeca se kreću i akumuliraju u gradijentu folikulske tečnosti. Pretpostavlja se da je progesteron koji je prisutan u folikulskoj tečnosti i sekretuje se iz kumulusnih ćelija, hemoatraktant za spermatozoide čoveka i zeca. Pokazano je da tretman anti-progesteronskim supstancama blokira aktivnost medijuma u kome su prethodno inkubirane kumulusne ćelije čoveka.

Kod žene, do oplodjenja mora doći u roku od 24 h nakon ovulacije zato što jajna ćelija može da preživi 24 h. Spermatozoidi imaju duži životni vek od jajne ćelije, obično žive 48 h, ali mogu da prežive i do 5 dana u ženskom reproduktivnom traktu.

## 10.2. KAPACITACIJA SPERMATOZOIDA

Kapacitacija je proces koji omogućava da spermatozoid stekne karakterističnu pokretljivost biča, sposobnost da se veže za ZP, i da dođe do akrozomske reakcije (egzocitoze akrozoma). Kapacitacija je reverzibilna i ako se kapacitirani spermatozoidi inkubiraju u tečnosti koja se nalazi u lumenu epididimusa, ili semenoj plazmi oni će postati dekapacitirani. Pokazano je da je slobodan holesterol glavni inhibitor u semenoj plazmi, a važni su i joni cinka koji blokiraju određene jonske kanale.

Kapacitacija spermatozoida obuhvata: gubitak holesterola i promene drugih lipida što menja sastav i fluidnost ćelijske membrane spermatozoida; povećanje pH citoplazme, povećanje koncentracije jona  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{Ca}^{2+}$ ; aktivaciju signalnog puta ciklični adenzin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP)/protein kinaza A (PKA) i povećanje fosforilacije proteina; stvaranje niskih nivoa reaktivnih kiseoničnih čestica (engl. *reactive oxygen species*, ROS).

### 10.2.1. Promene ćelijske membrane spermatozoida

U eksperimentima *in vitro* je pokazano da je kapacitacija povezana sa izlaskom holesterola iz membrane što povećava njenu fluidnost. Proteini iz semene plazme koji stabilišu membranu spermatozoida, uklanjaju se sa površine membrane tokom kapacitacije. Pokazano je da proteini BSP pored vezivanja za epitel jajovoda, učestvuju i u remodelovanju ćelijske membrane spermatozoida. Naime, ovi proteini stimulišu uklanjanje holesterola i fosfolipida iz membrane spermatozoida. Gubitak molekula glikoproteina menja naelektrisanje membrane, i omogućava promenu u lipidnoj strukturi, posebno gubitak holesterola. Albumini poreklom iz jajovoda takođe doprinose izlasku holesterola iz membrane.

Kapacitacija *in vitro* može da se izazove inkubiranjem u specifičnom medijumu koji sadrži goveđi serum albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA),  $\text{Ca}^{2+}$  i jone  $\text{HCO}_3^-$ . BSA, kao i lipoproteini velike gustine i apolipoproteini predstavljaju kritičnu komponentu za *in vitro* kapacitaciju, jer vezuju holesterol i na taj način ga uklanjaju iz membrane. Takođe je pokazano da proteini BSP interaguju specifično sa heparinom koji se koristi za ka-

pacitaciju spermatozoida bika u *in vitro* uslovima. Holesterol je snažan dekapacitacioni faktor koji stabilizuje ćelijsku membranu spermatozoida. Stoga, uklanjanje holesterola iz membrane destabilizuje membranu. Za izlazak holesterola iz membrane, važnu ulogu imaju i ROS. Pokazano je da oksidacija holesterola stvara produkte koji se lakše vezuju za albumin što olakšava izlazak holesterola iz membrane.

### 10.2.2. Promene u unutarćelijskoj koncentraciji jona i membranski potencijal

Regulacija pH je ključna za aktivnost svake ćelije i kod sisara se obezbeđuje transportom  $H^+$  i  $HCO_3^-$  kroz ćelijsku membranu. Na putu od epididimusa do ampule jajovoda spermatozoide prati različit pH u vanćelijskom prostoru. U lumenu epididimusa pH je oko 6.4–6.8, u semenoj tečnosti čoveka je od 7.2–7.8 što štiti spermatozoide od kisele sredine u vagini (pH oko 4.4), da bi u materici pH bio oko 7.0, a u lumenu jajovoda više od 7.0. Pored promena u koncentraciji  $H^+$  prisutne su promene u koncentraciji  $HCO_3^-$ . U epididimusu je koncentracija daleko manja nego u semenoj plazmi, a koncentracija višestruko raste u jajovodu, posebno u vreme ovulacije. Boravak u alkalnoj sredini, pri povećanoj koncentraciji  $HCO_3^-$  u okruženju, obezbeđuje ulazak ovih jona u ćeliju. Izbacivanje  $H^+$  iz ćelije i ulazak  $HCO_3^-$  doprinosi alkalizaciji citoplazme spermatozoida tokom kapacitacije. Postoje podaci da se smanjenje koncentracije  $H^+$  u citoplazmi obezbeđuje aktivnošću kanala HVCN1 (engl. *hydrogen voltage gated channel 1*) koji je u spermatozoidima čoveka lociran u središnjem delu biča neposredno pored kanala *CatSper*. HVCN1 se aktivira depolarizacijom i alkalizacijom vanćelijskog prostora. Njegovo prisustvo nije potvrđeno kod glodara kod kojih se koncentracija  $H^+$  kontroliše aktivnošću elektroneutralnog izmenjivača koji izbacuje  $H^+$ , a ubacuje  $Na^+$  (engl. *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*, NHE). Prisustvo NHE pokazano je i kod čoveka, ali njegova fiziološka uloga još nije definisana. Izbacivanje protona rezultira brзом alkalizacijom citoplazme.

Joni  $HCO_3^-$  su ključni za proces kapacitacije, jer povećanje njihove koncentracije u citoplazmi spermatozoida aktivira solubilnu adenilil ciklazu (sAC), dolazi do povećanja koncentracije cAMP i aktivacije PKA. U ćelij-

skoj membrani spermatozoida postoje nosači koji ubacuju jone  $\text{HCO}_3^-$  u citoplazmu što povećava pH. Kotransporter koji prenosi  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{Na}^+$  (engl. *sodium bicarbonate cotransporter*, NBC) i izmenjivač koji izbacuje jone  $\text{Cl}^-$  a ubacuje  $\text{HCO}_3^-$  prisutni su u membrani spermatozoida i kandidati su za povećanje koncentracije  $\text{HCO}_3^-$  u citoplazmi. Istraživanja su pokazala da je CFTR (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), nosač koji ubacuje jone  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$ , takođe odgovoran za povećanje koncentracije  $\text{HCO}_3^-$  u citoplazmi, a njegova aktivnost zavisi od fosforilacije sa PKA. Ovaj kanal može da interaguje sa drugim kanalima i nosačima, pa je pokazano da inhibiše transporter koji ubacuje jone  $\text{Na}^+$  u ćeliju (engl. *epithelial sodium channel*, ENaC).

Povećanje unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  rezultat je kako njihovog ulaska iz vanćelijske tečnosti tako delom i oslobađanja  $\text{Ca}^{2+}$  iz unutarćelijskih rezervoara. U spermatozoidima nema razvijenog endoplazmatskog retikuluma. Međutim, postoje vezikularne membrane u vratu spermatozoida gde je pokazano prisustvo rijanodinskog receptora, a u akrozomskoj vezikuli receptora za inozitol trifosfat. U ćelijskoj membrani spermatozoida prisutni su voltažno-zavisni  $\text{Ca}^{2+}$ -kanali, izmenjivač za  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  kao i kanali prisutni samo u membrani spermatozoida tzv. kanali *CatSper*. To su katjonski kanali sa velikim afinitetom za  $\text{Ca}^{2+}$  nalaze se u membrani repa i glave spermatozoida. Aktiviraju se povećanjem unutarćelijskog pH, a kod spermatozoida čoveka i progesteronom u niskim koncentracijama koji deluje kao hemoatraktant iz kumulusnih ćelija. Kanal *CatSper* pokazuje i manju osetljivost na depolarizaciju membrane. Efekat progesterona je vrlo brz, što ukazuje da je u pitanju aktivacija jonskih kanala, a ne receptora spregnutih sa G-proteinom. Prvobitno se nije znalo da li se vezno mesto za progesteron nalazi na samom kanalu, ili na nekom asociranom proteinu. Kasnije je pokazano da progesteron deluje na ove kanale preko membranskog endokanabinoidnog signalnog puta, u koji je uključen protein 2 koji sadrži domen  $\alpha/\beta$  hidrolaze (engl.  *$\alpha/\beta$  hydrolase domain-containing protein 2*, ABHD2). Smatra se da su kanali *CatSper* u membrani repa u stanju mirovanja, jer su inhibisani sa endokanabinoidom 2-arahidonoilglicerolom (2-AG). Nakon vezivanja progesterona, ABHD2 razgrađuje 2-AG i time oslobađa kanale *CatSper* od inhibicije. Važno je da progesteron aktivira ove kanale samo u spermatozoidima čoveka i ma-



kaka, i ne izaziva nikakvo povećanje unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u spermatozoidima miša. Spermatozoidi sa mutiranim kanalima mogu da prođu kroz vanćelijski matriks koji okružuje jajnu ćeliju, ali ne i kroz ZP, usled odsustva hiperpokretljivosti biča. Povećanje unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  izaziva aktivaciju sAC, povećanje cAMP i aktivaciju PKA koja fosforiliše proteine u biču spermatozoida što omogućava hiperaktivaciju. Povećanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  je neophodno i za akrozomsku reakciju koja pretstavlja egzocitozu regulisanu  $\text{Ca}^{2+}$ . U glavi spermatozoida, aktivacija kanala *CatSper* doprinosi ovom događaju.

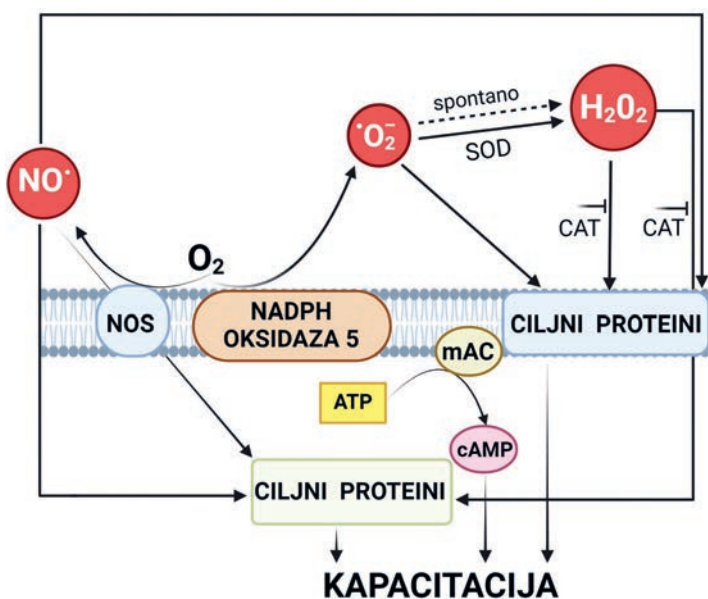
U svakoj ćeliji, aktivnost jonskih kanala, jonskih pumpi i nosača određuje koncentraciju jona sa jedne i druge strane ćelijske membrane i vrednost membranskog potencijala. Hiperpolarizacija membrane tokom kapacitacije pokazana je kod spermatozoida više vrsta, između ostalih, kod miša, govečeta, konja i čoveka. Eksperimenti na spermatozoidima miša su pokazali da hiperpolarizacija membrane prethodi akrozomskoj reakciji. Podaci o vrednosti membranskog potencijala nekapacitiranih spermatozoida pojedinih vrsta su različiti, ali se slažu da je membranski potencijal pre kapacitacije nizak, a da se tokom kapacitacije njegova vrednost u membrani spermatozoida miša povećava oko dva puta. Hiperpolarizacija membrane javlja se nakon povećanja koncentracije cAMP, odnosno aktivacije PKA u spermatozoidima miša i čoveka. Ukoliko se spermatozoidi miša stave u uslove koji izazivaju kapacitaciju uz istovremeno sprečavanje promene membranskog potencijala (metodom nametnute voltaže), dolazi do aktivacije signalnog puta cAMP/PKA i fosforilacije proteina, ali ne dolazi do egzocitoze akrozoma. Ovi rezultati sugerišu da je hiperpolarizacija membrane važna za akrozomsku reakciju. Pretpostavlja se da je hiperpolarizacija membrane rezultat smanjenja provodljivosti membrane za  $\text{Na}^+$ , ili povećanja propustljivosti za  $\text{K}^+$ .

Pokazano je da je u spermatozoidima prisutan veći broj različitih  $\text{K}^+$ -kanala, a u spermatozoidima čoveka posebno se govori o kanalima *KSper* koji se aktiviraju povećanjem unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ . Primena blokatora određenih kanala za  $\text{K}^+$ , sprečava hiperpolarizaciju membrane. Eksperimenti na spermatozoidima čoveka pokazuju da su za početno povećanje unutarćelijske koncentracije  $\text{HCO}_3^-$  odgovorni NBC, što omogućava započinjanje aktivacije signalnog puta cAMP/PKA. Fosforilacija CFTR

omogućava dalje povećanje koncentracije  $\text{HCO}_3^-$ , blokadu ENaC, a to zbog smanjenja propustljivosti za jone  $\text{Na}^+$  takođe doprinosi hiperpolarizaciji membrane.

### 10.2.3. Stvaranje niskih nivoa ROS

Spermatozoidi mnogih vrsta imaju pod određenim uslovima mogućnost da produkuju male količine ROS koji pomažu u procesu kapacitacije kao posrednici u indukciji fosforilacije proteina. Nakon ejakulacije, spermatozoidi u kontaktu sa atmosferskim kiseonikom generišu ROS, kao što je superoksid anjon radikal koji spontano ili katalitičkom aktivnošću SOD prelazi u vodonik-peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), snažan agens kapacitacije. Produkcija ROS je rani događaj u kapacitaciji (sl. 10.2).



**Sl. 10.2** Produkcija reaktivnih kiseoničnih čestica (ROS) tokom kapacitacije. Pretpostavlja se da je u ćelijskoj membrani lokalizovana oksidaza koja produkuje superoksid anjone. U semenoj tečnosti su prisutni superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (CAT) koje obezbeđuju niske koncentracije ROS. Pretpostavlja se da u membrani postoji azot-oksidi sintaza (NOS) koja katalizuje sintezu  $\text{NO}$ ; cAMP – ciklični adenozin-monofosfat, sekundarni glasnik. Ostali detalji u tekstu.

Slika je napravljena u Biorenderu.

NADPH oksidaza 5 je prisutna u membrani spermatozoida, i produkuje superoksid anjon radikal u vanćelijskoj tečnosti pod uplivom agenasa kapacitacije. U prilog tome je da jedinjenje difenil-jodonium (DPI), inhibitor NADPH oksidaza koje su prisutne u neutofilima blokira i produkciju superoksid anjona radikala i kapacitaciju spermatozoida. Superoksid anjon radikali spontano ili katalitičkom aktivnošću SOD dismutuju u  $H_2O_2$  i oba ROS deluju na ciljne proteine u membrani. U membrani spermatozoida je prisutna azot-oksid (NO) sintaza (NOS) koja katališe sintezu NO. On takođe učestvuje u kapacitaciji, jer inkubacija spermatozoida u prisustvu dodavanje inhibitora NOS (L-NAME) blokira ovaj proces. Ciljni molekul za ROS je membranska AC (mAC). Membranska AC sadrži 12 cisteinskih ostataka, od toga osam u katalitičkom centru, pa se pretpostavlja da su oni ciljni domeni za delovanje ROS. cAMP aktivira PKA za koju je pokazano da se aktivira tokom kapacitacije spermatozoida čoveka, miša i bika.

#### 10.2.4. Fosforilacija proteina

Smatra se da je posttranslacijska modifikacija proteina sa tirozinskim ostacima putem fosforilacije vrlo bitan moment u kapacitaciji spermatozoida. Fosforilaciju tirozina (P-Tyr) u spermatozoidima čoveka stimulišu različiti agensi, kao što su BSA, ultrafiltrat folikulske tečnosti, analozi cAMP, a inhibišu je inhibitori PKA, na primer H89, što ukazuje na uključenost PKA u ovaj proces. Imunocitohemijski eksperimenti su pokazali da su P-Tyr prisutni u određenim delovima biča spermatozoida kao i u vratu. Ovi proteini su povezani sa pokretljivošću i hiperaktivacijom. Fosforilacija tirozina je kasniji događaj u kapacitaciji i nije značajna u prva 2 h inkubacije spermatozoida u specifičnom medijumu koji indukuje kapacitaciju. U fosforilaciju su, pored PKA, uključene i mnoge druge protein kinaze: protein kinaza C (PKC), fosfoinozimid-3 kinaze (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K), protein kinaza B (PKB ili AKT), mitogenima aktivirane protein kinaze (MAPK), pri čemu su ROS glavni regulatori aktivnosti. Dodavanje antioksidativnih enzima, SOD i katalaze, ili inhibitora NOS (na primer L-NAME) sprečava fosforilaciju, a dodavanje egzogenih ROS promoviše fosforilaciju tirozinskih ostataka u proteinima. Supstrati za PKA su proteini sa ostacima serina i treonina sa motivom (ARg)-X-X-(Ser/Thr). Fosforila-

cija istih supstrata dešava se i pri delovanju drugih agenasa kapacitacije, kao što su BSA i progesteron, što ukazuje da je fosforilacija proteina sa ostacima tirozina deo kapacitacije, a ne dejstva specifičnih induktora. Kapacitacija je proces koji mora da bude precizno vremenski definisan, jer je kapacitiran spermatozoid u metastabilnom stanju, ima kratak poluživot, i u određenom periodu mora da se sretne sa sekundarnom jajnom ćelijom. Stoga može da se pretpostavi da postoji višestruka kontrola fosforilacije proteina sa tirozinskim ostacima, odnosno da u ovom događaju učestvuje više unutarćelijskih signalnih puteva koji su međusobno povezani.

## 10.3. INTERAKCIJA SPERMATOZOIDA I JAJNE ĆELIJE

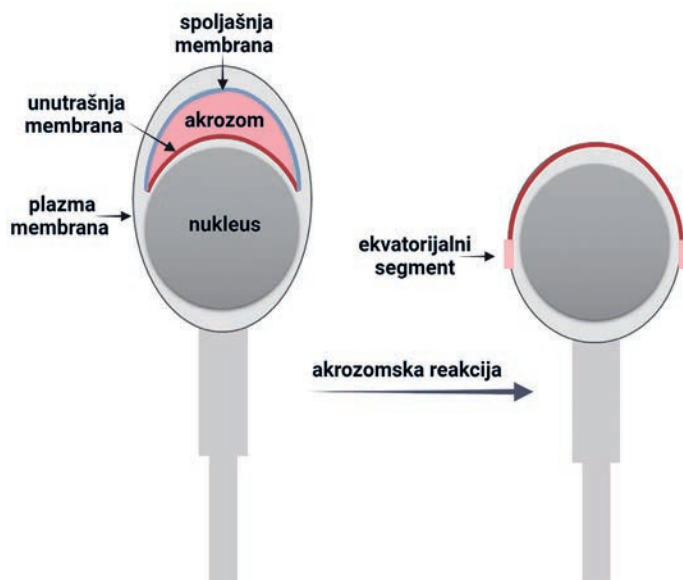
### 10.3.1. Interakcija spermatozoida i kumulusnih ćelija

Ubrzo nakon interakcije sa COC, spermatozoidi prodiru kroz vanćelijski matriks koji je bogat proteinima i glukozaminoglukanima. Pokazano je da jajna ćelija miša oslobođena od kumulusa dejstvom hijaluronidaza može da bude oplodena *in vitro*. Međutim, slojevi kumulusnih ćelija koji okružuju jajnu ćeliju miša važni su za fertilizaciju. Utišavanje gena uključenih u sintezu i stabilizaciju vanćelijskog matriksa blokira fertilizaciju *in vivo*. Za prolaz kroz vanćelijski matriks odgovorni su enzimi sa aktivnošću hijaluronidaze. Prema istraživanjima, ovi enzimi prisutni su na površini membrane spermatozoida, kao što su hijaluronidaza Spam 1 (engl. *sperm adhesion molecule 1*) i hijaluroglukozaminodaza 5 (Hyal 5) koji se nalaze na spermatozoidima miša. Međutim, drugi autori ukazuju da su enzimi sa aktivnošću hijaluronidaze prisutni u akrozomu, pa se postavlja pitanje kako ti enzimi bivaju oslobođeni pri kontaktu sa kumulusnim ćelijama i vanćelijskim matriksom. Pokazano je da jedan broj spermatozoida doživljava akrozomsku reakciju pre vezivanja za ZP, odnosno pri samom kontaktu sa kumulusnim ćelijama. Takvi spermatozoidi se označavaju kao “žrtvovani”. Međutim, ako se enzimi sa aktivnošću hijaluronidaze nalaze u akrozomu, onda bi ti spermatozoidi koji dožive akrozomsku reakciju pri kontaktu sa kumulusnim ćelijama omogućavali put kroz vanćelijski matriks ostalim spermatozoidima. Početni signal za akrozomsku reakciju je povećanje unu-

tarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u glavi spermatozoida. Ovo povećanje  $\text{Ca}^{2+}$  može da izazove veći broj faktora poreklom iz kumulusnih ćelija. Među njima su progesteron i određeni hemokini. U niskom koncentracijskom gradijentu (pM-nM) progesteron deluje kao hemoatraktant za spermatozoide, ali ne izaziva akrozomsku reakciju, dok veće mikromolarne koncentracije izazivaju akrozomsku reakciju. To znači da u kumulusu postoje faktori koji mogu da izazovu akrozomsku reakciju, ali se postavlja pitanje fiziološkog značaja njihovog prisustva za izazivanje akrozomske reakcije.

### 10.3.2. Vezivanje spermatozoida za zonu pelucidu i akrozomska reakcija

Egzocitoza akrozoma dešava se kod kapacitiranih spermatozoida. Akrozom je vezikula koja prepokriva jedro u glavi spermatozoida. Sadrži hidrolitičke enzime neophodne za prolaz spermatozoida kroz ZP. Na akrozomu se razlikuju unutrašnja membrana akrozoma okrenuta prema jedru i spoljna membrana akrozoma okrenuta prema plazma membrani glave spermatozoida (Slika. 10.3).



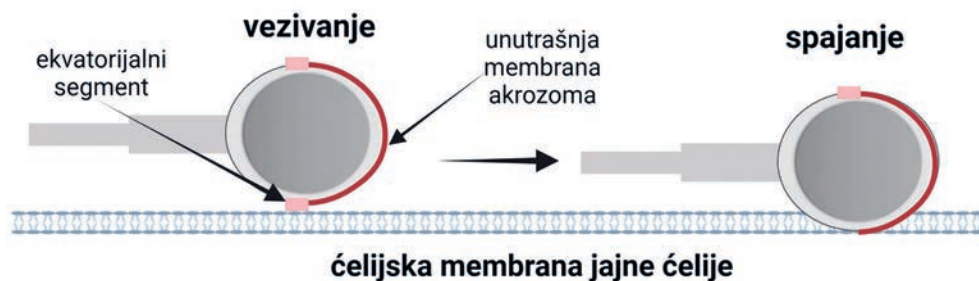
**Sl. 10.3.** Šematski prikaz glave spermatozoida pre i posle akrozomske reakcije.

Slika je napravljena u Biorenderu.

Akrozomska reakcija može da se stimuliše *in vitro* sa rastvorljivom ZP. Kod spermatozoida čoveka, progesteron koji sekretuju kumulusne ćelije može da izazove akrozomsku reakciju. Takođe, kod 20–40% kapacitiranih spermatozoida miša, akrozomska reakcija se stimuliše spontano. ZP igra ključnu ulogu u akrozomskoj reakciji. Danas postoji uverenje da spermatozoidi ne prepoznaju specifičan protein ZP već 3D strukturu koje se formira interakcijom svih proteina koji čine ZP. Postoji više proteina na plazma membrani spermatozoida miša koji su potencijalni receptorni proteini (sper-receptori) za glikoproteine u ZP. Jedan od njih je enzim  $\beta$ 1,4-galaktozil transferaza 1 (GalT 1). Kod miševa sa utišanim genom za GalT 1, kapacitet vezivanja spermatozoida za ZP je smanjen. Drugi potencijalni kandidati su selektin i zonadhezina za koje je pokazano da obezbeđuju selektivnost vezivanja spermatozoida određenih vrsta. U odsustvu zonadhezina, dolazi do promiskuitetnog vezivanja spermatozoida za ZP različitih vrsta.

Tokom akrozomske reakcije javlja se prolazno povećanje ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  u spermatozoid, aktivira se fosfolipaza C (engl. *phospholipase C*, PLC), dolazi do hidrolize fosfatidiliinozitol-4,5-bifosfata (engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP2) na diacilglicerol (DAG) i inozitol-3-fosfat (engl. *inositol 1,4,5-trisphosphate*, IP3). IP3 izaziva oslobađanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz endoplazmatičnog retikuluma, a DAG koji ostaje vezan za membranu aktivira PKC što obezbeđuje fosforilaciju određenih proteina. Ovi događaji izazivaju dalji ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  iz vanćelijskog prostora kroz tzv. TRP (engl. *transient receptor potential*) katjonske kanale. To dovodi do egzocitoze akrozoma. Prilikom akrozomske reakcije događaju se višestruka spajanja ćelijske membrane i spoljne akrozomske membrane, prvo na vrhu, a zatim u ekvatorijalnoj regiji. Kao rezultat akrozomske reakcije, preostali deo plazma membrane u ekvatorijalnoj i postakrozomskoj regiji stiče potencijal za vezivanje i spajanje sa ćelijskom membranom jajne ćelije. Porast  $\text{Ca}^{2+}$  je ključan u akrozomskoj reakciji što je dokazano izostankom reakcije u nedostatku  $\text{Ca}^{2+}$ , kao i stimulacije prevremene egzocitoze akrozoma nakon dodatka ovih jona. Takođe, porast unutarćelijskog pH od 7,1 do 7,5 može da funkcioniše zajedno sa  $\text{Ca}^{2+}$  tokom akrozomske reakcije. Izlaganje unutrašnje akrozomske membrane na kojoj su locirani enzimi (na primer, akrozin) prema ZP omogućava digestiju i formiranje “puta” kroz ZP koji kod spermatozoida

čoveka traje oko 5–20 minuta. Kao rezultat akrozomske reakcije, preostali deo plazma membrane u ekvatorijalnoj i postakrozomskoj regiji stiče potencijal za vezivanje i spajanje sa ćelijskom membranom jajne ćelije. To se dešava kada spermatozoid uđe u perivitelinski prostor (slika 10.4).



**Sl. 10.4.** Šematski prikaz vezivanja i spajanja membrane spermatozoida sa ćelijskom membranom jajne ćelije. Slika je napravljena u Biorenderu.

### 10.3.3. Vezivanje spermatozoida za ćelijsku membranu jajne ćelije i spajanje membrana

Nakon penetracije ZP, spermatozoid se postavlja tangencijalno u odnosu na površinu ćelijske membrane jajne ćelije gde mikrovile jajne ćelije obavijaju glavu spermatozoida. Zatim dolazi do povezivanja membrana spermatozoida i jajne ćelije preko specifičnih molekula prisutnih u ćelijskim membranama, a zatim do spajanja membrana i endocitoze nukleusa, središnjeg dela i dela repa spermatozoida u citoplazmu jajne ćelije. Vezivanje i spajanje uključuju interakciju između specifičnih proteina u ćelijskoj membrani jajne ćelije i u ćelijskoj membrani spermatozoida. Literatura o potencijalnim kandidatima za ove događaje je obimna i postoji veliki broj proteina za koje je pretpostavljeno da su od značaja za vezivanje ili spajanje spermatozoida i jajne ćelije, međutim za sada ni za jedan od njih nema konačne potvrde o učešću u spajanju dveju membrana.

Novija literatura ukazuje na više proteina na spermatozoidima koji su od značaja za vezivanje ili spajanje spermatozoida i jajne ćelije. Prvi od njih su proteini IZUMO1 (engl. *izumo sperm-egg fusion 1*) koji su otkri-

veni 2005 godine. Locirani su na unutrašnjoj akrozomskoj membrani i u ekvatorijalnom segmentu membrane spermatozoida. Miševi sa utišanim genom *Izumo1* su sterilni što ukazuje na značaj ovih proteina za proces fertilizacije. Međutim, najnovija istraživanja ukazuju da IZUMO1 nije dovoljan da pokrene spajanje membrana ili da posreduje u adheziji ovih ćelija. Nedavno, u periodu 2020–2021. godine, pored IZUMO1, otkriveni su i proteini za koje se pretpostavlja da imaju važnu ulogu za vezivanje ili spajanje spermatozoida i jajne ćelije. To su akrozom-asocirani protein 6 na spermatozoidima (engl. *sperm acrosome-associated protein 6*, SPACA6), membranski protein koji utiče na oplodnju (engl. *fertilization-influencing membrane protein*, FIMP), protein neophodan za fuziju 1 (engl. *sperm-ooocyte fusion-required 1*, SOF1), transmembranski protein 95 (engl. *transmembrane protein 95*, TMEM95) i protein koji sadrži DC-STAMP domen 1 i 2 (engl. *DC-STAMP domain-containing 1/2*, DCST1 i DCST2). Spermatozoidi miša kojima nedostaje bilo koji od ovih proteina ne uspevaju da se povežu sa ćelijskom membranom jajne ćelije, uprkos njihovoj normalnoj morfologiji, pokretljivosti i sposobnosti da izazovu akrozomsku reakciju. Od ovih proteina, IZUMO1, SPACA6, TMEM95, DCST1 i DCST2 su transmembranski glikoproteini koji su lokalizovani na akrozomalnoj membrani i translociraju se na površinu spermatozoida tokom akrozomske reakcije.

Raniji rezultati ukazivali su na proteine ADAM (fertilin i ciritestin) kao potencijalne kandidate u procesu vezivanja i spajanja, međutim kasnije je pokazano da ovi proteini učestvuju u ovim procesima, ali da nisu neophodni za interakciju gameta. Fertilin (ADAM) je membranski-vezan heterodimer sastavljen od  $\alpha$  (ADAM 1) i  $\beta$  (ADAM 2) subjedinice i raspoređen je po čitavoj glavi spermatozoida dok su spermatozoidi u testisu. Dolaskom spermatozoida u epididimus dolazi do njegovog premeštanje u posteriorni deo glave, deo membrane koji je odgovoran za spajanje sa ćelijskom membranom jajne ćelije. Proteini ADAM eksprimiraju se na površini ćelije nakon odgovarajućeg proteolitičkog procesovanja. Ciritestin (ADAM 3) pronađen je u testisima miša i majmuna. Iako je danas mišljenje da proteini ADAM nisu ključni molekuli koji direktno učestvuju u spajanju membrana, blokada funkcije ovih kao i proteina koji obezbeđuju njihovo procesovanje i ugradnju u membranu, ukazuje na njihovu važnost za proces fertilizacije.



Na ćelijskoj membrani jajne ćelije se nalaze integrini, proteini tetraspanin kao i glikofosfatidilinozitol (engl. *glycophosphatidylinositol*, GPI)-usidreni proteini. Integrini su identifikovani kao molekuli koji interaguju sa proteinima ADAM na membrani spermatozoida. Integrini su široko rasprostranjeni površinski receptorni proteini koji omogućavaju vezivanje ćelije sa proteinima vanćelijskog matriksa. Uključeni su u brojne aspekte adhezije ćelija, kao i prenosa informacija. Integrini su heterodimeri sastavljeni od  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice od kojih svaka ima transmembranski domen, dugačak vanćelijski kraj sa kojim se vezuje za proteine iz vanćelijskog matriksa, kao i unutarćelijski kraj koji je povezan sa citoskeletom ćelije, tako da funkcionišu kao transmembranski integratori. Kao i za proteine ADAM, novija literatura ukazuje da integrini učestvuju, ali nisu ključni za interakciju između gameta.

Proteini tetraspanin su značajni u ćelijskoj adheziji, pokretljivosti, a pokazano je da formiraju mikrodomene u membrani koji su bogati tetraspaninom i na taj način obezbeđuju interakciju molekula proteina. Polipeptidni lanac proteina tetraspanina četiri puta prolazi kroz ćelijsku membranu i formira dve vanćelijske petlje, malu i veliku, koja sadrži više disulfidnih veza. Smatra se da deluju kao proteini skele. Proteini tetraspanin CD9 su prisutni u ćelijskoj membrani jajne ćelije miša, a CD81 prisutni su u ćelijskoj membrani jajne ćelije čoveka i miša. Za oba proteina, CD9 i CD81 pokazano je da su neophodni za spajanje gameta zbog toga što regulišu arhitekturu membrane. Protein CD151 karakterističan je za ćelijsku membranu jajne ćelije čoveka. Jedan od najviše proučavanih tetraspanin proteina je CD9. Ženke miševa kojima nedostaje CD9 pokazuju smanjenu plodnost, a nedostatak oba proteina CD9/CD81, dovodi do sterilnosti. Sterilnost se javlja kao posledica poremećaja u vezivanju/spajanju jajne ćelije i spermatozoida, budući da spermatozoidi divljeg tipa mogu da prodru u ZP, ali nisu u stanju da se vežu sa jajnim ćelijama kojima nedostaju CD9/CD81. U eksperimentima gde je ispitivana adhezija između jajne ćelije i spermatozoida, CD9 se akumulira na mestu interakcije spermatozoida i jajne ćelije pre spajanja i istovremeno se kolokalizuje sa IZUMO1. CD9 je takođe uključen u biogenezu i organizaciju mikrovila, o čemu svedoči zapažanje da su mikrovili poremećeni u jajnim ćelijama sa nedostatkom CD9. Pretpostavlja se da su mikrovili idealno mesto za spajanje, s obzirom

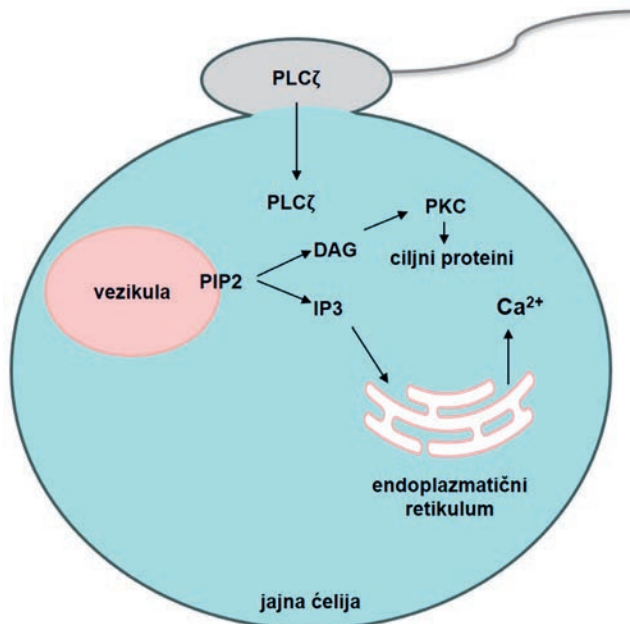
na to da njihov mali radijus zakrivljenosti može da podstakne preuređenje membrane i da njihova veza sa aktinskim citoskeletom može da olakša proces spajanja. Iako je identifikovano nekoliko potencijalnih partnera za interakciju sa CD9 do sada nije precizno utvrđen nijedan koji je važan za oplodnju.

Još pre dve decenije, pretpostavljena je uloga GPI-usidrenih proteina u interakciji spermatozoida i jajne ćelije, međutim tek 2014. godine utvrđeno je da ovaj protein predstavlja receptor za IZUMO1 protein iz membrane spermatozoida i da je prisutan kod više sisarskih vrsta. Dobio je naziv JUNO, prema rimskoj boginji plodnosti. Jajne ćelije miša kojima nedostaje protein JUNO nisu u stanju da se vežu i spoje sa spermatozoidom, što ženke ovakvih miševa čini sterilnim. Uprkos širokoj ekspresiji proteina JUNO u više tkiva, miševi sa nedostatkom ovih proteina ne pokazuju nikakve druge nedostatke osim steriliteta, što ukazuje da je njihova suštinska uloga u vezivanju spermatozoida i jajne ćelije kroz interakciju sa IZUMO1. Važno je da su proteini IZUMO1 i JUNO konzervisani kod sisara. Do danas, IZUMO1 i JUNO su jedini poznati par proteina koji je u interakciji neophodan za oplodnju u polnim ćelijama čoveka. Uprkos tome što su verovatno najbolje proučavani, precizna funkcija ovog proteinskog para tokom procesa vezivanja i spajanja spermatozoida i jajne ćelije još uvek nije rasvetljena. IZUMO1 se nalazi i na unutrašnjoj i na spoljašnjoj akrozomalnoj membrani pre akrozomske reakcije. Nakon akrozomske reakcije, IZUMO1 se premešta u ekvatorijalni segment površine spermatozoida, region koji je u interakciji sa ćelijskom membranom jajne ćelije. Stoga, akrozomska reakcija stimuliše premeštanje IZUMO1, čineći spermatozoide sposobnim da interaguju sa JUNO na površini jajne ćelije i na taj način ih čine kompetentnim za spajanje. Pored toga, kod miševa kojima nedostaje CD9, protein JUNO više nije ograničen na region mikrovila gde dolazi do vezivanja i spajanja sa spermatozoidom. Međutim, ostaje nejasno u kojoj meri pogrešna lokalizacija JUNO ili bilo koji drugi poremećaj uočen u jajnim ćelijama miša sa nedostatkom CD9 doprinosi neplodnosti.

## 10.4. DOGAĐAJI NAKON SPAJANJA MEMBRANE SPERMATOZOIDA I JAJNE ČELIJE

### 10.4.1. Indukcija kalcijumovih talasa u jajnoj ćeliji

Nakon spajanja membrana spermatozoida i jajne ćelije, spermatozoid u citoplazmu jajne ćelije unosi PLC zeta (PLC  $\zeta$ ). PLC $\zeta$  katališe hidrolizu PIP2 lociranog u membrani citoplazmatskih vezikula, a ne u ćelijskoj membrani. Ove vezikule sadrže i vezno mesto za PLC $\zeta$ . Dolazi do oslobađanja sekundarnog glasnika IP3 i DAG (sl. 10.5). IP3 aktivira oslobađanje Ca<sup>2+</sup> iz endoplazmatičnog retikuluma, dok DAG aktivira PKC koja stimuliše fosforilaciju proteina neophodnih za razvoj preembriona. Povećanje unutarćelijske koncentracije Ca<sup>2+</sup> omogućava završetak druge mejotičke deobe jajne ćelije, kortikalnu reakciju i fosforilaciju ciljnih proteina.



**Sl. 10.5.** Povećanje unutarćelijske koncentracije Ca<sup>2+</sup> u sekundarnoj jajnoj ćeliji.

Spermatozoid isporučuje PLC $\zeta$  koji difunduje kroz jajnu ćeliju i vezuje se za unutarćelijske vezikule koje sadrže vezno mesto za PLC $\zeta$ , kao i PIP2. PIP2 se nalazi i u plazma membrani, međutim ne postoje vezna mesta za PLC $\zeta$  tako da ona hidrolizuje PIP2 iz membrana vezikula. PLC $\zeta$  katališe hidrolizu PIP2 na IP3 i DAG, a IP3 izaziva oslobađanje Ca<sup>2+</sup> iz endoplazmatičnog retikuluma. Slika je napravljena u Biorenderu.

Kod jajne ćelije morskog ježa i ribica medaka događa se talas povećanja unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , dok se kod jajnih ćelija različitih vrsta sisara javljaju oscilacije u intervalima koji su karakteristični za vrstu, a oscilacije traju i po nekoliko sati. Prvi talas povećanja unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  javlja se na mestu spajanja membrane spermatozoida sa ćelijskom membranom jajne ćelije. Posle desetak minuta PLC $\zeta$  difunduje dalje od mesta ulaska i aktivira više regiona. Stoga su naredni talasi  $\text{Ca}^{2+}$  brži i obuhvataju veći deo jajne ćelije. Pokazano je i da PLC $\zeta$  igra ključnu ulogu u plodnosti kod čoveka, te da nedostatak ili relativno odsustvo aktivne PLC $\zeta$  u spermatozoidima kod čoveka vodi do niskih stopa oplodnje nakon unutarцитoplazmatske injekcije spermatozoida (engl. *intracytoplasmic sperm injection*, ICSI).

#### 10.4.2. Blokada polispermije

Blokada polispermije dešava se na nivou jajne ćelije, ali i na nivou jajovoda. Na nivou jajne ćelije blokada polispermije može da se dešava na nivou ZP i/ili na nivou ćelijske membrane jajne ćelije, u zavisnosti od vrste. Kod nekih vrsta kao što su npr. zec i krtica, postoji visoko efikasan blok na nivou ćelijske membrane jajne ćelije dok je blokada polispermije na nivou ZP slabije izražena. Kod drugih vrsta kao što su pas, ovca i poljska voluharica, blokada polispermije efikasnija je na nivou ZP. Kod čoveka, miša, pacova, mačke, tvora, svinje i krave blokada polispermije dešava se i na nivou ZP i na nivou ćelijske membrane jajne ćelije. Međutim, iako za sprečavanje polispermije postoje brojna mesta i mehanizmi (o čemu će više biti u nastavku teksta), polispermija se i dalje javlja kod sisara. Analize dobijene nakon spontanih abortusa pokazuju da se triploidija detektuje kod oko 30% aneuploidnih preembriona kod čoveka i da je triploidija rezultat oplodnje sa dva spermatozoida u 60–80% slučajeva. U postupku *in vitro* fertilizacije kod čoveka procenat polispermije iznosi od 5 do 10%, a slična stopa sreće se i kod životinjskih vrsta, npr. krave, ovce, glodara, dok u slučaju jajne ćelije svinje kod *in vitro* fertilizacije taj procenat može da dostigne i 50%.

Spajanje spermatozoida i jajne ćelije pokreće oslobađanje sadržaja kortikalnih granula nakon tzv. kortikalne reakcije i blokade polispermije.

Kod većine sisara, primarno mesto blokade polispermije nakon egzocitoze kortikalnih granula je ZP. Molekulski mehanizmi koji vode kortikalnoj reakciji podrazumevaju unutarćelijsko povećanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u jajnoj ćeliji i aktiviranje enzima kalamodulin kinaze II (engl. *calmodulin-dependent kinase II*, CaMKII), koja se aktivira vezivanjem kompleksa kalcijum-kalmodulin. CaMKII je važna za mobilizaciju kortikalnih granula u blizinu ćelijske membrane jajne ćelije nakon čega dolazi do egzocitoze i oslobađanja njihovog sadržaja u perivitelinski prostor. Najveći talas egzocitoze jeste u roku od 15 minuta od ulaska spermatozoida u jajnu ćeliju. Kortikalne granule sadrže hidrolitičke enzime i polisaharidaze koji difunduju kroz perivitelinski prostor i na ZP razlažu specifične molekule sprečavajući tako, dalje vezivanje i penetraciju spermatozoida (blok zona ili reakcija zone). Proteaze razgrađuju ZP2, a  $\beta$ -heksozaminidaza B hidrolizuje oligosaharidne komponente na glikoproteinu ZP3. Na taj način se uklanja mogućnost vezivanja nekog drugog spermatozoida za ZP koja menja osobine, zadržava i postaje neprobojna za spermatozoide.

Promene na ćelijskoj membrani jajne ćelije dešavaju se brže u odnosu na promene ZP. Promene na ćelijskoj membrani jajne ćelije sprečavaju da nakon oplodnje sa jednim spermatozoidom, dođe do spajanja membrane jajne ćelije sa membranom drugog spermatozoida. Kod jajne ćelije morskog ježa nakon oplodnje dolazi do depolarizacije membrane, što je označeno kao brzi blok polispermije. Međutim, brza depolarizacija membrane se ne javlja u oplodjenim jajnim ćelijama sisara, ali tačna osnova blokade na nivou ćelijske membrane jajne ćelije nije do kraja istražena. Uočeno je da oplodjena jajna ćelija miša gubi proteine JUNO, koji funkcioniše kao vezujući partner za proteine IZUMO1 spermatozoida. Do promena u karakteristikama ćelijske membrane jajne ćelije ne dolazi kada se spermatozoid direktno ubaci u jajnu ćeliju u postupku *in vitro* oplodnje (ICSI), što ukazuje da u promeni učestvuju i komponente iz membrane spermatozoida. Međutim, nije poznato da li druge promene na membrani jajne ćelije doprinose blokadi polispermije na nivou ćelijske membrane jajne ćelije ili je gubitak proteina JUNO sam dovoljan za membranski blok. Potencijalni medijator blokade polispermije na nivou ćelijske membrane jajne ćelije može biti i promena u aktinsko-miozinskom kompleksu citoskeleta kao što se dešava kod jajne ćelije miša.

Pored toga, blokada polispermije dešava se i na nivou jajovoda. Jajovod doprinosi blokadi polispermije na dva načina: prvo utero-tubalni spoj predstavlja fizičku barijeru za prolaz velikog broja spermatozoida u istmus, a takođe postupno oslobađanje spermatozoida iz istmusa sprečava da velik broj stigne istovremeno do mesta oplodnje.

### 10.4.3. Završetak II mejotičke deobe

Posle završetka mejoze I, jajna ćelija zastaje u metafazi mejoze II zahvaljujući citostatičkom faktoru (CSF). U ovom zastoju jajna ćelija održava visok nivo/aktivnost faktora promocije sazrevanja (engl. *maturation-promoting factor*, MPF) tako što inhibiše aktivnost APC/C (engl. *anaphase-promoting complex/cyclosome*) čime sprečava proteolitičku degradaciju ciklina B (engl. *cycline B*, CyB). Kako se ostvaruje aktivnost CSF? Postoje studije koje ukazuju da je glavna komponenta CSF protein Emi2 poznat i kao Erp1 (engl. *early mitotic inhibitor 1-related protein 1*) koji stabilizuje APC/C. APC/C je ubikvitin ligaza koja obeležava ciljane proteine ćelijskog ciklusa, kao što je CyB, za degradaciju pomoću 26S proteazoma. CSF stabilizacijom APC/C onemogućava ubikvitinaciju i degradaciju CyB. Ulazak spermatozoida u jajnu ćeliju (sekundarnu oocitu) indukuje nastavak ćelijskog ciklusa i završetak mejoze II. Signal za izlazak iz zastoja u metafazi mejoze II jeste povećanje unutarćelijske koncentracije  $Ca^{2+}$ . Postoje rezultati koji ukazuju da se povećanjem unutarćelijske koncentracije  $Ca^{2+}$  aktivira CaMKII koja fosforiliše Emi2, što otvara mesto za kinazu Plx1 (engl. *polo-like kinase*) i fosforilaciju Emi2 sa Plx1. Na taj način Emi2 biva označen za degradaciju. Gubitak Emi2 dovodi do inhibicije CSF, što omogućava aktivnost kompleksa APC/C i degradaciju CyB. Destabilizacija MPF kompleksa i gubitak aktivnosti omogućava završetak mejoze II i formiranje ženskog pronukleusa, kao i izbacivanje drugog polarnog telašca. Produženo trajanje zastoja u metafazi mejoze II vodi smanjenju kvaliteta jajne ćelije što se označava kao „starenje jajne ćelije“.

U slučaju jajne ćelije čoveka, 4–7 h nakon spajanja, dva seta haploidnih hromozoma formiraju pronukleuse, sintetiše se DNK, centriola spermatozoida se deli, odlazi na suprotne strane i formira deobno vreteno. Pronukleusi se približavaju, membrane jedra fragmentišu i postavljanjem

haploidnih garnitura u ekvatorijalnu ravan nastaje diploidni zigot. Čelija je spremna za prvu mitotičku deobu 18–24 h nakon spajanja, i dolazi do nastanka 2-ćelijskog stadijuma. Četvrtog dana razvića zametak se sastoji od 12–16 ili od 32 blastomere, i naziva se morula i u tom stadijumu ulazi u matericu. Petog dana razvića nastaje blastocista koja se sastoji od embrioblasta (unutrašnja ćelijska masa od koje će se razviti embrion, amnion, alantois i žumančana kesa) i trofoblasta (spoljašnja ćelijska masa od koje će se razviti plodov deo posteljice i horion). Preembrionalni period razvića kod čoveka traje od oplodjenja do kraja druge nedelje, i plod se u ovom periodu naziva preembrion. Period od prvog do šestog dana razvića označen je kao preimplantacioni, a od sedmog do četrnaestog dana kao postimplantacioni.

## **10.5. PRIPREMA MATERICE ZA IMPLANTACIJU PREEMBRIONA**

Rezultati istraživanja na eksperimentalnim i domaćim životinjama ukazali su da je za normalnu implantaciju neophodna sinhronizacija u razvoju blastociste i endometrijuma. Blastocista mora da dostigne određeni stupanj kompetencije da bi moglo da dođe do implantacije, odnosno mora da poseduje specifičan set eksprimiranih signalnih molekula, receptornih i adhezionih molekula koji obezbeđuju adekvatnu komunikaciju sa endometrijumom materice.

### **10.5.1. Sekretorni produkti materice**

Endometrijum produkuje veliki broj proteina koji funkcionišu kao autokrini, parakrini i jukstakrini faktori za endometrijum i preembrion. Značajno povećanje sekretne aktivnosti javlja se tokom lutealne faze i rane trudnoće. Mnogi od tih proteina se ekspresuju pod direktnim, ili indirektnim uticajem progesterona. Jedan od tih proteina je i glikodelin najzastupljeniji sekretni produkt endometrijalnih žlezda i decidue. Postoji više izoformi glikodelina. Glikodelin A je glavni protein čiju sintezu reguliše progesteron i koji se luči u lumen. Koncentracija se značajno povećava šest dana nakon ovulacije. Ako dođe do oplodnje nivo glikodelina rapidno raste

posle implantacije dostižući maksimum između 8. i 10. nedelje trudnoće. Njegova funkcija u odnosu na endometrijum, implantaciju i trudnoću je malo poznata. Glikodelin A je snažan inhibitor vezivanja spermatozoida i jajne ćelije, a pretpostavlja se da može imati ulogu imunomodulatora zbog svoje sposobnosti da supresuje NK ćelije (eng. *natural killer cells*). Pokazalo se da glikodelin A ograničava invaziju trofoblasta *in vitro* suzbijanjem proizvodnje matriks metaloproteinaza (MMP) od strane citotrofoblasta. Odsustvo glikodelina A tokom oplodnje i njegovo pojavljivanje za vreme implantacije i placencije su u skladu sa ovim predloženim funkcijama.

Insulinu-sličan faktor rasta vezujući protein (engl. *insulin-like growth factor binding protein-1*, IGFBP-1) je glavni sekretni produkt decidualnih ćelija. Smanjuje vezivanje faktora rasta sličnih insulinu (engl. *insulin-like growth factor*, IGF) 1 i 2 za svoje receptore. Trofoblast koji penetrira u stromu eksprimira IGF-2, pa IGFBP-1 kao glavni sekretni produkt decidualnih ćelija kontroliše invaziju i proliferaciju trofoblasta tokom implantacije vezujući i smanjujući aktivnosti IGF-2. Prevelika ekspresija IGFBP-1 može da smanji normalnu invaziju trofoblasta i receptivnost uterusa što može da dovede do neuspešne implantacije. Eksprimiranje gena za IGFBP-1 u stromi reguliše progesteron, kao i IGF, insulin, relaksin i drugi faktori rasta. IGF-1 i 2 i insulin smanjuju oslobađanje IGFBP-1 iz decidualnih ćelija, dok relaksin povećava njegovu sekreciju. Transkripcioni faktor FOXO1, prolaktin i IGFBP-1 podstiču decidualizaciju i pretpostavlja se da su uključeni u diferencijaciju strome posredovanu progesteronom. Sekrecija IGFBP-1 se povećava dejstvom humanog horionskog gonadotropina (engl. *human chorionic gonadotropin*, hCG). Budući da IGFBP-1 sadži specifičan motiv (Arg-Gly-Asp, RGD) koji prepoznaju površinski integrini, pretpostavlja se da pored uklanjanja IGF-2 omogućava i vezivanje sa integrinima.

Osteopontin (OPN) je član posebne familije proteina (SIBLING familija). Svaki protein u ovoj familiji sadrži sekvencu Arg-Gly-Asp i ima vezno mesto za površinske integrine ( $\alpha\beta3$ ). Takođe ima vezno mesto za protein CD44 koji spada u adhezione molekule vanćelijskog matriksa i učestvuje u interakcijama ćelija-ćelija i ćelija-vanćelijski matriks. Predstavlja i receptor za hijaluronsku kiselinu, molekul visoko prisutan u vanćelijskom matriksu. OPN je glikozirani fosfoprotein koji sekretuje glandularni epitel



i njegovo eksprimiranje reguliše progesteron. Služi kao “sendvič” ligand između integrina i CD44 na površini embriona i endometrijuma.

Prolaktin se produkuje u endometrijumu i miometrijumu. Nivo serumskog prolaktina se ne menja tokom menstrualnog ciklusa, ali raste tokom prvog trimestra dostižući pik koncentracije između 15. i 20. nedelje trudnoće. Prolaktin je, kao i IGFBP-1, marker decidualizacije ćelija strome kod čoveka. Pretpostavlja se da različiti faktori mogu da regulišu eksprimiranje prolaktina, kao što su grelin, IGFBP-1, leptin. Uloga prolaktina u decidualizaciji nije definisana, ali je, kod miševa kojima je utišan receptor za prolaktin, pokazano da je decidualizacija poremećena, i da je smanjeno eksprimiranje ciklooksigenaze (engl. *cyclooxygenase*, COX) 1 i 2, PPAR $\delta$  (engl. *peroxisome proliferator-activating receptor*), faktora rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i njihovih receptora. Moglo bi da se pretpostavi da prolaktin preko aktivacije svojih receptora u jajnicima, indukuje sekreciju progesterona, i da je to ključni efekat prolaktina, a ne direktno dejstvo na decidualizaciju strome. Tokom trudnoće, prolaktin akumuliran u amniotskoj tečnosti ima ulogu u osmoregulaciji i razvoju pluća fetusa.

