

# Uloga proliferacije i apoptoze u razvoju humanih gonada

---

**Vukušić Pušić, Tanja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2013**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:534149>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-03**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Tanja Vukušić Pušić, dr. med.**

**Uloga proliferacije i apoptoze u razvoju humanih gonada**

**Doktorska disertacija**

**Mentorica:**

**Doc. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med.**

**Split, 10. svibnja 2013.**

**Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju**

**Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

**Voditeljica rada: doc. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med.**

## **ZAHVALA**

*Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojim najmilijima Andrei, Anti, Nediljku i Svjetlani koji su mi stalni poticaj i podrška u svim područjima mog života.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj dragoj mentorici doc. dr. sc. Katarini Vukojević zbog ukazanog povjerenja i izvrsnog vodstva tijekom izrade doktorske disertacije. Hvala Vam na dobroti, iskrenosti, bezgraničnom strpljenju, stalnoj dostupnosti, korisnim savjetima, ohrabrenjima i podršci u svim segmentima rada. Naučili ste me znanstveno razmišljati, postavljati prava pitanja, samostalno osmišljavati i izvoditi pokuse, prezentirati i publicirati rezultate.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Mirni Saraga-Babić na mogućnosti izrade doktorske disertacije, podršci i motivaciji.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Vjekoslavu Krželju na ukazanoj podršci i povjerenju.*

*Zahvaljujem gđi. Asji Miletić na stručnoj tehničkoj pomoći pri izradi histoloških preparata te svim djelatnicima Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.*

*Zahvaljujem prof. Mariti Mimica na korisnim savjetima i ljubaznosti.*

## SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Embrionalni razvoj humanih gonada.....	1
1.1.1.	Indiferentna gonada.....	1
1.1.2.	Diferencijacija gonada.....	3
1.2.	Poremećaj razvoja gonada.....	7
1.3.	Razvojni čimbenici.....	7
1.3.1.	Proliferacijski čimbenici.....	8
1.3.2.	Proapoptotski i antiapoptotski čimbenici.....	9
1.3.2.1.	Apoptoza.....	9
1.3.2.2.	Uloga p53 u razvoju spolnih žlijezda.....	12
1.3.2.3.	Uloga kaspaze-3 u razvoju spolnih žlijezda.....	13
1.3.2.4.	Uloga AIF-a u razvoju spolnih žlijezda.....	14
1.3.2.5.	Uloga bel-2 i bax-a u razvoju spolnih žlijezda.....	15
1.3.2.6.	Uloga intermedijarnih filamenata citokeratina i vimentina u razvoju spolnih žlijezda .....	16
1.4.	Problematika istraživanja.....	18
<b>2.</b>	<b>CILJEVI RADA I HIPOTEZE .....</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>METODE I MATERIJALI .....</b>	<b>22</b>
3.1.	Sakupljanje tkiva i određivanje starosti zametaka.....	22
3.2.	Postupci sa zametcima, uklapanje tkiva u parafin i rezanje.....	23
3.3.	Imunohistokemijsko bojenje rezova.....	23
3.3.1.	Bojenje diaminobenzidinom (DAB-om).....	25
3.3.2.	Imunofluorescencija.....	25

3.4.	Statistička analiza i kvantifikacija Ki-67, p53, kaspaza-3, AIF, bax, bcl-2, citokeratin 8 i vimentin čimbenika.....	26
3.5.	Etička načela.....	28
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
4.1.	Glavne morfološke značajke ranog razvoja spolnih žlijezda.....	29
4.2.	Imunohistokemijsko i imunofluorescentno bojenje.....	31
4.2.1.	Bojenje s biljekom Ki-67 i određivanje broja pozitivnih stanica.....	32
4.2.2.	Bojenje s biljekom p53 i određivanje broja pozitivnih stanica.....	35
4.2.3.	Bojenje s biljekom na aktivnu kaspazu-3, kolokalizacija s AIF bjelančevinom i određivanje broja pozitivnih stanica.....	39
4.2.4.	Bojenje s bax biljekom i određivanje broja pozitivnih stanica.....	46
4.2.5.	Bojenje s bcl-2, kolokalizacija s bax-om i određivanje broja bcl-2 pozitivnih stanica.....	49
4.2.6.	Bojenje s citokeratin 8 biljekom i određivanje broja pozitivnih stanica.....	53
4.2.7.	Bojenje s vimentinom, kolokalizacija s citokeratinom 8 i određivanje broja vimentin pozitivnih stanica.....	57
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>63</b>
5.1.	Dinamika procesa proliferacije i staničnog preživljenja u razvoju gonade.....	63
5.2.	Značaj intermedijarnih filamenata citokeratina 8 i vimentina u razvoju gonade.....	67
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK.....</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>76</b>
<b>9.</b>	<b>POPIS LITERATURE.....</b>	<b>77</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>90</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

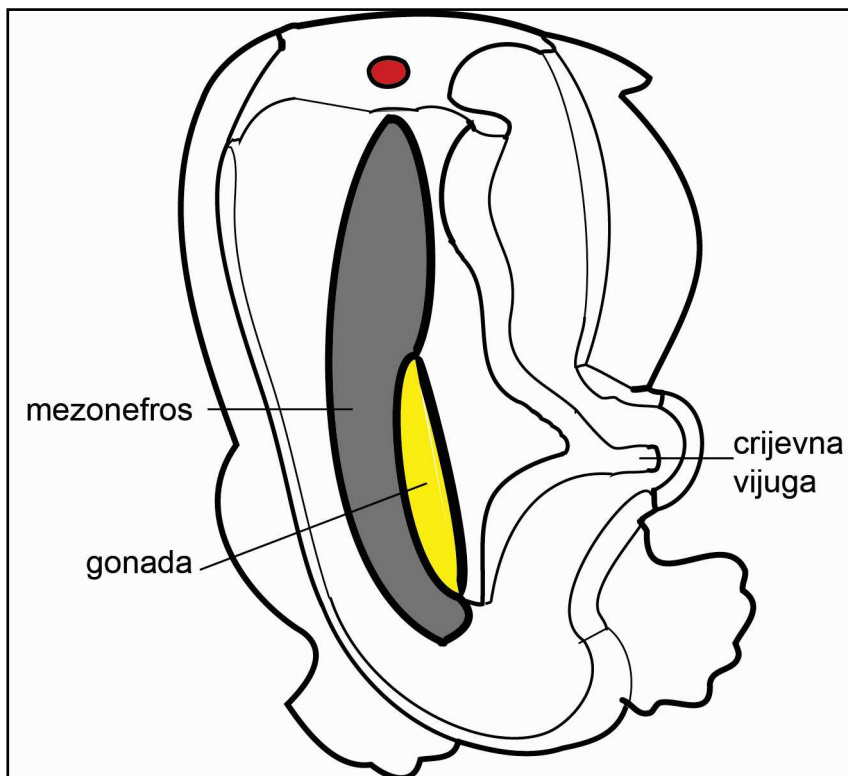
<b>AIF</b>	čimbenik indukcije apoptoze ( <i>eng.</i> Apoptosis Inducing Factor)
<b>AMH</b>	anti-Müllerov hormon ( <i>eng.</i> anti-Müllerian hormone)
<b>CRL</b>	duljina tjeme-zadak ( <i>eng.</i> crown-rump length)
<b>DAB</b>	diaminobenzidin
<b>DAPI</b>	4,6-diamino-2-fenilindol
<b>DNK</b>	deoksiribonukleinska kiselina
<b>FITC</b>	fluorescein izotiocijanat ( <i>eng.</i> fluorescein isothiocyanate)
<b>FGF</b>	fibroblastni čimbenik rasta ( <i>eng.</i> Fibroblast Growth Factor)
<b>IF</b>	intermedijarni filamenti ( <i>eng.</i> Intermediate Filaments)
<b>PDGF</b>	trombocitni čimbenik rasta ( <i>eng.</i> Platelet-Derived Growth Factor)
<b>PBS</b>	pufirirana fiziološka otopina ( <i>eng.</i> Phosphate Buffer Saline)
<b>SRY</b>	područje određivanja spola ( <i>eng.</i> sex-determining region on Y)
<b>TDF</b>	čimbenik određivanja testisa ( <i>eng.</i> testis-determining factor)
<b>TGF</b>	transformirajući čimbenik rasta ( <i>eng.</i> Transforming Growth Factor)
<b>TR</b>	Texas crvena ( <i>eng.</i> Texas Red)
<b>TRAIL</b>	poticajni ligand za transformirajući čimbenik rasta povezan s apoptozom ( <i>eng.</i> Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand)
<b>TUNEL</b>	( <i>eng.</i> Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling, deoksinukleotidil-tranferaza – TdT)
<b>WNT4</b>	WNT4 molekula ( <i>eng.</i> Wingless type MMTV4),
<b>WT1</b>	Wilmsov tumor supresor gen ( <i>eng.</i> Wilm's tumor supressor)

# 1. UVOD

## 1.1. Embrionalni razvoj humanih gonada

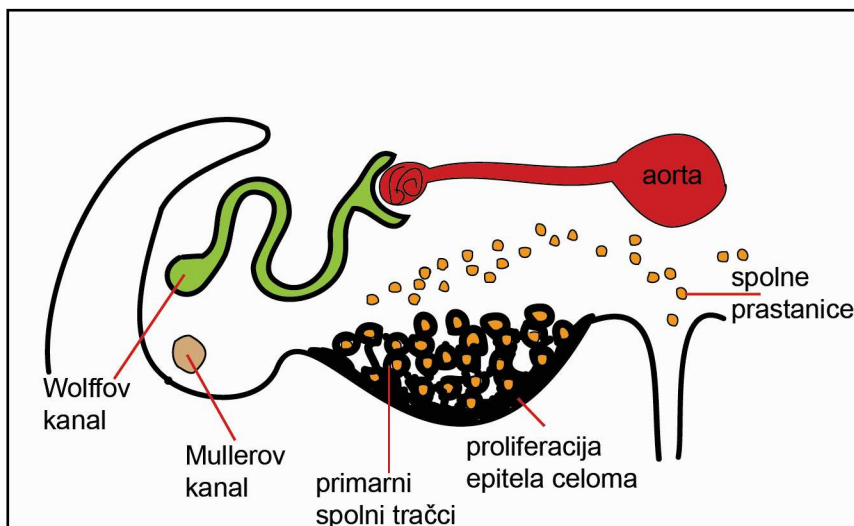
### 1.1.1. Indiferentna gonada

Razvoj gonada (spolnih žlijezda) u čovjeka započinje u trećem tjednu razvoja od bipotentne epitelno-mezenhimske osnove koja se diferencira u ovarije ili testise (1). U početku se gonade razvijaju kao par uzdužnih spolnih nabora (*lat. plicae genitales*) koji se oblikuju proliferacijom epitela celoma i zgušnjavanjem priležećeg rahlog mezenhima. Spolni nabori kao dijelovi urogenitalnih nabora smješteni su medijalno od mezonefrosa u medijalnom dijelu tog nabora (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz položaja gonade i mezonefrosa u urogenitalnom naboru zametka u trećem tjednu embrionalnog razvoja.

U spolnim naborima u ranom stadiju razvoja nema spolnih stanica sve do 6. tjedna razvoja. Spolne prastanice potječu od epiblasta i u početku su smještene u stijenci žumanjčane vreće između njenih endodermalnih stanica blizu polazišta alantoisa (1). Tijekom četvrtog tjedna razvoja spolne prastanice migriraju ameboidnim gibanjem kroz dorzalni mezenterij stražnjeg crijeva i stižu u spolne nabore početkom petog tjedna razvoja. Pretpostavlja se da je osnovna funkcija spolnih nabora u ovom razdoblju otpuštanje kemijskih glasnika koji privlače spolne prastanice. Posebno važnu ulogu u tome ima otpuštanje fibronektina. Fibronektin je od presudne važnosti za pravilno usmjeravanje spolnih prastanica i njihov prelazak duž dorzalnog mezenterija stražnjeg crijeva te, konačno, ulazak u spolni nabor u šestom tjednu razvoja (2). Neposredno prije i za vrijeme dolaska spolnih prastanica u spolni nabor, celomski epitel spolnog nabora proliferira i prodire u priležeći mezenhim te oblikuje prstolike epitelne tračke nazvane primarni spolni tračci u koje se useljavaju spolne prastanice (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz poprečnog presjeka kroz slabinski dio zametka u šestom tjednu razvoja. Vide se spolni tračci u osnovi gonade koji okružuju spolne prastanice.

I u muških i u ženskih zametaka u šestom tjednu razvoja primarni spolni tračci povezani su s celomskim epitelom koji ih okružuje te morfološki nije moguće razlikovati mušku i žensku gonadu. Stoga se gonada u ovom razdoblju naziva indiferentna gonada.

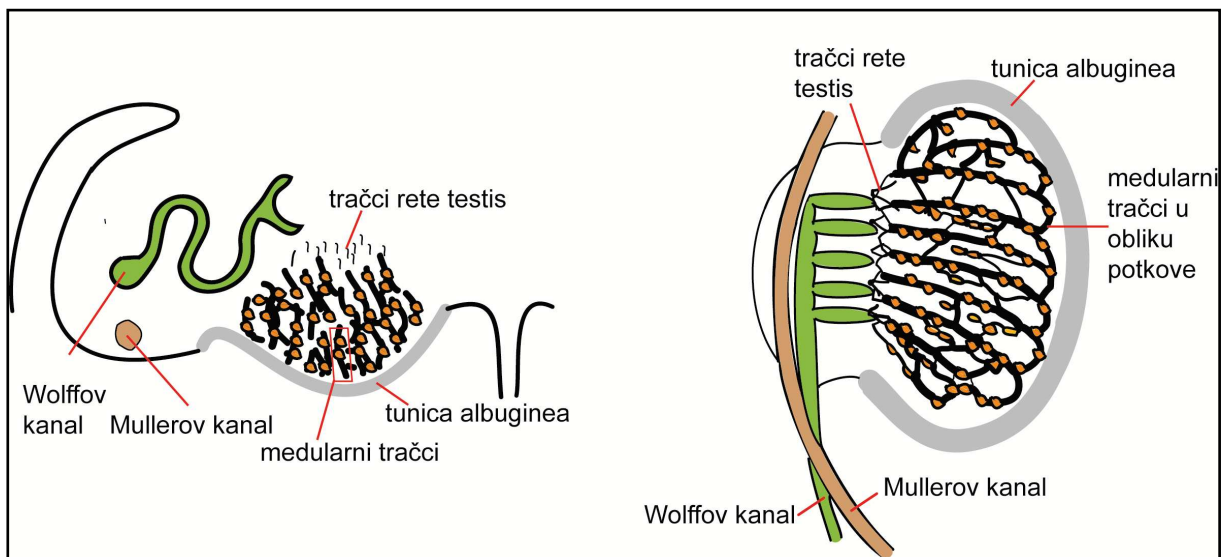
Spolne prastanice su velike zaobljene stanice koje sadrže različite organele, čestice glikogena i lipidne kapljice koje im služe kao rezerva energije tijekom migracije (3). Za vrijeme migracije u spolni nabor zametne se prastanice aktivno mitotski dijele, a brojni okolišni čimbenici utječu na njihov rast i opstanak (4). Smatra se kako spolne prastanice imaju



poticajan učinak na razvoj gonada prema ovarijima ili testisima (1). Ulaskom zametnih prastanica u spolni nabor gubi se njihova sposobnost kretanja, a dolazi i do promjena oblika i sposobnosti prijanjanja (4). Stanične su linije indiferentne gonade bipotentne te se mogu diferencirati u muške ili ženske spolne stanice.

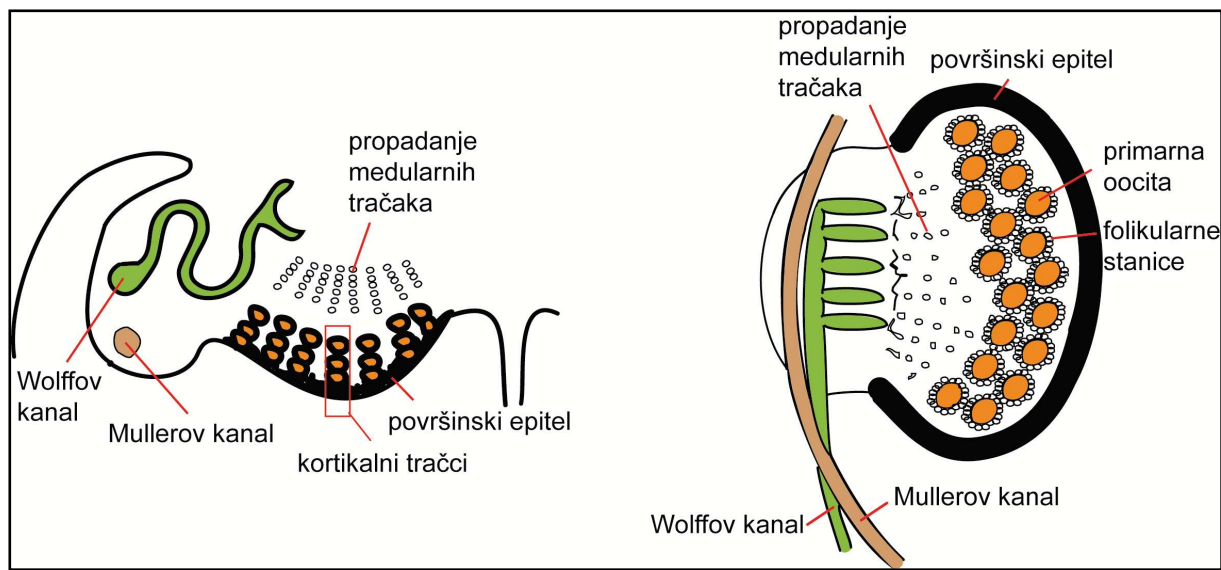
### 1.1.2. Diferencijacija gonada

Iako je spol zametka genetski određen u vrijeme oplodnje, muške i ženske gonade ne pokazuju morfološke razlike sve do kraja sedmog tjedna razvoja te se opisuju kao indiferentne gonade i predstavljaju rani stupanj razvoja spolnog sustava čovjeka (1). Tijekom osmog tjedna razvoja pojavljuju se prvi znakovi diferencijacije budućeg testisa, tj. inicijalna organizacija medularnih tračaka u muškog spola (Slika 3). Naime, pod utjecajem Y kromosoma primarni spolni tračci nastavljaju proliferirati odvajajući se od površinskog epitela te prožimaju mezenhim i oblikuju medularne tračke ili tračke testisa. U području hilusa muške gonade medularni tračci daju osnovu koju kasnije nazivamo *rete testis*. Ispod epitela gonade mezenhim se diferencira u gustu vezivnu ovojniju koju zovemo *tunica albuginea testis* (Slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz poprečnog presjeka kroz zametak u području testisa u osmom tjednu razvoja (lijevo). Vide se medularni tračci, rete testis i tunica albuginea. Na shemi desno prikaz je uzdužnog presjeka u području testisa u šesnaestom tjednu razvoja. Medularni tračci testisa potkovasto su zaobljeni i nastavljaju se u rete testis.

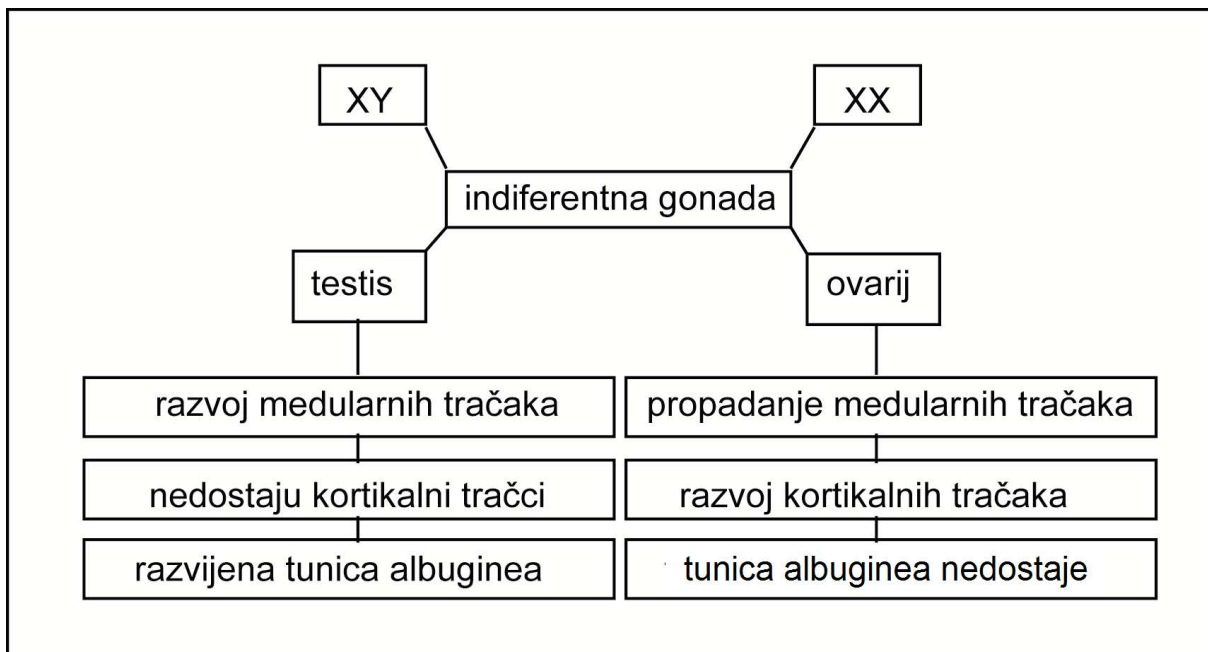
Početni znakovi diferencijacije muške gonade vidljivi su u osmom tjednu, dok budući jajnik duže zadrži svoju „indiferentnu“ morfologiju. U ženskoj se gonadi primarni spolni tračci razdvajaju i oblikuju nepravilne skupine stanica u budućoj stromi ovarija među kojima su i spolne prastanice (oogonije) (1). Epitel na površini ženske gonade, za razliku od muške gonade, u sedmom tjednu razvoja ulazi u novi val proliferacije, uzrokujući nastanak sekundarnih spolnih tračaka koje zovemo kortikalni spolni tračci (1, 2, 5-8) (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz poprečnog presjeka kroz zametak u području ovarija u osmom tjednu razvoja (lijevo). Vidi se propadanje medularnih tračaka i nastajanje kortikalnih tračaka. Shema desno prikaz je presjeka u području ovarija u dvadesetom tjednu razvoja. Kora jajnika sadržava skupine primarnih oocita okruženih folikularnim stanicama.

Kortikalni spolni tračci smješteni su u budućoj kori ovarija blizu njegove površine. U dvadesetom tjednu razvoja kortikalni tračci odjeljuju gnijezda stanica sačinjenih od primarnih oocita okruženih folikularnim stanicama (1).

U zametaka sa XX kromosomima medularni tračci nestaju i razvija se nova generacija kortikalnih tračaka. U zametaka sa XY kromosomima medularni tračci postaju rete testis, a kortikalni tračci se ne razvijaju (1) (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz utjecaja Y kromosoma na indiferentnu gonadu

Ključ spolnog dimorfizma je Y kromosom, odnosno područje određivanja spola SRY (*eng.* sex-determining region on Y) gen te njegov bjelančevinski produkt TDF (*eng.* testis-determining factor) koji potiče niz gena važnih za određivanje sudbine indiferentne gonade (1, 2). U prisustvu TDF-a razvija se muški spol, a u odsustvu se razvija ženski spol. On pokreće kaskadu molekularnih zbivanja, kao i morfološke i funkcionalne promjene koje vode formiranju testisa (1, 2). Kratko poslije inicijacije izražaja SRY značajno se poveća proliferacija u celoskim epitelnim stanicama XY gonade (9).

U miševa antagonistički efekti SRY/SOX9 - ovisnih FGF signalnih molekula i Wnt signalnih molekula vode spolno određivanje muškim ili ženskim razvojnim putem (10, 11). Brojni stanični i molekularni putevi uključeni su u određivanje spola kod sisavaca (6, 7). Nekoliko signalnih molekula kao FGF (fibroblastni čimbenik rasta), PDGF (trombocitni čimbenik rasta), WNT4 (*eng.* Wingless type MMTV4), TGF (transformirajući čimbenik rasta) (12); strukturne i regulatorne makromolekule (tip IV kolagen alfa 1-5, laminin alfa 5, beta 1 i beta 2, citokeratini 18 i 19, dezmin, vimentin, integrin alfa 6, AMH (*eng.* anti-Müllerian hormone), SOX-9 protein, pokazalo se da imaju presudnu ulogu u diferencijaciji gonada (5).

Dugo je prevladavalo mišljenje da u odsustvu testikularnih signala dolazi do razvoja ovarija pasivnim procesom. Međutim, brojni dokazi upućuju da je razvoj ovarija pažljivo reguliran proces koji uključuje kompleksne molekularne puteve i interakciju zametnih i pratećih

potpornih somatskih stanica, koji stimuliraju ovarijsku diferencijacijsku kaskadu i u određenom trenutku suzbijaju izražaj bjelančevina ključnih za razvoj testisa (5).

WNT4 signalni put ima središnju ulogu u upravljanju razvojem ovarija. Mutacije gena WNT4 puta uzrokuju ozbiljne poremećaje spolnog određivanja ovarija (13, 14). RSPO-1 (*eng.* R spondin homolog 1) regulira WNT4 i beta-kateninske signale (15). WNT4 se veže na svoj receptor na površini stanice što vodi do stabilizacije beta-katenina koji se nakuplja u citoplazmi i ulazi u jezgru stanice (16). Jezgrin beta-katenin je transkripcijski regulator WNT4 i njemu podređenih gena (17, 18). Beta-katenin sprječava djelovanje SRY pridruženog SOX 9 proteina (18).

Razvoj testisa nije ovisan o zametnim stanicama i pretežno je koordiniran somatskim Sertolijevim stanicama (19). U razvoju ovarija oocite imaju ključnu ulogu. Bez zametnih stanica neće biti formirane gonadalne strukture ni folikuli (20). Također, ukoliko dođe do gubitka oocita nakon formiranja folikula, nastaje brza degeneracija folikula (21, 22).

Diferencijacija gonada također uključuje promjenu mezenhima u epitel, promjene citoskeletnih komponenti te veza među stanicama kao i promjene u polarizaciji i sintezi bazalne membrane. Strukturne bjelančevine su iste za oba spola, ali pokazuju razlike u prostornom i vremenskom rasporedu (5).

Procesom diferencijacije zametnih stanica u miševa ženske zametne stanice ulaze u profazu prve mejotičke diobe, dok muške zametne stanice podliježu mitotičkom zaustavljanju u Go/G1 fazi (18). Pokazalo se da inhibicija mejoze u XX gonadama može biti potaknuta izlučenim čimbenicima molekularne mase veće od 10 kDa sadržanim u kondicioniranim kulturama podrijetlom iz fetalnih testisa (23).

Muške gonade u miša induciraju migraciju stanica mezonefrosa, a ženske ne. Ova je migracija bitna za normalni razvoj testisa te njeno onemogućavanje može inhibirati stvaranje testikularnih tračaka (24, 25). Većina ovih migrirajućih mezonefričkih stanica su vaskularne endotelne stanice koje su ključne za stvaranje testis specifičnih krvnih žila (24, 25).

## 1.2. Poremećaj razvoja gonada

Nepotpun ili oštećen razvoj spolnih žlijezda (*lat. dysgenesis*), obilježen je potpunim nedostatkom zametnih stanica te nadomještanjem funkcionalnog tkiva gonade fibroznim tkivom. U većini slučajeva udružen je s poremećajima spolnih kromosoma (broja, odnosno strukture). Najčešće je istraživani oblik gonadalne disgeneze kod Turnerovog sindroma (kariotip 45X). Udružen je s infertilitetom, a ovariji su uglavnom pretvoreni u tanke fibrozne tračke u kojima nedostaju zametne stanice (1).

Razvojne studije na 45X ljudskim fetusima pokazale su normalan broj zametnih stanica u spolnim naborima (uredan proces migracije i diferencijacije) uz izrazito smanjenje broja oocita sredinom gestacije, a kod rođenja nije (u većini slučajeva) bilo oocita unutar gonadalnih tračaka (26).

Modi i suradnici su unutar 45X gonade fetusa čovjeka TUNEL metodom dokazali da je nedostatak zametnih stanica posljedica povećanog gubitka uslijed ubrzane apoptoze (27). Semikvantitativnom analizom utvrđen je povećan broj apoptotskih zametnih stanica u aneuploidnim 45X gonadama ljudskih fetusa u odnosu na ovarije i testise iste razvojne dobi kod euploidnih fetusa čovjeka (27). Oblici gonadalne disgeneze s Y kromosomom odnosno dijelovima Y kromosoma imaju povećan rizik od nastanka tumora zametnih stanica (28).

## 1.3. Razvojni čimbenici

Dioba stanica, stanična smrt i diferencijacija imaju ključnu ulogu tijekom ranog razvoja ljudskog zametka i bitni su za održavanje cjelovitog ustroja organa i organskih sustava. Stanični ciklus podrazumijeva niz događaja koji rezultiraju udvostručenjem DNK i podjelom stanice (29), a sastoji se od nekoliko faza tijekom kojih stanica raste: faza sinteze DNK (S faza) i mitoze (M faza) te dviju međufaza G1 i G2. Zbivanja u staničnom ciklusu prostorno su i vremenski regulirana mehanizmima nadzornih točaka koje osiguravaju pravilno udvostručenje DNK i pravilan slijed S i M faze (30). Brojni geni (8), kao i uravnotežen vremensko-prostorni odnos između mnogih razvojnih čimbenika uključenih u procese proliferacije, rasta i apoptoze imaju presudan utjecaj na normalan rast i razvoj te opstanak svih staničnih linija unutar spolnih žlijezda tijekom razdoblja ranog razvoja humanih gonada (31). Fina ravnoteža između apoptoze i stanične proliferacije neophodna je za rast i razvoj reproduktivnih tkiva (32-34) te je pod utjecajem okolnih somatskih stanica.

Ravnoteža između antiapoptotskih i proapoptotskih čimbenika presudna je za regulaciju opstanka zametnih stanica i pratećih stanica u prenatalnom i postnatalnom periodu (31, 35). Različita patološka stanja poput razvojnih anomalija, smanjene plodnosti, prijevremenog iscrpljenja ovarija, autoimunih bolesti i karcinoma mogu nastati zbog poremećaja ove kompleksne regulatorne mreže (36).

### 1.3.1. Proliferacijski čimbenik

Među različitim razvojnim procesima uravnotežena proliferacija glavni je preduvjet za normalan rast i razvoj spolnih žlijezda (37). Proliferacija u tkivima vezana je uz izražaj Ki-67 bjelančevine. Identificirana je 1991. g. kao nehistska jezgrina bjelančevina, a nedugo zatim ista je skupina autora opisala odgovarajuće protutijelo u gradu Kielu (zbog toga oznaka Ki) poslije imunizacije miševa s linijom stanica Hodgkinovog limfoma L 428, a broj 67 se odnosio na broj klona na 96. pločici na kojoj je pronađen (38).

Ki-67 je jezgrina bjelančevina koja je prisutna u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa. Nije izražena u G0 fazi mirovanja ni tijekom popravljavanja DNK. Ovaj karakterističan obrazac izražaja čini Ki-67 bjelančevinu izvrsnim biljekom za određivanje proliferacijske aktivnosti u određenoj staničnoj populaciji, naročito u tumorima (39).

