

Spolni dimorfizam izvanorbitalnih suznih žlijezda u miševa bez gena SF-1

Šemanjski, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:414026>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Kristina Šemanjski

**Spolni dimorfizam izvanorbitalnih
suznih žlijezda u miševa bez gena SF-1**

DISERTACIJA



Zagreb, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Kristina Šemanjski

**Spolni dimorfizam izvanorbitalnih
suznih žlijezda u miševa bez gena SF-1**

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je izrađen u okviru projekta: *the European Union through the European Regional Development Fund, Operational Programme Competitiveness and Cohesion, under Grant Agreement No. KK.01.1.1.01.0008, Reproductive and Regenerative Medicine—Exploring New Platforms and Potentials.*

Mentori rada: prof. dr. sc. Davor Ježek i prof. dr. sc. Gregor Majdič

Ovu disertaciju posvećujem svom sinu Ezri koji me uvijek gura naprijed svojom nepresušnom životnom energijom.

Puno hvala mojim mentorima prof. Davoru Ježeku i prof. Gregoru Majdiču.

Od srca zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu na podršci i pomoći, osobito prof. Srećku Gajoviću, prof. Gordani Jurić-Lekić, dr. sc. Viviani Kozini, dr. sc. Andrei Vukasović, dr. med, te ing. Željki Punčec i ing. Mireli Vranić, te prof. Florianu Bulić-Jakuš sa Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Hvala mojoj obitelji, roditeljima Ziti i Štefanu, te mojoj braći Mariju, Zvonimiru, Emilu i Petru, bez čije bi nesebične pomoći ovaj pothvat bio teško izvediv i Luki koji mi je dao konačni poticaj za završetak ove disertacije.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. SPOLNI DIMORFIZAM	2
1.1.1. <i>Određivanje spola i primarna spolna obilježja</i>	5
1.1.1.1. <i>Određivanje spola</i>	7
1.1.1.2. <i>Formiranje spolnih nabora</i>	8
1.1.1.3. <i>Aktivacija Sry gena</i>	10
1.1.2. <i>Sekundarna spolna obilježja i spolni dimorfizam</i>	13
1.1.2.1. <i>Spolni dimorfizam u čovjeka</i>	20
1.2. SUZNI APARAT MIŠA	27
1.2.1. <i>Anatomija suznog sustava</i>	27
1.2.2. <i>Histološka građa suzne žlijezde</i>	29
1.2.3. <i>Funkcija suzne žlijezde</i>	33
1.2.4. <i>Spolni dimorfizam suzne žlijezde</i>	37
1.3. TRANSGENIČNE ŽIVOTINJE	39
1.3.1. <i>Sintetska biologija</i>	39
1.3.2. <i>Umjetni oblici života</i>	40
1.4. STEROIDOGENI FAKTOR 1	49
1.4.1. <i>Steroidogeneza</i>	49
1.4.2. <i>Nuklearni receptori</i>	53
1.4.2.1. <i>Androgeni i androgeni receptori</i>	54
1.4.2.2. <i>Steroidogeni faktor 1</i>	57
1.5. SF-1 KO MIŠEVI	65
1.5.1. <i>Mutacije Sf-1 gena u čovjeka</i>	71
2. HIPOTEZA	73
3. CILJEVI RADA	74

4. MATERIJALI I METODE	75
4.1. ŽIVOTINJE - držanje, žrtvovanje i uzimanje tkiva	75
4.2. HISTOLOŠKE METODE	77
4.2.1. Obrada tkiva	77
4.2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza tkiva	78
4.2.3. Imunohistokemija	78
4.2.4. Statistička obrada podataka	80
5. REZULTATI	81
5.1. KVALITATIVNA HISTOLOŠKA ANALIZA SUZNIH ŽLIJEZDA SF-1 KO MIŠEVA	81
5.2. KVANTITATIVNA HISTOLOŠKA ANALIZA SUZNIH ŽLIJEZDA SF-1 KO MIŠEVA	97
5.2.1. Stereološka analiza građevnih elemenata suznih žlijezda	97
5.2.2. Statistička analiza dobivenih stereoloških podataka o suznoj žlijezdi	103
5.2.2.1. Volumenska gustoća acinusa, odvodnih kanala i veziva, te duljinska gustoća odvodnog sustava	103
5.2.2.2. Srednji volumen acinusa, vezivnog tkiva i odvodnih kanala	106
5.2.2.3. Srednja duljina interlobularnih i pravih odvodnih kanala	107
5.3. EKSPRESIJA ANDROGENIH RECEPTORA U SUZNOJ ŽLIJEZDI SF-1 KO MIŠEVA	108
6. RASPRAVA	112
7. ZAKLJUČAK	123

8. KRATKI SADRŽAJ	124
9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU – SUMMARY	125
10. POPIS LITERATURE	126
11. ŽIVOTOPIS	161

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABP = engl. **androgen binding protein**, hrv. androgen vezujući protein

ACh = engl. **acetylcholine**, acetilkolin

ACTH = engl. **adrenocorticotrophic hormone**, hrv. adrenokortikotropni hormon ili kortikotropin

AF1 = engl. **activation function 1 domain**, hrv. transaktivacijska poddomena 1

AF2 = engl. **activation function 2 domain**, hrv. transaktivacijska poddomena 2

AGP = adrenogonadalni primordij

AgRP = engl. **agouti-related peptide**, hrv. agouti-povezani peptid

AMH = engl. **anti-Müllerian hormone**, hrv. anti-Müllerov hormon

AR = engl. **androgen receptor**, hrv. androgeni receptor

Arc = arkuatna jezgra

AVPV = antroventralna periventrikularna jezgra

BDNF = engl. **brain-derived neurotrophic factor**, hrv. moždani neurotrofni čimbenik

BMP2 = engl. **bone morphogenic protein 2**, hrv. koštani morfogenetski protein 2

BNST = engl. **bed nucleus of the stria terminalis**, hrv. ležišna jezgra strije terminalis

C/EBPs = engl. **CCAAT/enhancer binding proteins**, hrv. CCAAT-pojačivač-vezujući proteini

CAM = engl. **calmodulin**, hrv. kalmodulin

cAMP = engl. **cyclic adenosine monophosphate**, hrv. ciklični adenzin monofosfat

CART = engl. **cocaine and amphetamine-regulated transcript**, hrv. transkript reguliran kokainom i amfetaminom

Cas9 = engl. **CRISPR-associated protein 9**

CB1R (CNR1) = engl. **cannabinoid receptor 1**, hrv. kanabinoidni receptor tip 1

CBX2 = engl. **chromobox homolog 2**

CCND2 = gen koji kodira protein ciklin D2

Cdkn1B (p27) = engl. **c**yclin-**d**ependent **k**inase inhibitor **1B**, inhibitor kinaze 1B
ovisan o ciklinima

cDNA = engl. **c**omplementary **DNA**, hrv. komplementarna DNA

CGRP = engl. **c**alcitonin **g**ene-related **p**eptide, hrv. peptid povezan s
kalcitoninom

CITED2 = engl. **C**bp/P300 **I**nteracting **T**ransactivator **W**ith **G**lu/**A**sp **R**ich
Carboxy-Terminal **D**omain **2**, hrv. Cbp / p300-interaktivni transaktivator 2

c-jun = engl. **c**ellular-**j**un; prvi otkriveni onkogeni transkripcijski faktor

CPA = ciproteron acetat

Cre/lox rekombinacija = tehnologija koja koristi Cre rekombinazu za deleciju,
umetanje, translokaciju i inverziju specifičnih mjesta na DNA

CREB = engl. **c**AMP response **e**lement-**b**inding protein, hrv. transkripcijski
faktor koji se veže za cAMP odgovorni element

CRHR2 = engl. **c**orticotropin-releasing **h**ormone **r**eceptor **2**, hrv. receptor za
CRH tip 2

CRISPRs = engl. **c**lustered **r**egularly interspaced **s**hort **p**alindromic **r**epeats

csd gene = engl. **c**omplementary **s**ex **d**eterminer, hrv. gen za komplementarno
određivanje spola

CYP = engl. **c**ytochromes **P**450, hrv. citokrom P-450

DAX1 = engl. **d**osage sensitive sex reversal, **a**drenal hypoplasia critical region,
on chromosome **X**, gene **1**

DBD = engl. **DNA**-**b**inding **d**omain, hrv. DNA-vezujuća domena

DES = engl. **d**ry **e**ye **s**ndrome, hrv. sindrom suhog oka

DHEA = engl. **d**ehydroepiandrosterone, hrv. dehidroepiandrosteron ili prasteron

DHEA-s = engl. **d**ehydroepiandrosterone-**s**ulphate, hrv. dehidroepiandrosteron-
sulfat

DHT = engl. **d**ihidrotestosterone, hrv. dihidrotestosteron

DMRT1 = engl. **d**oublesex and **mab**-3 related **t**ranscription factor **1**

DNA = engl. **d**eoxyribonucleic **a**cid, hrv. deoksiribonukleinska kiselina

DSD = engl. **d**isorders of **s**ex **d**evelopment, hrv. poremećaji spolnog razvoja

E = embrionalni dan razvoja u miša, računa se od pojave vaginalnog čepa u oplođene ženke

ELP = engl. **embryonal long terminal repeat-binding protein**

ERK1/2 = engl. **extracellular signal-regulated kinases 1/2** , hrv. izvanstanične signalno regulirane kinaze 1/2

ER α = engl. **estrogen receptor α** , hrv. estrogeni receptor tip α

ES = engl. **embryonal stem cell**, hrv. embrionalna matična stanica

ESP = engl. **exocrine-gland secreting peptide**

fAdE = engl. **fetal adrenal enhancer**, hrv. fetalni adrenalni pojačivač

FGF9 = engl. **fibroblast growth factor 9**, hrv. čimbenik rasta fibroblasta 9

fLE = engl. **fetal Leydig cell enhancer**, hrv. fetalni pojačivač u Leydigovim stanicama

FOXL2 = engl. **forkhead box L2**

FSH = engl. **follicle-stimulating hormone**, hrv. folikulostimulirajući hormon

Fst = engl. **follistatin**, hrv. folistatin

Ftz-F1 = engl. **Fushi tarazu factor-1**

G418 = genetin

GATA4 = engl. **GATA binding protein 4**

GDO = engl. **genetically designed organism**, hrv. genetski dizajnirani organizam

GDV = engl. **genetically designed virus**, hrv. genetski dizajnirani virus

GEO = engl. **genetically edited organism**, hrv. genetski editirani organizmi

GL = lat. **glandula lacrimalis**, **glandula Löwenthali**, engl. **lacrimal gland**, hrv. suzna žlijezda

GMO = engl. **genetically modified organism**, hrv. genetski modificirani organizam

GPCR = engl. **G protein-coupled receptor**, hrv. receptor povezan s proteinima G

GRE = engl. **glucocorticoid response element**, hrv. element koji odgovara na glukokortikoide

HCO₃⁻ = bikarbonat

HGM = engl. **high mobility group**, hrv. grupa visoke mobilnosti

HSD = engl. **h**ydrox**y**steroid **d**ehydrogenase, hrv. hidroksisteroid-dehidrogenaza

HSPs = engl. **h**eat **s**hock **p**roteins, hrv. proteini toplotnog šoka

IgA = imunoglobulin A

IgG = imunoglobulin G

IL-1 β = interleukin **1 β**

IQ = engl. **i**ntelligence **q**uotient, hrv. kvocijent inteligencije

IT = informatička tehnologija

kb = mjerna jedinica u molekularnoj biologiji koja označava 1000 parova baza DNA ili RNA

Ki-67 = nuklearni protein, marker stanične proliferacije

KO = engl. **k**nock-**o**ut, hrv. nokaut

LBD = engl. **l**igand **b**inding **d**omain, hrv. ligand-vezujuća domena

LH = engl. **l**uteinizing **h**ormone, hrv. luteinizirajući hormon

LHX9 = engl. **L**IM **h**omeobox **9**,

LRH-1 = engl. **l**iver **r**eceptor **h**omolog-**1**, hrv. receptor jetre homolog-1

MAPK = engl. **m**itogen-**a**ctivated **p**rotein **k**inase, hrv. mitogenom aktivirana protein-kinaza

mAR = engl. **m**embrane **a**ndrogen **r**eceptor, hrv. membranski androgeni receptor

MC2R = engl. **m**elanocortin **2** receptor, hrv melanokortin 2 receptor ili ACTH-R

miRNA = engl. **m**icro**R**NA, hrv. mikroRNA

MMP-2 = engl. **m**atrix **m**etalloproteinase-**2**, hrv. metaloproteinaza matriksa tip 2

mRNA = engl. **m**essenger **R**NA, hrv. glasnička RNA

MUC = mucin

NA = engl. **n**or**a**drenaline, hrv. noradrenalin

NC AR = engl. **n**on **c**lasical **a**ndrogen **r**eceptor, hrv. neklasnični androgeni receptor

neo = neomicin

NES = engl. **n**uclear **e**xport **s**ignal, hrv. signal nuklearnog izvoza

NLS = engl. **n**uclear **l**ocalisation **s**ignal, hrv. nuklearni lokalizacijski signal

NPY = engl. **n**euro**p**eptide **Y**, hrv. neuropeptid Y

NR = engl. **n**uclear **r**eceptor, hrv. jezgrin receptor

NR5A1 = engl. **N**uclear **R**eceptor Subfamily **5** Group **A** Member **1**

NR5A2 = engl. **N**uclear **R**eceptor Subfamily **5** Group **A** Member **2**

NUC lobe = engl. **n**uclease lobe (Cas9), domena Cas9 enzima

P450scc = engl. cholesterol side-chain cleavage enzyme, hrv. enzim za cijepanje bočnog lanca kolesterola

pb = par baza ili engl. base pair (bp), temeljna jedinica dvostruke nukleinske kiseline a predstavlja dva nukleotida vezana vodikovom vezama (npr. A-T i C-G)

PGE = engl. **p**ituitary **g**onadotrope **e**nhancer, hrv. pitutarno gonadotropni pojačivač

PIAS1 = engl. **p**rotein **i**nhibitor of **a**ctivated **S**TAT**1**, hrv. proteinski inhibitor aktiviranog STAT1

PKA = engl. **p**rotein **k**inase **A**, hrv. protein kinaza A

PKC = engl. **p**rotein **k**inase **C**, hrv. protein kinaza C

PRP = engl. **p**latelet **r**ich **p**lasma, hrv. plazma obogaćena trombocitima

REC lobe = engl. **r**ecognition lobe (Cas9), domena Cas9 enzima

RNA = engl. **r**ibonucleic **a**cid, hrv. ribonukleinska kiselina

RSPO1 = engl. **R-S**pondin **1**

SD = hrv. **s**polni **d**imorfizam, engl. **s**exual **d**imorphism

SDN-POA = engl. **s**exually **d**imorphic **n**ucleus of the **p**reoptic **a**rea, hrv. spolno dimorfna jezgra preoptičke regije

SF-1 = **s**teroidogeni **f**aktor **1**, engl. **s**teroidogenic **f**actor **1**

SHBG = engl. **s**ex **h**ormone-**b**inding **g**lobulin, hrv. globulin koji veže spolne hormone

SIX1/4 = engl. **s**ine oculis homeobox homolog 1/4

SOX gene = engl. **S**RY-related HMG-**b**ox gene

SRC-1 = engl. **s**teroid **r**eceptor **c**oactivator **1**, hrv. koaktivator steroidnih nuklearnih receptora 1

SREBPs = engl. **s**terol **r**esponse-**e**lement **b**inding **p**roteins, hrv. proteini koji se vežu za regulatorne elemente za sterole

SRY = engl. **s**ex-determining **r**egion **Y**, hrv. Y regija za određivanje spola

SSD = engl. sexual size dimorphism, hrv. spolni dimorfizam u veličini

StAR = engl. **S**teroidogenic **a**cute **r**egulatory protein, hrv. steroidogeni akutni regulatorni protein

STAT1 = engl. **s**ignal **t**ransducer and **a**ctivator of **t**ranscription **1**, hrv. transduktor signala i aktivator transkripcije 1

SUMO = engl. **s**mall **u**biquitin-like **m**odifier, hrv. mali modifikator sličan ubikvitinu

T = engl. **t**estosterone, hrv. testosteron

TALEN = engl. **t**ranscription **a**ctivator-like **e**ffector **n**uclease, hrv. efektorska nukleaza slična transkripcijskom aktivatoru

TBUT = engl. **t**ear **b**reak-**u**p **t**ime, hrv. vrijeme prekida suznog filma

TDF = engl. **t**estis-**d**etermining **f**actor, hrv. faktor za određivanje testisa

TE = engl. **t**ransposable **e**lement, transpozon

TES = engl. **t**estis **s**pecific **e**nhancer, pojačivač specifičan za testise

TF = engl. **t**ranscription **f**actor, hrv. transkripcijski čimbenik

TFIIB = engl. **t**ranscription **f**actor **II B**, hrv. faktor transkripcije II B

TGF β = engl. **t**ransforming **g**rowth **f**actor **β** , hrv. transformirajući čimbenik rasta β

TK = engl. **t**hymidine **k**inase, hrv. timidin kinaza

TLR = engl. **t**oll **l**ike **r**eceptor, hrv. tolenski receptor

TNF α = engl. **t**umour **n**ecrosis **f**actor **α** , hrv. faktor nekroze tumora α

TP = engl. **t**estosterone **p**ropionate, hrv. testosteron propionat

TCF21 = engl. **t**ranscription **f**actor **21**, hrv. transkripcijski faktor 21

tRNA = engl. **t**ransfer **R**NA, hrv. prijenosna RNA

TSG-6 = engl. tumor necrosis factor- (TNF) **s**timulated **g**ene-**6**, protein gena 6 induciran faktorima tumorske nekroze

UBC9 = engl. **u**biquitin **c**arrier protein **9**, hrv. protein ubikvitin-nosač 9

UCN = engl. **u**rocortin, hrv. urokortin

VIP = engl. **v**asoactive intestinal **p**eptide, hrv. vazoaktivni crijevni peptid

VMH = engl. **v**entromedial **h**ypothalamus, hrv. ventromedijalni hipotalamus

VMHE = engl. **v**entromedial **h**ypothalamic nucleus-specific **e**nhancer, hrv. VMH specifični pojačivač

VNO = vomeronazalni organ

WNT4 = engl. **w**ingless-**t**ype MMTV integration site family, member **4**

WT = engl. **w**ild **t**ype, hrv. divlji tip

WT1 = engl. Wilms' tumor 1, hrv. Wilmsov tumorski protein

ZFN = engl. **z**inc **f**inger **n**uclease, hrv. nukleaza s cinkovim prstima

ZFPM2 = engl. **z**inc **f**inger **p**rotein, FOG family **m**ember **2**, hrv protein cinkovog prsta, član porodice FOG 2

ZNF = engl. **z**inc **f**inger, hrv. cinkov prst

1. UVOD I SVRHA RADA

Tijekom 20. stoljeća razlike između ženskog i muškog spola su postale nedvojbeno znanstvena činjenica. Te razlike sežu daleko iza vidljivih fizičkih karakteristika na kojima su najočitije. Mnogobrojna istraživanja su dokazala da spolni dimorfizam postoji već na staničnoj razini, te se potom izražava na razini tkiva, organa i cijelog organizma.