Veliki broj faktora rasta i citokina uključen je u promene endometrijuma. U endometrijumu i decidui kod čoveka eksprimiraju se članovi iz familije transformišućih faktora rasta (engl. *transforming growth factor*, TGF), familije epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF) i drugi. Za više faktora je pokazano da imaju regulatornu ulogu u eksprimiranju proteina vanćelijskog matriksa, njihovih receptora (integrina, kadherina) i enzima, MMP, što takođe utiče na ćelijski rast, diferencijaciju i remodelovanje. Iz familije TGF u endometrijumu se sreću TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2 i TGF $\beta$ -3, a njihovo eksprimiranje je prostorno i vremenski određeno. U sekretnoj fazi, TGF $\beta$  inhibišu MMP u stromi i epitelu stimulišući ekspresiju tkivnog inhibitora MMP (engl. *tissue inhibitor of metalloprotease-1*, TIMP). Progesteron delujući preko TGF $\beta$  održava integritet endometrijuma tokom trudnoće. U odsustvu trudnoće, pad u koncentraciji progesterona zbog regresije žutog tela, oslobađa MMP inhibicije, što dovodi do programirane razgradnje vanćelijskog matriksa za kojom sledi menstrualno krvarenje. TGF $\beta$ -1 i TGF $\beta$ -2 se nalaze na graničnoj površini između embriona i endometrijuma i imaju višestruku ulogu tokom prijanjanja embriona i

njegove invazije u stromu. U trudnoći, TGF $\beta$  je najzastupljeniji u prvom trimestru. Potentni je faktor koji inhibiše funkciju imunskog sistema i koji možda sprečava imuni odgovor majke na implantirani preembrion, blokiranjem hemotaksije i aktivnosti makrofaga i T-limfocita. Druga grupa proteina iz ove familije su aktivini koji su prisutni u velikoj koncentraciji u endometrijumu. Aktivin  $\beta$  ( $\beta$ A i  $\beta$ B) se sreće u glandularnom epitelu sa pikom ekspresije u sekretnoj fazi. Aktivin A pojačava produkciju leukemija-inhibirajući faktor (LIF) i potencira prepisivanje i aktivnost MMP tokom decidualizacije što je ključno za decidualizaciju kod pacova i primata.

### 10.5.2. Prozor implantacije, receptivnost materice

Za normalno odvijanje procesa implantacije važno je da dođe do sinhronizacije u razvoju embriona i endometrijuma. Uspešna implantacija zavisi od obostrane komunikacije između blastociste i materice u okviru ograničenog vremena označenog kao prozor implantacije. Receptivnost materice se definiše kao period sazrevanja endometrijuma tokom koga trofoektoderm blastociste može da se veže za epitel endometrijuma, a zatim da nastavi penetraciju u stromu endometrijuma. Osetljivost materice na implantaciju klasifikuje se u tri faze: prereceptivna, receptivna i nereceptivna (refraktorna). Aktivna blastocista izaziva adekvatan odgovor materice, ali samo u određenom intervalu tokom estrusnog ili menstrualnog ciklusa kada je endometrijum u receptivnoj fazi, odnosno za vreme prozora implantacije.

Hormoni jajnika, progesteron i estradiol, glavni su hormoni koji omogućavaju receptivnost materice. Progesteron je esencijalan za implantaciju i trudnoću, dok je uloga estrogena specifična za vrstu. Na primer, kod miša i pacova progesteron i estradiol poreklom iz jajnika ključni su za implantaciju, dok kod svinje, zamorca, zeca i hrčka umesto estradiola poreklom iz jajnika, učestvuje estradiol poreklom od preembriona. Kod čoveka za sada nije definisano da li je estradiol poreklom iz jajnika ili iz blastociste ključan za implantaciju. Međutim, postoje klinički podaci koji ukazuju da kod pacijenata u postupku vantelesne oplodnje visok nivo estradiola u serumu ( $> 3000$  pg/ml) na dan primene hCG kao posledica prevelikog od-

govora (engl. *high responders*) na stimulaciju jajnika sa FSH i hCG, može da bude poguban za receptivnost materice, bez obzira na broj folikula jajnika i nivo progesterona u serumu. Kod ovakvih pacijenata registruje se veći porast estradiola u serumu tokom preimplantacionog perioda u poređenju sa pacijentima koji normalno odgovaraju na stimulaciju jajnika. Smanjenje nivoa estrogena tokom pre-implantacionog perioda primenom protokola stimulacije jajnika sa manjim dozama FSH, poboljšava se procenat uspešne implantacije i trudnoće kod ovih pacijenata. Takođe, estradiol pri koncentracijama  $\geq 10 \mu\text{M}$  ima negativan efekat na adheziju embriona za odgovarajuću podlogu u *in vitro* kulturi.

Kod miša i pacova promene u nivou progesterona i estrogena iz jajnika regulišu proliferaciju i diferencijaciju endometrijuma dovodeći endometrijum materice u receptivno stanje za prihvatanje blastociste. Na primer, prvog dana trudnoće (dan kada se u vagini zatekne koagulisana sperma) epitel materice, pod uplivom estrogena izlučenih pre ovulacije, doživljava intenzivnu proliferaciju koja se nastavlja u drugom danu. Od trećeg dana raste nivo progesterona iz žutog tela, a ujutro četvrtog dana kada se materica još nalazi u prereceptivnom stanju, dolazi do porasta estrogena koji su ključni za ulazak materice u receptivno stanje. Ako se ženki miša uklone jajnici, tokom prva 2–3 dana nakon oplodnje, a nivo progesterona održava dnevnim unošenjem pomoću injekcija, blastocista ulazi u matericu normalno, ali umesto da nastavi proces implantacije ostaje slobodna i miruje u lumenu materice. Međutim, ako se takvoj ženki primeni jedna injekcija estradiola dolazi do aktivacije blastociste i implantacije. Pokazano je da su za dejstvo progesterona i estrogena važni ER $\alpha$  i progesteronski receptor (PR) A.

Estradiol obezbeđuje proliferaciju epitela delujući na ER $\alpha$  u stromi i indukujući eksprimiranje određenih faktora rasta kao što su insulin-sličan faktor rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1), EGF, TGF $\alpha$ . Diferencijacija epitela pod uplivom estrogena zahteva aktivaciju ER $\alpha$  u epitelu i stromi i izaziva produkciju laktoferina i glikoproteina MUC1. Aktivacija PR u stromi inhibiše proliferativni efekat estrogena na nivou epitela preko transkripcionog faktora COUP-TF II. Imunofilin FK506 vezujući protein-4 (FKBP52) ima funkciju košaperona i neophodan je za adekvatnu aktivnost PR. Progesteron indukuje aktivaciju transkripcionog faktora HOXA10 koji

omogućuje eksprimiranje FKBP52. Transkripcijski faktor HAND 2 obezbeđuje proliferativni efekat progesterone na stromu.

Pod uplivom progesterona i estradiola dolazi do strukturnih i funkcionalnih promena u epitelu endometrija koji se u preceptivnom stanju karakteriše velikim površinskim naelektrisanjem, dugačkim mikrovilima i debelim glikokaliksom. Dolazi do gubitka površinskog naelektrisanja i skraćivanja mikrovila na membrani apikalnih ćelija i pojave velikih apikalnih protruzija, pinipoda, koje apsorbuju tečnost iz lumena materice. Kod glodara se smanjuje eksprimiranje glikoproteina MUC1 koji se nalazi na apikalnoj membrani epitelnih ćelija i koji predstavlja anti-adhezioni molekul. Pokazano je da u materici kod čoveka eksprimiranje MUC1 ostaje na visokom nivou i tokom receptivne faze, a da preembrion parakrinim faktorima indukuje lokalno uklanjanje MUC1 na mestu implantacije pre uspešnog vezivanja za epitel materice. Takođe, citokini koji se sekretuju od strane trofoblasta i epitela materice su bitni za njenu transformaciju u receptivno stanje. Nakon pričvršćivanja blastociste, dolazi do apoptoze epitelijalnih ćelija endometrija koje okružuju prodiruću blastocistu, što omogućava da signalni molekuli koje produkuje blastocista stignu do stromalnih ćelija. Izostanak apoptoze ovih ćelija remeti implantaciju.

### 10.5.3. Decidualizacija endometrija

Kod ženki pacova i miša, tokom kasne lutealne faze estrusnog ciklusa, prisustvo blastociste inicira morfološke, biohemijske i funkcionalne promene ćelija strome endometrija i njihovu transformaciju u decidualne. Kod žene, proces decidualizacije (tzv. predecidualizacija) započinje sredinom lutealne faze menstrualnog ciklusa tokom perioda receptivnosti uterusa bez obzira na odsustvo ili prisustvo blastociste, ali postaje mnogo izraženiji ukoliko treba da dođe do implantacije.

Ćelije strome oko krvnih sudova počinju da se diferenciraju u velike okrugle višejedarne decidualne ćelije sa puno poliribozoma i hrapavim endoplazmatičnim retikulumom, što ukazuje na sintezu proteina. Sa implantacijom blastociste, decidualizacija se širi kroz stromu i zahvata čitav endometrijum. Biohemijske promene u decidualnim ćelijama podrazumevaju sintezu komponenti vanćelijskog matriksa (laminin i fibronektin), hor-

mona i peptida, kao što su prolaktin, kortikotropni hormon-oslobađajući hormon (engl. corticotropin releasing factor, CRF), IGFBP-1, citokina, kao što je LIF, faktora rasta, MMP itd. Takođe, decidualne ćelije akumuliraju glikogen, lipide i proteine koji služe kao hranljivi molekuli za rast embriona, dok ne dođe do potpunog razvoja placente. U *in vivo* studijama, primena FSH, LH, hCG, TSH stimuliše produkciju prolaktina, pojačava decidualizaciju i relaksaciju miometrijuma. Receptori za LH/hCG su prisutni u jajovodima, miometrijumu i endometrijumu. Imaju nešto drugačiju strukturu i njihovom aktivacijom ne dolazi do sinteze cAMP, nego se uključuju signalni putevi MAPK, ili se aktivira sinteza prostaglandina. *In vitro*, hCG inhibiše apoptozu ćelija strome, stimuliše decidualizaciju što se ispoljava povećanjem prepisivanja IGFBP-1 i COX-2. Aktivacija receptora za LH/hCG u miometrijumu izaziva relaksaciju mišića. Regulatori decidualizacije su prvenstveno steroidi iz jajnika, cAMP, ali i drugi faktori.

## 10.6. IMPLANTACIJA

Implantacija je veoma kompleksan proces koji je pod dominantnom kontrolom hormona jajnika, kao i citokina, faktora rasta i njihovih receptora. Nakon ovulacije, progesteron iz žutog tela transformiše proliferativni endometrijum u sekretornu strukturu i priprema ga za implantaciju blastociste. U odgovarajućem endokrinom miljeu, blastocista će da interaguje sa epitelom endometrijuma i da penetrira u stromu. Implantacija može da se podeli u odvojene etape vremenski usklađene sa promenama koje su zavisne od steroida i koje se događaju u endometrijumu. Implantacija blastociste započinje 6–7 dana nakon oplodnje, odnosno između 20. do 24. dana ciklusa.

### 10.6.1. Transport preembriona u matericu

Kod najvećeg broja sisara sa posteljicom, kumulusne ćelije počinju da se razdvajaju ubrzo nakon fertilizacije, dok ZP ostaje očuvana. Oplodena jajna ćelija ostaje u nivou spoja ampula-istmus pre nego što nastavi transport ka materici. Transport preembriona kroz jajovod može da se razlikuje od transporta neoplođene jajne ćelije. Na primer, kod kobile neoplođena

jajna ćelija ostaje u jajovodu nekoliko estrusnih ciklusa, dok preembrion ulazi u matericu 5–6 dana nakon ovulacije. Pokazano je da preembrion kobile sekretuje prostaglandin  $E_2$  koji deluje na jajovod i ubrzava transport u matericu. Epidemiološke studije ukazuju da duvanski dim ima uticaj na transport preembriona kroz jajovod i da povećava rizik od ektopične trudnoće kod žena. Na *in vitro* modelu preparata jajovoda izolovanog iz ženke hrčka pokazano je da pikomolarne i nanomolarne koncentracije nekih od sastojaka duvanskog dima smanjuju prihvatanje jajne ćelije, pokretljivost cilija kao i kontrakcije glatkih mišića u zidu jajovoda.

### 10.6.2. Faze i tipovi implantacije

Implantacija ima tri faze: apozicija ili adplantacija je početno nestabilno prihvatanje blastociste na površinu endometrijuma; adhezija ili prihvatanje blastociste predstavlja stabilnu fazu kontakta sa endometrijumom, dok se invazija endometrijuma, odnosno usađivanje u endometrijum označava kao treća faza implantacije. Kod domaćih životinja koje se karakterišu neinvazivnom centričnom implantacijom, ova treća faza izostaje. Po ulasku u matericu, preembrion se pozicionira na mesto implantacije koje je karakteristično za vrstu. Slobodna blastocista hrani se sekretima materice, a dužina preimplantacionog perioda zavisi od tipa implantacije.

Kod neinvazivne implantacije koja se označava i kao centrična, epitel endometrijuma ostaje očuvan. Ovaj tip implantacije se sreće kod domaćih životinja, krave, konja, ovce, svinje, koze. Kod ovih vrsta, preimplantacioni period je produžen i dolazi do značajnog uvećanja površine blastociste u odnosu na zapreminu. Na primer, blastocista svinje u početku ima sferičan oblik dijametra 2 mm šestog dana trudnoće, a povećava se na 100  $\mu$ m dvanaestog dana trudnoće. Ovaj rast se odnosi najvećim delom na ekstraembrionalno tkivo. Formira se velika površina preko koje se vrši razmena metabolita sa mlekom materice, sekretom bogatim hranljivim materijama, što omogućava adekvatnu ishranu preembriona. Ova ogromna površina ekstraembrionalnog trofoblasta dozvoljava i mnogo širi dodir sa epitelom endometrijuma, pa ne dolazi do njegovog narušavanja.

Kod invazivne implantacije, proliferacija i diferencijacija trofoblasta dešava se od trenutka uspostavljanja kontakta između trofoblasta i en-

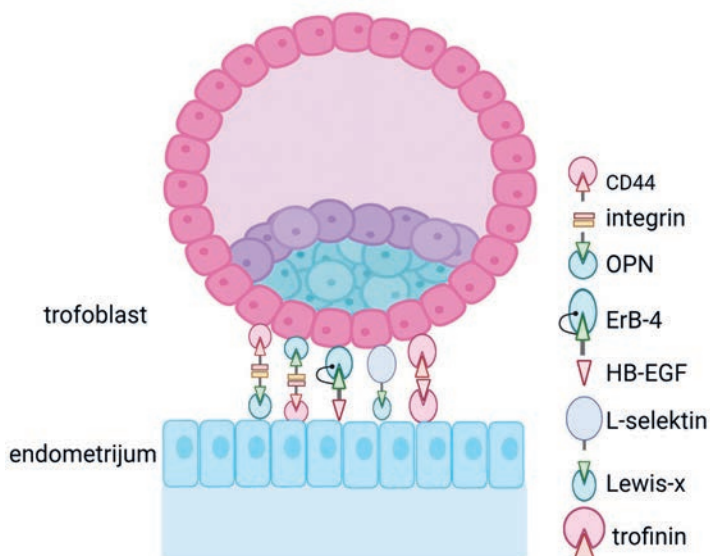
dometrijuma, pri čemu se formiraju sinciciotrofoblast – spoljašnji sloj višejedarne citoplazme, i unutrašnji sloj kubičnih ćelija citotrofoblast. Sinciciotrofoblast svojim enzimima razgrađuje decidualne ćelije i iz njih obezbeđuje hranljive materije za ishranu preembriona. Vrste kod kojih preembrion ulazi duboko u stromu, a površina epitela u procesu obnavljanja prepokriva preembrion označava se kao intersticiyelna implantacija (npr. implantacija kod čoveka, šimpanze i morskog praseta). Kod drugih vrsta, preembrion delimično ulazi u stromu i to je tzv. ekscentrična implantacija (npr. kod Rhesus majmuna, kuje, mačke i pacova). Prema nekim autorima, kuja ima neinvazivnu, centričnu implantaciju.

### 10.6.3. Interakcije između blastociste i endometrijuma

Ispitivanja apozicija miše blastociste u *in vitro* uslovima ukazala su na značaj adhezionog molekula L-selektina na površini trofoblasta. L-selektin je poznat i kao molekul koji obezbeđuje vezivanje leukocita za endotel krvnih sudova. Ovakvo prisustvo na površini trofoblasta olakšava adheziju blastociste na mesto invazije. Nakon inicijalne apozicije blastociste u proces se uključuju integrini koji su važni za stabilnu adheziju, migraciju i invaziju blastociste. Integrini su prisutni i na površini trofoektoderma i endometrijuma. Kod miša, pacova i svinje trofoektoderm sekretuje hCG koji supresuje antiadhezioni faktor MUC1 koji je lociran na epitelu endometrijuma na mestu invazije. Ekspresija MUC1 je povećana u prerceptivnoj fazi. Pretpostavlja se da preembrion čoveka produkuje enzim koji lokalno na mestu implantacije cepa ugljenohidratni lanac MUC1. Uklanjanje MUC1 omogućava otkrivanje oligosaharidnih molekula na površini epitela i vezivanje L-selektina.

Na sl. 10.6 su prikazani luminalni površinski proteini materice koji bi mogli da interaguju sa komplementarnim proteinima na površini trofoblasta. Postoje eksperimentalne potvrde za svaku od pretpostavljenih interakcija. Svaki od prikazanih proteina bi mogao da ima specifičnu funkciju u signalingu ili vezivanju tokom inicijalne faze implantacije. Ekspimiranje velikog glikoproteina MUC1 se smanjuje na mestu apozicije. Prikazani proteinski molekuli trofinin, integrini, CD44, L-selektin, faktor rasta sličan EGF koji vezuje heparin (engl. *heparin-binding EGF-like growth*

*factor*, HB-EGF) verovatno imaju ulogu u inicijalnoj adheziji blastociste. Trofinina ima i na trofoblastu i na endometriju. OPN se nalazi između CD44 i integrina. CD44 je površinski glikoprotein uključen u interakcije među ćelijama, a takođe je i receptor za hijaluronsku kiselinu. HB-EGF i njegovi receptori eksprimirani su na površini endometrija i površini blastociste (glodari, čovek). L-selektin je adhezioni molekul iz familije selektina, a ekspresuje se na luminalnom i glandularnom epitelu.



**Sl. 10.6.** Površinski proteini na luminalnom epitelu endometrija koji mogu da interaguju sa komplementarnim proteinima na površini embriona (humani model).

CD44 – površinski glikoprotein uključen u ćelija-ćelija interakcije, receptor za hijaluronsku kiselinu; OPN – osteopontin;  $\alpha v \beta 3$  – površinski integrin; HB-EGF – faktor rasta sličan EGF koji vezuje heparin; ErbB-4 – receptor za HB-EGF; Lewis-x – tetrasaharid Sialyl Lewis<sup>x</sup>; L-selektin – adhezioni molekul iz familije selektina; trofinin – adhezioni membranski protein. Ostali detalji u tekstu.

Slika je napravljena u Biorenderu.

Ispitivanja komunikacije između blastociste i endometrija u *in vitro* uslovima ukazala su na značaj određenih molekula produkovanih od strane endometrija i blastociste koji omogućavaju uspešnu komunikaciju i implantaciju kod miša. Na dejstvo estradiola, epitel materice (endometrijalne žlezde) odgovara sekretujući citokin LIF. Mutacije u genu



za LIF onemogućavaju implantaciju kod mišica i kod žena. Receptori za LIF se povećano eksprimiraju u epitelu i stromi endometrija u vreme implantacije. LIF deluje na endometrijum tako što povećava receptivnost epitela za prijanjanje blastociste. Kod žena se nivo LIF u materici povećava 7. dana nakon ovulacije, a dostiže maksimum 5 dana kasnije. Dokazano je da je nivo LIF u materici žena sa ponovljenim neuspelim implantacijama smanjen u odnosu na žene sa uspešnom trudnoćom. Poremećaj u produkciji LIF je jedan od mogućih uzroka ponovljenih ranih pobačaja kod žena. Kod ženki miševa sa nedostatkom LIF ne dolazi do eksprimiranja enzima COX-2 u stromi i HB-EGF u epitelu na mestu implantacije.

Pokazano je kod mišica da je LIF bitan za sintezu nekoliko članova EGF familije u epitelu endometrija. Jedan od prvih koji se pojavljuje je HB-EGF. Čelije trofoblasta ekspresuju receptore za EGF (kod miševa su označeni kao ErbB1-4, a kod čoveka HER1-4) i heparin-sulfat proteoglikan (HSPG), za koje se vezuje HB-EGF. HB-EGF se eksprimira kao transmembranska forma (HB-EGF<sub>TM</sub>) koja obradom daje solubilnu formu i predstavlja rani marker komunikacije između blastociste i materice. U vreme eksprimiranja HB-EGF<sub>TM</sub> blastocista se nalazi vrlo blizu epitela endometrija. Ova blizina omogućuje da HB-EGF<sub>TM</sub> stupi u interakciju sa svojim receptorima (HER1/ErbB1 i HER4/ErbB4) na blastocisti. Pretpostavlja se da bi ova jukstrakrina interakcija između HB-EGF<sub>TM</sub> mogla da služi kao receptor-ligand par u prijanjanju blastociste za endometrijum, pri čemu bi solubilne forme HB-EGF interferirale sa ovakvim povezivanjem. Vezivanje HB-EGF za receptore indukuje fosforilaciju receptora i aktivaciju signalnog puta MAPK. To je praćeno razlaganjem ZP, adhezijom i invazijom trofoblasta. Izlaganje mišje blastociste inhibitorima HSPG onemogućava adheziju blastociste, što potvrđuje njegovu ulogu kao receptora za HB-EGF. Značajnu ulogu u implantaciji pored HB-EGF imaju i drugi faktori koji pripadaju EGF familiji proteina, kao što su EGF, amfregulin, betacelulin, epiregulin, TGF $\alpha$  i neuregulini koji se eksprimiraju u endometriju materice.

U trećoj fazi invazivne implantacije postoje procesi koji su slični proinflammatornoj reakciji. Stoga je rani marker implantacije povećanje vaskularne permeabilnosti na mestu vezivanja blastociste. U tome značajnu ulogu imaju prostanoide. Enzimi COX-1 i COX-2 katališu sintezu prostaglandina, tromboksana i prostaciklina. Pretpostavlja se da su za implantaciju važni

prostaciklin  $I_2$  ( $PGI_2$ ) koji aktivira  $PPAR\delta$  koji se eksprimira u ćelijama strome i predstavlja nuklearni receptor i transkripcioni faktor.

Pored prostaglandina, i drugi lipidni molekuli učestvuju u procesu implantacije. Ukazano je na značaj anandamida, derivata arahidonske kiseline (arahidoniletanolamin), liganda za kanabiodne receptore. Ovi receptori ( $CB1-R$  i  $CB2-R$ ) ekspresuju se u preembrionu od dvoćelijskog stadijuma i u reproduktivnom traktu. U malim koncentracijama anandamid ubrzava diferencijaciju trofoblasta, dok u velikim koncentracijama inhibiše. Pretpostavlja se da učestvuje u sinhronizaciji razvoja preembriona. Sličan efekat imaju i egzogeni kanabinoidi.

Važnu ulogu u procesu implantacije, decidualizacije kao i kasnijeg formiranja placente ima proces angiogeneze (formiranja novih krvnih sudova) i remodelovanje tkiva i vanćelijskog matriksa. U remodelovanju, važnu ulogu imaju MMP i inhibitori MMP. Proces angiogeneze kontroliše veliki broj faktora, među kojima posebnu ulogu ima VEGF. Pored VEGF, značajnu ulogu ima i faktor indukovano hipoksijom (engl. *hypoxia inducible factor*, HIF). U proces angiogeneze i vaskularne permeabilnosti uključeni su i prostaglandini.

#### 10.6.4. Odgođena implantacija (dijapauza)

Odgođena implantacija se dešava kada blastocista ostane zaustavljena u lumenu materice sa zastojeom u rastu i metaboličkoj aktivnosti. Skoro 100 sisarskih vrsta ima odgođenu implantaciju. Postoje dva tipa odgođene implantacije: fakultativna i obavezna. Fakultativna se javlja, na primer, kod glodara. Kod ženke pacova koja doji mladunčad iz prethodnog okota dolazi do odgađanja implantacije, jer sisanje blokira endogeni estradiol koji je neophodan za uspostavljanje receptivnosti materice. Odgođena implantacija može da bude kod glodara i kada nema dovoljno hrane, vode ili u drugim stresnim uslovima, a u cilju obezbeđenja boljih uslova za preživljavanje mladunčadi. Obavezno odlaganje implantacije javlja se kod mrkog medveda, lasice, srne. Na primer, kod srne dijapauza traje nekoliko meseci. Parenje se dešava u julu/avgustu kada je ishrana dobra, a dijapauza traje do januara kada je implantacije blastociste. To obezbeđuje rađanje mladih u maju/junu kada ima dosta hrane.

## 10.7. LITERATURA

- Aitken RJ and Nixon B (2013) Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod* 19:785–793.
- Cha J, Dey SK and Lin HJ. (2007) Embryo implantation: U: Plant T and Zeleznik A, ur., Knobil & Neill's Physiology of Reproduction, 4. izdanje, Elsevier, 1697–1739.
- Deneke VE, Pauli A. (2021) The Fertilization Enigma: How Sperm and Egg Fuse. *Annu Rev Cell Dev Biol* 37:391–414.
- Evans, JP. (2020) Preventing polyspermy in mammalian eggs – contributions of the membrane block and other mechanisms. *Mol Reprod Dev.* 87:341– 349.
- Florman HM and Fissore RA. Fertilization in mammals. U: Plant T i Zeleznik ur., A Knobil i Neill's Physiology of Reproduction, 4. izdanje, Elsevier, 149–196.
- Ikawa M, Inoue N, Benhanm AM and Okabe M (2010) Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* 120:984–994.
- Johnson MH. (2013) Essential reproduction, poglavlje 12: Initiating pregnancy, (2007)7. izdanje, John Wiley & Sons, 206–224.
- Johnson MH. (2013) Essential reproduction, poglavlje 10: Sperm and eggs, 7. izdanje. John Wiley & Sons, 175–188.
- Lessey BA and Young SL. (2019) The structure, function and evaluation of the female reproductive tract. U: JF Strauss i RL Barbieri, ur., Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology 8. izdanje, Elsevier, 206–247.
- O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C (2006) Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events. *Fee Radic Biol Med* 41:528–540.
- Pinto FM, Odriozola A, Candenas L, Subiran N (2023) The role of sperm membrane potential and ion channels in regulating sperm function. *Int J Mol Sci* 24: article 6995, 1–26.
- Puga Molina LC, Luqui GM, Balestrini PA, Marin-Briggiler CI, Romarowski A, Buffone MG (2018) Molecular basis of human sperm capacitation. *Frontiers Cell develop Biol* 6:72.
- Rahban R, Nef S. (2020) CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 518:110951.
- Ritagliati C, Baro Graf C, Stival C, Krapf D (2018) regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mech Dev* 154:33–43.
- Suarez SS (2015) Gamete and Zygote Transport: U: Plant T i Zeleznik A, ur., Knobil & Neill's Physiology of Reproduction, 4. izdanje, Elsevier, 197–232.
- Swann K. (2022) Sperm factors and egg activation: PLCzeta as the sperm factor that activates eggs: 20 years on. *Reproduction*.164(1):E1–E4.

- Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H. (2021) Kisspeptin neurons and estrogen-estrogen receptor  $\alpha$  signaling: unraveling the mystery of steroid feedback system regulating mammalian reproduction. *Int J Mol Sci* 22:9229.
- Wang H and Dey SK (2006) Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Rev Genet* 7:185–199.
- Zhang S, Kong S, Lu J, Wang Q, Chen Y, Wang W, Wang B and Wang H (2013) Deciphering the molecular basis of uterine receptivity. *Mol Reprod Dev* 80:8–21.

**Stevan Milatović**  
**Dragan Stajić**

---

# **11.** **TRUDNOĆA,** **POROĐAJ,** **LAKTACIJA**

---



## 11.1. TRUDNOĆA

Trudnoća (graviditet, gestacija) predstavlja stanje žene tokom kojeg se jedan ili više plodova razvija unutar materice (uterusa). Nastaje kada se oplodena jajna ćelija implantira u prethodno hormonski i strukturalno pripremljen endometrijum. Trudnoća kod čoveka može nastati u sklopu polnog čina (*coitus-a*) ili pomoću metoda asistiranih reproduktivnih tehnologija. Sa kliničkog aspekta trudnoća se može završiti živorođenjem, mrtvorođenjem, spontanim pobačajem ili indukovanim pobačajem. U proseku traje 280 dana (10 lunarnih meseci, 40 nedelja) posmatrano u odnosu na prvi dan poslednje menstruacije, te se to trajanje opisuje kao gestacijska starost trudnoće. Konceptijsku starost trudnoće karakteriše kraće trajanje za u proseku dve nedelje od gestacijske starosti. Tačan momenat koncepcije u spontano nastaloj trudnoći je teško otkriti, te se taj entitet koristi kod asistiranih reproduktivnih tehnologija gde je to egzaktno. Žena koja je po prvi put trudna nazivamo prvorotkom (*primigravida*), dok ženu koja je više puta rađala nazivamo višertokom (*multigravida*). Trudnoće kod kojih se u materici razvija više od jednog ploda nazivamo višeplođnim trudnoćama, uglavnom se u praksi viđamo blizanačke, ređe troplodne trudnoće. Blizanačke trudnoće se javljaju u približno 1–1,5% svih trudnoća, sa većom stopom ukoliko se primenjuju asistirane metode reprodukcije.

Razvoj ploda nakon implantacije zahteva progesteronsku podršku što se ostvaruje produženim trajanjem žutog tela. Uspostavljanje trudnoće, pretpostavlja da ona bude prepoznata od strane majke. Izraz „maternal recognition of pregnancy“ (Roger Short, 1969) označava proces u kome preembrion signalizira svoje prisustvo majci i to rezultira izostankom luteolize. Hormoni ploda deluju na matericu u parakrinom maniru u cilju uspostavljanja i održavanja trudnoće. Kod najvećeg broja sisara, produkcija progesterona od strane žutog tela je neophodna za uspešnu trudnoću. Progesteron deluje na matericu i omogućava ostvarenje funkcija koje su bitne za rani embrionalni razvoj, implantaciju i razvoj posteljice. Progesteron je važan i kasnije tokom trudnoće za normalan razvoj fetusa i poste-

ljice. Produženo funkcionisanje žutog tela, odnosno gravidno žuto telo, je karakteristika trudnoće kod vrsta kod kojih trajanje trudnoće prevazilazi dužinu normalnog estrusnog ili menstrualnog ciklusa, kao što su domaće životinje, laboratorijski glodari i čovek.

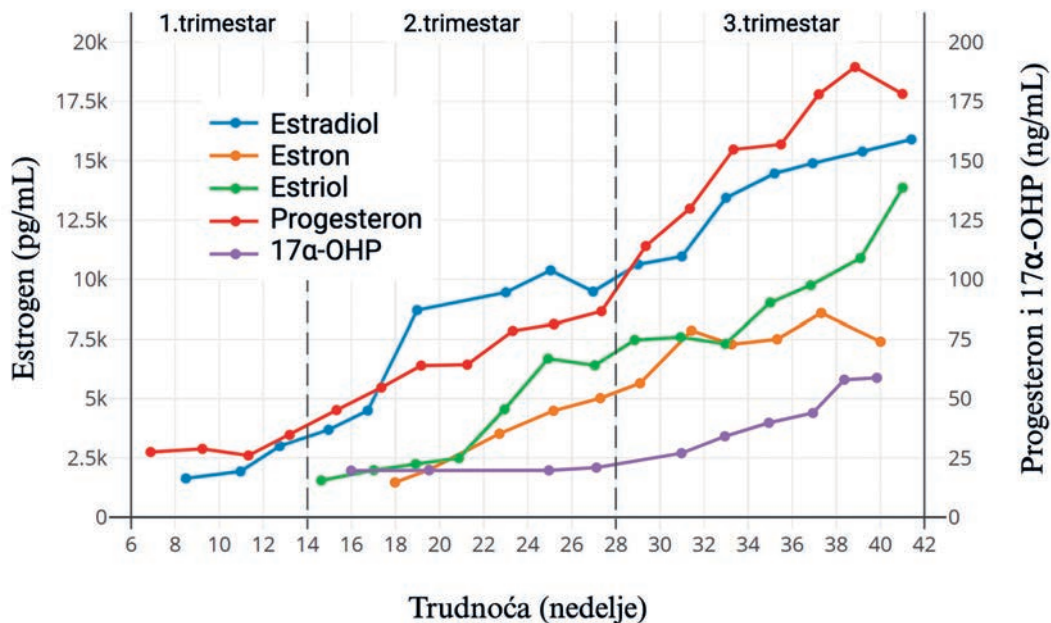
### 11.1.1. Steroidni hormoni i fetoplacentalna jedinica

Blastocista čoveka produžava život žutog tela lučenjem humanog horionskog gonadotropina (engl. *human chorionic gonadotropin*, hCG) koji sintetiše sinciotrofoblast 6–7 dana nakon oplodnje. Progesteron auto-krinom povratnom spregom takođe produžava funkcionalnost žutog tela, a i sinteza relaksina u žutom telu predstavlja podršku trudnoći. Kod svinja, krave i ovce nema produkcije hCG tokom preimplantacionog perioda.

U odnosu na produkciju steroidnih hormona u trudnoći, treba uzeti u obzir međusobnu povezanost fetusa, posteljice i majke u produkciji velikih količina progesterona i estrogena, i produkciju steroidnih hormona unutar samog fetusa. Međusobna zavisnost između fetusa, posteljice i majke u pogledu sinteze steroidnih hormona vodi formiranju fetoplacentalne jedinice. Posteljica je nekompletan organ u pogledu sinteze steroidnih hormona, a prekursore za sintezu progesterona i estradiola dobija uglavnom od majke i fetusa.

U prvih 7 nedelja trudnoće produkcija progesterona u žutom telu je neophodna za početno održavanje trudnoće, da bi nakon toga produkcija ovog steroidnog hormona u posteljici dostigla potreban nivo za dalje održavanje trudnoće. Žuto telo produkuje progesteron do 10. nedelje trudnoće. U luteinskoj fazi ciklusa u kome se dogodila oplodnja, nivo progesterona dostiže određene vrednosti koje se održavaju sve do 10. nedelje kada posteljica postaje glavni izvor progesterona. Nakon toga, nivo progesterona u serumu majke raste i pred kraj trudnoće produkcija u posteljici iznosi oko 250 mg/dan, a u serumu nivo dostiže 100–200 ng/ml. Koncentracija progesterona u amnionskoj tečnosti je najveća između 10. i 20. nedelje trudnoće, a koncentracija u miometriju je oko 2–3 puta veća u odnosu na nivo u serumu majke. Na sl. 11.1 prikazani su nivoi progesterona i estrogena tokom trudnoće.

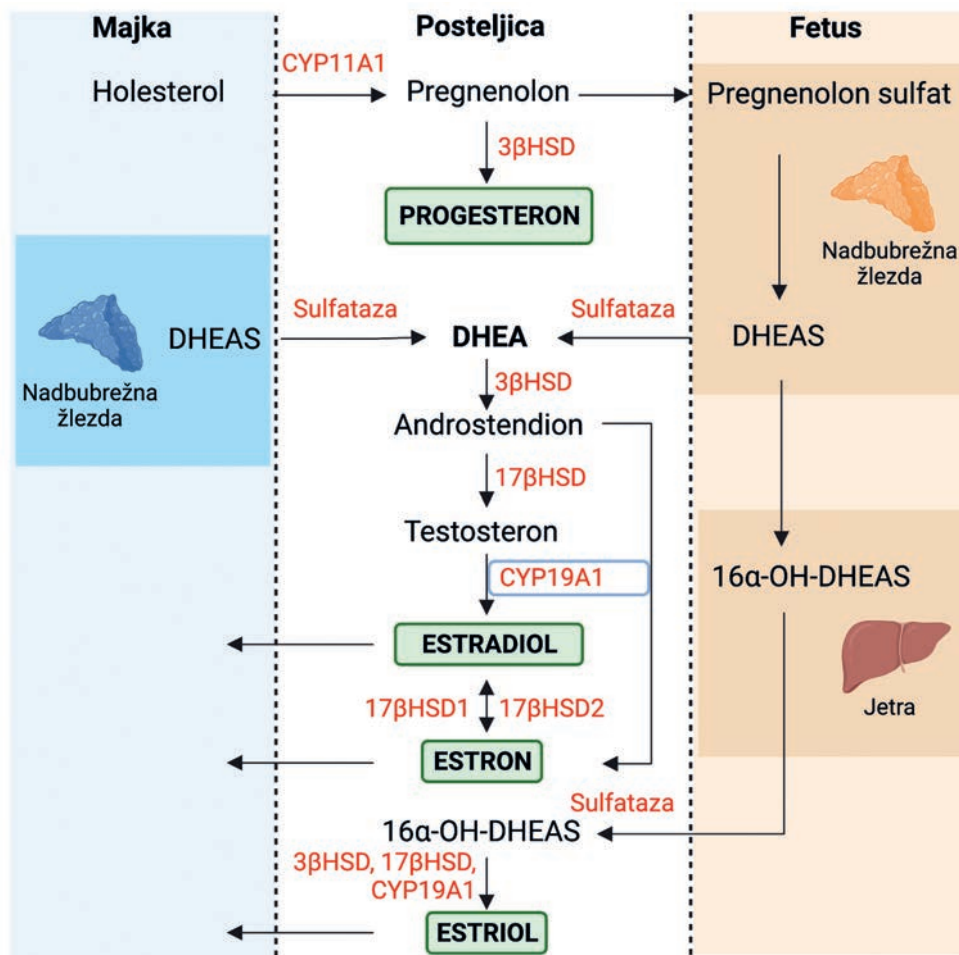




**Sl. 11.1** Nivoi steroidnih hormona u serumu majke tokom trudnoće.

Preuzeto sa [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Estrogen\\_and\\_progesterone\\_levels\\_during\\_pregnancy\\_in\\_women.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Estrogen_and_progesterone_levels_during_pregnancy_in_women.png), modifikovano u Biorenderu

Holesterol neophodan za sintezu progesterona potiče od majke i ćelije trofoblasta ga procesom endocitoze preuzimaju iz krvi majke u obliku lipoproteina male gustine (*engl. low-density lipoproteins*, LDL). Proces preuzimanja LDL stimulišu estrogeni, a podaci ukazuju da ovi hormoni povećavaju ekspimiranje receptora za LDL na ćelijskoj membrani. Hidroliza proteinske komponente LDL verovatno predstavlja izvor aminokiselina za fetus, a hidroliza estara holesterola izvor esencijelnih masnih kiselina. Otvoreno je pitanje da li je sinteza progesterona regulisana uplivom luteinizirajućeg hormona (*engl. luteinizing hormone*, LH)/hCG. Postoje podaci da su potrebne male količine hCG. Posteljica poseduje enzim koji seče bočni lanac holesterola (CYP11A1) i  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenazu/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  izomerazu ( $3\beta$ -HSD) koji katališu sintezu progesterona od holesterola. Obzirom da posteljica ne ekspimirira  $17\alpha$ -hidroksilazu/ $17,20$ -liazu (CYP17A1), konverzije progesterona u androgene koji služe kao supstrat za sintezu estrogena izostaje (Slika. 11.2).



**Sl. 11.2** Biosinteza progesterona i estrogena u posteljici čoveka. Progesteron se sintetiše uglavnom od holesterola koji potiče od majke, a estradiol i estriol od DHEA-S koji potiče od fetusa i majke. Estriol se sintetiše od 16α-OH-DHEAS poreklom samo iz fetusa. Slika je napravljena u Biorenderu

I pored nedostatka enzima CYP17A1, posteljica ima sposobnost sinteze estrogenih hormona. Posteljica eksprimira aromatazu (CYP19A1) i ima vrlo veliki kapacitet za aromatizaciju C19 steroida. Tokom prvih 5–6 nedelja trudnoće, žuto telo je jedini izvor estrogena. Posle prvog trimestra, posteljica postaje glavni izvor estrogena čija osnovna funkcija jeste rast materice i povećanje protoka krvi. Supstrate koji će biti prevedeni u

estrogene, posteljica dobija od fetusa i majke. Glavni supstrat je dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEA-S) koji potiče iz nadbubrežnih žlezda fetusa, mada i nadbubrežne žlezde majke mogu da predstavljaju izvor DHEA-S. Posteljica sadrži puno sulfataza koje prevode konjugate sumporne kiseline u slobodne steroide (Slika 11.2). U jetri fetusa nastaje  $16\alpha$ -OH-DHEA-S, a njegovom hidroksilacijom na poziciji 15 nastaje  $15,16$ -di-OH-DHEA-S. Drugim rečima, fetus ima enzime koji vrše konjugaciju C21 i C19 steroida, a posteljica enzime koji katališu reakcije u suprotnom smeru. Konjugacija steroida sa ostatkom sumporne kiseline je od ogromnog značaja za fetus. Ova jedinjenja su rastvorljiva u vodi i neaktivna. Na taj način se sprečavaju neželjeni efekti steroida na fetus (na primer maskulinizacija ženskog fetusa). DHEA-S se dejstvom sulfataza u posteljici prevodi u DHEA koji se zatim katalitičkom aktivnošću enzima  $3\beta$ -HSD, CYP19A1 i  $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze ( $17\beta$ HSD) prevodi u estradiol i estron. Pored estradiola i estrona, važan estrogen koji se sintetiše u posteljici je estriol koji pored OH-grupa na pozicijama C3 i C17, ima i dodatnu OH-grupu na C16. Višestruko povećanje koncentracije estriola u krvi majke dešava se oko 12. nedelje trudnoće. To se poklapa sa povećanjem nadbubrežnih žlezda fetusa i povećanom sekrecijom ACTH iz hipofize fetusa. Estriol se sintetiše od  $16\alpha$ -OH-DHEA-S koji nastaje u jetri fetusa. Nakon ulaska u posteljicu oslobađa se ostatka sumporne kiseline dejstvom sulfataze, a zatim se  $16\alpha$ -OH-DHEA aromatizuje u estriol (Slika. 11.2). Metaboliše se u jetri majke u estriol-glukuronat i estriol-sulfat i izbacuje putem urina. Obzirom da supstrat za estriol potiče isključivo od fetusa, niži nivoi estriola u krvi majke mogu da ukažu na određene probleme u pogledu normalnog razvoja fetusa. Pored estriola, estradiola i estrona u posteljici se sintetiše i estetrol koji nastaje od  $15,16$ -di-OH-DHEA-S1.

### 11.1.1.1. Funkcije progesterona

Glavna funkcija progesterona je relaksacija miometrijuma. Uklanjanje progesteronske podrške izaziva prekid trudnoće. Smatra se da učestvuje u blokadi imunog odgovora majke na antigene fetusa, te tako sprečava odbacivanje fetusa. Predstavlja supstrat sa sintezu kortikosteroida u nadbubrežnoj žlezdi fetusa. Progesteron deluje preko klasičnih nuklearnih

receptora i preko membranskih receptora koji omogućavaju brze efekte hormona. Nuklearni receptori za progesteron su PR-B i PR-A. Ovi receptori se prepisuju sa istog gena, a razlikuju se po tome što PR-A ima na N-kraju 164 aminokiselina manje. Genomski efekti progesterona ostvaruju se aktivacijom izoforme PR-B. Generalno se smatra da PR-B imaju snažnu transkripcionu aktivnost i odgovoran je za mirovanje miometrijuma tokom trudnoće. Transkripciona aktivnost PR-A je mnogo manja, odnosno zavisi od tipa ćelije i gena na čiju transkripciju progesteron deluje. Takođe, PR-A deluju kao inhibitor transkripcije PR-B.

Pokazano je da progesteron sprečava efekte estrogena na nivou endometrijuma tokom trudnoće, tako što inhibiše ekspimiranje receptora ER $\alpha$ . Indukcija porođaja primenom RU846 koji je poznat antagonist receptora za progesteron, ukazuje na značaj progesterona u održavanju trudnoće. Ispitivanja efekta progesterona na ćelijama miometrijuma *in vitro* pokazuju da on inhibiše bazalne i kontrakcije izazvane uterotonicima, jedinjenjima koja izazivaju kontrakcije miometrijuma kao što su prostaglandini i oksitocin.

### 11.1.1.2. Funkcije estrogena

Estradiol i estriol ispoljavaju pozitivno dejstvo na protok krvi kroz placentu. U pogledu dejstva na krvne sudove estriol ima istu potentnost kao i estradiol, dok u pogledu ostalih estrogenih delovanja ispoljava svega 1% od aktivnosti estradiola i 10% aktivnosti estrona. Stoga može da se pretpostavi da je glavna funkcija estriola kontrola protoka krvi kroz posteljicu. Njegovo slabo dejstvo na organizam majke, čini ga idealnim kandidatom za tu funkciju.

Aktivnost estrogena ostvaruje se preko receptora ER $\alpha$  i ER $\beta$ . Iako u slučaju nedostatka sulfatazne aktivnosti, ili anencefalije dolazi do znatnog smanjenja sinteze estrogena, to ima mali efekat na razvoj posteljice i fetusa. Studije koje su ispitivale tok trudnoće u uslovima nedostatka aktivnosti CYP19A1 u posteljici pokazale su da se to nema posledice na razvoj fetusa. U tim studijama izneta je pretpostavka da sinteza estrogena predstavlja način da se uklone androgeni iz posteljice i spreči virilizacija ženskog fetusa i majke. Takođe, postoje podaci da trofoblast ekspimira

receptore ER $\alpha$  i ER $\beta$  i da u *in vitro* uslovima estradiol stimuliše diferencijaciju citotrofoblasta u sinciotrofoblast, kao i sintezu leptina koji takođe stimuliše diferencijaciju trofoblasta.

Estrogeni imaju veliki značaj u porođaju. Izazivaju povećanje nadražljivosti miometrijuma kroz smanjnje vrednosti membranskog potencijala glatkih mišićnih ćelija. Stimulišu eksprimiranje gena za proteine koji omogućavaju kontrakcije miometrijuma (engl. *contraction associated protein*, CAP), kao što su receptori za oksitocin i prostaglandine, koneksioni CX43 koji povezuju glatke mišićne ćelije miometrijuma, ciklooksigenaza-2 (COX-2), enzim koji učestvuje u sintezi prostaglandina. Povećavaju osetljivost miometrijuma na oksitocin i prostaglandine. Te promene povećavaju kapacitet materice za sinhronizovane kontrakcije. U grliću materice, estrogeni stimulišu eksprimiranje proteolitičkih enzima (pr. kolagenaza) koji degradiraju ekstracelularni matriks i omogućavaju njegovo širenje.

## 11.1.2. Proteinski i peptidni hormoni posteljice

Posteljica produkuje veliki broj hormona sličnih hormonima koji se sintetišu u hipofizi i hipotalamusu, kao i veliki broj faktora rasta i citokina.

### 11.1.2.1. Humani horionski gonadotropin

hCG je glikoprotein sa biološkom aktivnošću sličnom LH. Sastoji se od  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice, a deluje preko receptora za LH/hCG. Produkuje ga sinciotrofoblast. Detektuje se u plazmi trudne žene 7–9 dana nakon oplodnje. hCG ulazi u krv majke u vreme implantacije blastociste. Nivo u plazmi se duplira svaka 2 dana. Maksimalan nivo se dostiže između 8. i 10. nedelje trudnoće. Posle 10–12. nedelje trudnoće nivo u plazmi majke počinje da se smanjuje do 20. nedelje, a zatim ostaje nepromenjen do kraja trudnoće. Nivo hCG u urinu prati nivo u plazmi.

Osnovna funkcija hCG jeste održanje žutog tela radi produkcije progesterona. Jedan dan po implantaciji hCG preuzima kontrolu održanja funkcije žutog tela. Trudnoća je zavisna od funkcije žutog tela do 7. nedelje trudnoće. Već oko 6. nedelje trudnoće produkcija progesterona u žutom telu počinje da opada uprkos porastu hCG, jer dolazi do smanjena

ekspresije receptora za LH/hCG u žutom telu. To se dešava u vreme kada trofoblast proizvodi dovoljno progesterona za održavanje trudnoće. Pored održavanja funkcije žutog tela, hCG izaziva i povećanje aktivnosti štitne žlezde majke, jer se vezuje za receptor za tireostimulirajući hormon (TSH). Pored toga, hCG proizveden od strane blastociste parakrinom aktivnošću utiče na deciduozizaciju strome. Takođe, hCG produžava trajanje prozora implantacije, jer blokira vezujući protein za insulinu sličan faktor rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor-binding protein-1*, IGFBP-1) iz endometrijuma (videti kasnije). hCG pojačava angiogenezu na mestu implantacije, autokrinim efektom deluje na trofoblast podržavajući njegovu diferencijaciju i povećavajući invazivni potencijal.

### 11.1.2.2. Laktogen i hormon rasta posteljice

Posteljica eksprimira i sekretuje proteine, članove genske familije hormona rasta (engl. growth hormone, GH)/prolaktina u kojoj postoji pet gena: *GH1*, *GH2*, *CSH1*, *CSH2*, *CSHL1*. Gen za *GH1* kodira GH iz hipofize, *GH2* kodira hormon rasta posteljice (engl. *human placental growth hormone*, hPGH), *CSH1* i *CSH2* kodiraju laktogen posteljice (engl. *human placental lactogen*, hPL), dok *CSHL1*, koji ima veliku sličnost sa prethodna dva gena, predstavlja pseudogen.

Početkom 70-tih godina prošlog veka opisano je da posteljica proizvodi supstancu koja se karakteriše mamotropnom aktivnošću, kao i da poseduje imunološke sličnosti sa hormonom rasta čoveka. Zbog mamotropne aktivnosti supstance je dobila ime laktogen. Nakon toga izvršena su mnoga istraživanja ovog hormona i bilo je mnogo diskusije oko naziva, imajući u vidu da supstanca ispoljava mnoge karakteristike GH poreklom iz hipofize. Stoga su predloženi i drugi nazivi: horionski hormon rasta-prolaktin, horionski somatotropin. hPL je polipeptidni lanac od 191 AA sa 2 disulfidna mosta i 96% homologije sa GH. Prisutan je u posteljici oko 18. dana trudnoće, a u plazmi majke od 3. nedelje trudnoće. Nakon 20–40 dana trudnoće, koncentracija raste eksponencijalno i korelira sa porastom mase posteljice sve do porođaja. hPL je prisutan i u fetusu, a nivo se smanjuje približavanjem porođaja. Sintetiše se i u nekim tumorima, na primer, horiokarcinomu testisa.

Hormon rasta posteljice se eksprimira u sinciotrofoblastu u dve forme. Jedna forma se vrlo malo razlikuje od GH iz hipofize, dok druga forma nastaje kao rezultat alternativnog splajsovanja i predstavlja mali udeo u ukupnoj produkciji GH u posteljici. Koncentracija hPGH je daleko manja u odnosu na hPL. Može da se registruje u cirkulaciji majke tek između 21. i 26. nedelje trudnoće. Tokom trećeg trimestra nivo hPGH u krvi majke eksponencijalno raste, zajedno sa hPL i dostiže maksimum na porođaju. Interesantno je istaći da tokom trudnoće, kod žene, hPGH postaje dominantna forma GH, i nivo GH iz hipofize se postepeno smanjuje. Dok se u prvom trimestru, GH iz hipofize majke luči u pulsativnom maniru, njegov nivo počinje da se smanjuje od 15. nedelje trudnoće, i nakon 30. nedelje se ne detektuje u cirkulaciji majke. Istovremeno, u tom periodu raste sekrecija hPGH. Drugim rečima, u drugom trimestru se smanjuje nivo GH iz hipofize, a u trećem trimestru hPGH predstavlja glavnu formu hormona rasta u trudnoći.

Studije trudnoća kod žena su pokazale da su, u slučaju nedostatka hPL u krvi majke, trudnoća i razvoj fetusa normalni. Nedostatak oba hormona (hPL i hPGH) dovodi do velike retardacije rasta fetusa, a u ostalim parametrima, normalnom trudnoćom. Trudnoće sa nedostatkom samo hPGH nisu registrovane. Ovi nalazi pokazuju da hPL nije potreban za normalnu trudnoću dok rast fetusa zavisi od hPGH, ili alternativno da postoji redundantnost u dejstvu ova dva hormona. hPL i hPGH se vezuju za receptor hormona rasta (engl. *growth hormone receptor*, GHR). Afinitet hPL za ovaj receptor je oko 2000 puta manji u odnosu na hGH, ali njegova visoka koncentracija to kompenzuje. Za sada nije identifikovan specifičan receptor za hPL. Kako hPGH ne ulazi u fetus, njegovo dejstvo trebalo bi da se ostvaruje preko majke.

Istraživanja ukazuju na moguću ulogu hPL i hPGH kao modulatora metabolizma majke. Poznato je da GH vrši mobilizaciju masti iz masnog tkiva i čini ih neposredno dostupnim za obezbeđenje energetske potrebe. Takođe, ima suprotan efekat na metabolizam glukoze u odnosu na insulin. U trudnoći se javlja smanjena tolerancija trudnice na glukozu, smanjena osetljivost na insulin, a povećan je nivo slobodnih masnih kiselina u krvi. Takvo stanje je pozitivno za fetus, jer povećava dostupnost energetske rezervi majke. Potrebe fetusa rastu u drugom i trećem trimestru, a to prati

eksponencijalni porast hPL i hPGH. Ova dva hormona usmeravaju majčin metabolizam u smeru mobilizacije energetskih izvora za zadovoljenje potreba fetusa, što je primer “konflikta” između majke i fetusa.