Mnoga istraživanja potvrdila su da je funkcija bjelančevine Ki-67 vezana uz replikaciju, staničnu diobu i pojačani rast (40).

Poluvrijeme života Ki-67 bjelančevine je od 60 do 90 minuta. Ki-67 gen lokaliziran je na dugom kraku desetog kromosoma (10q25) u čovjeka (41). Organiziran je u 15 eksona, a enkodira veliku jezgrinu bjelančevinu s dvije izoforme, čija biološka uloga još nije u potpunosti razjašnjena. Veća izoforma Ki-67 bjelančevine ima molekulsku težinu 359 kDa, a manja 320 kDa. Slijed od 22 aminokiseline nazvan Ki-67 motiv je u velikoj mjeri evolucijski očuvan među vrstama i uključuje epitop FKEL koji veže originalno Ki-67 antitijelo (42).

Imunohistokemijskim metodama utvrđeno je da prostorno-vremenski obrazac i intezitet izražaja Ki-67 bjelančevine ovisi o fazi staničnog ciklusa. Dokazana je nužnost Ki-67 bjelančevine za staničnu proliferaciju, kao i njezina uloga u RNK polimeraza I - ovisnoj sintezi nukleolarne rRNK (42).

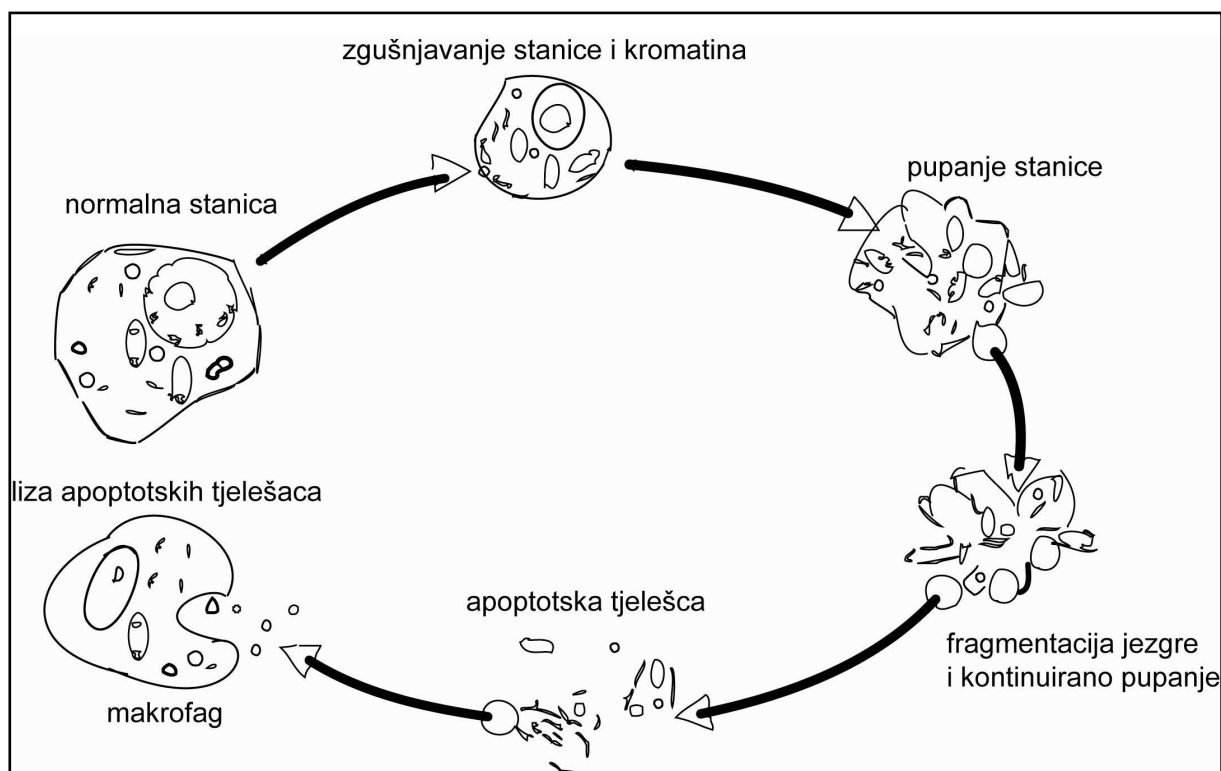
Za određivanje izražaja Ki-67 bjelančevine najčešće se u novijim istraživanjima koristi monoklonalno MIB 1 protutijelo. Do sad a je Ki-67 bjelančevina imunohistokemijski istraživana u tkivima pokusnih životinja te u dugotrajnim kulturama stanica.

Postoji samo jedna studija gdje je imunohistokemijskim postupcima istražen izražaj Ki-67 bjelančevine u ljudskim jajnicima počevši od šesnaestog tjedna razvoja do šestog dana postnatalno (37). Dokazano je da je izražaj Ki-67 bjelančevine bio veći tijekom ranijih razvojnih razdoblja jajnika i to uglavnom u oocitama kore. U drugom i trećem tromjesečju trudnoće njegova se aktivnost smanjivala u zametnim i nezametnim stanicama, a do poroda je gotovo nestala u oocitama (37). U fetalnim ovarijima miša pronađen je izražaj Ki-67 bjelančevine u mejozi oocita (43). Do sada ni jedna studija nije istražila izražaj proliferacijskog biljega Ki-67 u gonadama čovjeka tijekom indiferentnog razdoblja i razdoblja rane diferencijacije.

### 1.3.2. Proapoptotski i antiapoptotski čimbenici

#### 1.3.2.1. Apoptoza

Apoptoza (programirana stanična smrt) je energetski ovisan, evolucijski očuvan, striktno reguliran i visoko selektivan proces koji zahvaća pojedinačnu stanicu. Ima presudnu ulogu tijekom razvoja, obnove tkiva i očuvanja stanične homeostaze (44). Apoptozom se odstranjuju nepotrebne, oštećene i ostarjele stanice, bez inicijacije destruktivnog upalnog procesa (45). Morfološke oznake apoptoze uočljive svjetlosnim mikroskopom su smanjivanje stanice, zgušnjavanje citoplazme i kromatina, „pupanje“ stanične membrane (piknoza), pa se s površine stanice odvajaju djelići citoplazme i jezgre okruženi staničnom membranom, tzv. apoptotska tjelešca (46, 47) (Slika 6). Apoptotska tjelešca fagocitiraju makrofagi i razgrađuju unutar fagolizosoma.



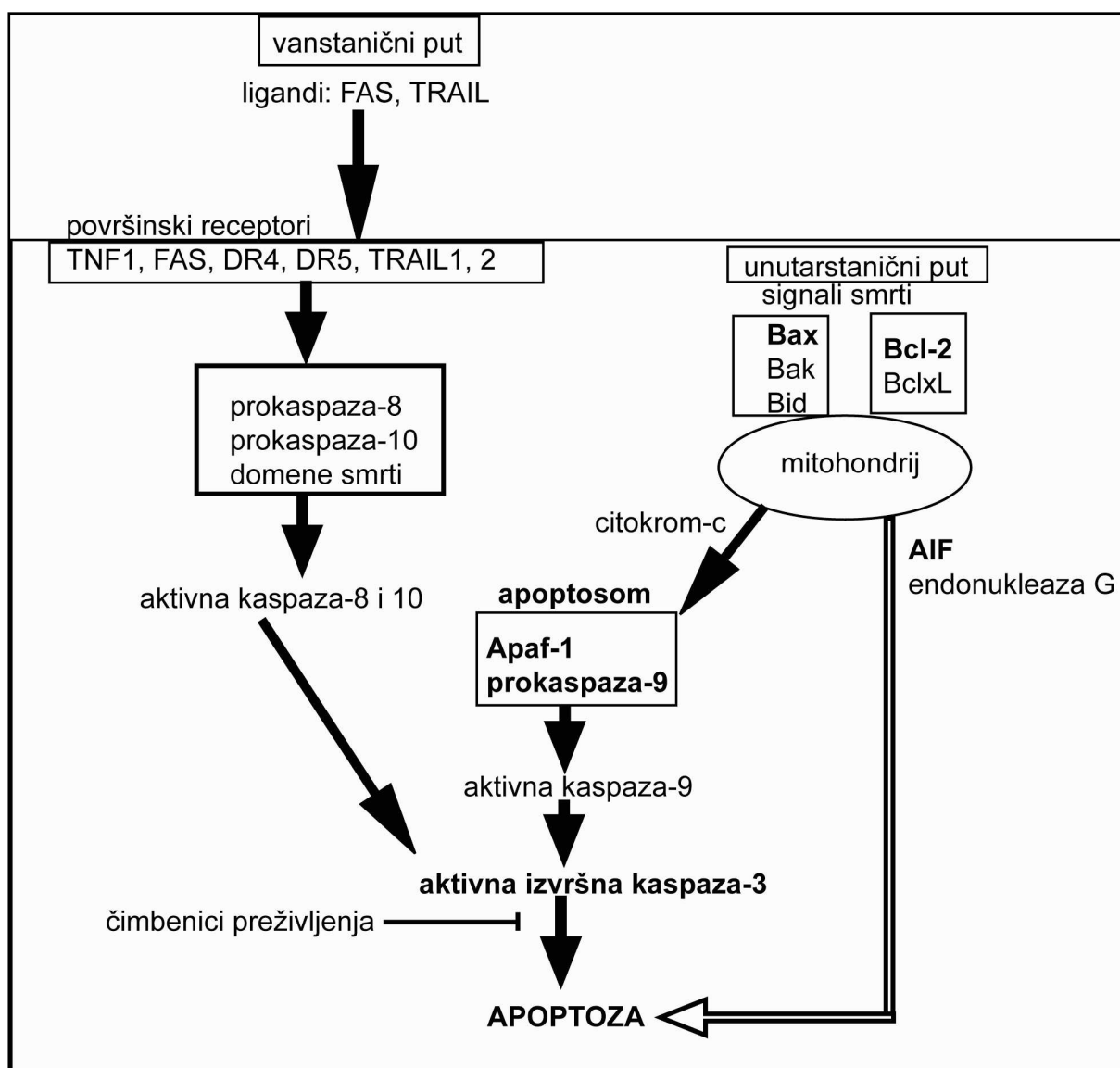
Slika 6. Shematski prikaz morfoloških promjena stanice u apoptozi.

Apoptoza ima važnu ulogu u fiziološkim i patološkim uvjetima i odvija se na kaspaza ovisan i kaspaza neovisan način (48). Kaspaza ovisan način stanične smrti posredovan je preko dva glavna apoptotska puta: vanstanični (receptorski) i unutarstanični (mitohondrijski) put, dok je kaspaza neovisan način stanične smrti dio unutarstaničnog apoptotskog puta (Slika 7). Samoubojstvo stanice može biti potaknuto različitim vanstaničnim ili unutarstaničnim zbivanjima. Vanstanični put apoptoze aktivira se vezanjem specifičnog liganda za receptor na staničnoj membrani, npr. Fas receptor, TNF1 receptor (*eng.* Tumor Necrosis Factor 1), receptor smrti DR4 i 5, TRAIL receptor 1 i 2 (*eng.* Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand) (49). Unutarstanični (mitohondrijski) apoptotski put može se aktivirati različitim nespecifičnim poticajima, npr. oksidativnim stresom, nedostatkom hormonske podrške, nedostatkom čimbenika rasta, hipoksijom, radijacijom, kemoterapeutskim agensima i oštećenjem DNK (50). Nakon apoptotskog signala u vanstaničnom putu apoptoze dalje se aktiviraju kaspaza-8 i kaspaza-10, te konačno izvršna kaspaza-3 (49). U unutarstaničnom putu apoptotski signali pod utjecajem p53 bjelančevine aktiviraju proapoptotske članove obitelji Bcl-2 bjelančevina što dovodi do oligomerizacije kompleksa Bax-Bak i posljedičnog otvaranja pora na membrani mitohondrija i otpuštanja citokroma c, AIF bjelančevine (*eng.* Apoptosis Inducing Factor) i endonukleaze G. Za razliku od citokroma c koji aktivira kaspaza ovisan put apoptoze (preko Apaf-1 te kaspaze-9 i u konačnici izvršne kaspaze-3), AIF i



endonukleaza G nastavljaju kaspaza neovisan apoptotski put, jer prelaskom u citoplazmu i kasnije u jezgru direktno dovode do zgušnjavanja kromatina i DNK fragmentacije (49).

Dakle, vanstanični i unutarstanični put apoptoze djeluju preko kaskadne aktivacije kaspaza pri čemu se ova dva puta mogu preklapati i voditi zajedničkom putu aktivacije izvršnih kaspaza s rezultirajućom apoptotskom smrću stanice (51, 52). Međutim, dio unutarstaničnog apoptotskog puta koji ide preko AIF bjelančevine i endonukleaze G dovodi do smrti stanice bez aktiviranja kaspaza te se ovaj put zove kaspaza neovisan put apoptoze (48, 53, 54).



Slika 7. Shematski prikaz dva apoptotska puta (unutarstanični i vanstanični) preko kaskadne aktivacije kaspaza (pune strelice) koji se mogu preklapati te voditi zajedničkom putu aktivacije izvršnih kaspaza s rezultirajućom apoptotskom smrću stanice. Dio unutarstaničnog

puta koji je posredovan AIF bjelančevinom i endonukleazom G (prazna strelica) je kaspaza neovisan način apoptoze. Vanstanični put: apoptotski signal induciran je specifičnim vezanjem liganda (FAS, TRAIL) za njihove receptore (TNF1, FAS, DR4, DR5, TRAIL1 i 2) smještene na staničnoj membrani. Unutarstanični put: apoptotski signal induciraju različiti nespecifični stresni čimbenici te djeluje preko Bcl-2 obitelji. Strelica u obliku horizontalno položenog slova T pokazuje inhibitorni učinak.

Normalni razvoj gonada karakteriziran je masivnom apoptozom (55). Već tijekom migracije, a usporedno s procesom proliferacije, neke spolne prstanice budu odstranjene apoptozom (56). Zametne stanice degeneriraju tijekom embrionalnog, fetalnog i postnatalnog perioda, pretežno programiranom staničnom smrću (57-59).

Sedam milijuna zametnih stanica u dvadesetom tjednu razvoja čovjeka reducirano je na samo dva milijuna kod rođenja te oko tristo tisuća u pubertetu žene (60). Za vrijeme reproduktivnog života više od 90% ovarijskih folikula koji sadrže oocite podliježe degenerativnom procesu (61). Tijekom normalne spermatogeneze smrt zametnih stanica prisutna je u svim stadijima te rezultira gubitkom više od 75% od potencijalnog broja zrelih spermija odraslog muškarca (62).

#### 1.3.2.2. Uloga p53 u razvoju spolnih žlijezda

P53 je proapoptotska bjelančevina kodirana p53 tumor supresorskim genom (63). P53 gen smješten je na kratkom kraku 17-og kromosoma (17p 13.1). Uključen je u indukciju apoptoze, ključni je čimbenik u regulaciji staničnog ciklusa, razvoju, diferencijaciji, genetskoj amplifikaciji, DNK rekombinaciji, starenju stanice te se naziva „čuvarom staničnog genoma“ (64).

U zdravoj stanici niska se koncentracija p53 bjelančevine održava brзом razgradnjom te postojanjem u latentnom i neaktivnom obliku. Stresni čimbenici poput hipoksije i genotoksičnog oštećenja DNK mogu inducirati stvaranje funkcionalne p53 bjelančevine i započeti proces apoptoze. Kod oštećenja DNK dolazi do nakupljanja p53 u stanici, zaustavljanja staničnog ciklusa u G1-S fazi i popravljivanja oštećene DNK. U slučaju nepopravljivih oštećenja dolazi do pokretanja procesa programirane stanične smrti zbog očuvanja genetske homeostaze (63, 65, 66).

Protein p53 može pokrenuti apoptozu tako da poremeti odnos proapoptotskih i antiapoptotskih mitohondrijskih proteina obitelji Bcl-2 ili da inducira gene koji povećavaju produkciju reaktivnih spojeva kisika koji su snažni aktivatori apoptoze (67, 68).

Jedna od najvažnijih funkcija divljeg tipa (*eng.* wild type) p53 je sekvencijski specifična transaktivacija ciljnih gena (sposobnost aktivacije transkripcije) koja može biti modulirana s drugom antionkogenom bjelančevinom, produktom WT1 (*eng.* Wilm's tumor supressor) gena (69, 70).

P53 bjelančevina detektirana je u granulosa i luteinskim stanicama štakora (71) i sudjeluje u regulaciji razvoja folikula i funkciji žutog tijela u čovjeka (72). Nakupljanje p53 bjelančevine u jezgri izraženo je u ljudskim granulosa i luteinskim stanicama tijekom apoptoze „in vitro“ i u apoptotičkim granulosa stanicama atretičnih folikula „in vivo“. Put programirane stanične smrti posredovan p53 bjelančevinom mogao bi imati važnu ulogu u indukciji regresije zametnih stanica (73) te se pretpostavlja kako kontrolira bazalnu razinu izražaja AIF gena (74). Unatoč brojnim radovima o p53 bjelančevini ne postoje istraživanja o važnosti ovog čimbenika tijekom ranog razvoja spolnih žlijezda u čovjeka.

#### 1.3.2.3. Uloga kaspaze-3 u razvoju spolnih žlijezda

Kaspaza-3 je apoptotski čimbenik koji pripada velikoj obitelji kaspaza i ima središnju ulogu u izvršenju procesa programirane stanične smrti. Do danas je u stanicama čovjeka uočeno i opisano oko 14 članova obitelji kaspaza koje postoje kao neaktivni zimogeni – prokaspaze (75, 76). Sve kaspaze su sintetizirane kao prekursori odnosno prokaspaze koji imaju nisku katalitičku aktivnost, a aktiviraju se kad stanica primi apoptotski poticaj, preko zimogenog odvajanja u pažljivo kontroliranom autoaktivacijskom procesu. Kaspaze se aktiviraju kaskadno, tako da svaka aktivirana kaspaza razgrađuje sljedeću prokaspazu u njezin aktivni oblik. Ime su dobile zbog cisteina na njihovom aktivnom mjestu (*eng.* cysteine – **aspartic proteases**, *hrv.* cistein – aspartat proteaze) (75, 76). Stupnjevita razgradnja u kojoj jedna kaspaza može aktivirati druge kaspaze, ali i samu sebe, pojačava apoptotski signalni put i dovodi do vrlo brze stanične smrti (77).

Članovi obitelji kaspaza podijeljeni su u tri skupine: upalne kaspaze (1, 4, 5, 11, 12, 13, i 14); inicijacijske kaspaze (2, 8, 9 i 10) i izvršne kaspaze (3, 6 i 7) (75, 76). Ciljevi kaspaza su druge niže postavljene kaspaze i bjelančevine koje sudjeluju u regulaciji apoptoze (npr. bcl-2) ili u održavanju stanične strukture (inhibitori nukleaze i citoskeletalni regulatori). Kaskadna

aktivacija kaspaza odgovorna je za proteolitičko odvajanje bjelančevinskih supstrata, aktivaciju nukleaza i DNK razgradnju te konačno odstranjenje staničnog sadržaja uz pomoć makrofaga. Ključna efektorska kaspaza je kaspaza-3. Ona povezuje mitohondrijski i receptorski put u zajednički kaspaza ovisan proces apoptoze (77-79).

Konačna potvrda procesa apoptoze uz kaspazu-3 je i TUNEL (*eng.* Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling, deoksinukleotidil-tranferaza – TdT) metoda koja označava OH skupine na krajevima DNA fragmenata (80).

Kaspaza-3 je najčešće istraživana na genetski modificiranim miševima (78). Čini se da je kaspaza-3 funkcionalno neophodna u procesu atrezije folikula i apoptozi granuloza stanica, dok to nije slučaj u apoptozi oocita (78). Slične rezultate dale su i studije na ljudskim fetusima između 14. i 19. tjedna (81). Kaspaza-3 ovisna stanična smrt dokazana je u granuloza stanicama zdravih i atretičnih folikula (82) te u oocitama i granuloza stanicama prenatalnih folikula (83). Postoji dosta studija koje su istraživale ulogu kaspaze-3 na različitim tkivima embrija (47, 84-88), ali do sada nema istraživanja na gonadama ljudskih embrija tijekom indiferentnog razdoblja i razdoblja rane diferencijacije.

#### 1.3.2.4. Uloga AIF-a u razvoju spolnih žlijezda

AIF (*eng.* Apoptosis Inducing Factor) je proapoptotski čimbenik za kaspaza-neovisni mitohondrijski put programirane stanične smrti. Otkriven je 1999. godine kao bifunkcijski polipeptid, flavoprotein molekularne težine 57 kDa (54). Iskazuje različite funkcije ovisno o subcelularnoj razini djelovanja. Zna se da u mitohondriju unaprjeđuje bioenergetske procese te djeluje kao redoks senzor, a stabiliziranjem kompleksa I respiratornog lanca (zreli oblik AIF-a) sudjeluje u održavanju stanične redoks homeostaze.

Kod izloženosti stanice apoptotskim stimulansima (oksidativni stres, oštećenje DNK) kao odgovor na proapoptotske članove Bcl-2 obitelji (48, 53, 89), AIF mijenja intracelularnu lokaciju i s prostora unutarnje mitohondrijske membrane prelazi u citosol te reagira s brojnim funkcionalno različitim bjelančevinama koje mogu utjecati na njegovu translokaciju u jezgru (npr. Hsp70, *eng.* Heat shock protein).

U jezgri formira kromatin degradirajući kompleks (s ciklofilinom A i drugim bjelančevinama), sudjeluje u stvaranju apoptotskih tjelešaca, kondenzaciji kromatina i fragmentaciji DNK kaspaza neovisnim putem (49). Mehanizam kromatinolize (vjerojatno elektrostatička interakcija) i fiziološka uloga AIF-a u mitohondriju nisu još u potpunosti razjašnjeni.

Izražaj AIF bjelančevine u pozitivnoj je korelaciji s aktivnošću kompleksa I respiratornog lanca. Interesantno, kod odsustva ili smanjenja izražaja AIF-a (čak i kad nije dio kompleksa I) smanjuje se oksidativna fosforilacija i povećava oksidativni stres (90, 91) (92). Redukcija funkcije AIF-a oštećuje respiratorni lanac i mitohondrijski energetskei metabolizam (49). Inaktivacija AIF-a u ranom mišjem embriju oštećuje aktivnost respiratornog kompleksa i vodi u staničnu smrt (53, 93).

AIF gen reguliran je bazalnim nivoom tumor supresorske p53 bjelančevine, ali aktivacija p53 genotoksičnim stresom ne uzrokuje značajno daljnje povećanje izražaja AIF-a. Pokazalo se da p53 čini stanice pojačano osjetljivima na kaspaza neovisnu staničnu smrt preko pozitivne regulacije izražaja AIF-a (74). Pojačani izražaj antiapoptotskih članova Bcl-2 obitelji prevenira otpuštanje AIF-a i njime posredovanu kaspaza neovisnu staničnu smrt (94). Smatra se da AIF kontrolira prvi val programirane stanične smrti tijekom embriogeneze (94). Za sada nema studija o njegovoj ulozi u ranom razvoju humanih gonada.

#### 1.3.2.5. Uloga bcl-2 i bax-a u razvoju spolnih žlijezda

Bcl-2 (*eng.* B-cell lymphoma protein 2) je obitelj unutarstaničnih bjelančevina koje imaju središnju ulogu u regulaciji apoptoze, naročito preko unutarstaničnog (mitohondrijskog) puta apoptoze. Obitelj Bcl-2 bjelančevina koordinira signale sa stanične površine i unutarstanične signale kao i formiranje apoptosoma i aktivaciju kaspazne kaskade (95). Sastoji se od pro-apoptotskih i antiapoptotskih bjelančevina koje djeluju pretežno na razini vanjske membrane mitohondrija gdje su i smještene (96). One su dimeri te utječu na propusnost membrane preko stvaranja ionskih kanala ili pora (97). Obzirom na funkciju i molekularnu građu obitelj Bcl-2 bjelančevina dijeli se u 3 podskupine. U prvoj podskupini nalaze se antiapoptotske bjelančevine koje sadrže sve četiri Bcl-2 homologne (BH) domene. Predstavnicima te skupine su: bcl-2, bcl-xL, mcl-1, bcl-w, A1/bfl-1, bcl-b/bcl-2L10. Druga podskupina načinjena je od

bjelančevina koji sadrže samo BH-3 domenu. Oni su inicijatori apoptoze te se aktiviraju djelovanjem staničnog stresa (npr. oštećenjem DNK ili nedostatkom čimbenika rasta). Neki od njenih članova su bid, bim, puma, noxa, bad, bmf, hrk, bik. Članovi treće podskupine sadrže sve četiri BH domene te imaju proapoptotsku ulogu. Važniji predstavnici su bax, bak i bok/mtd (98, 99). Ravnoteža između proapoptotskih i antiapoptotskih članova Bcl-2 obitelji bjelančevina određuje hoće li stanica opstati ili će biti uništena apoptozom (100). Aktivacija bjelančevina Bcl-2 obitelji regulirana je razinom izražaja gena te može biti modificirana kaspaza posredovanim odvajanjem ili fosforilacijom i antiapoptotskih i proapoptotskih članova (101), ali i mnogim čimbenicima stvorenim u stanici, poput transkripcijskog čimbenika p53 i jezgrinih bjelančevina (TR3, histoni) (102).

Bcl-2 bila je prva bjelančevina ove obitelji koja je identificirana prije više od dvadeset godina. Kodirana je istoimenim genom pronađenim u humanom B staničnom limfomu s t (14; 18) kromosomskom translokacijom (103). Bcl-2 ima jači izražaj tijekom embrionalnog razvoja nego postnatalno, posebno je značajna njegova uloga u zaštiti stanica u području epitelno-mezenhimske interakcije i kondenzacije stanica (104). Bcl-2 štiti stanicu od apoptoze tvoreći homo i heterodimere s proapoptotskom bjelančevinom bax (105). Bcl-2 deficijentni miševi imaju smanjen broj zametnih stanica i folikula u odnosu na „divlji tip“ (106). Prekomjeren izražaj bcl-2 rezultira smanjenjem folikularne apoptoze i atrezije (35, 107). Dokazano je da su bcl-2 i bax važni regulatori apoptoze u stanicama jajnika čovjeka i miša tijekom razvoja (106, 108-112).

Bax (*eng.* bcl-2 associated x protein), proapoptotski član Bcl-2 obitelji, ima ključnu ulogu u apoptozi zametnih stanica tijekom kasnijih stadija diferencijacije (113). Potiče stvaranje pora na vanjskoj membrani mitohondrija i povećava njenu propusnost, omogućujući otpuštanje citokroma c, endonukleaze G i AIF-a iz mitohondrija s posljedičnom aktivacijom apoptotske kaskade, a djelovanje mu ovisi o lokalizaciji unutar stanice (114). Izražaj bax-a dokazan je u humanim fetalnim ovarijima od četrnaestog tjedna do termina poroda u zametnim, pregranuloza i granuloza stanicama (105, 111). Studije na genetski modificiranim mišjim modelima pokazale su da potpuni nedostatak proapoptotske bjelančevine bax vodi povećanju broja oocita i primordijalnih folikula u usporedbi s „divljim tipom“ (110), no mišice nakon rođenja pokazuju normalan fenotip i duže očuvan fertilitet nego što bi odgovaralo njihovoj kronološkoj dobi (115). S druge strane, pojačan izražaj proapoptotske bjelančevine bax uzrokuje smrt granuloza stanica i atreziju folikula štakora (116) i čovjeka (113).

Do sada je izražaj bcl-2 i bax proučavan u samo nekoliko imunohistokemijskih studija koje su rađene na ljudskim fetalnim jajnicima, gdje je pokazan različit prostorni i vremenski obrazac

pojavljivanja u različitim staničnim populacijama (105, 111, 117). Međutim, do sada nije istražena uloga bcl-2 i bax-a u ranom razvoju gonada čovjeka.

#### 1.3.2.6. Uloga intermedijarnih filamenata citokeratina i vimentina u razvoju spolnih žlijezda

Intermedijarni (prijelazni) filamenti su skupina bjelančevinskih niti (filamenata) koje čine najstabilniji dio citoskeleta te se mogu pronaći u gotovo svim stanicama kralježnjaka (118, 119). Imaju ulogu u pružanju potpore i zaštiti stanice od istezanja, a ne sudjeluju u pokretima stanice. Razlikuju se od drugih komponenti citoskeleta po svom promjeru zbog čega su i dobili naziv prijelazni filamenti (promjer im je veći od mikrofilamenata, a manji od mikrotubula i iznosi između 8 i 10 nm). Osim njihove osnovne uloge u održavanju arhitekture citoskeleta, intermedijarni filamenti sudjeluju i u signaliziranju i regulaciji transkripcije, remodeliranju tkiva i rastu stanica (120) te u konačnici održavanju stanične homeostaze jer su uključeni u signalne puteve povezane sa staničnim preživljenjem, pa ih se smatra i antiapoptotskim čimbenicima (121, 122), kao i regulatorima staničnog ciklusa (123).

Sastoje se od obitelji bjelančevina podijeljenih u šest skupina koje dijele zajednička strukturna obilježja: 1. kiseli keratini; 2. bazični keratini; 3. dezmin, glijalna fibrilarna kiselina bjelančevina (GFAP, *eng.* Glial Fibrillary Acidic Protein), periferin i vimentin; 4. neurofilamenti (NF); 5. jezgrini laminini; 6. nestin (124). Ove filogenetski vrlo stare bjelančevine većinom su smještene u citoplazmi, osim laminina koji je smješten u jezgri (125).

Svaki član superobitelji intermedijarnih filamenata ima svoj specifičan vremensko-prostorni obrazac sinteze tijekom razvoja i u odrasloj dobi što ukazuje na složenu regulaciju (126). Postoji 65 funkcionalno različitih gena za intermedijarne filamente. Od toga su 54 za citokeratine, a nalaze se na kromosomima 17 i 12 (127). Svaki pojedini keratinski gen enkodira samo jedan keratinski protein.

Citokeratini (CK) su u stanici prisutni kao parovi citokeratina tipa 1 i tipa 2 koji se u podjednakom omjeru udružuju u heteropolimere. Pojedinačni CK su vrlo nestabilni i brzo budu uništeni što bi moglo služiti održavanju ravnoteže specifičnog tipa 1 i tipa 2 citokeratina u stanici (126). Osnovni par keratina jednostavnih epitela čine CK8 (tip 2) i CK18 (tip 1). Tijekom embriogeneze javljaju se prije svih ostalih citoplazmatskih intermedijarnih

filamenata, a njihov izražaj dokazan je u četverostaničnom stadiju razvoja mišjeg embrija (128). Potpuni nedostatak (knock-out modeli) CK8 letalan je za mišji embrio (129).

Tijekom razvoja intermedijarni filamenti ukazuju na različite puteve diferencijacije mezenhima u smjeru epitela ili u smjeru veziva (intersticija).

Vimentin pripada tipu 3 intermedijarnih filamenata. Najčešće tvori homopolimere, ali se može udružiti i u heteropolimere s tipom 3 i 4 intermedijarnih filamenata (130). Vimentin je jedini intermedijarni filament koji nema tkivno specifičnu distribuciju te se tijekom embriogeneze pojavljuje u više različitih tipova stanica, što može ukazivati da je neophodan tijekom ranih stadija razvoja. Napredovanjem procesa diferencijacije postupno bude zamijenjen intermedijarnim filamentom specifičnim za određena tkiva (126).