Oko je jedan od organa koji pokazuje izraziti spolni dimorfizam. Suzne žlijezde su važan dio vidnog sustava, a izlučevine suzne žlijezde imaju najveći udio u suznom filmu. Istraživanja na glodavcima su pokazala da spolni hormoni, poglavito androgeni, imaju izrazito velik utjecaj na nastanak i održavanje spolnog dimorfizma suzne žlijezde. Zanimanje za to specifično obilježje suzne žlijezde je u zadnje vrijeme poraslo zbog povećane incidencije sindroma suhog oka, od kojeg uglavnom pate žene, pa je tako u zadnjih 10 godina objavljeno 7765 znanstvenih radova o sindromu suhog oka (PubMed, 01.04.2021., pretraga po ključnim riječima *dry eye syndrome*), a o spolnom dimorfizmu suzne žlijezde tek 31 rad (PubMed, 01.04.2021., pretraga po ključnim riječima *sexual dimorphism lacrimal*).

U ovom istraživanju smo koristili suzne žlijezde transgeničnih miševa kod kojih, zbog izbacivanja *Sf-1* gena iz genoma, nema razvoja spolnih žlijezda, pa prema tome niti djelovanja spolnih hormona. Svakako treba naglasiti da životinje imaju očuvane spolne XX i XY kromosome ili gonosome. Stoga je važno istražiti da li se i u kojoj mjeri na suznoj žlijezdi miša očituje spolni dimorfizam bez utjecaja spolnih hormona, a pod djelovanjem očuvanih genetskih čimbenika. Kao što je navedeno, u *Sf-1* KO miševa može se izbjeći utjecaj hormona kao što je testosteron pa kao svrhu rada navodimo istraživanje spolnog dimorfizma suznih žlijezda u ovisnosti isključivo o prisutnosti XX ili XY gonosoma.

Proučavanje spolnog dimorfizma na suznoj žlijezdi miševa koji su bez spolnih žlijezda i hormona moglo bi u budućnosti doprinijeti razumijevanju etiologije sindroma suhog oka i ostalih bolesti koje su povezane s patološkom funkcijom suznih žlijezda čovjeka te njihovoj prevenciji, dijagnostici i liječenju.

1.1. SPOLNI DIMORFIZAM

Pojam **spolnog dimorfizma (SD)** se odnosi na bilo koju razliku između mužjaka i ženke iste vrste. Spolni dimorfizam je prisutan u većine vrsta životinjskog svijeta, a može ga se uočiti i u nekih biljaka. Očituje se kao razlika u veličini, morfološkom izgledu, metaboličkoj aktivnosti, odgovoru na hormone, osjetljivosti na lijekove i toksine, različitoj učestalosti bolesti između muške i ženske populacije (1,2). Duljina životnog vijeka također podliježe spolnom dimorfizmu (3). Takve razlike mogu biti vrlo suptilne, ali i izrazito prenaplašene i upečatljive.

Spolna obilježja koja razdvajaju i jasno označavaju jedan od dva spola mogu biti primarna i sekundarna. **Primarna spolna obilježja** su prisutna prilikom rođenja, a odnose se na posjedovanje muških ili ženskih reproduktivnih organa. **Sekundarna spolna obilježja** obično nisu uočljiva pri rođenju a potpuno se razviju prilikom postizanja spolne zrelosti jedinke. Predstavljaju fizička obilježja, izuzev spolnih organa, koja razlikuju dva spola iste vrste – različita veličina, težina, boja i sl.

Osnovna svrha spolnog dimorfizma je opremanje organizma anatomske i fiziološke značajkama potrebnim za što uspješnije razmnožavanje. Razmnožavanje u prirodi može biti nespolno i spolno. Organizmi nastali nespolnim razmnožavanjem genetički su jednaki i zovemo ih klonovi. Jedini izvor varijabilnosti kod klonova može biti mutacija gena. Nasuprot tome, spolno razmnožavanje jamči varijabilnost jer se potomci genetički razlikuju kako od roditelja tako i od svoje braće i sestara. Proces koji to omogućavaju su rekombinacija odsječaka DNA između para kromosoma tijekom mejoze te proces oplodnje, u kojem se spajaju muška i ženska spolna stanica.

Genetika (grč. *genno* = roditi, stvoriti) je znanost koja proučava nasljeđivanje. Taj termin je predložio 1907. Bateson za novo područje u biologiji koje se tada počelo razvijati. Nasljeđivanje (lat. *heres* = nasljednik) je proces koji dovodi do sličnosti između roditelja i potomaka; razmnožavanjem jedinki neke vrste nastaju uvijek potomci te vrste. Organizmi skladište upute za stvaranje novih pripadnika svoje vrste u spolnim stanicama ili gametama čija je

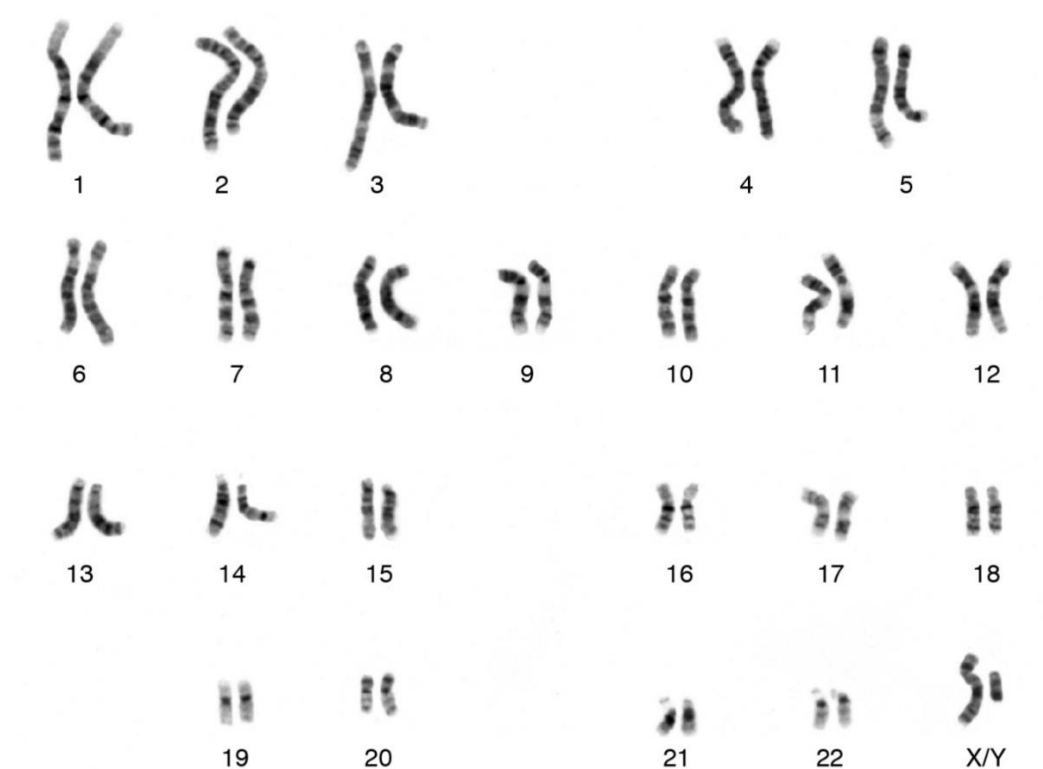
karakteristika polovičan ili haploidan broj kromosoma (n). Prilikom oplodnje dolazi do spajanja muške i ženske gamete, uspostavlja se diploidni broj kromosoma ($2n$), a genetska uputa se prenosi u oplođenu jajnu stanicu, zigotu, iz koje nastaje novi organizam.

Pokušaji razumijevanja nasljeđivanja datiraju u davnu prošlost. U samim počecima agrikulture i stočarstva ljudi su počeli uočavati da postoje zakonitosti u nasljeđivanju. Istraživanje koje je uključilo analizu genetskog materijala ljudi iz razdoblja mlađeg paleolitika prije 34000 godina sugerira da su ljudi tražili partnere izvan svoje neposredne obitelji i da su vjerojatno bili umreženi u širu grupu ljudi iz koje su birali partnere. Ovo istraživanje sugerira da su čak i naši davni preci bili svjesni opasnosti razmnožavanja s bliskim rođacima i svjesno ju izbjegavali (4). Stari grčki filozofi su također bili zainteresirani za fenomen nasljeđivanja i pitanje određivanja spola fetusa. Hipokrat je vjerovao da se nasljedne čestice sakupljaju u tijelu odrasle jedinke te se oblikuju iskustvom, dok je Aristotel zastupao tezu da je nasljedna uputa nepromjenjiva i nasljeđuje se putem gameta. On je još 355 pr. Krista postavio tezu da spolni dimorfizam izvire iz razlike u temperaturi sperme u vrijeme parenja - vruće sjeme stvara mužjake, a hladno ženke i sve posljedične razlike (5). Kroz dugo vremensko razdoblje je prenošenje obilježja s roditelja na potomke spadalo u domenu filozofije i teologije, a žena je smatrana „krnjim“ muškarcem (6). Stoljećima kasnije, Charles Darwin je opisao fenomen prenošenja fizičkih karakteristika na potomstvo, no u to vrijeme nitko nije mogao objasniti na koji način se to događa (7).

Kraj 19. i početak 20. stoljeća označavaju prekretnicu u području genetike. Austrijski redovnik Gregor Mendel, „otac genetike“ je na temelju precizno izvedenih pokusa s biljkom graška prvi postavio principe nasljeđivanja. Njegov rad je objavljen 1866. pod nazivom „Versuche über Pflanzen-Hybriden“ (Pokusi s biljnim hibridima) u *Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brunn*, ali nije dobio zasluženu pozornost. Za ponovno otkriće njegovih rezultata zaslužni su Hugo de Vries, Karl Correns i Erich Tschermak koji su ih 1900. ponovili i potvrdili (8). Godine 1902. i 1903. su Walter Sutton, Theodore Boveri i Wilhelm Johannsen uočili da se kromosomi ponašaju kao Mendelovi faktori, da dolaze u parovima i da svaki potječe od jednog roditelja. Tada su jasno definirani i uvedeni

u genetiku pojmovi fenotip, genotip i selekcija.

Nettie Maria Stevens, američka genetičarka, je 1905. godine otkrila spolne kromosome. Naime, proučavanjem kukaca brašnara uočila je da mužjaci stvaraju dvije vrste sperme, jednu s velikim kromosomom i jednu s malom. Kada sperma s velikim kromosomom oplodi jajašce nastaje žensko potomstvo, dok muško nastaje od sperme s malim kromosomom. Ovaj par kromosoma je kasnije postao poznat pod nazivom X i Y spolni kromosomi. Dok su drugi znanstvenici tog vremena navodili okolišne faktore kao glavnu determinantu spola, ona je ustrajala na tome da je spol genetički određen (9). Danas se zna da spolni kromosomi zaista sadrže gene koji određuju spol, dok ostale kromosome nazivamo autosomi. Sve kromosome jedne stanice složene u homologne parove i poredane prema veličini od najvećeg do najmanjeg nazivamo kariotip (sl. 1.).



Slika 1. Kariotip muškarca 46X,Y (izvor: National Human Genome Research Institute)

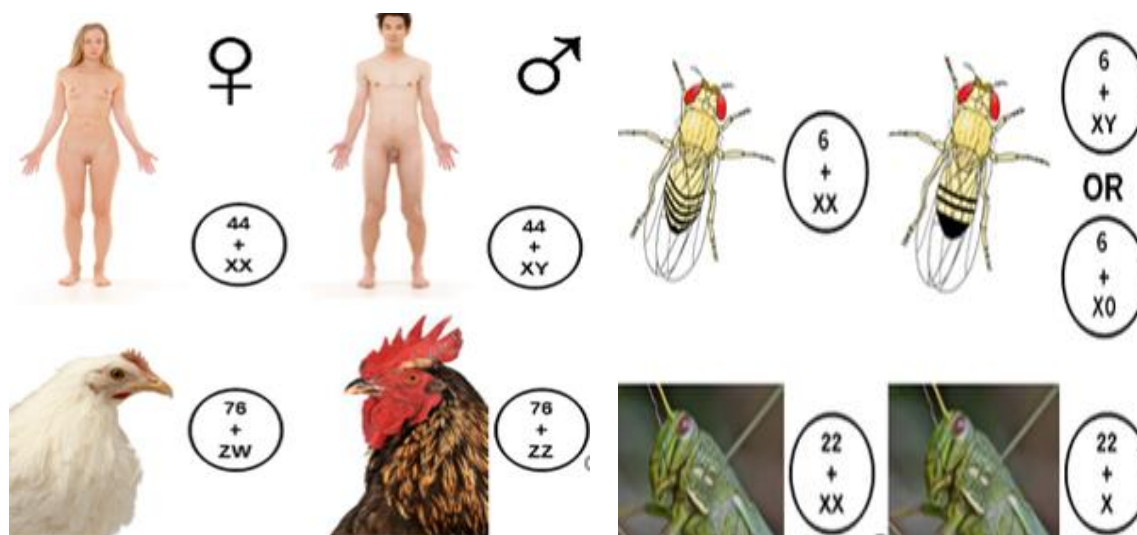
1.1.1. Određivanje spola i primarna spolna obilježja

Hermafroditi su organizmi koji imaju set reproduktivnih organa oba spola te proizvode gamete i muškog i ženskog spola. Mnoge životinje, većinom beskralješnjaci, nemaju odvojene spolove, nego prilikom parenja bilo koji od partnera može biti ili „muško“ ili „žensko“. Npr. velika većina plaštenjaka, puževa i glista su hermafroditi, kao i većina cvatućih biljaka. U kralješnjaka, hermafroditizam nalazimo uglavnom kod nekih vrsta riba. Također postoji i pojava nazvana sekvencijalni hermafroditizam gdje životinja može tijekom života promijeniti spol. Primjer je tropska riba klaun gdje, kada ženka ugine, dominantni mužjak postaje ženka, dok sve ostale jedinke u jatu ostaju muškog spola (10). Postoje također vrste u kojima postoji samo jedan spol, a one se razmnožavaju partenogenezom (razmnožavanje ženki bez oplodnje muškim sjemenom). Neke vrste kao što su boa ili komodo se mogu razmnožavati spolno, a u slučaju da nema raspoloživog partnera, partenogenezom (11).

Ipak, većina organizama koji stvaraju potomstvo spolnim razmnožavanjem ima dva odvojena spola: muški i ženski. **Sustav spolnog određenja** definira spolne karakteristike u organizmu. U mnogo vrsta taj biološki sustav je **genetski**, tj. spol je određen u trenutku oplodnje. Mužjaci i ženke imaju različite alele, gene ili različite kombinacije spolnih kromosoma (pr. X/Y, Z/W, X/O, Z/O) koji određuju njihov izgled i ponašanje (sl. 2).

Za organizme koji izražavaju spol na diploidan način postoje dva glavna oblika organizacije spolnih kromosoma (sl. 2). Najpoznatiji sustav, kojega nalazimo u čovjeka i većine sisavaca, je **XX/XY sustav**. Ženke imaju dva jednaka X kromosoma, dok su mužjaci s X i Y kromosomima heterogametni. X i Y čine par kromosoma koji su različiti po veličini i obliku, za razliku od ostalih parova kromosoma – autosoma (sl.1). Također, u nekih vrsta, npr. u čovjeka, potrebno je neko vrijeme od oplodnje do aktivacije spolnih kromosoma, dok, npr. u voćnih mušica spolna diferencijacija nastupa odmah po oplodnji jajašca. Wilson je 1906. otkrio varijantu ovog sistema u kojem mužjaci imaju jedan kromosom manje od ženki – **XX/X0 sustav** (12). Postoji također i obrnuti sustav, sa ženskom heterogamijom, kojeg označavamo s **ZW/ZZ**, gdje W kromosom pripada

ženskom spolu. Slučajeve u kojima ženke imaju jedan kromosom manje od mužjaka označujemo sa Z0/ZZ. Sustavi XX/X0 i Z0/ZZ su vjerojatno nastali gubitkom Y ili W kromosoma, a spol je određen brojem kopija gena na X ili Z kromosomu (13).



Slika 2. Različiti oblici kromosomalnog spolnog određivanja u ljudi i kokoši (lijevo), voćnih mušica i skakavaca (desno)

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Types_of_sex_determination.png)

Sustav određivanja spola kod nekih vrsta kao što su pčele i mravi je haplodiploidija koja se temelji na zigotnosti *csd* lokusa (engl. *complementary sex determiner*). Neoplođena jajašca se razviju u haploidne jedinice koje imaju jednu kopiju *csd* lokusa i koje su mužjaci. Oplođena jajašca daju diploidne potomke, koji zahvaljujući visokoj varijabilnosti *csd* lokusa, mogu biti sterilni mužjaci, ali obično su heterozigotne ženke radilice. Povrh toga, ženke mogu određivati spol potomaka, bilo zadržavajući spermu ili je puštajući u jajovod te prema tome, ukoliko se ukaže potreba u koloniji, stvarati više radilica (14–16).