### 11.1.2.3. Kortikotropini posteljice

Posteljica eksprimira pro-opiomelanokortin (engl. *proopiomelanocortin*, POMC). U kortikotropnim ćelijama hipofize, POMC je prekursor za veći broj peptidnih hormona, adrenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH),  $\beta$ -lipotropin ( $\beta$ -LPH),  $\alpha$ -melanostimulirajući hormon i  $\beta$ -endorfin (engl.  *$\beta$ -endorphin*,  $\beta$ -EP). Svi ovi hormoni, uključujući i POMC se detektuju u posteljici čoveka. U sinciciotrofoblastu se eksprimira POMC, ali se obrada razlikuje u odnosu na ćelije hipofize. Mada dolazi do obrade u izvesnoj meri, najveći deo POMC se, kao takav, oslobađa u cirkulaciju majke. Može da se detektuje u 3. mesecu trudnoće, nakon čega raste do sredine trudnoće dostižući maksimalnu koncentraciju između 28. nedelje trudnoće i termina za porođaj. Nakon porođaja, POMC vrlo brzo postaje nemerljiv u plazmi majke. Uloga ACTH i drugih derivata POMC poreklom iz posteljice je otvoreno pitanje. ACTH iz posteljice ne može da spreči hipoplaziju nadbubrežnih žlezda fetusa u slučaju hipopituitarizma zbog anencefalije. Međutim, ACTH iz posteljice može da deluje na majku i možda je uzrok za smanjen efekat negativne povratne sprege glukokortikoida na hipotalamo-hipofizni sistem majke tokom trudnoće. U posteljici se sreću i druge familije endogenih opioida, kao što su enkefalini i dinorfini. U trećem trimestru u amniotskoj tečnosti i umbilikalnoj venskoj krvi sreću se relativno visoke koncentracije dinofrina. Dinorfin se vezuje za kapa-opioidne receptore (kapa receptori) čija je koncentracija u posteljici pred porođaj velika. Agonisti koji aktiviraju kapa receptore stimulišu oslobađanje hPL, pa može da se pretpostavi da dinorfin ispoljava lokalni efekat na produkciju hPL.



#### 11.1.2.4. Gonadotropni hormon oslobađajući hormon, inhibin i aktivin

Gonadotropni hormon-oslobađajući hormon (engl. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) posteljice je identičan dekaeptidu iz hipotalamusa. GnRH je prisutan u citotrofoblastu i sinciotrofoblastu, a produkcija je najveća u ranoj fazi trudnoće i u korelaciji je sa nivoom hCG. Receptori za GnRH (GnRHR) su prisutni u citotrofoblastu i sinciotrofoblastu i imaju manji afinitet za GnRH u odnosu na receptore u hipofizi, jajnicima i testisu. Smanjen afinitet za GnRHR se prevazilazi visokim nivoom GnRH u posteljici, a istovremeno izostaje odgovor ovog receptora na niske koncentracije GnRH iz cirkulacije. Ekspimiranje GnRHR u posteljici prati krivu rasta nivoa hCG. To ukazuje na ulogu GnRH u kontroli produkcije hCG. Sekreciju GnRH stimulišu estrogeni, aktivin-A, insulin i prostaglandini, a inhibišu progesteron, inhibin, folistatin i endogeni opiodi.

Posteljica žene produkuje inhibin. Sve tri subjedinice ( $\alpha$  subjedinica,  $\beta A$  i  $\beta B$ ) produkuje sinciotrofoblast i nivoi ekspimiranja se ne menjaju napretkom trudnoće. Aktivin-A (dimer  $\beta A \beta A$ ) se takođe produkuje u žutom telu, decidui i fetalnoj membrani tokom trudnoće. Posteljica produkuje i folistatin koji inhibiše vezna mesta na aktivinu za receptor ActIIA/ActIIB, te na taj način sprečava aktivnost aktivina. U kulturi ćelija posteljice žene, hCG stimuliše produkciju inhibina, a isti efekat imaju analozi cikličnog adenzin monofosfata (engl. *cycle adenosine monophosphate*, cAMP) i aktivatori adenilil ciklaze. Kako se inhibin i aktivin sintetišu u citotrofoblastu, moglo bi da se pretpostavi postojanje autoregulacije produkcije hCG u posteljici preko modulacije lokalne aktivnosti GnRH. Pokazano je da u *in vitro* uslovima, inhibin smanjuje, a aktivin stimuliše produkciju GnRH, te na taj način parakrinom aktivnošću utiču na produkciju hCG.

#### 11.1.2.5. Kortikotropni-oslobađajući hormon

Posteljica žene ekspimirira kortikotropni-oslobađajući hormon (engl. *corticotrophin releasing hormone*, CRH) i CRH-vezujući protein (engl. *CRH-binding protein*, CRH-BP). Oni se oslobađaju uglavnom u krv majke

gde se detektuju od 15. nedelje trudnoće, a zatim eksponencijalno rastu sve do pred kraj trudnoće. Nivo CRH poreklom iz posteljice je oko 1000 puta veći od nivoa koji se sreće kod žena koja nisu trudne. Koncentracija CRH-BP je daleko veća od koncentracije CRH u cirkulaciji majke. Takođe, CRH-BP ima veći afinitet za CRH od receptora za CRH u adenohipofizi, tako da kompletno vezuje CRH i blokira njegovu aktivnost. Stoga ACTH majke ostaje nizak tokom trudnoće. Kao što je rečeno, u kasnoj trudnoći, poslednje 2–4 nedelje, nivo CRH dramatično raste, a nivo CRH-BP opada tako da se povećava biodostupnost CRH i mogućnost njegovog vezivanja za receptore. I pored toga sekrecija ACTH iz hipofize majke ostaje i dalje niska. To bi moglo da se objasni rezultatima *in vitro* studija koje pokazuju da CRH desenzitivise receptor za CRH u kortikotropnim ćelijama hipofize uprkos biodostupnosti CRH.

Studije *in vitro* pokazuju da se eksprimiranje CRH u posteljici može izazvati agonistima koji deluju na nivou hipotalamusa, kao što su prostaglandini, PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub>, norepinefrin, acetilholin, oksitocin, vazopresin. S druge strane, progesteron i donori azot oksida inhibišu eksprimiranje CRH *in vitro*. Takođe je pokazano da glukokortikoidi povećavaju lučenje CRH u posteljici. Ovaj stimulatorni efekat je pokazan *in vivo* kod žena koje su tretirane glukokortikoidima tokom trećeg trimestra. Efekat je pokazan i *in vitro* u kulturi ćelija posteljice. Interesantno je napomenuti da kortizol inhibiše produkciju CRH na nivou hipotalamusa, dok na nivou posteljice ima stimulišući efekat na ovaj hormon. Kako su CRH poreklom iz posteljice i hipotalamusa produkt istog gena pretpostavlja se da je razlika u delovanju kortizola na produkciju CRH u hipotalamusu i posteljici uslovljena uključenjem transkripcionih faktora specifičnih za posteljicu, što omogućava pozitivno delovanje kortizola na sintezu CRH. CRH stimuliše lučenje ACTH iz hipofize fetusa što povećava produkciju kortizola u nadbubrežnim žlezdama fetusa, a kortizol stimuliše sintezu CRH. Uspostavlja se pozitivna povratna sprega, a rezultat je značajan rast CRH u poslednjih 10 nedelja trudnoće.

CRH može da utiče na nadbubrežne žlezde fetusa direktno delujući na povećanje produkcije DHEA-S. Interesantno je napomenuti da je CRH efikasan kao i ACTH u pogledu stimulacije produkcije DHEA-S, ali 70% manje efikasan u pogledu stimulacije produkcije kortizola. Potencijal za

povećanje produkcije DHEA-S ukazuje da CRH povećava i sintezu estrogena u posteljici.

CRH iz posteljice može da reguliše eksprimiranje i obradu POMC. U *in vitro* uslovima CRH stimuliše formiranje ACTH,  $\alpha$ -LPH,  $\beta$ -LPH,  $\alpha$ -MSH u kulturi ćelija posteljice. Takođe, CRH bi mogao da bude faktor u odgovoru na stres od strane fetusa. To bi moglo da bude značajno u uslovima kao što su vaskularna insuficijencija posteljice, intrauterine infekcije i slično.

### 11.1.2.6. Leptin

Leptin je hormon koji primarno proizvode adipociti. Označava se i kao hormon sitosti, jer obezbeđuje aktivaciju centra za sitost u hipotalamusu i tako ograničava unos hrane. Pretpostavlja se da leptin ima određenu ulogu u reproduktivnoj funkciji. Sve dok koncentracija leptina u organizmu nije na određenom nivou, GnRH pulsni generator ne funkcioniše adekvatno. Na taj način organizam signalizira da li su energetske rezerve dovoljne za uspostavljanje i održanje trudnoće.

Posteljica je glavni izvor leptina tokom trudnoće. Najveći deo se sekretuje u cirkulaciju majke. Ne zna se koliko se usmerava ka fetusu. U prvom trimestru nivo leptina u krvi trudnice je dva puta veći u odnosu nivo kod žene koja nije trudna, i nastavlja da raste u drugom i trećem trimestru. Nakon porođaja pada na normalne vrednosti u roku od 24 h. Interesantno je napomenuti da nivo leptina tokom trudnoće ne korelira sa indeksom telesne mase, kao što je slučaj u odsustvu trudnoće. Trudnoća je stanje hiperleptinemije i rezistencije na leptin u odnosu na regulaciju unosa hrane. Leptin favorizuje mobilizaciju slobodnih masnih kiselina, može da deluje na jetru, pankreas, mišiće da smanji osetljivost na insulin. Mogla bi da se pretpostavi uloga leptina kao modulatora metabolizma majke i energetskih izvora za fetus.

Pokazano je da su receptori za leptin prisutni u posteljici. Leptin stimuliše sekreciju hCG, a stimuliše i rast posteljice pojačavajući proliferaciju, preuzimanje amino kiselina, i sintezu ekstracelularnog matriksa.

### 11.1.2.7. Faktori rasta i citokini

U posteljici je potvrđena produkcija mnogih faktora rasta, citokina i njihovih receptora. Ovi faktori imaju ulogu u rastu, razvoju i diferencijaciji posteljice i fetusa. Faktor rasta sličan insulinu-1 (engl. *insulin-like growth factor-1*, IGF-1) i faktor rasta sličan insulinu-2 (engl. *insulin-like growth factor-2*, IGF-2) se sintetišu u posteljici u različitim tipovima ćelija od 8. nedelje trudnoće. Studije na miševima kod kojih su utišani geni za ova dva faktora rasta ukazuju da su neophodni za normalan razvoj posteljice i fetusa. Postoji šest različitih proteina koji vezuju IGF (engl. *IGF binding protein*, IGF-BP). U decidui se sintetiše najviše IGFBP-1. Balans između eksprimiranja faktora rasta (IGF-1 i IGF-2) i IGFBP-1 obezbeđuje usklađen rast posteljice i fetusa tokom trudnoće. Međutim, prekomerno eksprimiranje IGFBP-1, dominantno vezuje IGF-2 u posteljici i dovodi do inhibicije rasta posteljice i fetusa. Gen za IGF-2 je imprintovan gen i eksprimira se samo sa očevog alela, dok se gen za IGFBP-1, koji je takođe imprintovan gen, eksprimira samo sa majčinog alela. To znači da očev gen stimuliše razvoj posteljice i fetusa, dok majčini alel imprintovanog gena ima suprotan efekat dovodeći do sukoba između majke i fetusa. Data je pretpostavka da je to rezultat obezbeđenja budućeg reproduktivnog potencijala žene, a ne samo konkretne trudnoće.

Značajnu ulogu u razvoju posteljice imaju faktori rasta koji stimulišu proliferaciju endotela krvnih sudova (engl. *vascular endothel growth factor*, VEGF). Postoji više izoformi koji su rezultat alternativne obrade jednog gena. Sintetišu se u sinciotrofoblastu i citotrofoblastu, kao i u stromi resica. Ovi faktori rasta regulišu remodelovanje spiralnih arterija, i kontinuiranu angiogenezu tokom trudnoće koja prati rast placente. VEGF, zajedno sa faktorom rasta posteljice (engl. *placental growth factor*, PlGF) se povezuju sa komplikacijama u trudnoći, posebno sa preemklampsijom. Pretpostavlja se da u tim slučajevima u ranoj trudnoći dolazi do neodgovarajućeg remodelovanja spiralnih arterija što u kasnijim fazama trudnoće dovodi do smanjene funkcije posteljice u pogledu odgovarajućeg snabdevanja posteljice krvlju i razmene gasova i hranljivih materija između majke i fetusa.

### 11.1.3. Dijagnoza trudnoće

Dijagnoza trudnoće se postavlja pomoću anamnestičkih podataka i objektivnog nalaza trudnice. Sve promene koje trudnica oseti (simptomi) i koje se objektivno mogu verifikovati (znaci) možemo podeliti na nesigurne, verovatne i sigurne znake i simptome trudnoće.

U nesigurne znakove i simptome se ubrajaju promene koje se mogu javiti i kod negravidnih osoba. Tu ubrajamo mučnine, osećaj gađenja prema određenim namirnicama, povećanje obima trbuha, promene u raspoloženju, drugačiju pigmentaciju kože, lako zamaranje, konstipacija.

Verovatne znake i simptome karakteriše da se javljaju na polnim organima žene. Tu ubrajamo izostanak menstrualnog ciklusa kao najčešći razlog postavljanja sumnje na graviditet, povećanje dojki, promena u vaginalnom sekretu, pojavu kolostruma, inicijalnog mleka na areolama dojki, razmekšanje i uvećanje materice pri pregledu.

U sigurne znake trudnoće ubrajamo potvrdu prisutnosti ploda unutar materice ultrazvučnom sonografijom, verifikaciju srčanih tonova ploda, prisutnost  $\beta$ hCG u urinu ili krvi majke, utvrđivanje pokreta fetusa, te pregledom stomaka trudnice i opipavanjem delova ploda.

Osnova testa za utvrđivanje trudnoće je evaluacija  $\beta$ hCG u krvi i urinu. hCG predstavlja heterodimer koji se sastoji iz dve subjedinice,  $\alpha$  i  $\beta$ , a uloga je da održava žuto telo i cilju lučenja progesterona. FSH i LH dele  $\alpha$  subjedinicu sa hCG, dok je  $\beta$  subjedinica različita za svaki od ovih hormona, te se iz tog razloga koriste za utvrđivanje trudnoće. Sinciotrofoblast je taj koji luči hCG, čija se vrednost eksponencijalno povećava, duplirajući svoju vrednost na dva dana. Oko 9. nedelje dostiže najveće vrednosti od oko 120 000 IU/L, nakon čega zadržava vrednost neko vreme, a zatim pada na vrednosti oko 20 000 IU/L oko 20. nedelje trudnoće.

Ultrazvučna dijagnostika trudnoće predstavlja neinvazivnu metodu za potvrdu i kasnije praćenje trudnoće. Prvi znak trudnoće je postojanje gestacijskog meška, koja predstavlja egzocelomsku šupljinu koju okružuju dva sloja, decidua *partialis* i decidua *capsularis*. Vidljiva je oko 4,5 nedelja gestacije, kada su vrednosti  $\beta$ HCG oko 1500–2000 IU/L. Izuzetno je važno razlikovati prisustvo pseudogestacijskog meška koji se javlja kod vanmaterične trudnoće, koji predstavlja lažni mešak usled hormonskih

promena koje prate i vanmateričnu trudnoću. Žumančana kesa predstavlja sledeću strukturu koja je vidljiva oko 5,5 nedelja i promera je oko 3–5 mm. U gestacijskoj vreći u 6. nedelji trudnoće može se pored žumančane kese videti i embrion promera 1–2 mm, dok se srčana radnja registruje od 6–6,5 nedelja gestacije kada je promer embriona između 1–5 mm.

#### 11.1.4. Razvoj ploda

Razvoj ploda se deli na preembrionalni period, od fertilizacije do 2. nedelje trudnoće, embrionalni period od početka 3. nedelje do kraja 8. nedelje i fetalni period, od kraja 8. nedelje do rođenja.

Preembrionalni period trudnoće, poznat kao period oplodnje i prve nedelje trudnoće, obuhvata fertilizaciju sekundarne oocite i spermatozoida u ampularnom delu jajovoda, formiranja zigota, njegovo brazdanje, dostizanje stadijuma blastociste i sledstvene implantacije. Preembrionalni period je ključan za uspešnu trudnoću, koji često prolazi bez realizacije žene da je trudna. U 11. i 12. postkonceptijskom danu dolazi do implantacije, i to integracijom krvnih sudova majke i lakuna trofoblasta, te se formira uteroplacentarna cirkulacija.

Embrionalni period trudnoće karakteriše intenzivan razvoj kao i formiranje osnovnih organa i sistema. Embrion se sastoji od tri klicina lista: endoderma, mezoderma i ektoderma. Svaki od pomenutih delova embriona će proizvesti za njega specifične delove tela i organe. Za svaki organ i organski sistem embriona, postoji kritičan stadijum diferencijacije, kada je naglašena osetljivost embriona na određene teratogene agense.

Fetalni period počinje od 8. postkonceptijske nedelje i odgovara 10. gestacijskoj nedelji. Ovaj period karakteriše kontinuiran rast i sazrevanje prethodno formiranih struktura. Ekstremiteti fetusa, uključujući prste na rukama i nogama, postaju bolje definisani i pokretni. Fetus brzo dobija na težini tokom fetalnog perioda, iako najveći prirast dobija u poslednjim nedeljama trudnoće. U 16. nedelji gestacije dužina fetusa je 12 cm, težina oko 110 g. Sa 36 nedelja gestacije težina je oko 2500 g, sa 40 nedelja 3500 gr, a dužina 50 cm.

Trend rasta se prati ultrazvučno, merenjem pojedinih dijmenzija fetusa – praćenjem biometrije ploda. Izolovani parameter nije apsolutno tačan

za određivanje trudnoće, a ocena gestacijske dobi i rasta ploda se dobija kombinacijom više različitih parametara.

#### 11.1.4.1. Nadzor ploda

Nadzor ploda tokom trudnoće je ključan deo prenatalne nege kako bi se osiguralo da trudnoća napreduje bez komplikacija i da se pravovremeno reaguje na potencijalne probleme. Ključan je za identifikaciju eventualnih komplikacija i brigu o zdravlju majke i fetusa. Redovni prenatalni pregledi i testovi igraju ključnu ulogu u osiguravanju zdrave trudnoće i sigurnog porođaja.

Postoje različite metode i testovi koji se koriste za nadzor ploda tokom trudnoće. Kao što je i prethodno opisano, ultrazvučna sonografija predstavlja najčešće korišćen instrument za praćenje rasta i razvoja fetusa. U prvom trimestru najtačniji parametar za određivanje trudnoće je dužina teme-trtica (engl. *crown to rump length*, CRL), dok je u kasnijem dobu mera glavice, biparijetalni dijametar (BPD) i dužina butne kosti (engl. *femur length*, FL). Standardni parametri biometrije su okcipitofrontalni dijametar (OFD), obim trbuha (engl. *abdominal circumference*, AC), dužina nadlaktice (engl. *humerus length*, HL), kao i širina bočnih moždanih komora (engl. *ventriculoperitoneal, ventriculoatrial*, Vp, Va) i moždanih hemisfera. U svrhu određivanja starosti, kada nije poznat datum poslednje menstruacije ili kada su menstrualni ciklusi neredovni, biometrijska merenja mogu jasnije odrediti starost. Međutim, tačnost je obrnuto proporcionalna starosti gestacije, što bi značilo da je na početku trudnoće oko 12. nedelje određivanje starosti i verovatnog termina porođaja tačnije nego u kasnijem periodu trudnoće.

CTG – kardiotokografija, predstavlja medicinski postupak koji se koristi za praćenje srčane aktivnosti fetusa i kontrakcija materice tokom trudnoće i porođaja. CTG je važan alat za nadzor fetusa tokom trudnoće i porođaja. Glavni cilj CTG je da prati srčane otkucaje fetusa. To se postiže postavljanjem senzora na trbuh trudnice. Jedan senzor registruje srčane otkucaje fetusa, dok drugi senzor prati kontrakcije materice. Senzor na fundusu materice prati intenzitet i učestalost kontrakcija tokom trudnoće i porođaja. CTG je posebno važan tokom porođaja kako

bi se osiguralo da fetus dobro podnosi kontrakcije i da nema znakova stresa.

### **11.1.5. Promene u organizmu žene tokom trudnoće**

Trudnoća zdravih žena je medicinski klasifikovana u fiziološka stanja, međutim, normalno je praćena promenjenom morfoloijom i funkcijom mnogih organa i organskih sistema. Zavisno od psihofizičkog stanja i uslova života i rada, adaptacija na ove promene je različita i specifična u populaciji trudnica. Fiziološke promene koje se dešavaju u organizmu žene tokom trudnoće opsežne su i veoma kompleksne. Nastaju kao posledica ubrzanog i promenjenog načina produkcije hormona, a imaju za cilj da prilagode organizam trudnice na novonastalo stanje, da omoguće tolerisanje ploda, obezbede njegovu ishranu, rast i razvoj, pripreme majku na optimalno završavanje trudnoće porođajem, kao i da pripreme dojke za period laktacije. Mnoge od ovih promena počinju veoma brzo nakon oplodjenja i nastavljaju se tokom trudnoće, ali jednako brzo kao što nastanu, one se i povlače nakon završetka trudnoće. U ovom poglavlju upoznaćemo se sa osnovnim fiziološkim mehanizmima koji se javljaju u trudnoći.

#### **11.1.5.1. Promene na reproduktivnom traktu**

##### *Materica*

Negravidna materica teži oko 70 grama. Tokom trudnoće materica se uvećava i pretvara u mišićnu strukturu, istanjenih zidova koja ima sposobnost da primi posteljicu, plodovu vodu i fetus tokom cele trudnoće. Ona se uglavnom uvećava na osnovu uvećanja mišićnih vlakana, a manjim delom stvaranjem novih. Njeno uvećanje u ranoj trudnoći uzrokovano je uticajem estrogena i progesterona, dok nakon 12. nedelje dominantni uticaj preuzima plod, plodova voda i posteljica. Tokom prvih nekoliko nedelja, materica zadržava svoj oblik obrnute kruške, a kako trudnoća napreduje, ona poprima okrugli oblik, izlazi iz male karlice i potiskuje okolne organe.

Već u ranoj trudnoći grlić počinje da razmekšava i bubri kao posledica pojačane vaskularizacije i edema celog grlića kao i pratećom hipertrofijom



i hiperplazijom cervikalnih žlezda. Žlezde endocerviksa proizvode sluz u cervikalni kanal gde se pod uticajem progesterona formira takozvani sluzni čep, bogat imunoglobulinima i citokinima koji predstavlja barijeru za prodor mikroorganizama iz vagine.

### *Jajnici*

Tokom trudnoće zaustavlja se sazrevanje novih folikula i ovulacija. Na jednom od jajnika formira se žuto telo koje proizvode progesteron tokom prvih 6 do 7 nedelja trudnoće. Nakon toga ulogu preuzima posteljica da bi nakon 16. nedelje uticaj žutog tela bio zanemarljiv. Žuto telo proizvode i relaksin, hormon koji igra ključnu ulogu u mnogim promenama u trudnoći.

## **11.1.5.2. Promene na ekstragenitalnim organima**

### *Kardiovaskularni sistem*

Najvažniji adaptivni odgovor kardiovaskularnog sistema u trudnoći je povećanje volumena cirkulišuće krvi za oko 30–40%. Porast volumena započinje od 6. nedelje trudnoće i dostiže vrhunac između 20. i 24. nedelje, nakon čega se održava nepromenjen. Paralelno se povećava i minutni volumen srca, u početku kao posledica povećanja udarnog volumena, a kasnije kao posledica povećanja srčane frekvencije. Minutni volumen srca varira u zavisnosti od pozicije gravidne materice, posebno u odmaklom stadijumu trudnoće, kada materica pritiskom na donju šuplju venu smanjuje venski priliv u desno srce, tako da se pri uspravnom položaju trudnice može smanjiti i do 25%. Drugi važan adaptivni odgovor je smanjenje periferne vaskularne rezistencije. Smanjenje opterećenja je posledica i oslobađanja vazodilatatornih prostaglandina i azot oksida (NO) u sistemsku cirkulaciju iz gravidne materice. Osim toga, postoji i smanjen odgovor na noradrenalin i angiotenzin II, periferna vazodilatacija vodi do smanjenja krvnog pritiska tokom prvog i drugog trimestra, a kasnije dolazi do aktivacije sistema renin-angiotenzin i produkcije vazopresina koji povećava volumen plazme. Osim navedenog, dolazi i do smanjenja koloidno-onkotskog pritiska plazme za 10–15%, što olakšava transudaciju tečnosti i nastanak perifernih edema kao i intersticijskog plućnog edema.

Tokom porođaja se takođe događaju važne i brze hemodinamičke promene. Bol i anksioznost doprinose povećanju srčane frekvencije kao i sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska. Kontrakcije materice dodatno doprinose porastu srčane frekvencije, kao i povećanju krvnog volumena pre-raspedelom krvi iz materice u sistemsku cirkulaciju. Prvi i drugi stadijum porođaja je povezan sa dodatnim povećanjem minutnog volumena srca, a treći stadijum porođaja je udružen sa povišenim rizikom od nastanka plućnog edema i zahteva pažljiv monitoring. Neposredno nakon porođaja, autotransfuzija krvi iz kontrahovane materice označava dodatni rizik od daljeg porasta minutnog volumena srca, koji traje do sat vremena nakon porođaja, nakon čega se brzo smanjuje.

### *Respiratorni sistem*

Trudnoća mehaničkim, humoralnim, endokrinološkim i drugim mehanizmima dovodi do značajnih anatomskih i funkcionalnih promena respiratornog sistema. Fiziološke promene respiratornog sistema u trudnoći uslovljene su povećanim potrebama za kiseonikom organizma majke i fetoplacentalne jedinice. Zbog rasta materice i pritiska na dijafragmu dolazi do njenog podizanja za oko 4 cm proksimalno, dok se kompenzatorno grudni koš širi u svom obimu čime se zadržava kapacitet prostora. Frekvencija respiracija se ne menja značajnije u trudnoći, ali dolazi do značajnog povećanja Tidalovog i minutnog volumena te se zadovoljavaju potrebe za kiseonikom koje su uvećane za oko 20%. Porast minutne ventilacije uzrokovan je pre svega pojačanim respiratornim nagonom, primarno kao posledica stimulativnog dejstva progesterona na respiratorni centar, ali i zbog niskog respiratornog rezervnog volumena.

### *Digestivni sistem*

Jedan od prvih gastrointestinalnih simptoma koji se javlja tokom trudnoće je mučnina ili povraćanje kod oko 70% trudnica. Najčešće se javlja u prvom trimestru, a može biti u blažem obliku sve do jakih i obilnih povraćanja (*hyperemesis gravidarum*). Takođe, progesteron dovodi do usporavanja pražnjenja želuca opuštanjem mišića glatke muskulature te dolazi do žgaravice koja nastaje zbog refluksa kiselih produkata iz želuca u donji deo ezofagusa. U trudnoći dolazi do povećanja i nešto

sporijeg pražnjenja žučne kese te postoji povećan rizik za nastanak holestaze, holecistitisa i holestatskog pruritisa. Progesteron takođe utiče i na opuštanje glatke muskulature debelog creva te uzrokuje simptome opstipacije.

### *Urinarni sistem*

Bubreg je organ koji svojim radom omogućava održavanje homeostaze telesnih tečnosti i elektrolita te omogućava izlučivanje metaboličkih nusprodukata i štetnih materija iz organizma. Tokom trudnoće zapažen je značajan broj promena kako u funkciji bubrega tako i u njegovoj anatomiji. Reapsorpcijski kapacitet bubrežnih kanalića za  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i vodu povećava se za 50% te uzrokuje stvaranje hormona koji dovode do povećanog stvaranja mokraće. Tokom trudnoće mnogi testovi bubrežnog rada se menjaju, te su kriterijumi normalnih vrednosti bitno različiti. Zbog lučenja hormona progesterona, konstantnog rasta gravidne materice, držanja tela trudnice, njene telesne težine i većeg volumena krvi dolazi do strukturnih i funkcionalnih promena bubrežne funkcije. Strukturne promene bubrega i uretre, posledica su dilatacije bubrežnih čašica, a zbog vazodilatacije bubrežnih krvnih sudova dolazi do povećanja protoka plazme kroz bubreg te se brzina glomerularne filtracije povećava za oko 50%. Veruje se da povećanje minutne glomerularne filtracije, delimično nastaje kao kompenzacija povećane tubularne reapsorpcije soli i vode. Bitna uloga bubrega je da zadrže  $\text{Na}^+$  u količini nužnoj za zadržavanje dovoljne količine vode koja omogućava porast volumena krvi i vanćelijske tečnosti. Bubreg se tokom trudnoće povećava za 1–1,5 cm te svoj vrhunac dostiže sredinom trudnoće. Uzrok ovog povećanja je bubrežna cirkulacija i povećanje intersticijskog prostora, a broj nefrona jednak je kao i pre trudnoće.

### *Hematopoetski sistem*

Hematopoetski sistem prilagođava volumen krvi, sastav plazme i stvaranje krvnih ćelija potrebama trudnoće. Volumen krvi počinje da se povećava od 6. nedelje trudnoće i najviši je u 34. nedelji te se ne menja do porođaja. Povećanje iznosi 40–50%, a najveći deo posledica je povećanja volumena plazme. Karakteriše ga povećanje plazme za oko 50%, te povećanje mase

eritrocita za oko 450 ml. Budući da je povećanje volumena plazme veće od povećanja mase eritrocita, dolazi do pada koncentracije hemoglobina, hematokrita i broja eritrocita. Zbog navedenih razlika, u trudnoći dolazi do fiziološke gestacijske anemije. Ona je rezultat povećanog volumena majčine krvi te se javlja povećana potreba majčinog organizma za gvoždjem. Zbog hemodilucije (razređenja krvi) pada titar anitela, međutim broj leukocita se znatno povećava u trudnoći, a posebno u porođaju i ranom puerperijumu. Povećanje volumena krvi u trudnoći omogućava većinu hranljivih potreba za dete, sprečava snižavanje krvnog pritiska u uspravnom položaju i smanjuje gubitak volumena pri krvarenju u porođaju. Trudnoća je takođe stanje u kojem se viđaju promene u koagulacionom sistemu: povećanje koncentracije fibrinogena preko 50%, povećanje koncentracija faktora VII, VIII, IX i X te nepromenjene koncentracije faktora zgrušavanja II, V i XII, što karakteriše stanje gestacijske hiperkoagulabilnosti.

### *Metaboličke promene*

Tokom trudnoće prilagodjavanje metabolizma ima nekoliko ciljeva. Neki od ciljeva su: osigurati zadovoljavajući rast i razvoj deteta, osigurati dovoljno energije za porođaj i dovoljno rezervi fetusu za prilagodjavanje životu izvan maternice, osigurati stvaranje majčine rezerve koje će zadovoljiti narasle potrebe za energijom u trudnoći, kao i stvoriti rezerve za napore porođaja i laktacije. Da bi metabolizam mogao osigurati sve ove ciljeve, organizam trudnica podleže nizu fizioloških promena koje omogućavaju homeostazu i fetalni rast i razvoj. U prvoj polovini trudnoće dolazi do anaboličkog stanja jer tada raste uzimanje hrane, a u majčinom organizmu se nakuplja oko 3,5 kg masti i oko 900 g proteina, te koristi oko 80.000 dodatnih kalorija. Međutim, u drugom trimestru metabolizam postaje kataboličan te se počinju koristiti rezervna mast i povećava se rezistencija na insulin. Hormoni, laktogen posteljice i progesteron, regulišu sve ove promene te menjaju osetljivost na insulin i iskorištavanje glukoze. Tačna funkcija laktogena posteljice nije potpuno jasna, ali je sličan hormonu rasta i utiče na metabolizam ugljenih hidrata i lipida. Progesteron utiče na metabolizam tako što opušta glatke mišiće i uzrokuje atoniju gastrointestinalnog i urinarnog trakta.

### *Dojke*

Već u početnoj trudnoći postoji napetost i parestezija u dojka (verovatni znaci trudnoće). Nakon drugog meseca dolazi do njihovog uvećanja, pojačava se venski crtež na koži, bradavice se uvećavaju i postaju jače obojene, a kasnije se može pojaviti žućkasti iscedak *colostrum* dok se na aerolama pojavljuju Montgomerijeve, hipertrofične lojne žlezde.

## **11.2. POROĐAJ**

Procesi koji se događaju tokom porođaja su slični kod viviparnih životinjskih vrsta i čoveka. Iz etičkih razloga mnogi aspekti ljudske trudnoće porođaja i dalje su neistraženi, i tada životinjski modeli dobijaju zasluženu ulogu. Pored razumevanja fiziologije samog porođaja, neophodno je razumevanje i porođaja kod trudnoća sa visokom rizikom. Posebno su značajni za razumevanje aspekti višeploidne trudnoće, faktori rizika za prevremeni porođaj, faktori koji dovode do prevremenog prsnuća plodovih ovojaka, trudnoće sa dijagnostikovanom anomalijom ploda kao i poremećajem rasta fetusa. Ne postoji savršen životinjski model, ali gravidna ovca pokazala se kao prihvatljiva. Ono po čemu je gravidna ovca prihvatljiva je mogućnost hirurškog aplikovanja katetra pomoću kojeg se prate vaskularni parametri majke i fetusa. Takođe, značajno je i uzimanje uzorka u više navrata, a da pri tome nema potreba za uvođenjem u anesteziju.

Šezdesetih godina prošlog veka *in vivo* istraživanja na ovcama pokazala su da je aktivacija osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlezde odgovorna za smanjenje koncentracije progesterona i započinjanja porođaja. Iako postoje razlike u pogledu hormonske regulacije procesa porođaja kod ovce i kod žene, saznanja dobijena proučavanjem porođaja kod ovce dala su dobru osnovu i smer za dalja istraživanja. Značajna saznanja o mehanizmu porođaja kod žene dobijaju se i na osnovu farmakoloških intervencija kod rizičnih trudnoća.

### 11.2.1. Model porođaja kod ovce

Kod ovce dominantnu ulogu u određivanju vremena porođaja ima fetus. Tokom poslednjih 15–20 dana pred porođaj, zapaža se izuzetno povećanje koncentracije ACTH u plazmi fetusa. To je praćeno dupliranjem mase nadbubrežnih žlezdi fetusa. Povećanje koncentracije ACTH nastaje kao posledica povećane sinteze i sekrecije CRH od strane hipotalamusa fetusa. ACTH deluje na nadbubrežne žlezde fetusa dovodeći do povećanog oslobađanja kortizola. Ovi podaci ukazuju na značaj osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlezde fetusa u kontroli početka porođaja preko lučenja kortizola. Kortizol povećava eksprimiranje enzima u posteljici koji mogu da katališu transformaciju progesterona u C19 steroide, odnosno u supstrate za sintezu estradiola. To je praćeno smanjenjem koncentracija progesterona, jer se konvertuje u estrogene. Stoga se odnos estradiola i progesterona pomera u korist estradiola. Smanjuje se relaksirajući efekat progesterona i povećava nadražljivost materice. Estradiol stimuliše oslobađanje prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) u posteljici i u miometrijum. Povećanje veličine fetusa, izaziva istezanje materice što povećava kontrakcije i indukuje oslobađanje oksitocina iz neurohipofize. Istezanje stimuliše eksprimiranje receptora za oksitocin i receptora za prostaglandine i miometrijum postaje osetljiv na oba hormona. Primena blokatora prostaglandina inhibiše kontrakcije materice i u prisustvu ACTH, kortizola ili deksametazona.

### 11.2.2. Model porođaja kod žene

Porođaj predstavlja fiziološki proces kojim se porođajni objekti istiskuju iz materice. U porođajne objekte spadaju plod, posteljica, plodova voda i plodovi ovojci. Prema vremenu započinjanja, porođaj može biti pre termina – *partus praetemporarius* (pre 37. gestacijske nedelje), u terminu – *partus a tempore*- (od 37. do 42. gestacijske nedelje) i porođaj posle termina – *partus posttemporarius* (posle 42. nedelje gestacije). Ako govorimo o načinu porođaja on može biti vaginalni, instrumentalni ili abdominalni. Kod vaginalnog porođaja u odnosu na pojavu kontrakcija on može biti spontan, ako se kontrakcije izazivaju tada je indukovani, ili ako pojačavamo intezitet već postojećih kontrakcija tada je stimulisani. Kada govori-

mo o instrumentalnom završetku porođaja, tu podrazumevamo vakuum ekstrakciju ili primenu forcepsa. Pod abdominalnim načinom završetka porođaja podrazumevamo carski rez, koji može biti elektivni (planirani) ili hitni. Predmet polemisanja i istraživanja su faktori koji dovode do početka porođaja. Potencijalni faktori uključuju promene u nivoima estrogena i progesterona, povećanu proizvodnju prostaglandina i povišenje nivoa CRH, kao i povećanu osetljivost miometrijuma na endogeni oksitocin. Osim promena na miometrijumu, u smislu povećane osetljivosti prisutne su promene i na grliću koji postaje hiperemičan, lividan, razmekšan i počinje da se skraćuje. Najverovatnije je da interakcije između ovih faktora igraju suštinsku ulogu u procesu porođaja. Najstarija teorija koja se pominje je teorija zrelosti ploda i sazrevanja posteljice.

U toku trudnoće uterus se nalaza u takozvanoj fazi mirovanja koja obuhvata uspostavljanje i održavanje trudnoće (faza 0). Miometrijum je neosetljiv na oksitocin i prostaglandine. Cerviks je zatvoren i rigidan. U ovom periodu progesteron, prostaciklin (PGI<sub>2</sub>), relaksin, CRH, NO i drugi faktori obezbeđuju relaksaciju miometrijuma.

Porođaj kod žene uključuje četiri faze odnosno četiri porođajna doba. U stranoj literature negde se opisuju tri porođajna doba, a četvrto kao posebno. Faza 1 predstavlja fazu dilatacije – *phasis dilatationis* gde dolazi do promena na grliću materice. Grlić se skraćuje i dilatira. U okviru ove faze imamo dve podfaze – latentnu fazu koja predstavlja period od početka kontrakcija do dilatacije od 3–4 cm i aktivnu fazu koja se završava kompletnom dilatacijom. Dužina trajanja ove faze najviše zavisi od pariteta. Ova faza ujedno predstavlja pripremu za porođaj, odnosno fazu transformacije endometrijuma i korodinisane aktivnosti hormona koji će omogućiti kontraktilnost miometrijuma. Druga faza – *phasis expulsionis* predstavlja aktivni porođaj koji započinje kompletnom dilatacijom, a završava se istiskivanjem ploda u spoljašnju sredinu. Spuštanje ploda i sama ekspulzija mogući su zahvaljujući naponima, odnosno nevoljnim kontrakcijama dijafragme i mišićima prednjeg trbušnog zida. Treća faza predstavlja rađanje posteljice – *phasis placentalis*. Dešava se nakon ekspulzije ploda i isticanja plodove vode kada započinje kontrakcija materice. Posteljica je sunderast organ koji ne prati skupljanje materice te se pomoću hematoma, koji je potpuno odvoji od zida uterusa ona ekstrahuje. Opisani hematoma stvara

se između maternalne strane posteljice i zida materice. Poslednja, četvrta faza predstavlja hemostazu – *phasis haemostasis* i involuciju materice. Započinje izbacivanjem posteljice, plodovih ovojnica i decidue iz materice. Spiralne arteriole se kontrahuju i tako ubrzavaju hemostazu nakon porođaja. Tokom narednih nedelja dolazi do involucije materice apoptozom miometrijalnih ćelija i atrofijom. Grlić materice se remodeluje i prelazi u zatvoreno i rigidno stanje.

Osnovne hormonske promene kod porođaja dešavaju se u promeni koncentracija progesterona i estrogena. Progesteron inhibiše kontrakcije materice tokom prvih nekoliko meseci trudnoće. Kako trudnoća ulazi u drugu polovinu trećeg trimestra, nivoi progesterona su na platou. Međutim, nivoi estrogena nastavljaju da rastu u cirkulaciji majke (Slika 11.1). Sve veći odnos estrogena i progesterona čini miometrijum (glatki mišić materice) osetljivijim na stimuluse koji podstiču kontrakcije (jer ih progesteron više ne inhibira). Pred kraj trudnoće kortizol fetusa raste, što pojačava lučenje estrogena od strane placente koji nadjačava efekat progesterona. Neke žene mogu osetiti rezultat pada nivoa progesterona u kasnoj trudnoći kao slabe i nepravilne peristaltičke Brakston Hiksove kontrakcije, koje se nazivaju i lažnim kontrakcijama.

Zadnji režanj hipofize pojačava lučenje oksitocina, hormona koji stimuliše kontrakcije materice. Na miometrijumu se povećava broj receptora za oksitocin, tako da se javljaju češće i bolnije kontrakcije, a stimuliše se lučenje i prostaglandina iz membrana fetusa. Prostaglandini sinergistički deluju sa oksitocinom povećavajući kontraktilnu snagu materice. Hipofiza fetusa takođe luči oksitocin, koji još više povećava koncentraciju prostaglandina. Osnovni hormonski mehanizmi porođaja uključuju smanjeno inhibitorno delovanje progesterona i dominaciju estrogena, povećanje osetljivosti na oksitocin, kao i povećanu aktivnost prostaglandina.

### 11.2.2.1. Mehanizam uklanjanja progesterona

U prvoj fazi porođaja, miometrijum koji je do tada bio relaksiran ulazi u stanje kontraktilnosti. To je uvodna faza u aktivan porođaj. Miometrijum stiče sposobnost da se ritmički kontrahuje i postaje osetljiv na hormone



koji izazivaju kontrakcije. Grlić materice postaje elastičan i dilatiran. Dominantna je uloga estradiola i smanjen efekat progesterona.

Kod većine životinja do porođaja dolazi usled pada nivoa progesterona i povećanja nivoa estrogena što dovodi do transformacije miometrijuma i povećanog eksprimiranja receptora na njegovoj površini. Kod čoveka i viših primata koncentracija progesterona i estrogena se povećava tokom trudnoće i izuzetno je visoka u toku porođaja. Kod žene, posteljica ne eksprimira CYP17A, tako da ne dolazi do prelaska progesterona u estradiol. Pretpostavlja se da kod žena na početak porođaja ne utiču koncentracije ova dva hormona nego smanjen odgovor miometrijuma na progesteron, a povećana osetljivost na estrogene. Progesteron tokom trudnoće smanjuje osetljivost miometrijuma na agense koji izazivaju porođaj povećavajući ekspresiju beta-adrenergičkih receptora u miometrijumu koji, zauzvrat, pomoću pozitivne povratne sprege stimulišu posteljicu na dalju sintezu progesterona. Ono što je značajno je da inhibicija delovanja gestagena ne dovodi do momentalnog pokretanja porođaja, već vrši senzibilizaciju ćelije miometrijuma na agense koji izazivaju kontrakciju. Estrogeni, nasuprot tome, omogućavaju miometrijumu da se pripremi za porođaj stimulišući receptore za oksitocin i čini se da je ovo prvi korak ka porođaju.

Gubitak osetljivosti na progesteron u terminu može biti posledica nekoliko različitih mehanizama uključujući: (1) katabolizam progesterona u materici u neaktivna jedinjenja; (2) promene u odnosu izoformi PR-B i PR-A); (3) promene nivoa proteina kofaktora koji utiču na transaktivaciju PR; i (4) upalna reakcija, pomoću NF $\kappa$ B, izaziva inhibiciju PR.

Na samom početku porođaja dolazi do funkcionalnog uklanjanja progesterona tako što se povećava eksprimiranje izoforme PR-A. Kako PR-A ima malu transkripcionu aktivnost i inhibiše dejstvo PR-B, dolazi do smanjenja osetljivosti miometrijuma na progesteron. Tokom čitave trudnoće progesteron delujući preko PR-B smanjuje osetljivost miometrijuma na estrogene inhibicijom eksprimiranja ER $\alpha$ . Na porođaju, dejstvo progesterona na miometrijum se smanjuje, a estrogena povećava, jer se povećava ekspresija PR-A koji inhibiše dejstvo PR-B. Na taj način se vrši funkcionalno uklanjanje progesterona, odnosno smanjuje njegovog efekat na miometrijum. Kao posledica toga, dolazi do povećane ekspresije

ERa i sledstveno povećane osetljivosti miometrijuma na estrogene. Kao što je rečeno, estradiol povećava eksprimiranje gena za proteine koji su važni za kontraktilnost miometrijuma, kao što su receptori za oksitocin i prostaglandine, koneksoni CX43 koji povezuju glatke mišićne ćelije miometrijuma, enzim COX-2 koji učestvuje u sintezi prostaglandina. Koji faktori mogu da indukuju povećanje eksprimiranja PR-A? Eksperimenti *in vitro* na ćelijskim linijama miometrijuma pokazuju da  $PGF_{2\alpha}$  stimuliše ekspresiju PR-A i povećava odnos PR-A/PR-B. Kod žena primena  $PGF_{2\alpha}$  izaziva porođaj kada se primeni u bilo kojoj fazi trudnoće. Međutim, kada se primeni u fazi 0 indukcija porođaja započinje nakon latentne faze od 15–20 časova.

Mnogobrojne studije ukazuju da je stanje mirovanja endometrijuma tokom trudnoće posledica blokade zapaljenskih procesa u materici, odnosno blokade signalnih puteva koji izazivaju inflamaciju. Smatra se da progesteron ima antiinflamatorno dejstvo i da preko PR-B blokira aktivnost NFkB, transkripcionog faktora koji posreduje u eksprimiranju gena odgovornih za aktivnost signalnih puteva koji izazivaju inflamaciju. Postoje dokazi koji porođaj opisuju kao stanje sa povišenim proinflamatornim faktorima, samim tim i NFkB. Posledično, inhibicija PR-B indukovana porastom koncentracije NFkB izaziva početak porođaja. Ispitivanja *in vitro* ukazuju da u kulturi imortalizovanih ćelija miometrijuma proinflamatorni citokini povećavaju eksprimiranje PR-A, a samim tim povećavaju i njihov kapacitet da blokiraju aktivnost PR-B.

#### 11.2.2.2. Uloga CRH u kontroli porođaja

Kod primata, koncentracija CRH poreklom iz posteljice raste tokom trudnoće što ukazuje i na njegovu moguću ulogu u porođaju. Koncentracija CRH u krvi trudnice i brzina porasta CRH sa napretkom trudnoće je parameter na osnovu koga može da se predvidi dužina trudnoće. Koncentracija CRH posebno je visoka u trećem trimestru. CRH raste u serumu majke počevši od približno 16. nedelje, a povećava se bržim tempom u poslednjih 6–8 nedelja trudnoće. Eksponencijalni rast CRH u krvi trudnice u uznapređaloj trudnoći je povezan za padom koncentracije CRH-BP u kasnoj trudnoći. To ukazuje na povećanje biodostupnosti CRH na početku

porođaja. CRH bi mogao da bude direktno uključen u početak porođaja kod žena preko modulacije kontrakcija miometrijuma. Receptori za CRH su identifikovani u miometrijumu i fetalnoj membrani. Istraživanja *in vitro* pokazuju da CRH stimuliše oslobađanje prostaglandina iz decidue i amniona, i pojačava efekte oksitocina i  $\text{PGF}_{2\alpha}$  na kontraktilnost miometrijuma. U mirujućem miometrijumu, CRH izaziva povećanje koncentracije cAMP što obezbeđuje relaksaciju. Nasuprot tome, njegov kapacitet da povećava nivo cAMP u miometrijumu se smanjuje tokom porođaja. U terminu pod uticajem oksitocina dolazi do smanjenja biološke aktivnosti CRH receptora i smanjenja koncentracije cikličnog adenzin monofosfata čime se favorizuju kontrakcije. Na koncentraciju cAMP utiče aktivnost fosfodiesteraze (engl. *phosphodiesterase*, PDE). Predpostavlja se da u terminskim trudnoćama usled visoke koncentracije CRH dolazi do povećane aktivnosti PDE i time se dejstvo agonista koji aktiviraju dejstvo cAMPa smanjuje. CRH, preko različitih podtipova receptora, tada je u stanju da pojača kontraktilni odgovor miometrijuma. Da li promene u receptorima za CRH utiču na ovu tranziciju i početak porođaja ostaje da se utvrdi. Drugim rečima, tokom najvećeg dela trudnoće, CRH doprinosi relaksaciji miometrijuma, a ovaj efekat se smanjuje tokom porođaja.

U posteljici se produkuje CRH koji može da ima efekat na aktivnost fetoplacentalne jedinice. CRH stimuliše fetalne nadbubrežne žlezde da produkuju kortizol koji zatim stimuliše produkciju CRH od strane posteljice odnosno dolazi do formiranja pozitivne povratne sprege između CRH iz posteljice i nadbubrežnih žlezdi fetusa. Ostala gestacijska tkiva koja su takođe ciljani za CRH su posteljica, fetalne membrane i nadbubrežne žlezde fetusa, gde CRH može regulisati različite fiziološke funkcije, od kontrole vaskularnog tonusa do nadbubrežne steroidogeneze uključujući i sintezu, ali i aktivnosti prostaglandina. Povećanje proizvodnje glukokortikoida može se takođe javiti usled stimulacije nadbubrežne žlezde. Poznato je da su glukokortikoidi odgovorni za sazrevanje pluća fetusa. Dakle, CRH dovodi do sazrevanja pluća fetusa, a samim tim i stvaranja okidača za početak porođaja. Pored toga, CRH može da poveća ACTH iz hipofize koji stimuliše produkciju kortizola i DHEA-S koji je prekursor za sintezu estradiola.

### 11.2.2.3. Uloga prostaglandina

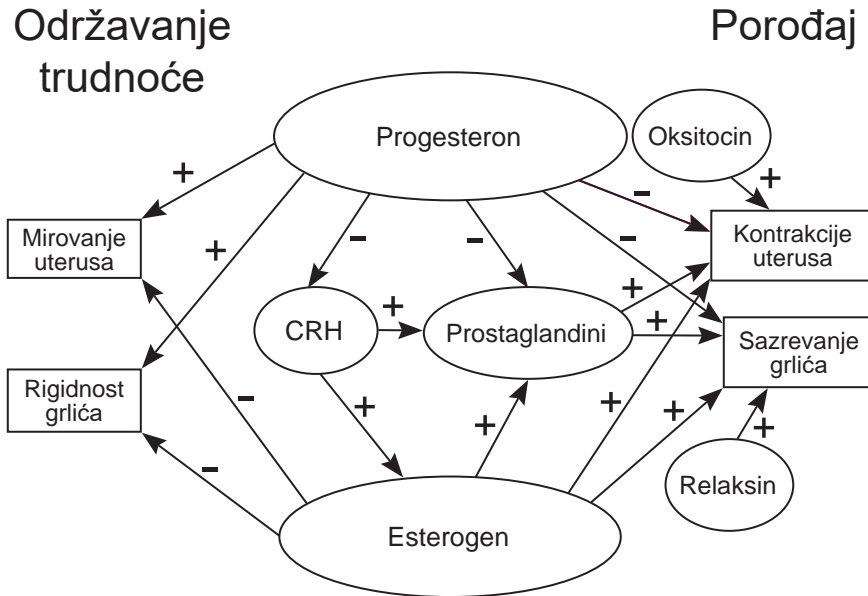
Prostaglandini se formiraju od arahidonske kiseline delovanjem enzima ciklooksigenaza, COX-1 i COX-2. Prostaglandini su zajedno sa oksitocinom endogeni uterotonici koji stimulišu kontrakcije miometrijuma. Inhibicija sinteze prostaglandina aspirinom ili drugim inhibitorima produžava trudnoću. Produkcija PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub> u kasnoj trudnoći povezana je sa porođajem. Regulacija produkcije prostaglandina u materici je važan faktor u porođaju kod žene. Limitirajući korak u biosintezi prostaglandina je reakcija katalizovana enzimima COX-1 i COX-2. COX-1 se eksprimira konstitutivno u najvećem broju tkiva, dok se COX-2 indukuje pod dejstvom različitih faktora. Produkcija prostaglandina tokom trudnoće rezultat je delovanja kompleksa parakrinih i autokrinih faktora. Epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*, *EGF*), transformišući faktor rasta (*TGFα*) i CRH stimulišu produkciju prostaglandina u plodovim ovojnicama i decidui. Plodove ovojnice, amnion i horion proizvode aktivin i inhibin, a aktivin stimuliše oslobađanje PGE<sub>2</sub> iz ćelija amniona. Pre porođaja sinteza prostaglandina odvija se najviše u amnionu, a u mnogo manjoj meri i u horionu, dok se u decidui i miometrijumu sintetiše vrlo malo prostaglandina. Takođe, tokom trudnoće u horionu je velika aktivnost enzima prostaglandin dehidrogenaze (engl. *prostaglandin dehydrogenase*, PGDH) koja prevodi prostaglandine, PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub>, u neaktivna metabolite, tako da vrlo malo prostaglandina koji se sintetiše u plodovim ovojnicama stiže do miometrijuma. Slika se menja tokom porođaja. Povećava se aktivnost COX-2 u horionu, kao i u decidui i miometrijumu. Istovremeno se u horionu smanjuje aktivnost PGDH, te se mnogo manje prostaglandina prevodi u neaktivne forme. Stoga, veća količina PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub> stiže do miometrijuma. Eksperimentalni rezultati ukazuju da progesteron povećava aktivnost PGDH, a inhibiše COX-2. Nasuprot tome, kortizol, CRH i određeni citokini imaju obrnut efekat.

Lokalna primena PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> se klinički koristi za izazivanje sazrevanja grlića materice. PGF<sub>2α</sub> povećava ukupnu aktivnost glikozaminoglikana. PGE<sub>2</sub> proširuje male krvne sudove grlića materice. PGE<sub>2</sub> dovodi do cervikalnog sazrevanja povezanog sa degradacijom kolagena. Kod nas u primeni je preparat *Prepidil gel* koji se aplikuje intracervikalno u

sterilnim uslovima kod nepovoljnog akušerskog nalaza, a radi indukcije porođaja.