Morfološko i funkcionalno sazrijevanje tkiva tijekom razvoja praćeno je pojavom i nestankom određenih intermedijarnih filamenata u stanicama, prvenstveno citokeratina 8 (CK8) koji je biljeg epitelne diferencijacije i vimentina, biljega mezenhimskih, tj. vezivnih stanica (131). Istodobni izražaj citokeratina i vimentina fiziološki je prisutan u različitim tkivima tijekom embrionalnog razvoja (smatra se izrazom sazrijevanja struktura unutar pojedinih organa), ali i u određenim patološkim uvjetima u reaktivnim, degenerativnim i proliferativnim lezijama kao i u malignim tumorima (132-134).

Do sada je uloga intermedijarnih filamenata u indiferentnom razdoblju i razdoblju rane diferencijacije gonada uglavnom proučavana na gonadama štakora (135, 136). Početak spolnog određivanja testisa u štakora dovodi se u vezu s pojavom izražaja CK18 i postupnim nestajanjem CK19 u Sertolijevim stanicama (135). Izražaj citokeratina u fetalnim jajnicima štakora kao i epitelna transformacija mezenhimskih stanica istraženi su u studiji Fröjdmann a i suradnika (136).

U humanim testisima istraživani su citokeratini 8 i 18 te vimentin, ali samo u Sertolijevim stanicama fetalnih, prepubertalnih ili senilnih testisa (133). No, ekspresijski obrasci ovih filamenata u razvoju humanih gonada u periodu od 5. do 9. tjedna razvoja još uvijek nisu istraženi.



#### 1.4. Problematika istraživanja

Dosadašnje su spoznaje o regulaciji procesa proliferacije i staničnog preživljenja u gonadama uglavnom stečene na pokusnim životinjama ili kulturama stanica, dok su u ljudskim gonadama istraživani uglavnom u fetalnim i postnatalnim gonadama i to u smislu folikularne i lutealne atrezije. Međutim, još uvijek nema podataka o utjecaju procesa proliferacije i stanične smrti na rani razvoj i diferencijaciju ljudskih indiferentnih gonada. Stoga je u ovom radu po prvi put analizirana važnost proliferacije i stanične smrti u preživljenju i kontroli broja stanica različitih staničnih linija koje se pojavljuju tijekom nediferenciranog i ranog fetalnog razdoblja razvoja gonada. U tom smislu istraženi su različiti razvojni čimbenici, poput proliferacijskog Ki-67 čimbenika, proapoptotskih čimbenika (p53, kaspaza-3, bax, AIF), antiapoptotskog čimbenika bcl-2 i intermedijarnih filamenata (citokeratin 8 i vimentina), jer u literaturi ne postoje podatci o ulozi navedenih čimbenika tijekom rane faze razvoja spolnih žlijezda čovjeka u razdoblju od petog do devetog tjedna razvoja. Praćenje razvojnih procesa proliferacije, apoptoze i diferencijacije u razvoju humanih gonada važno je za lakše razumijevanje njihovog nastanka i oblikovanja u smislu muških ili ženskih gonada. Poznavanje vremenske i prostorne dinamike ovih razvojnih procesa omogućit će bolje razumijevanje odstupanja od normalnog obrasca koja se pojavljuju u disgenezama gonada.

## 2. CILJEVI RADA I HIPOTEZE

Spoznaje o ranom razvoju ljudskih spolnih žlijezda malobrojne su i nedostatne. Saznanja o kontroli broja spolnih prastanica i razvoju različitih staničnih populacija u spolnim žlijezdama tijekom indiferentnog stadija i stadija rane diferencijacije uglavnom se temelje na podacima dobivenim istraživanjima različitih pokusnih životinja i kulturama tkiva. Postoje razlike vremensko-prostornog obrasca izražaja čimbenika proliferacije i apoptoze, kao i anatomske razlike između pojedinih vrsta sisavaca. Također, podatci dobiveni studijama „in vitro“ ne mogu se jednostavno primijeniti na ljudske zametke.

Ovo je istraživanje prvo koje izravno u ljudskim spolnim žlijezdama prati utjecaj različitih razvojnih čimbenika na proliferaciju, diferencijaciju i programiranu smrt stanica koje izgrađuju osnovu indiferentnih spolnih žlijezda i usmjeravaju njihovu ranu diferencijaciju.

Cilj ove studije bio je primjenom imunohistokemijskih biljega za proapoptotske čimbenike (kaspazu-3, p53, bax, AIF), proliferacijski čimbenik (Ki-67), antiapoptotski čimbenik (bcl-2) te intermedijarne filamente (citokeratin 8 i vimentin) na histološkim rezovima ljudskih spolnih žlijezda (5. - 9. tjedan razvoja) tijekom indiferentnog i razdoblja rane diferencijacije u svim staničnim linijama istražiti sljedeće:

1. Utvrditi prostornu i vremensku raspodjelu pojavljivanja biljega za navedene bjelančevine te njihovu moguću ulogu u regulaciji stanične smrti i preživljavanju različitih staničnih populacija u tkivu indiferentne spolne žlijezde te tkivu jajnika i testisa tijekom najranijih razdoblja diferencijacije.
2. Utvrditi prostornu i vremensku raspodjelu stanične proliferacije (Ki-67) tijekom nastanka primitivnih spolnih tračaka (indiferentna spolna žlijezda) i sekundarnih spolnih tračaka (rana diferencijacija spolnih žlijezda).
3. Metodama kvantifikacije i statističke analize pratiti promjene u međusobnom odnosu istraživanih čimbenika te na temelju toga zaključiti o njihovoj mogućoj ulozi tijekom rane diferencijacije spolnih žlijezda.
4. Primjenom dvostrukog imunofluorescentnog bojenja dokazati kolokalizaciju (istovremenu prisutnost) više različitih čimbenika u istoj stanici te prevagu jednog od njih koji određuje sudbinu te stanice (preživljenje ili programirana stanična smrt).

## Hipoteza istraživanja

Očekuje se da će razvoj ljudskih spolnih žlijezda biti popraćen promjenom inteziteta izražaja, te promjenom vremena i mjesta pojave izražaja istraživanih biljega u različitim staničnim linijama (zametne stanice i prateće stanice) koje izgrađuju osnovu spolne žlijezde čovjeka tijekom indiferentnog perioda i perioda rane spolne diferencijacije.

Ovisno o razvojnom stadiju gonade i promatranim staničnim linijama očekuje se promjena izražaja proapoptotskih čimbenika (kaspaze-3, p53, bax, AIF-a), proliferacijskog čimbenika (Ki-67), antiapoptotskog čimbenika (bcl-2), te intermedijarnih filamenata (citokeratin 8 i vimentin).

Analiza dobivenih podataka mogla bi omogućiti nove spoznaje o ulozi navedenih čimbenika u procesu nastanka spolnih nabora, primarnih i sekundarnih (kortikalnih i testikularnih) spolnih tračaka te procesima proliferacije, stanične diferencijacije i načinima stanične smrti unutar pojedinih staničnih populacija.

Slične studije na humanom materijalu vezane uz ovu temu istraživanja ne postoje. Ovo će istraživanje dati prve informacije o čimbenicima važnim tijekom najranijih razdoblja razvoja ljudskih spolnih žlijezda.

### 3. METODE I MATERIJALI

#### 3.1. Sakupljanje tkiva i određivanje starosti zametaka

Istraživanje je u cijelosti provedeno na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Korištena su tkiva dvanaest normalnih ljudskih embrija i fetusa od 5. do 9. tjedna starosti (Tablica 1) koja potječu iz postojeće arhivske zbirke Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu ili Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

U ovoj sudiji korištena su tkiva spontano pobačenih i zametaka iz tubarnih trudnoća. Izabrani su samo dobro očuvani embriji i fetusi, uredne morfologije, bez znakova maceracije i bez patoloških promjena. Nakon makroskopskog pregleda i mikrosekcije orijentacijski je obojen (hemalaunom i eozinom) svaki deseti rez zbog provjere razine reza i očuvanosti tkiva. Normalno i očuvano tkivo histološki je prikazano urednom morfologijom stanica i međustaničnog prostora, bez znakova upalnih promjena.

Ova je studija izrađena kao dio znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta «Genski izražaj u ranom razvoju čovjeka» (216.2160528-0507), uz suglasnost Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Splitu i Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split.

Starost ljudskih embrija i fetusa određena je na temelju podataka o ovulacijskoj dobi (datum posljednje menstruacije) kao i vanjskim mjerenjima dužine tjeme - zadak (eng. CRL- crown rump length) te usporedbom sa stadijima Carnegie Instituta (137).

Tablica 1. Starost i broj ljudskih zametaka analiziranih u istraživanju

Starost (tjedni)	CRL (mm)	Carnegie stadij*	Broj zametaka u istraživanju
5	8	15	2
6	14	17	2
7	18	18	2
8	25	22	2
9	32	-	4

\*Prema referenci Carnegie Instituta (137)

### 3.2. Postupci, uklapanje u parafin i rezanje tkiva

Nakon pregleda vanjskog izgleda zametaka napravljena je mikrosekcija kojom su odvojeni kaudalni dijelovi tkiva koji sadrže gonadu. Navedeni uzorci tkiva embrija i ranih fetusa fiksirani su u 4% formaldehidu u fosfatnom puferu (*eng.* phosphate buffered saline-PBS) tijekom 24 sata te nakon ispiranja u fosfatnom puferu dehidrirani u uzlaznim koncentracijama alkohola. Nakon ispiranja u ksilolu uzorci su uklopljeni u parafin na 56°C (85). Napravljene su serijski poprečni rezovi debljine 7 µm te pričvršćeni na predmetna stakalca prethodno obrađena 0.01%-tnom vodenom otopinom poly-L-lizina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Prije imunohistokemije svaki je deseti rez orijentacijski obojen hemalaunom i eozinom radi provjere razine reza i očuvanosti tkiva.

### 3.3. Imunohistokemijsko bojenje rezova

U ovom radu korištene su dvije tehnike vizualizacije biljega (protutijela):

1. imunohistokemijska metoda s primjenom diaminobenzidina za dokazivanje prisutnosti pojedinih biljega i statističku analizu
2. imunofluorescencija za dokazivanje istovremene prisutnosti različitih protutijela u istoj stanici (kolokalizacija).

Imunohistokemijski postupak započet je deparafiniranjem rezova tkiva u ksilolu, a zatim rehidriranjem alkoholima silazne koncentracije. Za neutraliziranje aktivnosti endogene peroksidaze rezovi su inkubirani tijekom 30 minuta u 0.1% vodikovom peroksidu, na sobnoj temperaturi i isprani u PBS-u. U svrhu otkrivanja antigenih mjesta preparati su kuhani u natrijevom citratnom puferu (*eng.* sodium citrate buffer) u mikrovalnoj pećnici na 95°C kroz 15 minuta te isprani u PBS-u (*hrv.* puferirana fiziološka otopina).

Daljnji postupci slijedili su ovisno o uputama proizvođača i referentnim metodama laboratorija. Korištena su sljedeća primarna protutijela:

1. mišja monoklonalna na ljudske antigene:
  - anti-human Ki-67 (u razrjeđenju 1:100, M 7240, DAKO, Glostrup, Denmark)
  - anti-human p53 (u razrjeđenju 1:100, M 7001, DAKO, Glostrup, Denmark)
  - anti-human bcl-2 onkoprotein (M0887, DAKO, Glostrup, Denmark)
2. kunička monoklonalna na ljudske antigene:
  - anti-human, anti-mouse caspase-3 (u razrjeđenju 1:1500, AF835, R&D System Inc., Minneapolis Mi, USA)
  - anti-mouse bax antibody (AB 2915, Chemicon, Temecula, CA, USA)
  - anti-citokeratin 8 (ab59400, abcam, Cambridge, UK)
3. kozja poliklonalna na ljudske antigene:
  - AIF 1:500; AF5824, R&D Systems, Minneapolis, USA)
  - Vimentin (AF2105, R&D Systems, Minneapolis, USA).

Nakon jednosatne inkubacije s primarnim protutijelom, odvojeno, na sobnoj temperaturi i ispiranja PBS-om korištena su dva načina za sekundarno utvrđivanje primarnih protutijela:

- bojenje DAB-om (diaminobenzidin tetrahidrokloridna otopina)

- imunofluorescencija.

### 3. 3. 1. Bojenje diaminobenzidinom (DAB-om)

Za detekciju primarnih protutijela neovisnu o njihovom podrijetlu korišten je sustav streptavidin-biotin peroksidaze (K0690, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Rezovi su isprani PBS-om i obojeni DAB-om kroz 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga isprani su destiliranom vodom i obojeni hemalaunom, uklopljeni u medij za uklapanje i pokriveni pokrovnim stakalcem. Stanice koje su reagirale s odgovarajućim primarnim protutijelom imale su smeđe obojenu citoplazmu ili jezgru. Stanice koje nisu reagirale s primarnim protutijelom imale su hemalaunom plavo obojenu jezgru i svijetlu citoplazmu. Preparati su pregledani mikroskopom Olympus BX40 (Olympus, Tokyo, Japan). Rezovi namijenjeni negativnoj kontroli kod imunohistokemijskog bojenja svakog antigena prošli su zajedno s ostalim rezovima identičan postupak, osim što nisu inkubirani s primarnim protutijelom, nego su za to vrijeme bili u fosfatnom puferu.

Negativna kontrola imala je samo hemalaunom odnosno DAPI-jem plavo obojene jezgre bez smeđe boje, tj. bez fluorescentnog signala citoplazmi ili jezgara stanica.

Pozitivna kontrola na istraživanim rezovima bilo je smeđe obojenje (bojenje DAB-om) odnosno fluorescentni signal (bojenje fluorescentnim sekundarnim protutijelima) pojedinih citoplazmi ili jezgara stanica u okolnim strukturama za koje je iz literature poznato da reagiraju s primarnim protutijelima. Dodatno je u literaturi provjeren raspored i razlika pozitivnih od negativnih stanica u strukturama rezova za svaki traženi čimbenik.

### 3. 3. 2. Imunofluorescencija

Kod ove metode za prikazivanje vezanja primarnih protutijela korištena su sekundarna protutijela prema životinjskom podrijetlu primarnih protutijela:

- Texas Red –TR (T-862, Jackson Immuno Research Lab., PA, USA u razrjeđenju 1:200)
- Fluorescein izotiocijanat – FITC (ab6743, abcam, Cambridge, UK; sc-2024, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; AP132F Chemicon, Temecula, CA, USA) u razrjeđenju 1:200
- Biotinizirana sekundarna protutijela (sc-2040 i sc-2039 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA u razrjeđenju 1:200)

- Streptavidin Alexa Fluor 488 konjugat (Invitrogen Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA u razrjeđenju 1:500).

Za dvostruko imunofluorescencijsko bojenje korištena je kombinacija dvaju primarnih protutijela koja je inkubirana jedan sat, zatim je isprana u PBS-u nakon čega je dodana kombinacija odgovarajućih sekundarnih protutijela i inkubirana također jedan sat u tamnoj komori. Nakon završnog ispiranja PBS-om rezovi su uklopljeni u medij za uklapanje (Immuno-Mount, Shandon, Pittsburg, PA, USA) i prekriveni pokrovnim stakalcima. Analizirana je kolokalizacija primijenjenih biljega u stanicama.

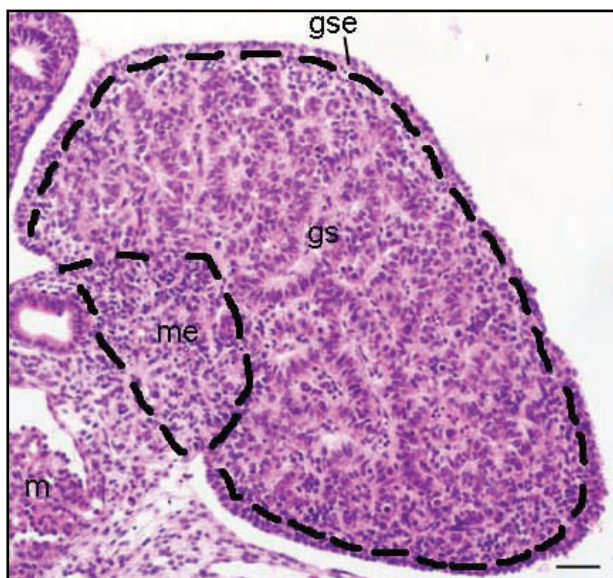
Stanice koje su reagirale s odgovarajućim kompleksom primarnog i sekundarnog protutijela imale su zeleno ili crveno obojenu citoplazmu ili jezgru. Stanice koje nisu reagirale s odgovarajućim kompleksom primarnog i sekundarnog protutijela imale su 4',6'-diamidino-2-fenilindol dihidrokloridom (eng. 4', 6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride - DAPI, D1306, Invitrogen Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) plavo obojenu jezgru.

Preparati su pregledani fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) i slikani DP71 digitalnom kamerom.

#### 3.4. Statistička analiza i kvantifikacija Ki-67, p53, kaspaza-3, AIF, bax, bcl-2, citokeratin 8 i vimentin čimbenika

U svim područjima gonada (površinski epitel gonade, stroma gonade i srž gonade) za analizu su odabrana polja  $30 \times 30 \mu\text{m}$  na povećanju  $\times 20$ , za svako istraživano razdoblje (osim za peti i šesti tjedan razvoja kada su razvijeni samo površinski epitel i stroma gonade) (Slika 8).





Slika 8. Shematski prikaz podjele gonade u sedmom tjednu razvoja na 3 regije: površinski epitel gonade (gse), stroma gonade (gs), medula gonade (me); mezonefros (m). Hematoksilin & eozin. Povećanje 20 $\times$ , ljestvica 50 $\mu$ m.

Izračunati su udjeli pozitivnih stanica za Ki-67, p53, kaspazu-3, AIF, bax, bcl-2, citokeratin 8 i vimentin na svakom trećem rezu. Ukupno je bilo 856 polja za Ki-67, 792 polja za p53, 645 polja za kaspazu-3, 543 polja za AIF, 324 za bax, 523 za bcl-2, 564 za citokeratin 8 i 576 za vimentin. Broj stanica evaluiran je kvantitativno od dva neovisna istraživača i definiran kao pozitivne (obojene) i negativne (neobojene) stanice. Kvantitativna analiza za Ki-67, p53, kaspazu-3, AIF, bax, bcl-2, citokeratin 8 i vimentin provedena je u tri razvojna perioda (5./6., 7./8., 9. tjedan) u skladu s razvojnom dobi analiziranih zametaka. U svakom području gonada izračunat je postotak Ki-67, p53, kaspaza-3, AIF, bax, bcl-2, citokeratin 8 i vimentin pozitivnih stanica i izražen kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Odabrana razina vjerodostojnosti u svim testovima bila je  $p < 0,05$ . Za ovu analizu korišten je Olympus BX40 mikroskop s DP11 digitalnom kamerom kao i DP-SOFT Version 3.1 računalni program.

U skladu s rezultatima Kolmogorov-Smirnovog testa o normalnosti raspodjele podataka, odabran je i odgovarajući statistički test. Ukoliko podaci nisu imali normalnu raspodjelu, za dvije skupine podataka korišten je Mann-Whitney test, odnosno  $t$ -test ukoliko je raspodjela bila normalna. Za analizu tri ili više skupina podataka koristio se Kruskal-Wallisov i Dunnov posthoc test za podatke koji nisu imali normalnu raspodjelu, odnosno ANOVA test ukoliko je raspodjela bila normalna. Rezultati za 7./8. i 9. tjedan analizirani su Kruskal-Wallisovim i

Dunnovim posthoc testom, dok su rezultati za 5./6. razvojni tjedan analizirani Studentovim *t*-testom.

### 3.5. Etička načela

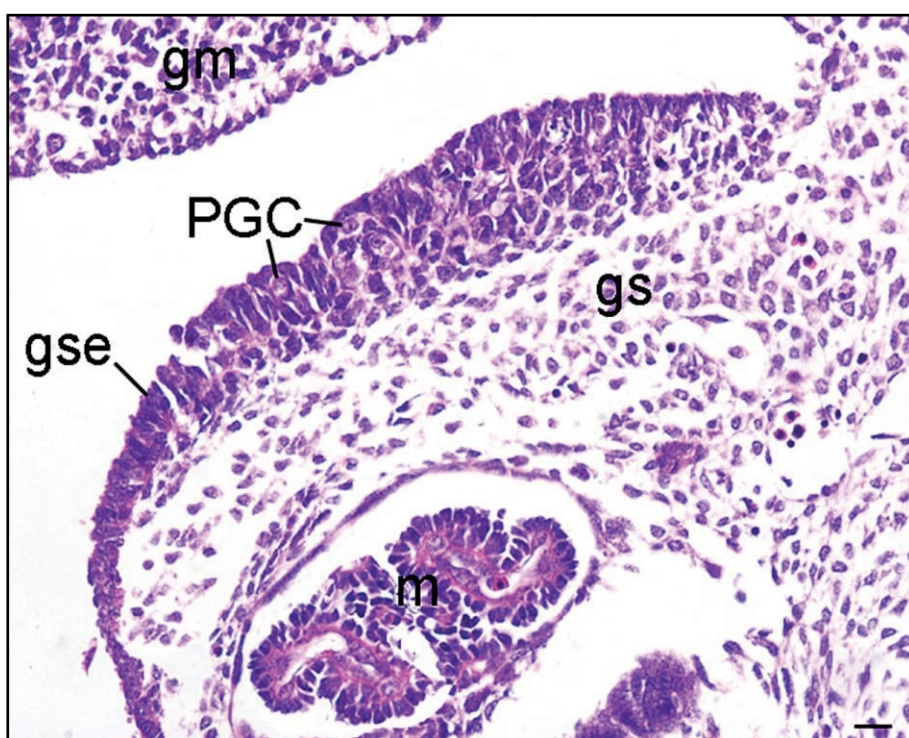
Pri provedbi ovog znanstvenog istraživanja poštovana su etička načela o istraživanju embrionalnih i fetalnih tkiva te smjernice i pravila o sigurnosti sudionika propisane sljedećim zakonima, etičkim normama (138) i međunarodnim ugovorima (139):

1. Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03)
2. Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04)
3. Helsinška deklaracija
4. Osnove dobre kliničke prakse.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Glavne morfološke značajke ranog razvoja gonade

Indiferentna spolna žlijezda predstavlja rani razvojni stadij ljudskog spolnog sustava. U petom i šestom tjednu razvoja osnova buduće spolne žlijezde (gonadalni primordium) razvija se u središnjem dijelu urogenitalnog nabora, dok njegovi postranični dijelovi sadrže strukture mezonefrosa (Slika 9).



Slika 9. Poprečni presjek kroz lumbalno područje ljudskog zametka starosti 5/6 tjedana u području gonade: vidi se površinski epitel gonade (gse), gonadalna stroma (gs), spolne prastanice (PGC), strukture mezonefrosa (m) te mezenterij crijeva (gm). Hematoksilin & eozin. Povećanje 20 $\times$ , ljestvica 40 $\mu$ m.

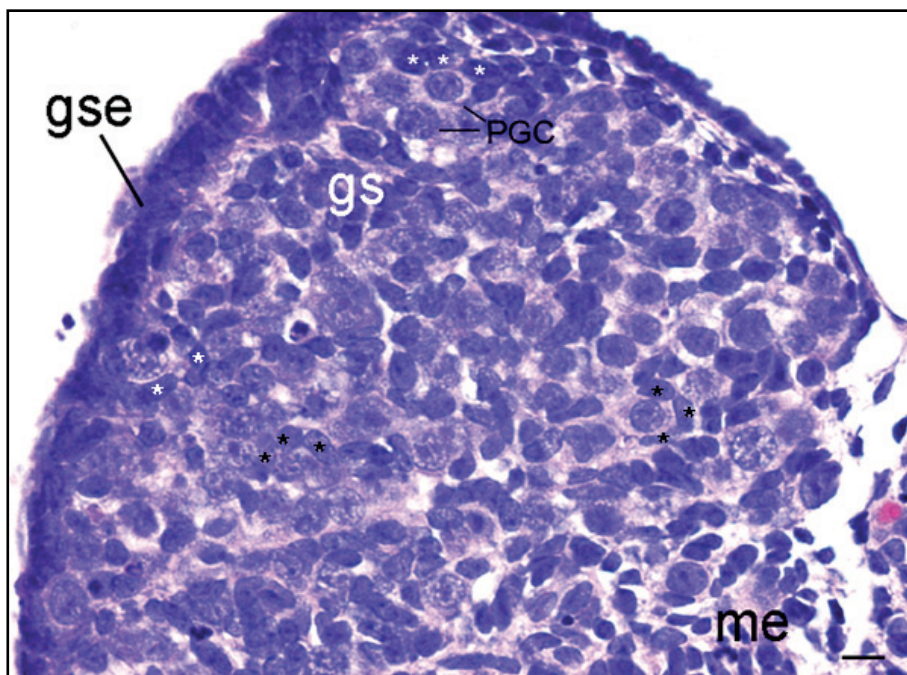
Površinski epitel postupno prolifera i prodire u podležeci mezenhim te stvara prstolike epitelne tračke nazvane primarni spolni tračci. Ovi primitivni spolni tračci predstavljaju budući vanjski korteks dok ostatak tkiva spolne žlijezde tvori unutarnji dio, tzv. medulu.

U šestom tjednu razvoja spolne prastanice nasele spolne nabore i postaju sastavni dio primitivnih spolnih tračaka (Slika 9).

Površinski epitel indiferentne gonade i primarni spolni tračci sastoje se od stanica s tamno obojenom jezgrom, a spolne prastanice imaju blijedo obojenu jezgru s istaknutim jezgricama i obilnu, svijetlo obojenu citoplazmu. U najranijim stadijima razvoja spolne žlijezde nema jasnih znakova morfoloških razlika između testisa i ovarija (Slika 9).

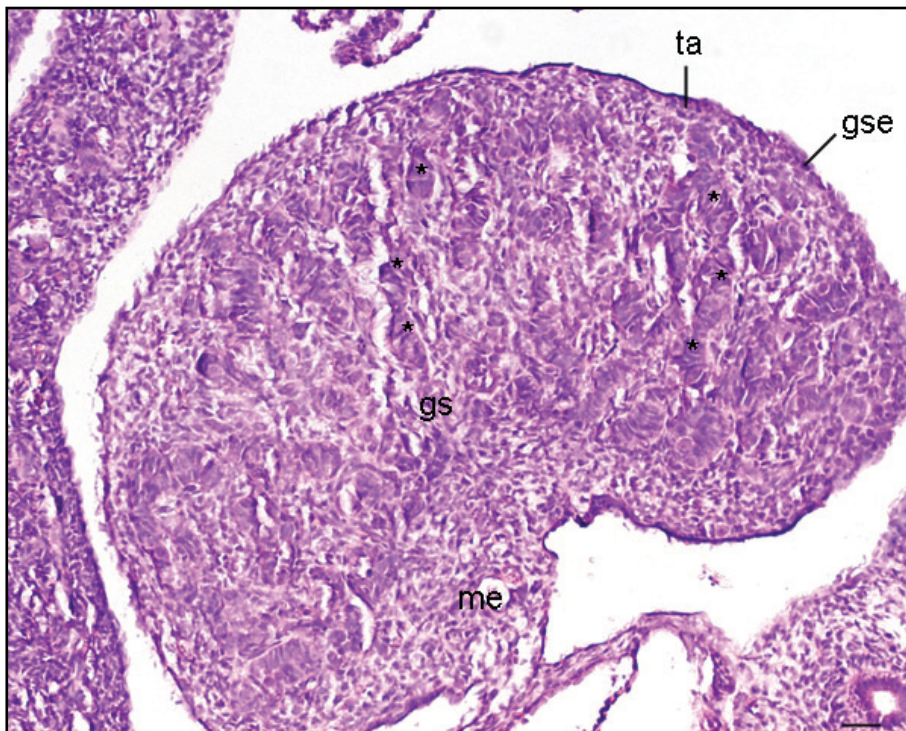
U sedmom i osmom tjednu razvoja ovariji su prekriveni epitelom koji stvara primitivne spolne tračke. Budući testisi već u sedmom tjednu razvoja pokazuju početnu organizaciju sekundarnih, odnosno seminifernih tračaka za razliku od budućih ovarija koji u dužem vremenskom razdoblju zadrže svoju indiferentnu morfologiju.

Napredovanjem proliferacijskog procesa cijela spolna žlijezda raste i stvara izbočenje unutar abdominalne šupljine. U ovome stadiju stroma sadržava brojne velike spolne prastanice, a neke od njih su djelomično okružene budućim folikularnim stanicama od kojih su neke svijetle, a neke tamne folikularne stanice što može ukazivati na njihovo različito epitelno podrijetlo (Slika 10).



Slika 10. Poprečni presjek kroz gonadu ljudskog zametka starosti 8 tjedana: vidi se površinski epitel gonade (gse), gonadalna stroma (gs), medula (me) i spolne prastanice (PGC) okružene budućim folikularnim stanicama: svijetle folikularne stanice (crne zvjezdice) i tamne folikularne stanice (bijele zvjezdice). Hematoksilin & eozin. Povećanje 40×, ljestvica 25µm.

U devetom tjednu razvoja dimenzije spolnih žlijezda u razvoju značajno se povećavaju. Ovariji se sastoje od površinskog epitela (mezotela), strome sa spolnim prasticama koje dijelom okružuje epitel kortikalnih spolnih tračaka i medule. Naime, nakon što degeneriraju primarni spolni tračci, u ranom fetalnom razdoblju nova generacija spolnih tračaka proteže se od površinskog epitela prema podležecem mezenhimu. Ispod epitela na površini nalazi se tanki sloj vezivnog tkiva (*tunica albuginea*), ali je slabije razvijena nego u testisima iste razvojne dobi (Slika 11).



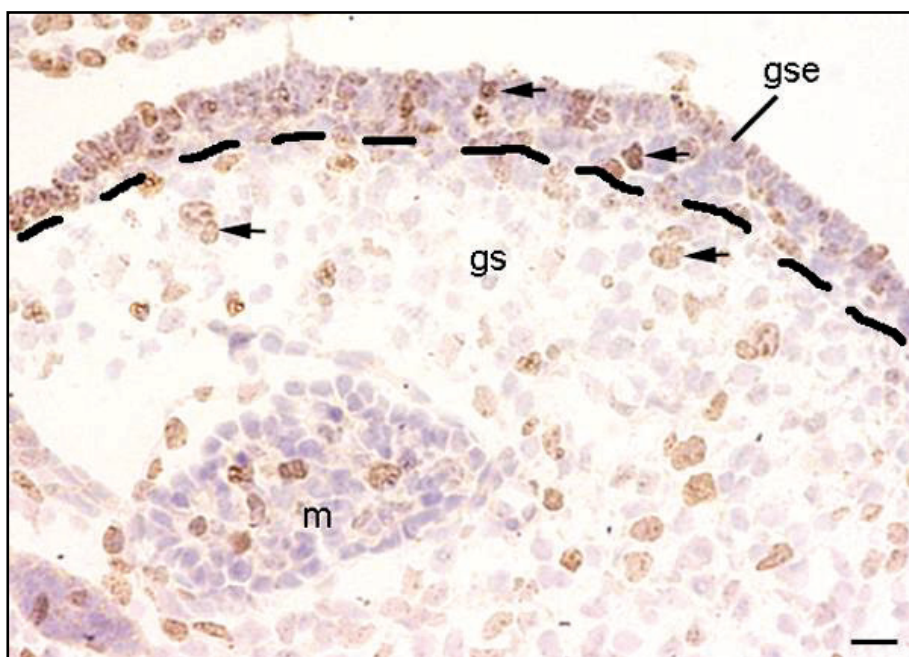
Slika 11. Poprečni presjek kroz testis ljudskog zametka starosti 9 tjedana: vidi se površinski epitel gonade (gse), gonadalna stroma (gs), medula (me), *tunica albuginea* (ta) te spolni tračci testisa (zvjezdice). Hematoksilin & eozin. Povećanje 20 $\times$ , ljestvica 40 $\mu$ m.