Osim genetskog postoji i **okolišno** spolno određivanje. Spol embrija ovisi o temperaturi okoliša, intenzitetu svjetlosti i fotoperiodu, dostupnosti vode i hranjivih tvari, feromonima od strane okolnih biljaka i životinja i sl. U ovom slučaju, genetska informacija za oba spola je sadržana na autosomnim kromosomima.

Nakon izloženosti određenom okolišnom faktoru, epigenetske promjene uzrokuju da jedinka postane ženka ili mužjak. Npr., u krokodila pri konstantnoj temperaturi gnijezda iznad 32 °C iz jaja se izleže više mužjaka, a ispod 31 °C više ženki (17).

1.1.1.1. Određivanje spola

Primarna spolna obilježja su definirana posjedovanjem muških ili ženskih reproduktivnih organa. Spolni sustav sastoji se od spolnih žlijezda ili gonada, spolnih kanala i vanjskog spolovila. U normalnom spolnom razvoju postoje tri faze koje se događaju jedna za drugom:

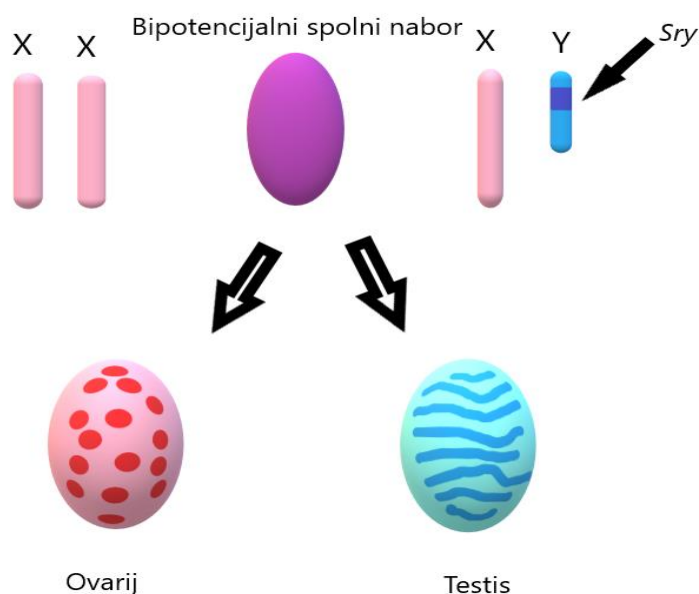
1. Inicijalno uspostavljanje kromosomskog spola pri oplodnji
2. Uspostavljanje gonadalnog fenotipa (nastajanje testisa ili ovarija)
3. Uspostavljanje spolnog fenotipa kontroliranom i programiranom proliferacijom i regresijom različitih dijelova cjevastih struktura i vanjskog genitalnog tkiva (18).

U genetici spolnog razvoja i diferencijacije ključni proces je **razvoj fetalnih gonada**. Iako je spolna sudbina sisavaca određena u trenutku oplodnje, ta sudbina se počinje ispunjavati nakon kraćeg fetalnog razdoblja spolne dvoznačnosti ili neodređenosti nakon kojeg se gonade počinju diferencirati u jajnike ili testise.

Razvoj gonada se može podijeliti u dvije faze. Inicijalna faza je karakterizirana pojavom spolnog ili genitalnog nabora kojeg čine nediferencirane, bipotentne stanice sposobne za diferencijaciju u mušku ili žensku gonadu. Druga faza obuhvaća razvoj testisa ili jajnika i potaknuta je isključivo postojanjem i funkcijom Sry gena. Razvoj spolnih kanala, vanjskih genitalija i sva sekundarna spolna obilježja su posljedica uredne diferencijacije gonada i njihove neometane funkcije (19).

Spol u sisavaca je obično određen prisutnošću ili odsutnošću malog gena sastavljenog od jednog egzona na Y kromosomu: Sry (engl. *sex-determining region Y*), a njegovo postojanje je dokazao Sinclair sa suradnicima tek 1990. (20,21). Godinu dana kasnije Koopman je pokazao da 14 kb velik odsječak DNA koji sadrži Sry ubačen na X kromosom može inducirati razvoj testisa i usmjeriti

razvoj XX miševa u mužjaka (22). Ekspresija *Sry* gena u spolnim naborima rezultira razvojem testisa, dok njegovo odsustvo ili disfunkcija dovode do razvoja ovarija. Taj proces nazivamo **Y-centriranim spolnim određivanjem** (sl. 3). Jost je 1947. pokazao da, ukoliko se XX i XY zečji fetusi kastriraju *in utero*, prije spolne diferencijacije, nastavljaju razvijati ženske unutarnje i vanjske genitalije. Dugo vremena se smatralo da razvoj u ženski spol predstavlja pasivno, „*default*“ stanje u odsutnosti *Sry* gena (23). Novija istraživanja, ipak, sve više dokazuju važnu i aktivnu ulogu ženskih spolno determinirajućih gena u razvoju ovarija (24).



Slika 3. Ekspresija *Sry* gena u spolnim naborima dovodi do razvoja testisa, a njegovo odsustvo do razvoja ovarija.

1.1.1.2. Formiranje spolnih nabora

Spolni nabori su prekursori gonada oba spola. Ovaj jedinstveni primordij ima bipotencijalnu prirodu, jer od njega mogu nastati ili testisi ili jajnici (25). Spolni nabor je građen od linije somatskih ili potpornih stanica i linije zametnih ili germinalnih stanica. Ove dvije linije imaju različito embriološko porijeklo i poziciju u embriju.

U miša formiranje spolnih nabora počinje na ventralnoj površini mezonefrosa kao parno zadebljanje epitela oko E9.5. Nastajanje spolnih nabora prati proliferacija celomskog epitela i fragmentacija bazalne membrane te migracija epitela u podležeći mezenhim u obliku primitivnih spolnih tračaka. Celomski epitel je prekursor **somatskih stanica** gonada. Oko E9.5 u celomskom epitelu neke od stanica se diferenciraju u SF-1 pozitivne gonadalne progenitorne stanice. Njihov broj mitotskim diobama raste (E10.0) te je oko E10.5 višeslojan u celomskom epitelu. Nakon toga, one migriraju u dorzalni unutarnji mezenhim kroz fragmentiranu bazalnu membranu i čine primordij spolnog nabora (E11.75). U XY gonadama, dio stanica kćeri ovih SF-1 pozitivnih stanica postaje prekursorima Sertolijevih stanica, a u XX gonadama prekursorima granuloza stanica (26).

U dijelu stanica epiblasta u proksimalnom dijelu pregastrulacijskog embrija (E6.25) nastaju progenitorne **stanice zametne linije**. Progenitorne stanice formiraju staničnu nakupinu oko E6.75, a zatim se u toj staničnoj nakupini počinju diferencirati primordijalne zametne prastanice. One se translociraju iz mezoderma u endoderm tako što se inkorporiraju u invaginaciju stražnjeg crijeva i rašire duž embrionalnog crijeva. Oko E10.0 migriraju kroz dorzalni mezenterij i smjeste se u spolni nabor (27). Nakon njihovog dolaska, bipotencijalna gonada kreće u razvoj ili prema testisu ili prema jajniku, a to ovisi o već spomenutoj diferencijaciji somatskih stanica u Sertolijeve ili granuloza stanice.

Sličan tijek događaja se odvija i u čovjeka. Spolni sustav, kao i mokraćni, se razvijaju od zajedničkog parnog mezodermalnog tračka (intermedijarni mezoderm), duž stražnje stijenke trbušne šupljine. Početkom 4. tjedna nastaju parni urogenitalni nabori. 5. tjedan se od osnove za bubreg (mezonefros) odvaja osnova za gonade – spolni nabor. Spolni nabori se formiraju umnažanjem celomskog epitela te zgušnjavanjem mezenhima. U 6. tjednu razvoja se u njih u usele spolne stanice, te u 7. tjednu počinju dobivati muške ili ženske značajke (28). Zanimljivo je napomenuti jedno novije istraživanje u kojem Makiyan vodećim determinacijskim faktorom spolnog određivanja gonada smatra strukture mezonefrosa (29).

1.1.1.3. Aktivacija Sry gena

Iako Sry, kao glavni regulator, pokreće kaskadu čimbenika koji usmjeravaju i određuju životnu sudbinu organizma (muški ili ženski spol), njegova ekspresija je limitirana isključivo na potporne/somatske stanice spolnog nabora koje usmjerava u diferencijaciju prema Sertolijevim stanicama (30) i na vrlo uski vremenski period. U miša, ekspresija Sry je uočena od 10.5 dana postkoitalno do 12.5 kada se naglo gasi (31). Dakle, precizna i osjetljiva regulacija transkripcije Sry, kao i njegovo pravovremeno isključivanje, su ključni u pokretanju i pravilnom razvoju muške jedinke. Postoji također i razlika među vrstama: njegova ekspresija u čovjeka nije toliko prostorno limitirana, a u zečeva i ovci dulje traje (32).

Sry je glavni gen u određivanju muškog spola, no potrebno je i djelovanje mnogo drugih gena za razvoj testisa. Sry kodira transkripcijski faktor SRY (ili po ranijoj nomenklaturi TDF, engl. *testis-determining factor*) koji sadrži HMG-box (engl. „*high mobility group*“ box), domenu koja omogućuje vezanje na DNA (20). SRY se, u zajedničkoj akciji s SF-1, veže na pojačivač TES (engl. *testis specific enhancer*) Sox9 (engl. *SRY-related HMG-box gene 9*) gena (33) u već spomenutom kritičnom vremenskom periodu u potpornim stanicama XY bipotencijalne gonade.

Oba, i Sry i Sox9, su nužno potrebni i dovoljni za pokretanje diferencijacije potpornih stanica spolnih nabora u Sertolijeve stanice (34). Sertolijeve stanice, direktno i indirektno induciraju diferencijaciju drugih stanica u gonadama i mezonefrosu u Leydigove stanice i peritubularne mioidne stanice. Također potiču zametne stanice u formiranje sjemenih kanalića (35,36). Dodatno, Sertolijeve stanice eksprimiraju *Fgf9* koji održava visoke razine Sox9 ekspresije (37). Nakon prestanka ekspresije Sry u kasnijem fetalnom razdoblju visoka razina izražaja Sox9 perzistira zbog ravnoteže maskulinizirajućeg *Fgf9* i feminizirajućeg *Wnt4* (38), te perinatalno i postnatalno radi fine ravnoteže akcije Sox9 i *Dmrt1* s jedne strane te *Foxl2*, estrogena i retinoidne kiseline s druge strane (39,40). Ekspresija Sry također ovisi o prisutnosti transkripcijskog faktora GATA4. Fosforilacija GATA4 pomoću MAPK puta, te aktivacija kofaktora ZFP281 i SIX1/4 omogućuju

vezivanje GATA4 na dvije regije DNA na *Sry* promotoru (32,41,42).

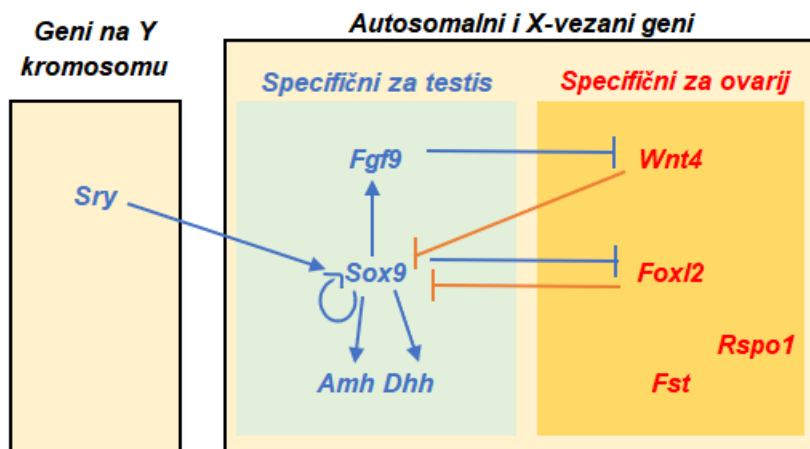
Slijedeći faktor koji je ključan za regulaciju *Sry* gena je SF-1 koji svoju akciju ostvaruje na dva načina: direktnim vezanjem na *Sry* i regulacijom već spomenutog gena *Sox9* (33,43). Na njegovo djelovanje pak učinak imaju proteini iz skupine polikomb CBX2, CITED2 u interakciji s WT1 proteinom, te već spomenuti transkripcijski faktori SIX1 i SIX4 (44–46). Treći važni regulacijski faktor je WT1 koji u interakciji s GATA4 može aktivirati *Sry* promotor u miša, svinje i čovjeka (47).

DAX1 je nuklearni receptor kodiran od gena *Dax1/NR0B1* na X kromosomu. Djeluje kao negativni regulator SF-1 (48,49). Također ima djelovanje kao „anti-testis“ faktor, djelujući antagonistički na SRY (50). Transgenični XY miševi s dodatnim kopijama *Dax1* gena pokazuju odgođeni razvoj testisa (51), dok manjak *Dax1* na X kromosomu u XY miša dovodi do steriliteta radi poremećene morfogeneze sjemenih kanalića (52). U čovjeka *Dax1* mutacija uzrokuje X-vezanu kongenitalnu adrenalnu hipoplaziju i hipogonadotropni hipogonadizam (53). U diferencijaciji somatskih i zametnih stanica u budućim muškim gonadama također je izrazito bitan gen *Dmrt1* (54,55). Osim u determinaciji spola, bitan je i u održavanju muškog gonadalnog spola, naime, njegov gubitak dovodi do transdiferencijacije Sertolijevih stanica u granuloza stanice i ženske morfologije gonada (56). mRNA profiliranje je pokazalo da DMRT1 aktivira mnoge testikularne gene i utišava ovarijske, tako npr. može utišati *Foxl2* čak i u odsutnosti testis-determinirajućih gena *Sox8* i *Sox9* (57).

U XX gonadama bez *Sry* gena i njegove ekspresije, potporne stanice spolnog nabora diferenciraju se u granuloza stanice. Nije potpuno jasno da li granuloza stanice induciraju druge gonadalne stanice prema ženskom putu razvoja ili se to događa po „*defaultu*“ tj. kao zadano. Wnt/ β -katenin signalni put je izrazito evolucijski sačuvan put koji sudjeluje u procesima stanične proliferacije, diferencije, staničnog reprogramiranja i karcinogeneze (58). WNT signalne molekule kao što su RSPO1 i WNT4 se izražavaju u XX gonadalnim somatskim stanicama i potrebne su za određivanje ženskog spola (59–61). Čini se da svoju akciju bar dijelom ostvaruju smanjujući ekspresiju *Sox9* gena i djelujući antagonistički FGF9 signalnim molekulama (38). Također je bitna

ekspresija FOXL2, „forkhead“ transkripcijskog faktora, koji je ključan za diferencijaciju i održavanje granuloza stanica (62,63). Štoviše, disrupcija *Foxl2* u zrelih granuloza stanicama dovodi do transdiferencijacije i *up*-regulacije markera Sertolijevih stanica (64). *Sox3* se eksprimira u gonadama u razvoju i mozgu, te se evolucijski smatra genom prekursorom *Sry*. No, istraživanja su pokazala da nije potreban za spolno određivanje gonada, nego je važan za normalan razvoj oocita i gametogenezu (65). WNT4 i FOXL2 su uključeni u pozitivnu regulaciju *Bmp2*, a zajedno s RSPO1 aktiviraju ekspresiju *Fst*.

Nalazimo sve više dokaza da je genetička mreža koja stoji iza spolnog određivanja i diferencijacije puno složenija i dinamičnija nego što se ranije mislilo. Muški i ženski geni za određivanje spola djeluju međusobno antagonistički (sl. 4) u uspostavljanju i održavanju različitih potpornih stanica tijekom fetalnog, ali i odraslog života (24).



Slika 4. *Sry* uključuje slijed regulatornih koraka koji zajednički potiču razvoj testisa, a suprimiraju razvoj ovarija.

Dok se razvijaju primitivne gonade iz spolnog nabora, u embriju se također formiraju cjevaste strukture koje će postati unutrašnji spolni organi. Tijekom ranih stadija, embriji oba spola imaju iste strukture koje su još spolno neodređene. Parni mezonefritički (Wolffovi) kanali i parni paramezonefritički (Müllerovi) kanali nastaju *de novo* iz uzdužnih nabora uzduž lateralne stijenke trbušne šupljine (18).

Nakon što se diferenciraju sjemenici ili jajnici, daljnji razvoj mužjaka ili ženke se odvija zbog djelovanja spolno specifičnih gonadalnih hormona.

U sjemenicima se stvara testosteron (T) i antimilerijanski hormon (AMH) koji osiguravaju razvoj muškog reproduktivnog sustava i diferencijaciju muških spolnih kanala. Ovi hormoni utječu na regresiju ženskih embrionalnih tubularnih struktura i potiču razvoj muških (epidimis, *ductus deferens*, akcesorne spolne žlijezde) te stimuliraju progresivni razvoj struktura koje daju osnovu za vanjske spolne organe.

Razvoj ženskih unutarnjih i vanjskih genitalija se događa u ženskim embrijima u odsutnosti testosterona i AMH. Modeliranje ženskih cjevastih organa uključuje rast, stapanje i ekstenziju embrionalnih paramezonefritičkih Müllerovih kanala te formiranje jajovoda, uterusa, cerviksa i kranijalnog dijela vagine. Promjene u urogenitalnom recesusu, genitalnoj kvržici i naborima stvaraju vulvu, klitoris, vestibulum i kaudalni dio vagine. Proces se u ljudi završava do oko 22. tjedna.