#### 11.2.2.4. Uloga oksitocina

Oksitocin je jedan od najpotentnijih uterotonika, ali nije najvažniji. Često nazivan „hormonom ljubavi“, oksitocin je povezan sa osećanjima povezanosti i majčinstva. Spontano se izlučuje iz zadnjeg režnja hipofize. Pacijentkinje koje su imale hipofizektomiju takođe su se porođale, što je dokaz da nije esencijalan. Koristi se u kliničkoj praksi za indukciju porođaja. Njegova uloga je izazivanje snažnih kontrakcija koje pomažu u stanjivanju i širenju grlića materice, pomeranju bebe nadole i van porođajnog kanala, istiskuju placentu i ograničavaju krvarenje na mestu placentice. Oksitocin je nanopeptid koji tokom trudnoće produkuje posteljica. Koncentracija u krvi trudnice se povećava u drugoj fazi porođaja. Oksitocin sintetisan u materici, parakrinim mehanizmom reguliše kontrakcije i porođaj. Inhibicija dejstva oksitocina primenom antagonista smanjuje kontraktilnost materice u slučaju prognoze za prevremeni porođaj. Aktivnost oksitocina može da se reguliše na nivou ciljnog tkiva promenom eksprimiranja receptora za oksitocin. Kako se približava porođaj, tako raste eksprimiranje receptora za oksitocin. Kao što je ranije rečeno, estrogene povećavaju eksprimiranje oksitocina u placenti, kao i receptora za oksitocin u miometriju. Istezanje cerviksa izaziva oslobađanje oksitocina iz zadnjeg režnja hipofize preko neuroendokrinog refleksa (Fergusonov refleks). Oksitocin iz hipofize učestvuje u svim fazama porođaja i lučenju mleka.



**Slika 11.3.** Šema endokrinološke kontrole trudnoće i porođaja kod žena. Preuzeto sa: [https://www.researchgate.net/publication/239942566\\_Endocrinology\\_of\\_parturition](https://www.researchgate.net/publication/239942566_Endocrinology_of_parturition)

Oksitocin izaziva kontrakcije materice na dva načina (Slika 11.3). Oksitocin stimuliše oslobađanje  $\text{PGE}_2$  i  $\text{PGF}_{2\alpha}$  u fetalnim membranama aktivacijom fosfolipaze C (engl. *phospholipase C*, PLC). Prostaglandini stimulišu kontraktilnost materice. Oksitocin takođe može direktno da izazove kontrakcije miometrijuma preko PLC, što zauzvrat aktivira  $\text{Ca}^{2+}$  kanale u ćelijskoj membrani kao i oslobađanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz endoplazmatskog retikuluma.

Nakon porođaja, nastavlja se sa primenom infuzije sa Syntocinom (oksitocin) kako bi se kontrolisalo krvarenje i stimulisala involucija materice.

### 11.2.2.5. Ostali hormoni

Sa povećanjem inteziteta kontrakcija oslobađaju se prirodni hormoni za ublažavanje bolova. Poznati kao beta-endorfini, slični su lekovima kao što je morfijum i deluju na iste receptore u mozgu. Osim što ublažavaju bol, oni mogu izazvati osećaj ushićenja i sreće kod majke. Visok nivo endorfina tokom porođaja može proizvesti izmenjeno stanje svesti koje može pomoći da se pacijentkinje lakše nose sa procesom porođaja, čak i ako je

dug i izazovan. Prilikom same ekspulzije ploda majčino telo oslobađa velike količine adrenalina i noradrenalina – takozvanih hormona „bori se ili beži“. Nalet ovih hormona neposredno pred ekspulziju izazivaju nalet energije kod majke i nekoliko veoma jakih kontrakcija, koje pomažu da se beba rodi.

Još jedan hormon koji se pominje je relaksin. Njega luči žuto telo, a zatim placenta i pomaže u pripremi majčinog tela za porođaj. Povećava elastičnost simfize pubis zgloba i karličnih ligamenata, stvarajući prostor za rastući fetus i omogućavajući proširenje karličnog izlaza za porođaj. Relaksin takođe pomaže u širenju grlića materice tokom porođaja. Za razliku od navedenih hormona koji povoljno utiču na porođaj, adrenalin ga usporava. Adrenalin sa druge strane može imati i suprotan efekat, u nepovoljnim situacijama. Žene koje se osećaju ugroženo tokom porođaja mogu proizvesti visok nivo adrenalina. Adrenalin može usporiti porođaj ili ga potpuno zaustaviti. Previše adrenalina može izazvati uznemirenost bebe pre porođaja, izazvati prestanak kontrakcija, usporavanje ili nepravilan obrazac i time produžiti porođaj. Adrenalin se može povećati kada majka paniči ili doživi pojačan bol. Adrenalin se često povećava kod žena, kada one dobiju informaciju od zdravstvenih radnika o potrebi za instrumentalnim ili hirurškim završavanjem porođaja. Povećanjem adrenalina, smanjuje se efekat oksitocina i telo reaguje kao da je napadnuto. U tim stanjima obezbeđuje se dodatni dotok krvi u noge, ruke i srce, pripremajući ga da se bori ili beži od opasnosti. Adrenalin smanjuje dotok krvi u matericu i probavni sistem, šaljući više krvi u delove tela koji spasavaju život kada je u opasnosti. Jednom kada se adrenalin oslobodi u telu, smanjeni protok krvi u matericu dovodi do toga da se manje kiseonika doprema u matericu, što otežava porođaj, čini ga bolnijim i dužim.

#### **11.2.2.6. Promene na nivou grlića materice i miometrijuma**

Za uspešno održavanje trudnoće neophodno je blokiranje spontanijih kontrakcija miometrijuma i zatvoreni kanal grlića materice. Prilikom porođaja dolazi do fizioloških promena na grliču materice i miometrijumu. Grlič materice ima izuzetno važnu ulogu u zadržavanju fetusa unutar materice, a to se postiže zahvaljujući njegovoj građi. Grlič materice je bogat

kolagenim vlaknima i proteoglikanima koji imaju sposobnost odupiranja pritisku. Omekšavanje grlića materice se postiže promenama u unutar ćelijskom matriksu, odnosno dolazi do redukcije kolagena i povećanja nivoa glukozaminoglikana koji onemogućavaju stvaranje agregata između preostalih kolagenih vlakana. "Omekšavanju" grlića materice doprinose i metaloproteinaze, a zapažen je i prliv proinflatornih citokina kao što su interleukini (IL) 2 i 8. Prostaglandini,  $\text{PGE}_2$  i  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , utiču na "omekšavanje" grlića materice, kao i NO koji stimuliše lokalno oslobađanje prostaglandina.

U toku trudnoće dolazi do promena u veličini ćelija miometrijuma, odnosno do njihove hipertrofije. Ove ćelije se uvećavaju za oko 10 puta (sa 50  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$ ) i povećavaju se rezerve glikogena. Ćelije su povezane neksusima i ponašaju se kao funkcionalni sincicijum.

Pred porođaj nastaju promene u tonusu miometrijuma koje omogućavaju koordinisane kontrakcije. Ove kontrakcije moraju biti periodične, a ne konstantne, kako ne bi došlo do prekida u snabdevanju krvlju. Takođe, kontrakcije moraju biti prostorno organizovane tako da kontrakcije u delu oko grlića materice ne spreče ulazak fetusa u porođajni kanal. Kontraktilnost ćelija miometrijuma zavisi od unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  odnosno njegovog oslobađanja iz endoplazmatičnog retikuluma kao i ulaska iz vanćelijskog prostora.

Kontraktilnost miometrijuma kontrolišu progesteron, estradiol, prostaglandini i oksitocin. Progesteron stabilise membranski potencijal mišićnih ćelija. Prostaglandini,  $\text{PGE}_2$  i  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , pojačavaju ulazak vanćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$ . Oksitocin stimuliše oslobađanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz endoplazmatičnog retikuluma. Prostaglandin  $\text{I}_2$  ( $\text{PGI}_2$ ) izaziva relaksaciju miometrijuma, i omogućava smenu kontrakcija i relaksacija i dotok krvi do fetusa. Steroidni hormoni modulišu dejstvo prostaglandina i oksitocina na miometrijum. Kod ovce estradiol povećava broj receptora za oksitocin u endometrijumu, dok progesteron ima obrnuti efekat. Isti efekat zapažen je i na materici žene. Kao što je rečeno receptori za oksitocin su deo CAP. Oksitocin direktno stimuliše oslobađanje prostaglandina. Istezanje materice takođe stimuliše povećanje broja receptora za prostaglandine i oksitocin, ali samo u uslovima niskih nivoa progesterona. Oksitocin se oslobađa iz neurohipofize stimulacijom grlića materice i kontrakcijama miometrijuma, a na njegovo oslobađanje takođe utiče i odnos estradiola i progesterona.



Istezanje materice takođe može da izazove porođaj. Pokazano je da kod pacova istezanje materice kod ženki u ciklusu izaziva promene u eksprimiranju gena koji kodiraju proteine uključene u povećanje kontraktilnosti miometrijuma. Stimulatorni efekat istezanja na eksprimiranje ovih gena konstatovan je i u kulturi miometrijalnih ćelija žena.

### 11.2.2.7. Prevrmeni porođaj

Prevrmeni porođaj je povezan sa povećanim nivoom relaksina u cirkulaciji. Žene koje imaju superovulaciju sa humanim menopauzalnim gonadotropinima za indukciju ovulacije ili u sklopu vantelesne oplodnje imaju značajno veći rizik od prevremenog porođaja. Ove žene, koje imaju višestruka žuta tela, imaju značajan nivo hiperrelaksinemije. Logistička regresiona analiza je pokazala da je stepen hiperrelaksinemije kod ovih žena povezan sa povećanim nivoom nedonoščadi. Dodatna podrška ulozi relaksina kod nedonoščadi je to što u spontanim trudnoćama žene koje su predodređene za prevremeni porođaj imaju više nivoe relaksina u 30. nedelji trudnoće nego žene koje su rodile u terminu. Potencijalni mehanizam za ovaj odnos može biti dejstvo relaksina na grlić materice.

Relaksin je povezan sa omekšavanjem grlića materice. Receptori za relaksin su prisutni na grliću materice. Neki od efekata relaksina uključuju stimulaciju prokolagenaze i prostromelizina, kao i smanjenje TIMP-1 (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase 1*). Relaksin je takođe sposoban da inhibira kontrakcije humanih miometrijalnih vlakana kod žena koje nisu trudne. Paradoksalno, relaksin ne inhibira kontrakcije miometrijuma gravidnih žena. Ovo može biti zbog kompetitivnih efekata progesterona.

Žene koje su predodređene za prevremeni porođaj imaju viši nivo CRH sredinom trudnoće od onih koje se porođaju u terminu. Ovaj viši nivo CRH može se koristiti kao marker za žene sa rizikom od prevremenog rođenja. Povišeni CRH može ubrzati tajming procesa porođaja.

Istezanje materice takođe može da izazove prevremeni porođaj. Najnoviji rezultati Barnett i sar. (2023) ukazuju da miometrijum materice žena koje su imale prevremen porođaj ima daleko manje mehanosenzitivnih kanala Piezo 1 u odnosu na miometrijuma materice žena koje su imale porođaj u terminu. Na osnovu eksperimenata na primarnoj kulturi endotel-

nih i mišićnih ćelija miometrijuma pretpostavili su da mehanosenzitivni kanali Piezo 1 doprinose relaksaciji miometrijuma tokom trudnoće i da predstavljaju molekularnu kapiju koja moduliše reaktivnost miometrijuma na istezanje.

### 11.3. LAKTACIJA

Tokom trudnoće, dojke su izložene visokim nivoima hormona koji imaju laktogeno dejstvo, kao što su prolaktin (PRL), hPL i hPGH. Ovi hormoni mogu da aktiviraju receptore za prolaktin. U trećem trimestru, nivo PRL je oko 15 puta veći u odnosu na nivo kod žene koja nije trudna, a hPL dostiže nivoe od oko 6000 ng/ml. Međutim, tokom trudnoće visoke koncentracije progesterona blokiraju produkciju mleka. Nakon porođaja, smanjenje nivoa estradiola i progesterona i porast nivoa PRL dovodi do produkcije mleka u narednih 2–5 dana.

Posle porođaja pada i nivo PRL, ali mnogo sporije. U odsustvu dojenja, sekrecija mleka trajeće 3–4 nedelje, sve dok je nivo PRL iznad normalnih vrednosti. Za održavanje povišenog nivoa PRL neophodna je stimulacija bradavica. Stimulacija bradavica preko neuroendokrinog refleksa izaziva povećanu sekreciju PRL. Stimulacija bradavica aktivira receptore za dodir, završetke senzornih neurona koji 4, 5. i 6. torakalnim nervom ulaze u kičmenu moždinu, ushodnim putevima dolaze do moždanog stabla, a zatim do hipotalamusa gde izazivaju smanjenje aktivnosti tuberoinfundibularnih dopaminergičkih neurona. Obzirom da dopamin inhibiše oslobađanje PRL, blokada ovih neurona izaziva povećanu sekreciju ovog hormona, kao odgovor na stimulaciju mehanoreceptora u bradavicama. PRL stimuliše sintezu kazeina i laktalbumina, zatim masnih kiselina i laktoze.

Stimulacija bradavica u toku sisanja aktivira receptore za dodir, a senzorni neuroni prenose informaciju do supraoptičkog i paraventrikularnog jedra gde se nalaze neuroni koji sintetišu oksitocin. Aktivacija ovih neurona dovodi do nastajanja akcionih potencijala koji se prostiru do završetaka aksona smeštenih u neurohipofizi. Dolazi do oslobađanje oksitocina u opštu cirkulaciju. Oksitocin, delujući na nivou mioepitelijalnih ćelija mlečnih žlezda, dovodi do kontrakcija ovih ćelija i lučenja mleka. Oksitocin, delujući preko svojih receptora koji aktiviraju fosfolipazu C, katališe sintezu inozi-

tol-3-fosfata i diacilglicerola. Povećanje koncentracije unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  i aktivacija protein kinaze C stvaraju uslove za kontrakciju mioepitelijalnih ćelija i sekreciju mleka u mlečne kanale, pri čemu se stvara pritisak u doj-kama. Oslođavanje oksitocina se može indukovati i alternativno, bebinim plačem ili stimulacijom ženskog reproduktivnog trakta (posebno vagine i grlića materice), pri čemu dolazi do lučenja mleka i bez stimulacije mehanosenzitivnih završetaka senzitivnih neurona u bradavicama.

## 11.4. LITERATURA

- Barnett SD, Hazik A, and Buxton ILO (2023) Novel identification and modulation of the mechanosensitive Piezo1 channel in human myometrium. *J Physiol* 601:1675–1690.
- Barry JS, Anthony RV (2008) The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology* 69:55–67.
- Brown AG, Leite RS, Strauss JF 3<sup>rd</sup> (2004) Mechanisms underlying “functional” progesterone withdrawal at parturition. *Ann N Y Acad Sci* 1034:36–49.
- Chan WY, Powell AM, Hruby VJ (1982) Antioxytotic and antiprostaglandin-releasing effects of oxytocin antagonists in pregnant rats and pregnant human myometrial strips. *Endocrinology* 111:48–54.
- Gerson Weiss (2000) *Endocrinology of Parturition*. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4421–4425.
- Grammatopoulos DK, Hillhouse EW (1999) Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet* 354:1546–1549.
- Gurung A, Wrammert J, Sunny AK, Gurung R, Rana N, Basaula YN, Paudel P, Pokhrel A, Ashish KC (2020) Incidence, risk factors and consequences of preterm birth – findings from a multi-centric observational study for 14 months in Nepal. *Arch Public Health* 78:64.
- Leake RD, Weitzman RE, Glatz TH, Fisher DA (1981) Plasma oxytocin concentrations in men, nonpregnant women, and pregnant women before and during spontaneous labor. *J Clin Endocrinol Metab* 53:730–733.
- Liggins GC, Fairclough RJ, Grieves SA, Forster CS, Knox BS (1977) Parturition in the sheep. *Ciba Found Symp* 47:5–30.
- Lindström TM, Bennett PR (2005) The role of nuclear factor kappa B in human labour. *Reproduction* 130:569–581.
- Mesiano S (2019) *Endocrinology of human pregnancy and fetal-placental neuroendocrine development*. U: Strauss JF i Barbieri RL, ur., Yen & Jaffe’s Reproductive Endocrinology, 8. izdanje, Elsevier, 256–284.
- Albrecht ED i Pepe GJ (2015) *Placental endocrine function and hormone action*. U: Plant TM i Zeleznik AJ, ur., Knobil and Neill’s physiology of reproduction, Elsevier, 1783–1834.

- Mesiano S, De Franco E, Muglia LJ (2015) Parturition. U: Plant TM i Zeleznik AJ, ur., Knobil and Neill's physiology of reproduction, Elsevier, 1875–1925.
- Johnson MH (2013) Essential Reproduction. 7. izdanje. John Wiley&Sons, 212–221; 245–274.
- Barbieri RL (2019) Breast. U: Strauss JF i Barbieri RL, ur., Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology, 8. izdanje, Elsevier, 248–255.
- Taylor HS, Pal L i Seli E (2019). The endocrinology of pregnancy. U: Speroff's Gynecological Endocrinology and Infertility, 9. izdanje, Wolters Kluwer, p. 196–250
- Murray D. Mitchell (1994) The initiation of parturition. *Current Obstetrics & Gynaecology* 4:74–78.
- Navitsky J, Greene JF, Curry SL (2000) The onset of human labor: current theories. *Primary Care Update for OB/GYNS* 7:197–199.
- Neulen J, Breckwoldt M (1994) Placental progesterone, prostaglandins and mechanisms leading to initiation of parturition in the human. *Exp Clin Endocrinol* 102:195–202.
- Olson DM, Skinner K, Challis JR (1983) Prostaglandin output in relation to parturition by cells dispersed from human intrauterine tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 57:694–699.
- Petrović Đ (2017) Normalni porođaj. U: Novakov Mikić A, Vejnović T, ur., Akušerstvo. Novi Sad: Medicinski fakultet, 213–221.
- Sennström MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G, Malmström A, Byström B, Endrésen U, Mlambo N, Norman M, Ståbi B, Brauner A (2000) Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod* 6:375–381.
- Steer P, Flint C (1999) ABC of labour care: physiology and management of normal labour. *BMJ* 318(7186): 793–796.
- Thomas DB "lactation", *Encyclopedia Britannica*, <https://www.britannica.com/science/lactation>, pristupljeno 5. 9. 2023.
- Tyson EK, Smith R, Read M (2009) Evidence that Corticotropin-Releasing Hormone Modulates Myometrial Contractility during Human Pregnancy. *Endocrinology* 150:5617–5625.
- Weiss G, Goldsmith LT, Sachdev R, Von Hagen S, Lederer K (1993) Elevated first-trimester serum relaxin concentrations in pregnant women following ovarian stimulation predict prematurity risk and preterm delivery. *Obstet Gynecol* 82:821–828.
- Wetzka B, Sehringer B, Schäfer WR, Biller S, Hör C, Benedek E, Deppert WR, Zahradnik HP (2003) Expression patterns of CRH, CRH receptors, and CRH binding protein in human gestational tissue at term. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111:154–61.

**Vladislav Volarević**  
**Marina Gazdić**

---

# **12.**

# **IMUNOLOGIJA**

# **TRUDNOĆE**

---



Trudnoća je prirodan proces koji se smatra velikim imunološkim izazovom za imunski sistem majke, imajući u vidu da fetus kao „alotransplantat“ eksprimira i majčinske i očinske antigene. Za uspešnu trudnoću i terminski porođaj, neophodno je uspostavljanje imunske tolerancije na fetus, koji postaje imunoprivilegovan, čime se rizik od odbacivanja ploda od strane imunskog sistema majke svodi na minimum. U imunskom sistemu majke se tokom trudnoće dešavaju brojne promene kako bi se majka i fetus zaštilili od patogena, ali uz istovremeno sprečavanje preteranog imunskog odgovora koji bi bio štetan po fetus. Iako postoji malo dokaza koji ukazuju da je imunski odgovor majke suprimiran tokom trudnoće, povećan rizik za određene vrste infekcija ukazuje na značajne kvalitativne promene imuniteta. Ipak, imajući u vidu složene okolnosti koje prate normalnu trudnoću, povećan rizik za infekcije treba pažljivo razmatrati kao posledicu ne samo imunskih već i specifičnih endokrinoloških i fizioloških promena. Na primer, infekcije urinarnog trakta mogu biti češće ili pneumonija može biti teža tokom trudnoće, uglavnom zbog promena u cirkulaciji i smanjenog funkcionalnog rezidualnog kapaciteta pluća usled povećanog abdominalnog pritiska. Druge vrste infekcija se jednostavno češće prijavljuju zbog rizika od kliničkih posledica na fetus. Bolje razumevanje imunskih promena tokom trudnoće takođe može biti važno u razmatranju optimalnih strategija za upotrebu vakcina (na primer protiv gripa i pertusisa), kako bi se zaštilili i trudnica i dete.

U ovom poglavlju opisane su dinamičke promene koje se dešavaju u imunskom sistemu majke tokom normalne trudnoće.

## **12.1. KARAKTERISTIKE UROĐENOG IMUNSKOG ODGOVORA U TRUDNOĆI**

### **12.1.1 Sistem komplementa**

Koncentracije komponenti komplementa C3a, C4a, C5a, C4d, C3a, C3, C9 u plazmi i SC5b9 su povećane tokom trudnoće. Ovo povećanje zastupljenosti komponenti komplementa sugeriše na povećanu aktivnost komplementa kod trudnica, dok se ravnoteža održava visokim nivoima regulatornih proteina kao što je faktor N koji blokira alternativnu C3 kon-

vertazu. U skladu sa ovim, pokazano je i povećano prisustvo inhibitora komplementa – faktora ubrzanja razgradnje (engl. *decay accelerating factor*, DAF), takođe poznatog kao CD55, u mononuklearnim ćelijama periferne krvi tokom trudnoće. Blokirajući formiranje C3 konvertaza, DAF efikasno inhibira dalju aktivaciju komplementa. Slično tome, S3 inhibitor trudnoće plazma protein A (PAPPA) se povećava tokom drugog i trećeg trimestra. Hemolitička aktivnost komplementa (engl. *complement hemolytic activity*, CH50) odražava aktivnost klasičnog puta komplementa. Serumski CH50 se povećava kako trudnoća napreduje. Povećana aktivnost komplementa je povezana sa preeklampsijom i prevremenim porođajem, što ukazuje da je kontrolisana aktivnost sistema komplementa neophodna za zdravu trudnoću.

Trudnoća je hiperkoagulabilno stanje, sa četiri puta većim rizikom od duboke venske tromboze u poređenju sa ženama koje nisu trudne. Pokazano je da postoji interakcija između proteina akutne faze, koagulacije i sistema komplementa. Koncentracija C-reaktivnog proteina (engl. *C-reactive protein*, CRP) u serumu je povišena tokom trudnoće, osim toga ovaj protein aktivira komponente C1, C4, C2 i C3. Fibrinogen i faktor VII su deo kaskade koagulacije koja nezavisno aktivira sistem komplementa, na primer, pokazano je da trombin cepa C3 i C5. Fibrinogen i faktor VII takođe su povećani tokom trudnoće, što dodatno potvrđuje činjenicu da se sistem komplementa aktivira u trudnoći. Visokim nivoima prokoagulantnih faktora suprotstavljaju se povećani nivoi glikoproteina specifičnih za trudnoću koje produkuje placenta, čime se sprečava aktivacija trombocita posredstvom integrina.

### 12.1.2. Granulociti

Trudnoća ne utiče na broj eozinofila i bazofila, međutim, tokom drugog i trećeg trimestra, u urinu je povećana koncentracija neurotoksina koje sekretuju eozinofili, što ukazuje na intenzivnu degranulaciju ovih ćelija. Nasuprot tome, koncentracija N-metilhistamina u urinu je snižena u trećem trimestru, što ukazuje na smanjenu degranulaciju mastocita.

Neutrofilni uništavaju mikroorganizme fagocitozom, neutrofilnim vanćelijskim zamkama (engl. *neutrophil extracellular traps*, NET), produkcijom



toksičnih granula i reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Već od prvog trimestra počinje postepeno i značajno povećanje broja neutrofila. U skladu sa tim, koncentracije G-CSF (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*) i GM-CSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), citokina koji direktno kontrolišu stvaranje neutrofila u kostnoj srži, takođe su povišene tokom trudnoće. Funkcija neutrofila isto može biti promenjena tokom trudnoće. Neutrofili su ćelije sa visokim energetskim potrebama koje zavise od glikolize, dok kiseonik koriste za proizvodnju reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta u mitohondrijama. Da bi se zadovoljile njihove metaboličke potrebe, glukoza se metaboliše preko heksoza monofosfatnog puta, kojim se proizvodi NADPH. Aktivacija neutrofila uzrokuje translokaciju enzima do ćelijske membrane gde oni formiraju enzimske komplekse, povećavajući efikasnost anaboličkih procesa. Neutrofile trudnica karakteriše retrogradni transport ovih metaboličkih enzima do centrozoma, što ukazuje na aktivnu prevenciju metaboličke regulacije: glukozo-6-fosfat dehidrogenaza i 6-fosfoglukonat dehidrogenaza ostaju funkcionalne u neutrofilima tokom trudnoće, ali pošto je njihova aktivnost ograničena na citoplazmu, metabolički put je prigušen. Ovo objašnjava zašto *in vitro* aktivirani neutrofili trudnica pokazuju manji respiratorni prasak i veću otpornost na stimulaciju citokinom IFN- $\gamma$ . Nasuprot tome, nestimulisani neutrofili trudnica imaju povećanu oksidativnu aktivnost i produkuju nivoe ROS koji su uporedivi sa stimulisanim neutrofilima kod žena koje nisu trudne. Osim proizvodnje ROS, neutrofili tokom trudnoće kontinuirano povećavaju proces NET-oze. Pomenute *in vitro* studije ukazuju da je tokom trudnoće bazalna funkcija neutrofila povećana u mirovanju, dok je nakon stimulacije smanjena. Razlika između nestimuliranih i aktiviranih neutrofila može objasniti naizgled kontradiktorne podatke o aktivnosti neutrofila tokom trudnoće. Povećana bazalna aktivnost neutrofila u trudnoći može biti posledica efikasnije lokalizacije citoplazmatskog enzima mijeloperoksidaze na površini ćelijske membrane nakon stimulacije. Konstitutivna ekspresija enzima na površini ćelije tokom trudnoće može uzrokovati kontinuiranu produkciju ROS bez potrebe za ponovnom stimulacijom.

Brojne studije su potvrdile izmenjenu fagocitozu neutrofila tokom trudnoće. Elastaza i laktoferin se luče iz primarnih, odnosno sekundarnih

granula neutrofila, i povišene su u prvom trimestru. Dok povišeni nivoi mogu ukazivati na povećanu aktivnost neutrofila, količina proteina elastaze ili laktoferina po pojedinačnom granulocitu je nepromenjena ili čak niža kako trudnoća napreduje. Dakle, povišeni nivoi pomenutih enzima u plazmi mogu da odražavaju povećan broj granulocita tokom trudnoće. Ekspresija aktivacionog markera humanog neutrofilnog antigena-2a (engl. *human neutrophil antigen-2a*, HNA-2a), takođe poznatog i kao CD177, povećava se tokom trudnoće i ostaje povišena još četiri do osam nedelja nakon porođaja. S druge strane, prisustvo markera aktivacije CD11b, CD15, CD18 i CD62L na membrani neutrofila se ne razlikuje između trudnica i žena koje nisu trudne. Pokazano je da je ekspresija markera zrelosti neutrofila CD16 i HLA-DR smanjena na granulocitima trudnica, dok je u drugoj studiji pokazana povećana ekspresija CD11b na granulocitima u kasnoj trudnoći. Nije zabeležena značajna razlika u relativnoj ekspresiji mRNK za TLR2 i TLR4 između ispitivanih grupa. Nasuprot tome, ekspresija koreceptora za TLR4- CD14 i Fc receptora CD64 je povišena na granulocitima u drugom i trećem trimestru, potvrđujući povećanu aktivaciju neutrofila tokom trudnoće. Može se zaključiti da je aktivacija neutrofila tokom trudnoće povećana, ali da je njihov potencijal da izvrše efektorske funkcije (npr. prezentacija antigena) značajno ograničen.

### 12.1.3. Monociti

Kod ljudi su okarakterisane tri frakcije monocita. Klasični monociti (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>) su glavna podskupina u perifernoj krvi zdravih odraslih osoba (~80% svih monocita) i imaju fagocitne funkcije. Neklasični, inflamatorni monociti (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>) su prisutni u velikom broju u perifernoj krvi odraslih koji boluju od hroničnih ili akutnih inflamacijskih bolesti. Monociti fenotipa CD14<sup>high</sup>CD16<sup>intermediate</sup> predstavljaju prelazno stanje, pokazujući i inflamatorni i fagocitni kapacitet. Monociti takođe prezentuju antigene T limfocitima, stoga moduliraju adaptivni imunski odgovor.

Broj monocita se povećava tokom trudnoće, počevši od prvog trimestra. Ovo povećanje je uglavnom na račun povećanja broja „intermedijarnih“ monocita, dok se broj klasičnih monocita smanjuje, bez promene u zastupljenosti neklasičnih inflamatornih monocita. Povećanje broja monocita

intermedijarnog fenotipa moglo bi da objasni povećanu produkciju IL-12 i TNF- $\alpha$  kod trudnica kao i smanjene fagocitoze tokom trudnoće. Povećanu proinflamatornu aktivnost monocita dodatno potvrđuju veća ekspresija aktivacionih markera CD11a, CD11b, CD14 i CD64 i veća produkcija ROS u monocitima trudnica. Povećan broj neklasičnih monocita i povišena aktivacija monocita mogu biti delimično uzrokovani i produktima placente i hormonskim promenama u trudnoći. Naime, ekstracelularne vezikule koje stvara placenta indukuju sazrevanje monocita i njihovu aktivaciju *ex vivo*.

Sa druge strane, rezultati pojedinih studija ukazuju da su monociti kod trudnica antiinflamatorni i pokazuju fenotipske znake tolerancije na endotoksine. U perifernoj krvi trudnica je u trećem trimestru, proizvodnja IL-12 i TNF- $\alpha$  od strane monocita stimulisanih LPS-om značajno smanjena u poređenju sa kontrolnom grupom. Pored toga, u prvom trimestru trudnoće ekspresija gena koji kodiraju HLA molekule je smanjena u monocitima kao i površinska ekspresija MHC molekula II klase. Sve ukazuje da se monociti tokom trudnoće nalaze u hroničnoj, blagoj inflamaciji, ali ne reaguju, što se može prevazići adekvatnom stimulacijom.

Proinflamatorno stanje je uravnoteženo povećanjem regulatornih karakteristika monocita. Ekspresija gena koji kodiraju IL-10,IDO i CD200 je povećana, dok su transkripti za IL-8 i CXCL-10 smanjeni u monocitima trudnica u prvom trimestru. Ovim je, detektovano smanjenje broja neklasičnih i povećanje broja klasičnih monocita u trećem trimestru trudnoće u poređenju sa zdravim kontrolama. Iako se navedeni rezultati čine kontradiktornim, oni jasno ukazuju da trudnoća izaziva specifične imunske promene, drugačije od imunskih reakcija u patološkim stanjima.

#### 12.1.4. Urođene limfoidne ćelije

Urođene limfoidne ćelije (engl. *innate lymphoid cells*, ILCs) ne ekspri miraju marker CD3 kao ni antigen-specifične receptore. Najbolje okarakterisana populacija ILCs su ćelije prirodne ubice (engl. *natural killer cells*, NK). U krvi, većinu NK ćelija karakteriše niska ekspresija adhezionog molekula CD56 i receptora CD16. Ove CD56<sup>dim</sup> ćelije se definišu kao citotoksične efektorske ćelije. Nasuprot tome, CD56<sup>bright</sup> NK ćelije su mnogo manje zastupljene u perifernoj krvi i pokazuju manju citotoksičnost zbog

niske ekspresije CD16, što sugerira da imaju imunomodulatorni fenotip. NKT ćelije ekspimiraju i T ćelijski receptor (TCR) i markere povezane sa NK ćelijama. NKT ćelije tipa I (klasične ili iNKT ćelije), imaju ograničenu raznolikost TCR i prepoznaju antigene ( $\alpha$ -galaktozilceramid) u sklopu CD1d molekula. NKT ćelije tipa II osim  $\alpha$ -GalCer-a prepoznaju i druge lipide molekule i imaju veću raznolikost TCR-a.

Specijalizovane NK ćelije smeštene su u decidui posteljice i neophodne su za uspešan razvoj spiralnih arterija i implantaciju fetusa u prvom trimestru trudnoće. Nasuprot tome, manje podataka ima o uticaju trudnoće na broj cirkulišućih NK ćelija. Bez obzira na smanjenje ukupnog broja NK ćelija, većina studija ukazuje da nema značajnih promena u zastupljenosti različitih podtipova NK (CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup>), invarijantnih NKT (iNKT) i NKT ćelija tipa II u perifernoj krvi trudnica. NK ćelije su podeljene na podgrupe (tip 1 i tip 2) u zavisnosti od citokina koje proizvode. Ispitivanjem površinske ekspresije IL18R1 (posredstvom IFN- $\gamma$  promoviše Th1 imunski odgovor) i IL1RL1 (aktivacija preko IL-33 promoviše urođeni imunitet), otkriveno je da se odnos NK ćelija tipa 1 i tipa 2 smanjuje u trećem trimestru u poređenju sa zdravim kontrolama. U odnosu na žene koje nisu trudne, kod trudnica je procenat ćelija koje ekspimiraju IL18R1 značajno niži u trećem trimestru trudnoće. Ekspresija homing receptora, koji su odgovorni za migraciju NK ćelija u placentu u različitim fazama trudnoće, povećana je na CD56<sup>bright</sup> NK ćelijama tipa 2 u drugom trimestru, u poređenju sa prvim i trećim. Kod CD56<sup>dim</sup> NK ćelija tipa 2 ekspresija homing receptora je najveća u trećem trimestru.

NK ćelije i monocite karakteriše povećana ekspresija proteina TIM-3 u trudnoći, usled povećanog IL-4 i niskog IFN- $\gamma$  (38). TIM-3 je važan za produkciju IFN- $\gamma$  od strane NK ćelija i može doprineti povećanju fagocitoze. Visok površinski nivo TIM-3, najverovatnije ukazuje na to da su NK ćelije u trudnoći anergične. Na povećani inflamatorni kapacitet NK ćelija tokom trudnoće ukazuje povećana ekspresija aktivacionog markera CD69 na CD4<sup>neg</sup> iNKT ćelijama kako trudnoća napreduje. Takođe, ekspresija degranulacionog markera CD107a na CD56<sup>dim</sup> ćelijama nakon stimulacije, kao i bazična ekspresija citotoksičnih markera NKp46 (CD335) i CD38 su povećane u trećem trimestru u poređenju sa ženama koje nisu trudne. Pored toga, *in vitro* odgovor NK ćelija na ćelije inficirane virusom gripa

ili ćelije raka je intenzivniji u trudnoći. Sve ukazuje na povećanu bazalnu aktivnost i povećani potencijal za snažni urođeni imunski odgovor tokom trudnoće. Nasuprot tome, produkcija IFN- $\gamma$  je smanjena, a IL-10 povećana nakon *ex vivo* stimulacije NK ćelijama izolovanih tokom prvog trimestra, u poređenju sa ženama koje nisu trudne. Ovaj antiinflamatorni kapacitet doprinosi slabljenju adaptivnog imunskog odgovora.

Necitotoksične ILCs su grupisane u tri podtipa, ILC1, ILC2 i ILC3. Ovi tipovi ćelija imaju slične funkcionalne i fenotipske karakteristike kao ćelije Th1, Th2 i Th17 tipa, lokalizovane su u placenti, ali je malo podataka o zastupljenosti ovih ćelija u drugim tkivima majke tokom trudnoće.

## 12.2. STEČENI IMUNSKI ODGOVOR U TRUDNOĆI

### 12.2.1. Fenotipske i funkcionalne karakteristike T limfocita u trudnoći

Apsolutni broj i procentualna zastupljenost T limfocita se ne razlikuje značajno tokom prvog, drugog i trećeg trimestra trudnoće, ipak broj T ćelija tokom trudnoće je manji nego pre trudnoće.

Trudnoća je takođe praćena promenom fenotipa T limfocita, iako su podaci kontradiktorni. Procentualna zastupljenost CD4+ i CD8+ T ćelija kod žena u različitim fazama gestacije se ne razlikuje značajno. Takođe, ne postoje značajne promene u procentu CD4+ ćelija, CD8+ ćelija, niti u odnosu CD4+/CD8+ u bilo kojoj fazi trudnoće. Međutim, u poređenju sa brojem pre trudnoće, broj T helpera i citotoksičnih T limfocita je manji u trećem i prvom trimestru trudnoće, dok je broj supresorskih T limfocita veći u prvom trimestru. Naime, na kraju prvog trimestra dolazi do porasta sekrecije estrogena i progesterona, koji uzrokuju reverzibilnu involuciju timusa, što bi delimično moglo da objasni uočeno smanjenje broja i CD4+ i CD8+ T limfocita.

Više studija je ispitivalo odnos Th1 i Th2 ćelija merenjem koncentracija sekretovanih Th1 ili Th2 citokina u serumu, određivanjem broja CD4+ ćelija koje proizvode Th1 ili Th2 citokine, ili ekspresijom hemokinskih receptora CXCR3 (povezanih sa Th1 ćelijama) i CCR4 (povezanih sa Th2 ćelijama) na CD4+ limfocitima. Definisane trudnoće kao Th2 stanja po-

državaju brojne studije, dok ga druge odbacuju. Činjenice u prilog toga da je trudnoća Th2 stanje su povećan nivo antiinflamatornih citokina, kao i podaci da su autoimunski poremećaji tipa Th1 i Th17 ublaženi, dok se autoimunski poremećaji Th2 tipa pogoršavaju u trudnoći (45). Dakle, kako bi se razvila lokalna imunska tolerancija materice, tokom trudnoće nastupa promena citokinskog profila od Th1 ka Th2 tipu. IL-2 i IL-12 se definišu kao Th1 citokini, dok su IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 Th2 citokini; svi navedeni igraju važnu ulogu u uspostavljanju imunske tolerancije u trudnoći. Tokom ovog perioda, makrofagi i dendritske ćelije sekretuju širok spektar citokina, hemokina i enzima koju učestvuju u održavanju tolerancije, tkivnom remodelovanju i angiogenezi. Odbacivanje fetusa kao i pretermijski porođaj su vrlo povezani sa visokim nivoom proinflamacijskih citokina. Progresivni pomak od ćelijski posredovanog, proinflamatornog Th1 odgovora ka humoralnom, antiinflamatornom Th2 odgovoru počinje rano u trudnoći i održava se četiri nedelje nakon porođaja. Procenat CD4+ ćelija koje produkuju IFN- $\gamma$  je niži u trećem trimestru, dok nisu primećene promene u procentu CD4+ T ćelijama koje proizvode IL-4. Međutim, u pojedinim studijama nije zabeležena promena u odnosu Th1/ Th2 ćelija tokom trudnoće, pri čemu je i udeo CD3+CD8-IFN- $\gamma$ + ćelija tokom trudnoće bio nepromenjen i stabilan. Dok se koncentracija proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ ) u amnionskoj tečnosti tokom trudnoće i porođaja povećava, u plazmi se koncentracija proinflamatornih citokina (IL-2 i IFN- $\gamma$ ) smanjuje, a koncentracija antiinflamatornih citokina se povećava (npr. IL-4 i IL-10).

Hormoni mogu značajno uticati na fenotipske i funkcionalne karakteristike limfocita. Nivoi estradiola u serumu se povećavaju i do pet stotina puta tokom trudnoće. Nizak nivo estradiola podstiče Th1 odgovor, dok visok estradiol promovise Th2 odgovor. Povišen progesteron inhibira Th1 odgovor tokom trudnoće i može indukovati produkciju citokina Th2 tipa (IL-4 i IL-5) dodatno pojačavajući polarizaciju Th2 imenskog odgovora. Th17 ćelije su važne u borbi protiv bakterija i gljivica. Odnos Th17 ćelija i CD4+ limfocita je sličan kao kod zdravih žena koje nisu trudne tokom svih faza trudnoće. Međutim, jedna studija je uočila smanjenje CD3+CD8-IL17+ ćelija za 60% između prvog i drugog trimestra trudnoće.

### 12.2.2. B limfociti i produkcija imunoglobulina u trudnoći

Antitela majke su glavna imunska komponenta majke koja štiti novorođenče odmah nakon rođenja. Broj B limfocita u perifernoj krvi varira tokom normalne trudnoće i perioda nakon porođaja. Smanjenje broja B limfocita u cirkulaciji je posebno izraženo tokom trećeg trimestra, što se označava kao „fiziološka“ limfopenija B ćelija, a nastaje usled delovanja povišenog estrogena na limfopoezu. Ova B ćelijska limfopenija se objašnjava i migracijom ćelija u tkiva, uključujući deciduu placente, i ukazuje da B limfociti imaju važnu ulogu u održavanju imunske tolerancije majke na antigene fetusa.

Funkcija B limfocita se takođe menja kako trudnoća napreduje. Reaktivnost na mitogene i infektivne agense se smanjuje, što može povećati rizik od infekcije. Analiza markera funkcije i aktivacije B limfocita u serumu, kao što su solubilni CD23 (sCD23) i faktor aktiviranja B ćelija (engl. *B cell activating factor*, BAFF) ukazuju na promene u biologiji B limfocita tokom trudnoće. CD23 je eksprimiran na nezrelim B limfocitima koje izlaze iz kostne srži, dok su B ćelije postgerminativnog centra negativne na CD23. Nakon aktivacije, CD23 se cepa, nastaje sCD23 koji je stabilan 12–24h, i predstavlja marker prelaska naivnih u memorijske B limfocite (engl. *memory B cells*, MVC). Kod žena koje nisu trudne, visok sCD23 je povezan sa inflamacijskim i limfoproliferativnim poremećajima, kao i sa relapsom reumatoidnog artritisa. Koncentracija sCD23 u plazmi se smanjuje tokom trećeg trimestra trudnoće, što ukazuje na slabiju konverziju naivnih u MVC i antiinflamatorno stanje u trudnoći. Nivo BAFF u plazmi se povećava tokom trećeg trimestra, što sugeriše da BAFF može biti važan u implantaciji embriona. Povećanje nivoa BAFF u trećem trimestru trudnoće podržava podatak o smanjenju ukupnog broja B limfocita u kasnoj trudnoći.

Poslednjih nekoliko decenija brojne studije su objavile kontradiktorne rezultate u pogledu nivoa imunoglobulina (Ig) tokom trudnoće. Naime, u nekim je dokazana stabilna koncentracija ukupnih Ig tokom trudnoće, dok druge studije pokazuju smanjenje Ig u odmakloj trudnoći. Koncentracija IgG1 je veća u trudnoći u poređenju sa ženama koje nisu trudne, dok je

koncentracija IgG3 veća kod trudnica u drugom trimestru, u odnosu na vrednosti kod žena koje nisu trudne. IgG1 je potklasa imunoglobulina koja se trans-placentno najefikasnije prenosi na novorođenče i jak je induktor efektorskih mehanizama posredovanih Fc fragmentom (npr. ćelijska citotoksičnost zavisna od antitela, citotoksičnost zavisna od komplemента i fagocitoza zavisna od antitela), tako da potencijalno obezbeđuje zaštitu i za majku i za dete u ranom životu. Vrednosti IgG2 i IgG4 su stabilne tokom cele trudnoće i slične kao kod žena koje nisu trudne. Ovi naizgled neskladni rezultati sniženog ukupnog IgG i promena zastupljenosti podklasa antitela (povećani IgG1 i IgG3, nepromenjeni IgG2 i IgG4), ukazuju da je tumačenje rezultata dobijenih primenom različitih imunoloških testova na različitim grupama pacijentkinja veliki izazov. Naime, samo merenje koncentracije antitela ne govori o funkcionalnim promenama antitela, uključujući aviditet i strukturne promene poput glikozilacije koje poboljšavaju njihovu funkciju. Imunoglobulini klase IgG su glikoproteini i sadrže N-glikane u Fc i Fab delu. Ovi N-glikani se sastoje od konstantnog heptasaharidnog jezgra, fukoze, N-acetilglukozamina, galaktoze i sijalinske kiseline. U trudnoći se povećava galaktozilacija Fc fragmenta IgG. Glikozilacija Fc domena IgG takođe može značajno modulirati efektorske funkcije IgG pošto glikani povezani sa Fc menjaju trodimenzionalnu strukturu proteina, utičući na taj način na kapacitet za vezivanje za Fc-receptor. Osim toga, fukozilacija Fc fragmenta IgG, koja se dešava tokom trudnoće, ima potencijal da inhibira vezivanje sa Fc receptorom IIIa eksprimiranim na NK ćelijama, čime se značajno smanjuje ćelijska citotoksičnost zavisna od antitela (engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) i povećava rizik od infekcija u trudnoći.

Iako grupa naučnika primećuje da nema značajnih promena u koncentraciji IgA i IgM tokom trudnoće, postoje i studije koje ukazuju da se tokom trudnoće dešavaju dinamičnije promene nivoa ovih klasa antitela, dok su podaci o vrednostima IgE koji ostaju stabilni tokom trudnoće vrlo oskudni. Različiti faktori koji utiču na sintezu proteina mogu da objasne smanjenje ukupnih Ig u trudnoći, uključujući supresiju ćelijskog imuniteta, gubitak proteina urinom, hemodiluciju zbog povećanog intravaskularnog volumena, prenos IgG sa majke na fetus preko placente, hormonske promene.



### 12.2.3. Uloga i značaj regulatornih T i B limfocita u trudnoći

Regulatorni T limfociti (engl. *T regulatory cells*, Tregs) indukuju perifernu toleranciju tako što sprečavaju proliferaciju i produkciju citokina CD4+ i CD8+ T limfocita, proizvodnju Ig od strane B limfocita, citotoksičnu aktivnost NK ćelija i sazrevanje dendritskih ćelija. Tregs eksprimiraju niske nivoe IL7R i visoke nivoe alfa lanca receptora za IL-2 (CD25) i transkripcionog faktora Foxp3. Opisane su i druge imunosupresivne T ćelije uključujući, CD4+CD25+ Foxp3- tip 1 regulatorne T ćelije (Tr1) i CD4+C-CD25<sup>low</sup> Th3 ćelije koje su indukovane i ispoljavaju svoju supresivnu aktivnost posredstvom IL-10 i TGF-β.

Tregs ćelije su važne u sprečavanju odbacivanja fetusa od strane imunih ćelija majke i supresiji inflamacije u materici tokom implantacije. Dinamika Tregs tokom trudnoće je kontroverzna, što može biti delimično zbog različite karakterizacije ovih ćelija u različitim studijama. Estrogen povećava ekspresiju Foxp3 *in vitro* i *in vivo*, a osim toga tretman estrogenima u životinjskom modelu povećava zastupljenost CD4+CD25+ Tregs i time podstiče imunsku toleranciju u trudnoći. U situacijama spontanog pobačaja pokazano je smanjenje broja CD25<sup>bright</sup> CD4+ T ćelija u perifernoj krvi u poređenju sa nekomplikovanom trudnoćom. Međutim, pošto aktivirani T limfociti takođe eksprimiraju CD25, izbor ovog markera se često smatra nedovoljno specifičnim za karakterizaciju Tregs. Takođe, iako se CD25 i Foxp3 najčešće koriste kao markeri Tregs, aktivirane konvencionalne T ćelije takođe mogu da eksprimiraju Foxp3 uz sniženu ekspresiju CD25 (CD25<sup>dim</sup>). Veća procentualna zastupljenost CD4+CD25<sup>dim</sup> T limfocita je detektovana u terminu porođaja u poređenju sa periodom od 17. do 24. nedelje trudnoće, međutim, nisu primećene nikakve značajne promene u zastupljenosti CD4+CD25<sup>bright</sup> T ćelija. U jednoj studiji, broj CD4+CD25+ Foxp3+ T ćelija se smanjio tokom prvog trimestra, zatim se povećao od 24. do 30. nedelje trudnoće, a zatim se ponovo smanjivao od 31. nedelje do termina. Neke studije su pokazale da se zastupljenost Foxp3+Tregs u cirkulaciji povećava tokom rane trudnoće i dostiže maksimum u drugom trimestru. Upoređujući različite metode karakterizacije ovih ćelija, Santner-Nanan i saradnici su ustanovili da je procentualna zastupljenost CD4+CD25<sup>bright</sup> i CD4+CD127<sup>low</sup>CD25+ T ćelija značajno povećana u vreme porođaja u od-

nosu na zastupljenost kod žena koje nisu trudne. Procenat CD4+Foxp3+ T ćelija je takođe veći, ali razlika ne dostiže statističku značajnost.

Regulatorni B limfociti (engl. *B regulatory cells*, Bregs) eksprimiraju visok nivo CD24, CD27 i/ili CD38 i imaju kapacitet da suprimiraju odgovor T limfocita produkcijom antiinflamatornog citokina IL-10. Faktori transkripcije specifični za Bregs nisu potpuno identifikovani i postoji fenotipska heterogenost ovih ćelija. Zastupljenost CD19+CD24<sup>hi</sup>CD27+ Bregs se povećava u prvom trimestru trudnoće. Humani horionski gonadotropin (hCG) poboljšava funkciju Bregs, na taj način što hCG indukuje produkciju IL-10 u B limfocitima, a ~95% CD19+CD24<sup>hi</sup>CD27+ ćelija eksprimira receptor za hCG. Apsolutni broj Bregs koje sekretuju IL-10 i Bregs fenotipa CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> je niži tokom trećeg trimestra nego kod žena nakon porođaja. Najvažnija uloga Bregs tokom trudnoće je da suprimira Th1 odgovor majke, čime se sprečavaju alogene reakcije na fetus. Međutim, potpuni mehanizam aktivacije i ekspanzije Bregs u trudnoći je i dalje nedovoljno jasan.

Može se zaključiti da se tokom trudnoće dešavaju značajne sistemske promene imunskog odgovora. Promene su posledica dinamične interakcije između imunskog sistema majke i fetusa, pre nego supresije imuniteta majke. Poznavanje ovih promena je od ključne važnosti pri tumačenju rezultata imunološkog testiranja u kliničkoj praksi.

## 12.3. LITERATURA

- Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG (2009) Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet Gynecol* 114:1326–1331.
- Abu Raya B, Edwards KM, Scheifele DW, Halperin SA (2017) Pertussis and influenza immunisation during pregnancy: a landscape review. *Lancet Infect Dis* 17:e209–e22.
- Al-ofi E, Coffelt SB, Anumba DO (2012) Monocyte subpopulations from pre-eclamptic patients are abnormally skewed and exhibit exaggerated responses to Toll-like receptor ligands. *PLoS One* 7:e42217.
- Alijotas-Reig J, Llorca E, Gris JM (2014) Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells. *Placenta* 35:241–248.
- Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A (2008) Gebhard F, et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol* 632:71–79.
- Artis D, Spits H (2015) The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517:293–301.

- Belo L, Santos-Silva A, Rocha S, Caslake M, Cooney J, Pereira-Leite L, et al. (2005) Fluctuations in C-reactive protein concentration and neutrophil activation during normal human pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 123:46–51.
- Bischof P, Geinoz A, Herrmann WL, Sizonenko PC (1984) Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) specifically inhibits the third component of human complement (C3). *Placenta* 5:1–7.
- Biró A, Rovó Z, Papp D, Cervenak L, Varga L, Füst G, et al., (2007) Studies on the interactions between C-reactive protein and complement proteins. *Immunology* 121:40–50.
- Bondt A, Rombouts Y, Selman MH, Hensbergen PJ, Reiding KR, Hazes JM, et al. (2014) Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy – associated changes. *Mol Cell Proteomics* 13:3029–3039.
- Burke SD, Seaward AV, Ramshaw H, Smith GN, Virani S, Croy BA, et al. (2015) Homing receptor expression is deviated on CD56+ blood lymphocytes during pregnancy in Type 1 diabetic women. *PLoS One* 10:e0119526.
- Cambridge G, Perry HC, Nogueira L, Serre G, Parsons HM, De La Torre I, et al (2014) The effect of B-cell depletion therapy on serological evidence of B-cell and plasmablast activation in patients with with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *J Autoimmun* 50:67–76.
- Cierny JT, Unal ER, Flood P, Rhee KY, Praktish A, Olson TH, Goetzi L (2014) Maternal inflammatory markers and term labor performance. *Am J Obstet Gynecol* 210:447.e1-6.
- Clarke AG, Kendall MD (1994) The thymus in pregnancy: the interplay of neural, endocrine and immune influences. *Immunol Today* 15:545–551.
- de Taeye SW, Rispen T, Vidarsson G (2019) The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions. *Antibodies (Basel)* 8:30.
- Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD, Waters TP, Mathew L, Chung EK, et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine* (2011) 53:170–7.
- Denny KJ, Woodruff TM, Taylor SM, Callaway LK (2013) Complement in pregnancy: a delicate balance. *Am J Reprod Immunol* 69:3–11.
- Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA (2017) The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* 47:820–33.
- Giaglis S, Stoikou M, Sur Chowdhury C, Schaefer G, Grimolizzi F, Rossi SW, et al. (2016) Multimodal Regulation of NET Formation in Pregnancy: Progesterone Antagonizes the Pro-NEToxic Effect of Estrogen and G-CSF. *Front Immunol* 7:565.
- Göhner C, Plösch T, Faas MM (2017) Immune-modulatory effects of syncytiotrophoblast extracellular vesicles in pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 60(Suppl 1):S41–51.
- He YD, Xu BN, Song D, Wang YQ, Yu F, Chen Q et al., (2020) Normal range of complement components during pregnancy: A prospective study. *Am J Reprod Immunol* 83:e13202.