#### 4.2. Imunohistokemijsko i imunofluorescentno bojenje

Korištenjem imunohistokemijskih i imunofluorescentnih tehnika dokazana je prisutnost svih istraživanih čimbenika (Ki-67, p53, kaspaza-3, AIF, bax, bcl-2, citokeratin 8 i vimentin) u humanim gonadama tijekom 5. do 9. tjedna razvoja (Slika 12-45).

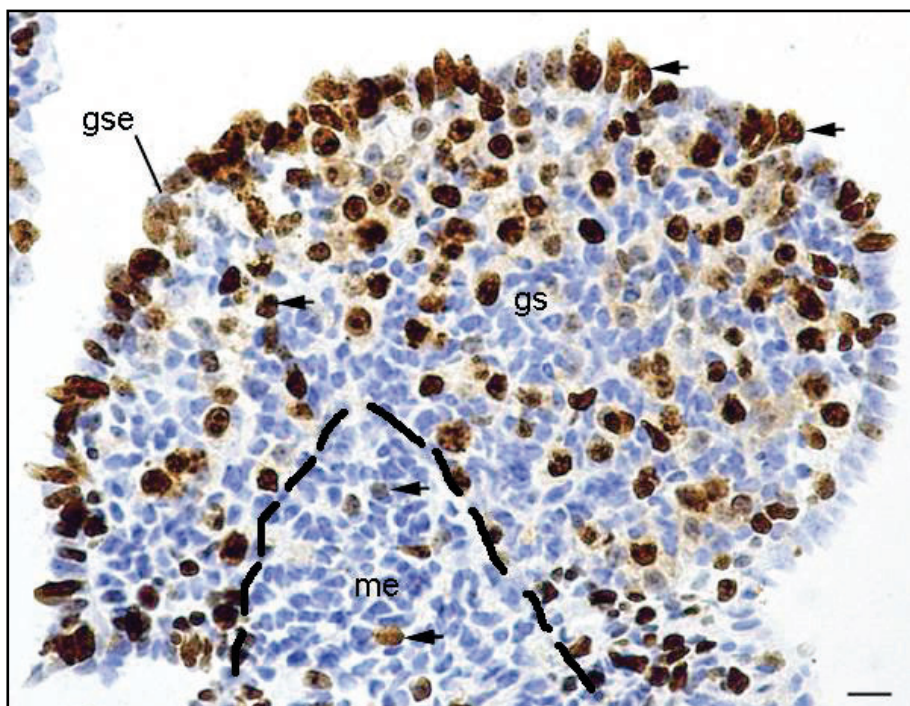
#### 4.2.1. Bojenje s biljekom Ki-67 i određivanje broja pozitivnih stanica

Tijekom šestog razvojnog tjedna bojenjem s Ki-67 proliferacijskim biljekom uočena je proliferacija stanica u površinskom epitelu, stromalnim stanicama i spolnim prasticama. Imunohistokemijskim bojenjem Ki-67 pozitivne stanice prikazuju se smeđim obojenjem jezgre, a nalaze se u svim dijelovima indiferentne spolne žlijezde, kao i u obližnjim mezonefričkim tubulima i glomerulima (Slika 12).



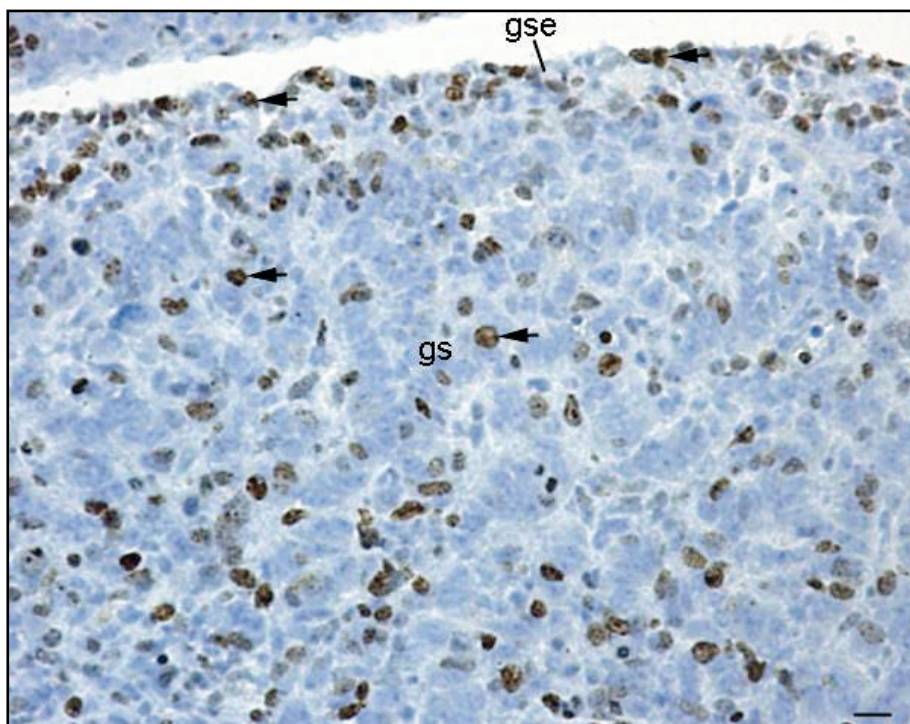
Slika 12. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 6 tjedana: stanice strome (gs) i površinskog epitela (gse) odijeljene isprekidanom linijom imaju jednolično plavo obojene jezgre (stanice u mirovanju) ili smeđe obojene jezgre (strelice) ukoliko reagiraju s Ki-67. Imunohistokemijsko bojenje na Ki-67. Povećanje 20 $\times$ , ljestvica 40 $\mu$ m.

Tijekom daljnjeg razvoja gonade uočen je porast broja Ki-67 pozitivnih stanica, kao i porast inteziteta obojenja proliferirajućih stanica. Proliferacija prevladava u predjelu površinskog epitela i kortikalnim dijelovima gonade, dok medularni dio ima samo mali broj Ki-67 pozitivnih stanica (Slika 13).



Slika 13. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 7 tjedana: izrazito Ki-67 pozitivne stanice površinskog epitela (gse) i strome (gs) označene su strelicama. Rijetke Ki-67 pozitivne stanice (strelice) uočene su i u meduli (me) koja je isprekidanom linijom odvojena od strome. Imunohistokemijsko bojenje na Ki-67. Povećanje 20 $\times$ , ljestvica 40 $\mu$ m.

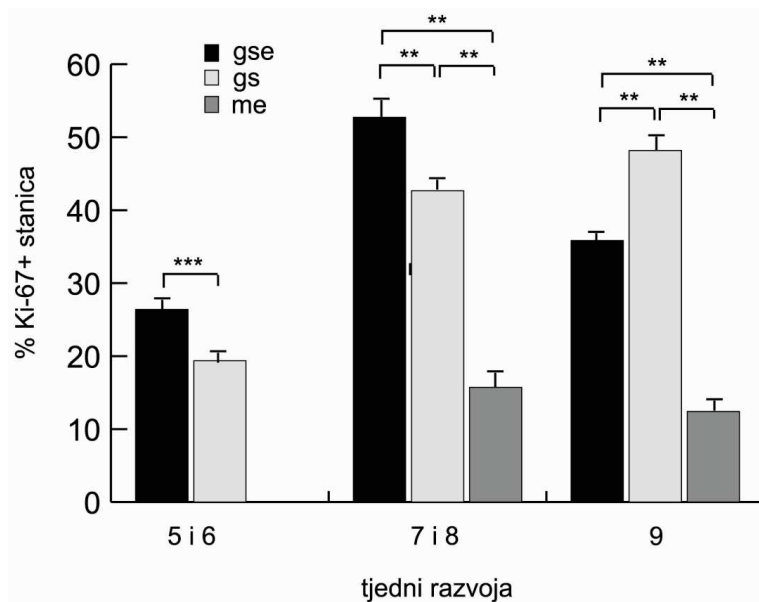
U ranom fetalnom periodu Ki-67 pozitivne stanice vide se u površinskom epitelu i naizmjenično su raspoređene unutar kortikalnog dijela gonade u razvoju (Slika 14).



Slika 14. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 8 tjedana: vide se Ki-67 pozitivne stanice (strelice) u površinskom epitelu (gse) i stromi (gs). Imunohistokemijsko bojenje na Ki-67. Povećanje 20 $\times$ , ljestvica 40 $\mu$ m.

Statistička analiza podataka potvrđuje povećanje proliferacijske aktivnosti u površinskom epitelu gonade (26% -52%) i stromi (19% - 42%) tijekom stvaranja primarnih i sekundarnih spolnih tračaka između petog i osmog tjedna razvoja. U kasnijim stadijima utvrđeno je lagano smanjenje proliferacijske aktivnosti u površinskom epitelu (35%), dok se u stromi proliferacija nastavlja povećavati (48%) sve do kraja devetog razvojnog tjedna. Medula pokazuje znatno nižu proliferacijsku aktivnost koja se postupno smanjuje s 15% na 12% između sedmog i devetog tjedna razvoja. Postoje statistički značajne razlike u broju Ki-67 pozitivnih stanica između površinskog epitela i gonadalne strome tijekom svih istraživanih razdoblja, također i između strome i medule, kao i površinskog epitela i medularnog dijela od sedmog do devetog tjedna razvoja (Slika 15).

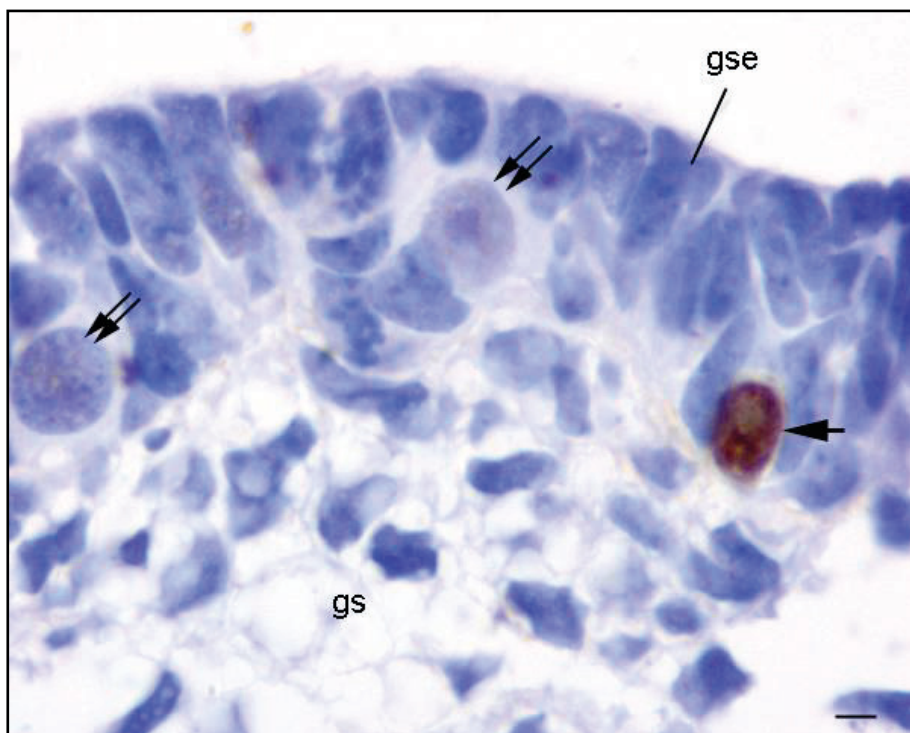




Slika 15. Raspodjela Ki-67 pozitivnih stanica u površinskom epitelu gonade (gse), stromi gonade (gs) i meduli (me) tijekom razvoja gonade (5.-9. tjedan). Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (okomita crta). Statistički značajne razlike (t-test za 5./6. tjedan i Kruskal-Wallis za 7./8. i 9. tjedan razvoja) prikazani su sa: \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  (N=30-92).

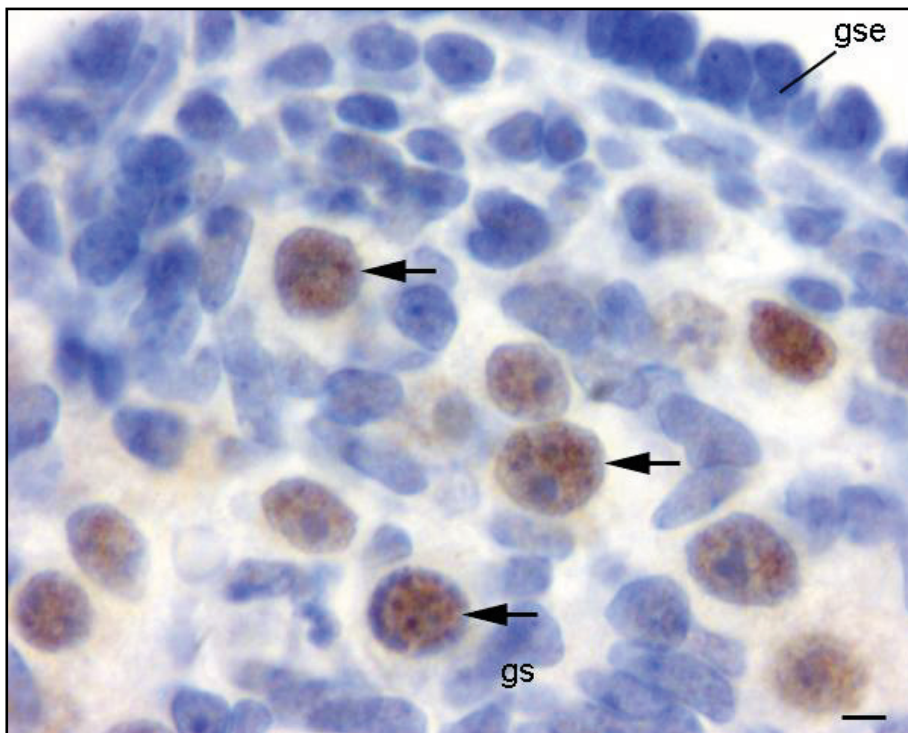
#### 4.2.2. Bojenje s biljekom p53 i određivanje broja pozitivnih stanica

P53-pozitivne stanice nalazimo u svim razvojnim stadijima ljudske spolne žlijezde koji su analizirani u ovome istraživanju. Imunohistokemijskim bojenjem na p53 pozitivne se stanice prikazuju smeđim obojenjem jezgre. Tijekom petog i šestog tjedna spolne prastanice samo su izuzetno p53 pozitivne (Slika 16).



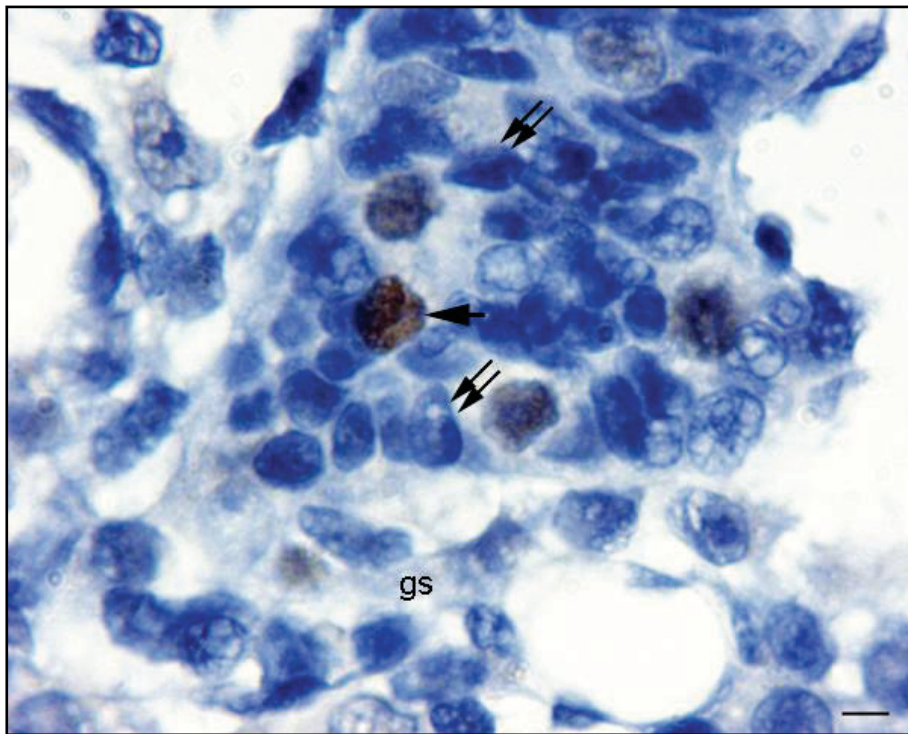
Slika 16. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 6. tjednu razvoja: neke spolne prastanice su p53 pozitivne i imaju smeđe obojene jezgre (strelica), dok su negativne spolne prastanice s hemalaunom plavo obojenim jezgrama (dvostruke strelice); površinski epitel (gse), stroma (gs). Imunohistokemijsko bojenje na p53. Povećanje 100×, ljestvica 10μm.

U kasnijim stadijima (sedmi i osmi tjedan) razvoja jezgre gotovo svih spolnih prastanica unutar primarnih spolnih tračaka pokazuju određeni stupanj p53 reaktivnosti (Slika 17).



Slika 17. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 7. tjednu razvoja: gotovo sve spolne prstanice su p53 pozitivne i imaju smeđe obojene jezgre (strelice); površinski epitel (gse), stroma (gs). Imunohistokemijsko bojenje na p53. Povećanje 100×, ljestvica 10μm.

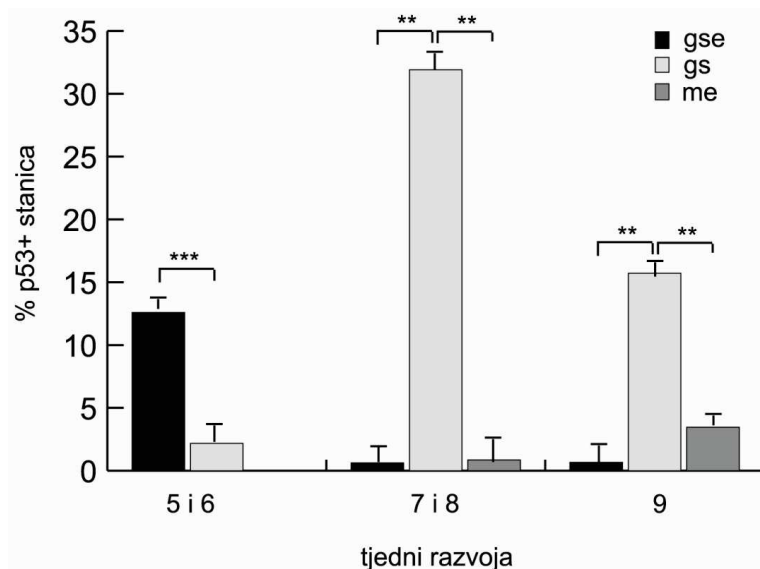
U ranom fetalnom razdoblju samo poneke spolne prstanice u testikularnim tračcima pokazuju slabu p53 reaktivnost, dok su ostale zametne stanice p53 negativne, tj. nemaju izražaj p53 bjelančevine (Slika 18).



Slika 18. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 9. tjednu razvoja: samo pojedine spolne prastanice su p53 pozitivne i imaju smeđe obojenu jezgru (strelica), dok su negativne spolne prastanice s hemalaunom plavo obojenim jezgrama (dvostruke strelice); stroma (gs). Imunohistokemijsko bojenje na p53. Povećanje 100×, ljestvica 10μm.

Sve ostale stanične populacije tijekom razvojnih razdoblja istraženih u ovoj studiji su p53 negativne.

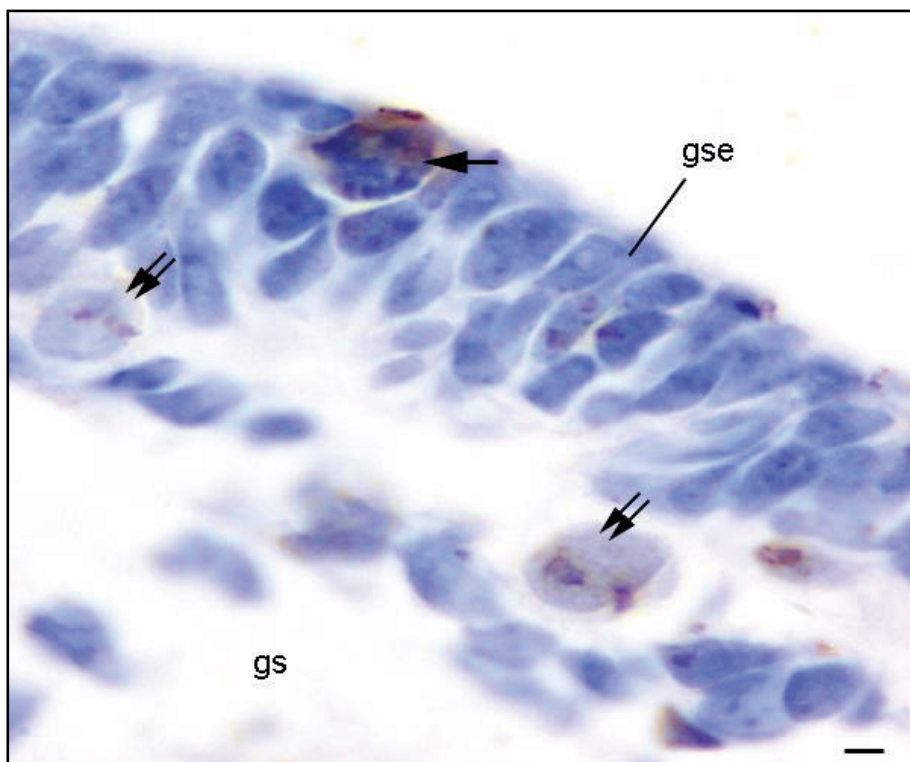
Izražaj p53 bjelančevine u površinskom epitelu gonade najveći je u petom i šestom tjednu (12%), dok je u stromi najveći izražaj u sedmom i osmom tjednu razvoja (32%). U meduli gonade izražaj p53 bjelančevine neznatan je i neznatno se povećava (1% - 3%). Statistički značajne razlike između broja p53 pozitivnih stanica površinskog epitela i strome uočene su u svim razvojnim tjednima, a strome i medule od sedmog do devetog tjedna razvoja ljudske spolne žlijezde (Slika 19).



Slika 19. Raspodjela p53 pozitivnih stanica u površinskom epitelu gonade (gse), stromi gonade (gs) i meduli (me) tijekom razvoja gonade (5.- 9.tjedan). Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (okomita crta). Statistički značajne razlike (t-test za 5./6. tjedan i Kruskal-Wallis za 7./8. i 9. tjedan razvoja) prikazani su sa: \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  (N=20-68).

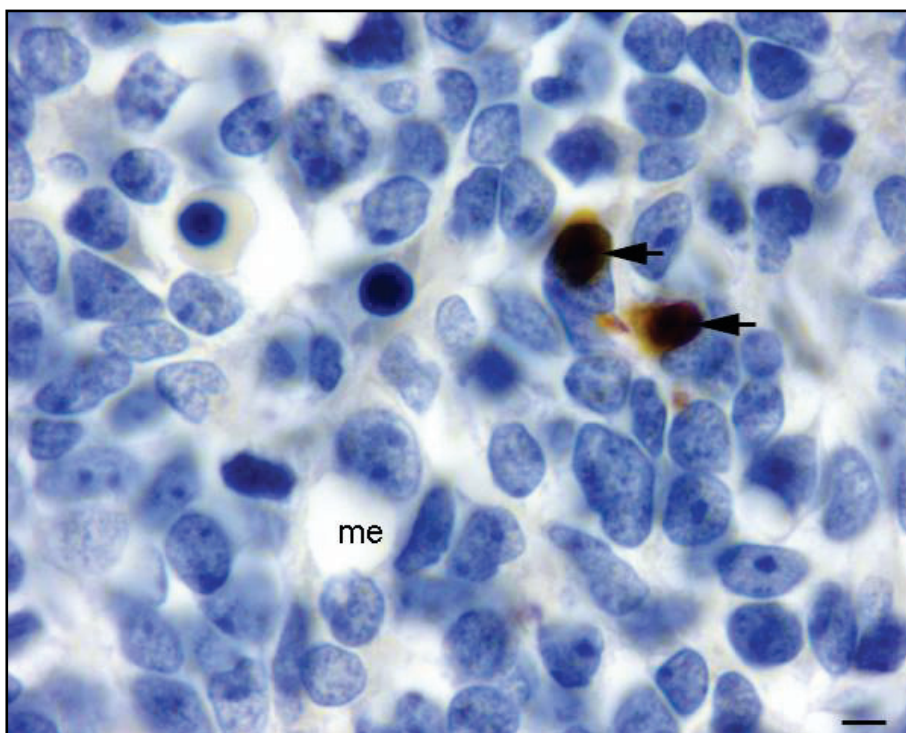
#### 4.2.3. Bojenje s biljegom na aktivnu kaspazu-3, kolokalizacija s AIF bjelančevinom i određivanje broja pozitivnih stanica

Izrazito niska kaspaza-3 reaktivnost prisutna je u spolnim prasticama, stanicama površinskog epitela i primarnih spolnih tračaka u petom i šestom tjednu razvoja. Imunohistokemijskim bojenjem kaspaza-3 bjelančevina prikazuje se smeđim obojenjem jezgre (Slika 20).



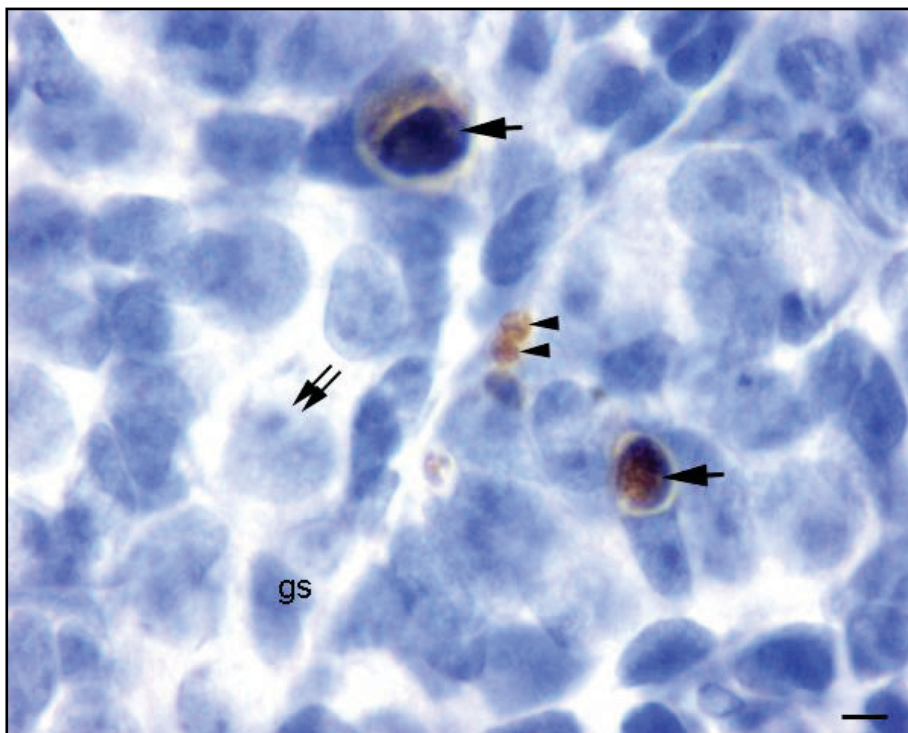
Slika 20. Presjek kroz spolnu žljezdu ljudskog zametka u 6. tjednu razvoja: vidi se kaspaza-3 pozitivna spolna prstanica (strelica) sa smeđe obojenom jezgrom u površinskom epitelu (gse) te kaspaza-3 negativne stanice (dvostruke strelice) u stromi (gs). Imunohistokemijsko bojenje na aktivnu kaspazu-3. Povećanje 100×, ljestvica 10μm.

U sedmom i osmom tjednu kaspaza-3 pozitivne apoptotske stanice u blagom su porastu u odnosu na prethodno razdoblje i prisutne su uglavnom u stromi i medularnom dijelu gonade u razvoju (Slika 21).



Slika 21. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 7. tjednu razvoja: vide se kaspaza-3 pozitivne stanice (strelice) sa smeđe obojenom jezgrom u meduli (me). Imunohistokemijsko bojenje na aktivnu kaspazu-3. Povećanje 100×, ljestvica 10μm.

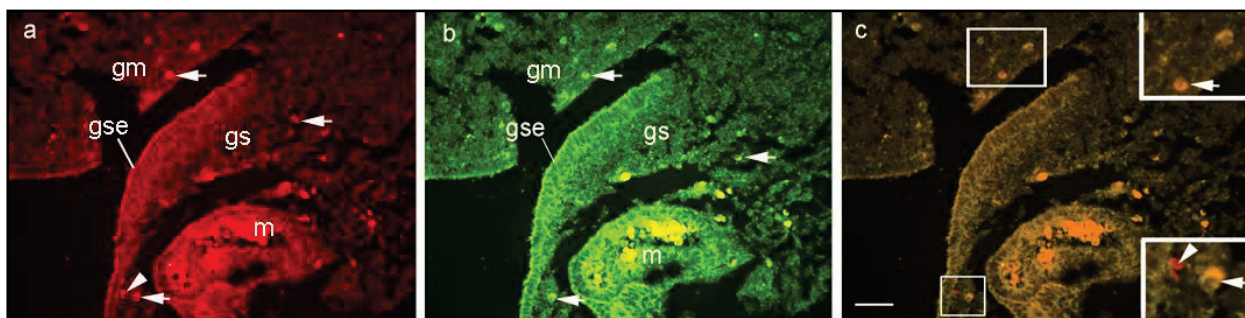
U ranom fetalnom razdoblju izrazita kaspaza-3 reaktivnost prisutna je u samo nekim spolnim prasticama i stromi te u folikularnim stanicama u razvoju (Slika 22).



Slika 22. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 8. tjednu razvoja: vide se kaspaza-3 pozitivne stanice (strelice) sa smeđe obojenom jezgrom te apoptotska tjelešca (vrhovi strelice) i kaspaza-3 negativna stanica (dvostruke strelice) u stromi (gs). Imunohistokemijsko bojenje na aktivnu kaspazu-3. Povećanje 100×, ljestvica 10μm.