1.1.2. Sekundarna spolna obilježja i spolni dimorfizam

U sisavaca, pa tako i čovjeka razlikuju se dvije jasno odvojene kategorije: muško i žensko – sa svim genetskim, gonadalnim, anatomskim i psihološkim aspektima pripadanja tom spolu. O iznimkama u ovoj jasnoj binarnoj podjeli u smislu gradijenta između muškog i ženskog spola bit će govora kasnije.

Proces determinacije spola odvija se za vrijeme fetalnog razdoblja, a ključan trenutak u tom procesu je razvoj jajnika ili testisa (primarna spolna obilježja). Od tog trenutka nadalje sudbina jedinke ovisi o spolnim hormonima koji se stvaraju u gonadama i koji definiraju biološki spol – aktiviraju se geni potrebni za razvoj muškog reproduktivnog sustava ili se „dopušta“ razvoj ženskih organa (66). Složenim međusobnim djelovanjem gena smještenih na spolnim i autosomnim kromosomima se diferenciraju spolne žlijezde koje izlučuju spolne hormone. Gonadalni hormoni, pod utjecajem hipotalamo-hipofizne osi, svojim djelovanjem na gensku ekspresiju u brojnim tkivima u doba puberteta daju konačan fenotipski izgled mužjaka ili ženke (67). Novija istraživanja upućuju na to da npr. testosteron

ostvaruje spolni dimorfizam i epigenetski, upravljajući metilacijom DNA uzvojnice i time inaktivirajući neke gene (68,69).

Iako su se tradicionalno spolne razlike pripisivale djelovanju spolnih hormona, novija istraživanja sve više ističu ulogu gena, osobito gena smještenih na spolnim kromosomima, u nastanku i održavanju spolnog dimorfizma. Par homolognih autosomnih kromosoma naših predaka se kroz period od 166 milijuna godina razvio u X i Y kromosome te je tako ustanovljen dimorfizam svake stanice našeg tijela koja sadrži jezgru (70). Urođena razlika u ekspresiji gena smještenih na X i Y kromosomu, te također njihov epigenetski mehanizam regulacije ekspresije gena, također može doprinijeti spolnoj diferencijaciji ne-gonadalnih stanica u organizmu.

Sekundarna spolna obilježja predstavljaju spolno dimorfne karakteristike koje se pojavljuju tijekom puberteta i razvijaju tijekom spolnog sazrijevanja jedinke. Sekundarna spolna obilježja su ona koja nisu direktno involvirana u reprodukciju, već su bitna za privlačenje partnera ili za brigu za potomstvo. Mnoge sekundarne spolne karakteristike predstavljaju ujedno i spolni dimorfizam. Te karakteristike su izrazito varijabilne između različitih biljnih i životinjskih vrsta.

U biljnom svijetu je spolni dimorfizam generalno manje razvijen nego u životinjskom i prevladava monomorfizam. Većina (oko 90%) cvatućih biljaka pokazuje hermafroditizam, s jedinkama koje funkcioniraju i kao ženski i kao muški roditelj. Za razliku od njih, dvodomne biljke imaju različite muške i ženske jedinke tj. jednospolni cvjetovi se nalaze na odvojenim biljkama. Kod ovih vrsta muške i ženske biljke se često razlikuju u morfološkom i fiziološkom pogledu, a spol jedinke se obično ne može odrediti prije cvjetanja bez spolno specifičnih genetskih markera (71). Kod nekih vrsta muško sjeme je teže, veće i klija ranije od ženskog (72), a u dugoživućih biljaka, muške biljke često nadmašuju ženske u jakosti, veličini izdanaka i kapacitetu za klonalnu propagaciju (73).

Darwin je 1871. u djelu „*The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*“ iznio teoriju spolnog odabira u kojoj je opisao mnogo primjera životinjskih vrsta u kojima se mužjaci i ženke dramatično razlikuju u morfologiji, koloraciji i ponašanju. Budući da je uočio da teorija prirodnog odabira ne može objasniti mnoge adaptacije koje ne povećavaju vjerojatnost preživljenja, smatrao je da se

spolni dimorfizam može objasniti onim varijacijama jedinki koje osiguravaju veću uspjeh u parenju. U odlomku u knjizi „*On the Origin of Species*“ navodi:

... "when the males and females of any animal have the same general habits ... but differ in structure, colour, or ornament, such differences have been mainly caused by sexual selection."

Razlikuje dva oblika spolnog odabira. Prvi oblik je intraseksualna selekcija – borba za partnera između jedinki istog spola, obično mužjaka (engl. male to male competition). Sekundarne spolne karakteristike (npr., veliki očnjaci, rogovi, njuške i sl.) koje daju mužjaku prednost u fizičkom sukobu mogu omogućiti njegovu pobjedu i osigurati mu dominaciju. Dominantni mužjak će se moći pariti s više ženki te će geni koji osiguravaju tu prednost postati rašireni u populaciji. Drugim riječima, to sekundarno spolno obilježje biti će prirodno odabrano. Važno je istaknuti da spolni i prirodni odabir vrše ponekad suprotne pritiske na neko obilježje. Npr., spolni odabir vodi do izrazitog preuveličavanja ornamentacije ili koloracije. S jedne strane to dovodi do prednosti u privlačenju jedinki suprotnog spola, dok s druge strane predstavlja rizik za preživljavanje zbog povećane vidljivosti i smanjene pokretljivosti pri bijegu od predatora. No, dokle god je reproduktivna korist posjedovanja neke karakteristike veća od cijene postavljene od strane prirodnog odabira, ta će se karakteristika širiti u populaciji. To znači da će čak i obilježje koje uzrokuje raniju smrt mužjaka, ali omogućuje bolju reprodukciju, biti *benefit* za vrstu. Ova ravnoteža održava dimorfizam i osigurava da slijedeće generacije mužjaka posjeduju obilježje privlačno ženkama.

Drugi oblik je interseksualna selekcija ili „odabir partnera“, obično od strane ženki. One biraju mužjaka s većim, sjajnijim i boljim ukrasima da bi povećale vjerojatnost preživljenja potomaka svojim izborom partnera s boljim genima na dva načina. Teorija „dobrog ukusa“ ili „seksi sinova“ kaže da ženke biraju razmetljive mužjake jer će njihovi ukrasi biti naslijeđeni od strane sinova čime će oni imati bolju šansu za razmnožavanje. Teorija „dobrih gena“ pretpostavlja da jače ornamentacije znače i povećanu otpornost na bolesti i generalno bolje zdravlje koje može biti preneseno na potomke.

U većini vrsta, mužjaci i ženke imaju drugačije strategije u igri udvaranja radi različitih uloga koje investiraju u stvaranje potomaka (74). Batemanov princip

kaže da ženke inicijalno puno više investiraju u produciranje potomaka (proizvodnja jaja, trudnoća) dok je u velikoj većini vrsta mužjakova jedina kontribucija za opstanak potomstva njegova spolna stanica (75,76). Prema tome, reproduktivni uspjeh mužjaka će najčešće biti limitiran dostupnošću potencijalnih partnerica, dok reproduktivni uspjeh ženki najčešće ovisi o dostupnosti resursa. Također, što je veća investicija ženke, ona će detaljnije i pažljivije birati. Danas su ti koncepti i teorije dobro kvalitativno i kvantitativno istraženi i ova tema zauzima važno mjesto u evolucijskoj i bihevioralnoj ekologiji (77–79).

Sekundarna spolna obilježja i spolno dimorfno obilježja **u životinja** su raznolika i obuhvaćaju puno različitih tipova: razlike u veličini i masi (SSD, engl. *sexual size dimorphism*), ornamentaciju, koloraciju, glasanje, razlike u ponašanju i dr.

Možda najuočljivije obilježje koje se odnosi na fizičke razlike između dva spola je razlika u veličini. Često je jedan spol veće tjelesne mase od drugoga. U većini vrsta životinjskog svijeta (insekti, žabe, ptice, sisavci) mužjak je veći od ženke. Postoje i obrnuti primjeri, gdje su ženke veće od mužjaka. Taj fenomen je osobito dobro proučen u pauka, gdje su ženke dramatično veće od mužjaka (sl. 5). Kod nekih vrsta pauka, kao i bogomoljki, pronađena je korelacija sa seksualnim kanibalizmom, gdje veće ženke nisu toliko sklone pojesti mužjaka prilikom parenja, a uz to pokazuju i veću plodnost. Mužjaci koriste različite strategije da bi povećali vjerojatnost reprodukcije i vlastito preživljenje: odabirom većih ženki, vezanjem ženki svilom, modificiranjem mreži ženki, parenjem dok se ženka hrani ili donošenjem „poklona“ prije parenja (80,81).

Dokaz da je spolni dimorfizam produkt kako genetskih tako i okolišnih faktora je riba *Lamprologus callipterus* (sl. 6). Mužjaci ove ribe mogu biti do šezdeset puta veći od ženki. Ženke se gnijezde u praznim puževim školjkama koje prikupljaju mužjaci u agresivnoj borbi s drugim mužjacima za što veće školjke. Tijelo ženke mora ostati malo jer mora položiti jaja unutar školjke. Također, iako ženke preferiraju veće školjke, one često nisu dostupne. Dakle, ženkin rast je limitiran veličinom školjki i može se promijeniti ovisno o veličini školjki dostupnih za gniježđenje i veličini i snazi mužjaka da ih prikupi (82,83).



Slika 5. Ženka (lijevo) i mužjak (desno) pauka *Argiope appensa*
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Male_and_female_A._appensa.jpg



Slika 6. Ženka (lijevo) i mužjak (desno) ribe *Lamprologus callipterus*

Uobičajeni i lako prepoznatljivi tipovi dimorfizma su ornamentacija i koloracija. Za ukrašavanje ili ornamentaciju najbolji primjer nalazimo kod paunova, gdje je razlika između raskošnog i raznobojnog repa mužjaka i smeđe neuočljive boje ženke tolika da se čini da mužjak i ženka pripadaju različitim vrstama (sl. 7).

Razlika u boji između spolova se naziva spolni dikromatizam i često je prisutna u ptica i reptila. Primjer za ovu vrstu spolnog dimorfizma je plavetna sjenica *Parus caeruleus* (sl.8). Perje mužjaka je nešto žuće od perja ženki, vjerojatno radi hranjenja zelenom Lepidoteran larvom, koja sadrži veliku količinu karotenoida luteina i zeaksantina. Iako se mužjaci se ljudskom oku čine više žutima, ženka koje vide u UV spektru perje izgleda intenzivno plavo i indikator je dobrog zdravlja i prehrane mužjaka te prema tome i potencijalno dobrog genetskog materijala (84).



Slika 7. Ženka (desno) i mužjak (lijevo) pauna *Pavo cristatus*



Slika 8. Mužjak plavetne sjenice *Parus caeruleus*

Većina vrsta sisavaca je karakterizirana spolnim dimorfizmom koji se očituje u veličini. Obično su mužjaci veći, iako i tu postoje iznimke. Renschovo pravilo kaže da spolni dimorfizam u veličini (SSD) raste s veličinom vrste ako je mužjak veći, dok opada ako je ženka veći spol u vrsti. Spolni odabir djeluje putem prvenstveno muško-muške kompeticije (85,86). *Mirounga leonina*, južni morski slon, pokazuje izraziti spolni dimorfizam u veličini (sl. 9). Mužjak je jako teritorijalan i kontrolira veliku skupinu puno manjih ženki. Razlika u veličini nastaje dijelom radi spolnog odabira, a dijelom i radi toga jer ženke ulaze u reproduktivnu dob puno ranije od mužjaka. Dok mužjaci investiraju isključivo u masu bez ikakvog roditeljskog angažmana, ženke investiraju u potomstvo (87).



Slika 9. Ženka (lijevo) i mužjak (desno) južnog morskog slona *Mirounga leonina*

Obilježja koja razlikuju dva spola u sisavaca također mogu biti veličina očnjaka, kraniofacijalna struktura, veličina i oblik kostiju, vokalizacija, krzno te obilježja kao što su brada, krijesta, boja kože i sl.

U primata postoji izrazita korelacija između poliginije i spolnog dimorfizma. Monogamne vrste pokazuju niži stupanj spolnog dimorfizma, jer monogamni mužjaci imaju niži diferencijalni reproduktivni uspjeh (88). Također, mužjaci u poliginim vrstama imaju veće i jače očnjake od mužjaka u monogamnim i poliandričnim sistemima parenja. U čovjeka se spolovi razlikuju puno više nego

u monogamnih, no ipak i puno manje nego u poligamnih životinja (89). Primati koji žive na tlu pokazuju veći stupanj dimorfizma od onih koji žive na drveću, pretpostavlja se radi veće izloženosti potencijalnim predatorima, te jer bi primatima koji žive na drveću veća tjelesna masa mogla smanjivati pokretljivost (90,91).

1.1.2.1. Spolni dimorfizam u čovjeka

Najčešće pitanje prilikom rođenja djeteta je da li je djevojčica ili dječak. Od tog trenutka naš spol, bio on muški ili ženski utječe na gotovo svaki vid našeg života. Spolne razlike utječu na fiziologiju i mehanizam nastanka bolesti u svim ili gotovo svim tkivima (92). Također, pripadanje jednom spolu čini razliku, ne samo u biološkom, već i socijalnom, ekonomskom i kulturalnom pogledu.

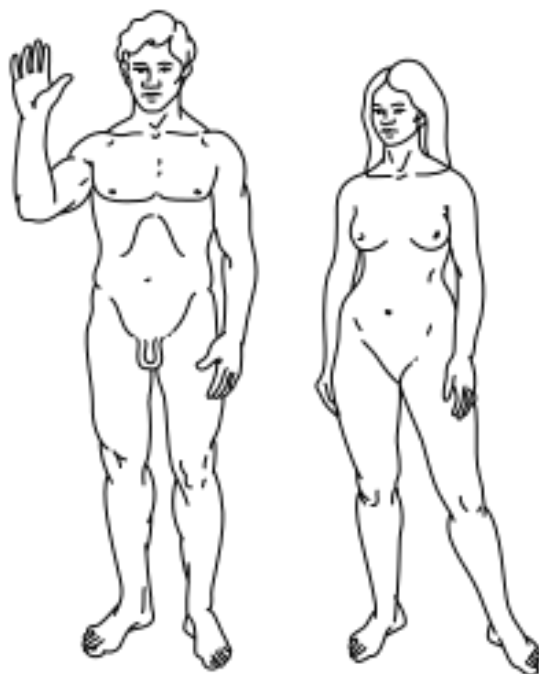
Razlike među spolovima u ljudi su istraživane u mnogim područjima. Kao i kod većine drugih sisavaca, biološki spol je određen pri začeću, prisutnošću ili odsutnošću Sry gena i formiranjem gonada. Fenotipski spol se odnosi na spol osobe koji je određen unutarnjim i vanjskim genitalijama, ekspresijom sekundarnih spolnih obilježja i ponašanjem. Spolna neodređenost u ljudi je rijetka pojava i nazivamo je interseksualnost.

Iako se nama ljudima razlike između žena i muškaraca čine značajnima, zapravo, u usporedbi s drugim vrstama, *Homo sapiens* ispoljava nisku razinu spolnog dimorfizma. U muškaraca su karakteristična sekundarna spolna obilježja dlakavost lica (brkovi i brada) i prsa, općenito povećana dlakavost tijela, uža zdjelica, snažniji gornji dio tijela, te sposobnost povećanja mišićne mase brže od žena. U žena nalazimo relativni manjak tjelesne dlakavosti, gušću kosu, zaobljene bokove i figuru, dojke i sposobnost dojenja potomstva, menstrualni ciklus, te povećan udio masti u građi tijela (sl. 10).

U *Homo sapiensa* prosječna razlika u veličini mase tijela između spolova je oko 15% u korist muškaraca. Odrasli muškarci imaju veću nemasnu tjelesnu masu i mineralnu masu od žena. U SAD-u, odrasli muškarci su, u prosjeku, 9% viši i 16,5% teži od žena. Distribucija tkiva je također različita: muškarci imaju veću mišićnu masu tijela, veće i jače kosti i centralni raspored abdominalne masti,

dok žene imaju periferniju raspodjelu masnog tkiva (93). Razlike među spolovima u sastavu tijela se primarno vežu uz djelovanje spolnih hormona, osobito tijekom pubertetskog perioda. Djelovanje estrogena je bitno ne samo zbog utjecaja na raspodjelu masti, nego i zbog specifičnog razvoja koštane mase kod žena koji donosi veći rizik od osteoporoze u starijoj dobi (94,95).

Prosječni bazalni metabolizam je viši oko 6%-10% u muškaraca nego u žena nakon puberteta. Podaci o apsolutnoj snazi pokazuju da žene u prosjeku imaju 40-60% snage gornjeg dijela tijela muškaraca i 70-75% snage donjeg (96,97), te da su muškarci u prosjeku 11% brži u trčanju od žena (98). Muškarci obično imaju veću traheju i bronhe, te oko 30% veći volumen pluća po jedinici tjelesne mase (99,100), kao i veće srce, 10% viši broj eritrocita, viši hemoglobin, veću koncentraciju faktora zgrušavanja i veći broj trombocita. Cijeljenje rana je brže, kao i periferna tolerancija boli. Kao i kod većine vrsta, žene su „imunokompetentnije“: obično imaju viši broj leukocita (kako pothranjenih, tako i onih u cirkulaciji), više granulocita te T i B limfocita. Stvaraju više protutijela, rjeđe obolijevaju od zaraznih bolesti, a ako obole, brže se oporavljaju (101–103).



Slika 10. Muškarac (lijevo) i žena (desno) *Homo sapiens* (dio ilustracije plakete na letjelici Pioneer 10)

Danas u znanosti nalazimo sve više dokaza da razlike između spolova postoje i u organima i sustavima za koje se dugo vremena smatralo da, osim u razlici u veličini, ne podliježu spolnom dimorfizmu. Primjeri su brojni. Kod životinja, ali i kod čovjeka, takve razlike su uočene na žlijezdama slinovnicama (104,105) i suznim žlijezdama (106), nadbubrežnim žlijezdama (107), bubrežima (108), jetri (109,110), hipofizi (111), metabolizmu lipida i lipoproteina (112,113).