- Heit JA, Kobbervig CE, James AH, Petterson TM, Bailey KR, Melton LJ (2005) Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study. *Ann Intern Med* 143:697–706.
- Higuma-Myojo S, Sasaki Y, Miyazaki S, Sakai M, Siozaki A, Miwa N, et al. (2005) Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 54:21–29.
- Jagadeesan V (1988) Serum complement levels in normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *Int J Gynaecol Obstet* 26:389–91.
- Jara LJ, Medina G, Cruz-Dominguez P, Navarro C, Vera-Lastra O, Saavedra MA (2014) Risk factors of systemic lupus erythematosus flares during pregnancy. *Immunol Res* 60:184–192.
- Kindzelskii AL, Huang JB, Chaiworapongsa T, Fahmy RM, Kim YM, Romero R, et al. (2002) Pregnancy alters glucose-6-phosphate dehydrogenase trafficking, cell metabolism, and oxidant release of maternal neutrophils. *J Clin Invest* 110:1801–11.
- Kindzelskii AL, Ueki T, Michibata H, Chaiworapongsa T, Romero R, Petty HR (2004) 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase form a supramolecular complex in human neutrophils that undergoes retrograde trafficking during pregnancy. *J Immunol* 172: 6373–6381.
- Kolaczowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13:159–75.
- Koldehoff M, Cierna B, Steckel NK, Beelen DW, Elmaagacli AH (2013) Maternal molecular features and gene profiling of monocytes during first trimester pregnancy. *J Reprod Immunol* 99:62–68.
- Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ. Pregnancy and infection. *N Engl J Med* (2014) 370:2211–8. Schnarr J, Smaill F. Asymptomatic bacteriuria and symptomatic urinary tract infections in pregnancy. *Eur J Clin Invest* (2008) 38(Suppl 2):50–57.
- Kühnert M, Strohmeier R, Stegmüller M, Halberstadt E (1998) Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 76:147–151.
- Lampé R, Kövér Á, Szűcs S, Pál L, Árnys E, Ádány R, et al. (2015) Phagocytic index of neutrophil granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy. *J Reprod Immunol* 107:26–30.
- Le Gars M, Seiler C, Kay AW, Bayless NL, Starosvetsky E, Moore L, et al. (2019) Pregnancy-Induced Alterations in NK Cell Phenotype and Function. *Front Immunol* 10:2469.
- Lima J, Cambridge G, Vilas-Boas A, Martins C, Borrego LM, Leandro M (2019) Serum markers of B-cell activation in pregnancy during late gestation, delivery, and the postpartum period. *Am J Reprod Immunol* 81:e13090.
- Lima J, Martins C, Leandro MJ, Nunes G, Sousa MJ, Branco JC, et al. (2016) Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to postpartum: a prospective observational study. *BMC Pregnancy Childbirth* 16:139.
- Lissauer D, Goodyear O, Khanum R, Moss PA, Kilby MD (2014) Profile of maternal CD4 T-cell effector function during normal pregnancy and in women with a history of recurrent miscarriage. *Clin Sci (Lond)* 126:347–354.

- Luppi P, Haluszczak C, Betters D, Richard CA, Trucco M, DeLoia JA (2002) Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. *J Leukoc Biol* 72:874–884.
- Luppi P, Haluszczak C, Trucco M, DeLoia JA (2002) Normal pregnancy is associated with peripheral leukocyte activation. *Am J Reprod Immunol* 47:72–81.
- Matsumoto K, Ogasawara T, Kato A, Homma T, Iida M, Akasawa A, et al. (2003) Eosinophil degranulation during pregnancy and after delivery by cesarean section. *Int Arch Allergy Immunol* 131(Suppl 1):34–39.
- Melgert BN, Spaans F, Borghuis T, Klok PA, Groen B, Bolt A, et al. (2012) Pregnancy and preeclampsia affect monocyte subsets in humans and rats. *PLoS One* 7:e45229.
- Moffett A, Colucci F (2014) Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 124:1872–1879.
- Mor G, Cardenas I (2010) The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol* 63:425–33.
- Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B (2015) Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep* 5:13886.
- Naccasha N, Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Berman S, Yoon BH, Maymon E, et al. (2001) Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. *Am J Obstet Gynecol* 185: 1118–1123.
- Nakashima A, Ito M, Yoneda S, Shiozaki A, Hidaka T, Saito S (2010) Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 63:104–109.
- Nowicki S, Izban MG, Pawelczyk E, Agboto VK, Pratap S, Olson G, et al., (2009) Preterm labor: CD55 in maternal blood leukocytes. *Am J Reprod Immunol* 61:360–367.
- Pazos M, Sperling RS, Moran TM, Kraus TA (2012) The influence of pregnancy on systemic immunity. *Immunol Res* 54:254–261.
- Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, Afentoulis M, Vandembark AA, Ziegler SF, et al. (2004) Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol* 173:2227–2230.
- Pozzilli C, Pugliatti M, Group P (2015) An overview of pregnancy-related issues in patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 22 (Suppl 2):34–39.
- Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-Garcia A, Raeva Y, Schumacher A, Hartig R, et al. (2013) Cutting Edge: IL-10-Producing Regulatory B Cells in Early Human Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 70:44–453.
- Rosser EC, Mauri C (2015) Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 42:607–612.
- Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, et al. (2009) Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17- producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol* 183:7023–7030.
- Sarma JV, Ward PA (2011) The complement system. *Cell Tissue Res* 343: 227–235.

- Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S (2004) Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 10:347–353.
- Shanley DK, Kiely PA, Golla K, Allen S, Martin K, O’Riordan RT, et al. (2013) Pregnancy-specific glycoproteins bind integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and inhibit the platelet-fibrinogen interaction. *PLoS One* 8:e57491.
- Sheffield JS, Cunningham FG. Community-acquired pneumonia in pregnancy. *Obstet Gynecol* (2009) 114:915–22.
- Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT (2004) Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* 112:38–43.
- Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toerner A, Meuer S, et al. (2008) Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? *Clin Immunol* 129:401–412.
- Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Teoh TG, Bennett PR (2012) The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm* 2012: 967629,1–12.
- Taniguchi K, Nagata H, Katsuki T, Nakashima C, Onodera R, Hiraoka A, et al. (2004) Significance of human neutrophil antigen-2a (NB1) expression and neutrophil number in pregnancy. *Transfusion* 44: 81–5.
- Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, van Schip JJ, Kleijburg C, de Groot-Swings GM, et al. (2006) Differential distribution of CD4(+)CD25(bright) and CD8(+)CD28(-) T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta* 27(Suppl A):S47–53.
- Zhang J, Shynlova O, Sabra S, Bang A, Briollais L, Lye SJ (2017) Immunophenotyping and activation status of maternal peripheral blood leukocytes during pregnancy and labour, both term and preterm. *J Cell Mol Med* 21:2386–2402.
- Zhao J, Lei Z, Liu Y, Li B, Zhang L, Fang H, et al. (2009) Human pregnancy up-regulates Tim-3 in innate immune cells for systemic immunity. *J Immunol* 182:6618–6624.
- Ziegler KB, Muzzio DO, Matzner F, Bommer I, Ventimiglia MS, Malinowsky K, et al. (2018) Human pregnancy is accompanied by modifications in B cell development and immunoglobulin profile. *J Reprod Immunol* 129:40–7.
- Ziegler SM, Feldmann CN, Hagen SH, Richert L, Barkhausen T, Goletzke J, et al. (2018) Innate immune responses to toll-like receptor stimulation are altered during the course of pregnancy. *J Reprod Immunol* 128:30–37.

**Radmila Kovačević**

---

**13.  
NEUROENDOKRINE  
OSNOVE  
PUBERTETA**

---





## 13.1. UVOD

Pubertet se karakteriše fiziološkim, morfološkim i promenama u ponašanju koje se dešavaju tokom transformacije organizma iz juvenilnog stadijuma u potencijalno fertilnog adulta. Pubertet kod ljudi može da se definiše i kao period u kome osoba postaje sposobna za reprodukciju, a obeležen je sazrevanjem genitalnih organa, razvojem sekundarnih seksualnih karakteristika, ubrzanim somatskim rastom, promenama u ponašanju, i kod devojčica menarhom (prvom menstruacijom). Pojam adolescencije je širi pojam od puberteta i obuhvata razvojne promene na prelazu iz detinjstva u odraslo doba. Pojam puberteta odnosi se na telesne promene koje dovode do polne zrelosti i reproduktivne sposobnosti, te odraslog izgleda i veličine tela.

Nastanak puberteta zavisi od genetskih, metaboličkih faktora kao i od faktora sredine. Raniji nastanak puberteta koji se uočava poslednjih decenija ukazuje da bi metabolički faktori, kao što je gojaznost i uticaji iz spoljašnje sredine, kao što su endokrini ometači, mogli delom da budu odgovorni za ove promene delujući na eksprimiranje određenih gena i epigenetsku kontrolu.

Kod ženki laboratorijskih pacova otvaranje vagine, kao spoljašnji znak nastanka puberteta, javlja se između 30–50 dana nakon rođenja u zavisnosti od soja pacova. Nakon 24 h javlja se kornifikacija epitela vagine što je znak estrusa. Otvaranje vagine kod ženki miševa dešava se između 25–30 dana starosti; međutim pojava estrusa može da kasni i više od 20 dana. Produkcija pokretnih spermatozoida kod mužjaka pacova i miševa je između 40 i 55 dana starosti. Kod devojčica, fizičke manifestacije puberteta javljaju se između 8. i 13. godine života, odnosno 9. i 14. godine kod dečaka. Kod ljudi, otprilike dve do četiri godine pre jasnih znakova seksualnog sazrevanja, u organizmu se odigrava serija promena u mnogim organima i organizmu u celini. Ove promene zavise od povećanja nivoa steroidnih hormona iz gonada (gonadarha), a takođe i iz nadbubrežnih žlezda (adrenarha). Ranim promenama u gonadama obično prethodi povećano lučenje androgena iz kore nadbubrežnih žlezda dehidroepiandrosterona (DHEA), dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS) i androstenediona. To se dešava između 8. i 10. godine kod devojčica, odnosno između 10. i 12.

godine kod dečaka. Utvrđeno je da kod ljudi odsustvo adrenarhe ne sprečava gonadarhu i fertilitnost.

Najranija saznanja o karakteristikama seksualnog sazrevanja bazirana su na zapažanjima vezanim za domaće životinje i ljude, a početkom 20. veka publikuju se prvi rezultati eksperimentalnih istraživanja. Još 1900. godine italijanski fiziolog Karlo Foa (*Carlo Foà*) je pokazao da transplantacija jajnika novorođene zečice u odraslu jedinku izaziva njegov razvoj. U monografiji o estrusnom ciklusu ženki pacova objavljenoj 1922. godine, Džozef Long (*Joseph Abraham Long*) i Herbert Evans (*Herbert McLean Evans*) su ukazali da dolazi do razvoja jajnika nezrele ženke pacova ukoliko se transplantira u organizam odrasle ženke. Ovi radovi su pokazali da je transplantiran (nezreli) jajnik sposoban da odgovori na signale prisutne u odraslom organizmu. Isti autori su dokazali da ekstrakt hipofize vola izaziva luteinizaciju folikula jajnika kod pacova što je bio pokazatelj kontrole gonada od strane hipofize.

Slični nalazi potvrđeni su tridesetih godina prošlog veka eksperimentima rađenim na miševima od strane Bernarda Zondeka (Bernhard Zondek) i Selmara Ašhejma (Selmar Aschheim) u Nemačkoj, odnosno na pacovima od strane Filipa Smita (Philip Edward Smith) i Erla Engla (Earl T Engle) u SAD. Navedeni autori ističu da implantacija parčića hipofize u prepubertalne ženke miševa, odnosno pacova, izaziva otvaranje vagine i sazrevanje folikula jajnika, što ukazuje da su gonade sposobne da odgovore na hormone iz hipofize. Tridesetih godina prošlog veka pojavljuje se veći broj radova koji ukazuju na postojanje međusobnog delovanja hipofize i jajnika, tj. hipofize i testisa.

Podaci o mogućoj kontroli gonadotropne funkcije hipofize od strane hipotalamusa, odnosno o kontroli reprodukcije vezuju se za istraživače Fransisa Maršala (Francis Hugh Adam Marshall) i Džefri Harisa (Geoffrey Wingfield Harris). Oni su u eksperimentima na zečevima i pacovima, pokazali da električna stimulacija određenih moždanih struktura preko aktivacije hipofize deluje na jajnike. U monografiji "Nervna kontrola hipofize" iz 1955. godine, Haris sumira svoje i rezultate drugih autora koji ukazuju na značaj centralnog nervnog sistema i hipotalamusa u kontroli aktivnosti hipofize i gonada i na postojanje kapilarnog sistema koji povezuje hipotalamus i adenohipofizu.

Sedamdesetih godina prošlog veka, izolacija i strukturne karakterizacije nekoliko hormona hipotalamusa, među kojima i luteinizirajućeg hormona-oslobađajućeg hormona (engl. *luteinizing hormone releasing hormone*, LHRH), kasnije označenog kao gonadotropin-oslobađajući hormon (engl. *gonadotropin hormone releasing hormone*, GnRH) od strane dve laboratorije Rodžera Gilmena (Roger Charles Louis Guillemin) i Andreja Šelija (Andrzej Viktor Schally), potvrdili su prirodu veze između hipotalamusa i adenohipofize.

Šezdesetih godina prošlog veka pojavljuju se radovi koji pokazuju da lezije hipotalamusa kod eksperimentalnih životinja, pa i ljudi, mogu da dovedu do pojave preranog puberteta. To jeste u prilog pretpostavci da odgovarajuće promene u aktivnosti hipotalamusa mogu da stimulišu oslobađanje gonadotropnih hormona i nastanak puberteta. Na osnovu ispitivanja efekata kastracije i primene malih koncentracija estradiola na nivo luteinizirajućeg hormona (LH) u plazmi i hipofizi kod nezrelih i odraslih ženki pacova, Viktor Ramirez (Victor D. Ramirez) i Samjuel Meken (Samuel Donald McCann) su pokazali da je hipotalamus nezrelih ženki mnogo osetljiviji na dejstvo estradiola u odnosu na odrasle jedinke. Formulirali su hipotezu o povećanoj osetljivosti hipotalamusa i hipofize na inhibitorno dejstvo gonadalnih hormona tokom juvenilnog perioda, tzv. hipoteza gonadostata. Prema toj hipotezi, tokom seksualnog sazrevanja dolazi do smanjenja osetljivosti gonadostata u hipotalamusu na povratno negativno dejstvo gonadalnih hormona, što rezultira povećanom aktivnosti svih struktura u sistemu hipotalamus-hipofiza-gonade kako se organizam približava pubertetu. Ubrzo je ova hipoteza primenjena i na ljude, ali je osamdesetih godina postala upitna u odnosu na njenu primenu na seksualno sazrevanje kod ženki pacova, rebus majmuna i ljudi. Danas je prihvaćeno mišljenje da ovom hipotezom može da se objasni nastanak puberteta kod ovaca, i još nekih vrsta. Važeći koncept o seksualnom sazrevanju i nastanku puberteta, pretpostavlja promene na nivou hipotalamusa kao ključne komponente u nastanku puberteta.

I pored velikog broja podataka o neuroendokrinoj osnovi nastanka puberteta, još uvek nije sklopljena potpuna slika o tom procesu. Kod svih sisarskih vrsta, ulazak jedinke u pubertet karakteriše se pulsativnim oslobađanjem GnRH u portalnu cirkulaciju, njegovim vezivanjem

za receptore na ćelijskoj membrani gonadotropnih ćelija hipofize i lučenjem gonadotropina: LH i folikulostimulišućeg hormona (FSH) u odgovarajućem vremenskom obrascu. Gonadotropni hormoni deluju na jajnik, stimulišući produkciju hormona gonada i razvoj folikula. Pokazano je da hipofiza odgovara na primenu GnRH, kao i gonade na primenu gonadotropnih hormona i pre puberteta, što ukazuje da je ograničavajuća komponenta u neuroendokrinoj kontroli nastanka puberteta hipotalamus.

## 13.2. FAZE RAZVOJA PUBERTETA

Hormon rasta i hormoni gonada su odgovorni za fizičke promene tokom puberteta. Nagli porast visine dešava se kod dečaka oko dve godine kasnije u odnosu na devojčice, a dinamika faza rasta zavisi ne samo od hormona rasta nego i hormona gonada. Kod osoba sa funkcionalnim hipopituitarizmom, povećanje visine postiže se zajedničkom primenom hormona rasta i steroidnih hormona. Promene u telesnoj masi i količini masnog tkiva počinju negde oko šeste godine kod devojčica, odnosno devete godine kod dečaka. Pubertet se karakteriše razvojem sekundarnih seksualnih karakteristika. Kod devojčica se uočavaju sledeće promene: telarha (razvoj žlezdanog tkiva dojki), pubarha (razvoj aksilarne i pubične maljavosti), i menarha (prva menstruacija kao jasni znak puberteta). Početni period je anovulatorni, a regularni ciklus sa ovulacijama nastupa oko godinu dana kasnije. Kod dečaka dolazi do povećanja skrotuma i testisa, pubične maljavosti, porasta penisa, pojava facijalne maljavosti. Ove karakteristične promene seksualnog sazrevanja kategorisane su u određene faze razvoja koje su definisane određenim kriterijumima, na osnovu kojih može da se prati pubertalni razvoj kod devojčica i dečaka.

Kod oba pola, promene u genitalijama i stidnim dlakama, a kod devojčica i promene u dojkama, u pubertetu su svrstane u pet faza, početna faza 1- prepubetalna faza i krajnja faza 5 – adultna faza. Fizičke promene koje su razvrstane u pet faza jesu rezultat gonadarhe (kao u slučaju uvećanja dojki i testisa) ili adrenarhe (kao u slučaju rasta stidnih dlaka). Iako se fizičke posledice gonadarhe i adrenarhe obično dešavaju istovremeno, moguća je desinhronizacija ova dva procesa tokom normalnog razvoja.

Povećano lučenje estrogena pospešuje razvoj dojki kod devojčica. Početni razvoj dojki – pupoljaka sa povećanim areolarnim prečnikom se smatra fazom 2. Veće proširenje dojki javlja se u fazi 3 i praćeno je povećanjem pigmentacije areola i bradavica. Tokom faze 4, areole se podižu iznad tkiva dojki, a tokom faze 5 dolazi do njihove recesije i uklapanja u konturu dojke. Dodatni efekti estrogena u ovoj fazi razvoja uključuju kornifikaciju vaginalne sluzokože, rast materice i morfogenezu tipičnu za odraslu ženu. Kod devojčica, prva menstruacija (menarha) dolazi nakon anovulatornog ciklusa i najčešće se javlja od 2 do 3 godine posle početka razvoja dojki. Menstrualni ciklusi tokom prve godine posle prve menstruacije su tipično neredovni i anovulatorni, i traju od 21 do 45 dana. U roku od 5 godina nakon menarhe, većina ciklusa je redovna – od 21 do 35 dana. Iako primordijalni i preantralni folikuli dominiraju u prepubertalnom periodu, treba napomenuti da se i mali antralni folikuli razvijaju tokom ove faze sazrevanja. U periodu nakon menarhe, morfologija jajnika na ultrazvuku se razlikuje od morfologije kod starijih žena. Konkretno, transabdominalnim ultrazvukom opažaju se jajnici sa prisutnim cistama i povećana zapremina jajnika. Povećano lučenje androgena iz nadbubrežne žlezde se smatra odgovornom za razvoj tamnijih dlaka duž usmina, što se dešava u fazi 2. Dlake postaju tamnije i grublje tokom faze 3, šire se preko stidnih sastava sa postepenom progresijom ka kompletnom stidnom trouglu. Apokrini miris može da prethodi, ili prati razvoj stidnih dlaka. Pridružene promene uključuju rast pazušnih dlaka, pojavu akni i nauljenost kože i kose. Razvoj dojki kod devojčica i testisa kod dečaka uobičajeno prethodi rastu stidnih dlaka. Ipak, tempo za rast stidnih dlaka je brži, tako da se sinhronizacija u razvoju genitalija i stidnih dlaka javlja tokom kasnijih faza puberteta. Pubertetsko ubrzavanje u rastu devojčica javlja se istovremeno sa početkom razvoja dojki i maksimum dostiže oko 12. godine, nakon čega se rast usporava. Smatra se da je visinski rast kod devojčica završen u najvećoj meri kada starost kostiju dostigne 15 godina.

### 13.3. ADRENARHA

Adrenarha predstavlja povećanje lučenja androgena iz nadbubrežnih žlezda kao rezultat sazrevanja zone retikularis u prepubertalnom periodu. Tokom trudnoće, fetalna zona nadbubrežnih žlezdi fetusa, proizvodi velike količine DHEAS koji se u posteljici konvertuje u estrogene. Nakon rođenja dolazi do involucije fetalne zone koja je praćena padom u nivou androgena. Lučenje androgena je na niskom nivou tokom infantilnog perioda i ranog detinjstva (do 6. ili 7. godina života). Nakon toga sinteza androgena se polako povećava kao rezultat početka razvoja zone retikularis koja je odgovorna za produkciju androgena u nadbubrežnoj žlezdi. Zapaža se dalji razvoj zone retikularis i povećanje lučenja DHEA, DHEAS i androstendiona. Postoje i podaci koji ukazuju da se porast lučenja androgena iz nadbubrežnih žlezdi javlja već od 3. ili 4. godine života. Nivo DHEAS nastavlja da raste i dostiže maksimalne vrednosti u krvi oko 25. godine kod žena, a nešto kasnije kod muškaraca, da bi nakon toga sledilo postepeno smanjenje do niskih nivoa posle 60. godine života. Adrenarha kao proces koji prethodi gonadarhi, sreće se kod ljudi i nekih vrsta primata kao što su šimpanze i gorile. Kod rezus majmuna takođe dolazi do povećane lučenja DHEA i DHEAS, ali u infantilnom, a ne u prepubertalnom periodu.

Početak adrenarhe karakteriše povećanje aktivnosti  $17\alpha$ -hidroksilaze/ $17,20$ -liaze i smanjenje aktivnosti  $3\beta$ -hidroksisteroid/ $\Delta^{5-4}$ izomeraze. Prema literaturnim podacima promene u ekspresiranju gena za DHEA-sulfotransferazu, citohrom b5 i  $3\beta$ -hidroksisteroid/ $\Delta^{5-4}$  izomerazu imaju ključnu ulogu u produkciji DHEA i DHEAS. Povećanje lučenja androgena iz nadbubrežnih žlezdi se dešava u odsustvu povećanog lučenja adrenokortikotropnog hormona. Nije definisan signal koji pokreće adrenarhu. Na osnovu istraživanja u populaciji ljudi smatra se da se adrenarha dešava nezavisno od promena u osovini hipotalamus-hipofiza-gonade. Studije pokazuju da se kod dece sa nepravilnim razvojem gonada uspostavlja adrenarha i pubarha, a da deca sa primarnom insuficijencijom nadbubrežnih žlezda mogu da imaju normalnu gonadarhu. Noviji podaci ukazuju da androgeni poreklom iz nadbubrežnih žlezdi mogu da utiču na vreme nastanka puberteta. Tako su viši nivoi androgena u urinu tokom prepu-

berteta u pozitivnoj korelaciji sa ranijom telarhom i porastom penisa, kao i sa kraćim trajanjem porasta visine tokom puberteta.

## 13.4. GONADARHA

Gonadarha je rezultat povećanja aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-gonade. Pojam gonadarha se odnosi na porast lučenja hormona gonada, razvoj fizičkih manifestacija puberteta i završetak gametogeneze, odnosno pojave spermatozoida pod uplivom pojačanog lučenja LH i FSH. Aktivacija jajnika i testisa tokom gonadarhe, dovodi, ne samo do povećanja lučenja steroidnih hormona gonada, nego i inhibina, proteina iz familije transformišućeg faktora rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ), koji ima endokrinu i parakrinu funkciju. Endokrina se ogleda u kontroli lučenja FSH, a parakrina funkcija u okviru gonada. Kod muškog pola, Sertolijeve ćelije luče inhibin B, dok se u jajnicima luče obe izoforme, inhibin A i B. Lučenje inhibina B raste sa početkom puberteta, a lučenje inhibina A započinje u fazi telarhe 3 i 4. Kod devojčica adultni nivoi se dostižu oko 15. godine. Anti-Milerov hormon (AMH), odnosno Mile-rov inhibirajući hormon, takođe je član TGF- $\beta$  familije i luči se u testisu i jajnicima. Kod muškog pola, AMH ima značajnu ulogu u razvoju testisa i regresiji Milerovih kanala. Luče ga Sertolijeve ćelije sve do puberteta kada se smanjuje njegovo lučenje u korelaciji sa povećanim lučenjem inhibina B. S druge strane, AMH, čije je lučenje najveće od strane granuloza ćelije preantralnih i ranih antralnih folikula, sprečava aktivaciju primordijalnih folikula i tako predstavlja jedan od faktora očuvanja ovarijalne rezerve.

Koji kontrolni sistem određuje vreme ulaska u pubertet? Postoje dve osnovne hipoteze. Prema jednoj, reaktivacija generatora pulseva GnRH uslovljena je određenim stepenom somatskog razvoja. Poseban akcenat je stavljen na hormon leptin koji se luči u masnom tkivu. Osobe sa mutacijom u signalnom putu leptina, bilo da je u pitanju mutacija gena za leptin ili njegov receptor, ne mogu da uđu u pubertet. Fenotip koji ima mutaciju gena za receptor uključuje ogromnu gojaznost, abnormalno ponašanje u jedenju i odsustvo spontanog ulaska u pubertet. Kada se leptin primeni u odgovarajućem uzrastu (period puberteta), omogućava ulazak u pubertet. Takođe, bitno je, da nema preranog puberteta kod mlađe dece nakon

primene leptina. Nasuprot tome, kod dece sa preranim pubertetom koji je zavisan od GnRH, koncentracija leptina korelira sa indeksom telesne mase, a ne sa pubertalnim statusom. Ovi podaci potvrđuju da je leptin neophodan za nastanak puberteta, ali u malim koncentracijama. Dokazano je da su deca sa različitim lipodistrofijama normalna, uprkos niskom nivou leptina. Takođe, nivo leptina u krvi raste progresivno tokom telarhe stadijuma od 1 do 5. Druga hipoteza je o postojanju pubertalnog sata u centralnom nervnom sistemu.

### **13.5. POSTNATALNI RAZVOJ OSOVINE HIPOTALAMUS-HIPOFIZA-GONADE**

Nakon rođenja, kod primata uključujući čoveka, ispoljava se aktivnost GnRH neurona najverovatnije zbog gubitka inhibitornog dejstva steroidnih hormona poreklom iz posteljice, što izaziva prolaznu aktivaciju osovine hipotalamus-hipofiza-gonade, takozvani "mini-pubertet". Nivoi gonadotropina počinju da rastu između 6. i 10. dana nakon rođenja. Kod dečaka, u 2. nedelji po rođenju nivo LH počinje da raste, maksimum dostiže između 2. i 3. meseca, a zatim pada na prepubertalne vrednosti između 4. i 6. meseca života. Povećanje produkcije testosterona prati obrazac lučenja LH, maksimalne koncentracije su između 1. i 3. meseca života, nakon čega se smanjuju na prepubertalne vrednosti između 6. i 9. meseca života. Aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-testisi je tokom mini puberteta važna za razvoj muških reproduktivnih organa. Mini pubertet je prisutan i kod jedinki ženskog pola, ali je mnogo manje istražen. Javlja se porast u nivou LH koji prati obrazac kakav je kod dečaka samo što su maksimalne vrednosti niže nego kod muškog pola. Takođe je zapaženo i povećanje nivoa FSH čije su vrednosti znatno veće nego kod dečaka. Produkcija FSH dostiže maksimalne vrednosti između 1. i 3. meseca života. Dok se kod dečaka nivo FSH smanjuje na prepubertalne vrednosti oko 4. meseca života, kod devojčica povećane vrednosti mogu da traju i do 3. i 4. godine po rođenju. Budući da je odnos koncentracija FSH:LH kod devojčica u korist FSH, moglo bi da se uspostavi da je frekvencija pulseva GnRH manja kod devojčica u odnosu na dečake. Pretpostavlja se da na povećanje nivoa FSH tokom mini-puberteta mogu da utiču i niski nivoi inhibina A i B što



dovodi do izostanka negativnog uticaja na stvaranje FSH kao što je pokazano u eksperimentima na pacovima. Prolazno povećanje nivoa FSH stvara prolazne stimulacije aktivnosti jajnika koja se očituje u prisustvu antralnih folikula i povećanju nivoa estradiola. Nivo estradiola oscilira tokom mini-puberteta kod devojčica, dostižući maksimalne vrednosti između 1. i 3. meseca, a zatim se smanjuje nakon 6. meseca, pri čemu se produkcija zadržava i do 2. godine života. Za sada ima malo podataka o uticaju aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-jajnik tokom mini-puberteta na razvoj reproduktivne funkcije.

Produženi tretman infantilnih mužjaka rezus majmuna sa agonistima GnRH dovodi, kao i kod adulta, do blokade osovine hipofiza-testisi. Takođe, bilateralna kastracija jednu nedelju starog rezus majmuna muškog pola izaziva postkastarciono povećanje lučenja LH i FSH, kao kod adultne jedinke. Slični rezultati pokazani su i kod ženki rezus majmuna kastriranih prve nedelje života, s tim što je nivo FSH viši u odnosu na jedinke muškog pola.

Nakon infantilnog perioda kod oba pola, nivoi gonadotropnih hormona u cirkulaciji se smanjuju, jer dolazi do inhibicije aktivnosti GnRH neurona. Eksperimenti na rezus majmunima pokazuju da inhibicije aktivnosti GnRH neurona ima i kod ovarijektomisanih, odnosno kastriranih jedinki kojima su gonade uklonjene tokom prve nedelje života. Koncentracija gonadotropnih hormona u serumu ostaje niska sve do životnog doba koje neposredno prethodi pubertetu. U tom periodu započinje postepen porast nivoa FSH i LH u serumu uz sve izraženije pulsativno lučenje hormona. Juvenilni period kod rezus majmuna i čoveka, u kome su nivoi gonadotropnih hormona niski, kraći je kod jedinki ženskog pola posebno kada je u pitanju FSH, jer one ranije ulaze u pubertet. Lučenje gonadotropnih hormona tokom rane faze puberteta se karakteriše niskim koncentracijama danju, a pojačanim lučenjem noću kada se uočavaju pulsevi LH velike amplitude, što je verovatno posledica lučenja GnRH po istom obrascu. Kako pubertet napreduje, frekvencija pulseva GnRH se povećava i kod dečaka i devojčica. Kod ženke rezus majmuna, frekvencija pulseva GnRH se povećava u prvoj fazi puberteta, da bi kasnije amplituda i dalje rasla uz nepromenjenu frekvenciju.

Model agonadalnog rezus majmuna, kao i praćenje nivoa gonadotropnih hormona kod dečaka i devojčica od infantilnog do pubertalnog doba,

pokazali su da kod primata tokom prelaska u juvenilni period dolazi do "isključenja" aktivnosti GnRH neurona i mirovanja tokom juvenilne faze da bi kasnije prelaskom juvenilnog u peripubertalni period došlo do "uključenja", iliti njihove aktivacije. To ukazuje da je kod rezus majmuna prisutan bifazni model lučenja gonadotropnih hormona; visoki nivoi u neonatalnom/infantilnom i pubertalnom periodu, uz minimalno lučenje tokom juvenilnog perioda. Takođe, ovaj model pokazuje da tokom seksualnog sazrevanja ne dolazi do smanjenja osetljivosti osovine hipotalamus-hipofiza na negativno povratno dejstvo steroidnih hormona kako je bilo pretpostavljeno teorijom gonadostata, nego da dolazi do uspostavljanja aktivnosti hipotalamusa, odnosno GnRH neurona koji stimulišu lučenje gonadotropnih hormona nezavisno od prisustva gonada. Pubertalni porast aktivnosti GnRH neurona, rezultat je uklanjanja inhibitornih ili dejstva stimulišućih signala na nivou GnRH neurona, ili kombinacija obe aktivnosti.

Kod glodara (miš, pacov) između infantilnog i pubertalnog perioda ne postoji jasna juvenilna faza mirovanja osovine hipotalamus-hipofiza. Merenje lučenja GnRH iz izolovanog hipotalamusa ženki različitog uzrasta u *in vitro* uslovima ukazuje na porast frekvence pulseva GnRH tokom postnatalnog života. U neonatalnom periodu (do 7. dana po rođenju) GnRH se oslobađa na svakih 90 minuta, tokom 2. i 3. nedelje života (infantilni period) na svakih 60 minuta, a u juvenilnom (4. nedelja života) i peripubertalnom periodu (oko 5. nedelje života) na svakih 30 minuta. Frekvencija pulseva GnRH se postepeno povećava i nema mirovanja osovine hipotalamus-hipofiza kao kod primata.

Kod ženki pacova, primordijalni folikuli se formiraju 3. dana života, a sekundarni folikuli su prisutni u jajnicima već 7. dana po rođenju, na kraju neonatalnog perioda. Tokom te prve nedelje života razvoj folikula ne zavisi od aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza, jer je pokazano prisustvo sekundarnih folikula i kod ženki miševa starih 7 dana kod kojih nema eksprimiranja gena za GnRH. Takođe, u 1. nedelji života receptori za gonadotropne hormone nisu prisutni u jajnicima. Tokom 2. i 3. nedelje života, javlja se prvi talas folikula u jajniku koji će ovulirati u pubertetu. Mala frekvencija pulseva GnRH, i moguć nedostatak inhibina A i B u infantilnom periodu odgovorna je za veće lučenje FSH u odnosu na LH. FSH dostiže maksimum u 2. nedelji života, dok je nivo LH povišen tokom jed-

ne nedelje u periodu od 4. do 18. dana života u serumu kod ženki pacova i miša. To obezbeđuje transformaciju sekundarnih u antralne folikule i veću produkciju estrogena. Interesantno je da, iako postoji porast u nivoima FSH, LH i estradiola, razvoj folikula ide samo do stadijuma antralnih folikula. Steroidogena aktivnost ovarijuma raste između 7. i 21. dana života. Važnu ulogu u regulaciji lučenja gonadotropina kod miševa tokom fetalnog i infantilnog perioda ima  $\alpha$ -feto protein (AFP). Ovaj protein vezuje estradiol i time smanjuje njegovu dostupnost u organizmu. AFP se stvara u jetri fetusa i njegovi nivoi su visoki tokom fetalnog razvoja što sprečava negativno dejstvo estradiola majke na lučenje gonadotropina i na taj način omogućava aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza tokom fetalnog razvoja.

Nakon rođenja, kod miševa, AFP se polako smanjuje, međutim nivoi koji su prisutni do 16. dana života i dalje smanjuju količinu dostupnog estradiola i tako sprečavaju negativnu povratnu spregu ovog steroida na lučenje gonadotropina. Ovakav efekat AFP omogućuje porast gonadotropina tokom druge nedelje života. Oko 20. dana života, potpuno se smanjuje nivo AFP, a raste nivo estradiola usled rasta i razvoja folikula, pa se nivo FSH smanjuje, a takođe se gube i sporadični porasti LH, te nivo LH u serumu ostaje nizak. Tokom juvenilnog perioda osovina hipotalamus-hipofiza je osetljiva na niske nivoe estradiola produkovanog od strane jajnika, tj. uspostavlja se negativna povratna sprega. Pri kraju juvenilnog perioda raste frekvencija pulseva GnRH i javlja se pulsativno lučenje LH. Istovremeno dolazi do "sazrevanja" hipotalamusa, koji stiče sposobnost da odgovori na visoke koncentracije egzogenog estradiola, mada u tom periodu jajnici još ne proizvode dovoljne količine estradiola u određenom vremenu da bi se ispoljila pozitivna povratna sprega. U peripubertalnom periodu javljaju se diurnalne promene nivoa LH. Sposobnost jajnika da luči dovoljne količine estradiola tokom 24-satnog perioda je ključni faktor koji definiše kada će doći do prvog preovulatornog oslobađanja LH i ovulacije. Kod ženki glodara pored estradiola, ključan faktor za preovulatorni talas LH je i upliv cirkadijalnog ritma. Naime, pozitivna povratna sprega estradiola ostvaruje se na nivou kipeptin neurona koji se nalaze u anteroventralnom periventralnom jedru koje prima ulazne cirkadijalne signale iz suprachiasmatskog jedra.

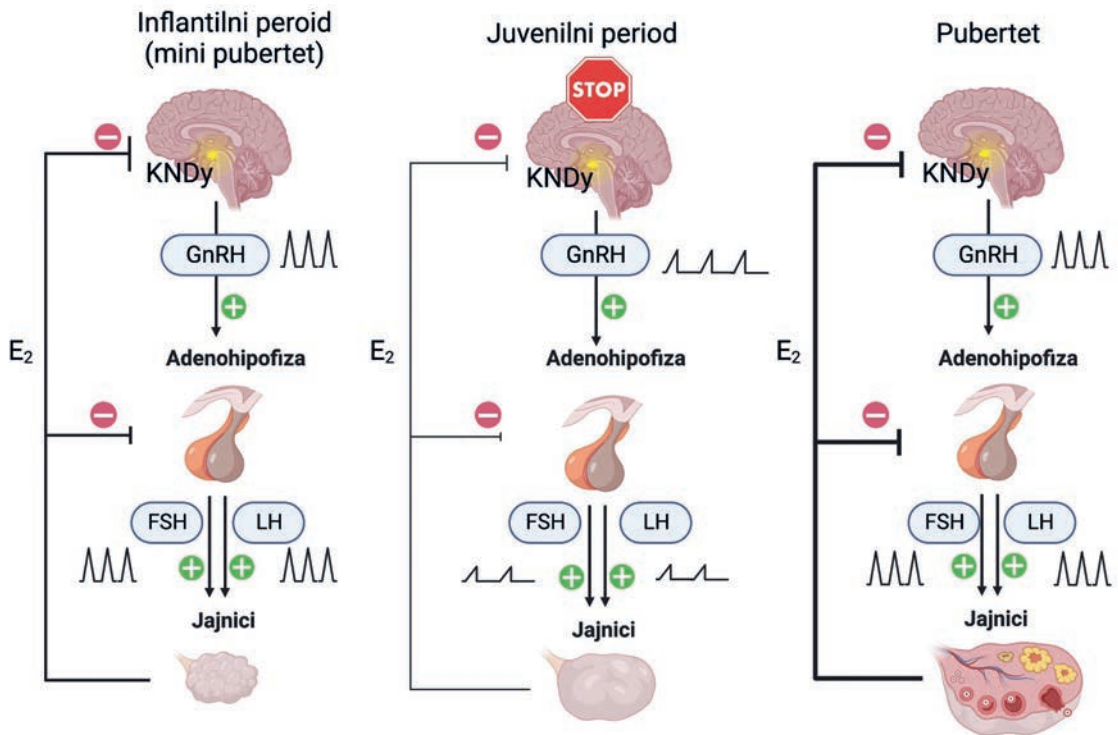
## 13.6. MEHANIZAM NASTANKA PUBERTETA

Istraživanja na glodarima (miš, pacov) i drugim životinjskim vrstama (ovca, koza, ne-čovekoliki primati, čovek) ukazala su na značaj postojanja difuzne mreže neurosekretornih ćelija na nivou hipotalamusa koje utiču na oslobađanje GnRH u nivou eminencije medijane sinhronizovano i isprekidano u obliku pulseva od čije amplitude i frekvence zavisi obrazac lučenja gonadotropnih hormona. Oslobađanje GnRH u obliku pulseva ukazalo je na postojanje kontrolnog sistema u hipotalamusu koji je označen kao generator pulseva GnRH. Kao što je rečeno u poglavlju 3, dosadašnja istraživanja ukazuju na ključnu ulogu kisseptina u kontroli pulsativnog lučenja GnRH.

Veliki broj studija ukazuje na važnu ulogu neurosekretornih ćelija u arkuatnom jedru (infundibularno jedro) koje pored kisseptina, ekspresuju i neurokinin B (engl. *neurokinin B*, NKB) i dinorfin (engl. *dynorphin*, Dyn) i naziva su kisseptin/Dyn/NKB (KD<sub>Ny</sub>) neuroni. Dok NKB stimuliše, Dyn inhibiše oslobađanje kisseptina iz ovih neurona što omogućava epizodično lučenje kisseptina, ili isprekidanu stimulaciju GnRH neurona. Veći broj neuropeptida i neurotransmitera inhibitornog i ekscitatornog karaktera ima upliva na aktivnost GnRH neurona kao i interakcija neurona sa glia ćelijama koje luče faktore rasta, prostaglandine i glutamat. Energetski status organizma ima određenu ulogu u kontroli reproduktivne funkcije i puberteta kroz aktivnost hormona poreklom iz masnog tkiva, gastrointestinalnog trakta i pankreasa. Takođe, istraživanja ukazuju na značaj epigenetske kontrole kisseptin neurona i GnRH neurona u nastanku puberteta.

### 13.6.1. Kisseptin

Gen *KISS1*, otkriven je 1996. godine u gradu Heršej (Hershey) u SAD i obzirom na to da se u tom gradu proizvode čuvene čokolade "Poljupci" (Kisses) dobio je naziv po njima. Nekoliko godina kasnije je otkriveno je da mutacije gena *KISS1* koji kodira kisseptin i gena za njegov receptor, *KISS1R*, dovode do infertilnosti. Kao i kod drugih sisarskih vrsta, primena kisseptina stimuliše lučenje LH kod ljudi koji imaju mutaciju ova dva gena i koji su infertilni. Intenzivna istraživanja uloge kisseptina u reprodukciji dovela su do širokog stava da ima ključnu ulogu u nastanku puberteta.



**Slika 13.1** Model kontrole nastanka puberteta kod primata. U infantilnom periodu postoji pulsativno oslobađanje GnRH pod uplivom kispeptina. U juvenilnom periodu dolazi do centralne inhibicije aktivnosti i osovina hipotalamus-hipofiza-gonade miruje. U pubertalnom periodu dolazi do uklanjanja centralne inhibicije i uspostavlja se aktivnost generatora pulseva GnRH što omogućava ulazak jedinke u pubertet. Debljina strelice koja označava negativnu povratnu spregu ukazuje na stepen inhibicije od strane gonada koja je posredovana steroidnim hormonima u ove tri faze seksualnog razvoja kod primata. (Slika je napravljena u Biorenderu).

Na slici 13.1 prikazan je model reaktivacije generatora pulseva GnRH u pubertalnom periodu, u kome su ključni element KNDy neuroni koji su smešteni u arkuatnom/infundibularnom jedru. Njihova reaktivacija je kritična za nastanak puberteta. U ovom modelu, KNDy neuroni su predstavljeni kao integralni element generatora pulseva GnRH. Aksoni ovih neurona završavaju se na aksonskim (dendronskim) završecima GnRH neurona u eminenciji medijani. U infantilnom periodu pulsativna aktivnost indukovana iz arkuatnog jedra rezultira isprekidanim oslobađanjem

kispeptina, dovodeći do odgovarajuće pulsativnog lučenja GnRH u portalnu cirkulaciju. To dalje stimuliše pulsativno lučenje gonadotropina, LH i FSH. Na prelazu iz infantilnog u juvenilni period, centralna inhibicija izaziva smanjeno oslobađanje kispeptina. To smanjuje pulsativno oslobađanje GnRH i obezbeđuje mirovanje gonada. Uklanjanjem centralne inhibicije u periodu puberteta snažno se reaktivira pulsativno oslobađanje kispeptina i uspostavlja aktivnost generatora pulseva GnRH. Prema ovom modelu, ključ za nastanak puberteta kod primata jeste uklanjanje centralne inhibicije.

Koncept centralne inhibicije je dokumentovan kod rezus majmuna i ljudi, dok su literaturni podaci kod drugih vrsta sisara kontradiktorni. Tako na primer, dok kod primata kastracija u neonatalnom periodu izaziva samo prolazno povećanje lučenja LH/FSH, kod pacova i ovce to povećanje je trajno. Drugo, dok je kod prepubertalnih majmuna generator pulseva GnRH neosetljiv na estradiol, kod glodara je ovaj sistem veoma osetljiv na inhibitorno dejstvo estradiola. Takođe, dok se kod majmuna negativna povratna sprega estradiolom uspostavlja u ranom pubertalnom periodu, kod glodara se osetljivost na estradiol smanjuje nakon prve ovulacije.

### 13.6.2. Ekscitatorni i inhibitorni neurotransmiteri

Pored ključne uloge kispeptina, postoji i komponenta kontrole GnRH neurona koja je nezavisna od kispeptina i koja uključuje ekscitatorne i inhibitorne signale preko velikog broja sinaptičkih ulaza koji konvergiraju na kispeptin neurone i GnRH neurone. Neuroni koji luče glutamat (Glu neuroni) ispoljavaju ekscitatorno dejstvo vezujući se za receptore N-metil-D-aspartat (engl. *N-methyl-D-aspartate receptor*, NMDA) i kainatne receptore na postsinaptičkoj membrani. Glavne inhibitorne ulaze predstavljaju inhibitorni neuroni koji luče gaba-aminobuternu kiselinu (engl. *gaba-aminobutyric acid*, GABA) i deluju preko receptora GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>B</sub>. Endogeni opioidi inhibišu lučenje GnRH kod seksualno zrelih majmuna i čoveka i dalja spitivanja su ka pravcu njihove uloge u blokadi GnRH tokom juvenilnog perioda. Dokazano je da opioidni antagonisti, nalokson i naltrekson, ne izazivaju lučenje LH kod prepubertalnih rezus majmuna i šimpanza. Podaci o efektima neuropeptida Y (NPY) su kontradiktorni.

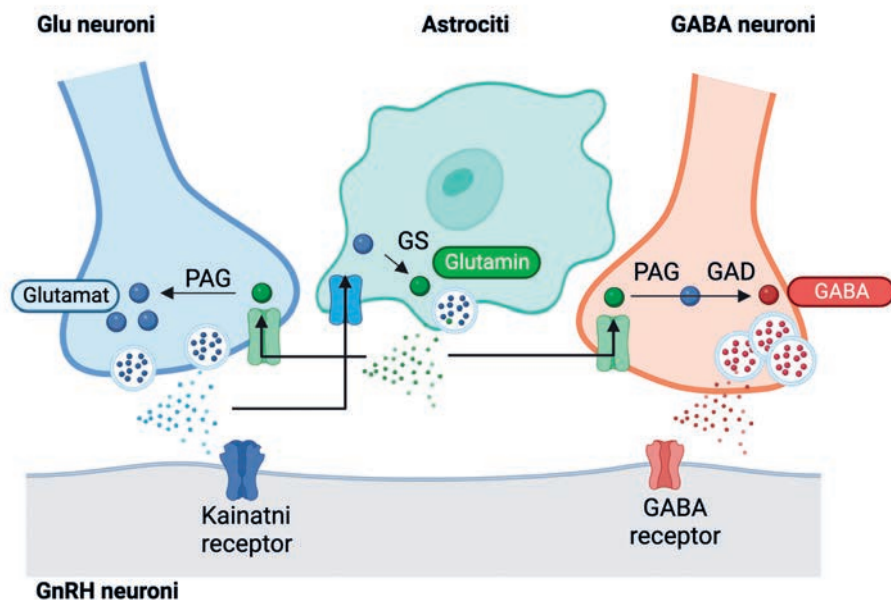
Tako, ispitivanja na ženkama pacova ukazuju na facilitatornu ulogu u kontroli puberteta. Kod pubertalnih i postpubertalnih ženki majmuna vidljivo je stimulatorno dejstvo na oslobađanje GnRH, ali taj efekat izostaje kod prepubertalnih životinja. Takođe, kod postpubertalnih agonalnih majmuna centralna primena NPY izaziva inhibiciju pulsativnog oslobađanja GnRH.

Aktivacija receptora NMDA selektivnim agonistima ubrzava pubertet i kod pacova i kod majmuna, dok blokada ovih receptora ima suprotno dejstvo. Takođe se kod pacova povećava aktivnost receptora NMDA u hipotalamusu u peripubertalnom periodu i to povećanje je nezavisno od gonada. Pokazano je da tokom perioda puberteta oko 50% GnRH neurona kod pacova eksprimira kainatne ili NMDA receptore. Istraživanja na ženkama majmuna ukazuju da GABA ima značajnu ulogu u blokadi lučenja gonadotropina tokom juvenilnog perioda, kao i da primena blokatora receptora za GABA izaziva prerani pubertet. Takođe, klinička studija pokazuje da primena GABA agonista jedanaestogodišnjoj devojčici sa epilepsijom i preranom gonadarhom smanjuje lučenje LH i usporava pubertalni razvoj.

Iako eksperimentalne manipulacije u pogledu lučenja glutamata i GABA dovode do suprotnih promena na nivou GnRH neurona, postoji puno rezultata koji ukazuju na njihovu povezanost. Moglo bi se pretpostaviti da samo povećanje ekscitatornih ulaza, ili samo gubitak inhibitornih ulaza na nivou generatora pulseva GnRH dovodi do isključenja blokade na prelazu juvenilnog doba u pubertet. Eksperimenti na rezus majmunima pokazuju da tokom juvenilnog perioda postoji povećani nivo GABA u eminenciji medijani. Ukazuje se dakle na postojanje tonične inhibicije usmerene ka osovini hipotalamus-hipofiza od strane GABA koja je odgovorna za mirovanje ove osovine tokom juvenilnog perioda. Smanjenje GABA dovodi do uklanjanja tonične inhibicije što proizvodi aktivaciju osovine hipotalamus-hipofiza-gonada i do početka puberteta. Niži nivoi GABA će takođe povećati nivo Glu u nivou eminencije medijane što će doprineti nastanku puberteta. Danas se smatra da je nastanak puberteta verovatno posledica povezanih događaja, pri čemu neki autori uključuju kao treću komponentu recipročnu komunikaciju koja postoji između neurona i glija ćelija u mozgu. Korišćenjem elektronske mikroskopije je pokazano da u hipotalamusu pri-

mata postoje brojne sinaptičke interakcije između interneurona koje luče glutamat odnosno GABA. Pored toga, glutamat je prirodni prekursor za sintezu GABA i promene u njegovoj dostupnosti utiču na sintezu GABA. Model povezanosti glutamata i neurotransmitera GABA se još naziva ciklus glutamat-glutamin-GABA i opisuje sledeće događaje (Slika 13.2). U GABA neuronima glutamat se procesom dekarboksilacije uz katalitičku aktivnost glutamat dekarboksilaze prevodi u neurotransmiter GABA koji se oslobađa u sinapsu putem egzocitoze. GABA neuroni dobijaju glutamat na dva načina: preuzimanjem glutamina iz sinapse koji se zatim u GABA neuronima dejstvom enzima glutaminaze prevodi u glutamat. Takođe, GABA neuroni poseduju specifične transportere za glutamat tako da ga mogu direktno preuzeti iz sinapse i prevoditi ga u GABA. Glutamin koji GABA neuroni preuzimaju iz sinapse nastaje u astrocitima. Ove ćelije prave glutamin od glutamata pomoću enzima glutamin sintaze, a posle ga oslobađaju u sinapsu odakle ga preuzimaju GABA neuroni i koriste za sintezu GABA. Glutamat koji je potreban za sintezu glutamina u astrocitima nastaje u Glu neuronima. Glu neuroni isto preuzimaju glutamin iz sinapse, a zatim ga prevode u glutamat pomoću enzima glutaminaze. Glutamat iz Glu neurona se oslobađa u sinapsu gde deluje na receptore na postsinaptičkoj membrani, ili ga preuzimaju astrociti za sintezu glutamina. Zbog ove povezanosti sinteze neurotransmitera, promene u nastajanju GABA imaju uticaj na nivo glutamata u hipotalamusu. Naime, *in vivo* blokada sinteze GABA u hipotalamusu, dovodi do povećanog lučenja glutamata. Stoga se može pretpostaviti da su promene u aktivnosti ovih neurona od velikog značaja za nastanak puberteta.





**Slika 13.2.** Šematski prikaz glutamat–glutamin i GABA–glutamin metabolizma između Glu neurona, GABA neurona i astrociti. Glu–glutamat, PAG–glutaminaza, GS–glutamin sintaza, GAD–glutamat dekarboksilaza (Slika je napravljena u Biorenderu)

U hipotalamusu ženke pacova se tokom puberteta u astrocitima smanjuje aktivnost glutamin sintaze koja prevodi glutamat u glutamin, prekursor za sintezu GABA u inhibitornim neuronima. Takođe, povećava se aktivnost glutamat dehidrogenaze koja katališe sintezu glutamata od oksoglutarata. Glutamin sintaza i glutamat dehidrogenaza su lokalizovane pretežno u astrocitima. Odgovarajuće promene u sintezi ova dva enzima mogu da rezultiraju u povećanju ekscitatornih signala prema GnRH neuronima.

### 13.6.3. Glija ćelije

Glija ćelije (astrociti i tanciti), prisutne u hipotalamusu, ostvaruju brojne kontakte sa GnRH neuronima. Astrociti produkuju faktore iz familije epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factors*, EGF), transformišućeg faktora rasta alfa (eng. *transforming growth factor alpha*, TGF $\alpha$ ) i neuroregulin (engl. *neuroregulin*, NRG) koji ostvaruju svoje

dejstvo na nivou astrocita aktivacijom receptora za TGF odnosno receptora za EGF, erbB1/erbB2 i erbB4/erbB2. Glutamat olakšava signalizaciju TGF $\alpha$ /NRG u astrocitima, jer aktivira odgovarajuće metaloproteinaze koje obezbeđuju obradu TGF $\alpha$  i NRG. Autokrina regulacija aktivnosti astrocita dovodi do nastajanja i oslobađanja prostaglandina E (engl. *prostaglandin E<sub>2</sub>*, PGE<sub>2</sub>), koji deluje na GnRH i stimuliše lučenje GnRH. GnRH neuroni poseduju receptore za PGE<sub>2</sub>. Još pre 40 godina, Serđo Ojeda (Sergio Ojeda) je utvrdio da je PGE<sub>2</sub> bitan regulator reproduktivne funkcije. Kod ženki pacova dolazi do progresivnog porasta sinteze PGE<sub>2</sub> u hipotalamusu kako se jedinka približava pubertetu, a smanjena sinteze ovog prostaglandina odlaže pubertet. Blokada receptora za TGF, takođe odlaže pubertet i remeti reproduktivnu funkciju kod odraslih ženki glodara.