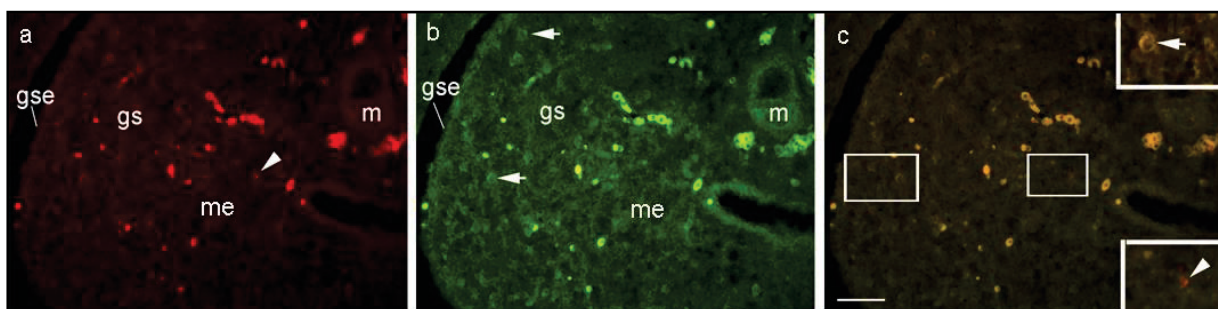
U petom i šestom tjednu razvoja AIF pozitivne stanice uočene su u svim strukturama indiferentne spolne žlijezde, kao i duž puta migracije spolnih prastanica, u dorzalnom mezenteriju stražnjeg crijeva. AIF pozitivne stanice se u tehnici imunofluorescentnog bojenja (FITC bojenje, *eng.* fluorescein isothiocyanate) prikazuju zelenim obojenjem AIF bjelančevine unutar citoplazme i/ili jezgre. U nekim stanicama AIF i kaspaza-3 biljezi su u koekspresiji (istovremena prisutnost u istoj stanici), dok su u drugim stanicama izraženi pojedinačno (Slika 23).





Slika 23. Presjek kroz indiferentnu spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 6 tjedana. Kaspaza-3 pozitivne stanice vidljive su u mezenteriju crijeva (gm), gonadalnoj stromi (gs) i površinskom epitelu (gse), a označene su strelicama i vrhom strelice (a). AIF pozitivne stanice vidljive su također u mezenteriju crijeva (gm), gonadalnoj stromi (gs) i površinskom epitelu (gse), a označene su strelicama (b); mezonefros (m). Preklapanjem slika a i b vidljiva je koekspressija kaspaze-3 i AIF bjelančevine u nekim stanicama (strelice u uvećanom okviru), dok u drugim stanicama kaspaza-3 i AIF nisu u koekspressiji (vrh strelice u uvećanom okviru) (c). Dvostruko imunofluorescentno bojenje na aktivnu kaspazu-3 i AIF. Povećanje 40 $\times$ , ljestvica 25 $\mu$ m.

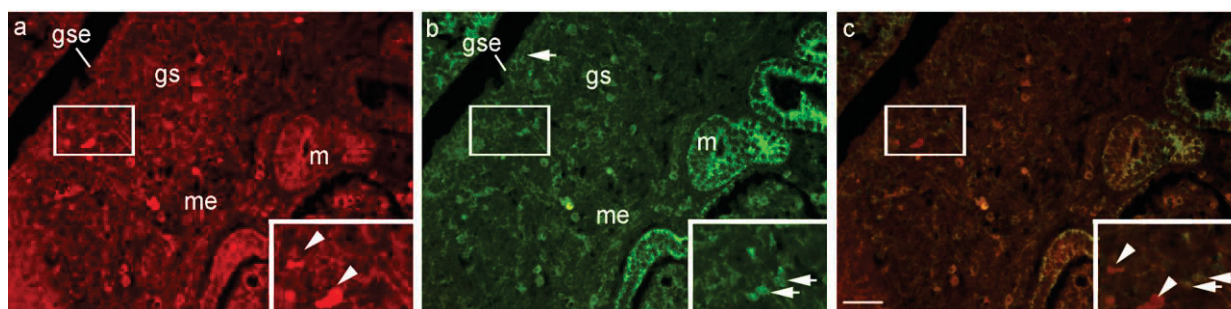
U sedmom i osmom tjednu razvoja na AIF bjelančevinu pozitivne su neke spolne prastanice unutar primarnih spolnih tračaka u kortikalnom predjelu. Koekspressija kaspaze-3 i AIF-a u ovom je razdoblju odsutna ili vrlo rijetka. Oba biljega izražena su u različitim populacijama stanica i u različitim dijelovima spolne žlijezde u razvoju (Slika 24).



Slika 24. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 7. tjednu razvoja: vidljiv je kortikalni dio s površinskim epitelom (gse), stroma (gs) i dobro razvijen medularni dio (me) te mezonefros (m). Neke stanice u meduli su kaspaza-3 pozitivne (vrh strelice) (a). Nekoliko stanica u kortikalnom dijelu su AIF pozitivne (strelice) (b). Preklapanjem slika a i b vidljivo

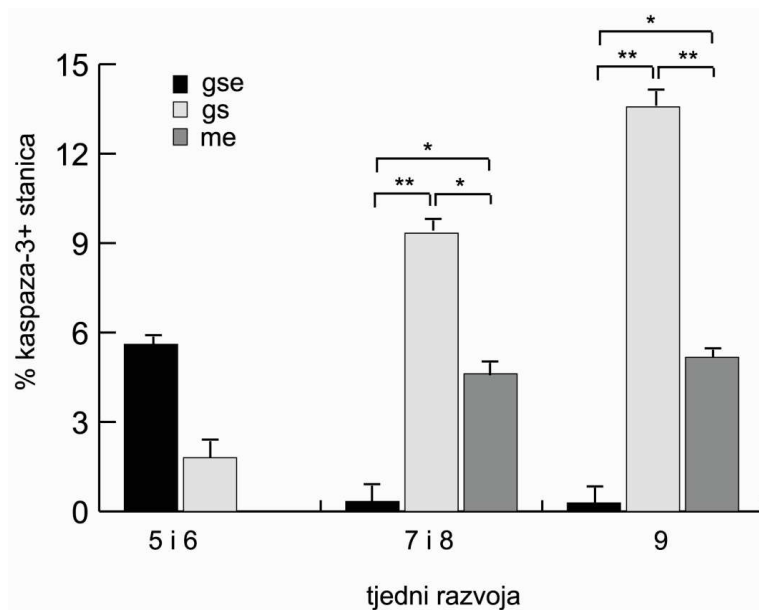
je kako nema koekspresije kaspaze-3 (vrh strelice u uvećanom okviru) i AIF bjelančevine (strelica u uvećanom okviru) (c). Dvostruko imunofluorescentno bojenje na aktivnu kaspazu-3 i AIF. Povećanje 40 $\times$ , ljestvica 30 $\mu$ m.

U devetom tjednu razvoja, izražaj AIF bjelančevine imaju prvenstveno spolne prstanice, ali i druge populacije stanica. Nema zajedničkog izražaja (koekspresije) kaspaze-3 i AIF bjelančevine, ali postoji njihov pojedinačni izražaj u stanicama (Slika 25).



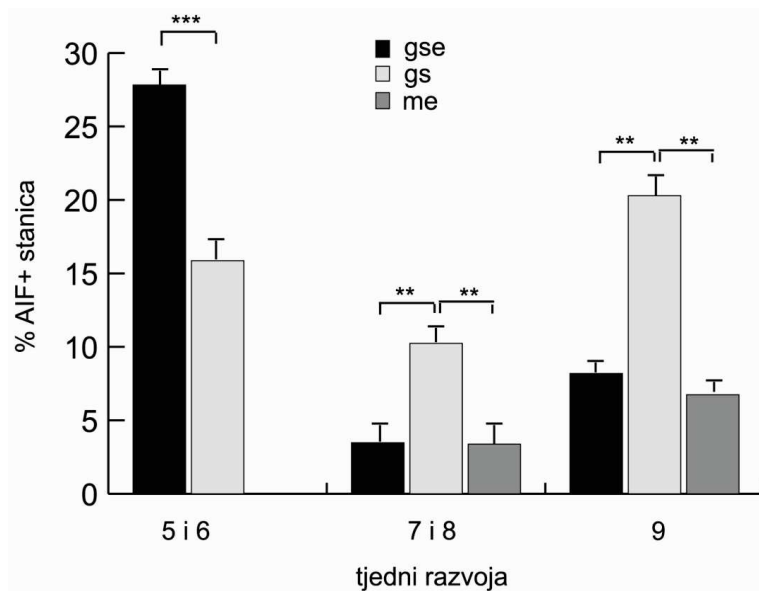
Slika 25. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 9. tjednu razvoja sastoji se od kortikalnog dijela s površinskim epitelom (gse), strome (gs) i dobro razvijenog medularnog dijela (me), a prikazan je i obližnji mezonefros (m). Nekoliko kaspaza-3 pozitivnih stanica nađeno je u korteksu, a označene su vrhom strelice u uvećanom okviru (a). AIF pozitivne stanice u kortikalnom dijelu označene su strelicama u uvećanom okviru (b). Preklapanjem slika a i b vidljiva je odsutnost koekspresije kaspaze-3 (vrhovi strelica u uvećanom okviru) i AIF bjelančevine (strelice u uvećanom okviru) u nekim stanicama rane fetalne ljudske spolne žlijezde. Dvostruko imunofluorescentno bojenje na aktivnu kaspazu-3 i AIF. Povećanje 40 $\times$ , ljestvica 25 $\mu$ m.

Izražaj kaspaza-3 bjelančevine u površinskom epitelu gonade najveći je u petom i šestom tjednu (6%), dok je u stromi najveći izražaj u devetom tjednu razvoja (13%). U meduli gonade izražaj kaspaza-3 bjelančevine neznatan je i neznatno se povećava (4% - 5%). Također postoji i statistički značajna razlika između broja kaspaza-3 pozitivnih stanica površinskog epitela, gonadalne strome i medule od sedmog do devetog tjedna razvoja (Slika 26).



Slika 26. Raspodjela kaspaza-3 pozitivnih stanica u površinskom epitelu gonade (gse), stromi gonade (gs) i meduli (me), tijekom razvoja gonade (5.- 9.tjedan). Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (okomita crta). Statistički značajne razlike (t-test za 5./6. tjedan i Kruskal-Wallis za 7./8. i 9. tjedan razvoja) prikazani su sa: \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  (N=25-54).

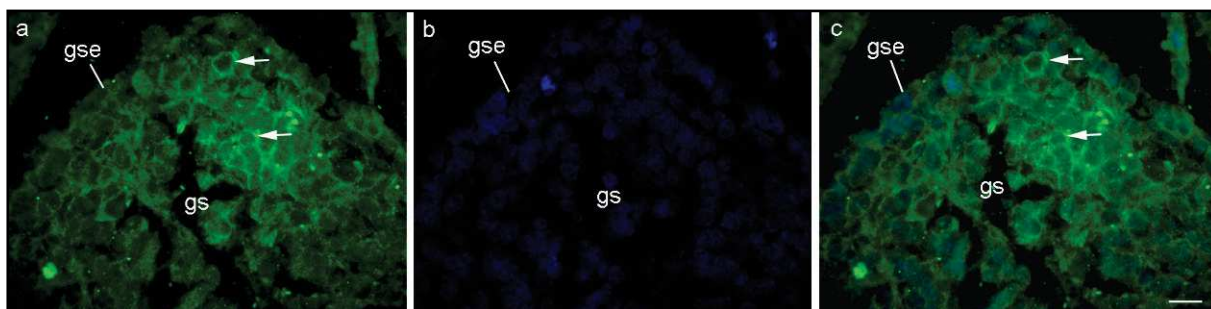
Izražaj AIF bjelančevine u površinskom epitelu gonade najveći je u petom i šestom tjednu (28%), dok je u stromi najveći izražaj u devetom tjednu razvoja (20%). U meduli gonade izražaj AIF bjelančevine blago se povećava s 3% na 7%. Također su statistički značajne razlike broja AIF pozitivnih stanica između površinskog epitela i strome gonade u cijelom istraživanom razdoblju te između strome i medularnog dijela u razdoblju od sedmog do devetog tjedna (Slika 27).



Slika 27. Raspodjela AIF pozitivnih stanica u površinskom epitelu gonade (gse), stromi gonade (gs) i meduli (me) tijekom razvoja gonade (5.- 9.tjedan). Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (okomita crta). Statistički značajne razlike (t-test za 5./6. tjedan i Kruskal-Wallis za 7./8. i 9. tjedan razvoja) prikazani su sa: \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  (N=30-64).

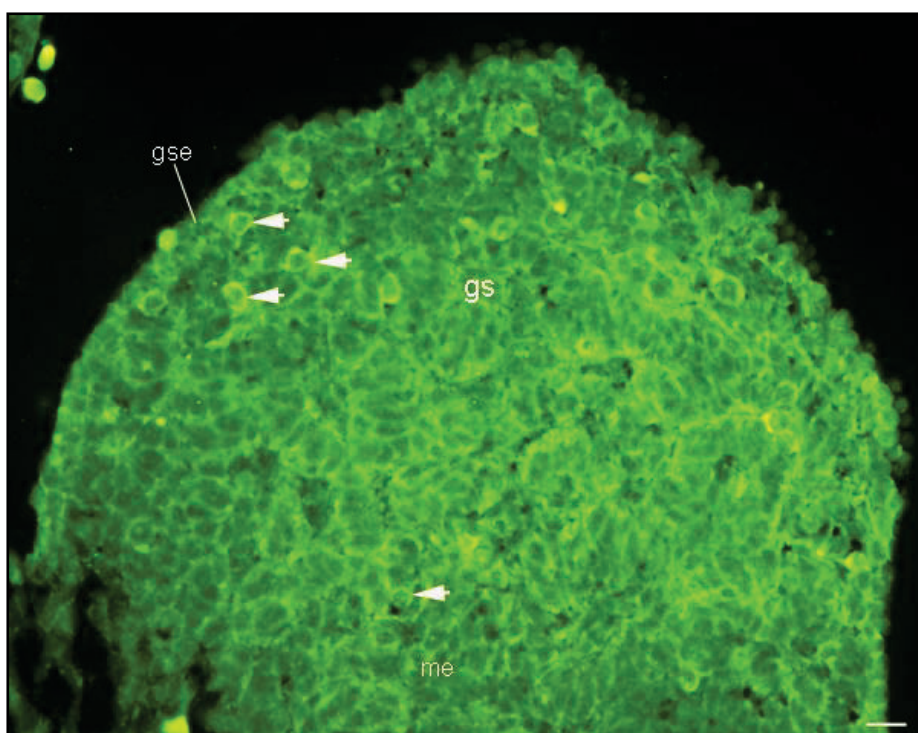
#### 4.2.4. Bojenje s bax biljgom i određivanje broja pozitivnih stanica

U petom i šestom tjednu razvoja bax pozitivne stanice nalaze se su u svim strukturama indiferentne spolne žlijezde, naročito u gonadalnoj stromi. Morfološki, bax pozitivne stanice se u tehnici imunofluorescentnog bojenja (FITC bojanje, *eng.* fluorescein isothiocyanate) prikazuju zelenim obojenjem bax bjelančevine unutar citoplazme koja okružuje DAPI-jem plavo obojene jezgre unutar gonade. Posebno jak izražaj bax bjelančevine imaju spolne prastanice (Slika 28).



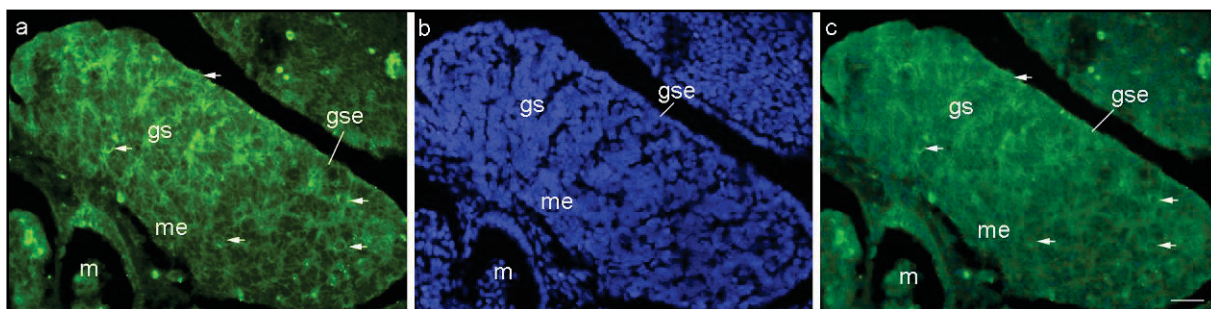
Slika 28. Presjek kroz indiferentnu spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 6 tjedana. Bax pozitivne stanice vidljive su u gonadalnoj stromi (gs) i površinskom epitelu (gse), a označene su strelicama (a). Sve jezgre su DAPI-jem obojene plavo (b). Preklapanjem slika a i b vidljiva je ekspresija bax bjelančevine posebno u citoplazmi spolnih prastanica (strelice) (c). Dvostruko imunofluorescentno bojenje na bax i DAPI. Povećanje 100×, ljestvica 10μm.

U sedmom i osmom tjednu razvoja bax pozitivne stanice prisutne su u svim dijelovima gonade, a najviše u stromi. Spolne prastanice izrazito su bax pozitivne (Slika 29).



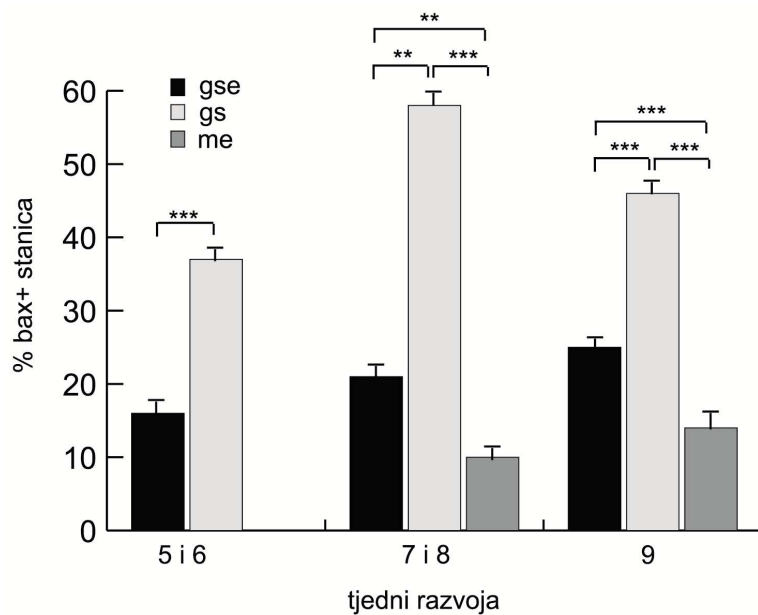
Slika 29. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 7 tjedana. Bax pozitivne spolne prastanice vidljive su u gonadalnoj stromi (gs), površinskom epitelu (gse) i meduli (me) (strelice). Imunofluorescentno bojenje na bax. Povećanje 40×, ljestvica 25μm.

U devetom tjednu razvoja bax pozitivne stanice prisutne su u svim dijelovima gonade. Bax reaktivnost najintenzivnije je izražena u spolnim prasticama (Slika 30).



Slika 30. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 9 tjedana. Bax pozitivne stanice vidljive su u gonadalnoj stromi (gs), površinskom epitelu (gse) i meduli (me), a označene su strelicama (a); mezonefros (m). Sve jezgre su DAPI-jem obojene plavo (b). Preklapanjem slika a i b vidljiva je ekspresija bax bjelančevine u citoplazmi pozitivnih stanica (strelice) (c). Dvostruko imunofluorescentno bojenje na bax i DAPI. Povećanje 40 $\times$ , ljestvica 25 $\mu$ m.

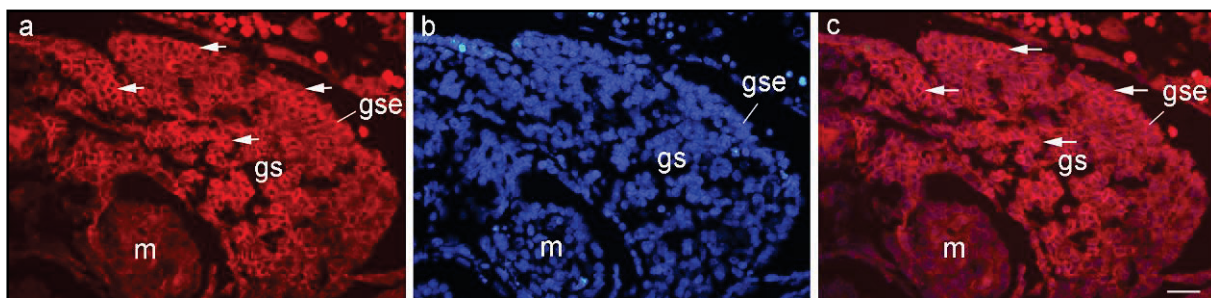
Izražaj bax bjelančevine povećava se u površinskom epitelu gonade (sa 16% na 25%). U stromi je najveći izražaj u sedmom i osmom tjednu razvoja (58%). U meduli gonade izražaj bax bjelančevine neznatno se povećava (10-14%). Postoje statistički značajne razlike u broju bax pozitivnih stanica između površinskog epitela i gonadalne strome tijekom svih istraživanih razdoblja, također i između strome i medule, kao i površinskog epitela i medularnog dijela od sedmog do devetog tjedna razvoja (Slika 31).



Slika 31. Raspodjela bax pozitivnih stanica u površinskom epitelu gonade (gse), stromi gonade (gs) i meduli (me) tijekom razvoja gonade (5. - 9.tjedan). Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (okomita crta). Statistički značajne razlike (t-test za 5./6. tjedan i Kruskal-Wallis za 7./8. i 9. tjedan razvoja) prikazani su sa: \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  (N=43-81).

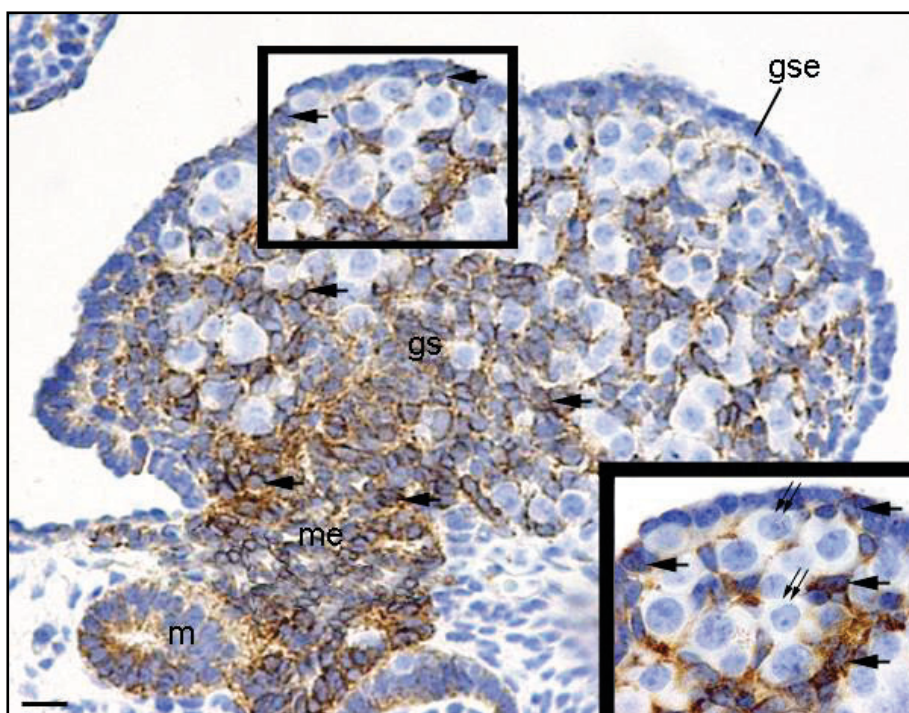
#### 4.2.5. Bojenje s bcl-2, kolokalizacija s bax-om i određivanje broja bcl-2 pozitivnih stanica

U petom i šestom tjednu razvoja bcl-2 pozitivne stanice uočene su u svim strukturama indiferentne spolne žlijezde, naročito u gonadalnoj stromi. Morfološki se bcl-2 pozitivne stanice u tehnici imunofluorescentnog bojenja (TR bojenje, eng. Texas Red) prikazuju crvenim obojenjem bcl-2 bjelančevine unutar citoplazme koja okružuje DAPI-jem plavo obojene jezgre unutar gonade (Slika 32).



Slika 32. Presjek kroz indiferentnu spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 6 tjedana. Bcl-2 pozitivne stanice vidljive su u gonadalnoj stromi (gs) i površinskom epitelu (gse), a označene su strelicama (a); mezonefros (m). Sve jezgre su DAPI-jem obojene plavo (b). Preklapanjem slika a i b vidljiva je ekspresija bcl-2 bjelančevine u citoplazmi pozitivnih stanica (strelice) (c). Dvostruko imunofluorescentno bojenje na bcl-2 i DAPI. Povećanje 40 $\times$ , ljestvica 25 $\mu$ m.

U sedmom i osmom tjednu razvoja bcl-2 pozitivne stanice prisutne su u svim dijelovima gonade, naročito u meduli. Spolne prastanice su bcl-2 negativne (Slika 33).

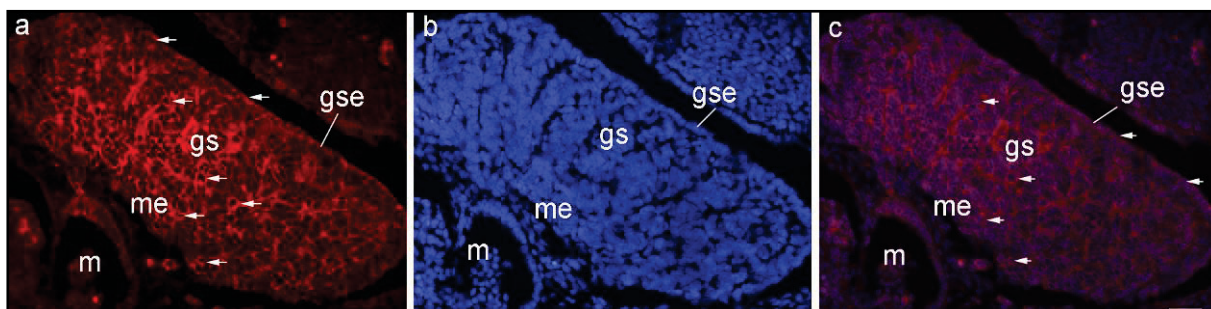


Slika 33. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 8. tjednu razvoja: Bcl-2 pozitivne stanice površinskog epitela (gse), strome (gs) i medule (me) označene su strelicama. Spolne



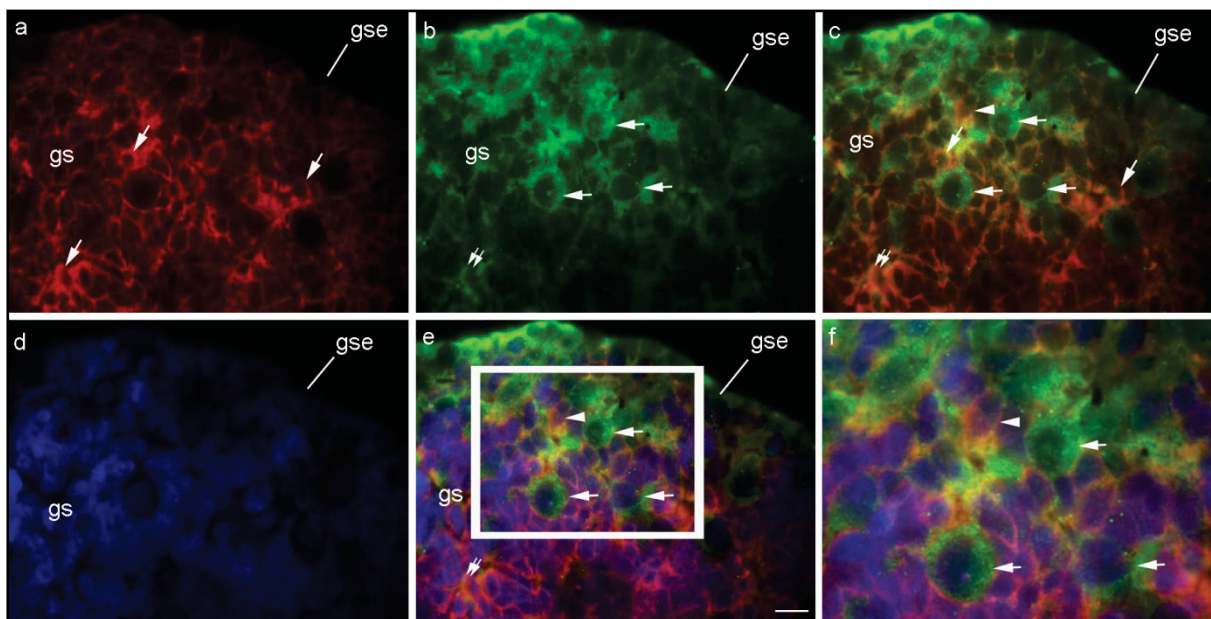
prastanice su bcl-2 negativne (dvostruke strelice u uvećanom okviru); mezonefros (m). Imunohistokemijsko bojenje na bcl-2. Povećanje 40×, ljestvica 25µm.

U ranom fetalnom razdoblju bcl-2 pozitivne stanice prisutne su u svim dijelovima gonade. Naročito je bcl-2 pozitivnost izražena u folikularnim stanicama u razvoju, ali su i neke spolne prastanice bcl-2 pozitivne (Slika 34).



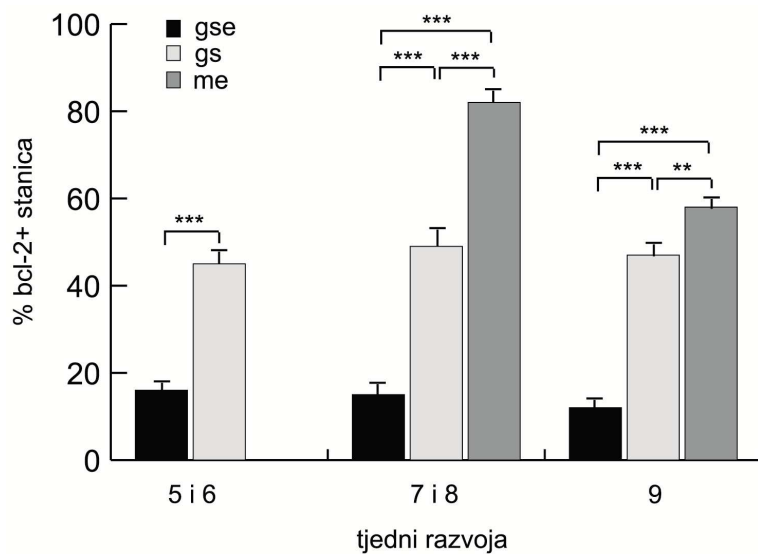
Slika 34. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 9 tjedana. Bcl-2 pozitivne stanice vidljive su u gonadalnoj stromi (gs), površinskom epitelu (gse) i meduli (me), a označene su strelicama (a); mezonefros (m). Sve jezgre su DAPI-jem obojene plavo (b). Preklapanjem slika a i b vidljiva je ekspresija bcl-2 bjelančevine u citoplazmi pozitivnih somatskih stanica i nekih spolnih prastanica (strelice) (c). Dvostruko imunofluorescentno bojenje na bcl-2 i DAPI. Povećanje 40×, ljestvica 25µm.

Trostrukim imunofluorescentnim bojenjem na bcl-2, bax i DAPI potvrđen je dominantni izražaj bcl-2 bjelančevine u folikularnim i pratećim stanicama, dok su spolne prastanice i epitelne stanice površinskog epitela uglavnom samo bax pozitivne. Samo mali broj folikularnih i spolnih prastanica pokazuje istodobni izražaj bcl-2 i bax bjelančevine u istoj stanici (Slika 35).