Razvoj i primjena neinvazivnih slikovnih tehnologija kao što su magnetna rezonanca (MR) i PET-CT su omogućile istraživanja razlika u morfologiji između muškog i ženskog mozga te povezanosti kognitivnih funkcija s njihovim moždanim korelatima. Istraživanja pokazuju veći udio sive tvari u žena, te veći apsolutni volumen mozga u muškaraca (114). Drugi radovi su pokazali spolni dimorfizam u debljini korteksa i girifikaciji, volumenu i konektivnosti bijele tvari, pokazujući generalno da ženski mozak ima deblji korteks i da postoji spolno uvjetovana razlika u povezanosti bijele tvari (115–117). Slikovno-teoretske analize ljudskog mozga pokazuju da je strukturalni konektom žena (karta neuronskih veza u mozgu) puno bolji od onog u muškarca (118).

Razlike u kognitivnim performansama između muškaraca i žena su dobro opisane. Muškarci pokazuju superiornost u prostornim i vizualno-prostornim zadacima, dok su žene nadmoćnije u zadacima verbalne fluencije, te zadacima koji zahtijevaju memoriju prepoznavanja i epizodno pamćenje (119). Također je važno istaknuti da morfološke i fiziološke razlike između muškog i ženskog mozga ne mogu biti translatirane na razlike u intelektu i inteligenciji. Haier je u svom istraživanju pronašao da muškarci i žene dosežu sličan IQ rezultat koristeći različite regije mozga, što sugerira da ne postoji jedinstvena neuroanatomska struktura za inteligenciju i da različiti tipovi moždanog dizajna mogu manifestirati jednako vrijedne intelektualne dosege (120).

I geni i hormoni imaju utjecaj na nastajanje i oblikovanje ljudskog mozga prije rođenja te utječu na ponašanje jedinke. Primjer kako hormoni utječu na formiranje moždanog tkiva vidimo u razvoju dva izrazito spolno dimorfna područja mozga: spolno dimorfne jezgre u preoptičkoj regiji hipotalamusa (engl. *sexually dimorphic nucleus in preoptic area*, SDN-POA) i ležišne jezgre strije terminalis (engl. *bed nucleus of the stria terminalis*, BNST). Ove regije su bitne za regulaciju

spolno određenog društvenog ponašanja i reproduktivnog neuroendokrinog sustava. Neuroanatomske razlike između spolova uključuju volumen regija, broj stanica, njihovu povezanost, fiziologiju i profil neurotransmitera. Androgeni koje proizvode testisi se transportiraju u moždane stanice i u njima djeluju preko androgenih receptora ili služe kao supstrat za enzim aromatazu. Aromatizacijom nastaju neuroestrogeni koji djelovanjem preko estrogenih receptora formiraju i organiziraju ova spolno dimorfna područja mozga u sisavaca. Novije studije sugeriraju da bi mehanizmi kojima neuroestrogeni to čine bili: induciranje spolnih razlika u gliju i imunološkim stanicama i kontrola broja neurona reguliranjem apoptoze ili fenotipskom organizacijom živih stanica. U razdoblju nastupanja puberteta, testikularni androgeni direktno, bez prethodne aromatizacije pridonose spolnoj diferencijaciji ovih moždanih jezgara (121,122).

No, iako je utjecaj hormona više proučen i bolje ga razumijemo jer je u istraživanjima puno lakše manipulirati razinom hormona, sve je više dokaza da razlike u ekspresiji gena smještenih na X i Y kromosomima značajno doprinose urednoj funkciji mozga i nastajanju bolesti. Također, u čovjeka, analizu dodatno otežava činjenica da se i socijalni utjecaji moraju uzeti u obzir. Slučajevi poremećaja spolnog razvoja, kao što su sindrom kompletne neosjetljivosti na androgene, kongenitalna adrenalna hiperplazija i sindrom deficijencije 5 α -reduktaze daju bitan uvid u genetski utjecaj jer razvoj mozga i bihevioralni fenotipi u ovim patološkim stanjima uvelike ovise o spolu osobe (123). Usporedba mozga mužjaka i ženki ptica Junco je pokazala različitu ekspresiju 651 gena u medijalnoj amigdali i 611 gena u hipotalamusu (69).

Utjecaj genetskih faktora pokazuju također studije učinjene na mozgovima *Sf-1* KO miševa. One su pokazale da spolni dimorfizam u dvije regije mozga u sisavaca, preoptičkoj regiji i ventromedijalnoj jezgri hipotalamusa, perzistira i bez djelovanja spolnih hormona (124–126). Naravno, ovi utjecaji nisu potpuno odvojeni i njihovo djelovanje nije neovisno. Moguće je da genetski utjecaji na mobilnost ili položaj stanica mogu postaviti scenu za kasnije hormonsko djelovanje (127), kao što i hormonski utjecaji ili poremećaji metabolizma hormona mogu nadjačati osnovne genetičke upute (128).

Fenotipske razlike između spolova su dokazane čak i na staničnoj razini, u kulturama stanica, neovisno o prijašnjoj izloženosti spolnim hormonima (129) . Npr., mišićne matične stanice uzete od ženki miša i transplantirane u bolesni mišić bilo kojeg spola regeneriraju mišić mnogo brže od onih uzetih od mužjaka (130). Istraživači su ustanovili da muške i ženske stanice različito reagiraju na stres (131) i da pokazuju različitu koncentraciju metabolita (132).

Spolni dimorfizam je, naravno, opisan i na genskoj razini. Za oko 6500 gena u čovjeka se zna da pokazuju spolno uvjetovanu ekspresiju, kako u reproduktivnom sustavu, tako i u ostalim tkivima (133). Mnogi od ovih gena nisu direktno vezani za reprodukciju, nego su vezani uz općenita biološka svojstva. Štoviše, pogubne mutacije autosomalnih gena koji se eksprimiraju u samo jednom spolu mogu proći spolno limitiranu selekciju i doseći veću učestalost nego mutacije slično selekcionirane u oba spola. Ekspresija nekih gena vezana uz specifični spol pokazuje veći stupanj mutacija i dovodi do različite prevalencije bolesti među spolovima. Tako mutacije gena specifičnih za muškarce i bitnih za reprodukciju mogu kroz nasljeđivanje preko ženske linije dovoditi do visoke incidencije muške neplodnosti (134).

Dužina života je također spolno dimorfna kategorija, kako kod čovjeka tako i u drugih životinjskih vrsta, osobito u sisavaca. Dobro je poznato da žene žive duže od muškaraca, u većini ljudskih društava čak i 10-15 godina duže. Do sada se ta razlika pripisivala kulturalnim i socijalnim razlozima, kao i cijeni spolnog odabira i roditeljskog ulaganja. No, čini se da spolni hormoni imaju velik utjecaj u prevalenciji bolesti, načinu starenja i dužini života, kao i nasljeđivanje mitohondrija od majke. Također, novija istraživanja daju naznaku da bi i spolni kromosomi mogli doprinositi razlici u dužini života raznim mehanizmima uključujući „*unguarded X*“ hipotezu (ekspresija recesivnih mutacija sa X kromosoma u muškarca koji je hemizigot i nema odgovarajućih gena na Y kromosomu), „toksični Y“ (Y kromosom je pun transpozabilnih elemenata, TEs, koji svojim premještanjem mogu izazvati mutaciju gena) ili gubitak Y kromosoma iz stanica koji nastupa sa starenjem organizma i koji je povezan s razvojem karcinoma i drugih bolesti (135–137).

Spolni dimorfizam u medicini uključuje i spolno specifične bolesti tj. bolesti koje se događaju isključivo muškarcima ili ženama, i bolesti povezane sa spolom, koje su učestalije ili se manifestiraju težom kliničkom slikom kod jednog spola. Tako npr. 90% slučajeva primarne bilijarne ciroze nalazimo u žena, dok je primarni sklerozirajući kolangitis učestaliji u muškaraca (138). U nedostatku boljeg izraza u hrvatskom jeziku, medicina utemeljena na spolu ili „**spolna medicina**“ (engl. *gender-based medicine* ili *gender medicine*) je grana medicine koja proučava biološke i fiziološke razlike između spolova i kako ta razlika utječe na pojavu i manifestiranje bolesti.

Kao što je dugo vremena dijete smatrano „umanjenim odraslim“ da bi se zatim shvatilo da se radi o potpuno drugačijim fiziološkim i patofiziološkim procesima u organizmu djeteta, tako se i tradicionalna medicina dugo bazirala na androcentričkom modelu. Pretklinička ispitivanja su većinom rađena na mužjacima, a isključivanje ženki je pravdano većom biološkom varijabilnošću radi fluktuacije spolnih hormona prilikom menstrualnog ciklusa. To je nesumnjivo stvaralo ozbiljan otklon prilikom transpozicije rezultata na kliničku praksu (139,140). I kliničke studije su, također, većinom izvođene na muškim osobama, a rezultati su primjenjivani na žene, te je dijagnostika i liječenje provedeno jednako i na muškim i na ženskim pacijentima. Npr. incidencija akutnog miokardijalnog infarkta je mnogo niža među ženama mlađim od 50 godina, ali nakon menopauze, dramatično raste i približava se onoj u muškaraca. Štoviše, mortalitet i morbiditet nakon jedne i pet godina je viši u žena. Unatoč tomu, u periodu od 2002. do 2007. žene su činile samo jednu trećinu pacijenta u kliničkoj studiji evaluacije kardiovaskularne bolesti (141,142).

Kada govorimo o malignim bolestima, koje su jedan od najvećih uzroka smrti u današnje doba, epidemiološki podaci o razlikama između dva spola u incidenciji, prognozi, odgovoru na terapiju i preživljenju između jasno ukazuju na povoljnije brojke u ženskog spola. Socijalni čimbenici, kao što su radni uvjeti i bihevioralni faktori, svakako imaju ulogu u ovom spolnom dimorfizmu (143). Međutim, zanimljivo je istaknuti i bitnu ulogu spolnih kromosoma, spolnih hormona i imunog odgovora koje čine razlika na staničnom i molekularnom nivou, te dovode do karcinogeneze ili supresije rasta tumora. Gledajući razliku između

XX i XY stanica, studije pokazuju da ženske stanice imaju veću sposobnost za nadvladavanje straničnog stresa kroz poticanje protektivnih mehanizama kao što su autofagija i antioksidativni mehanizmi. U ženskim stanicama se događa nasumična inaktivacija X kromosoma što dovodi do mozaicizma i prednosti u smislu genetičke heterogenosti. Teoretski bi inaktivacija X kromosoma trebala uravnotežiti ekspresiju X vezanih gena između žena i muškaraca, dok je praktično to zapravo inkompletni proces u kojem određeni broj gena (čak do 15%) izbjegne inaktivaciju. Ako se dogodi mutacija na tumor supresorskom genu na jednom alelu, posjedovanje dvije kopije ima protektivni učinak (144,145). X kromosom je puno bogatiji genima koji kodiraju proteine imunološkog sustava i genima za miRNA. MikroRNA (engl. *miRNAs*) su male nekodirajuće RNA molekule koje sadrže obično od 20 do 25 nukleotida. Sudjeluju u regulaciji ekspresije gena na posttranskripcijskoj razini tako što degradiraju ciljnu mRNA i/ili inhibiraju njihovu translaciju. Bitno je istaknuti da su novija istraživanja identificirala gotovo 120 miRNA na X kromosomu naspram 4 na Y kromosomu, dok je prosjek na autosomima 40 do 50 (146).

Također, spolni hormoni estrogeni i androgeni imaju sposobnost moduliranja imunološkog odgovora. Generalno gledajući, u žena su imunološke funkcije bolje, a imunološki odgovor jači, osobito tijekom reproduktivnog razdoblja (147,148). Uistinu, žene imaju niži teret bakterijskih, virusnih i parazitarne infekcije, što je najevidentnije tijekom reproduktivnih godina. S druge strane, žene imaju višu prevalenciju brojnih autoimunih bolesti kao što su Sjögrenov sindrom, sistemski lupus eritematosus, sklerodermija, reumatoidni artritis i multipla skleroza (149).

Danas, uz sve brojnije dokaze o razlikama između ženskog i muškog spola, koje nalazimo već na staničnom nivou, pa zatim na razini različitih organskih sustava, metabolizma, farmakodinamike i odgovora na liječenje, razvija se svijest o potrebi za drugačijim pristupom. Uz razvoj personalizirane medicine i farmakogenetike, spolno bazirana medicina i *omics* pristup (koji obuhvaća genomiku, epigenetiku, transkriptomiku, proteomiku i metabolomiku) također počinju zauzimati važno mjesto u sveobuhvatnom pogledu na organizam žene ili muškarca.

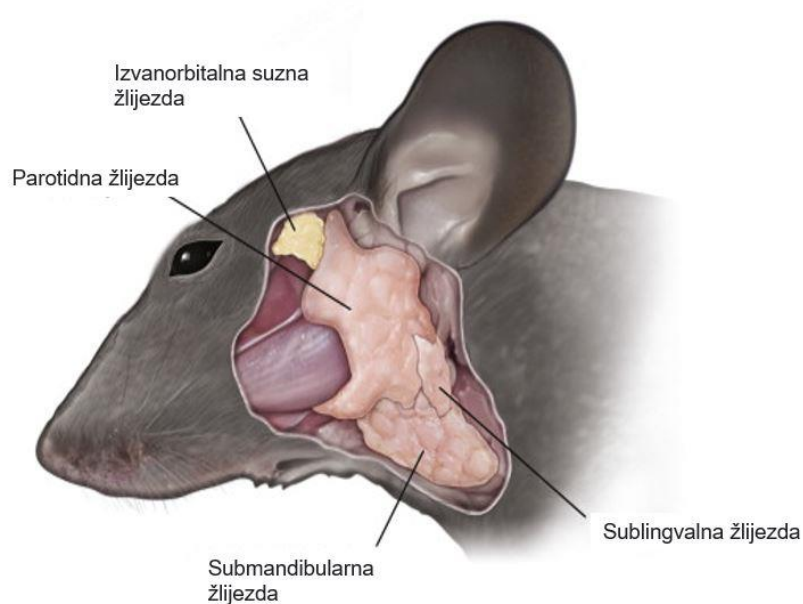
1.2. SUZNI APARAT MIŠA

1.2.1. Anatomija suznog sustava

Za razliku od čovjeka koji ima jedan par suznih žlijezda, miš posjeduje dva para suznih žlijezda (150). Manja intraorbitalna suzna žlijezda se nalazi u vanjskom kantungu oka, između zigomatične kosti, orbite i očne jabučice. Žlijezda se proteže u dubinu orbite sve do njezinog vrha. Površinski dio intraorbitalne žlijezde pokriven je fascijom vjeđe.

Na nju se naslanja struktura posebne histološke građe i funkcije, Harderova žlijezda. Ona djelomično okružuje optički živac te pokriva većinu stražnjeg dijela očne jabučice. Nalazimo ju kod životinja koje imaju treću očnu vjeđu (*membrana nictitans*) iz skupine kopnenih kralješnjaka (vodozemci, reptili, ptice, te neki sisavci, osobito glodavci). Ponekad ju se u literaturi navodi kao treći par suznih žlijezda, jer izlučuje svoj sekret u konjunktivalnu vreću. Sekret Harderove žlijezde je sastavom drugačiji od sekreta suznih žlijezda, a također se razlikuje se od vrste do vrste. U glodavaca, pa tako i miša, glavni sastojci sekreta su lipidi, porfirini i indoli. Funkcija ove žlijezde još nije u cijelosti jasna, pa se pretpostavlja da uz izlučivanje sekreta koji podmazuje treću očnu vjeđu, ova žlijezda ima i brojne druge uloge: služi kao dio imunološkog sustava, kao fotoprotektivni organ, dio retino-pinealne osi, izvor feromona, termoregulatornih lipida i dr. (151).

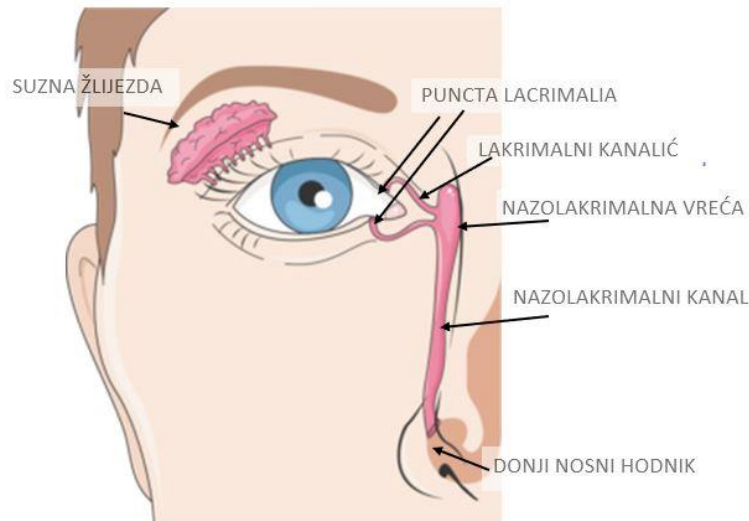
Vanjska izvanorbitalna suzna žlijezda (*glandula extraorbitalis lacrimalis, glandula Loewenthali, GL*) je veća od intraorbitalne, plosnatog oblika te smještena supkutano ispred vanjskog uha. Duboki dio te žlijezde leži na temporalnom mišiću, zigomatičnom nastavku temporalne kosti i površinskom dijelu mišića masetera (sl. 11). Budući da je smještena neposredno do parotidne žlijezde, te je slične histološke građe, dugo je smatrana njenim dijelom (152).



Slika 11. Anatomski smještaj izvanorbitalne suzne žlijezde i žlijezda slinovnica (parotidne, submandibularne i sublingvalne) u miša (Preuzeto i prilagođeno iz ©2021 Elsevier B.V.)