#### 13.6.4. Epigenetska kontrola

Kontrola eksprimiranja gena preko epigenetskih mehanizama omogućava integraciju signala koji su programirani (genetski zadati) i onih iz spoljašnjeg okruženja organizma. To obezbeđuje sposobnost za adaptacije na promenjene uslove životne sredine kroz promenu genske aktivnosti. Modifikacija histona je jedan od načina epigenetske kontrole eksprimiranja gena. Modifikacija histona može da podrazumeva metilaciju lizina pod dejstvom histon-metiltransferaze koje vrše metilaciju lizina najčešće u histonu 3 i 4. U zavisnosti od pozicije lizina kome su dodate metil-grupe, kao i od broja dodatih metil-grupa, modifikovani histoni mogu da deluju i kao blokatori i kao aktivatori eksprimiranja gena. Na primer, H3K4me2 (histon 3 sa lizinom na poziciji 4 sa po dve metil-grupe) deluje kao aktivator, dok H3K27me2, H3K27me3, H3K9me2 i H3K9me3 deluju kao blokatori.

Utvrđeno je da se, pre puberteta, geni *KISS1* i *TAC3* (gen koji se sastoji od 5 egzona, na egzonu 5 se nalazi sekvenca za NKB) eksprimiraju na veoma niskom nivou. Kod majmuna su promotori ovih gena zauzeti transkripcionim represorom GATAD1 koji regrutuje histon demetilazu KDM1A koja demetiluje mono- i dimetilovane H3K4. Pri prelasku prepubertalnog u pubertalni period dolazi do povećanja nivoa H3K4me2 na oba promotora paralelno sa padom povezanosti GATAD1 i KDM1 sa promotorima gena *KISS1* i *TAC3*. Na taj način, H3K4me2 omogućava povećanje eksprimira-

nja ovih gena. Druga istraživanja na ženkama miševa su ukazala na ulogu kompleksa proteina označenog kao PcG (engl. *polycomb*). Ovaj kompleks predstavlja grupu proteina koji deluju kao represori eksprimiranja gena. Pokazano je da su u okviru PcG, dva proteina važna za nastanak puberteta, EED i CBX7 koji blokiraju aktivnost gena *KISS1*. Geni za EED i CBX7 detektovani su u arkuatnom jedru. Eksprimiranje ovih gena smanjuje se metilacijom DNK, što dovodi do smanjenja aktivnosti represornih proteina i povećava se aktivacija gena za kisleptin pod uplivom aktivirajućih faktora.

### 13.6.5. Energetski status i leptin

Kao što je ranije rečeno, jedna od hipoteza o nastanku puberteta ukazuje na značaj somatskog razvoja. On zavisi od energetskog statusa organizma i nutritivnih faktora. Negativan energetski balans organizma (pothranjenost) i metabolički stress mogu da izazovu inhibiciju eksprimiranja gena *Kiss1* kod pacova u pubertetu kao i kod odraslih jedinki. Takođe, stanje hipogonadizma i odsustva puberteta usled pothranjenosti, može da bude prevaziđeno primenom kisleptina. Poremećaji u lučenju gonadotropina uslovljeni metaboličkim stresom kao što je nekontrolisani dijabetes mogu takođe da se ponište primenom kisleptina. Na osnovu ovakvih rezultata, pretpostavka je da kisleptin neuroni funkcionišu kao metabolički sensori koji informacije o metaboličkom statusu organizma prenose GnRH neuronima. Hormon masnog tkiva leptin je uključen u ovu aktivnost. Miševi sa mutacijom *ob/ob* u genu za leptin imaju značajno smanjenje transkripata za kisleptin u arkuatnom jedru, dok primena leptina poništava ovaj efekat. Nizak nivo transkripata za kisleptin sreće se i u neregulisanom dijabetesu. Imajući u vidu stimulišuće dejstvo leptina na aktivnost kisleptin neurona, moglo bi da se pretpostavi da telesna masa može da utiče na početak puberteta, preko nivoa leptina koji produkuje masno tkivo. Primena leptina smanjuje starost pri kojoj nastaje pubertet kod pacova i miševa. Takođe, *ob/ob* ženke miševa sa mutacijom u genu za leptin su sterilne, kao i *db/db* miševi sa mutacijom u receptoru za leptin.

GnRH neuroni nemaju receptore za leptin, ali se oni eksprimiraju na kisleptin neuronima. Leptin, delujući na kisleptin neurone, indirektno učestvuje u stimulaciji GnRH neurona. Molekularni mehanizmi regulacije

kispeptin neurona od strane leptina su predmet istraživanja više godina. Opisan je metabolički put koji uključuje atipičnu, sveprisutnu serin/treonin kinazu mTOR (engl. *mammalian target of rapamicin*) koja je ključna komponenta proteinskog kompleksa mTORC1 prisutnog u neuronima arkuatnog jedra. Pretpostavlja se da je mTORC1 odgovoran za dejstvo leptina na energetske homeostazu i unos hrane. Najnoviji rezultati ukazuju da blokada mTORC1 remeti normalan nastanak puberteta kod ženki pacova, kao i efekat leptina na produkciju kispeptina i nastanak puberteta. Tako, blokada mTORC1 primenom rapamicina izaziva smanjenje eksprimiranja gena *Kiss1* u arkuatnom jedru dok je manji efekat uočen u anteroventralnom periventralnom jedru kod pubertalnih ženki glodara. S druge strane aktivacija mTORC1 ponovljenom primenom L-leucina povećava lučenje LH u uslovima negativnog energetskog balansa organizma zbog pothranjenosti.

Pored rezultata o molekularnim senzorima preko kojih leptin deluje na kispeptin neurone, postoje podaci o učešću drugih struktura, osim arkuatnog jedra, u ostvarivanju dejstva leptina u metaboličkoj kontroli puberteta. Poznato je da leptin deluje na ventralno premamilarno jedro. Bilateralne lezije tog jedra smanjuju nivo LH i estradiola i sprečavaju pozitivno dejstvo leptina na osovину hipotalamus-hipofiza-jajnici kod životinja koje gladuju. Postoje pretpostavke o direktnom dejstvu Glu neurona iz ventralnog premamilarnog jedra na GnRH neurone, odnosno indirektnom preko dejstva na kispeptin neurone.

## 13.7. POREMEĆAJI PUBERTETA

Poremećaji u nastanku puberteta se grupišu u dve osnovne kategorije: prerani i zakasneli pubertet. Zakasneli pubertet ili odsustvo puberteta jeste posledica mutacija u više različitih gena. Kliničke studije ukazuju da pacijenti sa hipotalamičnim hipogonadizmom (engl. *hypothalamic hypogonadism*, HH) mogu da imaju mutaciju gena *KISS1R*, kao i mutaciju gena *KISS1*. Individue sa HH ne ulaze u pubertet, infertilne su, jer nemaju odgovarajući nivo FSH i LH. Analizirani su podaci o mutacijama gena *KISS1R* kod jedne porodice u Saudijskoj Arabiji u kojoj je šest članova imalo HH. Kod njih su nađene odgovarajuće mutacije u ovom receptoru (na položaju 148 leucin je zamenjen serinom). Kod ljudi mutacije u genu *TAC3* ili re-

ceptoru za ovaj neuropeptid (*TACR3*) takođe su povezane sa HH. Kalmanov sindrom je HH udružen sa gubitkom čula mirisa usled mutacije gena *ANOS-1* čiji produkt anosmin-1 učestvuje u migraciji GnRH neurona tokom embrionalnog razvoja. Takođe, registrovane su aktivacione mutacije u genu *KISS1*, kao i u genu *KISS1R* kod jednog dečaka i jedne devojčice koje su imali prerani pubertet (engl. *idiopathic central precocious puberty*, ICPP). Međutim, u slučaju ICPP ovakve mutacije su retkost. ICPP sa javlja mnogo češće u odnosu na HH. Incidenca za ICPP je oko 0.2%, dok je za HH 0.001–0.01%. ICPP može da bude povezan sa urođenom hiperplazijom nadbubrežnih žlezdi, koja se karakteriše povišenim androgenima, što je možda uzrok preranog puberteta. Prerani pubertet može da bude povezan i sa sindromom policističnih jajnika (engl. *polycystic ovary syndrome*, PCOS). Naime, povećani androgeni kod PCOS mogu izazvati prerani pubertet stimulacijom osovine hipotalamus-hipofiza-gonade. Kod adolescentkinja sa PCOS nivo kisleptina je povećan. Takođe, gojaznost ne mora da bude povezana sa preranim pubertetom. Devojčice sa ICPP imaju viši nivo kisleptina u serumu u odnosu na devojčice istih godina. Kisleptin u serumu pozitivno korelira sa nivoom LH u serumu, ali ne i sa indeksom telesne mase.

Studije mutacija kod osoba sa preranim pubertetom koji je uzrokovan centralnim mehanizmima ukazale su na mutaciju gena *MKRN3*. *MKRN3* (eng. *makorin RING finger protein 3*) je protein sa aktivnošću E3-ubikvitin ligaze, prisutan je u centralnom nervnom sistemu u ranom periodu razvoja kod miša, pacova i ne-čovekolikih primata. Gen *MKRN3* je monoalelni, odnosno imprintovan na majčinom hromozomu, a eksprimira se samo očev alel. U prepubertalnom i pubertalnom periodu kod jedinki ovih vrsta dolazi do smanjenja ekspimiranja gena za *MKRN3*. Postoje studije o smanjenju *MKRN3* u cirkulaciji dečaka pre i tokom puberteta. Takođe, kod devojčica sa preranim pubertetom nivo *MKRN3* u cirkulaciji je niži u odnosu na zdrave osobe istog uzrasta. Ispitivanja na miševima i rezus majmunima pokazuju da je *MKRN3* povezan sa promotorom gena *KISS1* i *TAC3* i da blokira prepisivanje gena.

## 13.8. LITERATURA

- Johnson MH (2013) *Essential Reproduction*. 7. izdanje. John Wiley&Sons, 133–145.
- Feldman SF i Topaloglu AP (2019) Puberty: Gonadarche and Adrenarche. U: JF Strauss i RL Barbieri, ur., *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* 8. izdanje, Elsevier, 395–466.
- Prevot V (2015) Puberty in mice and rats, U: Plant T i Zeleznik A, ur., *Knobil & Neill's Physiology of Reproduction*, 4. izdanje, Elsevier, 1395–1439.
- Plant MT (2015) Neuroendocrine control of the onset of puberty. *Front Neuroendocrinol* 38:73–88.
- Evans AM (1986) Age at puberty and first litter size in early and late paired rats. *Biol Reprod* 34:322–326.
- Caligioni C (2009) Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*. Appendix:Appendix–4I.
- Plant TM, Terasawa Ei, Witchel SF (2015) Puberty in non-humane primates and man, U: Plant T i Zeleznik A, ur., *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 4. izdanje, Elsevier, 1487–1536.
- Marshall FHA (1936) XI – The Croonian Lecture Sexual periodicity and the cause which determine it. Preuzeto sa <http://rstb.royalsocietypublishing.org/> on March 17, 2015.
- Long JA and Evans HL (1922) The estrous cycle in the rat and its associated phenomena, *Memoirs of the University of California*, ur., Leuschner AO, University California press, vol. 6:1–148.
- Ojeda SR, Skinner MK (2006) Puberty in the Rat, U: Plant T and Zeleznik A, ur., *Knobil & Neill's Physiology of Reproduction*, 3. izdanje, Elsevier, 2061–2125.
- Harris GW (1936) The induction of pseudo-pregnancy in the rat by electrical stimulation through the head. *J Physiol* 88:361–367.
- Guillemin R (2005) Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors *J Endocrinol* 184:11–28.
- Ramirez DV, McCann SM (1963) Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats. *Endocrinology* 72:452–464.
- Foster DL and Hileman SM (2015) Puberty in the sheep, In: U: Plant T and Zeleznik A, ur., *Knobil & Neill's Physiology of Reproduction*, 4. izdanje, Elsevier, 1487–1536.
- Conley AJ, Bernstein MR, and Nguyen AD (2012) Adrenarche in nonhuman primates: the evidence for it and the need to redefine it. *Journal Endocrinol* 214:121–131
- Rainey WE, Carr BR, Sasano H, et al (2002) Dissecting human adrenal androgen production. *TEM*13:234–239.
- Remer T, Boye KR, Hartmann MF and Wudy SA (2005) Urinary markers of adrenarche: reference values in healthy subjects aged 3–18 years. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2015–2021.

- Cariboni A, Maggi R and Parnavelas JG (2007) From nose to fertility: the long migratory journey of gonadotropin releasing hormone neurons. *Trends Neurosci* 30:638–643.
- Plant TM (2008) Hypothalamic control of the pituitary/gonadal axis in higher primates: key advances over the last two decades. *J Neuroendocrinol* 20:719–726.
- Herbison AE (2018) The gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Endocrinology* 159:3723–3736.
- Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Steiner RA, Okamura H. (2010) Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 30:3124–3132.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent A-S, Matagne V, and Mungenast AE (2006) Minireview: The Neuroendocrine Regulation of Puberty: Is the Time Ripe for a Systems Biology Approach? *Endocrinology* 147:1166–1174.
- Terasawa EI, Guerriero KA and Plant TM (2013) Kisspeptin and Puberty in Mammals. *Adv Exp Med Biol* 784:253–273.
- Terasawa E, Garcia JP, Seminara SB and Keen KL (2018) Role of Kisspeptin and Neurokinin B in Puberty in Female Non-Humane primates. *Frontiers in Endocrinol* 9:148.
- Prevot V, Sharif A (2021) The polygamous GnRH neuron: Astrocytic and tanycytic communication with a neuroendocrine neuronal population. *J Neuroendocrinol* 34:e13104
- McCarthy MM, Rissman EF (2015) Epigenetics of reproduction. U: Plant T i Zeleznik A, ur., Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, 4. izdanje, Elsevier, 2439–2501.
- Shalev D, Melamed P (2020) The role of the hypothalamus and pituitary epigenomes in central activation of the reproductive axis at puberty. *Mol Cell Endocrinol* 518:111031.
- Lomnizi A, Loche A, Castellano JM, Ronnekleiv OK, Bosch M, Kaidar G, Knoll JG, Wright H, Pfeifer GP, Ojeda SR (2013) Epigenetic Control of Female Puberty. *Nat Neurosci* 16:281–289.
- Roa J and Tena-Sempere M (2010) Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. *TEM* 21:519–528.
- Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M (2013) Metabolic control of puberty: Roles of leptin and kisspeptins. *Horm Behav* 64:187–194.
- Elias CF and Purohit D (2013) Leptin signaling and circuits in puberty and fertility *Cell Mol Life Sci* 70:841–862.

- Abreu AP, Toro CA, Song YB, Navarro VM, Bosch MA, Eren A, Liang JN, Carroll RS, Latronico AC, Ronnekleiv OK, Aylwin CF, Lomnizi A, Ojeda S, Kaiser UB (2020) MKRN3 inhibits the reproductive axis through actions in kisspeptin-expressing neurons. *J Clin Invest* 130:4486–4500.
- Abbara A, Djillo WS (2020) Makorin rings the kisspeptin bell to signal pubertal initiation. *J Clin Invest* 130:3957–3960.
- Ojeda SR, Lomnizi A, Sandau U (2014) Contribution of glial-neuronal interactions to the neuroendocrine control of female puberty. *Eur J neurosci* 32:2003–2010.
- Liang SL, Carlson GC, Coulter DA (2014) Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate – glutamine cycle in hippocampal area CA1. *J Neurosci* 26:8537–8548.
- Devillers MM, Mhaouty-Kodja S, Guigon CJ (2022) Deciphering the Roles & Regulation of Estradiol Signaling during Female Mini-Puberty: Insights from Mouse Models. *Int J Mol Sci* 23:13695



**Kristina Pogrmic-Majkić**

---

# **14. MENOPAUZA**

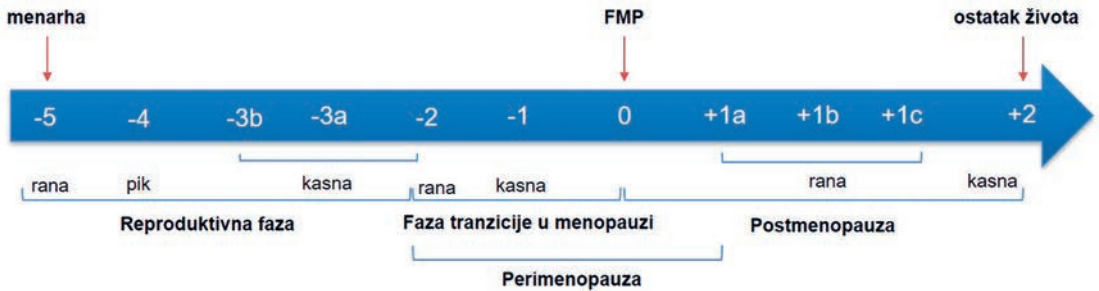
---



Menopauza označava poslednju menstruaciju i predstavlja kraj reproduktivnog perioda žene. Termin menopauza izveden je iz grčkih reči *men* (mesec) i *pausis* (prestanak). Menopauza je prirodan proces, predstavlja retrospektivnu dijagnozu i tvdi se da se dogodila kada je menstrualna aktivnost prestala najmanje 12 uzastopnih meseci u odsustvu bilo kakvog drugog fiziološkog ili patološkog objašnjenja. Označava kraj reproduktivnog života žene i folikularne aktivnosti jajnika. Menopauza nastaje kao posledica iscrpljivanja rezerve primordijalnih folikula, kada broj preostalih folikula jajnika padne ispod kritičnog praga, na oko 1.000, bez obzira na starost. U proseku kod žena, pad plodnosti se javlja oko 37–38 godine života, a menopauza sledi otprilike 13 godina kasnije (prosečna starost 51–52 godine). Podaci dobijeni iz epidemioloških studija ukazuju da oko 10% žena u opštoj populaciji ulazi u menopauzu oko 45. godine, dok tačni uzroci koji su u osnovi spontane prevremene menopauze (pre 40. godine) ostaju nejasni. Kako se očekivani životni vek povećava posle osme decenije života, posebno u razvijenim zemljama, sve veći procenat ženske populacije je u postmenopauzi. S obzirom na to da je prosečna starost žene koja ulazi u menopauzu između 51 i 52 godine života u zapadnim zemljama, više od jedne trećine života žena provodi u fazi postmenopauze. U ovoj fazi života se simptomi i znaci nedostatka estrogena stapaju sa problemima koji se javljaju tokom prirodnog starenja. Takođe, čini se da postoje etničke razlike u pogledu starosti žena koje ulaze u menopauzu. U Sjedinjenim Američkim Državama otkriveno je da Afroamerikanke i Hispanoamerikanke imaju menopauzu otprilike dve godine ranije. Malajke imaju menopauzu sa približno 45 godina, Tajlandanke sa 49,5 godina, Filipinke između 47 i 48, a Indijke sa 46,2 godina. Osim toga, žene u zemljama na većoj nadmorskoj visini (Himalaji ili Andi) ulaze u menopauzu 1 do 1,5 godinu ranije.

Godine starosti u kojima žena ulazi u menopauzu u najvećoj meri (87%) genetski su određene, ali i interakcija sa faktorima sredine i mogućim gonadotoksičnim faktorima može imati uticaja. Do sada su identifikovani geni kandidati koji su povezani sa pojavom menopauze, a uključeni su u procese replikacije DNK i popravku oštećenja, produkciju i delovanje hormona i imunološke funkcije. Ipak, mehanizmi delovanja ovih gena kao i njihove interakcije sa faktorima sredine i mogućim gonadotoksičnim faktorima još uvek nisu do kraja istražene. Opšte zdravstveno stanje, socioekonomski status, pušenje kao i telesna masa mogu uticati na poja-

vu menopauze. Smatra se da su godine kada žena ulazi u menopauzu u prvom redu u korelaciji sa opštim zdravstvenim statusom. Takođe, niži socioekonomski status povezan je sa ranijom pojavom menopauze, dok je s druge strane, viši socioekonomski status povezan sa kasnijom menopauzom. Pokazano je da je pušenje povezano sa pojavom menopauze 1 do 2 godine ranije. Telesna masa takođe može uticati na pojavu menopauze, veća masa se povezuje sa kasnijom menopauzom, dok su pothranjenost i vegetarijanstvo povezani sa ranijim početkom menopauze. Menopauza pre 40. godine smatra se preuranjenom. Nasuprot tome, 97% žena će proći kroz menopauzu do 58 godine života.



**Slika 14. 1.** STRAW 10+ klasifikacija životnog veka žene.

Standardizovana nomenklatura koja je doneta 2001. godine na Konferenciji o fazama reproduktivnog starenja (engl. *Stages of Reproductive Aging Workshop*, STRAW), te zajedno sa kriterijumima koji su ažurirani na konferenciji STRAW 2010. godine „STRAW + 10“ predstavlja zlatni standard za karakterizaciju reproduktivnog starenja kroz menopauzu. Prema ovoj klasifikaciji životni vek žene deli se u tri faze: reproduktivnu fazu, fazu tranzicije u menopauzi (stariji termin-perimenopauza) i fazu postmenopauze. Svaka od tri faze je podeljena na stadijume na osnovu informacija dobijenih kliničkim putem (obrazac menstrualnog ciklusa, simptomi), određivanja nivoa hormona, folikulostimulišućeg hormona (engl. *follicle-stimulating hormone*, FSH), anti-Milerovog hormona (engl. *anti-Mullerian hormone*, AMH) i inhibina-B u serumu, kao i ultrazvučnog određivanja broja antralnih folikula u jajniku (engl. *antral follicle count*, AFC). Poslednji menstrualni period (engl. *final menstrual period*, FMP) je identifikovan kao stadijum „0“

koji označava prekretnicu između reproduktivnog i postreproduktivnog perioda života žene i služi kao polazna tačka za tumačenje ostalih faza u okviru tri navedene faze životnog veka žene (Slika 14.1).

Reproduktivna faza obuhvata period od menarhe (prvi menstrualni ciklus) do početka faze tranzicije u menopauzi (kada menstrualni ciklus postane varijabilan) i podeljena je na tri faze (rana -5, pik -4, i kasna -3). Kasna reproduktivna faza podeljena je na podfaze -3b i -3a. U podfazi -3b, menstrualni ciklusi su uglavnom nepromenjeni, nivo FSH u ranoj folikularnoj fazi u serumu je relativno nizak i u normalnom opsegu, dok su AMH i AFC niski. U podfazi -3a, menstrualni ciklusi postaju kraći, FSH se povećava tokom rane folikularne faze ciklusa, dok su AMH, AFC i inhibin B niski. U tom periodu uočava se pad plodnosti kao najranije obeležje tranzicije praćeno prvenstveno promenama u obrascu menstrualnog ciklusa.

Na početku reproduktivnog perioda žene, nakon prve menarhe, u periodu od 2 do 3 godine javljaju se relativno dugi menstrualni ciklusi, a zatim se povećava redovnost kako se ciklusi skraćuju, da bi dostigli uobičajeni obrazac tokom reproduktivnog doba. U četrdesetim godinama, dužina ciklusa može ponovo početi da se menja (povećava se 2–8 godina pre menopauze). Najveća stopa anovulacijskih ciklusa je kod žena mlađih od 20 godina i kod žena preko 40 godina. U dobi od 25 godina, preko 40% ciklusa traje između 25 i 28 dana. U periodu od 25 do 35 godina, preko 60% ciklusa je između 25 i 28 dana, dok oko 15% ciklusa u reproduktivnom periodu ima savršen obrazac dužine 28 dana. 0,5% žena ima ciklus kraći od 21 dan, a samo 0,9% žena ima ciklus duži od 35 dana. Većina žena ima cikluse koji traju od 24 do 35 dana, a najmanje 20% žena ima nepravilne cikluse. Ciklusi duži od 40 dana su prilično rasprostranjeni u godini pre menopauze. Važno je napomenuti da čak i nepravilni ciklusi sa dugim intervalima (>50–60 dana) mogu biti ovulatorni (25%), te iako je plodnost značajno smanjena, žene u kasnoj fazi tranzicije u menopauzi imaju rizik od neplanirane trudnoće.

Faza tranzicije menopauze podeljena je na dve faze (rana -2 i kasna -1). Tokom rane faze tranzicije u menopauzi dolazi do povećanja FSH, sa uporno niskim nivoima AMH i niskim AFC, a dužina ciklusa postaje izuzetno varijabilna. Ova nepravilnost u dužini ciklusa se definiše kao ponavljanje razlike od 7 dana u dužini ciklusa tokom 10 uzastopnih ciklusa. Kasniju

fazu tranzicije u menopauzi karakterišu dve preskočene menstruacije, dakle ciklusi sa 60 ili više dana amenoreje (odsustvo menstruacije). Menstrualni ciklusi su sve nepravilnije dužine, nivo reproduktivnih hormona je varijabilan i često izostaje ovulacija. Nivo FSH je povišen, veći od 25 IU/L. Ova faza traje 1–3 godine, kada počinju da se javljaju vazomotorni simptomi kao što su naleti vrućine. Faza tranzicije u menopauzi se završava sa FPM i početkom postmenopauze.

Postmenopauza počinje nakon FPM iako se prepoznaje tek posle 12 meseci amenoreje. Fazu postmenopauze takođe čine dve faze (rana +1 i kasna +2). Rana faza postmenopauze podeljena je na podfaze +1a, +1b, +1c. Faza +1a označava završetak intervala od 12 meseci amenoreje, potrebnog za definisanje FMP. Takođe, označava i kraj faze tranzicije u menopauzi (perimenopauza- počinje u fazi -2 i završava se 12 meseci nakon FMP). Podfaze +1a i +1b u postmenopauzi traju po godinu dana i kulminiraju kada se fluktuacija nivoa FSH stabilizuje. Faza +1b uključuje kontinuirane promene nivoa FSH i estradiola; vazomotorni simptomi su najčešći u stadijumu +1a i +1b. Dakle, tokom rane faze postmenopauze, nivo FSH nastavlja da raste, dok nivo estradiola nastavlja da opada do dve godine nakon FMP, a potom se nivoi ovih hormona stabilizuju. Fazu +1c, karakteriše povišen FSH i nizak nivo estradiola. Ova podfaza traje od 3 do 6 godina. Ukupno, rana faza postmenopauze obuhvata period od 5 do 8 godina. Kasnu fazu postmenopauze (faza +2) karakterišu stabilni nivoi reproduktivnih hormona. U ovom periodu intenzitet vazomotornih simptoma za mnoge žene se smanjuje, dok fizički simptomi koji se mogu pripisati nedostatku estradiola, kao što su suvoća vagine i urogenitalni simptomi, postaju izraženiji.

## **14.1. HORMONSKE PROMENE TOKOM FAZE TRANZICIJE U MENOPAUIZI**

Period tranzicije u menopauzi označava period pre nastupanja menopauze, traje do poslednjeg menstrualnog perioda i početka postmenopauze. Najčešće nastupa oko 45 godine i traje 5–7, a može da traje i desetak godina. Fazu tranzicije u menopauzi karakterišu nepravilni menstrualni ciklusi, dolazi do pojave prvih simptoma menopauze sa porastom FSH. Tokom

tranzicije, hipotalamus-hipofizna osovina gubi osetljivost i na pozitivne i na negativne uplive estrogena, što rezultira anovulacijskim obrascima menstrualnog ciklusa. Endokrinologija tranzicije u menopauzi je složena, a cirkulišući nivoi estradiola, FSH i luteinizirajućeg hormona (engl. luteinizing hormone, LH) mogu u velikoj meri da variraju tokom ranih faza tranzicije. Pad broja jajnih ćelija do kritičnog nivoa i prestanak folikularne aktivnosti jajnika dovodi do ranih promena u hormonima i aktivaciji mehanizma povratne sprege između jajnika, hipofize i hipotalamusa, što u prvom redu izaziva promene u nivou gonadotropina. Koncentracija inhibina B u ranoj folikularnoj fazi kod žena u kasnim tridesetim godina opada, a FSH raste. Pokazano je da je nivo FSH viši tokom ciklusa kod starijih žena sa ovulacijom nego kod mlađih žena. Promene hormona su povezane sa progresivno anovulacijskim menstrualnim ciklusima sve dok se ne desi poslednja menstruacija. Povećani gonadotropini održavaju normalan nivo estradiola u cirkulaciji sve do kasne faze tranzicije u menopauzi, kada nivo estradiola opada. Takve hormonske promene obično uzrokuju nepravilne menstrualne cikluse sa skraćivanjem dužine ciklusa tokom rane faze tranzicije u menopauzi što je praćeno progresivno dugim razmacima između menstrualnih perioda u kasnijoj fazi tranzicije u menopauzi (60 i više dana amenoreje). Nivo testosterona u cirkulaciji se ne menja značajno tokom faze tranzicije u menopauzi što menja odnos između androgena i estrogena i uzrok je simptoma povezanih sa viškom androgena kod nekih žena.

Nedavni podaci dobijeni iz sveobuhvatne epidemiološke studije koja je pokrenuta 1996. godine sa ciljem da okarakteriše i definiše procese tranzicije u menopauzi kod žena širom sveta (engl. *Study of Women's Health Across the Nation, SWAN*) pokazuju da nivo estradiola počinje da opada dve godine pre FMP. Porast nivoa FSH javlja se nekoliko godina pre menopauze, ali se značajno povećava u poslednje dve godine, a zatim se stabilizuje dve godine nakon menopauze. Nivo FSH se zatim smanjuje u postmenopauzi, oko sedme decenije života. Takođe, uočen je veoma spor pad nivoa androgena u prvom redu androstendiona i testosterona, koji se ne može adekvatno detektovati u fazi tranzicije menopauze.

Jajnik se značajno menja od rođenja do početka menopauze. Najveći broj primordijalnih folikula prisutan je u materici u 20. nedelji trudnoće

i podleže redovnoj stopi atrezije do oko 37. godine života. Između 37. godine života i menopauze pad primordijalnih folikula postaje brži, kada ne ostane više od hiljadu folikula. Ovi preostali folikuli su prvenstveno atretične prirode. Iako razlog za ovo ubrzanje nije jasan, jedna mogućnost se odnosi na lučenje aktivina. Aktivin, poreklom iz granulosa ćelija jajnika, važan je za stimulisanje eksprimiranja receptora za FSH (engl. FSH receptor, FSHR). Povećanje nivoa FSH kao posledica opadanja inhibina B, može dovesti do povećane produkcije aktivina, što za posledicu ima povećan broj FSHR i pojačano delovanje FSH. Profil povišenog nivoa aktivina sa nižim nivoom inhibina B pronađen je kod starijih žena. Može se očekivati da autokrino dejstvo aktivina, koje uključuje pojačano dejstvo FSH, stvori ubrzan rast i diferencijaciju granulosa ćelija dok istovremeno ovi folikuli postaju atretični.

Iako se generalno smatra da su promene u fazi tranzicije menopauze endokrine prirode i da dovode do promena u menstrualnom ciklusu, značajno smanjenje reproduktivnog kapaciteta dolazi nekoliko godina ranije. Ovaj pad naziva se i gametogenim zatajenjem jajnika i karakteriše se smanjenim lučenjem inhibina B u ranoj folikularnoj fazi, porastom nivoa FSH u serumu, smanjenim AFC na ultrazvuku, smanjenim nivoom AMH i značajnim smanjenjem plodnosti. Ove promene se mogu javiti kod žena sa normalnim menstrualnim ciklusom i bez očiglednih endokrinih promena, već u dobi od 35 godina (10 ili više godina pre pojave menopauze). Kada nivo inhibina B ili AMH postane veoma nizak da ne može da se detektuje, menopauza nastupa za 4 do 5 godina. Postoji nekoliko modela predviđanja pojave menopauze na osnovu nivoa AMH, međutim, AMH se ne može koristiti za precizno predviđanje starosne dobi u kojoj će nastupiti menopauza. Sa druge strane, značaj određivanja nivoa AMH se povećava sa godinama, kako se skraćuje vreme do menopauze. Takođe, izuzetno nizak AMH može pomoći u ranoj dijagnozi prevremene menopaze kod mladih žena sa porodičnom istorijom ovog sindroma i žena koje imaju primarnu ili sekundarnu amenoreju. AMH proizvode granulosa ćelije rastućih folikula (manjih od 8 mm u prečniku). Dokazano je da koncentracija AMH odražava broj preostalih folikula u jajniku, te predstavlja jedan od najčešće korišćenih pokazatelja "funkcionalne rezerve jajnika" sa potencijalnom vrednošću za dijagnozu i predviđanje menopauze. Pred-



nost AMH kao biomarkera je u tome što je njegova vrednost tokom celog ciklusa konstantna, što gotovo da nije podložan varijacijama pod uticajem gonadotropina i drugih faktora (preantralni i mali antralni folikuli su gonadotropin nezavisni) u poređenju sa FSH ili inhibinom B, i što se može meriti tokom bilo koje faze ciklusa.

## 14.2. HORMONSKE PROMENE TOKOM POSTMENOPAUIZE

Hormonske promene kod žena u postmenopauzi u poređenju sa ženama koje se nalaze u ranoj fazi tranzicije menopauze (detektovane u ranoj folikularnoj fazi, od 2 do 4 dana ciklusa) pokazale su da dolazi do izrazitog smanjenja estradiola i estrona, te da je nivo estradiola u serumu smanjen u većoj meri nego estrona. Estron se prvenstveno proizvodi perifernom aromatizacijom androgena, te nivo ovog hormona sporije opada, uglavnom u zavisnosti od starosti. Kod žena u postmenopauzi nivo estrona u cirkulaciji je veći od nivoa estradiola. Nivo estradiola je u proseku 15 pg/mL, a u rasponu je od 10 do 25 pg/mL, dok je nivo estrona u rasponu od 30 do 70 pg/mL. Kod žena koje su bile podvrgnute ooforektomiji (operativna metoda uklanjanja jajnika) nivo estradiola je 10 pg/mL ili manje. Vrednosti estrona u serumu su u proseku 30 pg/mL, ali mogu biti veće kod gojaznih žena zbog povećane aromatizacije u masnom tkivu. Nivo estron-sulfata, konjugata estrogena koji služi kao stabilan cirkulišući rezervoar estrogena, najviši je među estrogenima kod žena u fazi tranzicije menopauze, obično iznad 1000 pg/mL; dok je kod žena u postmenopauzi u proseku 350 pg/mL.

U postmenopauzi jajnik i nadbubrežne žlezde nastavljaju da proizvode androgene. Jajnik nastavlja da proizvodi androstendion i testosteron, čija je produkcija delimično zavisna od LH. Nivoi androstendiona i testosterona su niži kod žena koje su imale bilateralnu ooforektomiju, sa vrednostima u proseku od 0,8 ng/mL i 0,1 ng/mL. Međutim, većina androstendiona u postmenopauzi potiče od nadbubrežnih žlezda, a samo mala količina potiče iz jajnika. Nadbubrežna žlezda nastavlja da proizvodi androstendion, dehidroepiandrosteron (DHEA) i dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS). Nivoi ovih hormona se donekle smanjuju (adrenopauza) prvenstveno kao posledica starenja, mada lučenje kortizola ostaje nepromenjeno. Iako se

nivo DHEAS smanjuju sa godinama (približno 2% godišnje), nedavni podaci ukazuju da nivo prolazno raste u fazi tranzicije menopauze, pre kontinuiranog opadanja nakon toga. Podaci dobijeni iz SWAN studije takođe ukazuju da je nivo DHEAS najviši kod Kineskinja, a najniži kod Afroamerikanki. Neki podaci ukazuju da velika proizvodnja testosterona za koju se smatralo da je poreklom iz jajnika zapravo potiče iz nadbubrežne žlezde koja obezbeđuje prekursore, kao što su androstendiona i DHEA. Zbog uloge nadbubrežnih žlezda u određivanju nivoa testosterona nakon menopauze, adenalektomija ili tretman deksametazonom dovodi do veoma niskih nivoa testosterona u serumu, koji se ne može detektovati. Nivo testosterona takođe opada tokom godina kao posledica starosti. Proizvodnja testosterona se smanjuje oko 25% nakon menopauze, ali jajnik u prvim godinama postmenopauze kod većine ali ne kod svih žena, luči više testosterona nego jajnik u fazi tranzicije menopauze. Međutim, ukupna količina testosterona tokom postmenopauze je smanjena jer je smanjena količina primarnog izvora, periferne konverzije androstendiona. Kako se odnos androgena i estrogena drastično menja nakon menopauze zbog izraženijeg pada estrogena, pojava blagog hirsutizma je uobičajena u tom periodu. Merenje bioraspoloživog ili „slobodnog“ testosterona korisnije je kod žena u postmenopauzi u poređenju sa merenjem ukupnog testosterona. Nakon menopauze, nivo globulina koji vezuju polne hormone (engl. *sex hormone binding globulin*, SHBG) se smanjuju, što dovodi do relativno viših nivoa bioraspoloživog testosterona ili višim indeksom slobodnih androgena. Kod žena koje primaju oralnu terapiju estrogena, nivo bioraspoloživog testosterona je izuzetno nizak jer je nivo SHBG povećan.

Tokom postmenopauze od hormona hipofize povišeni su FSH i LH kao posledica smanjenog lučenja estradiola i inhibina B, dok nivo ostalih hormona kao što je hormona rasta, tireostimulirajući hormon i adrenokortikotropni hormon ostaju nepromenjeni. Nivo prolaktina u serumu može biti blago smanjen budući da nivo prolaktina zavisi od statusa estrogena. Porast FSH, koji počinje u kasnoj reproduktivnoj fazi (stadijum -3), već u 38. godini, značajno fluktuiraju sve do otprilike 4 godine nakon menopauze kada su vrednosti konstantno veće od 20 mIU/mL. Povišen nivo FSH i LH u ovom periodu života su odraz prestanka funkcije jajnika. Nivo FSH je viši od LH zbog smanjenog nivoa inhibina B i verovatno zato što se LH

mного brže eliminiše iz krvi (poluživot LH je oko 20 minuta, a poluživot FSH je 3–4 sata).

Promene nivoa hipofiznih hormona tokom menopauze su dobro dokumentovane, ali se još uvek malo zna o učešću hormona hipotalamusa u menopauzi. Kod glodara smanjenje broja jajnih ćelija nije primarni uzrok reproduktivnog starenja, te je pokazana uloga hipotalamusa u ovom procesu. Za razliku od glodara, kod žena ne postoje tako jasni dokazi koji ukazuju na primarnu ulogu hipotalamusa u procesu reproduktivnog starenja. Na osnovu SWAN studije, Vajs i saradnici (Weiss i sar.) 2004. predložili su hipotezu koja ukazuje da efekti starenja u mozgu utiču na sisteme neurotransmitera koji regulišu GnRH, ometajući folikulogenezu jajnika i na kraju podstiču starenje. Pretpostavlja se da je ubrzani gubitak folikula koji je očigledan u kasnim tridesetim godinama posledica desinhronizacije pulsativnog lučenja GnRH. Iako se ne mogu zanemariti efekti starenja na nivou hipotalamusa, postoje brojni podaci koji ukazuju da je menopauza kod žena izazvana prvenstveno promenama na nivou jajnika. Kod pacova postoji usporavanje pulsacije LH sa starenjem, dok se kod žena frekvencija i amplituda LH pulsa povećavaju sa godinama kako se približava menopauza. Visoka frekvencija i amplituda pulsa LH primećeni su u prvih nekoliko godina kod žena u postmenopauzi, a potom usporavaju u kasnoj fazi postmenopauze kao direktna posledica starenja. Takođe, primećena je promena dinamike pulseva GnRH u snu kod žena u postmenopauzi, u smislu nemogućnosti povećanja amplitude pulseva GnRH noću.

### 14.3. PREVREMENA MENOPAUAZA

Prevremena menopauza ili prerano zatajenje jajnika (engl. *premature ovarian failure*, POF ) se definiše kao hipergonadotropna insuficijencija jajnika koja se javlja pre 40. godine. Predložen je i termin primarna insuficijencija jajnika (engl. *premature ovarian insufficiency*, POI) koji bliže definiše heterogenu prirodu ovog sindroma. POF/POI se javlja kod 5% do 10% mladih žena sa amenorejom i ima višestruku etiologiju, ali je često idiopatsko, dok se u opštoj populaciji javlja od 0,3% do 0,9% žena. Dijagnoza POF/POI se potvrđuje povišenim nivoom FSH u serumu (> 40 IU/L). Jedan od mogućih uzroka pojave POF/POI može biti ubrzana atrezija jaj-

nih ćelija. Tokom života postoji stalna stopa atrezije jajnih ćelija, međutim ovaj proces može biti ubrzan različitim oblicima disgeneze gonada usled defektnih X hromozoma koji dovode do pojave ovog sindroma. Iako većina ovih jajnih ćelija verovatno ima funkcionalne nedostatke, povremeno se javljaju spontane trudnoće kod mladih žena u prvih nekoliko godina nakon dijagnoze POF/POI zbog toga što u jajniku može da preostane oko 1000 (od prvobitnih 2 miliona) primarnih folikula.

### 14.3.1. Uzroci prevremene menopauze

Postoji nekoliko mogućih uzroka pojave POF/POI: genetski, enzimski, imunološki, promene u strukturi gonadotropina i njihovih receptora, oštećenje jajnika i idiopatski.

Genetski uzroci POF/POI: Nasledni oblici POF/POI mogu biti povezani sa nasleđivanjem vezanim za polne hromosome ili sa autozomno-dominantnim nasleđivanjem. Defekti u X hromozomu mogu dovesti do različitih tipova disgeneze gonada i pojavom POF/POI. Tarnerov sindrom (npr. 45, XO) je najčešća hromozomska anomalija u POF/POI; javlja se kod 1 od 2500 slučajeva i uključuje potpuni ili delimični gubitak jednog X hromozoma. Može se desiti i mozaicizam Tarnerovog sindroma, što dovodi do manje ozbiljnih POF/POI. Ove pacijentkinje mogu proći kroz normalan pubertet, a povremeno može doći i do trudnoće. Specifične mutacije u X hromozomu, kao i trizomije X hromozoma mogu da izazovu POF/POI. Opisane su i mutacije u genu koji kodira receptor za FSH (npr. mutacija u egzonu 7 u genu na hromozomu 2p), ali su izuzetno retke. Trinukleotidni ponovci u prvom egzonu gena za FMRP (engl. *fragile X mental retardation protein*, FMRP) dovode do sindroma Fragilno X, glavnog uzroka razvojnih smetnji kod muškaraca. Kod žena je sindrom Fragilno X povezan sa POF/POI. Sindrom blefarofimoze tipa 1, autozomno-dominantni poremećaj zbog mutacija u transkripcionom faktoru FOXL2 (engl. *Forkhead Box L2*, FOXL2) koji može imati važnu ulogu u razvoju i funkciji jajnika, uključuje takođe pojavu POF/POI.

Enzimski uzroci POF/POI: Galaktozemija je glavni uzrok POF/POI koji je povezan sa toksičnim nakupljanjem galaktoze kod žena koje nisu u stanju da metabolišu galaktozu. To je uzrokovano nedostatkom enzima

galaktozo-1-fosfat uridiltransferaze (GALT) i povezan je sa akumulacijom galaktoze u organima sa visokim eksprimiranjem GALT (jetra, bubrezi, jajnici i srce). Iako je galaktozemija redak metabolički poremećaj, koji se javlja kod 1 od 30.000–60.000 novorođenčadi postoji dobro prepoznata veza sa POF/POI. Čak i kod žena sa prilično dobro kontrolisanom ishranom bez galaktoze, postoji tendencija pojave POF/POI. Još jedan od enzimskih poremećaja povezan sa POF/POI je nedostatak 17 $\alpha$ -hidroksilaze, važnog enzima u produkciji steroida. Ovo retko stanje dovodi i do seksualnog infantilizma i hipertenzije.

Imunološki uzroci POF/POI: Utvrđeno je da su skoro svi autoimuni poremećaji povezani sa POF/POI, uključujući autoimune poliendokrinopatije kao što je autoimuna poliendokrinopatija-kandidijaza-ektodermalna distrofija (engl. *autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectoderm dystrophy*, APECED), koja je uzrokovana mutacijama u genu za AIRE (engl. *autoimmune regulator*, AIRE). AIRE je transkripcioni regulator koji ima važnu ulogu u imunitetu tako što reguliše eksprimiranje autoantigena i negativnu selekciju autoreaktivnih T-ćelija u timusu. Čini se da je prisustvo timusne žlezde neophodno za normalnu funkciju jajnika jer je POF/POI povezan sa hipoplazijom timusa. Specifični enzimi u jajnicima, kao što je 3 $\beta$ -HSD takođe mogu biti meta autoantitela. Razvijeni su imunološki testovi koji detektuju antitela usmerena na antigene jajnika i pokazali su pozitivne nalaze kod nekih pacijenata sa POF/POI. Međutim, ne preporučuje se testiranje autoantitela usmerenih protiv antigena jajnika zbog visoke stope lažno pozitivnih rezultata. Osim toga, 2% do 4% žena sa POF/POI ima antitela na nadbubrežne žlezde ili autoantitela na 21-hidroksilazu. Ove pacijentkinje mogu biti izložene riziku od insuficijencije nadbubrežnih žlezdi. Treba naglasiti da POF/POI može da se javi pre razvoja teške nadbubrežne insuficijencije i stoga se preporučuje brzo upućivanje pacijentkinja endokrinologu ako su prisutna antitela na nadbubrežne žlezde. Takođe, kod POF/POI može doći do pojave autoantitela na peroksidazu štitne žlezde kada funkciju štitne žlezde treba pratiti. Drugi autoimuni poremećaji povezani sa POF/POI uključuju dijabetes tipa 1, reumatoidni artritis i inflamatornu bolest creva.

Promene u strukturi gonadotropina i njihovih receptora kao uzroci POF/POI: Teorijski, abnormalnosti u strukturi gonadotropina ili njihovih

receptora ili promene u vezivanju gonadotropina za njihove receptore mogu biti povezane sa POF/POI. Opisani su i poremećaji vezivanja FSH za svoje receptore, što je posredovano inhibitorima iz seruma. Takođe, u tekstu su pomenute i mutacije koje mogu dovesti do promena u samoj strukturi FSH receptora.

Oštećenja jajnika kao uzroci POF/POI: POF/POI može biti izazvan jonizujućim zračenjem, hemoterapijom ili agresivnim operacijama jajnika. Udeo mladih žena sa POF/POI nastalim kao rezultat hemo- i radijacione terapije, operacije ili drugih intervencija raste, kako rastu stope preživljavanja ovih pacijentkinja. Očuvanje ili oporavak rezerve jajnika nakon hemoterapije zavisi od vrste, doze, prethodne rezerve jajnika i starosti žene koja je bila izložena terapiji, gde mlađe žene imaju bolju prognozu. Kod žene koje su primale antracikline i alkilirajuća sredstva, posebno ciklofosamid postoji veliki rizik za pojavu POF/POI. Takođe, virusne infekcije, kao što su zauške ili tuberkuloza, dovode se u vezu sa pojavom POF/POI. Nedavno je prepoznata veza sa virusom humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus, HIV*), bilo zbog antivirusnih lekova ili zbog samog virusa. Rutinski skrining testovi za ove bolesti kod žena sa dijagnozom POF/POI se ne rade, osim ako to nije naznačeno anamnezom ili kliničkim nalazima, kao kod izloženosti HIV. Osim toga, izloženost pol cikličnim aromatičnim ugljovodonicima koji se nalaze u dimu cigareta dovodi se u vezu sa POF/POI. Iako se ni ova testiranja ne rade rutinski u kliničkoj praksi, savetuje se izbegavanje pušenja, posebno kod žena u reproduktivnom dobu. Dodatno, izlaganje hemikalijama iz životne sredine kao što su ftalati i bisfenol A koji se nalaze u proizvodima od plastike, takođe se dovodi u vezu sa pojavom POF/POI.

Idiopatski uzroci POF/POI: Smatra se da većina žena ima idiopatski POF/POI jer se ne može tačno utvrditi uzrok ovog sindroma. Među ovim ženama, mutacije u genima koji leže na X hromozomu, kao što je FMR1 ili gen za protein morfogeneze kostiju 15 (engl. *bone morphogenetic protein 15, BMP15*) ili mutacije u autozomnim genima koji tek treba da budu identifikovane, mogu biti uzrok POF/POI. Brojni autozomni geni su predloženi kao uzročnik POF/POI; neke mutacije su identifikovane u genima za ERA, FSHR, LHR,  $\beta$ -subjedinicu FSH,  $\beta$ -subjedinicu LH, inhibin A, GALT, AIRE, protein koji je uključen u razvoj mnogih tkiva, uključujući

nervno tkivo i mišiće (NOGGIN), katalitičku subjedinicu DNK polimeraze gama (POLG), CYP19A1, FOXL2, FOXO3 (engl. *Forkhead Box O3*) i steroidogeni faktor 1, dok druge tek treba da budu identifikovane. Tehnike sekvenciranja čitavog genoma pružaju nadu za identifikaciju novih mutacija u genima koje mogu biti uzročnici POF/POI, a koje još nisu detektovane ciljanim sekvenciranjem gena, čime bi se otkrila stvarna etiologija kod značajnog broja žena kojima je dijagnostikovana idiopatska POF/POI.

Lečenje POF/POI zavisi od prisutnih simptoma. U prvom redu javljaju se simptomi koji su u direktnoj vezi sa nedostatkom estrogena kao što su vazomotorni simptomi, vulvovaginalna atrofija i neplodnost, a pored toga, dugoročno dolazi do smanjenja gustine kostiju i povećanog rizika od kardiovaskularnih bolesti. Hormonska supstitucionna terapija treba da bude individualizovana prema starosti, karakteristikama i potrebama i sklonostima pacijentkinja i da uključuje steroidne hormone jajnika (prvo estrogene ali i progesteron) najčešće do starosne dobi u kojoj bi prirodno došlo do menopauze.

## **14.4. PROMENE NA RAZLIČITIM SISTEMIMA ORGANA TOKOM MENOPAUAZE**

Hormonske promene koje se dešavaju tokom menopauze, prvenstveno pad nivoa estrogena, odražavaju se na brojne sisteme organa u telu kao što su centralni nervni, kardiovaskularni i urogenitalni sistem, koža i kosti. Takođe, tokom menopauze uočljive su i brojne metaboličke promene.

### **14.4.1. Promene na nivou centralnog nervnog sistema tokom menopauze**

Estrogeni imaju brojne efekte na funkciju mozga. Utiču na broj neurona, morfologiju, ali i veze koje se javljaju tokom kritične faze razvoja. Estrogeni imaju neurotrofno dejstvo te utiču na diferencijaciju neurona, produžetak neurita, formiranje sinapsi i interakciju sa neurotrofinima. Imaju neuroprotektivno dejstvo, ulogu u zaštiti od apoptoze, antioksidativna i antiinflamatorna svojstva, utiču na povećanje cerebralnog krvotoka,

poboljšanje transporta glukoze u mozak, slabljenje kortikosteroidnog odgovora na stres i interakciju sa neurotrofinima. Utiču na brojne neurotransmitere kao što su acetilholin, noradrenalin, serotonin, dopamin, glutamat,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina i neuropeptide. Imaju efekte na glija ćelije kao i na proteine uključene u Alchajmerovu bolest, kao što je prekursor amiloida, tau protein i apolipoprotein E. Dakle, postoje veoma važne funkcije mozga na koje utiču estrogene koje doprinose opštem zdravlju, kognitivnim procesima i raspoloženju. Najuočljiviji znaci nedostatka estrogena tokom menopauze su: napadi vrućine, znojenje, poremećaji spavanja i depresija.

Osnovna karakteristika opadanja nivoa estrogena u mozgu su naleti vrućine, koji se generalno nazivaju vazomotorna epizoda. Smatra se da do ovih epizoda dolazi usled odgovora hipotalamusa na promenu statusa estrogena, a proces je verovatno posredovan kateholaminima. Efekte u mozgu estrogene ostvaruju prvenstveno preko estrogenih receptora  $\alpha$  i  $\beta$  ( $ER\alpha$  i  $ER\beta$ ), kao i preko membranskih receptora. Kod pacova je uočena dominacija  $ER\beta$  u frontalnom i parijetalnom korteksu i malom mozgu. Estradiol je specifičan ligand za oba receptora, dok određeni sintetički estrogene imaju veći afinitet za  $ER\beta$ . Naleti vrućine se obično javljaju dve godine nakon smanjenja nivoa estrogena, ali mogu da traju 10 ili više godina. SWAN studija je pokazala da je trajanje vazomotornih simptoma u proseku 7,4 godina. Naleti vrućine (valunzi) su rezultat rasipanja toplote povećanjem periferne temperature (prsti na rukama ili nogama), smanjenjem rezistencije kože koje je povezano sa znojenjem (dijaforezom) i smanjenjem unutrašnje telesne temperature. Uočeno je da se struktura hipotalamusa kod žena u postmenopauzi značajno razlikuje u poređenju sa ženama pre menopauze, posebno u infundibularnom jezgru. Smanjen nivo estrogena kao i starenje izaziva hipertrofiju subpopulacije neurona u infundibularnom jezgru koji eksprimiraju kipeptin, neurokinin B i dinorfin (KNDy neuroni), a koji su povezani sa termoregulacionim centrima u mozgu. KNDy neuroni utiču na termoregulacioni centar u srednjem preoptičkom jezgru hipotalamusa preko neurokinina B. Pokazano je da neurokinin B, aktivirajući svoj receptor neurokinin 3 (NK3), izaziva nalete vrućine kod žena u postmenopauzi, te da administracija neurokinina B stimuliše valunge, dok antagonisti NK3 mogu da inhibiraju nalete vrućine i noćno znojenje kod žena u menopauzi. KNDy neuroni takođe



eksprimiraju ER $\alpha$ , a preko kispeptina utiču na oslobađanje GnRH. Istovremeno, aktivacija KNDy neurona oslobađa GnRH, a potom i oslobađa LH iz hipofize, što je primećeno tokom naleta vrućine.

Tokom menopauze dolazi i do poremećaja sna naročito kod žena koje imaju nalete vrućine, čestog buđenja i pojačanog znojenja noću. Elektroencefalogram (EEG) ukazuje na poremećaj spavanja paralelno sa pojavom vazomotornih epizoda. Efikasnost spavanja se smanjuje, a REM faza spavanja je duža kod žena sa naletima vrućine u poređenju sa asimptomatskim ženama, što može da dovede do umora i razdražljivosti tokom dana. Spavanje može biti poremećeno čak i ako žena nije svesna da se probudila iz sna. Učestalost buđenja i naleta vrućine može se značajno smanjiti terapijom estrogenima.