Slika 35. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 9 tjedana. Bcl-2 pozitivne stanice vidljive su u gonadalnoj stromi (gs), a označene su strelicama (a); površinski epitel gonade (gse). Bax pozitivne spolne prastanice (strelice) i bax pozitivna folikularna stanica (dvostruke strelice) vidljive su u gonadalnoj stromi (gs); površinski epitel gonade (gse) (b). Preklapanjem slika a i b vidljiva je međusobna dinamika izražaja bcl-2 i bax bjelančevine. Spolne prastanice su bax pozitivne (položene strelice), folikularne stanice su bcl-2 pozitivne (kose strelice), dok je kolokalizacija bcl-2 i bax bjelančevine u istoj folikularnoj stanici označena dvostrukim strelicama, a u spolnoj prastanici vrhom strelice (c). Sve jezgre su DAPI-jem obojene plavo (d). Preklapanjem slika c i d vidljiva je ekspresija bcl-2 i bax bjelančevine u odnosu na plavo obojene jezgre svih stanica. Kolokalizacija bcl-2 i bax-a u spolnoj prastanici (vrh strelice) i folikularnoj stanici (dvostruke strelice), bax pozitivne spolne prastanice (strelice) (e). Uvećanje detalja u okviru slike e (f). Trostruko imunofluorescentno bojenje na bcl-2, bax i DAPI. Povećanje 100 $\times$ , ljestvica 10 $\mu$ m.

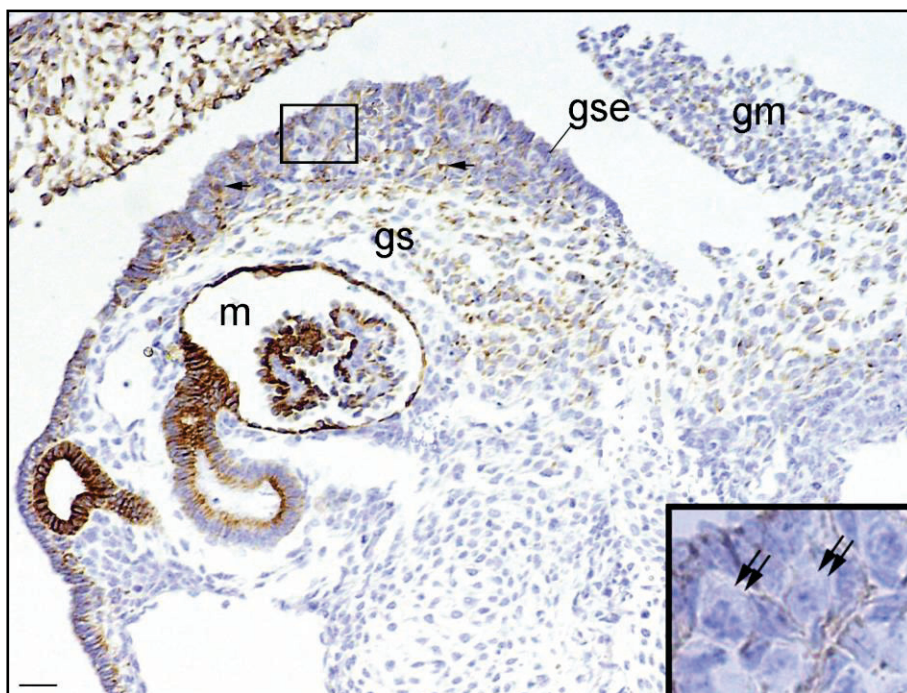
Izražaj bcl-2 bjelančevine u površinskom epitelu gonade neznatno se smanjuje tijekom istraživanih razdoblja (sa 16% na 12%), dok je najveći izražaj u stromi i meduli u sedmom i osmom tjednu razvoja (49% odnosno 82%). Postoje statistički značajne razlike u broju bcl-2 pozitivnih stanica između površinskog epitela i gonadalne strome tijekom svih istraživanih razdoblja, također i između strome i medule, kao i površinskog epitela i medularnog dijela od sedmog do devetog tjedna razvoja (Slika 36).



Slika 36. Raspodjela bcl-2 pozitivnih stanica u površinskom epitelu gonade (gse), stromi gonade (gs) i meduli (me) tijekom razvoja gonade (5.- 9.tjedan). Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (okomita crta). Statistički značajne razlike (t-test za 5./6. tjedan i Kruskal-Wallis za 7./8. i 9. tjedan razvoja) prikazani su sa: \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  (N=39-89).

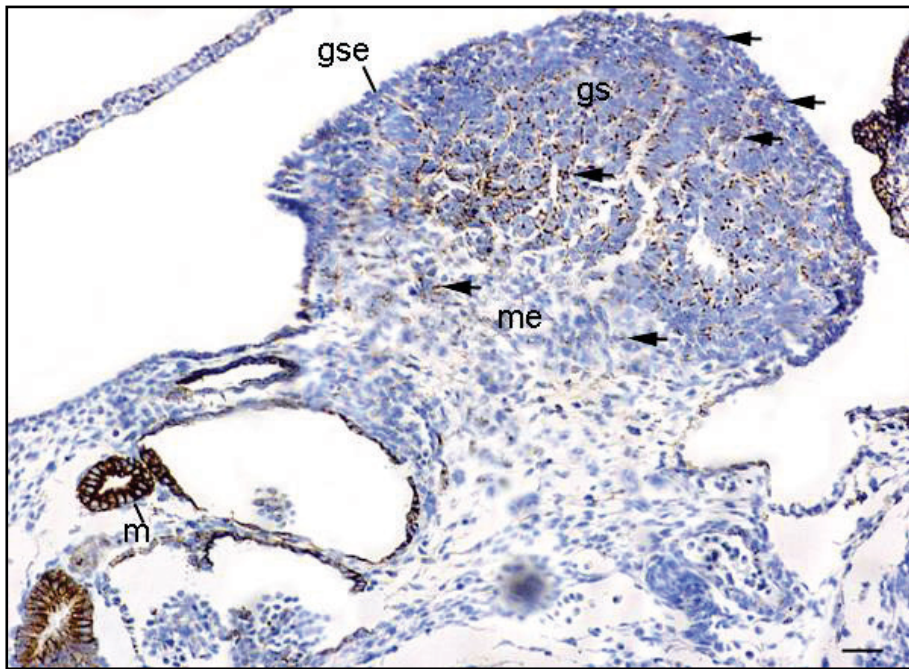
#### 4.2.6. Bojenje s citokeratinom 8 i određivanje broja pozitivnih stanica

Tijekom petog i šestog razvojnog tjedna citokeratin 8 prisutan je u stanicama površinskog epitela te u stanicama strome osim spolnih prastanica koje su citokeratin 8 negativne. Imunohistokemijskim bojenjem na citokeratin 8 pozitivne stanice imaju smeđe obojenje intermedijarnih filamenata u citoplazmi. Naročito jak izražaj citokeratina 8 prisutan je u obližnjim strukturama mezonefroza (Slika 37).



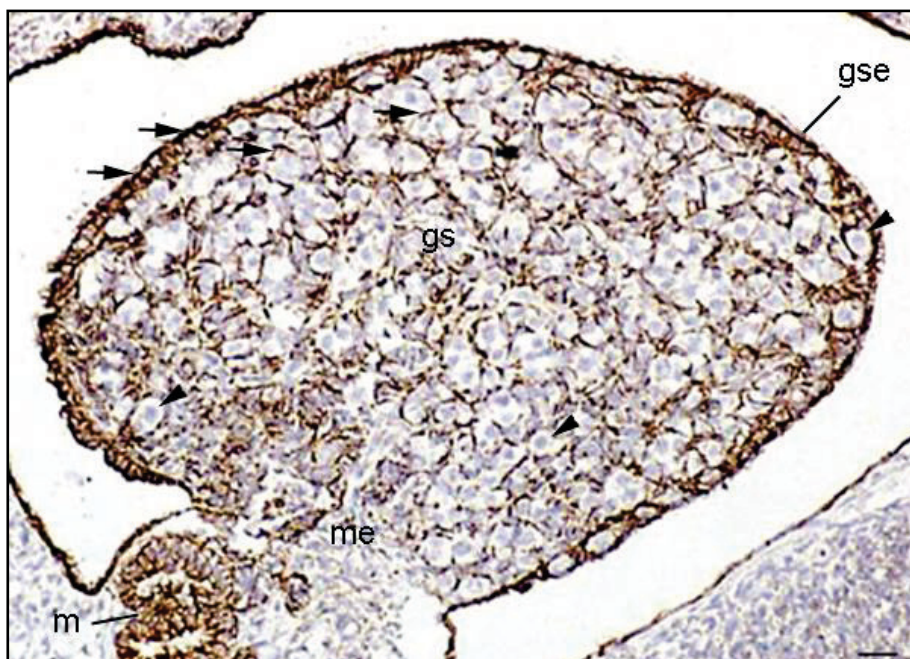
Slika 37. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 6. tjednu razvoja: vide se citokeratin 8 pozitivne stanice (strelice) sa smeđe obojenom citoplazmom u površinskom epitelu (gse) i stromi (gs). Spolne prstanice su citokeratin negativne (dvostruke strelice u uvećanom okviru); mezonefros (m). Imunohistokemijsko bojenje na citokeratin 8. Povećanje 10×, ljestvica 50μm.

Tijekom daljnjeg razvoja gonade spolne prstanice su i dalje negativne na citokeratin 8, a uočen je i njegov nešto manji izražaj u površinskom epitelu u odnosu na stromu. Također, intenzitet obojenja pozitivnih stanica nešto je jači u stromi gonade (Slika 38).



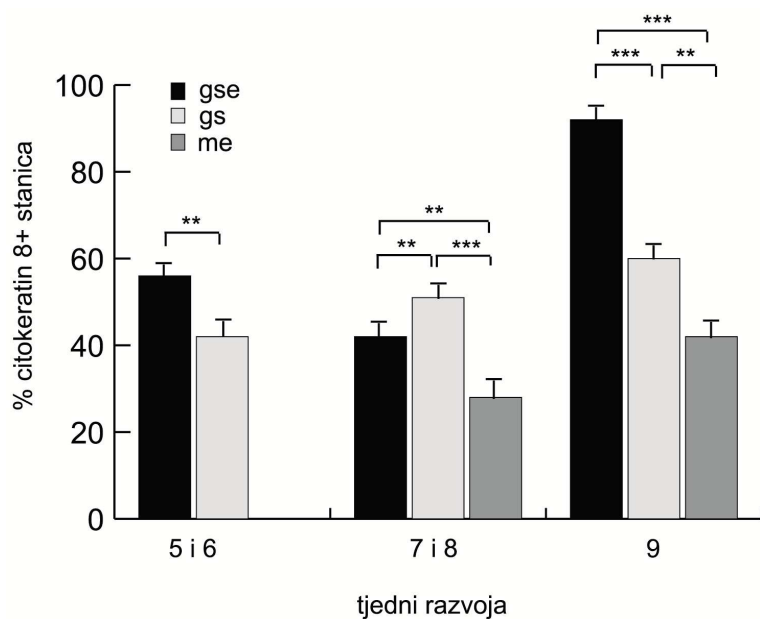
Slika 38. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 7 tjedana: citokeratin 8 pozitivne stanice površinskog epitela (gse) i strome (gs) označene su strelicama. Rijetke citokeratin 8 pozitivne stanice (strelice) uočene su i u meduli (me); mezonefros (m). Imunohistokemijsko bojenje na citokeratin 8. Povećanje 10 $\times$ , ljestvica 50 $\mu$ m.

U ranom fetalnom razdoblju citokeratin 8 pozitivne stanice imaju izrazito jak izražaj ove bjelančevine u svim dijelovima gonade osim u spolnim prasticama (Slika 39).



Slika 39. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 9. tjednu razvoja: vide se citokeratin 8 pozitivne stanice (strelice) sa smeđe obojenom citoplazmom u površinskom epitelu (gse), stromi (gs) i meduli (me). Spolne prastanice su citokeratin negativne (vrhovi strelica); mezonefros (m). Imunohistokemijsko bojenje na citokeratin 8. Povećanje 20 $\times$ , ljestvica 35 $\mu$ m.

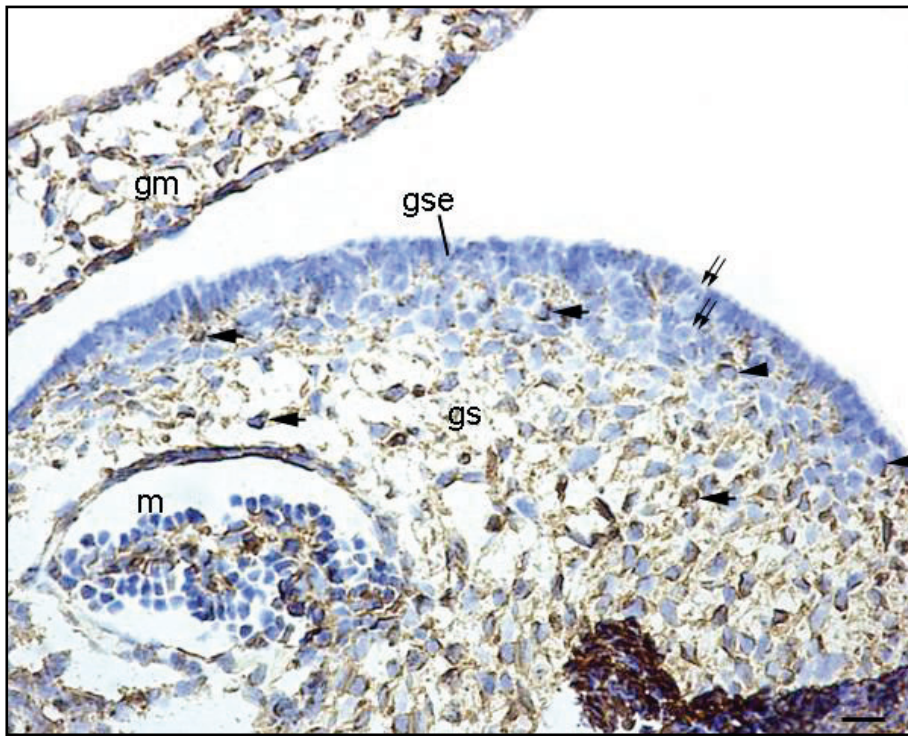
Izražaj citokeratin 8 bjelančevine u površinskom epitelu gonade u petom i šestom tjednu razvoja iznosi 56%. U sedmom i osmom tjednu dolazi do sniženja na 42% i ponovnog povećanja na 92% u ranom fetalnom razdoblju. U stromi se izražaj citokeratina 8 postupno povećava s 42% na 60%, dok je u meduli najveći izražaj u ranom fetalnom razdoblju (42%). Postoje statistički značajne razlike u broju citokeratin 8 pozitivnih stanica između površinskog epitela i gonadalne strome tijekom svih istraživanih razdoblja, također i između strome i medule, kao i površinskog epitela i medularnog dijela od sedmog do devetog tjedna razvoja (Slika 40).



Slika 40. Raspodjela citokeratin 8 pozitivnih stanica u površinskom epitelu gonade (gse), stromi gonade (gs) i meduli (me) tijekom razvoja gonade (5.- 9.tjedan). Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (okomita crta). Statistički značajne razlike (t-test za 5./6. tjedan i Kruskal-Wallis za 7./8. i 9. tjedan razvoja) prikazani su sa: \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  (N=52-101).

#### 4.2.7. Bojenje s vimentinom, kolokalizacija s citokeratinom 8 i određivanje broja vimentin pozitivnih stanica

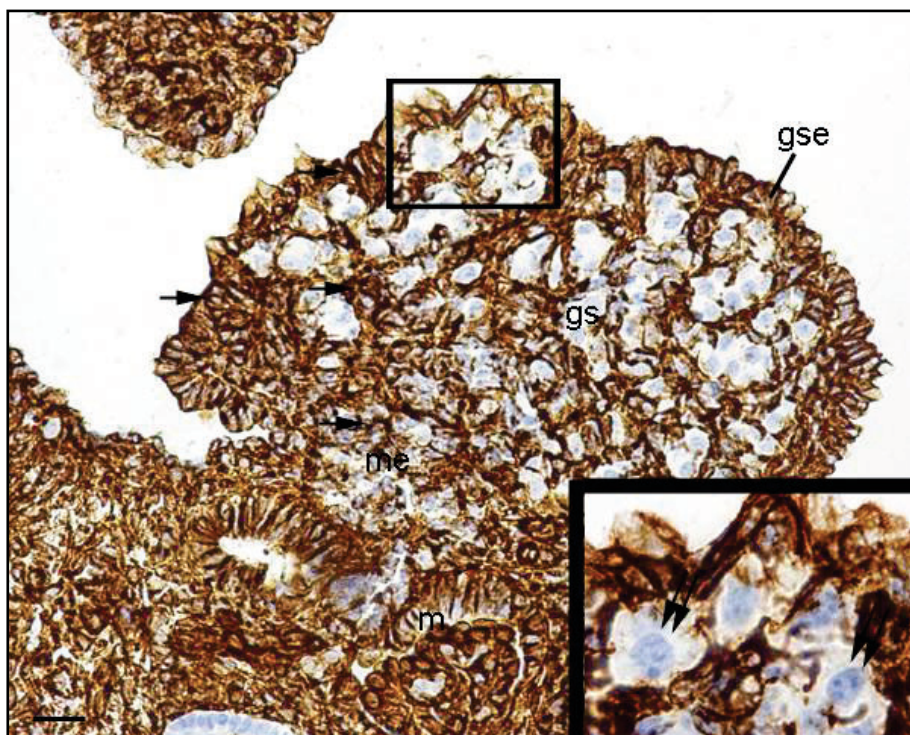
Tijekom petog i šestog razvojnog tjedna vimentin dominira u stanicama strome, dok je slabo izražen u površinskom epitelu. Imunohistokemijskim bojenjem na vimentin pozitivne stanice imaju smeđe obojenje intermedijarnih filamenata u citoplazmi te posebno oko jezgre u obliku perinuklearnog prstena. Neke spolne prstanice su vimentin negativne, a neke su vimentin pozitivne. Vimentin pozitivne stanice prisutne su i u obližnjim strukturama mezonefroza (Slika 41).



Slika 41. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 6. tjednu razvoja: vide se vimentin pozitivne stanice (strelice) sa smeđe obojenom citoplazmom u stromi (gs), neke spolne prastanice su vimentin negativne (dvostruke strelice), a neke su vimentin pozitivne (vrhovi strelica); površinski epitel (gse), mezonefros (m). Imunohistokemijsko bojenje na vimentin. Povećanje 20×, ljestvica 35μm.

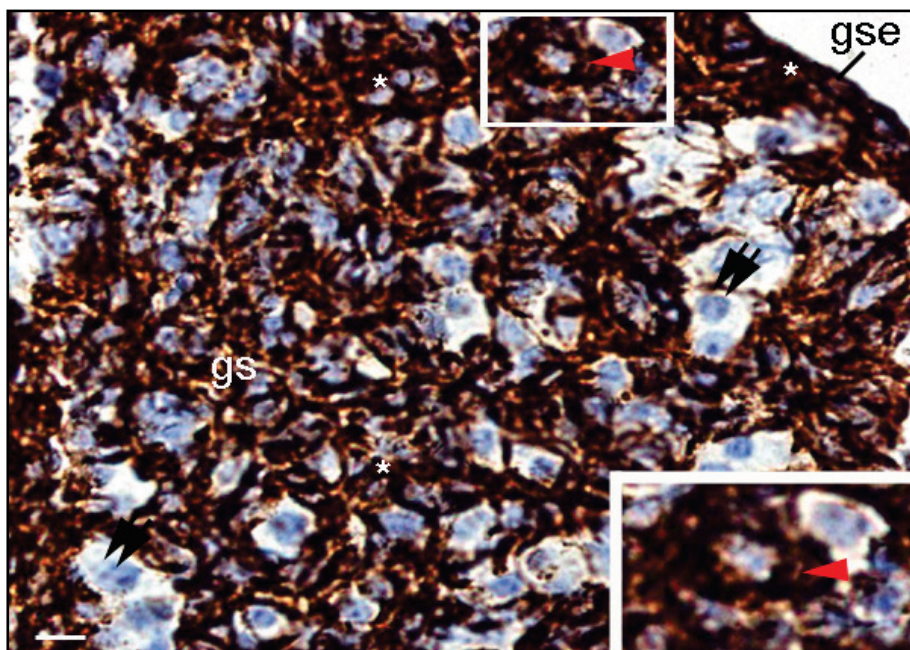
U sedmom i osmom tjednu razvoja većina stanica gonade su vimentin pozitivne, osim spolnih prastanica koje su uglavnom vimentin negativne (Slika 42).





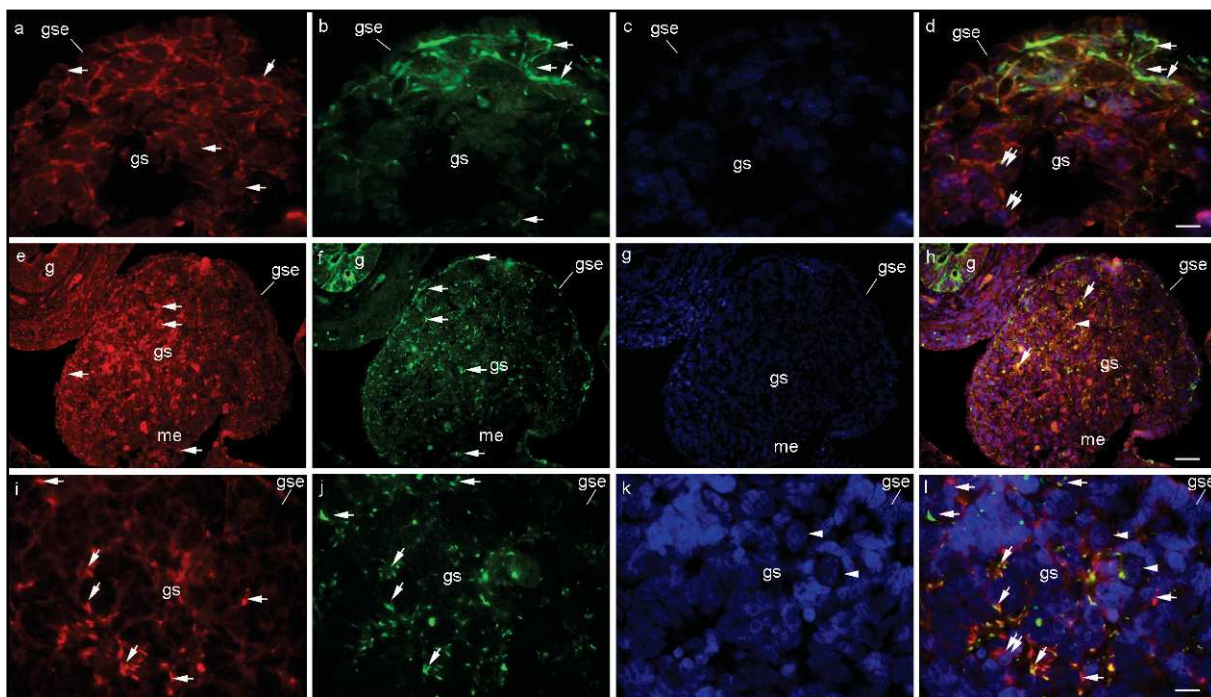
Slika 42. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 7. tjednu razvoja: vimentin pozitivne stanice površinskog epitela (gse), strome (gs) i medule (me) označene su strelicama. Spolne prstanice su vimentin negativne (dvostruke strelice u uvećanom okviru); mezonefros (m). Imunohistokemijsko bojenje na vimentin. Povećanje 20 $\times$ , ljestvica 35 $\mu$ m.

U devetom razvojnem tjednu vimentin ima izrazito jak izražaj u svim stanicama gonade. Spolne prstanice i dalje su uglavnom negativne, međutim i dalje neke spolne prstanice imaju znatan izražaj vimentina (Slika 43).



Slika 43. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka u 8. tjednu razvoja: vimentin pozitivne stanice površinskog epitela (gse) i strome (gs) označene su bijelim zvjezdicama; vimentin negativne spolne prastanice (dvostruke strelice), vimentin pozitivna spolna prastanica (vrh crvene strelice) prikazana je u uvećanom okviru. Imunohistokemijsko bojenje na vimentin. Povećanje 40 $\times$ , ljestvica 25 $\mu$ m.

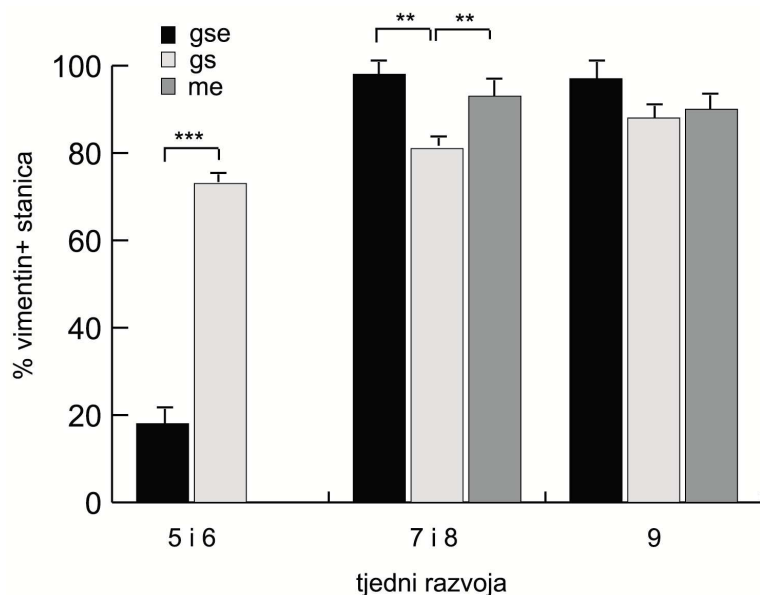
Trostrukim imunofluorescentnim bojanjem na vimentin, citokeratin 8 i DAPI u petom i šestom tjednu razvoja vidljiva je dominacija izražaja vimentina u stromi gonade, a citokeratina 8 u površinskom epitelu. Iako su spolne prastanice uvijek citokeratin 8 negativne i uglavnom vimentin negativne, ipak su neke od njih vimentin pozitivne. U dijelu somatskih stanica vimentin i citokeratin 8 su kolokalizirani, što upućuje na moguću epitelno mezenhimsku preobrazbu (Slika 44 a-d). U sedmom i osmom tjednu razvoja nastavlja se prisustvo kolokalizacije vimentina i citokeratina 8 u somatskim stanicama, dok neke spolne prastanice i dalje pokazuju izražaj vimentina (Slika 44 e-h). U ranom fetalnom razdoblju većina spolnih prastanica su vimentin negativne, uz tek poneku vimentin pozitivnu spolnu prastanicu što upućuje na smanjenje uloge vimentina u oblikovanju i daljnjem ponašanju spolnih prastanica (Slika 44 i-l).



Slika 44. Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 6 tjedana (a-d). Vimentin pozitivne stanice vidljive su u gonadalnoj stromi (gs) i epitelu (gse), a označene su strelicama (a). Citokeratin 8 pozitivne stanice (strelice) dominiraju u površinskom epitelu (gse), ali su pozitivne (strelica) i u nekim stanicama strome (gs) (b). Sve jezgre su DAPI-jem obojene plavo (c). Preklapanjem slika a-c vidljiva je međusobna dinamika izražaja vimentina i citokeratina 8. Neke spolne prastanice su samo vimentin pozitivne (dvostruke strelice), dok su neke stanice površinskog epitela (gse) samo citokeratin 8 pozitivne (položene strelice), a neke stanice imaju kolokalizaciju vimentina i citokeratina 8 u istoj stanici (kosa strelica) (d). Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 7 tjedana (e-h). Vimentin pozitivne stanice vidljive su u gonadalnoj stromi (gs), epitelu (gse) i meduli (me) (strelice) (e). Citokeratin 8 pozitivne stanice (strelice) prisutne su i dalje u površinskom epitelu (gse), ali su pozitivne i u mnogim stanicama strome (gs) te nešto manje u meduli (me) (f). Sve jezgre su DAPI-jem obojene plavo (g). Preklapanjem slika e-g vidljivo je kako neke folikularne stanice strome (gs) imaju kolokalizaciju vimentina i citokeratina 8 (kose strelice). Neke spolne prastanice samo su vimentin pozitivne (vrh strelice); crijevo (g) (h). Presjek kroz spolnu žlijezdu ljudskog zametka starog 9 tjedana (i-l). Vimentin pozitivne stanice vidljive su u gonadalnoj stromi (gs) i epitelu (gse), a označene su strelicama (i), kao i citokeratin 8 pozitivne stanice (strelice) (j). Sve jezgre su DAPI-jem obojene plavo, a jezgre spolnih prastanica označene su vrhovima strelica (k). Preklapanjem slika i-k vidljiva je međusobna dinamika izražaja vimentina i citokeratina 8. Neke spolne prastanice samo su vimentin pozitivne (dvostruke strelice), dok su neke stanice površinskog epitela (gse) i strome (gs) ili

samo vimentin pozitivne ili samo citokeratin 8 pozitivne (položene strelice). Druge imaju kolokalizaciju obaju biljega u folikularnim stanicama (kose strelice); vimentin negativne spolne prastanice (vrhovi strelice) (l). Trostruko imunofluorescentno bojenje na vimentin, citokeratin 8 i DAPI. Povećanje 100× (a-d; i-l), ljestvica 10μm, povećanje 40× (e-h), ljestvica 25μm.

Izražaj vimentin bjelančevine u površinskom epitelu gonade značajno se povećava tijekom istraživanih razdoblja (s 18% na 97%), dok je u stromi izražaj iznimno visok već u petom i šestom tjednu i iznosi 73% te se nastavlja povećavati na 88% u devetom tjednu razvoja. Medula ima najveći izražaj vimentina u sedmom i osmom tjednu razvoja (93%). Postoje statistički značajne razlike u broju vimentin pozitivnih stanica između površinskog epitela i gonadalne strome od petog do osmog tjedna, također i između strome i medule u sedmom i osmom tjednu razvoja (Slika 45).



Slika 45. Raspodjela vimentin pozitivnih stanica u površinskom epitelu gonade (gse), stromi gonade (gs) i meduli (me) tijekom razvoja gonade (5.- 9.tjedan). Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (okomita crta). Statistički značajne razlike (t-test za 5./6. tjedan i Kruskal-Wallis za 7./8. i 9. tjedan razvoja) prikazani su sa: \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001 (N=43-81).

## 5. RASPRAVA

Spolne žlijezde razvijaju se od bipotentne epitelno-mezenhimske osnove u koju migriraju spolne prstanice. Već tijekom migracije spolne prstanice prolaze kroz procese proliferacije i apoptoze, no u trenutku kada konačno nasele spolne nabore (peti i šesti tjedan embrionalnog razvoja), još uvijek imamo indiferentnu gonadu koja će tek krajem sedmog tjedna razvoja početi pokazivati jasnije morfološke znakove spolne diferencijacije. Dosadašnje spoznaje o regulaciji procesa proliferacije, staničnog preživljenja te programirane smrti stanice u gonadama uglavnom su stečene na pokusnim životinjama i kulturama stanica, dok su u ljudi uglavnom istraživane fetalne i postnatalne gonade. Stoga postoji vrlo malo podataka o ovim procesima u humanoj gonadi, naročito u embrionalnom i ranom fetalnom razdoblju koje je istraženo u ovom radu.