Glavni odvodni kanal žlijezde nalazi se na gornjem prednjem polu žlijezde i usmjeren je prema naprijed, te preko temporalnog mišića odlazi prema vanjskom dijelu gornje vjeđe. Prije nego što dosegne gornju vjeđu, odvodnom kanalu izvanorbitalne pridružuje se odvodni kanal intraorbitalne žlijezde čineći zajednički odvodni kanal. On prolazi kroz vanjski dio gornje vjeđe i izliva se u vanjski dio gornjeg forniksa spojnice. Sekret obaju suznih žlijezda se miješa s ostalim sastojcima te čini dio suznog filma. Suzni film se razlijeva po površini oka te se drenira u *puncta lacrimalia* u medijalnom očnom kutu. Od medijalnog očnog kuta suze se kanalikulima skupljaju u nazolakrimalnu vreću i prazne putem *ductus nasolacrimalis* u donji nosni hodnik.

U čovjeka, suzni aparata je sličan onom u miša, uz razliku da čovjek ima samo jedan par suznih žlijezda smještenih u gornjem temporalnom dijelu orbite. Sekret se preko odvodnog sistema prazni na očnu površinu u vanjskom gornjem kutu oka i treptanjem se raspoređuje po njoj. Sustav koji odvodi suzni film s očne površine počinje na nazalnoj strani oka s dva otvora, *puncta lacrimalia*, te se prazni preko dva lakrimalna kanalića u nazolakrimalnu vreću i donji nosni hodnik (sl. 12).



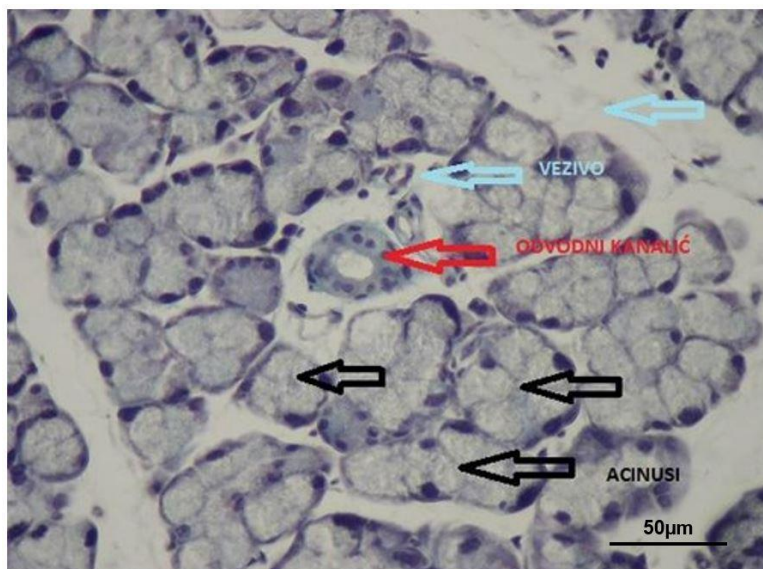
Slika 12. Suzna žlijezda i suzni odvodni kanali u čovjeka

1.2.2. Histološka građa suzne žlijezde

Suzna žlijezda miša je egzokrina žlijezda građena od acinusa i odvodnih kanala (sl. 13). Acinusi s početnim dijelom odvodnih kanalića čine režnjice (lobuluse), koji su odvojeni interlobularnim vezivom. Više lobulusa čini režnjeve (lobuse) između kojih se nalazi obilnija količina vezivnog tkiva. Cijela žlijezda je građena od režnjeva i obavijena gustim vezivnim tkivom koje nazivamo kapsula ili čahura.

Acinusi suzne žlijezde (sl.14) su sekretorni dio žlijezde, gusto su zbijeni s oskudno vezivnog tkiva između i ukupno čine oko 80% volumena žlijezde (153). Acinuse grade kubične do cilindrične stanice koje zatvaraju lumen acinusa, a smještene su na bazalnoj membrani. Stanice acinusa imaju pri bazi stanice bazofilno obojanu citoplazmu zbog dobro razvijene hrapave endoplazmatske mrežice. U apikalnom dijelu stanice citoplazma je bljeđa uz vidljivu granuliranost zbog prisutnih brojnih sekretnih zrnaca. Lumen acinusa i početnog dijela prijelaznih kanalića je jedva vidljiv i zamjećuje se na samo nekim acinusima pri većim povećanjima mikroskopa. Jezgre acinusnih stanica pokazuju umjereni pleomorfizam koji se povećava sa starošću životinje (154). Mioepitelne stanice spljoštenih jezgara okružuju acinuse i početne dijelove odvodnih kanala te svojim

kontrakcijama pomažu istiskivanje sekreta. Analiza stanica acinusa elektronskim mikroskopom pokazuje u nekim slučajevima invaginacije koje od apikalnog dijela stanice sežu sve do bazalne membrane te brojne čvrste spojeve (lat. *zonule occludentes*) između stanica acinusa (153).



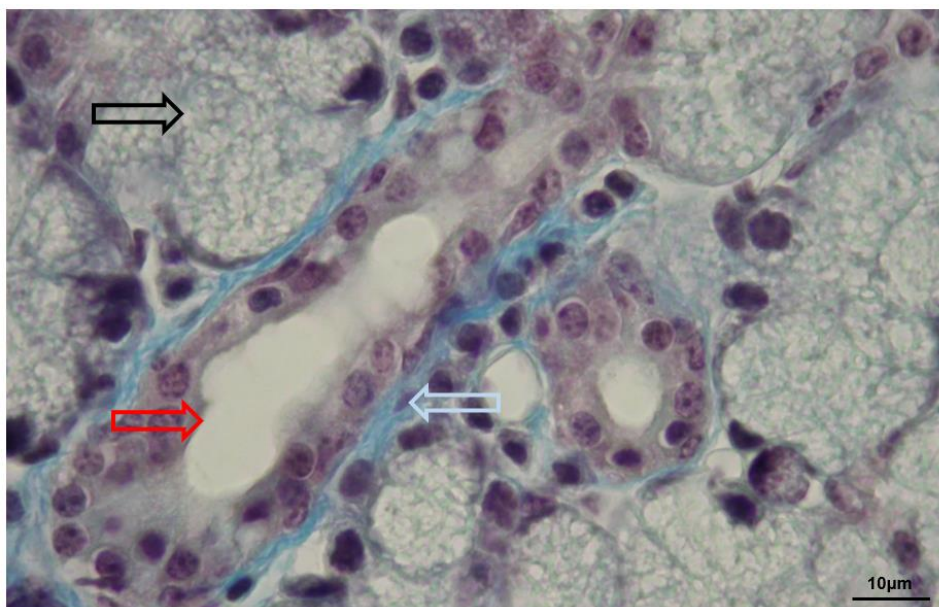
Slika 13. Preparat izvanorbitalne suzne žlijezde obojan metodom po Massonu. Crne strelice označavaju acinuse, crvena strelica intralobularni odvodni kanal, a plave strelice vezivo.
(Opažanje na povećanju 40x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 50µm)

Uloga **odvodnog sustava** (sl. 14) i njegovog epitela je odvodnja sekreta žlijezde na površinu oka, te održavanje stabilnog elektrolitnog i proteinskog sastava suznog filma (155). Kubične do cilindrične stanice koje oblažu odvodne kanale čine oko 10 do 12% površine žlijezde i stvaraju oko 30% ukupnog sekreta suzne žlijezde (156). Istraživanja provedena 70.-tih godina prošlog stoljeća pokazuju sličnost odvodnog sustava suznih žlijezda s odvodnim sustavom žlijezda slinovnica.

Odvodne cijevi dijelimo na intralobularne (prijelazne cijevi i intralobularni kanalići) i interlobularne ili prave odvodne kanale. Početni dio odvodnog sustava suzne žlijezde naziva se prijelazna cijev koja odvodi sekret iz acinusa do intralobularnog kanalića. Prijelazna cijev je obložena pločastim do kubičnim epitelom koji leži na bazalnoj membrani ispod koje se nalaze mioepitelne stanice. Stanice prijelazne cijevi razlikuju se od stanica acinusa po tome što im je

citoplazma acidofilna, ne sadrže sekretna zrnca i imaju brojna bazolateralna uvrnuća membrane i mitohondrije (157). Intralobularni kanalići su slične građe, no nešto višeg epitela i šireg lumena.

Pravi odvodni kanali, veći i manji, se nalaze u interlobularnim vezivnim pregradama. Ovisno o veličini kanala epitel je kubičan do dvoredan cilindričan. Interlobularni kanali se spajaju i čine glavni odvodni kanal žlijezde koji odvodi sekret. U miša i štakora opisani su često višestruki odvodni kanali. Kada se odvodni sustav promatra elektronskim mikroskopom, povremeno je moguće zamijetiti i po koje sekretne zrnice elektronskomikroskopski gustog sadržaja (158).



Slika 14. Preparat izvanorbitalne suzne žlijezde obojan metodom po Massonu. Crna strelice označava acinus, crvena strelica odvodni kanal, a plave strelice vezivno tkivo. (Opažanje na povećanju 100x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 10μm)

Vezivno tkivo žlijezde (sl. 14) građeno je od stanica, većinu kojih čine fibroblasti, i ekstracelularnog matriksa. Između acinusa vezivno tkivo je oskudno, no između reznjica postaje sve obilnije da bi na kraju činilo čvrstu čahuru oko suzne žlijezde. Grananje odvodnih kanala prati povećanje količine vezivnog tkiva tako da u interlobularnom vezivu nalazimo interlobularne kanaliće, krvne i limfne žile te živčana vlakna. Arterijsku krv dovodi lakrimalna arterija, lat. *arteria lacrimalis*, koja je ogranak oftalmičke arterije.

Da bi se osigurala adekvatna produkcija vodenastog dijela suznog filma, suzna žlijezda miša je obilno inervirana autonomnim simpatičkim i parasimpatičkim **živčanim vlaknima**.

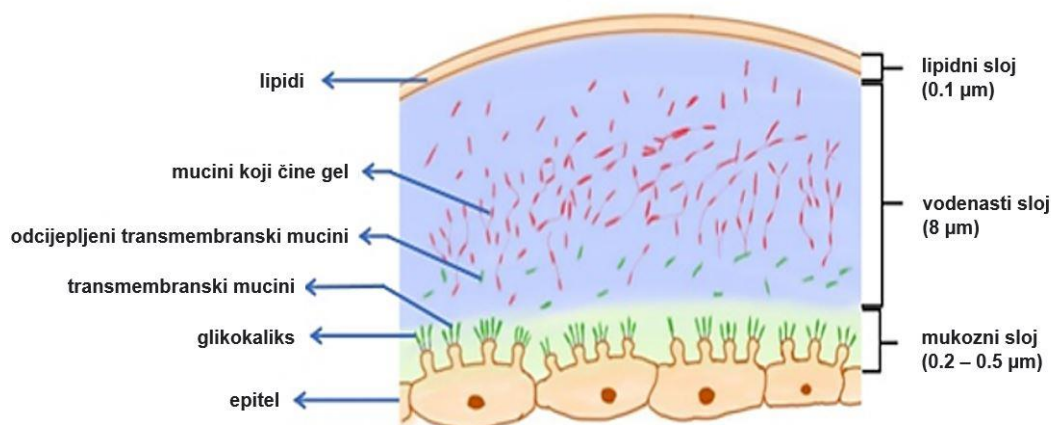
Parasimpatička opskrba žlijezde potječe iz lakrimalne jezgre ličnog živca (lat. *nervus facialis*) u ponsu, dok iz gornjeg cervikalnog ganglija (lat. *ganglion cervicale superior*) dolazi simpatička inervacija. Oskudno su prisutna i osjetna živčana vlakna. Većinu živčanih snopova čine nemijelinizirana vlakna, ali mogu se naći i mijelinizirana vlakna. Završeci živčanih vlakana su smješteni blizu acinusa, odvodnih kanala, mioepitelnih stanica, kao i krvnih žila, te tako kontroliraju različite funkcije suzne žlijezde. Komunikacijski spojevi (neksusi, engl. *gap junctions*) povezuju stanice električno i biokemijski te omogućuju i stanicama bez direktne živčane opskrbe odgovor na podražaj.

U suznoj žlijezdi parasimpatička živčana vlakna sadrže neurotransmitere acetilkolin (Ach) i vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), dok su simpatički neurotransmiteri noradrenalin (NA) i neuropeptid Y (NPY). Neurotransmiteri osjetnih vlakana su tvar P i CGRP (engl. *calcitonin gene-related peptide*). Ach i VIP su moćni stimulansi za sekreciju proteinskog i elektrolitsko - vodenastog dijela suznog filma. NA snažno stimulira sekreciju proteina, a nešto slabije vodenasti dio. NPY i CGRP su također slabi stimulatori vodenastog dijela. Tvar P je za sada nepoznate funkcije.

Stimulacija sekrecije suzne žlijezde se događa putem neuralnog luka koji počinje na očnoj površini. Refleks započinje stimulacijom aferentnih osjetnih živaca rožnice i konjunktive ili aktivacijom optičkog živca jakim svjetlošću. Zatim se iz centralnog živčanog sustava aktiviraju eferentni živci autonomnog živčanog sustava. Oni otpuštaju već spomenute neurotransmitere koji ulaze u interakciju sa specifičnim receptorima na bazolateralnim područjima stanica acinusa i odvodnih kanala. Unutar stanice se pokreće transdukcija signala te dovodi do fuzije već stvorenih sekretornih granula s apikalnom membranom i ispuštanja proteina u lumen (159). Da bi se pokrenula sekrecija elektrolita i vode, aktiviraju se ionski kanali i pumpe na bazolateralnim i apikalnim dijelovima stanica (160,161).

1.2.3. Funkcija suzne žlijezde

Glavna uloga suznog aparata je uspostavljanje i održavanje kontinuiranog suznog filma na očnoj površini (162,163). Fisher je prvi dokazao prisutnost suznog filma još 1928. godine koristeći reflektografiju, dok je Wolff 1946. detaljno opisao njegovu strukturu i nazvao ga prekornealnim suznim filmom (164).



Slika 15. Struktura suznog filma. Na slici desno su označeni slojevi suznog filma i njihova debljina, a na slici lijevo od donjeg dijela slike prema gore neke od komponenti suznog filma: epitel, glikokaliks, transmembranski mucini, zatim mucini koji se odvojili od glikokaliksa u vodenasti sloj, mucini koji čine gel u vodenastoj komponenti, te na koncu lipidi u lipidnom sloju.

Preuzeto i prilagođeno iz [Tear film \(slideshare.net\)](https://www.slideshare.net/Tear-film)

Suzni film se od vanjske površine prema očnoj površini sastoji od tri sloja: vanjski lipidni, srednji vodenasti i unutarnji mukozni sloj (sl. 15). Oni su specifični prema biokemijskom sastavu i fizičkim svojstvima, te vrsti stanica koja ih proizvodi.

Lipidni sloj je najtanji, debljine oko 0,1 mikrometar, proizvode ga Meibomove, Zeisove i Mollove žlijezde u vjeđama. Sastoji se od estera kolesterola, triglicerida, slobodnih masnih kiselina i fosfolipida. Funkcija mu je prevencija prelijevanja suza i isparavanja vodenastog dijela suznog filma te

predstavlja granicu oka prema okolišu.

Vodenasti sloj je najdeblji sloj (7-8 mikrometara) i predstavlja većinu volumena suznog filma. Proizvod je suznih žlijezda. Sastava je sličnog krvnoj plazmi, dakle, građen je od vode, anorganskih soli, sadrži glukozu, ureu, razne proteine (lizozim, lipokalin, laktoferin) i glikoproteine, uz nešto veću koncentraciju Na^+ i Cl^- , te manji postotak solidnih tvari. Zbog bikarbonatnih iona i proteina posjeduje puferska svojstva. Vodenasti sloj hidrira površinu oka i sprečava isušivanje, opskrbljuje avaskularni epitel rožnice kisikom i hranjivim tvarima, ispire strana tijela i iritanse. Tvari u vodenastom sloju kao što su lizozim, betalizin, laktoferin, sekretorni IgA i IgG posjeduju snažna antimikrobna svojstva. Suzni film je jedina zaštita nekeratiniziranom epitelu koji je izložen svakodnevnim onečišćenjima (dim, čestice prašine, bakterije, virusi i sl.).

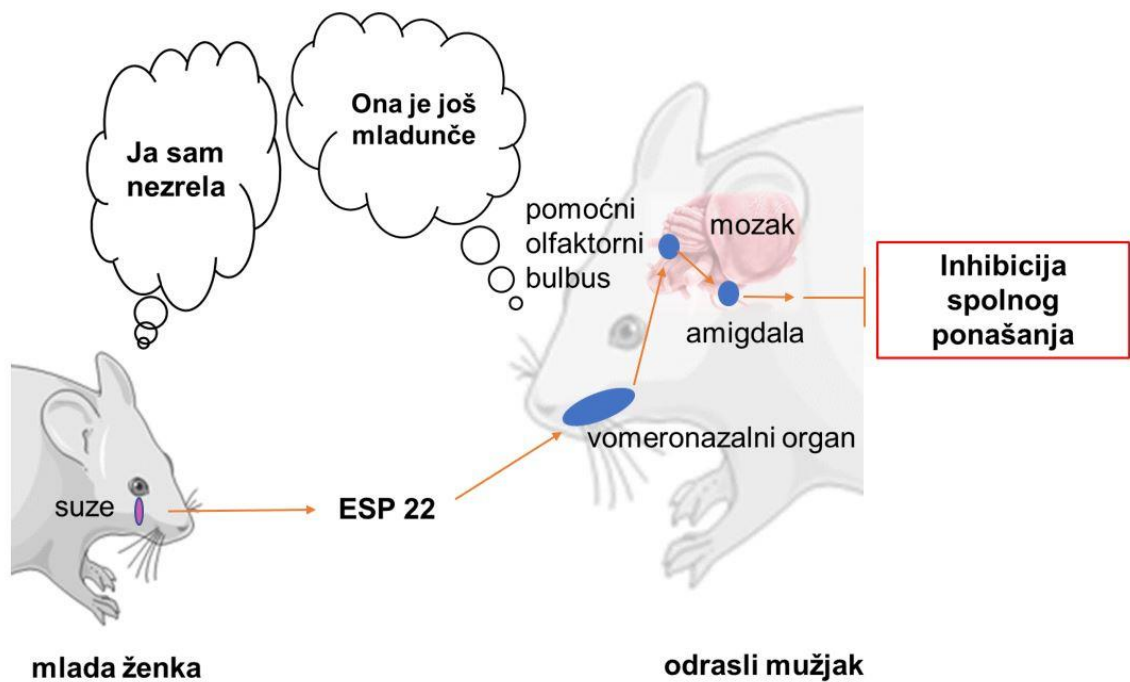
Mukozni sloj je debljine oko 0,5 mikrometara, priliježe na vanjsku površinu oka, a stvaraju ga mnogoslojne pločaste stanice epitela rožnice i konjunktive, te vrčaste stanice konjunktive. Sastoji se od mucina, od kojih su neki povezani s membranama epitela oka (MUC 1,4 i 16), a drugi su sekretorni (MUC 5AC i MUC 7). Mucini usidreni u staničnu membranu čine glikokaliks i prostiru se duboko u vodenasti sloj. Mukozni sloj ima bitnu ulogu u stabilnosti suznog filma, jer čini hidrofilni sloj preko površine oka i tako osigurava prilijezanje vodenastog sloja i vlaženje oka. Također čini klizavu površinu spram stranih tijela i štiti od abrazivnog djelovanja čestica pri treptanju.