Kognitivne promene i promene raspoloženja se često pominju kao tegobe tokom menopauze. Postoje brojni mehanizmi preko kojih estrogeni mogu uticati na mozak: regulacija metabolizma, povećanje cerebralnog krvotoka, diferencijacija neurona, deluju na faktore rasta neurona preko sinteze i transporta neurotransmitera i drugo. Međutim, dokazi za objektivne i dugoročne promene u kognitivnim funkcijama i mentalnom zdravlju tokom menopauze i dalje su nejasni. U stanju deficita estrogena, kao što je nakon menopauze, često se manifestuje veća incidenca kliničke ili subkliničke depresije. Pokazano je da estrogeni smanjuju depresivno raspoloženje kod žena u postmenopauzi. Međutim, menopauza samostalno ne izaziva depresiju i dok estrogeni generalno smanjuju depresivno raspoloženje, ne treba ih koristiti za psihijatrijske poremećaje. Na promene raspoloženja takođe mogu uticati pojave brojnih neprijatnih simptoma kao i nedostatak sna.

Kognitivni pad kod žena u postmenopauzi povezan je sa starenjem, kao i sa nedostatkom estrogena. Tokom faze tranzicije u menopauzi od simptoma primećeni su pad koncentracije, smanjena sposobnost planiranja, memorije i druge kognitivne promene. U novijim studijama, pokazano je se da se verbalna memorija poboljšava terapijom estrogenima. Takođe, tokom starenja povećava se rizik od demencije, a najčešći oblik demencije je Alchajmerova bolest. Kao što je navedeno, estrogeni imaju neurotrofno i neuroprotektivno dejstvo, utiču na neurotransmitere i proteine uključene u Alchajmerovu bolest. Stoga nedostatak estrogena može dovesti do

gubitka zaštite od razvoja ove bolesti. Ranije opservacione studije ukazuju da upotreba estrogena nakon menopauze smanjuje vjerojatnoću razvoja ili odlaže početak Alchajmerove bolesti ali samo kod onih žena koje primaju estrogene na početku menopauze dok kod starijih žena to može biti štetno. Ipak, do danas, ne postoje ubedljivi prospektivni podaci koji bi potvrdili ranije studije posmatranja o prednostima estrogena u prevenciji kognitivnog pada ili rizika od Alchajmerove bolesti kod mlađih žena u postmenopauzi. U slučaju da je već došlo do razvoja Alchajmerove bolesti malo je vjerovatno da terapija estrogenima može imati bilo kakvog efekta.

#### **14.4.2. Promene na koži i urogenitalnom sistemu tokom menopauze**

Nakon menopauze smanjuje se sadržaj kolagena. Estrogeni imaju pozitivan efekat na sintezu kolagena, koji predstavlja važnu komponentu kože i kosti i služi kao glavno potporno tkivo u strukturi karlice i urinarnog sistema. Estrogeni i androgeni receptori su identifikovani u fibroblastima kože. Skoro 30% kolagena iz kože se gubi u prvih pet godina nakon menopauze. Nivo kolagena se smanjuje za približno 2% godišnje tokom prvih 10 godina nakon menopauze. Iako literatura nije saglasna, terapija estrogenima generalno poboljšava nivo kolagena u koži nakon menopauze i značajno poboljšava debljinu kože nakon dve godine lečenja. Međutim, uočen je mogući biomodalni efekat terapije sa visokim dozama estrogena koji uzrokuje smanjenje debljine kože.

Smanjenje kolagena odražava se i na atrofiju sluzokože vagine i uretre, što uključuje i različite simptome kao što su prolaps i urinarnu inkontinenciju. Simptomi urinarne inkontinencije i simptomi iritacije bešike javljaju se kod 20% do 40% žena u fazi tranzicije menopauze i postmenopauzi. Prolaps materice i drugi ginekološki simptomi koji u osnovi imaju smanjenje sadržaja kolagena kao i tegobe urinarnog sistema, mogu se poboljšati terapijom estrogena. Pokazano je i da estrogen smanjuje incidencu recidiva infekcija urinarnog trakta. Ovi podaci se odnose na upotrebu estrogena vaginalno, a ne na sistemsku upotrebu. Pomalo paradoksalno, sistemska primena estrogena može povećati stresnu urinarnu inkontinenciju, dok lokalna vaginalna terapija može poboljšati urgentnu inkontinenciju. Po-

kazalo se da uspostavljanje kontrole mokraćne bešike kod starijih žena estrogenom smanjuje potrebu za prijemom u staračke domove u Švedskoj. Vulvovaginalne tegobe su uobičajene nakon menopauze, povećavaju se sa godinama i vrlo često su povezane sa nedostatkom estrogena. U fazi tranzicije menopauze dolazi do pojave suvoće kod 21% i atrofičnih promena kod 15% žena. S vremenom se ovi simptomi pojačavaju, te se nakon četiri godine suvoća javlja kod 47%, a atrofične promene kod 55% žena. Sa ovom promenom, povećava se incidenca dispareunije (bola pri polnom odnosu) kod 41% seksualno aktivnih žena od 60 godina. Takođe, zbog nedostatka estrogena dolazi do pojave tanke i blede vaginalne sluzokože, i smanjenja vlažnosti, pH se povećava (obično je veći od 5), a sluzokoža može imati zapaljenjske promene i male petehije (crvene tačkice po sluzokoži, grupisane u plakove, uzrokovane krvarenjem iz kapilara). Sa terapijom estrogena dolazi do citoloških promena na sluzokoži vagine, pH se smanjuje, a protok krvi se povećava.

### 14.4.3. Gubitak koštane mase tokom menopauze

Gubitak koštane mase u postmenopauzi koji dovodi do osteoporoze je veoma značajan zdravstveni problem. Gubitak kosti se prvi put može primetiti kada menstrualni ciklusi postaju nepravilni, u fazi tranzicije menopauze, u periodu od 1,5 godine pre menopauze do 1,5 godine posle menopauze. Pokazano je da se mineralna gustina kostiju kičme smanjuje za 2,5% godišnje u postmenopauzi u poređenju sa fazom tranzicije menopauze kada je stopa gubitka koštane mase 0,13% godišnje. Na osnovu mineralne gustine kostiju procenjeno je da oko 35% žena u postmenopauzi ima osteoporozu i da je rizik od preloma tokom života kod ovih žena 40%. Postizanje najveće koštane mase dešava se u kasnim dvadesetim godinama života, i kod žena i kod muškaraca. Proces dostizanja najveće koštane mase je većim delom genetski determinisan (nasledna komponenta je 50% do 70%) pri čemu važnu ulogu imaju polimorfizam u genu za vitamin D, genu za TGF $\beta$  i Sp1 vezujuće mesto u genu za kolagen tipa 1A1. Ovaj proces veoma je važan kako bi kasnije mogao da se nadoknadi gubitak koštane mase sa starenjem i nedostatkom estrogena, što vodi do rane osteoporoze.

Estradiol, zajedno sa hormonom rasta i insulinu sličnim faktorom rasta-1, deluje na udvostručenje koštane mase za vreme puberteta. Postpubertalni nedostatak estrogena (amenoreja iz raznih uzroka) značajno ugrožava ovaj proces. Adekvatna ishrana i unos kalcijuma su takođe ključni faktori. Estrogeni imaju dominantni značaj za koštanu masu i kod žena i kod muškaraca. Testosteron je važan u stimulisanoj periostalnoj apoziciji, te je kod muškaraca kortikalna kost veća i deblja. Iako je testosteron važan za formiranje kosti i stimulaciju koštane mase, čak i kod muškaraca dejstvo estrogena je od velike važnosti, jer je pokazano da se koštana masa povećava kod muškaraca koji su primali estrogene, a imaju nedostatak aromataze.

ER su prisutni u osteoblastima, osteoklastima i osteocistima. ER $\alpha$  i ER $\beta$  prisutni su u kortikalnoj kosti, dok ER $\beta$  dominira kod spužvaste ili trabekularne kosti. Pretpostavlja se da je delovanje estradiola posredovano preko ER $\alpha$ . Estrogeni inhibišu razgradnju i održavaju određenu stopu formiranja kosti. Estrogeni smanjuju dejstvo osteoklasta povećavajući stopu njihove apoptoze i na taj način smanjuje njihov životni vek. Takođe, estrogeni antagonizuju apoptozu osteoblasta izazvanu glukokortikoidima. Nedostatak estrogena tokom menopauze narušava ravnotežu između procesa formiranja i resorpcije kosti u korist resorpcije koja se produžava na račun smanjenja faze formiranja kosti. Molekulski mehanizmi delovanja estrogena na kosti uključuju inhibiciju proizvodnje proinflammatoryh citokina, uključujući interleukin-1, interleukin-6 i faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), koji dovode do resorpcije kosti, a preko svojih receptora na osteoblastima indukuju oslobađanje TGF $\beta$  koji inhibira resorptivnu aktivnost osteoklasta. RANKL (engl. *receptor activator of nuclear factor kappa beta*) je odgovoran za diferencijaciju i delovanje osteoklasta. Pretpostavlja se da do gubitka koštane mase kod žena dolazi u dve faze. Sa opadanjem nivoa estrogena na početku menopauze dolazi do ubrzane faze gubitka kosti, dok nakon toga ide sporija faza gubitka kosti (1% do 2% godišnje). Smatra se da je kasnija faza gubitka kosti stimulisana prvenstveno sekundarnim hiperparatiroidizmom.

Danas postoji mnogo dostupnih sredstava koji mogu sprečiti osteoporozu. Upotreba estrogena zavisi od toga da li postoje druge indikacije za lečenje estrogenom i da li postoje kontraindikacije. Pokazalo se da estrogen smanjuje rizik od osteoporoze kao i da smanjuje frakture kod osteo-

poroze. Takođe, za selektivne modulatore estrogenskih receptora kao što je raloksifen, droloksifen i tamoksifen vidljivo je da smanjuju resorpciju kosti. Pored toga, bisfosfonati imaju značajan efekat na prevenciju i lečenje osteoporoze, kalcitonin inhibira resorpciju kostiju, fluorid povećava gustinu kostiju, a paratiroidni hormon povećava koštanu masu. Dodatne mere za prevenciju osteoporoze su kalcijum, vitamin D i vežbanje. Kod žena ukupan unos kalcijuma treba da bude 1500 mg dnevno ako se ne koriste sredstva za inhibiranje resorpcije. Takođe treba unositi i 400 do 800 IU vitamina D. Nivo serumskog 25 hidroksi-vitamina D može biti veoma nizak (<20 ng/mL) kod velikog broja žena, posebno u geografskim područjima sa manje sunčeve svetlosti. Pokazalo se da je vežbanje korisno za izgradnju mišićne ali i koštane mase kao i za smanjenje padova.

Tokom menopauze mogu se javiti i problemi sa zglobovima. Hronični artritis je glavni izvor invaliditeta kod žena u postmenopauzi. Najčešće je povezan sa starenjem, mada postoje dokazi da nedostatak estrogena nakon menopauze može doprineti njegovom napredovanju. Pokazalo se da primena estrogena nakon menopauze inhibira oštećenje hondrocita, što je ključno kod problema artritisa.

#### **14.4.4. Promene na nivou kardiovaskularnog sistema tokom menopauze**

Nakon menopauze povećava se rizik od kardiovaskularnih bolesti (KVB) kod žena. Kod žena pre menopauze (period od 45. do 49. godine) incidenca pojave KVB je tri puta manja nego kod muškaraca, dok je u kasnijem dobu, od 75. do 79. godine, incidenca približno jednaka kod muškaraca i žena. Ovaj trend se odnosi i na polne razlike u mortalitetu od KVB. Bolest koronarnih arterija je vodeći uzrok smrti kod žena, a i rizik od smrti je 31% kod žena u postmenopauzi naspram rizika od 3% za umiranja od raka dojke.

KVB kod žena postaje rasprostranjeniji tek u kasnijim godinama nakon menopauze. Međutim, prevremeni prestanak funkcije jajnika, pre prosečne starosne dobi u kojoj dolazi do menopauze, predstavlja značajan rizik. Pokazalo se da prevremena menopauza, koja se javlja pre 35. godine, povećava rizik od infarkta miokarda dva do tri puta, a ooforektomija pre 35. godine povećava rizik nekoliko puta.

Porast ukupnog holesterola kod žena u postmenopauzi može biti jedan od mogućih razloga za povećanje KVB. Takođe, starenjem dolazi do promene težine, krvnog pritiska i glukoze u krvi. Iako su ove promene važne, smatra se da je stopa porasta ukupnog holesterola jedan od najbitnijih faktora pojave KVB, koja se značajno razlikuje kod žena u odnosu na muškarce. Povećanje ukupnog holesterola se objašnjava povećanjem nivoa holesterola iz lipoproteina niske gustine (engl. *low-density lipoprotein cholesterol*, LDL). Oksidacija LDL je takođe pojačana, a povećani su i nivoi lipoproteina veoma niske gustine i lipoproteina (a). Nivoi holesterola iz lipoproteina visoke gustine (engl. *high-density lipoprotein cholesterol*, HDL) s vremenom opadaju, ali su ove promene male i nedosledne u odnosu na povećanje LDL. Receptori za estrogene i progesteron su pronađeni u vaskularnim tkivima, uključujući koronarne arterije (pretežno ER $\beta$ ). Pored toga, opisani su i membranski efekti posredovani estrogenima. Smatra se da su direktni vaskularni efekti estrogena jednako važni ili čak važniji od promene lipidnog statusa i lipoproteina nakon menopauze.

Nakon menopauze ravnoteža koagulacije se ne menja zato što se neki faktori koagulacije povećavaju (faktor VII, fibrinogen i inhibitor aktivatora plazminogena-1), ali se faktori kao što su antitrombin III, plazminogen, protein C i protein S smanjuju. Markeri inflamacije, kao što su C-reaktivni proteini i citokini su povećani, a protok krvi u svim krvnim sudovima se smanjuje nakon menopauze. Proizvodnja prostaciklina se smanjuje dok se nivo endotelina povećava. Vazomotorni odgovor na acetilholin je konstrikcija krvnih sudova, zbog smanjene aktivnosti azot-oksida sinteze. Dodatkom estrogena, svi ovi parametri generalno se poboljšavaju. Odgovori koronarnih arterija na acetilholin postaju dilatatorni te dolazi do srazmernog povećanja protoka krvi. Povećava se nivo nitrita i nitrata u plazmi, a nivo angiotenzin-konvertujućeg enzima se smanjuje. Efekti estrogena uočljivi su samo u relativno normalnim koronarnim arterijama, bez značajne ateroskleroze. Međutim, u slučajevima kada postoji značajan aterosklerotski plak, terapija estrogenom nije od pomoći. Dakle, korisni efekti estrogena se mogu videti samo kod mlađih (faza +1) žena u postmenopauzi, dok kod žena sa značajnom aterosklerozom ili faktorima rizika, pozitivna reakcija izostaje. Postoje brojne studije koje su pokazale da mlađe žene imaju koristi

od terapije estrogenom u smislu prevencije koronarne bolesti i smanjenja ukupnog mortaliteta. Pošto ateroskleroza u velikoj meri zavisi od starosti, čak i žene koje nisu imale koronarno oboljenje imaju aterosklerotične sudove u 70% slučajeva. Kao jedno od mogućih objašnjenja izostanka efekta estrogena može biti povećana metilacija promotorskog regiona ER $\alpha$  koji se javlja kod ateroskleroze i starenja. Takođe, u nekim studijama uočen je i trend povećanja kardiovaskularnih oboljenja kod starijih žena, ili žena koje imaju oštećenja koronarnih arterija nakon terapije estrogenom. Smatra se da tada estrogen povećava cirkulišući nivo matriks metaloproteinaze, enzima koji rastvara deo želatinoznog plaka u muralnom delu aterosklerotskog koronarnog suda, uzrokujući nestabilnost i rupturu plaka koja dovodi do koronarne tromboze. Ovakvi efekti nisu primećeni kod starijih žena koje su istovremeno primale statine, jer je poznato da statini stabilizuju plak. Druga teorija kojom je moguće objasniti razlike u efektima estrogena u zavisnosti od doba primene je efekat endogenog 27 hidroksiholesterola (27 HC). Ovaj endogeni metabolit holesterola se povećava sa povećanjem nivoa holesterola i takmiči se sa estradiolom za vezivanje za ER u endotelu. Dakle, kada je holesterol povišen, visok nivo 27 HC može sprečiti delovanje estrogena. Kod žena u postmenopauzi, koje nisu gojazne, tolerancija na ugljene hidrate takođe se smanjuje, i kao rezultat može doći do povećanja insulinske rezistencije, te upotreba estrogena u postmenopauzi može smanjiti rizik od pojave dijabetesa. Ispitivanja sprovedena na modelu majmuna pokazala su zaštitni efekat estrogena u odnosu na koronarnu aterosklerozu (50% do 70%), kada se sa terapijom estrogena započne u vreme ooforektomije, sa ili bez aterogene dijeta. Odlaganje početka hormonske terapije kod majmuna za čak dve godine sprečava ovaj zaštitni efekat. Kod žena, smatra se da se rana primena estrogena odnosi na prvih šest godina nakon menopauze. Dakle, pokazano je da estrogeni štite od ateroskleroze pre menopauze i kod mlađih žena posle menopauze, pre razvoja ateroskleroze. Tretman estrogenom kod mlađih zdravih žena u postmenopauzi smanjuje koronarnu bolest i mortalitet, ali je neefikasan kod starijih žena i može biti štetan.

Rizik od moždanog udara kod žena raste sa godinama, a dodatno ga otežavaju gojaznost i hipertenzija. Efekat estrogena na krvni pritisak je neutralan, uključujući žene koje su već hipertenzivne. Nekonrolisana hi-

pertenzija kod žena u postmenopauzi predstavlja veliki rizik za moždani udar, a to se kod nekih žena može pogoršati upotrebom hormonske terapije. Moždani udar je treći vodeći uzrok smrti kod žena, a interakcija između primene hormonske terapije i rizika od moždanog udara kod žena se proučava već neko vreme. Brojne studije su pokazale mali, ali značajno povećan rizik od ishemijskog moždanog udara sa standardnim dozama hormonske terapije kod mlađih žena u postmenopauzi koje su najverovatnije povezane sa trombozom i nisu posledica ateroskleroze, koja se javlja kod starijih žena. Ovakav rizik primećen je kod žena koje su koristile oralne kontraceptive dok niže doze i transdermalna primena hormonske terapije nije povećavala rizik od ishemijskog moždanog udara. Poznato je da oralni estrogene povećavaju rizik od venske tromboze i tromboembolije kod žena u postmenopauzi na početku terapije (prva ili druga godina terapije) i značajno se povećava rizik (oko 15 puta) ako postoji osnovna trombofilija.

#### **14.4.5. Metaboličke promene tokom menopauze**

Sa starenjem se povećava telesna težina i nakupljaju masti. Ove promene počinju nekoliko godina pre menopauze i paralelno se dešavaju sa povećanjem FSH. Pokazano je da promeni težine uglavnom prethode hormonske promene, kao što je smanjenje SHBG. Takođe, ove promene su povezane sa povećanjem leptina. U ranoj fazi tranzicije menopauze, u slučaju normalne telesne težine, adiponektin se povećava. Međutim, kasnije tokom menopauze kao i kod gojaznosti, adiponektin se smanjuje što može voditi riziku od pojave KVB. Sa starenjem dolazi do smanjenog lučenja insulina iz  $\beta$  ćelija pankreasa i povećava se rizik od pojave dijabetes melitusa. Takođe, rizik od pojave insulinske rezistencije raste sa godinama i povećava sa povećanjem telesne težine i sa gojaznošću. Povećanje masnog tkiva i smanjenje mišićne mase je osnovni rizik za pojavu hroničnih bolesti. Kod žena u postmenopauzi može biti pojačano nedostatak estrogena. Takođe, smanjeno kretanje dovodi do pojave metaboličkog sindroma, dijabetesa i KVB. Najbolji način za borbu protiv gojaznosti je kombinacija dijeta i vežbanja, što treba da bude oslonac u borbi protiv starenja.



### 14.4.6. Karcinom dojke i menopauza

Rizik od raka dojke raste sa starenjem nakon menopauze, a većina karcinoma su tumori koji reaguju na estrogene. Međutim, rak dojke u postmenopauzi, nije vodeći uzrok smrtnosti kao KVB ili rak pluća. Smrtnost od raka dojke se smanjuje nakon menopauze, dok se smrtnost od raka pluća povećava nakon menopauze, a stopa smrtnosti od KVB dramatično raste od trenutka menopauze pa nadalje. Efekat hormonske terapije na rizik od raka dojke proučavan je poslednjih 30 godina. Postoje dokazi da je smrtnost od raka dojke smanjena kod žena u menopauzi koje su primale terapiju estrogena. Terapija samo estrogenima ne povećava rizik u prvim godinama terapije, osim uz produženu upotrebu u visokim dozama. U studiji koja je pratila žene koje su uzimale samo estrogene tokom 10 godina, potvrđeno je značajno smanjenje incidence raka dojke. Ova studija je takođe potvrdila statistički značajno smanjenje ukupnog mortaliteta kod korisnika estrogena. Noviji podaci ukazuju i na niži mortalitet od raka dojke kada su žene primale hormonsku terapiju. Međutim, čini se da postoje konzistentni nalazi povećanog rizika kod režima estrogena i gestagena nakon pet godina upotrebe. Ova procena rizika se kreće od 1,2 do 1,7 i povezana je sa dozom, verovatno vrstom progestagena, i trajanjem terapije. Najverovatnije, estrogeni u kombinaciji sa sintetičkim progestogenom izazivaju povećanje rizika, koji je povezan sa dozom i trajanjem terapije. Takođe, podaci iz studija posmatranja ukazuju da progesteron nije povezan sa povećanim rizikom, za razliku od sintetičkih gestagena. Međutim, ovi podaci tek treba da budu potvrđeni. U poređenju sa malim porastom rizika od karcinoma dojke primećenim sa standardnom dozom estrogena i progesterona, mnogi endogeni faktori predstavljaju veći rizik za rak dojke nego hormonska terapija. Jedan od mogućih faktora rizika je i povećana gustina grudi, što takođe predstavlja izazov za mamografsku detekciju malih tumora. Dok tretman estrogenima i progesteronom povećava gustinu dojke, nejasno je da li to predstavlja dodatni rizik od raka dojke ali je jasno da su ove promene u gustini dojki reverzibilne.

## 14.5. LITERATURA

- Edwards BJ and Li J. (2013) Endocrinology of menopause. *Periodontol* 2000 61:177–194.
- El Khoudary SR, Greendale G, Crawford SL, Avis NE, Brooks MM, Thurston RC, Karvonen-Gutierrez C, Waetjen LE, Matthews K. (2019) The menopause transition and women's health at midlife: a progress report from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Menopause* 26:1213–1227.
- Harlow SD, Gass M, Hall JE, Lobo R, Maki P, Rebar RW, Sherman S, Sluss PM, de Villiers TJ (2012) STRAW 10 Collaborative Group. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *Menopause* 19:387–95.
- Hogervorst E, Craig J, O'Donnell E. (2022) Cognition and mental health in menopause: A review. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 81: 69–84.
- Lambrinoudaki I, Paschou SA, Lumsden MA, Faubion S, Makrakis E, Kalantaridou S, Panay N (2021) Premature ovarian insufficiency: A toolkit for the primary care physician. *Maturitas* 147:53–63.
- Laven JSE (2016) Primary Ovarian Insufficiency. *Semin Reprod Med* 34:230–234
- Lobo RA (2019) Menopause and Aging. U: Strauss JF i Barbieri RL, ur., Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology, 8. izdanje, Elsevier, 322–352.
- Nelson SM, Davis SR, Kalantaridou S, Lumsden MA, Panay N, Anderson RA (2023) Anti-Müllerian hormone for the diagnosis and prediction of menopause: a systematic review. *Hum Reprod Update* 29:327–346.
- Santoro N, Roeca C, Peters BA, Neal-Perry G (2021) The Menopause Transition: Signs, Symptoms, and Management Options. *J Clin Endocrinol Metab* 106:1–15.
- Talaulikar V (2022) Menopause transition: Physiology and symptoms. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 81: 3–7. Taylor HS, Pal L i Seli E (2019). Menopause Transition and Menopause Hormone Therapy. U: Speroff's Gynecological Endocrinology and Infertility, 9. izdanje, Wolters Kluwer, 581–751.
- Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H. (2021) Kisspeptin Neurons and Estrogen-Estrogen Receptor  $\alpha$  Signaling: Unraveling the Mystery of Steroid Feedback System Regulating Mammalian Reproduction. *Int J Mol Sci.* 22:9229.
- Weiss G, Skurnick JH, Goldsmith LT, Santoro NF, Park SJ (2004) Menopause and hypothalamic-pituitary sensitivity to estrogen. *JAMA* 292:2991–2996.

**Danijela Kirovski**

---

**15.  
KOMPARATIVNA  
FIZIOLOGIJA  
REPRODUKTIVNOG  
CIKLUSA KOD  
DOMAĆIH  
ŽIVOTINJA SISARA**

---



U cilju boljeg razumevanja komparativne fiziologije reproduktivnog ciklusa domaćih životinja sisara (neprimata), potrebno je podsetiti se reproduktivnog ciklusa primata, prvenstveno žena, a u svrhu utvrđivanja sličnosti ali i razlika između primata i neprimata u pogledu odvijanja ovog fiziološkog procesa.

## 15.1. RAZLIKA IZMEĐU MENSTRUALNOG CIKLUSA PRIMATA I ESTRUSNOG CIKLUSA NEPRIMATA

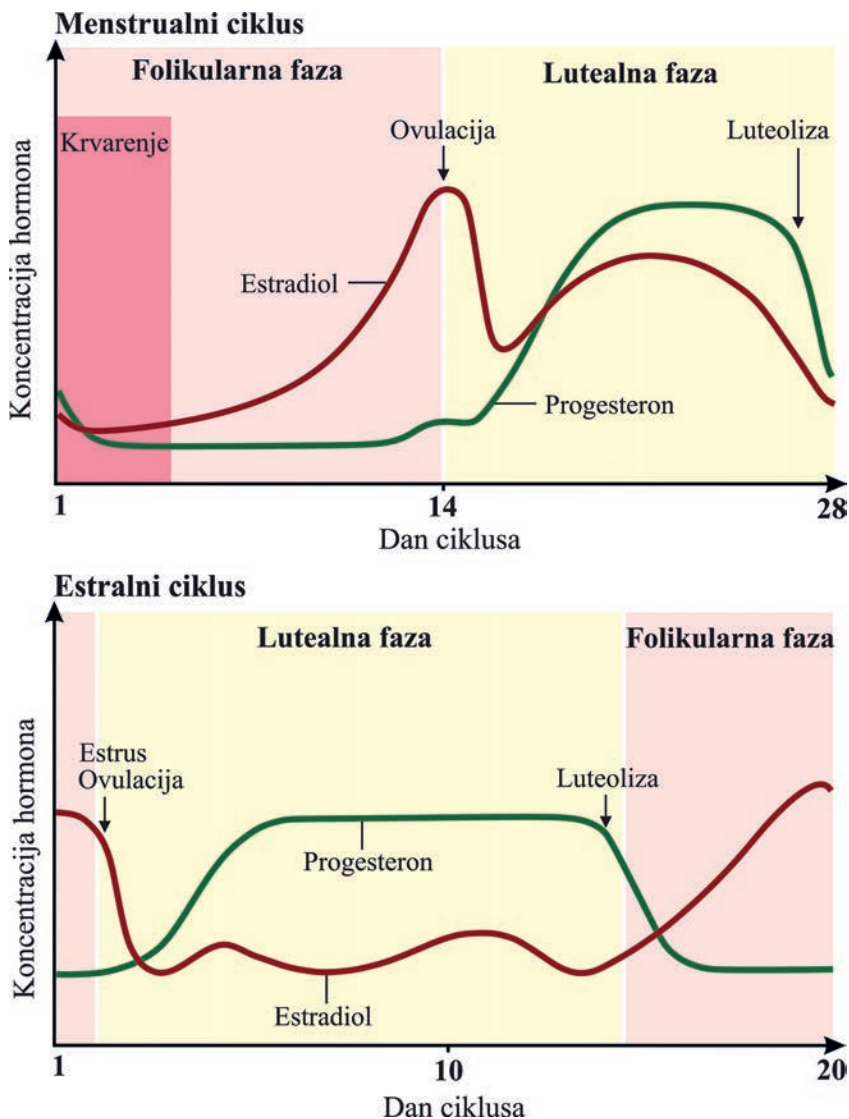
Reproduktivni ciklus se kod primata naziva *menstrualni ciklus*, a kod domaćih životinja sisara, odnosno neprimata se naziva *estrusni (estralni) ciklus*. Bez obzira na različite nazive, fiziološka osnova menstrualnog i estrusnog ciklusa je vrlo slična. Tako, tokom reproduktivnog ciklusa kako domaćih životinja sisara tako i primata, dešavaju se ciklične promene na jajnicima, jajovodima, materici kao i spoljašnjim polnim organima, pa se razlikuju ovarijalni ciklus (koji podrazumeva promene na jajniku), uterušni ciklus (koji podrazumeva promene na materici) i slično.

Jajnici žena i nekih vrsta domaćih životinja sisara (preživari) pri rođenju sadrže određen broj primordijalnih folikula, odnosno primarnih ovocita okruženih jednim slojem folikulskih ćelija. Međutim, kod nekih drugih vrsta (pasa, na primer) primordijalni folikuli se formiraju i nekoliko dana po rođenju. Počevši od puberteta, u jajniku se u određenim intervalima, koji je različit kod različitih vrsta životinja (opisano u daljem tekstu), odigravaju ciklične promene. Tokom ovarijalnog ciklusa i primata i neprimata razlikuju se dve faze, a to su folikulska i luteinska faza ciklusa. Kod primata folikulska faza počinje menstruacijom, odnosno krvarenjem iz materice, dok kod domaćih životinja sisara reproduktivni ciklus nije obeležen menstruacijom. Tokom folikulske faze dolazi do formiranja zrelog folikula koji luči estradiol i koji će prsnuti u procesu ovulacije. Kod žena i većine domaćih životinja primata ovulacija se odigrava spontano, dok je kod mačaka izazvana aktom parenja zbog čega se naziva indukovana ili refleksna ovulacija. Naime, pri indukovanoj ovulaciji se tek aktom parenja, pod uticajem hipotalamusa, u hipofizi pojačano luči luteinizirajući hormon (LH) čiji je pik u lučenju neophodan preduslov za odvijanje ovulacije. Period ovulacije je kod domaćih životinja sisara, ali ne i kod žena, praćen

promenom ponašanja u vidu polnog nagona ili žara a koji se karakteriše seksualnom prijemčivošću ženke za mužjaka. Ova promena ponašanja ženki koja ukazuje na njihovu sposobnost da u tom periodu koncipiraju naziva se estrus. To je jedna od značajnijih razlika između neprimata i primata jer je seksualna prijemčivost kod domaćih životinja sisara ograničena samo na period estrusa, dok kod primata ne postoji ograničen period seksualne prijemčivosti, već je ona prisutna tokom celog ciklusa. Znači estrusa su različiti kod različitih vrsta životinja, ali uvek jasno vidljivi. Zbog toga je ovulaciju, odnosno period kada je jedinka fertilna, lakše predvideti kod neprimata. Nakon ovulacije se, na mestu prsnutih folikula, formiraju žuta tela. U slučaju odsustva koncepcije na kraju luteinske faze nastupa luteoliza. Folikulska i luteinska faza ovarijalnog ciklusa kod primata traju jednako dugo, a to znači da svaka faza traje 14 dana kod prosečnog trajanja ciklusa od 28 dana. S druge strane, kod domaćih životinja sisara luteinska faza traje značajno duže od folikulske faze. Razlog tome je što kod većine neprimata žuto telo tokom luteinske faze luči samo progesteron, dok kod primata žuto telo luči pored progesterona i estradiol i inhibin. Zbog toga je kod primata negativna povratna sprega tokom luteinske faze izuzetno potentna, tako da, utičući na smanjenje lučenja gonadotropina, onemogućava folikulogenezu do samog kraja luteinske faze. Kod neprimata, međutim, ne tako jaka negativna povratna sprega, dozvoljava pojavu postovulatornog talasa folikulostimulišućeg hormona (FSH) koji obezbeđuje kontinuirani rast folikula i tokom luteinske faze, tako da je folikulska faza, u kojoj se odigrava samo završni rast folikula, značajno skraćena.

Iako su sa fiziološkog aspekta, estrusni i menstrualni ciklus vrlo slični, problemi u interpretaciji ova dva ciklusa nastaju zbog toga što se pojave po kojima su ovi ciklusi dobili naziv (menstruacija, odnosno estrus) dešavaju u potpuno različitim fazama ovarijalnog ciklusa. Menstrualni ciklus je period između dve menstruacije dok je estrusni ciklus period između dva estrusa. Pri tome, estrus, koji predstavlja polni žar, tj. period kada je jedinka seksualno najprijemčivija, dešava se pri završetku folikulske faze, odnosno tokom ovulacije. Dakle, estrusni ciklus počinje estrusom koji se dešava tokom ovulacije i nastavlja se luteinskom, a zatim folikulskom fazom. Menstruacija, odnosno krvarenje iz materice koje je posledica periodičnog odlupljivanja sluzokože, dešava se na početku folikulske faze ciklu-

sa i obično traje tokom prvih 5 dana, a zatim se folikulska faza nastavlja sve do ovulacije, nakon čega sledi luteinska faza. Estrus i menstruacija su prihvaćeni kao referentne tačke reproduktivnih ciklusa zato što su to najvidljivije pojave u toku ciklusa. Komparativni prikaz menstrualnog i estrusnog ciklusa dat je na slici 15.1.



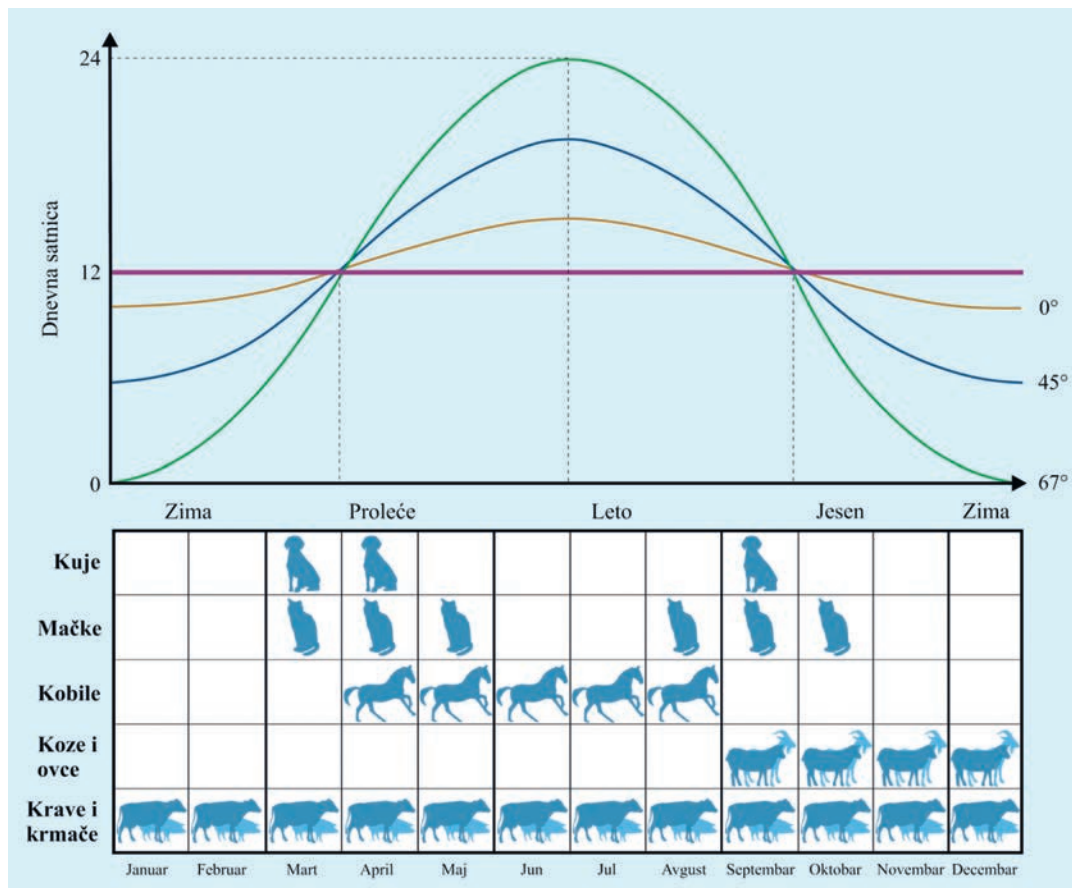
**Slika 15.1.** Komparativni prikaz menstrualnog i estrusnog ciklusa  
(ilustrovao Dušan Bošnjaković)

Postoje predlozi da se uvede termin *intraovulatorni interval* kao zajednički izraz za reproduktivni ciklus kod primata i neprimata, a tokom koga se prvo dešava luteinska, a zatim folikulska faza.

### 15.1.1. Sezonalnost estrusnog ciklusa

Estrusni ciklus domaćih životinja sisara može se, kao i menstrualni ciklus, ponavljati kontinuirano tokom cele godine ili se pojavljivati samo periodično u pojedinim sezonama godine. Na osnovu učestalosti pojave estrusnog ciklusa tokom godine, domaće životinje sisari se dele na poliestrične (više ciklusa tokom godine), diestrične (dva ciklusa ) i monoestrične (jedan ciklus tokom godine). Poliestrične životinje se dele na nesezonski kontinuirano poliestrične i sezonski poliestrične životinje. Kod nesezonski poliestričnih životinja, kao što su goveda i svinje, distribucija estrusnog ciklusa je ujednačena tokom cele godine, dok je kod sezonski poliestričnih ograničena na određenu sezonu u godini. Zavisno od sezone kada se javljaju estrusi, sezonski poliestrične životinje se dele na vrste dugog dana, kao što su kobile i mačke, kod kojih se ciklusi javljaju u periodu godine u kome se dan produžava i vrste kratkog dana, kao što su ovce i koze, kod kojih su ciklusi u periodu godine kada se dan skraćuje. Vrste dugog dana pokazuju znake estrusa u proleće, a vrste kratkog dana u jesen. Razlog sezonalnosti je rađanje potomstva u periodu godine koji pruža najbolje uslove. Naime, graviditet kod kobilica traje prosečno 335 dana tako da se one ždrebe u proleće, a graviditet kod ovaca traje prosečno 48 dana tako da se i one jagnje u proleće. Sezonalnost polnog ciklusa kod različitih vrsta domaćih životinja sisara prikazana je na slici 15.2.

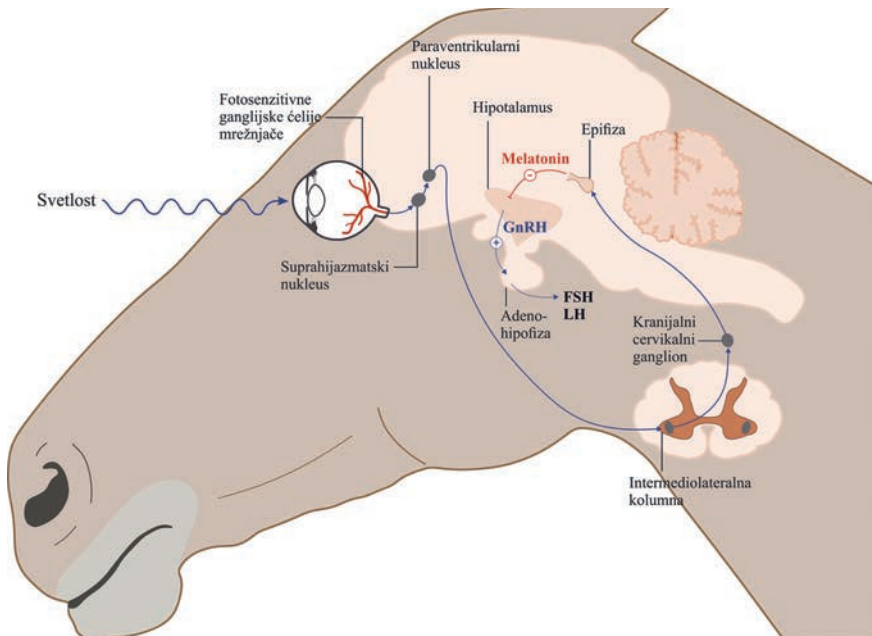




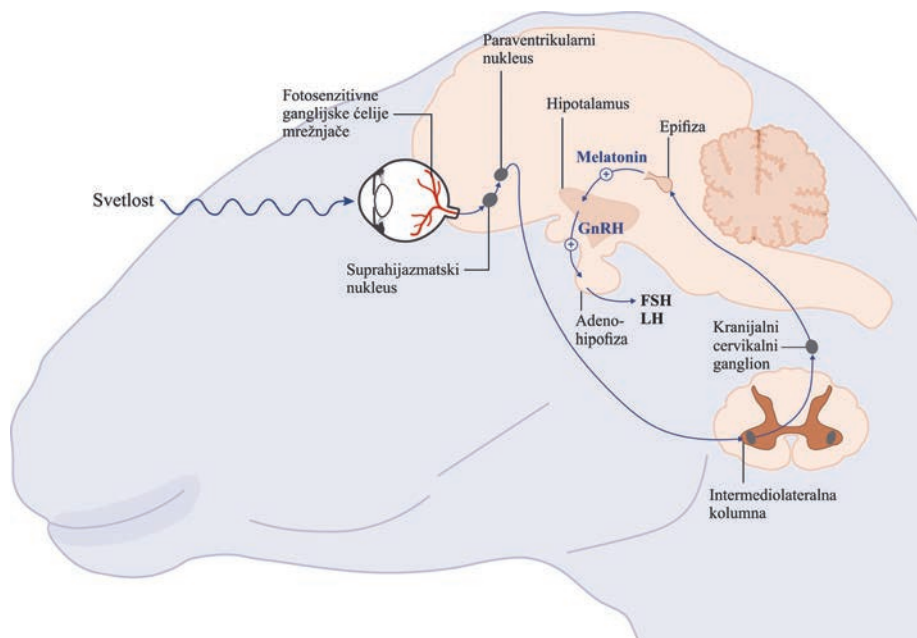
**Slika 15.2.** Period odnosno sezona u kojoj se pojavljuju polni ciklusi kod različitih vrsta životinja (ilustrovao Dušan Bošnjaković)

Fiziološki, veza između fotoperioda (broja sati dnevnog svetla u 24 h periodu) i početka sezone parenja se ostvaruje na nivou epifize. Epifiza je endokrini žlezda koja predstavlja dorzalni izvrat krova diencefalona i kod sisara je obavijena mekom moždanicom i povezana sa mozgom pomoću kratke drške. Snabdevena je krvnim sudovima i nervnim vlaknima simpatikusa, a parenhim čine trake ili folikuli građeni od pinealocita. U epifizi se luči više supstanci koje se smatraju hormonima ove žlezde. To su metoksiindoli/indolamini (N-acetilserotonin, 5-metoksi triptamin, 5-hidroksitriptofol i melatonin) ali i neki peptidi i proteini. Utvrđeno je da, od svih indola, samo melatonin ima stimulatívni ili kočéči uticaj na polne žlezde.

Melatonin se sintetisuje iz triptofana preko serotonina. U epifizi nema velikih rezervi melatonina jer se sintetisane količine izlučuju u krv i vrlo brzo metabolišu u jetri. Naime, poluživot melatonina u krvi je do 10 minuta. Kod svih životinjskih vrsta lučenje melatonina je pojačano tokom noći. Pri tome, informacija o količini svetlosti, odnosno tame ide od retine preko suprahijazmatičnog područja (jedara) i putem simpatikusa dospeva u epifizu. To je takozvani retino-hipotalamički trakt koji je odvojen od vizuelnog sistema. Smatra se da melatonin deluje na polne žlezde preko određenih centara u mozgu, pošto su receptori za ovaj hormon nađeni u hipotalamusu ali i hipokampusu, striatumu i srednjem mozgu. Broj receptora se menja zavisno od perioda dana tj. količine svetlosti. Pod stalnim uticajem svetla smanjuje se aktivnost epifize, a time se smanjuje i proizvodnja melatonina. Kod kobilica, visoke koncentracije melatonina inhibiraju lučenje gonadotropnog hormona-oslobađajućeg hormona (engl. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) tako da se estrus i posledično parenje odigrava u proleće (Slika 15.3). S druge strane, kod ovaca, visoke koncentracije melatonina stimulišu lučenje GnRH tako da se parenje dešava u jesenjem periodu (Slika 15.4).



**Slika 15.3.** Mehanizam uticaja fotoperioda na lučenje gonadotropnih hormona kod konja (ilustrovao Dušan Bošnjaković)



**Slika 15.4.** Mehanizam uticaja fotoperioda na lučenje gonadotropnih hormona kod ovaca (ilustrovao Dušan Bošnjaković)

## 15.1.2. Faze estrusnog ciklusa domaćih životinja sisara

Estrusni ciklus domaćih životinja sisara se može podeliti u četiri uzastopne faze koje, između ostalog, karakteriše različito ponašanje životinja. Te faze su: (1) proestrus, kada se razvija ovulatorni folikul; (2) estrus, odnosno period seksualne prijemčivosti kada dolazi do završnog sazrevanja folikula i ovulacije; (3) metestrus, period formiranja žutog tela i (4) diestrus, kada je žuto telo zrelo i aktivno proizvodi progesteron. Proestrus i estrus fiziološki pripadaju folikulske fazi, a metestrus i diestrus čine luteinsku fazu.

### 15.1.2.1. Proestrus

Proestrus je pripremna faza ciklusa, tokom koje se, pod uticajem FSH i LH, uvećavaju folikuli i započinje sinteza i lučenje estrogena. Estrogen dospeva u cirkulaciju i omogućava vaskularizaciju i intenzivniji rast će-

lija reproduktivnih organa pripremajući ih za estrus, odnosno polni žar. Kod nekih vrsta životinja moguće je da se u proestrusu pojavi mukozni ili krvav iscedak iz vulve.

### 15.1.2.2. Estrus

Estrus se dešava neposredno pre ovulacije i posledica je povećanja koncentracije estrogena iz rastućih folikula, ali delom nastaje i pod uticajem progesterona koji se luči iz preovulatornih folikula kao i žutih tela zaostalih iz prethodnog ciklusa. Estrus je period kada je ženka prijemčiva za parenje i to ispoljava vidljivim znacima estrusa, koji se razlikuju među životinjskim vrstama ali imaju za krajnji cilj privlačenje mužjaka i prihvatanje parenja. Prepoznavanje znakova estrusa je izuzetno značajno da bi se životinja pustila na prirodno parenje ili veštački osemnila. Fiziološki, promenjeno ponašanje životinja tokom estrusa je praćeno histološkim i funkcionalnim promenama na reproduktivnim organima. Međutim, ponekad se dešava da, iako postoji fiziološka ciklična ovarijalna aktivnost i fiziološki hormonalni status sa pojavom ovulacije, nedostaju vidljivi simptomi estrusa. Ta pojava naziva se tihi estrus. Kod kobilica i krava se promene na jajnicima, odnosno rast folikula i formiranje žutog tela mogu otkriti rektalnom palpacijom i ultrazvučno, dok se kod ostalih vrsta domaćih životinja te promene uočavaju samo ultrazvučno.

### 15.1.2.3. Metestrus

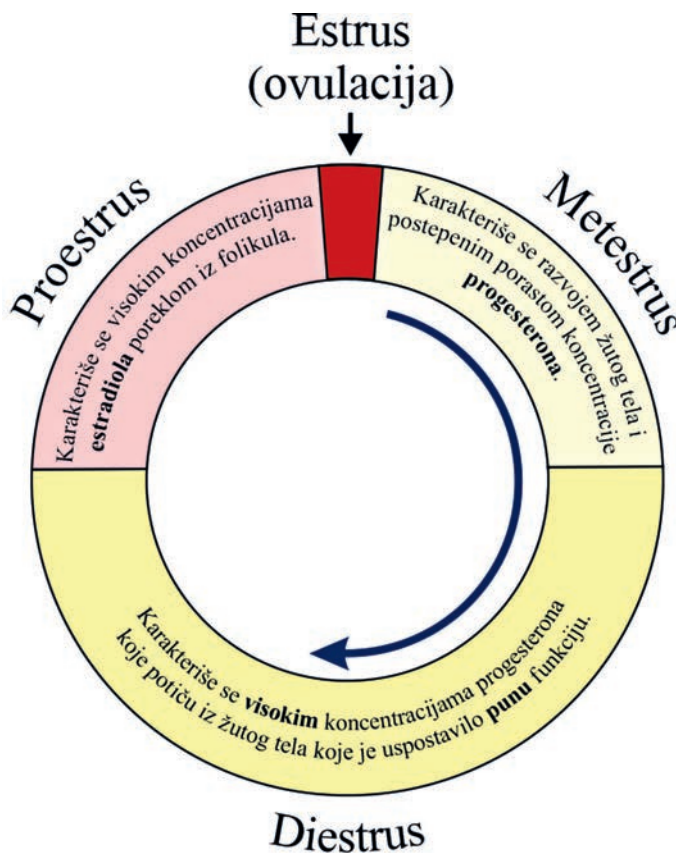
Metestrus predstavlja prestanak privlačenja mužjaka i prihvatanja parenja. Ova faza nastaje nakon ovulacije i tokom nje dominira prisustvo žutog tela na jajniku zbog čega se smanjuje koncentracija estrogena, a raste koncentracija progesterona. Porast koncentracije progesterona izaziva povećanje materičnih žlezda i rast miometrijuma, dok pad koncentracije estrogena dovodi do vraćanja izgleda vulve na stanje pre početka estrusa.

### 15.1.2.4. Diestrus

Diestrus je faza reproduktivnog mirovanja do početka proestrusa sledećeg ciklusa. Ova faza traje relativno kratko kod poliestričnih životinja

(krave, svinje). Kod diestričnih i monoestričnih životinja ovaj period mirovanja je produžen i često se naziva anestrus. Kod sezonski poliestričnih životinja (kobile, ovce) u sezoni parenja životinje ulaze u kratke periode diestrusa, dok u sezoni kada se ne pare one ulaze u period dužeg anestrusa i to nakon poslednjeg metestrusa u sezoni. Tokom anestrusa svi reproduktivni organi su u stanju mirovanja, a lučenje polnih hormona je na bazalnom nivou.

Anestrus je period mirovanja reproduktivnih organa, odnosno period kada nema ovulacije i oplodnje, a lučenje polnih hormona je na bazalnom nivou. Anestrus se, fiziološki javlja kod životinja van sezone parenja, ali i tokom graviditeta. Šematski prikaz i kratak opis pojedinih faza ciklusa dat je na slici 15.5.



**Slika 15.5.** Šematski prikaz i kratak opis pojedinih faza polnog ciklusa kod domaćih životinja sisara (ilustrovao Dušan Bošnjaković)

### 15.1.3. Pubertet

Pubertet predstavlja pojavu fizioloških, endokrinih i histoloških promena u organizmu jedinke koje pre svega zahvataju polne organe, a zahvaljujući kojima ona postaje reproduktivno aktivna. Do pojave puberteta ženski polni organi funkcionalno miruju, a nakon toga započinje ritmično lučenje GnRH, koji utiče na adenohipofizu da luči FSH i LH. Ovi hormoni dovode do cikličnih promena na ženskim polnim organima, odnosno do estrusnih ili polnih ciklusa. Vreme pojave puberteta varira između različitih vrsta domaćih životinja i zavisi od velikog broja faktora kao što su način držanja, ishrane, godišnje doba i drugo.

### 15.1.4. Graviditet

Graviditet traje različito dugo kod različitih vrsta životinja ali je fiziološka osnova graviditeta slična kako između različitih domaćih životinja sisara tako i u odnosu na primata. Kako je poznato, materica je “inkubator” za razvoj embriona. Embrion se vezuje za endometrijum materice majke i tamo se razvija do momenta dok nije sposoban samostalno da nastavi život u spoljašnjoj sredini. Pre nego što se embrion veže za zid materice, šalje signale majci o svom postojanju, čime omogućava dalju proizvodnju progesterona iz žutog tela, sprečava pojavu novog estrusnog ciklusa i omogućava izlučivanje hranljivih materija iz žlezda sluzokože materice. Embrioni različitih životinjskih vrsta šalju ove signale na različite načine. Kod preživara trofoblast embriona proizvodi interferon, koji smanjuje broj receptora za oksitocin u epitelu materice. Oksitocin je značajan stimulator sinteze prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) u materici, pod uslovom da je prisutan dovoljan broj receptora za oksitocin. Tako, interferon, smanjujući broj receptora za oksitocin, smanjuje lučenje  $PGF_{2\alpha}$  iz endometrijuma i sprečava luteolizu. Kod primata i konja, blastocista signalizira majci svoje postojanje proizvodnjom peptidnog hormona koji se naziva humani horionski gonadotropin (engl. *human chorionic gonadotropin*, hCG) ili konjski gonadotropin (engl. *equine chorionic gonadotropin*, eCG) koji ima isti efekat kao LH pa tako stimuliše luteinske ćelije da nastave proizvodnju progesterona.

Kod primata i glodara, implantacija, odnosno prodor blastocista u endometrijum dešava se pomoću enzima koje luče ćelije spoljašnjeg sloja horiona. S obzirom na to da epitel materice brzo prekriva mesto ulaska, dalji razvoj embriona i fetusa se nastavlja unutar endometrijuma. Međutim, kod domaćih životinja, fetus se razvija unutar lumena materice tako da nema prodora u endometrijum. Kod ovih jedinki pojam implantacija se koristi da se označi bliski kontakt između horiona i endometrijuma. Tkivo koje se razvija u području kontakta se naziva posteljica (placenta) unutar kojeg su kapilari fetusa i majke u prisnom kontaktu na velikoj površini. Veze između fetalnih ovojnica i endometrijuma čine mikroskopske resice koje se pružaju od horiona ka endometrijumu, povezujući površinu dodira. Veza se uspostavlja u određenim područjima fetalnih ovojnica. Raspored ovih dodirnih područja je osnov za podelu vrsta posteljica. Kod konja i svinja mala dodirna područja su raspoređena preko cele površine fetalnih ovojnica, pa se takva placenta naziva *placenta diffusa*. Kod preživara postoji od 15 do 120 dodirnih područja koji izgledaju kao dugmad pa se takva posteljica naziva *placenta kotiledonaria*. Mesojedi imaju horionske resice kružno raspoređene oko fetusa i takva posteljica naziva se *placenta zonaria*. Kod primata je, kako je poznato, prisutna *placenta discoidalis*. Između različitih vrsta životinja postoje razlike i u broju slojeva koji odvajaju krv fetusa i majke. Tako se kod konja, svinja i preživara nalazi *placenta epithiochorialis*, kao tip posteljice kod koje i fetalna i majčina strana sadrže zasebne kapilare i netaknuti epitel. Kod pasa i mačaka zastupljena je *placenta endothiochorialis* kod koje nedostaje epitel endometrijuma, a kapilari majke su u direktnom kontaktu sa epitelom horiona olakšavajući difuziju između krvi fetusa i majke. Kod primata je prisutna *placenta haemochorialis*, kod koje takođe izostaje endometrijum, a horionske resice se nalaze u malim lakunama krvi majke.