### 5.1. Dinamika procesa proliferacije i staničnog preživljenja u razvoju gonade

Procesi proliferacije i apoptoze prisutni su tijekom indiferentnog stadija i stadija rane diferencijacije humane gonade. Proliferacija je prisutna u svim staničnim populacijama, pretežno u kortikalnim dijelovima gonade u razvoju. Za vrijeme istraživanog razdoblja broj proliferirajućih stanica površinskog epitela i strome isprva se značajno uvećavao, a zatim se početkom fetalnog perioda broj Ki-67 pozitivnih stanica površinskog epitela smanjivao. Vjerujemo da je val proliferacije ispočetka bio povezan s nastajanjem primarnih spolnih tračaka, a kasnije s razvojem sekundarnih spolnih (kortikalnih ili medularnih) tračaka, karakterističnih za rani razvoj ovarija ili testisa. Naime, obje generacije spolnih tračaka nastaju proliferacijom površinskog epitela i uvećanjem kortikalnog dijela, što dovodi do rasta i uvećanja cijele gonade. Medularni dio (koji nastaje u sedmom tjednu razvoja) ima znatno niži proliferacijski indeks u odnosu na kortikalnu regiju. To je vjerojatno povezano s ranom diferencijacijom ovarija u kojima medula postupno regredira, dok se tijekom razvoja testisa medularni tračci u cijelosti razvijaju. Novi val mitotske i apoptotske aktivnosti u gonadama zapažen je u osamnaestom tjednu razvoja ljudskog jajnika (81).

U istraživanju Trauta i suradnika 2002. godine provedenog na mišjim gonadama pokazalo se da je Ki-67 bio izražen u fetalnim ovarijima u mejocitama (43), uglavnom u nukleolusu, dok u

mirujućim oocitama nije bilo izražaja Ki-67. Istovremeno s proliferacijom i rastom rane ljudske spolne žlijezde, u različitim staničnim populacijama bili su prisutni i drugi čimbenici uključeni u kontrolu broja stanica i staničnu smrt.

P53 bio je prisutan samo u jezgrama spolnih prastanica, naročito za vrijeme degeneracije primitivnih spolnih tračaka (sedmi i osmi tjedan razvoja). U ranom fetalnom razdoblju samo je nekoliko spolnih prastanica (unutar seminifernih tračaka) zadržalo p53 reaktivnost. Vjerujemo da p53 može služiti isključivo za kontrolu broja spolnih prastanica (naročito kod eliminacije primitivnih spolnih tračaka), ali ne i za eliminaciju drugih populacija stanica u razdoblju najranijih razvojnih stadija humane indiferentne gonade.

Dokazano je da proapoptotski p53 gen ima važnu ulogu u folikularnoj atreziji tijekom reproduktivnog životnog razdoblja (72) te da služi kao čuvar staničnog genoma od različitih pogubnih utjecaja (64). Oštećenje DNK uzrokuje brzo povećanje koncentracije bjelančevinskih produkata p53 gena, ali ukoliko je oštećenje opsežno, daljnje povećanje p53 potiče apoptotski mehanizam u svrhu očuvanja genetske homeostaze. Slično našim rezultatima na ljudskim gonadama, pokusni nalazi pokazuju da je p53 izražen u zametnim stanicama i tijesno vezan uz njihovo preživljenje. Međutim, izražaj p53 bjelančevine također je dokazan u degeneriranim granulosa stanicama atreličnih antralnih folikula ljudi i štakora (48, 53). Naši rezultati također pokazuju da AIF i p53 mogu biti važni u odstranjivanju određenog broja spolnih prastanica tijekom migracije te da u nekim stanicama djeluju zajedno s kaspazom-3, dok u drugim stanicama djeluju samostalno. Slično p53, pokazalo se da i AIF i bax imaju važnu ulogu u kontroli broja spolnih prastanica u najranijim stadijima razvoja humane gonade. Prethodne pokusne studije pokazale su da p53 može kontrolirati bazalni nivo izražaja AIF-a (74) i bax-a (140). P53 povećava osjetljivost stanica na kaspaza neovisnu staničnu smrt preko pozitivne regulacije izražaja AIF-a. Međutim, regulacija izražaja AIF-a preko p53 vjerojatnije ima citoprotektivnu funkciju, preko njegove uloge u sastavljanju respiratornog kompleksa I, nego u poticanju apoptoze. Pokusi u kulturama stanica pokazali su kako bax ima izražaj i u stanicama u kojima je p53 gen inaktiviran te kako razinu bax-a i njime posredovanu apoptozu stanica mogu povećati i p53 neovisni apoptotski stimulansi poput glukokortikoida (141, 142). Stoga možemo zaključiti da pojačan izražaj bax-a posredstvom p53 vjerojatno služi u pojačanju učinkovitosti apoptotskih signala, ali ne određuje hoće li stanica živjeti ili umrijeti. Ovim istraživanjem, kolokalizacijom bax-a i bcl-2 u istim stanicama, dokazano je da stanice koje imaju apoptotski potencijal (izražaj bax-a) ne moraju nužno ići u apoptozu, nego mogu živjeti zahvaljujući anti-apoptotskoj protuteži

(izražaj bcl-2). Pojačan izražaj bax bjelančevine doprinosi otpuštanju medijatora i kaspaza ovisne i neovisne stanične smrti, uključujući citokrom c, endonukleazu G i AIF (114), stoga je izvjesnije da je učinkovitost AIF-a u odstranjivanju viška spolnih prastanica potaknuta pojačanim izražajem bax-a, nego p53.

U našem istraživanju izražaj bax bjelančevine prisutan je tijekom cijelog razdoblja, posebno u zametnim stanicama i najizraženiji je u sedmom i osmom tjednu razvoja što bi moglo, kao i u slučaju pojačane p53 reaktivnosti, biti povezano s nestankom primarnih spolnih tračaka i smanjenjem ukupnog broja zametnih stanica u ranom fetalnom razdoblju. Propadanje spolnih prastanica apoptozom koje se pojačava u sedmom i osmom tjednu razvoja može nastati zbog kromosomskih abnormalnosti kao posljedica izrazite proliferacije u ovom razdoblju ili jednostavno zbog postizanja optimalnog broja spolnih prastanica uslijed njihove pretjerane produkcije.

Bax reaktivnost je prisutna i u ostalim staničnim populacijama rane ljudske gonade te stoga doprinosi i kontroli broja njihovih stanica. U studiji Vaskivuo i suradnika na ljudskim ovarijima dokazan je izražaj proapoptotske bax bjelančevine tijekom čitavog fetalnog razdoblja u pratećim stanicama, a u oocitama tek u kasnijem fetalnom razdoblju (105, 111). U zametnim stanicama ranih mišjih embrija te kulturama stanica mišjih gonada nije dokazan izražaj bax bjelančevine, dok je u kasnijem embrionalnom i fetalnom razdoblju prisutan njegov snažan izražaj (143). Studije na genetski modificiranim miševima pokazale su da potpuni nedostatak proapoptotske bjelančevine bax vodi povećanju broja oocita i primordijalnih folikula u usporedbi s „divljim tipom“ (110), no mišice nakon rođenja pokazuju normalan fenotip i duže očuvan fertilitet nego što bi odgovaralo njihovoj kronološkoj dobi (115). S druge strane, pojačan izražaj proapoptotske bjelančevine bax uzrokuje smrt granulosa stanica i atreziju folikula štakora (116) i čovjeka (113), a u suglasnosti je i s našim rezultatima o prisutnosti bax-a u somatskim stanicama gonade.

Pojačan izražaj anti-apoptotskih članova bcl-2 obitelji izgleda da prevenira otpuštanje AIF-a i posljedičnu staničnu smrt (94). AIF dakle posreduje kaspaza neovisnu staničnu smrt kaskadom apoptotske reakcije koja u jezgri formira kromatin degradirajući kompleks i sudjeluje u stvaranju apoptotskih tjelešaca, kondenzaciji kromatina i fragmentaciji DNK (49).

U ovom istraživanju kaspaza-3 je dokazana u svim staničnim populacijama gonada, za razliku od p53. Isprva je bila prisutna u svim područjima ranog gonadalnog primordiuma, ali u kasnijim stadijima (sedmi i osmi tjedan) kaspaza-3 pozitivne stanice prevladavaju u meduli.

Dakle, ovaj tip stanične smrti mogao bi služiti za uklanjanje medularnih dijelova primitivnih spolnih tračaka (spolnih prastanica i okolnih stanica u spolnim tračcima).

U ranom fetalnom razdoblju kaspaza ovisna stanična smrt prisutna je u svim staničnim populacijama u svim područjima gonade u razvoju. Brojne su studije pokazale da apoptotska kaskadna reakcija može biti potaknuta unutarnjim (mitohondrijskim) ili vanjskim (preko receptora smrti) putem (51, 52). Apoptotski proces ima ključnu ulogu tijekom razvoja i u održavanju homeostaze tkiva (44), bez obzira odvija li se kaspaza ovisnim ili kaspaza neovisnim putem (48). Za vrijeme apoptotske reakcije mitohondriji mogu otpustiti kaspaza-3 neovisne čimbenike stanične smrti poput citokroma c, AIF-a i endonukleaze G (48, 53, 54). Kao što je ranije navedeno, opsežan gubitak zametnih stanica uslijed apoptoze dokazan je tijekom prenatalne oogeneze i spermatogeneze miševa (57-59). Kaspaza-3 bila je prisutna u granulosa stanicama degeneriranih antralnih folikula u mišjim i ljudskim ovarijima. Promijenjeni i atretični folikuli bili su pronađeni i kod kaspaza-3 mutiranih mišica. Zaključeno je da je kaspaza-3 funkcionalno neophodna za apoptozu granulosa stanica tijekom folikularne atrezije, dok kod apoptoze zametnih stanica ovarija ovaj enzim nije funkcionalno neophodan.

Ovaj je nalaz u suglasnosti s rezultatima dobivenim u našoj studiji. Dokazan je pojačan izražaj bax i AIF bjelančevine u spolnim stanicama te apoptoza zametnih stanica kaspaza neovisnim načinom, jer i bax i AIF mogu poticati i potiču kaspaza neovisnu apoptozu.

U odraslih žena aktivni oblik kaspaze-3 nije pronađen u primordijalnim, primarnim ni sekundarnim folikulima, nego samo u velikim antralnim folikulima s mikroskopskim znakovima atrezije. Također, atretični folikuli bili su jedine ovarijske strukture u kojima je TUNEL postupkom dokazano odvajanje DNK (144). Kaspaza-3 naročito je bila izražena u uzorcima ljudskih jajnika u osamnaestom i devetnaestom tjednu razvoja, dok je u uzorcima dvadesetog tjedna izražaj bio znatno manji. U našem istraživanju dokazana je kaspaza-3 u zametnim stanicama već tijekom embrionalnog razdoblja, što je u suglasnosti sa studijom Fultona i suradnika koji sugeriraju da zametne stanice u gonadama koje ne dospiju u naizgled zaštitničko okruženje primordijalnih folikula pokazuju povećanje mitotske i apoptotske aktivnosti (81).

Dvostrukim imunofluorescentnim bojenjem na bcl-2 i bax bjelančevinu u našoj je studiji ustanovljen dominantan izražaj bcl-2 bjelančevine u folikularnim i pratećim stanicama, dok su spolne prastanice i epitelne stanice površinskog epitela uglavnom samo bax pozitivne. Samo



mali broj folikularnih i spolnih prastanica pokazuje istodobni izražaj bcl-2 i bax bjelančevine u istoj stanici, što je u skladu s funkcijom gena za bax i bcl-2 čija ravnoteža izražaja ima ključnu ulogu u određivanju opstanka ili programirane smrti stanice (145, 146). Naime, bcl-2 može spriječiti pokretanje apoptotskog mehanizma na razini mitohondrija tvoreći heterodimere s bax-om (100, 147) ili nakon što bax inducira stvaranje pora u membrani mitohondrija (148). Također, nizak bcl2/bax omjer može predodrediti stanicu za apoptozu (149). U našem istraživanju untarstanični čimbenik bcl-2 štiti uglavnom somatske stanice od apoptoze i izražen je u petom i šestom tjednu razvoja u svim staničnim linijama, u sedmom i osmom tjednu nema ga isključivo u spolnim prastanicama, što upućuje kako se u ovom razdoblju događa pojačano propadanje spolnih prastanica vjerojatno pod utjecajem snažnog izražaja p53 bjelančevine i povećanja izražaja bax-a i AIF-a. Propadanje spolnih prastanica nastavlja se i u ranom fetalnom razdoblju jer je bcl-2 izražaj prisutan uglavnom u folikularnim stanicama te samo manjim dijelom u spolnim prastanicama, što bi moglo (kao i u slučaju pojačane reaktivnosti bax-a, kaspaze-3 i AIF-a) biti povezano s nestankom primarnih spolnih tračaka i padom ukupnog broja spolnih prastanica u ranom fetalnom razdoblju. Naši su rezultati u suglasnosti sa studijama na ovarijima mišjeg embrija gdje se pokazalo odsustvo izražaja bcl-2 bjelančevine u zametnim stanicama, kao i u kulturama stanica istog porijekla (143). Sukladno našim rezultatima, u studiji Quenbyja i suradnika na ljudskim zametcima (6.-12. gestacijski tjedan) tijekom svih istraživanih razdoblja nije bilo izražaja bcl-2 u zametnim stanicama, a utvrđeno je prisustvo ovog antiapoptotskog čimbenika u populacijama somatskih stanica (150).

## 5.2. Značaj intermedijarnih filamenata citokeratina 8 i vimentina u razvoju gonade

U našem radu citokeratin 8 prisutan je tijekom cijelog istraživanog razdoblja u svim staničnim linijama gonade osim u zametnim stanicama, što je u skladu s prethodnim istraživanjima na štakorskim i mišjim modelima u kojima je prisustvo citokeratina utvrđeno rano tijekom embriogeneze (128, 135, 151-154). Rana pojava citokeratina 8 ukazuje na njegovu važnost tijekom embrionalne faze razvoja gonade, jer njegov potpuni nedostatak dovodi do smrti mišjih embrija, što je potvrđeno na modelima miševa s inaktiviranim genom za citokeratin 8 (*eng.* knock out) (126). Citokeratin 8 ima antiapoptotsku ulogu (121, 122) i uključen je u signalne puteve povezane sa staničnim preživljenjem (123) te je izražen u stanicama koje su predodređene za daljnju diferencijaciju. Ova je studija dokazala odsustvo izražaja citokeratina 8 tijekom svih istraživanih razdoblja u populaciji zametnih stanica, što je

s obzirom na njegovu antiapoptotsku ulogu u suglasnosti s povećanim propadanjem zametnih stanica (113) u razvoju gonade čemu svjedoči i pojačan izražaj proapoptotske bax bjelančevine u zametnim stanicama. Odsustvo citokeratina 8 u zametnim stanicama gonada u razvoju također je dokazano u mnogim prethodnih studijama (135, 152, 155, 156), dok je u suprotnosti rezultat studije Santini i suradnika gdje je pronađen izražaj citokeratina 8 u spolnim stanicama, ali ne tijekom embrionalnog razvoja nego u kasnih fetalnih i adultnih humanih ovarija (157).

Porast izražaja citokeratina 8 u gonadi prati sazrijevanje i diferencijaciju gonade, stoga je i najveći upravo u ranom fetalnom razdoblju. Pojava citokeratina (i nestanak dezmina) u prekursorima Sertolijevih stanica štakora povezana je s početkom njihove epitelne diferencijacije kao prvi morfološki znak spolnog određivanja testisa (158). U gonadama štakora citokeratin 8 prisutan je tijekom cijelog prenatalnog razdoblja i u ranom postpartalnom periodu (135).

Vimentin bjelančevina pozitivna je tijekom cijelog istraživanog razdoblja, naročito od sedmog tjedna razvoja gonade i to u većini somatskih i samo u nekim spolnim prastanicama, što ukazuje na važnu ulogu vimentina u izgradnji citoskeleta prikladnog za eventualnu migraciju stanica unutar gonade. Naime, utvrđeno je kako citoplazma zametnih stanica koristi citoskeletalne elemente poput vimentina kao važne izvore bjelančevina za izgradnju citoarhitekture stanice neophodne za njenu migraciju (159). Ovoj pretpostavci doprinosi i činjenica da je vimentin u bliskom kontaktu s jezgrom stanice kojoj daje mehaničku potporu i drži je na željenom mjestu u stanici te ima funkcionalnu ulogu u uspostavi polarnosti i citoarhitekture stanice (160, 161). Izražaj vimentina u spolnim stanicama potvrđen je i u studiji Tanga i suradnika koji su dokazali njegov izražaj u oocitama žabe (159). U kasnijem razvoju slab izražaj vimentina u zametnim stanicama doprinosi propadanju zametnih stanica zbog uključenosti vimentina u signalne puteve povezane sa staničnim preživljenjem (123).

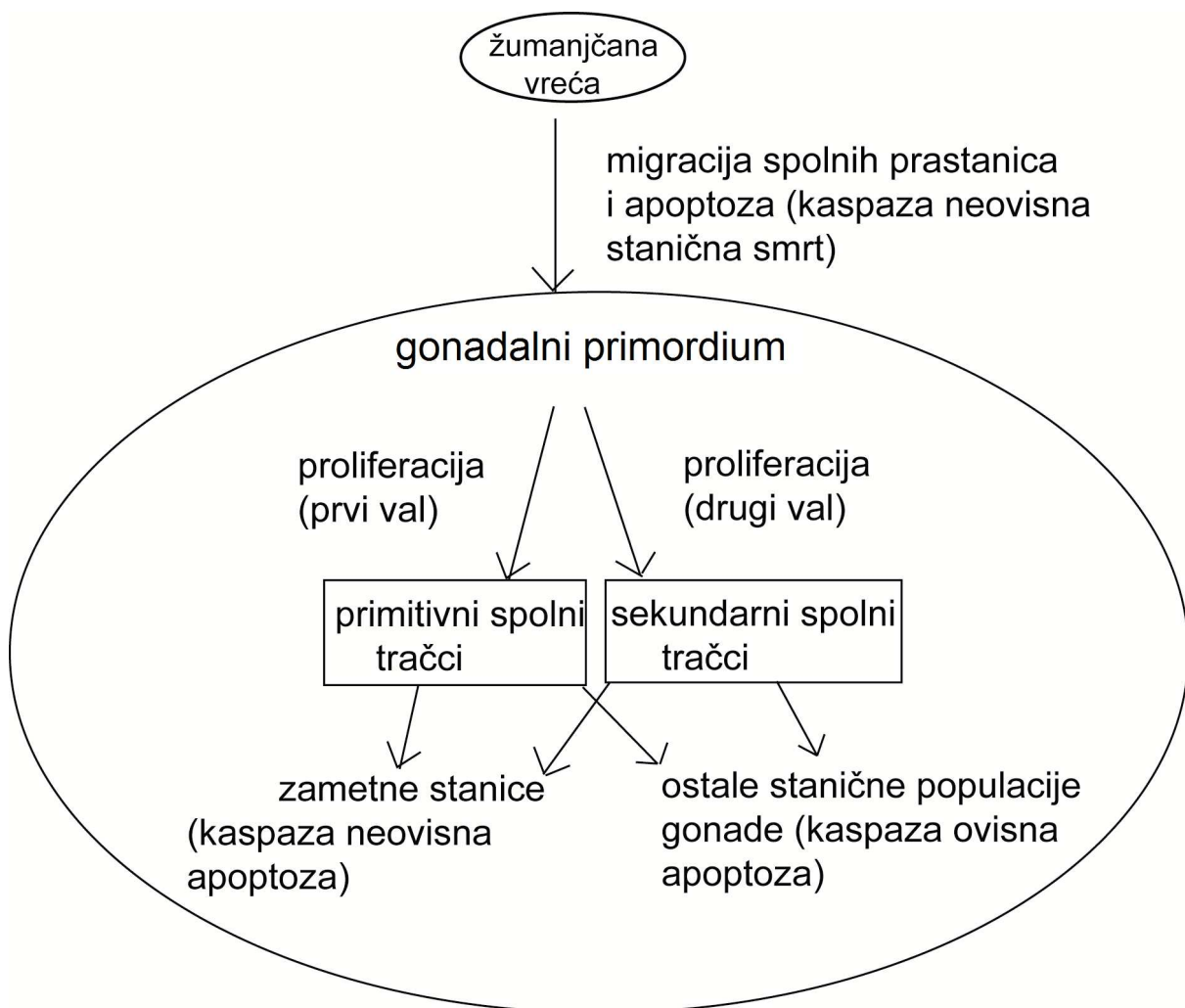
Izražaj citokeratina 8 kao biljega epitelnih stanica u stromi i meduli gonade upućuje na porijeklo somatskih stanica gonade i govori u prilog proliferacije celomskog epitela i njegovog urastanja u mezenhim gonade (spolni tračci), kako se tradicionalno opisuje u embriološkim knjigama (1, 162). S druge strane, ovom nalazu proturječi dominantan izražaj vimentina, kao biljega mezenhimskih stanica, posebno od sedmog tjedna razvoja pa nadalje (80% do 98% pozitivnih stanica), što ukazuje na mezenhimsko porijeklo somatskih stanica strome i medule gonade. Nedoumice oko epitelnog ili mezenhimskog porijekla somatskih stanica gonade dodatno naglašava i činjenica kako porijeklo folikularnih epitelnih stanica

gonade još uvijek nije u potpunosti utvrđeno te se predlažu tri moguća izvora njihovog podrijetla: celomski epitel, mezenhim mezonefrosa ili kombinacija celomskog epitela i mezenhima mezonefrosa. U našem radu izražaj citokeratina 8 od petog do devetog tjedna razvoja upućuje na diferencijaciju stanica s osobinama epitela, stoga ne iznenađuje njegova dominacija upravo u površinskom epitelu gonade. Izražaj u stromi gonade (naročito u sedmom i osmom tjednu) povezan je s urastanjem i proliferacijom celomskog epitela u mezenhim gonade kod stvaranja spolnih tračaka. Navedeno upućuje na epitelno podrijetlo folikularnih stanica. Dominantni izražaj vimentina (biljeg mezenhimskih stanica) prilog je teoriji o podrijetlu folikularnih stanica iz mezenhima mezonefrosa, što potvrđuje i studija Mora i suradnika (154). Obzirom na navedeno, vjerojatno je da folikularne stanice gonade potječu iz obaju izvora (celomskog epitela i mezenhima mezonefrosa). Dokazano je prisustvo dvaju različitih tipova folikularnih stanica (svijetlih, mezenhimskog porijekla i tamnih, porijeklom iz celomskog epitela) u ranom folikularnom epitelu (163), što potvrđuju i naši rezultati. S druge strane, kolokalizacija izražaja citokeratina 8 i vimentina u istim somatskim stanicama u ovoj studiji tijekom cijelog istraživanog razdoblja ukazuje i na mogućnost epitelno-mezenhimske i mezenhimsko-epitelne preobrazbe unutar gonade, jer je u tom razdoblju u tijeku migracija spolnih prastanica i epitelna morfogeneza, odnosno stvaranje spolnih tračaka (medularnih i kortikalnih) (135). Naime, tijekom embriogeneze, epitel se smatra iznimno plastičnim s mogućnošću ponovne preobrazbe prema mezenhimu i obrnuto, iz mezenhima prema epitelu (164). Epitelne stanice tipično su polarizirane, nepokretne stanice, koje su usidrene na bazalnu membranu. Epitelno-mezenhimskom preobrazbom epitelne stanice gube svoje tijesne spojeve, reorganiziraju citoskelet u smislu mezenhimske stanice te stječu jedan invazivan fenotip koji omogućuje migraciju (165). U odraslom organizmu epitelno-mezenhimska preobrazba podloga je za metastatsko širenje karcinoma, a pojavljuje se i u procesima zacjeljivanja rana i regeneracije tkiva (165). Dakle, biološka je podloga epitelno-mezenhimske preobrazbe stvaranje stanica s različitim fenotipom i tkivnom funkcijom kako bi se olakšala migracija stanica i njihova invazija u okolno tkivo. Tijekom embrionalnog razvoja epitelno-mezenhimska preobrazba ima kritičnu ulogu u stvaranju prvog seta mezenhimskih stanica (primarni mezenhim) iz kojih se diferencira sekundarni epitel putem mezenhimsko-epitelne preobrazbe, što je dokazano i u razvoju bubrega (166).

Naši rezultati kolokalizacije izražaja citokeratina 8 i vimentina u istim somatskim stanicama gonade u suglasnosti su i s nalazima studije Fridmachera i suradnika na gonadama štakora gdje su citokeratin 8 i vimentin kolokalizirani u istim somatskim stanicama indiferentne gonade koje u tom razdoblju još nisu organizirane u epitelne strukture (135). Zamjena

bjelančevina karakterističnih za epitelno tkivo bjelančevinama mezenhimskih stanica nastaje kao posljedica diferencijacije somatskih stanica u spolnim naborima (167). Zajednički izražaj mezenhimskih i epitelnih intermedijarnih filamenata prolazna je fiziološka osobitost u fetalnim i ranim postpartalnim gonadama štakora (153), fetalnim kravljim ovarijima (168) i fetalnim testisima čovjeka (134), a smatra se izrazom sazrijevanja tih organa. U stanicama dolazi do promjene sastava unutarstaničnih bjelančevina i aktivacije gena za bjelančevine zrelih intermedijarnih filamenata. Izražaj citokeratina 8 (u paru s citokeratinom 18) te vimentina prisutan je i u Sertolijevim stanicama zdravog ljudskog fetalnog (9. tjedan razvoja) testisa pa sve do sredine prenatalnog razdoblja kada citokeratini iščeznu iz Sertolijevih stanica, a njihov ponovni izražaj pojavljuje se samo u patološkim uvjetima (132).

Zaključno, ova studija pokazuje da tijekom indiferentnog razdoblja razvoja ljudskih spolnih žlijezda proces proliferacije omogućuje stvaranje primarnih spolnih tračaka koji postupno iščeznu i kasnije ih zamijeni druga generacija (kortikalnih ili medularnih) spolnih tračaka (Slika 46).



## Slika 46. Shematski dijagram razvoja ljudske gonade

Intenzivna proliferacija svih staničnih populacija neophodna je za rast i uvećanje rane humane gonade. Tijekom najranijih razvojnih razdoblja spolne prastanice ulaze u spolne nabore i nasele ih, zatim se postupno pripoje spolnim tračcima.

Tijekom procesa migracije spolne prastanice pokazuju koekspresiju protutijela za kaspazu-3 i AIF koja su kolokalizirana samo u navedenom razdoblju. Prateći njihovu daljnju sudbinu u primordijalnoj gonadi uočljivo je da se pojavljuju zasebno u različitim staničnim populacijama. AIF je uglavnom izražen u spolnim prastanicama, kao i bax bjelančevina. Kaspaza-3 pronađena je u svim staničnim populacijama (uključujući površinski epitel gonade i stromu, kao i u stanicama koje tvore spolne tračke), za razliku od p53 koji je bio izražen isključivo u spolnim prastanicama. U petom i šestom tjednu razvoja bcl-2 bjelančevina štiti od apoptoze sve stanične linije gonade, dok kasnije štiti somatske stanice te vrlo mali broj spolnih prastanica u ranom fetalnom razdoblju, omogućujući tako proapoptotskim čimbenicima provođenje apoptoze koja dominira u spolnim prastanicama. Citokeratin 8 i vimentin izraženi su u stanicama koje su predodređene za daljnju diferencijaciju. U populaciji zametnih stanica izražaj citokeratina 8 je odsutan. Vrlo malo zametnih stanica pozitivno je na vimentin, koji koriste kao važan izvor bjelančevina neophodnih za njihovu migraciju. Kolokalizacija citokeratina 8 i vimentina sugerira epitelno-mezenhimsku i mezenhimsko-epitelnu transformaciju kao važne procese u normalnom embrionalnom razvoju.

Temeljem rezultata našeg istraživanja možemo pretpostaviti da broj spolnih prastanica prvenstveno ovisi o ravnoteži p53, AIF-a i bax-a, vodeći kaspaza neovisnoj staničnoj smrti. Druge stanične populacije, uključujući stanice površinskog epitela, strome i spolnih tračaka, izgleda da umiru kaspaza ovisnom staničnom smrti. Naši rezultati pokazuju da oba puta stanične smrti djeluju u vrijeme ranog razvoja humane gonade, ali ovisno o vrsti stanice i razdoblju razvoja razlikuje se njihov intezitet.

## 6. ZAKLJUČCI

- Imunohistokemijskim i imunofluorescentnim postupcima dokazano je istovremeno prisustvo proliferacijskih (Ki-67), proapoptotskih (p53, bax, kaspaza-3, AIF) i antiapoptotskih (bcl-2) čimbenika te intermedijarnih filamenata (citokeratin 8 i vimentin) u različitim staničnim populacijama tijekom najranijih (embrionalno i rano fetalno) razvojnih razdoblja zdravih ljudskih spolnih žlijezda.
- Obrazac izražaja istraživanih bjelančevina ima tipičnu vremensko-prostornu raspodjelu ovisno o istraživanom razvojnom razdoblju i staničnoj populaciji.
- Za uredan rani (5.-9. tjedan) razvoj ljudskih spolnih žlijezda neophodan je uravnotežen odnos između proliferacijskih, apoptotskih i antiapoptotskih čimbenika po prvi put sustavno istraživanih u ovoj studiji.
- Proliferacijska aktivnost izražena biljegom Ki-67 prisutna je u svim staničnim linijama te se može zaključiti da je neophodna za rast i razvoj rane ljudske gonade.
- Proliferacijski indeks najveći je u kortikalnim dijelovima gonade dok medula (nastaje u 7. tjednu) ima nisku proliferacijsku aktivnost koja se snižava u razdoblju od 7. do 9. tjedna. Navedeno je vjerojatno u vezi s ranom diferencijacijom ovarija u kojem medularni dio postupno propada, dok se diferencijacijom testisa medularni tračci u cijelosti razvijaju.
- U razdoblju od 5. do 8. tjedna utvrđen je porast proliferacijske aktivnosti u stanicama površinskog epitela i strome, dok se u 9. tjednu smanjuje u površinskom epitelu, a u stromi nastavlja rasti. Navedeno se može povezati s razvojem spolnih nabora i primarnih spolnih tračaka kojima se pripoje novopridošle spolne pristanice (5./6. tjedan) koji postupno iščeznu i budu nadomješteni drugom generacijom spolnih tračaka (7./8. tjedan odnosno 9. tjedan razvoja).
- Izražaj p53 bjelančevine prisutan je tijekom cijelog istraživanog razdoblja u zametnim stanicama, najizraženiji je u 7./8. tjednu što bi moglo biti povezano s nestankom primarnih spolnih tračaka i padom ukupnog broja zametnih stanica u ranom fetalnom razdoblju. P53

reaktivnost nije prisutna u ostalim staničnim populacijama rane ljudske gonade. Na temelju navedenog može se pretpostaviti da p53 gen kontrolira broj zametnih stanica u razdoblju degeneracije primarnih spolnih tračaka, kao i da ne kontrolira broj stanica u drugim staničnim linijama rane ljudske gonade.