Treptanjem se suzni film raspoređuje po oku u određenoj debljini, te ostaje raspoređen na očnoj površini određeno vrijeme, prosječna vrijednost je oko 27 sekundi ("*tear film stability*"). TBUT je kratica za "*tear break up time*", a bitna je za kliničku procjenu stabilnosti suznog filma (165). Uz sve već nabrojane funkcije, suzni film stvara glatku optičku površinu na rožnici i savršen refraktivni medij za svjetlost, omogućujući pravilan lom svjetlosti i jasan vid.

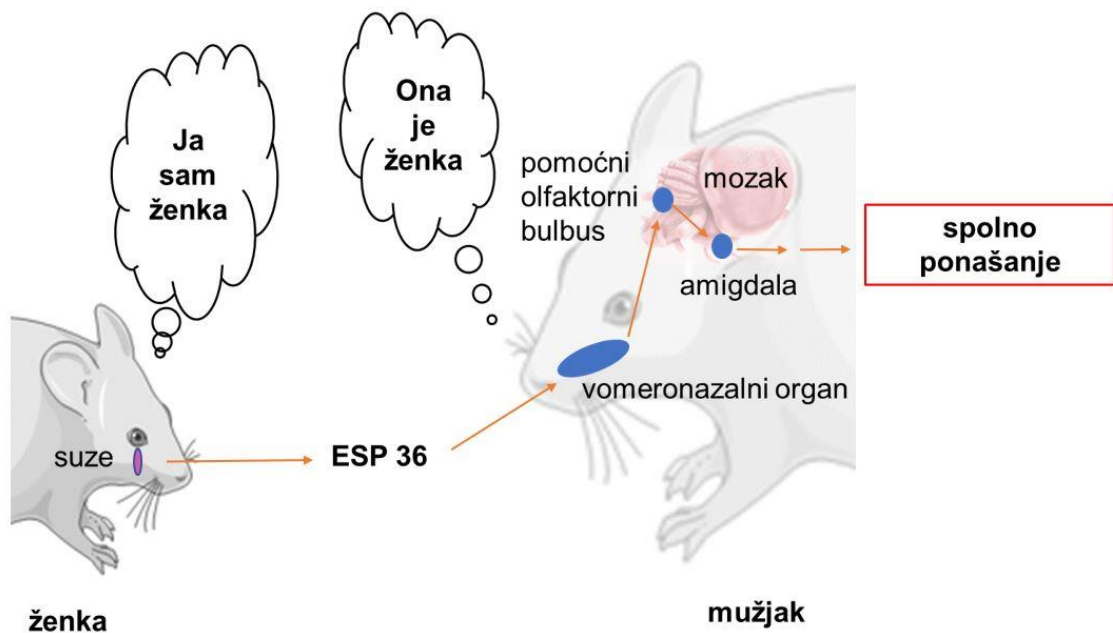
U životinjskom svijetu, u sisavaca, postoji još jedna vrlo važna funkcija suza. Naime, suzne žlijezde izlučuju u suzni film i nosnu sluz kemotaktilne molekule, feromone, koji putem vomeronazalnog organa sudjeluju u regulaciji socijalnog i seksualnog ponašanja životinja. Feromoni se također nalaze u urinu i slini. U miševa se obitelj peptida koja se izlučuje u suzni film naziva ESPs (engl. *exocrine*

gland-secreting peptides),.U miševa ih ima 38 vrsta, u štakora 10, dok u ljudskoj vrsti ne postoje (166). Te signalne molekule mogu biti specifične za vrstu, spol i dob životinje, pa se tako npr. ESP22 izlučuje u suzni film ženki miševa starih 2 do 3 tjedna, te ima snažan inhibitorni učinak na spolno zrele mužjake (167) (sl. 16), dok ESP1 koji izlučuju i intraorbitalna i ekstraorbitalna suzna žlijezda mužjaka miša inducira kod ženke položaj lumbalne lordoze i tako ju čini spremnijom za kopulaciju (168–170). ESP36 se eksprimira u ženki i spolno nezrelih mužjaka, no pojavom puberteta i porastom razine cirkulirajućeg testosterona ekspresija ESP36 se gubi u mužjaka i perzistira samo u ženki (171) (sl. 17). Istraživanja su pokazala da je ponašanje specifično za mužjake prilikom parenja u ženki suprimirano feromonima preko VNO (172).

Čovjek, za razliku od drugih sisavaca, nema razvijen vomeronazalni organ niti postoji ekspresija *Esp* gena. Smatra se da uloga feromona kod ljudske vrste nije toliko značajna zbog razvijene vizualne i glasovne komunikacije. No, pod utjecajem snažnih emocija kao što su sreća ili tuga, prefrontalni korteks čovjeka aktivira autonomni živčani sustav koji potakne hiperprodukciju suza u suznim žlijezdama. Posljedica je plakanje, tzv. emocionalne suze koje su jedinstvene za ljudsku vrstu (173). Gelstein je u svom istraživanju 2011. godine uočio da muškarci nakon njušenja tkanine natopljene suzama dobivenih od žena koje su plakale prilikom gledanja tužnih filmskih scena pokazuju smanjenje seksualne želje, sniženu razinu testosterona i smanjenu agresivnost (174).



Slika 16. ESP22 u sekretu suznih žlijezda nezrelih ženki ima inhibitoran učinak na spolno ponašanje zrelih mužjaka.



Slika 17. ESP36 u sekretu suznih žlijezda spolno zrelih ženki ima stimulativan učinak na spolno ponašanje zrelih mužjaka.

1.2.4. Spolni dimorfizam suzne žlijezde

Organi glodavaca na kojima je vidljiv spolni dimorfizam su žlijezde slinovnice, te suzne žlijezde koje su im histološki i fiziološki vrlo nalik (175). Prvo istraživanje kojim je uočen spolni dimorfizam podčeljusne žlijezde slinovnice u miša proveo je Lacassagne još 1940. godine (176). Uslijedila su brojna istraživanja na žlijezdama slinovnicama glodavaca kojima je spolni dimorfizam istražen i dokazan gotovo svim metodama – od anatomskih i morfometrijskih analiza, elektroforeze enzima sline do novijih metoda istraživanja genske ekspresije (177–180).

Sullivan i Cornell Bell u svom radu jasno i pregledno navode morfološke, biokemijske i imunološke razlike suzne žlijezde između mužjaka i ženki. Iako je apsolutna težina suzne žlijezde veća kod mužjaka, omjer težine suzne žlijezde i tjelesne mase ženke može biti manji, jednaki ili čak veći nego u mužjaka. Međutim, analiza suznih žlijezda različitih vrsta je pokazala da je u svih vrsta područje acinusa uvijek puno veće u mužjaka. Također, u mužjaka nalazimo velike, nepravilne acinuse šireg lumena, dok su u ženki manji, pravilniji i užeg lumena. Citoplazma acinusnih stanica mužjaka je "mrljasta", zrnata i bazofilnija. U ženki je citoplazma svjetlija i manje strukturirana, uz jaču bazofiliju oko jezgre koja blijedi prema periferiji. Jezgre acinusnih stanica su u mužjaka centralnije smještene, uz izražen polimorfizam, poliploidiju i obično jasno vidljivu jezgricu. Kod ženki nalazimo bazalno smještenu jezgru, koja je obično pravilnija po veličini i obliku. Granice među stanicama acinusa u mužjaka su slabije vidljive, dok su u ženki obrisi acinusnih stanica jasno izraženi.

Elektronskim mikroskopom u acinusnim stanicama mužjaka možemo uočiti bazalno smještene vakuole i veći broj intranuklearnih inkluzija, bolje razvijen Golgijev aparat, te manji broj međustaničnih kanala i pora na endotelnim stanicama kapilara. U ženki, nasuprot tome, nalazimo brojne, velike citoplazmatske vezikule, veći broj međustaničnih kanala i pora na endotelnim stanicama kapilara u vezivnom tkivu (181).

Kod štakora se starenjem u žljezdanim acinusima GL pojavljuju stanice s lipidnim kapljicama i obilnom glatkom endoplazmatskom mrežicom, te gušćim

izgledom kromatina. Stanice se nazivaju Harderovim stanicama, jer slične stanicama Harderove žlijezde koja se nalazi u orbiti glodavaca oko optičkog živca, a sama pojava naziva se "harderizacijom". U ženki starenjem ne dolazi do navedenih promjena acinusnih stanica (182).

Novija istraživanja na GL su pokazala da su androgeni receptori prisutni u oba spola, dok se ekspresija estrogenih receptora gubi u mužjaka starijih od 6 mjeseci. Estrogen sprječava pojavu „harderizacije“ (183). Tri tjedna nakon kastracije mužjaka štakora može se zamijetiti smanjenje volumena Harderovih stanica po mm³ tkiva suzne žlijezde (184,185). U ženki ovariektomija ne dovodi do promjena u građi žlijezde. U mužjaka miša kastracija dovodi do suprotnog učinka: smanjuje se aktivnost žlijezde i veličine acinusa, dolazi do proliferacije vezivnog tkiva, no povećava se broj Harderovih stanica (186,187).

Daljnijim istraživanjima je utvrđena povezanost androgena i žljezdanog tkiva slinovnica i suznih žlijezda, te se danas zna da su ta tkiva jedna od ciljnih za testosteron (188). Studije dokazuju da je testosteron odgovoran za razvoj odvodnih kanala submandibularne žlijezde miša te da je odgovor žlijezda na testosteron bolji u mužjaka (189). Autoradiografski je također dokazano nakupljanje označenog dihidrotestosterona u izvodnim kanalima i stanicama acinusa submandibularne žlijezde (190). U suznoj žlijezdi miša testosteron regulira ekspresiju više od 2000 gena. Djelovanje androgena je dijelom posredovano preko klasičnih androgenih receptora i pridonosi nastanku spolnog dimorfizma (191,192). Istraživanja su također pokazala da spol i endokrini sustav mogu značajno utjecati na raspodjelu veznih mjesta za androgene u tkivu suzne žlijezde. Štoviše, androgeni mogu povećati broj vlastitih receptora (engl. *up-regulation*) (193–195).

Od ostalih endokrinih čimbenika manju ulogu ima i prolaktin kod ženki gdje hiperprolaktinemija dovodi do "hiperženske" morfologije (196). Istraživanja su pokazala da estrogeni i progesteron, iako reguliraju brojne gene, ne predstavljaju značajniji uzročni čimbenik u razvoju spolnog dimorfizma suzne žlijezde miša (197). Istraživanja su također pokazala da manjak estrogena nije rizični faktor za disfunkciju suzne žlijezde i razvoj sindroma suhog oka (198).

Peroksidaza je marker sekrecijske aktivnosti GL, izlučuje se u suze i vjeruje

se da ima antimikrobna svojstva. Aktivnost peroksidaze je niža u mužjaka hrčaka i uvjetovana je represivnim djelovanjem androgenih hormona, u ženki hrčaka je oko 3.4 puta izraženija (199).

Lakrimalni ABP (engl. *androgen-binding protein*) spada u superobitelj sekretoglobina, izlučuje se u suze i veže androgene. Istraživanja su pokazala da se mRNA za podjedinice ABP također razlikuje u mužjaka i ženki miša tako vjerojatno proizvodeći različitu molekularnu građu tih sekretoglobina (200).

1.3. TRANSGENIČNE ŽIVOTINJE

1.3.1. Sintetska biologija

Stanica je osnovna jedinica života koja posjeduje jedinstvena svojstva prenošenja genetskog materijala i mogućnost evolucije. Kroz stoljeća biologija je bila znanost koja se temeljila na analizi (rašćlanjivanju) makroskopskog, a zatim i mikroskopskog svijeta. No krajem 19. stoljeća biologija postupno usvaja sintezu kao sredstvo razumijevanja živih organizama. Zahvaljujući epohalnim otkrićima u drugoj polovici 20. st. (od otkrića strukture DNA molekule kao dvostruke uzvojnice od strane Watsona i Cricka 1953. pa do otkrića metode lančane reakcije polimeraze 1983.) sinteza u biologiji doživljava veliki uspon (201).

Izraz „sintetska biologija“ te njenu definiciju kao „stvaranje umjetnih oblika života“ je prvi put je upotrijebila Barbara Hobom 1980. godine da bi opisala bakteriju kojoj je promijenjen genom pomoću tehnologije rekombinantne DNA (202). Često korišten sinonim za sintetsku biologiju je biološki inženjering ili bioinženjering (203).

90.-tih godina 20.stoljeća uspješnim sekvencioniranjem genoma mnogih vrsta, sustav postaje toliko složen da biologija u analiziranju ogromne količine podataka sve više ovisi o kompjuterima, matematičkim procesima te suradnji s IT sektorom. U biologiju sve više ulaze principi inženjeringa (dizajn, modeli, modularnost krugova i sl.) (204). Kako se bioinženjering sve više profilira kao interdisciplinarna znanost, s biolozima i inženjerima često surađuju kemičari,

fizičari, matematičari, znanstvenici iz društvenih i humanističkih područja, pa čak i umjetnici (201). Znanstveni savjet EU je 2014. predložio definiciju za suvremenu sintetičku biologiju kao „primjenu znanosti, tehnologije i inženjeringa u olakšavanju i ubrzavanju dizajna, proizvodnje i/ili modifikacije genetskog materijala živih bića“ (205).

1.3.2. Umjetni oblici života

Carlos Acevedo-Rocha u poglavlju „The synthetic nature of biology“ knjige „*Ambivalences of Creating Life: Societal and Philosophical Dimensions of Synthetic Biology*“ ističe nekoliko sintetičkih oblika života koje ćemo u ovom poglavlju detaljnije opisati.

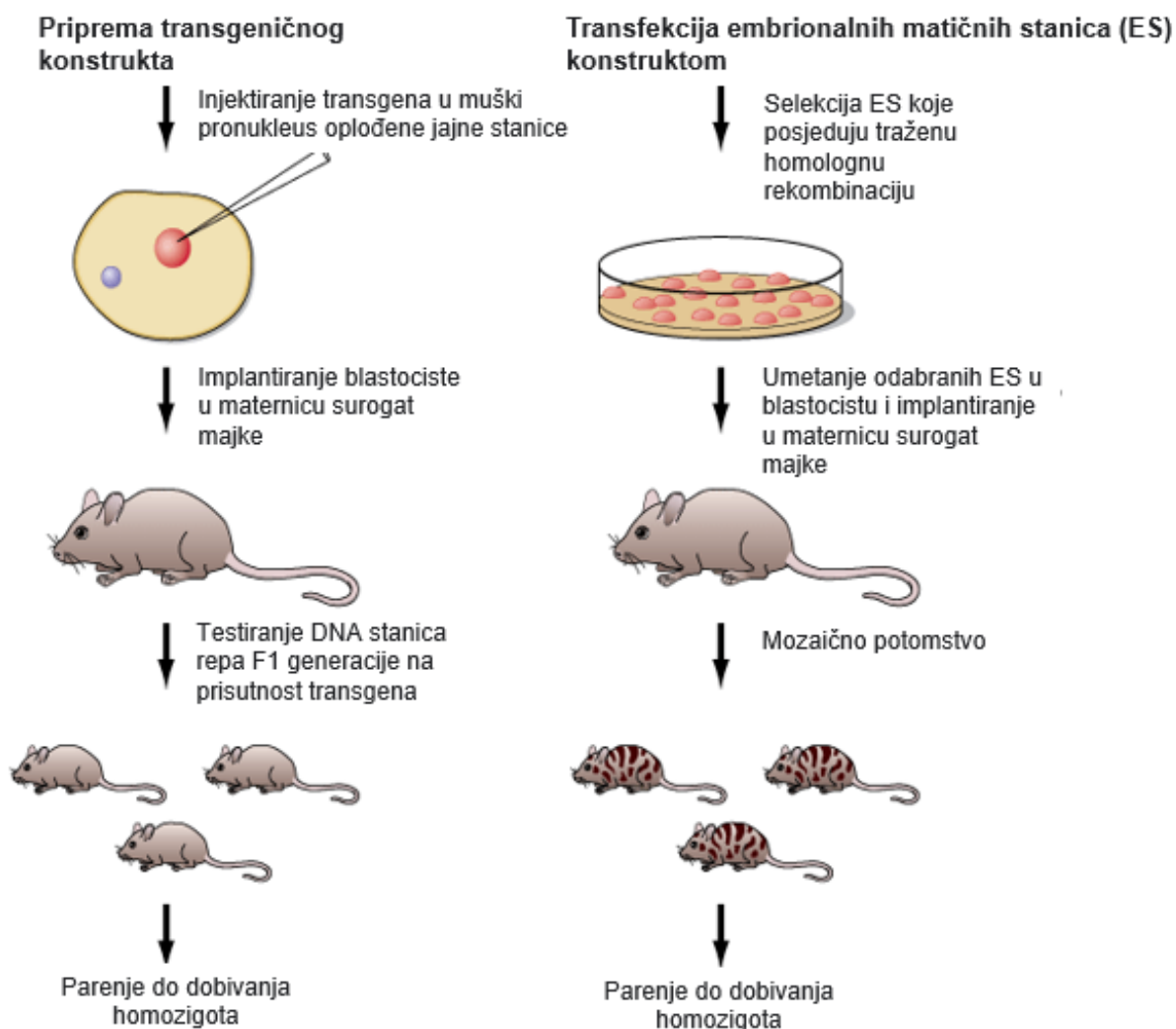
- **Genetski Modificirani Organizmi (GMOs)**

Zakoni Europske unije definiraju GMOs kao žive entitete čiji je „genetski materijal promijenjen na način koji se ne događa u prirodnim uvjetima kroz križanje, uzgoj ili prirodnu rekombinaciju.“ Na međunarodnom nivou, definicija se proširuje te se navodi da su to „svi živi organizmi koji posjeduju novu kombinaciju genetskog materijala dobivenu kroz upotrebu moderne biotehnologije (*“Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity”*). Tehnikama genetskog inženjeringa geni mogu transferirati unutar iste vrste, između vrsta ili čak između carstva na način da se u organizam uvedu novi geni. Također, ekspresija endogenih gena može biti pojačana, promijenjena ili izbačena.