## 15.2. KARAKTERISTIKE ESTRUSNOG CIKLUSA RAZLIČITIH VRSTA DOMAĆIH ŽIVOTINJA

U daljem tekstu biće dat opis pojedinih faza estrusnog ciklusa kod različitih vrsta domaćih životinja.

### 15.2.1. Estrusni ciklus kobile

Kobile su sezonski poliestrične životinje. Pubertet kod kobilica počinje u uzrastu od 12 do 19 meseci, zavisno od rase, dok estrusni ciklus traje od 19 do 21 dan, a ponekad i do 23 dana. U sezoni van parenja, kada kobile uđu u anestrus, ukupan estrusni ciklus kobilica traje 124 dana. Estrus kod kobilica traje prosečno pet dana, ali dužina zavisi od perioda sezone. Tako, početkom sezone (mart–april) estrus je duži, dok je krajem sezone (maj–jul) estrus kraći. Ovulacija kod kobilica se javlja od 1 do 2 dana pre kraja estrusa, tako da je to i optimalno vreme parenja. Znaci estrusa kod kobilica su: da su nemirne, neposlušne, nervozne i imaju smanjen apetit. Pored toga, za kobile u estrusu je karakteristično često uriniranje malih količina urina koji sadrži mukus, kao i ritmički pokreti klitorisa i ventralne komisure vulve, takozvano *bliskanje*. Znaci estrusa su izraženiji u blizini pastuva, prema kome kobile mogu pokazivati individualnu selektivnu zainteresovanost.

### 15.2.2. Estrusni ciklus krave

Krave su nesezonski poliestrične životinje, što znači da se estrus javlja tokom cele godine. Pubertet kod krava može početi pri uzrastu od 9 do 24 meseca, dok estrusni ciklus traje od 18 do 21 dan, a može trajati i do 24 dana. Na trajanje estrusnog ciklusa utiču različiti faktori, kao što su klima, uslovi sredine, socijalni i emotivni status jedinke, kao i rasa. Estrus kod krava traje od 12 do 28 sati, prosečno 18 . Ovulacija se kod krava odigrava 10 do 15 sati posle prestanka estrusa, a krave se optimalno pare od 36 sati pre početka ovulacije do 14 sati nakon ovulacije. Kod 55 do 60 % krava se ovulacija i posledična oplodnja i graviditet dešavaju na desnom jajniku, odnosno rogu materice. Znaci estrusa kod krava su češće oglašava-



vanje, povećana aktivnost životinje ili nemir i izraženije kretanje, moguće povećanje telesne temperature, lizanje drugih jedinki, smanjenje apetita i mlečnosti i postojanje bistrice estrusne sluzi koja se cedi iz vulve. Dodatno izraženo je naskakivanje na druge krave u stadu kao i refleks mirovanja i spremnost za parenje kada krave dopuštaju da budu zaskočene. Pojedine krave mogu pokazivati grčevite pokrete vulve, kao i izbacivanje i istežanje zadnjeg dela tela.

Folikulogeneza kod goveda se neprekidno odvija, pri čemu se razvoj folikula dešava u talasima, što je osobenost kod ove vrste životinja. Tih talasa obično ima dva ili tri, pri čemu se ovulacija dešava u poslednjem talasu, odnosno jedino folikul iz poslednjeg talasa ovulira dok folikuli iz prethodnih talasa podležu atreziji. Ukoliko krava ima dva folikularna talasa, prvi talas počinje sa prvim danom ciklusa, odnosno na dan ovulacije, a drugi 11. dana ciklusa. Kod nekih krava se javljaju tri talasa koji nastaju 2, 9, i 11. dana ciklusa.

### 15.2.3. Estrusni ciklus ovce i koze

Ovce i koze su sezonski poliestrične životinje u području umereno kontinentalne klime koja je karakteristična za Srbiju. Međutim, broj estrusnih ciklusa zavisi od klime u kojoj se ovce gaje. Ako se ovce gaje u područjima sa manjim varijacijama dužine dana i u tropskoj zoni, postaju nesezonski poliestrične, pa se estrusni ciklusi javljaju tokom cele godine. Poznato je da je dužina fotoperioda izuzetno značajna za reproduktivnu aktivnost ovaca i koza. Smanjenje dužine dana deluje stimulatивно na polnu aktivnost, dok produžetak svetlosnog perioda izaziva suprotni efekat i dovodi do anestrije. Kod nas se parenje ovaca dešava tokom jeseni, dok se jagnjenje dešava u proleće. Za razliku od ovaca, kod koza gajenih u tropskoj zoni, pored fotoperioda, važnu ulogu imaju i drugi klimatski faktori, kao temperatura, količina padavina i vegetacija. Ovce ulaze u pubertet u uzrastu od 4 do 14 meseci. Estrusni ciklus kod ovaca traje od 14 do 20 dana, dok je kod koza nešto duži i traje 15 do 24 dana, a u odnosu na rasu i sezonu može trajati i do 63 dana. Prosečna dužina trajanja estrusa kod ovaca je od 24 do 48 sati. Dužina estrusa zavisi od uzrasta (kraće traje kod mladih ovaca), rase, prisustva ovna (skraćuje ga), kao i perioda u sezoni parenja (kraći je na

početku sezone). Ovulacija je na kraju estrusa, tako da je optimalno vreme parenja od sredine do kraja estrusa. Kod ovaca obično dolazi do ovulacije dve do tri jajne ćelije u toku jednog ciklusa. Ovce imaju relativno slabo izražene promene u ponašanju koje prate estrus i često je teško utvrditi ovce koje su u estrusu ukoliko ovan nije pisutan u stadu. Ukoliko je ovan prisutan u okolini, znaci estrusa su izraženiji i ovce se trude da budu u njegovoj blizini. U prisustvu ovnova, ovce u estrusu su nemirne, mašu repom, njuškaju mužjaka, izražen je pasivni refleks stajanja (refleks mirovanja) pred ovnom, dozvoljavaju naskok ovna podizanjem i pomeranjem repa u stranu. Takođe se češće oglašavaju, češće mokre, vulva je otečena i crvena, moguće je istiskivanje estralne sluzi, koja je na početku estrusa bistra, a potom postaje zamućena. Cerviks je otvoren i edetamozan. Kod ovaca u estrusu se menja i miris urina, koji ovnovi prepoznaju.

#### 15.2.4. Estrusni ciklus svinje

Domaća svinja (*Sus scrofa domestica*) je nesezonski poliestrična multiparna životinja kod koje se estrus javlja tokom cele godine. Za razliku od domaće svinje, evropska divlja svinja (*Sus scrofa*) je sezonski poliestrična životinja i sezona parenja je u periodu decembar i januar. Pubertet krmača se javlja u uzrastu od 5 do 7 meseci, a trajanje estrusnog ciklusa je od 18 do 24 dana. Dužina estrusa prosečno traje od 40 do 46 sati, ali može biti i duža. Ovulacija se kod krmača dešava drugog dana estrusa, obično od 30. do 36. sata od početka estrusa. Znaci estrusa su izraženiji kod primitivnih u odnosu na plemenite rase. Nerastovi imaju stimulatívni efekat na pojavu estrusa putem olfaktivnih (feromoni u pljuvački i urinu), auditivnih (oglašavanje), taktilnih (njuškanje ženke) i vizuelnih (nerast u vidokrugu) stimulusa na krmače. Najznačajniji znak estrusa je pojava refleksa stajanja (lumbalni refleks), kada krmača u estrusu mirno stoji na pritisak u lumbalnom predelu. Krmače u estrusu su uznemirene, imaju povišenu telesnu temperaturu, češće se oglašavaju, imaju smanjen apetit, želju za nerastom i dozvoljavaju naskakivanje drugih ženki ili nerasta. Pojedine rase svinja u toku estrusa mogu držati ukočene uši uspravno i okrenute ka nazad.

### 15.2.5. Estrusni ciklus kuje

Kuje su monoestrične životinje. Kod kuja prvi polni ciklus, odnosno pubertet, nastaje u uzrastu od 6 meseci do 2 godine. Kod malih rasa se prvi estrus javlja sa 6 do 10 meseci, a kod velikih rasa se javlja kasnije, često i sa 18 do 20 meseci. Plodnost kod kuja opadne posle 7. godine života. Estrusni ciklus kuja traje 6 i više meseci. Kod većine kuja estrus se javlja dva puta godišnje, ali je interestrusni interval vrlo različit i može da traje od 4 do 10 meseca, što znači da se estrus može javiti jedanput do tri puta godišnje. Kuje karakteriše relativno dug period proestrusa koji traje od 5 do 20 dana. Proestrus se javlja nakon anestrusa i karakteristično je za ovaj period da kuja privlači mužjaka ali odbija parenje. Proestrus počinje sa hiperemijom i edemom vulve i vagine, pri čemu se javlja vaginalni iscedak, koji je posledica porasta koncentracije estrogena. Ovaj iscedak je hemoragičan i kada se pojavi to se označava kao prvi dan ciklusa. Za kuje u proestrusu je karakteristično da se porast koncentracije progesterona može desiti pre ovulacije, za razliku od drugih vrsta životinja kod kojih se porast koncentracije progesterona dešava tokom i nakon ovulacije. Ovaj porast koncentracije progesterona je neophodan za pojavu ovulacije i prelazak u estrus. Estrus kod kuja prosečno traje 9 dana i tada kuja prihvata mužjaka. Ovu fazu karakteriše manji edem vulve koja je mekane konzistencije i opuštena, a iz nje se cedi serohemoragični iscedak. Ipak, kod pojedinih kuja estrus može proći i bez ovih promena na vulvi. Tokom estrusa kuja pokazuje izrazit interes za mužjaka, okreće zadnji deo tela ka njemu, sklanja rep u stranu i stoji mirno. Tokom ove faze koncentracija progesterona raste, dok postepeno koncentracija estrogena opada. Ovulacija nastupa za 24–48 sata nakon pika LH koji se prosečno javlja 10. dana ciklusa. Ovulacijom se iz folikula izbacuje primarna ovocita koja tokom narednih od 48 do 60 sati sazreva u jajovodu i tek tada je spremna za oplodnju. Treba naglasiti da su spermatozoidi mužjaka fertilno sposobni od 5 do 7 dana u reproduktivnom traktu kuja. Ponašanje kuja tokom estrusa se ne razlikuje značajno u odnosu na proestrus ali u ovoj fazi kada je kuja uznemirena ona prihvata mužjaka, mada ovo prihvatanje može biti selektivno. Neposredno pre parenja kuja pomera zadnji deo tela ka odabranom mužjaku i mirno stoji, kao i tokom parenja. Pojedine kuje u estrusu mogu zaska-

kivati druge kuje. Metestrus traje od 50 do 80 dana, a počinje onog dana kada kuja naglo odbija parenje. Tada u vaginalnom brisu dolazi do nagle smene superficijalnih kornifikovanih ćelija parabazalnim i intermedijalnim ćelijama. Diestrus traje prosečno od 70 do 75 dana i pokriva period lažne trudnoće. Tada dominira progesteron. Anestrus kod kuja karakteriše mirovanje polnih organa i polna neaktivnost, a traje od 80 do 240 dana. Tokom ove faze koncentracija progesterona se smanjuje na bazalne vrednosti.

### 15.2.6. Estrusni ciklus mačke

Mačke su sezonski poliestrične životinje kod kojih parenje traje od januara do septembra, podeljeno u dve sezone, odnosno na period januar–mart i period avgust–oktobar. Dugodlake mačke, kao što je persijska mačka, imaju tendenciju veće sezonalnosti od kratkodlakih mačaka, kao što je sijamska mačka. Cikličnost tokom cele godine jeste u 50 % mačaka, dok ostatak ispoljava anestrus od septembra do kraja januara. Mačke ulaze u pubertet u uzrastu od 4 do 18 meseci, pri čemu kratkodlake rase mačaka ulaze u pubertet ranije u odnosu na dugodlake rase. Vreme ulaska u pubertet zavisi od fotoperioda, tako da kod mačaka koje postaju polno zrele u letnjem periodu prvi estrus se javlja ranije u odnosu na mačke čija se polna zrelost dostiže u zimskom periodu, kada se prvi estrus pomera za prvo proleće. Estrusni ciklusi se, ukoliko se mačka ne pari, ponavljaju na svake 2 do 3 nedelje u proleće, leto i jesen. Tokom zime mačke su u fazi anestrusa. Međutim, mačke koje se drže u uslovima veštačkog osvetljenja, odnosno u kućnim uslovima, često gube sezonalnost, pa se kod njih estrusni ciklusi javljaju i u zimskom periodu. Kod mačaka koje se drže u prirodnim spoljašnjim uslovima, učestalost polnog ciklusa zavisi od fotoperioda, tako da je potrebno da svetli deo dana traje najmanje 12 sati da bi se cikličnost održala. Ukoliko su mačke izložene svetlosti kraćoj od 8 sati cikličnost naglo prestaje. Ponovna cikličnost se dešava prosečno 16 dana nakon uspostavljanja dužine fotoperioda od 14 sati. Faza proestrusa kod mačaka se često ne uočava pa se obično u literaturi nalazi podatak da proestrus i estrus zajedno traju od 3 do 10 dana. Kod mačaka se tokom faze proestrusa i estrusa javljaju znaci estrusa koji podrazumevaju promene u

ponašanju kao što su: češće oglašavanje, češanje o predmete i zauzimanja stava lordoze. Promene na vulvi obično nisu izražene ali se može javiti crvenilo, omekšanje i edem bez prisustva iscedka. Vulva može biti blago otvorena. Akt parenja skraćuje trajanje estrusa. Ovulacija kod mačaka je indukovana parenjem. Naime, parenje kod mačaka indukuje pojavu LH pika koji prethodi ovulaciji. Period između parenja i ovulacije je prosečno od 24 do 54 sati. Potrebno je minimalno 4 parenja da se izazove ovulacija. Ukoliko se parenje ne desi, mačke ulaze u period interestrusa (period između dva uzastopna estrusa). Ovaj period traje od 10 do 14 dana, a nakon toga mačka ponovo ulazi u proestrus i estrus. Pojedine mačke mogu spontano da ovuliraju. Ovo se najčešće dešava kod starijih mačaka ili mačaka koje se drže u blizini mužjaka sa kojim nisu u fizičkom i vizuelnom kontaktu. Tada se luče feromoni od strane mačora koji izazivaju ovulaciju. Nakon toga mačke ulaze u lutealnu fazu ciklusa. Lutealna faza ciklusa kod mačaka koje nisu gravidne je skraćena u odnosu na negravidne mačke. Anestrus je period acikličnosti i traje od 45 do 150 dana. Mačke koje se nisu parile tokom estrusa ulaze u diestrus, odnosno pseudograviditet koji traje od 40 do 45 dana, dok mačke koje su se parile ulaze u graviditet od 60 do 65 dana.

Komparativni prikaz estrusnog ciklusa kod različitih vrsta domaćih životinja sisara dat je u Tabeli 15.1

**Tabela 15.1.** Komparativni prikaz estrusnog ciklusa kod različitih vrsta domaćih životinja sisara (Preuzeto iz knjige Biotehnologija animalne reprodukcije, Vakanjac i saradnici, 2020, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine) sa dozvolom autora

Parametar ciklusa	Vrsta životinje					
	<b>Krava</b>	<b>Kobilja</b>	<b>Ovca</b>	<b>Svinja</b>	<b>Kuja</b>	<b>Mačka</b>
Vreme pojave puberteta	9–24 meseci	12–19 meseci	4–14 meseci	5–7 meseci	6–24 meseci	4–18 meseci
Tip ciklusa	poliestrična	sezonski poliestrična (dug dan)	sezonski poliestrična (kratak dan)	poliestrična	monoestrična/diestrična	Sezonski poliestrična
Trajanje ciklusa	21 (18–24) dan	21 (19–21) dan	16,5 (14–20) dana	21 (18–24) dan	6–12 meseci	6–9 meseci
Trajanje estrusa	18 (12–28) sati	5 (4,5–7,5) dana	24–48 sati	2 (1–5) dana	9 (5–19) dana	3–10 dana
Vreme ovulacije	10–15 sati posle kraja estrusa	1–2 dana pre kraja estrusa	12–24 sati pre kraja estrusa	30–36 sati posle početka estusa	1–2 dana estrusa	Indukovano parenjem
Trajanje graviditeta	282 (274–291) dana	336 (323–341) dana	150 (140–160) dana	114 (110–116) dana	63 (60–65) dana	63–65 dana

## 15.3. LITERATURA

- Erickson HH, Goff JP, Uemura EE (2015) *Dukes' physiology of domestic animals*, John Wiley & Sons, Iowa, USA.
- Hafez B, Hafez ESE (2000) *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed., Lippincott Williams&Wilkins.
- Kustritz MVR (2011) *Clinical canine and feline reproduction: evidence-based answers*, John Wiley & Sonsč
- McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, DV Dickson (2011) *Equine reproduction*, John Wiley & Sons.
- Pavlović Vojislav (2018) *Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje*, Naučna KMD, Beograd.
- Sjastaad OV, Hove K, Sand O (2003) *Physiology of domestic Animals*, Scandinavian Veterinary Press, Oslo, Norway.
- Vakanjac i saradnici (2020) *Biotehnologija animalne reprodukcije*, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.





---

# SKRAČENICE

---



- 17 $\beta$ HSD – 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza
- 20 $\alpha$ -DHP – 20 $\alpha$ -dihidroprogesteron
- 20 $\alpha$ -HSD – 20 $\alpha$ -hidroksisteroid dehidrogenaza
- 3 $\beta$ HSD – 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze / $\Delta^5$ - $\Delta^4$  izomeraza
- 4E-BP1 – transkripcijski faktor (engl. *phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor*) S6K1 – S6 kinaza 1 (engl. *S6 kinase 1*)
- AA – arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*)
- ABHD2 – protein 2 koji sadrži domen  $\alpha/\beta$  hidrolaze (engl.  *$\alpha/\beta$  hydrolase domain-containing protein 2*)
- AC – adenilil ciklaza
- ACE I – angiotenzin I konvertujući enzim (engl. *angiotensin-converting enzyme 1*)
- ACTH – adrenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotrophic hormone*)
- ActIIA/ActIIB – receptori za aktivin
- ADAM – familija metaloproteaza, članovi se označavaju arapskim brojevima (engl. *a disintegrin and metalloproteinase*)
- ADAMTS1 – proteaza (engl. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs*)
- AF-1 i AF-2 – subdomeni u N-terminalnom (AF-1) i ligand-vezujućem domenu (AF-2) steroidnih receptora (engl. *activation function 1/2*)
- AFC – određivanje broja antralnih folikula (engl. *antral follicle count*)
- AFP – alfa feto protein
- AIRE – (engl. *autoimmune regulator*)
- AKAP – proteini za koje se vezuje PKA (engl. *A-kinase anchoring proteins*)
- AKR – aldo-keto reduktaza
- ALK4 – receptor tip I koji je sličan kinazi 4 (engl. *activin like kinase 4*)
- ALK5 – TGF $\beta$  tip I receptor kinaza (engl. *TGF $\beta$  type I receptor kinase*, poznat i kao ALK5)
- ALK6 – receptor tip 1B za za protein morfogeneze kostiju (engl. *activin receptor-like kinase 6*), označava se i kao BMPRII
- AMH – anti-Müllerov hormon
- Ang – angiopoetin
- AP – alkalna fosfatasa (engl. *alkaline phosphatase*)
- AP1 – familija transkripcijskih faktora (engl. *activator protein 1*)

- APC/C – multiproteinski kompleks sa aktivnošću E3-ubikvitin ligaze, označava se i kao ciklozom
- APECED – poliendokrinopatija-kandidijaza-ektodermalna distrofija  
(engl. *autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectoderm dystrophy*)
- AR – receptor za androgene hormone
- AREG – amfiregulin
- ATAD3A – protein u unutrašnjoj membrani mitohondija  
(engl. *ATPase family AAA domain- containing protein 3A*)
- ATF2 – faktor aktivacije transkripcije 2 (engl. *activating transcription factor 2*)
- AX8 – transkripcioni factor (engl. *paired box family, member 8*)
- BAFF – faktor aktivacije B limfocita (engl. *B cell activating factor*)
- bFGF – osnovni faktor rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*)
- BK<sub>Ca</sub> - Ca<sup>2+</sup>-zavisni K<sup>+</sup>-kanal sa velikom propustljivošću  
(engl. *big conductance calcium- dependent potassium channels*)
- BMP – protein morfogeneze kostiju, članovi familije označavaju se arapskim brojevima (engl. *bone morphogenic protein*)
- BMPRII – receptor za BMP tip II (engl. *morphogenetic protein receptor type II*)
- BSA – goveđi serum albumin (engl. *bovine serum albumin*)
- BSP – protein koji vezuju spermatozoide (engl. *binder of sperm*)
- BSPH1 – protein homolog sa BSP
- BTC – betacelulin
- c-kit – receptor tirozin kinaza
- C/EBP – transkripcioni faktor, članovi familije označavaju se grčkim slovima  
(engl. *CCAAT-enhancer-binding protein*)
- CaMKII – kalmodulin kinaza II (engl. *calmodulin-dependent kinase II*)
- cAMP – ciklični adozinmonofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*)
- CAPs – proteini povezani sa kontrakcijama materice  
(engl. *contraction associated proteins*)
- CB1-R i CB2-R – receptori za kanabionide, vezuju anandamid, derivat arahidonske kiseline
- CBG – globulini koji vezuju kortikosteroide (corticosteroid-binding globulin)
- CD107a – marker degranulacije
- CD200 – transmembranski glikoprotein (engl. *cluster of differentiation 200*)

- CD23 – marker aktivacije B limfocita
- CD38 – glikoprotein, klaster diferencijacije, površinski marker imunskih ćelija  
(engl. *cluster of differentiation 38*)
- CD69 – rani marker aktivacije limfocita  
(engl. *membrane-bound, type II C-lectin receptor*)
- CDC25B – fosfataza ćelijskog ciklusa 25B (engl. *cell division cycle 25B*)
- CDKs – ciklin zavisne kinaze (engl. *cyclin-dependent kinases*)
- CFTR – nosač koji ubacuje jone  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$  u ćeliju  
(engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)
- CGB, CGB1, CGB2, CGB5, CGB7, CGB8 – geni koji kodiraju  $\beta$ -subjedinicu hCG primata
- cGMP – ciklični guanozinmonofosfat (engl. *cyclic guanosine monophosphate*)
- CH50 – hemolitička aktivnost komplementa (engl. *complement hemolytic activity*)
- CLGN – šaperon (engl. *calmegin*)
- CNS – centralni nervni sistem
- COC – kompleks kumulus-jajna ćelija (eng. *cumulus-oocyte complex*)
- COMT – katehol-O-metiltransferaza (engl. *catechol-O-methyltransferase*)
- COX – ciklooksigenaza, COX-1 i COX-2 (engl. *cyclooxygenase*)
- CPEB – RNK vezujući protein, članovi familije označavaju se brojevima  
(engl. *cytoplasmatic polyadenylation element binding protein 1*)
- cPLA2 – citosolna fosfolipaza A2 (engl. *cytosolic phospholipase A2*)
- CRE – sekvenca DNK koja odgovara na cAMP (engl. *cAMP-responsive element*)
- CREB – transkripcioni faktor koji se vezuje za CRE  
(engl. *cAMP responsive element binding*)
- CRH – kortikotropni-oslobađajući hormon (engl. *corticotrophin releasing hormone*)
- CRH-BP – CRH-vezujući protein (engl. *CRH-binding protein*)
- CRP – C reaktivni protein
- CSF – citostatički faktor
- Ctnnb1 – kodira  $\beta$ -katenin koji učestvuje u kanonskom putu WNT/  $\beta$ -katenin  
(engl. *catenin b-1*)
- CX – koneksini, označavaju se arapskim brojevima (engl. *connexins*)
- CXCL10 – hemokin ligand 10 iz CXC familije hemokina (engl. *CXC chemokine ligand-10*)
- CXCL12 – hemokin ligand 12 iz CXC familije hemokina (engl. *CXC chemokine ligand 12*),  
poznat i kao engl. *stroma derived factor 1 $\alpha$* , SDF1 $\alpha$

- CXCR4 – G-protein spregnuti receptori za hemokine (engl. *CXC chemokine receptor 4*)
- CyB – ciklin B (engl. *cycline B*)
- CYP11A1 – enzim koji seče bočni lanac holesterola (P450<sub>sc</sub>)
- CYP11B1 i CYP11B2 – 11 $\beta$ -hidroksilaze
- CYP17A1 – 17 $\beta$ -hidroksilaza/17,20-liaza
- CYP19A1 – aromataza
- CYP21A2 – 21-hidroksilaza
- DA – dopamin
- DAF – inhibitor komplementa – faktor ubrzanja razgradnje  
(engl. *decay accelerating factor*)
- DAG – diacilglicerol
- DAX1 – orfanski nuklearni receptor (engl. *dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on X chromosome*)
- Dazl* – gen koji se eksprimira u germinativnim ćelijama (engl. *deleted in azoospermia-like*)
- DCST1, DCST2 – proteini, sadrže DC-STAMP domen  
(engl. *DC-STAMP domain-containing 1/2*)
- DHEA – dehidroepiandrosteron
- DHEAS – dehidroepiandrosteron-sulfat
- DHH* – gen koji kodira sekretorni protein iz familije *hedgehog* (engl. *Desert hedgehog*)
- DHT – dihidrotestosteron
- DNMT1 $\alpha$  – DNK metil transferaza (engl. *DNA methyltransferase 1 $\alpha$* )
- DPI – difenil-jodonium (engl. *diphenyliodonium*)
- Dppa3* – gen koji kodira protein DPPA3 (engl. *developmental pluripotency associated 3*), ranije poznat kao *Stella*
- DSIP – peptid koji uzrokuju sporo-talasno (delta) spavanje  
(engl. *delta sleep-inducing peptid*)
- Dyn – dinorfin (engl. *dynorphin*)
- eCG – horionski gonadotropin konja (engl. *equine chorionic gonadotropin*)
- ECM – vanćelijski matriks (engl. *extracellular matrix*)
- EEG – elektroencefalogram
- EGF – epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*)
- EGFR – receptor za EGF (engl. *EGF receptor*)

- EGR1 – transkripcijski faktor (engl. *early growth response-1 protein*)
- Emi2 / Erp1 – komponenta CSF (engl. *early mitotic inhibitor 1-related protein 1*)
- Emx2 – gen koji kodira transkripcijski faktor EMX2 (engl. *empty spiracles homeobox 2*)
- ENaC – transporter koji ubacuje Na<sup>+</sup> u ćeliju (engl. *epithelial sodium channel*)
- EPAC – faktor razmene guanin-nukleotida, aktivira ga cAMP  
(engl. *cAMP-activated guanine nucleotide exchange factor*)
- ER – receptori za estrogene hormone, alfa i beta (ER $\alpha$ , ER $\beta$ )
- ErbB1-4 – receptori za EGF (HER1-4)
- EREG – epiregulin
- ERK1/2 – vanćelijskim signalima regulisana kinaza 1/2  
(engl. *extracellular signal-regulated kinase*)
- ET<sub>A</sub> – receptor za endotelin
- FAD – flavinadenin-dinukleotid
- Fancl – gen kodira ubikvitin ligazu, uključen u proliferaciju PGC  
(engl. *Fanconi anemia, complementation group L*) poznat i kao Pog
- FGF9 – faktor rasta fibroblasta 9 (engl. *fibroblast growth factor 9*)
- FIGLA – transkripcijski faktor (engl. *folliculogenesis specific bHLH transcription factor*)
- FILIA – protein, produkt *maternal effect genes*
- FIMP – membranski protein koji utiče na oplodnju  
(engl. *fertilization-influencing membrane protein*)
- FKBP52 – ko-šaperon, imunoflin FK506 vezujući protein-4, FKBP propil izomeraza 4 koja vezuje imunosupresante FK506 i rapamicin
- FMN – flavinadenin-mononukleotid
- FMP – poslednji menstrualni period (engl. *final menstrual period*)
- FMRP – protein koji vezuje iRNK (engl. *fragile X mental retardation protein*)
- FOX – superfamilija transkripcijskih faktora/regulatora sa forkhead DNK vezujućim domenom
- FOXL2 – transkripcijski faktor ima značajnu ulogu u ovarijumu  
(engl. *forkhead Box protein L2*)
- Foxl2 – kodira protein FOXL2 (engl. *forkhead box L2*)
- FOXO1 – transkripcijski faktor i koregulator transkripcijskih faktora  
(engl. *forkhead box O1*)
- FOXO3 – transkripcijski faktor (engl. *forkhead box O3*)

- FSH – folikulostimulišući hormon (engl. *follicle-stimulating hormone*)
- FSHR – receptor za FSH (eng. *follicle-stimulating hormone receptor*)
- G-CSF – faktor stimulacije granulocitnih kolonija  
(engl. *granulocyte colony-stimulating factor*)
- GABA – gama amino buterna kiselina (engl. *gamma.aminobutyric acid*)
- GABA<sub>A</sub> – jonski kanal za Cl<sup>-</sup> koji se aktivira vezivanjem GABA
- GABA<sub>B</sub> – receptor za GABA koji aktivira G<sub>i/o</sub> protein
- GALT – galaktozo-1-fosfat uridiltransferaza
- GalT 1 – β1,4-galaktozil transferaza 1
- GAP – GnRH-povezani protein (engl. *GnRH-associated protein*)
- GATA4 – transkripcioni faktor (engl. *GATA binding protein 4*)
- GATAD1 – protein koji na N-kraju ima domen cinkanih prstiju, učestvuje u remodeliranju hromatina (engl. *GATA zinc finger domain containing 1*)
- GDF9 – faktor diferencijacije rasta 9 (engl. *growth differentiation factor 9*)
- GDP – guanozin difosfat (engl. *guanosine-5'-diphosphate*)
- GH – hormon rasta (engl. *growth hormone*)
- GIRK – K<sup>+</sup>-kanal K<sub>ir</sub> koji aktiviraju receptori spregnuti sa G-proteinima
- GluR – receptor za glutamat
- GM-CSF – faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija  
(engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
- GnIH – gonadotropni hormon inhibirajući hormon  
(engl. *gonadotropin-inhibitory hormone*)
- GnRH – gonadotropni hormon oslobađajući hormon  
(engl. *gonadotropin-releasing hormone*)
- GnRHR – receptor za GnRH (engl. *GnRH receptor*)
- GPCRs – receptori spregnuti sa G proteinom (eng. *G protein-coupled receptors*)
- GPOR – membranski receptor za estrogene (engl. *G protein-coupled estrogen receptor*)
- GPI-usidreni proteini – glikofosfatidilinozitol-usidreni proteini  
(engl. *glycophosphatidylinositol*)
- GPR12 – membranski receptor jajne ćelije
- GPR3 – membranski receptor jajne ćelije
- GTP – guanozin- trifosfat (engl. *guanosine-5'-triphosphate*)



- HAS2 – enzim hijaluronin sintaza 2
- HB-EGF – faktor rasta sličan EGF koji vezuje heparin  
(engl. *heparin-binding EGF-like growth factor*)
- hCG – humani horionski gonadotropin (engl. *human chorionic gonadotropin*)
- HDL – lipoproteini velike gustine (engl. *high-density lipoproteins*)
- HGF – faktor rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor*)
- HIF – faktor indukovan hipoksijom (engl. *hypoxia inducible factor*)
- HIV – virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)
- HLA class II – leukocitni antigen čoveka klasa II (engl. *human leukocyte antigene class II*)
- HNA-2a – neutrofilni antigen čoveka 2a (engl. *human neutrophil antigen-2a*), CD177
- HOXA10 – transkripcioni faktor, vezuje se za specifičnu sekvencu DNK  
(engl. *Homeobox A10*)
- hPGH – hormon rasta posteljice čoveka (engl. *human placental growth hormone*)
- hPL – laktogen posteljice čoveka (engl. *human placental lactogen*)
- HRE – sekvenca DNK za koju se vezuje steroidni receptor  
(engl. *hormone responsive element*)
- HSF-1 – faktor toplotnog šoka-1 (engl. *heat-shock factor-1*)
- HSPG – heparin-sulfat proteoglikan, vezuje HB-EGF (engl. *heparin-sulfat proteogican*)
- HVCN1 – voltažno zavisni jonski kanal za protone (engl. *hydrogen voltage gated channel 1*)
- Hyal 5 – hijaluroglukozaminodaza 5 (engl. *hyaluron glucosaminidase 5*)
- I-SMAD – inhibitorni SMAD proteini, koče signalizaciju aktiviranu članovima familije TGFβ
- ICER – transkripcioni regulator, kompetituje za CRE (engl. *inducible cAMP early repressor*)
- ICPP – prerani pubertet (engl. *idiopatic central precocious puberty*)
- ICSI – ubacivanje spermatozoida direktno u jajnu ćeliju  
(engl. *intracytoplasmic sperm injection*)
- IDO – enzim indolamin 2,3-dioksigenaza
- Ifitm1* – gen čiji je produkt IFITM1 važan za prelaz PGC iz mezoderma u endoderm žumančane kese (engl. *interferon-induced transmembrane protein 1*)
- Ifitm3* – gen koji se eksprimira u migratornim PGC i reguliše migraciju, poznat i kao *Fragilis*
- IFN-γ – interferon gama
- IGFs – faktori rasta slični insulinu (engl. *insulin-like growth factors*)

- IGF-1R – receptor za IGF-1 (engl. *insulin-like growth factor 1 receptor*)
- IGFBPs – IGF vezujući proteini (engl. *IGF-binding proteins*)
- IGFs – insulinu slični faktori rasta, IGF-1, IGF-2 (engl. *insulin-like growth factors*)
- ILs – interleukini, vrsta citokina, označavaju se arapskim brojevima (IL-12, IL-10, IL-8...)
- ILCs – urođene limfoidne ćelije (engl. *innate lymphoid cells*)
- IMPDH – inozin-5-monofosfat dehidrogenaza (engl. *inosine-5'-monophosphate (IMP) dehydrogenase*)
- iNKT – klasične (invarijantne) NKT ćelije, NKT ćelije tip I
- IP<sub>3</sub> – inozitol-trifosfat (engl. *inositol trisphosphate*)
- iPLA2 – inducibilna PLA2 (engl. *inducible phospholipase A2*)
- IRS1 – supstrat za insulinski receptor (engl. *insulin receptor substrate*)
- IVF – *in vitro* fertilizacija
- IZUMO1 – protein u membrani spermatozoida (engl. *izumo sperm-egg fusion 1*)
- JAK – kinaza Janus (engl. *just another kinase, janus kinase*)
- Jak2/Stat5 – signalni put
- JNK – Jun N-terminalna kinaza (engl. *Jun N-terminal kinase*)
- JUNO – receptor za IZUMO 1, pripada GPI-usidrenim proteinima
- KAL 1 (ANOS 1) – gen koji nosi informaciju za protein anosmin-1
- K<sub>ATP</sub> – K<sup>+</sup>-kanal K<sub>ir</sub> koji ima domen za vezivanje ATP što vodi zatvaranju pore kanala
- KDM1 – lizin-(K)specifična histon demetilaza, epigenetski represor transkripcije (engl. *lysine-specific protein demethylase 1*)
- KGF – faktor rasta keratinocita (engl. *keratonocyte growth factor*)
- K<sub>ir</sub> – K<sup>+</sup>-kanali, obrnuti ispravljajući (engl. *inward rectifier*)
- KISS1 – gen za kisseptin
- KISS1R – receptor za kisseptin, označava se i kao GPR54
- KIT-ligand – poznat kao faktor matičnih ćelija (engl. *stem cell factor, SCF*)
- KVB – kardiovaskularne bolesti
- L- Ca<sup>2+</sup>-kanali – voltažno-zavisni Ca<sup>2+</sup>-kanali dugotrajno otvoreni (engl. *long lasting*)
- L-NAME – inhibitor NO-sintaze
- LDL – lipoproteini male gustine (engl. *low-density lipoproteins*)
- LH – luteinizirajući hormon, (engl. *luteinizing hormone*)

- LHFPL2 – engl. *lipoma HMGIC fusion partner-like 2*
- LHR – receptor za LH (eng. *luteinizing hormone receptor*)
- LHRH – luteinizirajući hormon-oslobađajući hormon
- Lhx1* – gen koji kodira transkripcioni faktor LHX1 (eng. *lim homeobox protein 1*)
- Lhx9* – gen koji kodira transkripcioni faktor LHX9 (eng. *lim homeobox protein 9*)
- LIF– leukemija inhibišući faktor
- LIPA – kisela lipaza (eng. *acid lipase A*)
- LIPE – lipaza stimulirana hormonom (eng. *hormone-stimulated lipase*)
- LPA – lizofosfatidna kiselina (eng. *lysophosphatidic acid*)
- LPS – lipopolisaharid (eng. *lipopolysaccharide*)
- LRH-1 – transkripcioni faktor (eng. *liver receptor homolog-1*)
- LRRs – region bogat leucinom (eng. *leucine-rich repeats*)
- LTs – leukotrieni
- LXH8 – transkripcioni faktor (eng. *LIM homeobox 8*)
- MAPKp38 – mitogenim stimulusima aktivirana kinaza p38  
(eng. *mitogen activated protein kinase 38*)
- MATER – protein poreklom iz oocite, produkt *maternal effect genes*  
(eng. *the maternal antigen that embryo required* ili *NACHT leucine-rich repeat and PYD containinig 5, NLRP5*)
- MBC – memorijski B limfociti (eng. *memory B cells*)
- Meioc* – gen za protein MEIOC, stabilizuje RNK transkripte za proteine koji učestvuju u mejozi (eng. *meiosis specific with coiled-coil domain protein*)
- MKRN3 – protein sa aktivnošću E3-ubikvitin ligaze  
(eng. *makorin RING finger protein 3*)
- MMPs – matriks metaloproteaze, označavaju se arapskim brojevima
- MPF – faktor koji potpomaže sazrevanje (eng. *maturation-promoting factor*)
- mTOR – serin treonin kinaza, protein sisara koji vezuje rapamicin  
(eng. *mammalian target of rapamicin*)
- MUC1 – glikoprotein mucin 1
- MYT1 – kinaza koja inhibiše CDK1
- NANOG – transkripcioni faktor, marker pluripotentnosti matičnih ćelija i PGC
- NANOS3 – post-transkripcioni regulator (eng. *nanos C2HC-type zinc finger 3*)

- NBC – kotransporter koji prenosi  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{Na}^+$   
(engl. *sodium bicarbonate cotransporter*)
- NCEH1 – neutralna holesterol-estar hidrolaza (engl. *neutral cholesterol ester hydrolase*)
- NET – neutrofilne vanćelijske zamke (engl. *neutrophil extracellular traps*)
- NF $\kappa$ B – nuklearni faktor kapa B
- NHE – elektroneutralni izmjenjivač koji izbacuje  $\text{H}^+$ , a ubacuje  $\text{Na}^+$  (engl. *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*)
- NK ćelije – ćelije prirodne ubice (eng. *natural killer cells*)
- NKB – neurokinin B
- NKp46 (CD335) – aktivacioni receptor NK ćelija
- NKR – receptor za NKB
- NKT ćelije – T ćelije prirodne ubice (engl. *natural killer T cells*)
- NMDA – N-metil-D-aspartat, receptor za glutamat (engl. *N-methyl-D-aspartate receptor*)
- NO – azot-monoksid
- NOBOX – protein koji se najviše eksprimira u jajnoj ćeliji, važan za folikulogenezu i regulaciju specifičnih gena u jajnoj ćeliji  
(engl. *newborn ovary homeobox; NOBOX oogenesis homeobox*)
- NOS – NO-sintaza
- NPC – NPC transporter unutarćelijskog holesterola, NPC1, NPC2  
(engl. *NPC intracellular cholesterol transporter*)
- NPM2 – produkt *maternal effect genes* (engl. *nucleoplasmin 2*)
- NPPC (CNP) – natriuretčki peptid tipa C (engl. *C-type natriuretic peptide*)
- NPR2 – receptor za NPPC (engl. *natriuretic peptide receptor 2*)
- NPY – neuropeptid Y
- Nr5a1 – gen koji kodira steroidogeni faktor 1 (SF1) / nuklearni receptor subfamije 5, grupe A, član 1 (engl. *nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*), često se koristi nezvanična oznaka za gen, *Sf-1*
- NRG – neuroregulin (engl. *neuroregulin*)
- NSAIDs – nesteroidni antiinflamatorni lekovi (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)
- NUR77, NURR1 – transkripcioni faktori, nuklearni orfanski receptori
- OOET (ili FLOPED) – protein poreklom iz oocyte, produkt *maternal effect genes*  
(engl. *oocyte-expressed protein*)
- OPN – osteopontin
- P-Tyr – tirozin sa ostatkom fosforne kiseline

- p21<sup>cip1</sup> i p27<sup>kip</sup> – inhibitori CDKs
- P450c26 – 26-holesterol hidroksilaza
- PACAP – polipeptid koji aktivira adenilil ciklazu  
(engl. *pituitary adenylyl-cyclase-activating peptide*)
- PAPP-A – plazma protein A trudnoće, metaloproteaza  
(engl. *pregnancy-associated plasma protein A*)
- PAX2 – transkripcioni faktor (engl. *paired box family, member 2*)
- PcG – kompleks proteina (engl. *polycomb*)
- PCOS – sindrom policističnih jajnika (engl. *polycystic ovary syndrome*)
- PDE – fosfodiesteraza (engl. *phosphodiesterase*)
- PDGF – faktor rasta poreklom iz trombocita (engl. *platelet derived growth factor*)
- PDK1 – fosfoinozitud zavisna kinaza 1 (engl. *3-phosphoinositide-dependent kinase-1*)
- PG – prostaglandini
- PGC – primordijalne germinativne ćelije (engl. *primordial germinative cells*)
- PGDH – prostaglandin dehidrogenaza
- PGE<sub>2</sub> – prostaglandin E<sub>2</sub>
- PGF<sub>2α</sub> – prostaglandin F<sub>2α</sub>
- PGI<sub>2</sub> – prostaglandin I<sub>2</sub>, prostaciklin
- PGRMC – progesteronski receptor asociran za membranu, PGRMC1, PGRMC2  
(engl. *progesterone receptor membrane component*)
- PHI-27 – peptid histidin izoleucin
- PHM-27 – peptid histidin metionin
- PI3K – fosfatidilinozitol-3 kinaza (engl. *phosphatidylinositol-3-kinase*)
- PIGF – faktor rasta posteljice (engl. *placental growth factor*)
- PIP<sub>2</sub> – fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat (engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)
- PIP<sub>3</sub> – fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (engl. *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*)
- PITX1 – engl. *paired like homeodomain 1*
- PKA – protein kinaza A
- PKB – protein kinaza B, poznata i kao AKT
- PKC – protein kinaza C
- PLC – fosfolipaza C (engl. *phospholipase C*)
- PLC ζ – PLC zeta

- Plx1 – kinaza (engl. *polo-like kinase*)
- PMSG – gonadotropin iz seruma ždrebne kobile  
(engl. *pregnant mare serum gonadotropin*)
- POA – preoptički region (engl. *preoptic area*)
- POI – primarna insuficijencija jajnika (engl. *premature ovarian insufficiency*),  
ili POF – prerano zatajenje jajnika (engl. *premature ovarian failure*)
- POMC – proopiomelanokortin (engl. *proopiomelanocortin*)
- POU1F1 – transkripcioni faktor (engl. *POU class 1 homeobox 1*)
- Pou5f1* – gen koji kodira transkripcioni faktor POU5F1, marker pluripotentnosti  
(engl. *POU class 5 homeobox 1*, ranije poznat kao *Oct4*)
- PPAR $\delta$  – nuklearni receptor koji se aktivira proliferatorom peroksizoma delta  
(engl. *peroxisome proliferator-activated receptors delta*)
- PR – progesteronski receptor, PR-B i PR-A
- PRDM – transkripcioni faktori, članovi familije označavaju se arapskim brojevima  
(engl. *PR/SET domain family*)
- Prdm1* – gen koji kodira transkripcioni represor PRDM1  
(engl. *PR/SET domain 1*, poznat i kao *Blimp1*).
- Prdm14* – gen koji kodira transkripcioni faktor PRDM14 (engl. *PR/SET domain 14*)
- PRL – prolaktin
- PRLR – receptor za PRL (engl. *prolactin receptor*)
- PROP1 – transkripcioni faktor (engl. *PROP paired-like homeobox 1*)
- PSA – antigen specifičan za prostatu (engl. *prostate-specific antigen*)
- PTEN – fosfataza koja defosforiliše PIP<sub>3</sub>  
(engl. *tensin homologue deleted on chromosome 10*)
- PTGD2 – prostaglandin D2 sintaza (engl. *prostaglandin D2 synthase*)
- PTGER1– 4 – receptori za prostaglandin E<sub>2</sub>
- PTGFR – receptor za prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>
- PTGIR – receptor za prostaciklin PGI<sub>2</sub>
- PTGS – prostaglandin endoperoksidaza sintaza, tj. ciklooksigenaza,  
endoperoksidaza H sintaza
- PTX3 – pentraksin (engl. *pentraxin 3*)
- RAB – (eng. *Ras-associated binding protein*)
- Rac1, Cdc42 – Rac 1 i Cdc42 – članovi Rho familije GTP-aza

- RANKL – membranski protein tip II pripada superfamiliji TNF  
(engl. *receptor activator of nuclear factor kappa beta*)
- Ras – GTP-aza koju aktivira Src
- RFRPs – RFamid slični peptidi, RF je oznaka za aminokiseline arginin i fenilalanin  
(engl. *RFamid related peptides*)
- RIP140 (NRIP140) – nuklearni receptor koregulator (aktivator/represor)
- RK – retinoična kiselina
- ROS – reaktivne kiseonične vrste (engl. *reactive oxygen species*)
- RSK-2 – serin/treonin protein kinaza koja se nalazi nizvodno od ERK1/2
- Rspo* – geni koji kodiraju familiju sekretiranih glikoproteina, agonista signalnog puta WNT/ $\beta$ -katenin (engl. *root-plate specific spondin*)
- SA – sijalinska kiselina (engl. *sialic acid*)
- SC5b9 – rastvorljivi kompleks komplemenata (engl. *soluble terminal complement complex*)
- sCD23 – marker prelaska naivnih u memorijske B limfocite
- SF-1 – steroidogeni faktor 1 (engl. *steroidogenic factor 1*)
- SHBG – globulini koji vezuju polne hormone (engl. *sex hormone-binding globulin*)
- SHH* – gen koji kodira sekretorne proteine iz familije Hedgehog  
(engl. *Sonic hedgehog*), SHH je značajan za razvoj spoljašnjih genitalija
- DAX-1 – orfanski nuklearni receptor (engl. *dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on X chromosome*)
- SIP – sfingozin-1-fosfat (engl. *sphingosine-1-phosphate*)
- SK<sub>Ca</sub> – Ca<sup>2+</sup>-zavisni K<sup>+</sup>-kanal sa malom propustljivošću  
(engl. *small conductance calcium- dependent potassium channels*)
- Slc38a3* – gen koji kodira nosač neutralnih kiselina zavisan od natrijuma, SLC38A3  
(engl. *solute carrier family 38 member3*)
- SMAD – familija transkripcionih faktora koji učestvuju u signalnom putu TGF- $\beta$ , pojedini članovi se označavaju arapskim brojevima  
(engl. *mothers against decapentaplegic homolog*)
- SOAT1 – sterol O-acetiltransferaza 1
- SOF1 – protein neophodan za fuziju 1 (engl. *sperm-oocyte fusion-required 1*)
- SOHLH1 – engl. *spermatogenesis- and oogenesis- specific basic helix-loop-helix 1*
- SOX – porodica transkripcionih faktora koji regulišu embrionalni razvoj i diferencijaciju različitih tkiva (engl. *Sry-related high mobility group box*)

- SOX-17 – transkripcioni faktor, marker pluripotentnosti humanih PGC
- SOX-2 – transkripcioni faktor, marker pluripotentnosti matičnih ćelija i mišijih PGC
- SOX10 – transkripcioni faktor, prilikom razvoja testisa utiče na održavanje visokog nivoa SOX9
- SOX8 – transkripcioni faktor, prilikom razvoja testisa utiče na održavanje visokog nivoa SOX9
- SOX9 – gen koji kodira transkripcioni faktor važan za normalan razvoj testisa
- SP1 i SP2 – transkripcioni proteini (engl. *specifity proteins*)
- SPACA6 – protein 6 povezan sa akrozomom spermatozoida (engl. *sperm acrosome-associated protein 6*)
- Spam 1 – enzim hijaluronidaza (engl. *sperm adhesion molecule 1*) i
- sPLA2 – sekretna PLA2 (engl. *secretory phospholipase A2*)
- SR-B1 – membranski protein koji preuzima HDL (engl. *scavenger receptor type B, class 1*)
- Src – familija proteinskih tirozin kinaza
- SRD5A – steroid 5 $\alpha$ -reduktaze
- SREBP – transkripcioni faktori koji se vezuju za sterol regulatornu sekvencu DNK (engl. *sterol regulatory element binding proteins*)
- SRY – gen važan za formiranje testisa (engl. *sex-determining region Y*)
- DHT – dihidrotestosteron
- STAR – steroidogeni akutni regulatorni protein
- STAT – transkripcioni faktori, aktivira ih tirozin kinaza JAK, STAT se označavaju arapskim brojevima, signalni put JAK/STAT (engl. *signal transducer and activator of transcription*)
- STRA8 – protein specifičan za germinativne ćelije, neophodan za otpočinjanje procesa mejoze (engl. *stimulated by retinoic acid 8*)
- SU – N-acetilgalaktozamin-sulfat (engl. *N-acetylgalactosamine sulfat*)
- SULT – sulfotransferaze
- T-Ca<sup>2+</sup>-kanali – voltažno-zavisni Ca<sup>2+</sup>-kanali kratkotrajno otvoreni (engl. *transient*)
- TAC3 – gen koji kodira NKB
- TACE – alfa-konvertujući enzim nekroze tumora, (engl. *tumor necrosis factor – alpha converting enzyme*)
- TACR3 – gen koji kodira receptor za NKB
- TCR – T ćelijski receptor



- Tfap2c* – gen koji kodira transkripcijski faktor AP-2 gama, TFAP2C, pripada AP-2 porodici
- TGF- $\beta$  – transformirajući faktor rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)
- TGF $\alpha$  – transformirajući faktor rasta alfa (engl. *transforming growth factor alpha*)
- Tiar1* – gen uključen u proliferaciju PGC (engl. *T-cell intracellular antigen 1 (TIA1)-related*)
- TIDA – tuberoinfundibularni dopaminski (engl. *tuberoinfundibular dopamine*)
- Tie-2 – receptor za angiopoetin
- TIMPs – endogeni inhibitori metaloproteaza (engl. *tissue inhibitors of metalloproteases*)
- TMEM95 – transmembranski protein 95 (engl. *transmembrane protein 95*)
- TNF- $\alpha$  – faktor nekroze tumora alfa (engl. *tumour necrosis factor alpha*)
- TNFAIP6 – faktor nekroze tumora inducibilni gen 6 (engl. *tumor necrosis factor-inducible gene 6*), poznat i kao TSG-6
- TRH – tireotropni-oslobađajući hormon (engl. *thyrotropin-releasing hormone*)
- TRL – receptor za molekularni obrazac; receptor sličan Toll-u (engl. *toll-like receptors*)
- TRPC – klasični TRP neselektivni katjonski kanali (engl. *transient receptor potential, C-conventional*)
- TSC1, TSC2 – formiraju heterodimer, negativni regulator mTORC1 (engl. *tuberous sclerosis*)
- TSH – tireostimulirajući hormon
- TSPO – protein translokator (engl. *translocator protein*)
- TTX – tetradotoksin
- TXs – tromboksani (engl. *thromboxanes*)
- UGT – UDP-glukuronosulfotransferaza
- VDAC 1 – voltažno-zavisni anjonski kanal 1 (engl. *voltage-dependent anion channel 1*)
- VEGF – faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*)
- VIP – vazoaktivni intestinalni peptid
- WEE1 – nuklearna serin/treonin kinaza
- WNT – sekretujućih proteina uključeni u rast i razviće (engl. *wingless type MMTV integration site family*)
- WNT3 – sekretujućih proteina uključeni u specifikaciju primordijalnih germinativnih ćelija, (engl. *Wnt family member 3*)
- WNT4 – sekretujućih proteina uključeni u regulaciju razvoja jajnika i Milerovih kanala (engl. *WNT family, member 4*)

WNT5a – sekretujući protein značajan za razvoj muških i ženskih spoljašnjih genitalija

WNT7a – sekretujući protein uključen u regulaciju razvoja Milerovih kanala

*Wt1* – produkt ovog gena *WT1* ima ulogu u diferencijaciji i formiranju genitalnih grebena i gonada (engl. *Wilms tumor suppressor gene*)

YBX2 – DNK/RNK vezujući protein (engl. *Y-box binding protein 2*)

ZAG1 – produkt *maternal effect genes* (engl. *zygote arrest 1*)

ZP – zona pelucida

$\beta$ -EP –  $\beta$ -endorfin (engl.  *$\beta$ -endorphin*)

$\beta$ -LPH –  $\beta$ -lipotropin