- Iako u malom postotku, izražaj kaspaze-3 (za razliku od p53) prisutan je u svim staničnim populacijama tijekom cijelog razdoblja istraživanja. Kaspaza-3 reaktivnost postupno opada u površinskom epitelu, dok se u meduli i zametnim stanicama povećava. Na temelju ovih rezultata vjerojatno je da stanice medularnih dijelova primarnih spolnih tračaka (zametne i prateće stanice) umiru kaspaza ovisnom staničnom smrću.
- Izražaj AIF bjelančevine u početnom dijelu razdoblja istraživanja zabilježen je u površinskom epitelu, a zatim uglavnom u spolnim prastanicama, a zajednički izražaj AIF-a i kaspaze-3 uočen je jedino za vrijeme putovanja spolnih prastanica u spolne nabore. Navedeno može ukazivati na to da bi broj spolnih prastanica prvenstveno mogao biti pod nadzorom osjetljive ravnoteže p53 i AIF gena vodeći posljedičnoj kaspaza neovisnoj staničnoj smrti.
- Izražaj bax bjelančevine prisutan je tijekom cijelog istraživanog razdoblja naročito u zametnim stanicama u 7./8. tjednu, što je vjerojatno (kao i u slučaju pojačane p53 reaktivnosti) povezano s nestankom primarnih spolnih tračaka i padom ukupnog broja zametnih stanica u ranom fetalnom razdoblju. Bax reaktivnost je prisutna i u ostalim staničnim populacijama rane ljudske gonade, stoga doprinosi i u kontroli broja stanica drugih staničnih linija rane ljudske gonade.
- Izražaj bcl-2 bjelančevine u 5./6. tjednu razvoja prisutan je u svim staničnim linijama, ali je u 7./8. tjednu odsutan isključivo u spolnim prastanicama, što upućuje na pojačano propadanje spolnih prastanica u ovom razdoblju, vjerojatno pod utjecajem snažnog izražaja p53 bjelančevine i posljedičnog povećanja izražaja bax-a, kaspaze-3 i AIF-a. Propadanje spolnih prastanica nastavlja se i u ranom fetalnom razdoblju jer je bcl-2 izražaj prisutan uglavnom u folikularnim stanicama te samo manjim dijelom u spolnim prastanicama. To bi moglo (kao i u slučaju pojačane reaktivnosti bax-a i AIF-a) biti povezano s nestankom primarnih spolnih tračaka i padom ukupnog broja spolnih prastanica u ranom fetalnom razdoblju.
- Kolokalizacija bcl-2 i bax-a potvrđuje dominantni izražaj bcl-2 bjelančevine u folikularnim i pratećim stanicama, dok su spolne prastanice i epitelne stanice površinskog epitela uglavnom samo bax pozitivne. Samo mali broj folikularnih i spolnih prastanica pokazuje istodobni izražaj bcl-2 i bax bjelančevine u istoj stanici.

- Dinamika izražaja raznih proapoptotskih čimbenika ukazuje na to da oba puta stanične smrti djeluju tijekom najranijih razdoblja razvoja ljudskih spolnih žlijezda, ali različitim intenzitetom, što ovisi o vrsti stanice i razdoblju razvoja.
- Izražaj citokeratin 8 bjelančevine prisutan je tijekom cijelog istraživanog razdoblja u svim staničnim populacijama, osim u zametnim stanicama, što je vjerojatno u vezi s povećanim propadanjem zametnih stanica. Citokeratin 8 uključen je u signalne puteve povezane sa staničnim preživljenjem. Izražen je u stanicama koje su predodređene za daljnju diferencijaciju, pa stoga i ima najveći izražaj upravo u ranom fetalnom razdoblju.
- Vimentin bjelančevina pozitivna je u većini somatskih i samo u nekim spolnim prastanicama tijekom cijelog istraživanog razdoblja, što ukazuje na njegovu važnu ulogu u oblikovanju i ponašanju ranih zametnih staničnih linija. U kasnijem razvoju vimentin ima jak izražaj u svim staničnim populacijama osim u većini zametnih stanica, što također govori u prilog povećanom propadanju zametnih stanica zbog uključenosti vimentina u signalne puteve povezane sa staničnim preživljenjem.
- Istodobna prisutnost vimentina i citokeratina 8 u istim somatskim stanicama tijekom razvoja upućuje na epitelno-mezenhimsku i mezenhimsko-epitelnu preobrazbu unutar gonade.



## 7. SAŽETAK

Primjenom imunohistokemijskih i imunofluorescentnih metoda istražena je raspodjela Ki-67, p53, kaspaze-3, AIF, bax, bcl-2, citokeratina 8 i vimentina u tkivima spolnih žlijezda 12 ljudskih zametaka starosti 5-9 razvojnih tjedana. Između 5. i 8. tjedna proliferacija (Ki-67) se povećavala u površinskom epitelu (26-52%) i stromi (19-42%), a zatim se smanjivala u površinskom epitelu spolne žlijezde (35%) tijekom 9. tjedna te u srži (15%-12%) između 7. i 9. tjedna. Tijekom 5. i 6. tjedna spolne prastanice bile su vrlo rijetko pozitivne na p53. U 7. i 8. tjednu njihova se reaktivnost značajno povećala, a zatim postupno smanjivala tijekom 9. tjedna. Istovremeno, stanična se reaktivnost na kaspazu-3 postupno smanjivala u površinskom epitelu, a povećavala u spolnim prastanicama i sržnom dijelu spolne žlijezde. Reaktivnost na kaspazu-3 dokazana je u različitim staničnim populacijama. AIF pozitivnost isprva se pojavljivala u stanicama površinskog epitela, a zatim uglavnom u spolnim prastanicama. Kolokalizacija AIF-a i kaspaze-3 dokazana je samo tijekom razdoblja migracije spolnih prastanica u spolne žlijezde. Bax pozitivne stanice bila su prisutne u stromi tijekom 7. i 8. tjedna (58%), s najvećim intenzitetom u spolnim prastanicama. Izražaj bcl-2 bjelančevine u površinskom epitelu neznatno se smanjivao tijekom istraživanog razdoblja (16% - 12%), dok je najveći izražaj nađen u stromi i srži tijekom 7. i 8. tjedna i to u svim staničnim populacijama osim spolnih prastanica. U 9. tjednu pojedine spolne prastanice također su bile bcl-2 pozitivne, a ponekad kolokaliziraju s bax-om. Citokeratin 8 bio je prisutan u površinskom epitelu u 5. i 6. tjednu (56%), zatim se izražaj prolazno smanjivao da bi se u 9. tjednu opet uvećao (92%). Stanice u stromi i srži bile su citokeratin 8 pozitivne, a spolne prastanice negativne. Izražaj vimentina povećavao se u površinskom epitelu (18-97%) i stromi (73-88%) između 5. i 9. tjedna. Izražaj vimentina najveći je u srži i to u 7. i 8. tjednu (93%). Vimentin i citokeratin 8 kolokalizirali su u dijelu somatskih stanica, dok su neke spolne prastanice bile vimentin pozitivne. Broj i raspodjela stanica koje su bile pozitivne na istraživane biljege mijenjali su se sukladno razvoju i propadanju spolnih tračaka tijekom indiferentnog te ranog fetalnog razdoblja razvoja spolnih žlijezda. Kontrola broja spolnih prastanica vjerojatno je posljedica uravnoteženog odnosa intermedijarnih filamenata i bcl-2 te proapoptotskih bjelančevina (p53, AIF i bax), uzrokujući njihovu kaspaza- neovisnu staničnu smrti. Druge stanične populacije u spolnoj žlijezdi najvjerojatnije odumiru kaspaza- ovisnom smrću stanica. U ranom razvoju spolnih žlijezda djeluju oba puta programirane stanične smrti, a njihov intenzitet ovisi o vrsti stanice i razvojnom razdoblju koje se promatra.

**Ključne riječi:** Ki-67, kaspaza, p53, AIF, bax, citokeratin 8, vimentin, gonada, embrio.

## 8. SUMMARY

### **The involvement of proliferation and apoptosis in the early human gonad development**

Distributions of the Ki-67, p53, caspase-3 and AIF, bax, bcl-2, cytokeratin 8 and vimentin markers were investigated in the 5<sup>th</sup> to 9<sup>th</sup> week developing gonads of 12 human conceptuses using immunohistochemical and immunofluorescent methods. Between the 5<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> developmental week, proliferation increased in the surface gonad epithelium (26-52%) and in the stroma (19-42%), but decreased thereafter in the surface epithelium (35%) during the 9<sup>th</sup> week and in the medulla (15%-12%) between the 7<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> week. Initially, primordial germ cells (PGC) were only rarely p53 positive. In the 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week, almost all PGC-s displayed p53 positivity, but their number decreased in the 9<sup>th</sup> week. Caspase-3 reactivity decreased in surface epithelium, but it increased in PGC-s and medullar cells and characterized different cell populations. AIF-positivity first appeared in the surface gonad epithelium and then predominantly in PGC. AIF and caspase-3 co-localized only during the migration of PGC-s into the gonad primordium. Bax-positivity appeared in all parts of the gonad, especially in the gonad stroma during the 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week (58%) with the highest intensity in PGC-s. Bcl-2 expression in surface epithelium decreased slightly during development (16% - 12%), while its highest expression remained in stroma and medulla during the 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week (49% and 82% respectively). In the 9<sup>th</sup> week, only few PGC-s became bcl-2 positive, and some of them colocalized with bax. Cytokeratin 8 displayed positivity in the surface gonad epithelium (56%) in the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> week, then temporarily decreased, and finally increased to 92% in the 9<sup>th</sup> week. While the stromal cells were cytokeratin 8 positive, the PGC-s were cytokeratin 8 negative. Vimentin expression increased (18% - 97%) in the surface epithelium and in the stroma between the 5<sup>th</sup> (73%) and 9<sup>th</sup> week (88%), while the medulla showed highest vimentin expression in the 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week (93%). While vimentin and cytokeratin 8 colocalized in some somatic gonadal cells, only some PGC-s were vimentin positive. The number and distribution of cells positive to investigated factors changed coincidentally with the development and the regression of the sex cords in both indifferent and early fetal gonad. The number of PGC might be controlled by balance between intermediate filaments and bcl-2 factor and proapoptotic (p53, AIF, bax) factors leading to caspase independent cell death. Other cell populations are probably eliminated by caspase-dependent cell death. Both pathways of cell death seem to operate during early human gonad development, while their intensity varies depending on cell type and developmental period analysed.

**Keywords:** Ki-67, caspase-3 p53, AIF, bax, cytokeratin 8, vimentin, gonad, embryo

## 9. LITERATURA

1. Sadler TW. Urogenital system. In: TM Tracy, ed. Langman's medical embryology. Baltimore: Williams&Wilkins; 1996:247-81.
2. Fitzgerald MJT, Fitzgerald MI. Pelvis and perineum: reproductive systems. In: B Tindall, ed. Human embryology. London; 1994:142-53.
3. Motta PM, Nottola SA, Makabe S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 1997;75:5-10.
4. Wylie CC. The biology of primordial germ cells. *Eur Urol*. 1993;23:62-6; discussion 7.
5. Pelliniemi LJ, Frojzman K. Structural and regulatory macromolecules in sex differentiation of gonads. *Journal of Experimental Zoology*. 2001;290:523-8.
6. Pelliniemi LJ, Frojzman K, Sundstrom J, Pollanen P, Kuopio T. Cellular and molecular changes during sex differentiation of embryonic mammalian gonads. *Journal of Experimental Zoology*. 1998;281:482-93.
7. Tilmann C, Capel B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Progress in Hormone Research, Vol 57*. 2002;57:1-18.
8. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev*. 2007;87:1-28.
9. Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*. 2000;127:65-73.
10. Kocer A, Reichmann J, Best D, Adams IR. Germ cell sex determination in mammals. *Molecular Human Reproduction*. 2009;15:205-13.
11. Yao HHC, Tilmann C, Zhao GQ, Capel B, Nfs. The battle of the sexes: opposing pathways in sex determination. In: *Genetics and Biology of Sex Determination*; 2002:187-202.
12. Ross AJ, Capel B. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2005;16:19-25.
13. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*. 1999;397:405-9.
14. Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet*. 2006;38:1304-9.

15. Wei Q, Yokota C, Semenov MV, Doble B, Woodgett J, He X. R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. *J Biol Chem.* 2007;282:15903-11.
16. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci.* 2006;119:395-402.
17. Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A, et al. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1278-91.
18. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev.* 2009;30:624-712.
19. Merchant H. Rat gonadal and ovarioan organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol.* 1975;44:1-21.
20. McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol.* 1984;38:7-23.
21. Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD, Brinster RL. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature.* 1990;345:167-70.
22. Hashimoto N, Kubokawa R, Yamazaki K, Noguchi M, Kato Y. Germ cell deficiency causes testis cord differentiation in reconstituted mouse fetal ovaries. *J Exp Zool.* 1990;253:61-70.
23. Guerquin Marie-Justine, Clotilde Duquenne, Jean-Baptiste Lahaye, Sophie Tourpin, René Habert, Livera G. New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. *Developmental Biology* 2010;320-30.
24. Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, LovellBadge R, Capel B. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Current Biology.* 1997;7:958-68.
25. Brennan J, Karl J, Capel B. Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad. *Dev Biol.* 2002;244:418-28.
26. Cunniff C, Jones KL, Benirschke K. Ovarian dysgenesis in individuals with chromosomal abnormalities. *Hum Genet.* 1991;86:552-6.
27. Modi DN, Sane S, Bhartiya D. Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. *Mol Hum Reprod.* 2003;9:219-25.
28. Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:210-22.

29. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract.* 2004;58:1134-41.
30. Lewin B. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell.* 1990;61:743-52.
31. Sakamaki K. Physiological and pathological cell deaths in the reproductive organs. *Cell Structure and Function.* 2003;28:31-40.
32. Meresman G. Relevance of apoptosis in the female reproductive system. *Investigacion Clinica.* 2011;52:274-90.
33. Spencer SJ, Cataldo NA, Jaffe RB. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical & gynecological survey.* 1996;51:314-23.
34. Gosden R, Spears N. Programmed cell death in the reproductive system. *British Medical Bulletin.* 1997;53:644-61.
35. Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: Like sand through an hourglass. *Developmental Biology.* 1999;213:1-17.
36. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995;267:1456-62.
37. Stoop H, Honecker F, Cools M, de Krijger R, Bokemeyer C, Looijenga LH. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Hum Reprod.* 2005;20:1466-76.
38. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 1991;138:867-73.
39. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:7212-20.
40. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182:311-22.
41. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics.* 1991;11:476-7.
42. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993;123:513-22.

43. Traut W, Endl E, Scholzen T, Gerdes J, Winking H. The temporal and spatial distribution of the proliferation associated Ki-67 protein during female and male meiosis. *Chromosoma*. 2002;111:156-64.
44. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26:239-57.
45. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116:205-19.
46. Saraga-Babic M, Lehtonen E, Svajger A, Wartiovaara J. Morphological and immunohistochemical characteristics of axial structures in the transitory human tail. *Ann Anat*. 1994;176:277-86.
47. Vilovic K, Ilijic E, Glamoclija V, Kolic K, Bocina I, Sapunar D, et al. Cell death in developing human spinal cord. *Anat Embryol (Berl)*. 2006;211:1-9.
48. Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*. 2004;23:2785-96.
49. Natarajan SK, Becker DF. Role of apoptosis-inducing factor, proline dehydrogenase, and NADPH oxidase in apoptosis and oxidative stress. *Cell health and cytoskeleton*. 2012;43:11-27.
50. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:433-5.
51. Niswander JM, Dokas LA. Hyperosmotic stress-induced caspase-3 activation is mediated by p38 MAPK in the hippocampus. *Brain research*. 2007;1186:1-11.
52. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science (New York, N.Y.)*. 2002;296:1635-6.
53. Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS letters*. 2000;476:118-23.
54. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397:441-6.
55. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*. 2005;11:162-77.
56. Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CI, Lock LF, et al. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature*. 1991;352:809-11.

57. Wang RA, Nakane PK, Koji T. Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biology of Reproduction*. 1998;58:1250-6.
58. Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, Defelici M. Stem-cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial cell-death (apoptosis). *Development*. 1993;118:1089-94.
59. Coucouvanis EC, Sherwood SW, Carswellcrumpton C, Spack EG, Jones PP. Evidence that the mechanism of prenatal germ-cell death in the mouse is apoptosis. *Experimental Cell Research*. 1993;209:238-47.
60. Baker TG. A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1963;158:417-33.
61. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev*. 1994;15:707-24.
62. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec*. 1978;190:905-26.
63. Prochazkova J, Lichnovsky V, Kylarova D, Erdosova B, Vranka P. Involvement of p53 and Bcl-2 family proteins in regulating programmed cell death and proliferation in human embryogenesis. *Gen Physiol Biophys*. 2004;23:209-29.
64. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-6.
65. Armstrong JF, Kaufman MH, Harrison DJ, Clarke AR. High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol*. 1995;5:931-6.
66. Lichnovsky V, Kolar Z, Murray P, Hlobilkova A, Cernochova D, Pospisilova E, et al. Differences in p53 and Bcl-2 expression in relation to cell proliferation during the development of human embryos. *Mol Pathol*. 1998;51:131-7.
67. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*. 1994;124:1-6.
68. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. 1997;389:300-5.
69. Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ, 3rd, Hill DE, et al. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:5100-4.
70. Davies R, Moore A, Schedl A, Bratt E, Miyahawa K, Ladomery M, et al. Multiple roles for the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Cancer Res*. 1999;59:1747-50.

71. Trott EA, Plouffe L, Hansen K, McDonough PG, George P, Khan I. The role of p53 tumor suppressor gene and bcl-2 protooncogene in rat corpus luteum death. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1997;177:327-31.
72. Makrigiannakis A, Amin K, Coukos G, Tilly JL, Coutifaris C. Regulated expression and potential roles of p53 and Wilms' tumor suppressor gene (WT1) during follicular development in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85:449-59.
73. Wu J, Chen Y, Li T. Expression of Fas, p53 and AFP in development of human fetal germ cells in vitro. *Zygote*. 2002;10:333-40.
74. Stambolsky P, Weisz L, Shats I, Klein Y, Goldfinger N, Oren M, et al. Regulation of AIF expression by p53. *Cell death and differentiation*. 2006;13:2140-9.
75. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999;6:1028-42.
76. Wyllie AH. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol*. 2010;42:4-9.
77. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495-516.
78. Matikainen T, Perez GI, Zheng TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, et al. Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology*. 2001;142:2468-80.
79. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*. 1999;6:99-104.
80. Wei P, Jin X, Zhang XS, Hu ZY, Han CS, Liu YX. Expression of Bcl-2 and p53 at the fetal-maternal interface of rhesus monkey. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:4.
81. Fulton N, da Silva SJM, Bayne RAL, Anderson RA. Germ cell proliferation and apoptosis in the developing human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90:4664-70.
82. Boone DL, Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: Localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biology of Reproduction*. 1998;58:1533-9.
83. Hu CL, Cowan RG, Harman RM, Porter DA, Quirk SM. Apoptosis of bovine granulosa cells after serum withdrawal is mediated by Fas antigen (CD95) and Fas ligand. *Biology of Reproduction*. 2001;64:518-26.



84. Novakovic J, Mardesic-Brakus S, Vukojevic K, Saraga-Babic M. Developmental patterns of Ki-67, bcl-2 and caspase-3 proteins expression in the human upper jaw. *Acta Histochem.* 2011;113:519-26.
85. Vukojevic K, Carev D, Sapunar D, Petrovic D, Saraga-Babic M. Developmental patterns of caspase-3, bax and bcl-2 proteins expression in the human spinal ganglia. *J Mol Histol.* 2008;39:339-49.
86. Kalibovic Govorko D, Becic T, Vukojevic K, Mardesic-Brakus S, Biocina-Lukenda D, Saraga-Babic M. Spatial and temporal distribution of Ki-67 proliferation marker, Bcl-2 and Bax proteins in the developing human tooth. *Arch Oral Biol.* 2011;55:1007-16.
87. Carev D, Krnic D, Saraga M, Sapunar D, Saraga-Babic M. Role of mitotic, pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human kidney development. *Pediatr Nephrol.* 2006;21:627-36.
88. Saraga-Babic M, Bazina M, Vukojevic K, Bocina I, Stefanovic V. Involvement of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in the early development of the human pituitary gland. *Histol Histopathol.* 2008;23:1259-68.
89. Lipton SA, Bossy-Wetzel E. Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell.* 2002;111:147-50.
90. Pospisilik JA, Knauf C, Joza N, Benit P, Orthofer M, Cani PD, et al. Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell.* 2007;131:476-91.
91. Koene S, Willems PH, Roestenberg P, Koopman WJ, Smeitink JA. Mouse models for nuclear DNA-encoded mitochondrial complex I deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2010;34:293-307.
92. Miseviciene L, Anusevicius Z, Sarlauskas J, Sevrioukova IF, Cenas N. Redox reactions of the FAD-containing apoptosis-inducing factor (AIF) with quinoidal xenobiotics: a mechanistic study. *Arch Biochem Biophys.* 2011;512:183-9.
93. Brown D, Yu BD, Joza N, Benit P, Meneses J, Firpo M, et al. Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:9918-23.
94. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu S-W, et al. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *The Journal of cell biology.* 2002;158:507-17.
95. Sato T, Irie S, Krajewski S, Reed JC. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl-2 protein. *Gene.* 1994;140:291-2.

96. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:1899-911.
97. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, et al. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature.* 1997;385:353-7.
98. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:45-51.
99. Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell.* 2000;103:839-42.
100. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74:609-19.
101. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94:491-501.
102. Movassagh M, Foo RS. Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev.* 2008;13:111-9.
103. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science.* 1984;226:1097-9.
104. LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol.* 1993;142:743-53.
105. Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, te Velde ER, et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:3421-9.
106. Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology.* 1995;136:3665-8.
107. Hsu SY, Lai RJ, Finegold M, Hsueh AJ. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. *Endocrinology.* 1996;137:4837-43.
108. Rucker EB, 3rd, Dierisseau P, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Flaws JA, et al. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol Endocrinol.* 2000;14:1038-52.
109. Jefferson W, Newbold R, Padilla-Banks E, Pepling M. Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biol Reprod.* 2006;74:161-8.

110. Greenfeld CR, Pepling ME, Babus JK, Furth PA, Flaws JA. BAX regulates follicular endowment in mice. *Reproduction*. 2007;133:865-76.
111. Albamonte MS, Willis MA, Albamonte MI, Jensen F, Espinosa MB, Vitullo AD. The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ-cell-specific VASA protein, BCL-2/BAX expression balance and apoptosis. *Hum Reprod*. 2008;23:1895-901.
112. De Felici M, Lobascio AM, Klinger FG. Cell death in fetal oocytes: many players for multiple pathways. *Autophagy*. 2008;4:240-2.
113. Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, Tilly KI, Tao XJ, Martimbeau S, et al. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. *Cell death and differentiation*. 1998;5:67-76.
114. Kaipia A, Hsueh AJW. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology*. 1997;59:349-63.
115. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet*. 1999;21:200-3.
116. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*. 1995;136:232-41.
117. Hartley PS, Bayne RAL, Robinson LLL, Fulton N, Anderson RA. Developmental changes in expression of myeloid cell leukemia-1 in human germ cells during oogenesis and early folliculogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87:3417-27.
118. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008;129:705-33.
119. Owens DW, Lane EB. The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays*. 2003;25:748-58.
120. Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A, Liao J, Omary MB. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol*. 2005;15:608-17.
121. Ku NO, Omary MB. A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J Cell Biol*. 2006;174:115-25.
122. Caulin C, Ware CF, Magin TM, Oshima RG. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 2000;149:17-22.

123. Galarneau L, Loranger A, Gilbert S, Marceau N. Keratins modulate hepatic cell adhesion, size and G1/S transition. *Exp Cell Res.* 2007;313:179-94.
124. Gu H, Wang S, Messam CA, Yao Z. Distribution of nestin immunoreactivity in the normal adult human forebrain. *Brain Res.* 2002;943:174-80.
125. Moll R, Franke WW. Intermediate filaments and their interaction with membranes. The desmosome-cytokeratin filament complex and epithelial differentiation. *Pathol Res Pract.* 1982;175:146-61.
126. Galou M, Gao J, Humbert J, Mericskay M, Li Z, Paulin D, et al. The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies. *Biol Cell.* 1997;89:85-97.
127. Waseem A, Alexander CM, Steel JB, Lane EB. Embryonic simple epithelial keratins 8 and 18: chromosomal location emphasizes difference from other keratin pairs. *New Biol.* 1990;2:464-78.
128. Jackson BW, Grund C, Schmid E, Burki K, Franke WW, Illmensee K. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation.* 1980;17:161-79.
129. Baribault H, Price J, Miyai K, Oshima RG. Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8. *Genes Dev.* 1993;7:1191-202.
130. Steinert PM, Idler WW, Cabral F, Gottesman MM, Goldman RD. In vitro assembly of homopolymer and copolymer filaments from intermediate filament subunits of muscle and fibroblastic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:3692-6.
131. Franke WW, Grund C, Kuhn C, Jackson BW, Illmensee K. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation.* 1982;23:43-59.
132. Moll R. [Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors]. *Veroff Pathol.* 1993;142:1-197.
133. Stosiek P, Kasper M, Karsten U. Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation.* 1990;43:66-70.
134. Rogatsch H, Jezek D, Hittmair A, Mikuz G, Feichtinger H. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. *Virchows Arch.* 1996;427:497-502.
135. Fridmacher V, Locquet O, Magre S. Differential expression of acidic cytokeratins 18 and 19 during sexual differentiation of the rat gonad. *Development.* 1992;115:503-17.

136. Frojzman K, Paranko J, Kuopio T, Pelliniemi LJ. Structural proteins in sexual differentiation of embryonic gonads. *Int J Dev Biol.* 1989;33:99-103.
137. O'Rahilly R, Gardner E. The timing and sequence of events in the development of the human nervous system during the embryonic period proper. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1971;134:1-12.
138. Pellegrino ED. Ethics. *JAMA.* 1989;261:2843-5.
139. Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. *Bull World Health Organ.* 2008;86:650-2.
140. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80:293-9.
141. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell.* 2000;6:1389-99.
142. Delbridge AR, Valente LJ, Strasser A. The role of the apoptotic machinery in tumor suppression. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:
143. Felici MD, Carlo AD, Pesce M, Iona S, Farrace MG, Piacentini M. Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell Death Differ.* 1999;6:908-15.
144. Hurst PR, Mora JM, Fenwick MA. Caspase-3, TUNEL and ultrastructural studies of small follicles in adult human ovarian biopsies. *Human Reproduction.* 2006;21:1974-80.
145. Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:838-48.
146. Kim MR, Tilly JL. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research.* 2004;1644:205-10.
147. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1999;399:483-7.
148. Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature.* 1998;391:496-9.
149. Vaskivuo TE, Stenback F, Karhumaa P, Risteli J, Dunkel L, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;165:75-83.
150. Quenby SM, Gazvani MR, Brazeau C, Neilson J, Lewis-Jones DI, Vince G. Oncogenes and tumour suppressor genes in first trimester human fetal gonadal development. *Mol Hum Reprod.* 1999;5:737-41.

151. Lehtonen E, Ordonez G, Reima I. Cytoskeleton in preimplantation mouse development. *Cell Differ.* 1988;24:165-77.
152. Frojzman K, Paranko J, Virtanen I, Pelliniemi LJ. Intermediate filament proteins and epithelial differentiation in the embryonic ovary of the rat. *Differentiation.* 1993;55:47-55.
153. Paranko J, Kallajoki M, Pelliniemi LJ, Lehto VP, Virtanen I. Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. *Dev Biol.* 1986;117:35-44.
154. Mora JM, Fenwick MA, Castle L, Baithun M, Ryder TA, Mobberley M, et al. Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod.* 2012;86:153, 1-14.
155. Franke FE, Pauls K, Rey R, Marks A, Bergmann M, Steger K. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. *Anat Embryol (Berl).* 2004;209:169-77.
156. van Niekerk CC, Boerman OC, Ramaekers FC, Poels LG. Marker profile of different phases in the transition of normal human ovarian epithelium to ovarian carcinomas. *Am J Pathol.* 1991;138:455-63.
157. Santini D, Ceccarelli C, Mazzoleni G, Pasquinelli G, Jasonni VM, Martinelli GN. Demonstration of cytokeratin intermediate filaments in oocytes of the developing and adult human ovary. *Histochemistry.* 1993;99:311-9.
158. Frojzman K, Paranko J, Virtanen I, Pelliniemi LJ. Intermediate filaments and epithelial differentiation of male rat embryonic gonad. *Differentiation.* 1992;50:113-23.
159. Tang P, Sharpe CR, Mohun TJ, Wylie CC. Vimentin expression in oocytes, eggs and early embryos of *Xenopus laevis*. *Development.* 1988;103:279-87.
160. Lehto VP, Virtanen I, Kurki P. Intermediate filaments anchor the nuclei in nuclear monolayers of cultured human fibroblasts. *Nature.* 1978;272:175-7.
161. Virtanen I, Kurkinen M, Lehto VP. Nucleus-anchoring cytoskeleton in chicken red blood cells. *Cell Biol Int Rep.* 1979;3:157-62.
162. Moore K. *Before we are born: basic embryology and birth defects.* 3. izdanje, Philadelphia: Saunders; 1989.
163. Carlson BM. *Human Embriology and Developmental Biology.* 3. izdanje, Philadelphia, PA, USA: Mosby, Inc; 2004.
164. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 2009;119:1417-9.
165. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119:1420-8.

166. Ekblom P. Genetics of kidney development. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1996;5:282-7.
167. Page M. Changing patterns of cytokeratins and vimentin in the early chick embryo. *Development.* 1989;105:97-107.
168. van den Hurk R, Dijkstra G, van Mil FN, Hulshof SC, van den Ingh TS. Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev.* 1995;41:459-67.

## 10. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

**Ime i prezime:** Tanja Vukušić Pušić

**Adresa:** Smiljanićeva 8 b, Split

**Telefon:** ++ 385 21 537 099

**Mobitel:** 091 529 62 79

**Elektronička pošta:** [tanjavukusicpusic@gmail.com](mailto:tanjavukusicpusic@gmail.com)

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Datum i mjesto rođenja:** 05. kolovoza 1967., Split

**Bračni status:** udana, majka dvoje djece

**Zaposlena:** specijalistica ginekologije i opstetricije na Klinici za ženske bolesti i porode, KBC Split

### IZOBRAZBA

-2003.-2006. Poslijediplomski doktorski studij „Temeljne i kliničke medicinske znanosti“, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

- 1996.-2003. Specijalizacija ginekologije i opstetricije, KBC Split, Klinika za ženske bolesti i porode

- 1986.-1993. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

### DOSADAŠNJA ZAPOSLENJA

- 1996.- KBC Split, Klinika za ženske bolesti i porode

- 1995.-1996. Dom zdravlja Split SDŽ



- 1994.-1995. Hrvatska vojska, dragovoljac liječnik u pješačkoj pukovnji

- 1993.-1994. KBC Split, pripravnički staž

## **POPIS RADOVA**

1. Tadin I, Vukušić Pušić T, Meštrović Z, Banović I, Mimica M, Karelović D. Blizanačka trudnoća i prijevremeni porod. *Gynaecol Perinatol.* 2001; 10:129.
2. Poljicanin A, Vukusic Pusic T, Vukojevic K, Caric A, Vilovic K, Tomic S, Soljic V, Saraga-Babic M. The expression patterns of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human fetal and adult ovary. *Acta Histochem.* Jan 4. 2013
3. Vukusic Pusic T, Janjic T, Dujmovic I, Poljicanin A, Soljic V, Saraga-Babic M, Vukojevic, K. The involvement of proliferation and apoptosis in the early human gonad development. *J Mol Histol.* 2013 Feb;44(1):55-63.

## **MATERINSKI JEZIK**

- hrvatski jezik

## **OSTALI JEZICI**

- engleski jezik

## **OSTALE AKTIVNOSTI**

- hobi: književnost i slikanje