Različiti organizmi mogu biti genetski modificirani – mikroorganizmi, biljke i životinje, tako da postaju **TRANSGENIČNI ORGANIZMI**. Oni mogu nastati unošenjem nekog stranog transgena u genotip, a s druge strane, nokaut (engl. *knock-out*) miševi su transgenične životinje kojima je specifičan gen „izbačen“ iz genotipa, pa mu je onemogućena transkripcija i translacija. Istražujući efekte tog „nedostajućeg“ gena, znanstvenici mogu bolje razumjeti njegovu normalnu funkciju.

Transgenični organizmi se također proizvode u komercijalne svrhe. Bakterije i gljivice su organizmi na kojima je najlakše raditi genetski inženjering i koriste se za znanstvena istraživanja, proizvodnju hrane, industrijsko pročišćavanje proteina i lijekova, poljoprivredne svrhe pa čak i umjetnost. Virusi imaju značajnu ulogu kao vektori za umetanje gena u stanice drugih organizama, te u genskoj terapiji (206). Biljke se modificiraju u znanstvene svrhe, zatim za stvaranje novih boja, kemikalija i lijekova te proizvodnju hrane (207,208). Najpoznatiji i najkontraverzniji primjeri su genetski modificirani usjevi kukuruza i soje s genetski ugrađenom otpornošću na korov, insekte i herbicide. Transgenične životinje se koriste u medicini i farmakologiji kao modeli za proučavanje i liječenje bolesti u ljudi, te kao bioreaktori za proizvodnju proteina te za ksenotransplantaciju (209–211).

Transgenična životinja se može dobiti na više načina (212,213). Može se modificirati zigota (oplođena jajna stanica) gdje se obično u muški pronukleus unosi konstrukt transgena, ili se mogu u blastocistu unijeti genetički modificirane embrionalne matične stanice, ES (engl. *Embryonal stem cells*) porijeklom iz embrioblasta (engl. *Inner cell mass*- ICM). ES stanice se transficiraju određenim konstruktom koji će ciljano uništiti određeni gen. Zatim se traži klon ES stanica u kojem je gen izbačen. Poslije željene modifikacije ES stanica, takve stanice se unose u blastocistu koja postaje mozaična. Unosom blastociste u uterus surogat majke (pomajka) razvija se mozaično potomstvo. Parenjem mozaika koji su iz modificiranih ES stanica razvili spolne stanice sa normalnim jedinkama dobiju se heterozigotni nokauti. Obje vrste transgeničnih životinja pare se do dobivanja homozigota (*breed to homozygosity*) (sl. 18). Homozigotni nokauti zovu se i nul-mutante (engl. *0-mutants*) jer nemaju više niti jedan alel divljeg tipa. Danas se novom CRISPR-Cas9 tehnologijom, koja je objašnjena dalje u tekstu, može ciljano nokautirati jedan ili više gena i u samoj zigoti što znatno skraćuje vrijeme proizvodnje nokauta.



Slika 18. Načini dobivanja transgeničnih životinja

(Preuzeto i prilagođeno iz Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of internal Medicine*, 17th izdanje, The McGraw-Hill Companies, Inc.)

Prvi pokušaji bioinženjeringa sežu još u 1891. kad je Heape prenio embrije angora zeca u trudnu ženku belgijskog zeca, te dobio potomke obaju pasmina. 1945. je prvi puta izvršen transfer mišjeg embrija, dok prava revolucija u sintetskoj biologiji započinje 1973. tehnologijom rekombinantne DNA. Začetnicima bioinženjeringa se smatraju Paul Berg, Stanley Norman Cohen i Herbert Boyer. Berg je 1972. spojio DNA bakterije *Escherichiae coli* i *Simian Virusa 40* u

egzogenom plazmidnom vektoru. 1973. Cohen je pokazao da se DNA iz stafilokokne bakterije može unijeti i uspješno replicirati u E.coli. Iste godine su Cohen i Boyer, koristeći plazmide kao vektore, u E.coli unijeli gene južnoafričke žabe *Xenopus* i pokazali da se transgenični organizam može stvoriti kombiniranjem genetskog materijala dviju vrlo udaljenih vrsta. Godinu dana poslije stvorena je prva transgenična životinja, miš (214).

Primjena rekombinantne DNA tehnologije i njena translacija u industriju je donijela veliki napredak u medicini. Jedna od prvih biotehnoloških tvrtki - Genentech- je osnovana 1976. s Boyerom kao jednim od suosnivača. Ta tvrtka je bila prva koja je uspjela proizvesti humani inzulin pomoću metode rekombinantne DNA tehnologije (215), te potom i druge ljudske proteine: hormon rasta, alfa interferon, eritropoetin i tkivni aktivator plazminogena.

1990.-tih godina kemijski inženjer James Bailey je shvatio da proizvodnja kemikalija i antibiotika od strane mikroorganizama može biti uvelike poboljšana ukoliko se reguliraju metabolički resursi stanice te se time genetički inženjering proširuje na područje metaboličkog koji obuhvaća dva i više gena (216). Najbolji primjer je proizvodnja prekursora artemisininina, lijeka izbora za malariju od koje godišnje u nerazvijenim i siromašnim dijelovima svijeta oboli 500 milijuna, a umre 1 milijun ljudi. Artemisinin se može dobiti iz listova biljke *Artemisia annua*, no zbog klimatskih promjena i povećane potražnje, njene zalihe su nedostatne. Može biti i umjetno sintetiziran, no proizvodnja je vrlo skupa i lijek nedostupan za mnoge. Keasling je sa suradnicima, nakon dugogodišnjeg istraživanja, uspio proizvesti značajne količine artemisične kiseline u E.coli regulirajući metabolički put mevalonata pomoću 11 enzima E.coli, plijesni *Saharomyces cerevisiae* i biljke *Artemisia Annua* (217). Do sada, više od 1,7 milijuna doza ovog semisintetskog artemisininina (cijene oko 0,25 dolara) je poslano u malarijom zahvaćene države u Africi.

- **Genetski Dizajnirani Virusi (GDVs) i Genetski Dizajnirani Organizmi (GDOs)**

Razlika je u tome što su ovi GMO-i promijenjeni pomoću genoma koji je kopiran iz prirode u kompjuter te potom sintetiziran kemijskim putem za razliku

od „uobičajenih“ GMO gdje je genom „posuđen“ od postojećih organizama ili virusa i nije sintetiziran.

Prvi kemijski sintetiziran genom je bio genom humanog poliovirusa 2002. (218), a 2005. je Tumpey sa suradnicima sintetizirao genom virusa Španjolske gripe (219). Svi ovi GDV su imali sposobnost inficiranja stanice, što sugerira mogućnost da kemijski sintetizirani genomi viših organizama također mogu biti funkcionalni ako se ubace u živu stanicu.

Prvi Genetski Dizajnirani Organizam (GDO) je nastao 2010. u Venter laboratoriju. Gibson i suradnici su sintetizirali genom bakterije *Mycoplasma mycoides* (108000 pb) i transplantirali ga u *Mycoplasma capricolum*, reprogramirajući stanicu koja se transformirala u stanicu *M. Mycoides* (220). Zanimljiv je podatak da je genom reprogramirane stanice sadržavao 4 šifrirana vodena biljega s imenima i mailovima 46 osoba koje su sudjelovale u projektu i 3 poznata citata:

1. *“To live, to err, to fall, to triumph, to recreate life out of life”* (James Joyce)
2. *“See things not as they are, but as they might be”* (Robert Oppenheimer)
3. *“What I can not build, I can not understand”* (Richard Feynman)

Sinteza genoma je postala moguća ujedinjenjem sintetske biokemije i inženjeringa u „sintetsku genomiku“. To je tehnologija koja ima mogućnost sintetizirati i složiti odsječke DNA veličine kromosoma kao i simultano mijenjati postojeći genom na tisuću mjesta (221). Osim što omogućuje sintezu raznih genetski dizajniranih organizama, npr. pekarskog kvasca (222), mogla bi donijeti revoluciju u medicini smanjujući vrijeme potrebno za stvaranje cjepiva u slučaju moguće pandemije (223) ili u sintezi bakteriofaga koji bi mogli inficirati i uništavati multirezistentne sojeva bakterija (224).

- **Genetski Editirani Organizmi (GEOs)**

GEO su također genetski modificirani organizmi, no po Avecedu, razlog za svrstavanje u posebnu skupinu je u različitoj metodologiji. Naime, „klasični“ GMOs su modificirani korištenjem prirodnih ili sintetičkih sekvenci DNA ubačenih u plazmide, dok modificiranje kromosomske DNA u GEO obično uključuje korištenje sintetske DNA (koju proizvode i prodaju biotehnološke kompanije) i

najnaprednijih tehnologija molekularne biologije.

Editiranje genoma može uključivati male ili velike promjene, kao što su npr. mutiranje polimorfizma jednog nukleotida radi popravka nevaljanog genotipa koji dovodi do bolesti, mijenjanje više regija genoma radi optimizacije nekog metaboličkog puta u mikrobima pa sve do kromosomskih modifikacija koje tipično uključuju DNA delecije (knock-out), DNA adicije (knock-in) ili zamjene u svrhu proučavanja i razumijevanja funkcije gena i proteina.

Rani počeci editiranja genoma sežu do otkrića jednog od staničnih sustava u stanicama plijesni i sisavaca koje popravljaju lomove u dvostrukoj uzvojnici DNA (engl. *double-strand DNA breaks*, DSBs). Ti lomovi bi inače značili ili smrt stanice ili onkogenu mutaciju, stoga dolazi do aktivacije homologne rekombinacije (HR), što je zapravo „*copy and paste*“ mehanizam koji zahtijeva neoštećenu kopiju homolognog DNA odsječka kao osnovu za kopiranje DNA sekvence u području loma. U prošlosti su za indukciju DSBs korišteni UV zračenje, kemikalije i restrikcijski enzimi, no ti su događaji bili nasumični i nisu mogli biti usmjereni na željeno mjesto na DNA lancu.

Od 1990.-tih uvedena su nova oruđa za precizno editiranje genoma kao što su *rare-cutting homing endonucleases* (225), *Zinc-Finger Nucleases* (ZFNs) (226) i *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs) (227). Ova oruđa djeluju tako da specifično induciraju DSBs i omogućavaju aktivaciju HR koja se može koristiti za popravak raznih mutacija koje uzrokuju bolesti, npr hemofiliju, anemiju srpastih stanica i dr. (228). Negativna strana je što ovise o „po narudžbi“ rađenim proteinima za modifikiranje svakog ciljanog DNA odsječka, što uzrokuje visoke troškove kada se radi o simultanoj mutaciji više gena kod kompleksnijih bolesti (229).

Pojava novog oruđa za editiranje više gena, **CRISPR**, s rezultatima komparabilnim ZFNs i TALENs, ali sa značajno nižim troškovima zahvaljujući programabilnosti na RNA nivou je donijela revoluciju u područje bioinženjeringa (230). Sustav koji se sastoji kratkih izmjenjujućih ponavljajućih i neponavljajućih (engl. *spacers*) DNA segmenata, **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs)** i CRISPR-associated gena (**Cas**) u njihovoj blizini, CRISPR-Cas je obrambeni sustav koji se razvio u prabakterijama i

bakterijama u svrhu borbe protiv bakteriofaga i stranih plazmida. Spaceri su zapravo sekvence koje potiču od DNA virusa koji su prije napali bakteriju, dakle, služe kao „genetska memorija“ na prijašnju infekciju. Ako uslijedi napad istim virusom, aktivira se CRISPR-Cas obrambeni sustav. CRISPS sekvenca se prepisuje u kratke CRISPR RNA molekule. Te RNA molekule se udružuju s bakterijskom staničnom mašinerijom i usmjeravaju je na odgovarajuću ciljnu sekvencu u virusu koja odgovara sekvenci spacara, te ga ona reže i uništava. Bakterija izložena napadu „novog“ virusa može integrirati nove spacere iz genomske sekvence faga u već postojeće spacere i tako razviti fenotip rezistentan na bakteriofag.

Postoji nekoliko takvih sustava, a danas se za uklanjanje, dodavanje, aktiviranje i supresiju ciljanih gena koristi tip II CRISPR-Cas9 sustav (231,232) (sl. 19). Umjesto da se pouzdaju u bakteriju da sintetizira CRISPR RNA, znanstvenici dizajniraju i sintetiziraju kratke RNA molekule koje odgovaraju specifičnoj sekvenci DNA, u npr. ljudskoj stanici. Ova RNA upravlja molekularnu mašineriju na ciljanu DNA sekvencu koju zatim može ili izrezati (tj. utišati gen) ili ju čak promijeniti (popraviti) (sl. 20).

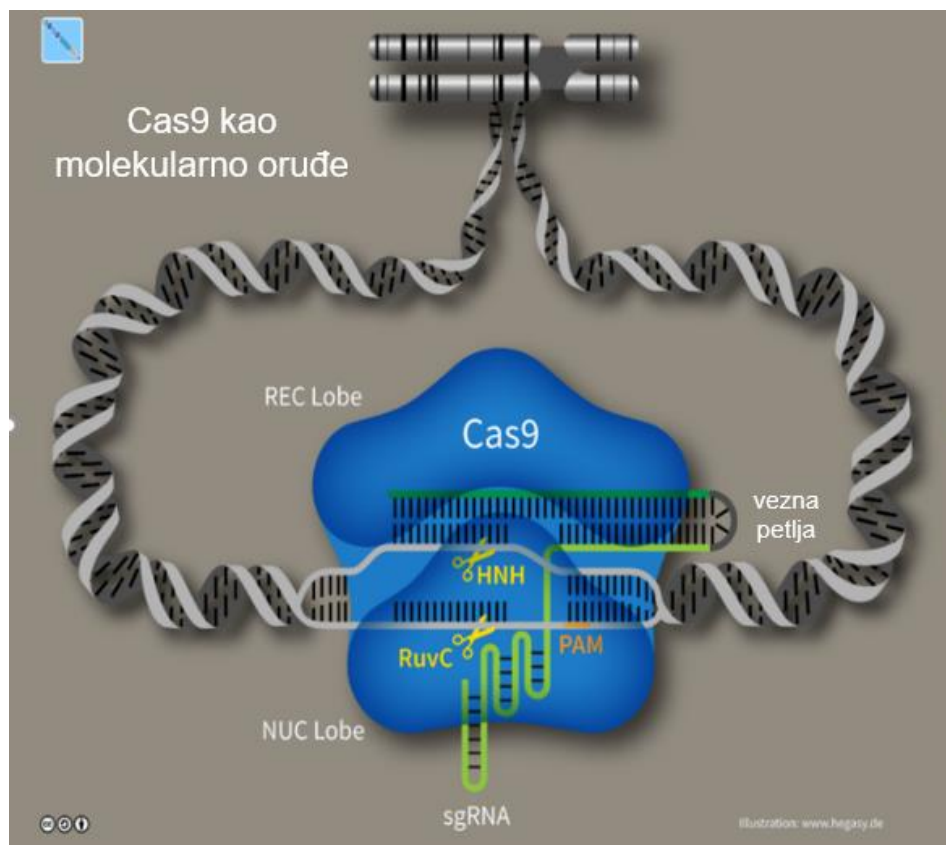
Najveći potencijal ove tehnologije je vidljiv u liječenju bolesti izazvanih genetskim mutacijama, naravno radi mogućnosti da specifično promijeni ciljani gen (229,233). Primjer su cistična fibroza i anemija srpastih stanica, gdje su klinička ispitivanja u tijeku, a rezultati su obećavajući (234,235).

Slijedeća primjena je istraživanje modela karcinogeneze utišavanjem ili pojačavanjem raznih onkogenih i tumor supresorskih gena te potencijalna terapijska primjena, npr. knock-out *Mdr1* gena u stanicama osteosarkoma dovodi do manje rezistencije na kemoterapeutike i boljeg preživljenja pacijenata (236).

CRISPR metoda se može također koristiti za borbu protiv virusa razaranjem virusnog replikacijskog sustava. Ciljajući dio genoma Hepatitis B virusa koji je odgovoran za replikaciju virusa, istraživači su uspjeli značajno i dugotrajno smanjiti virusno opterećenje i proizvodnju antigena te težinu bolesti (237,238).

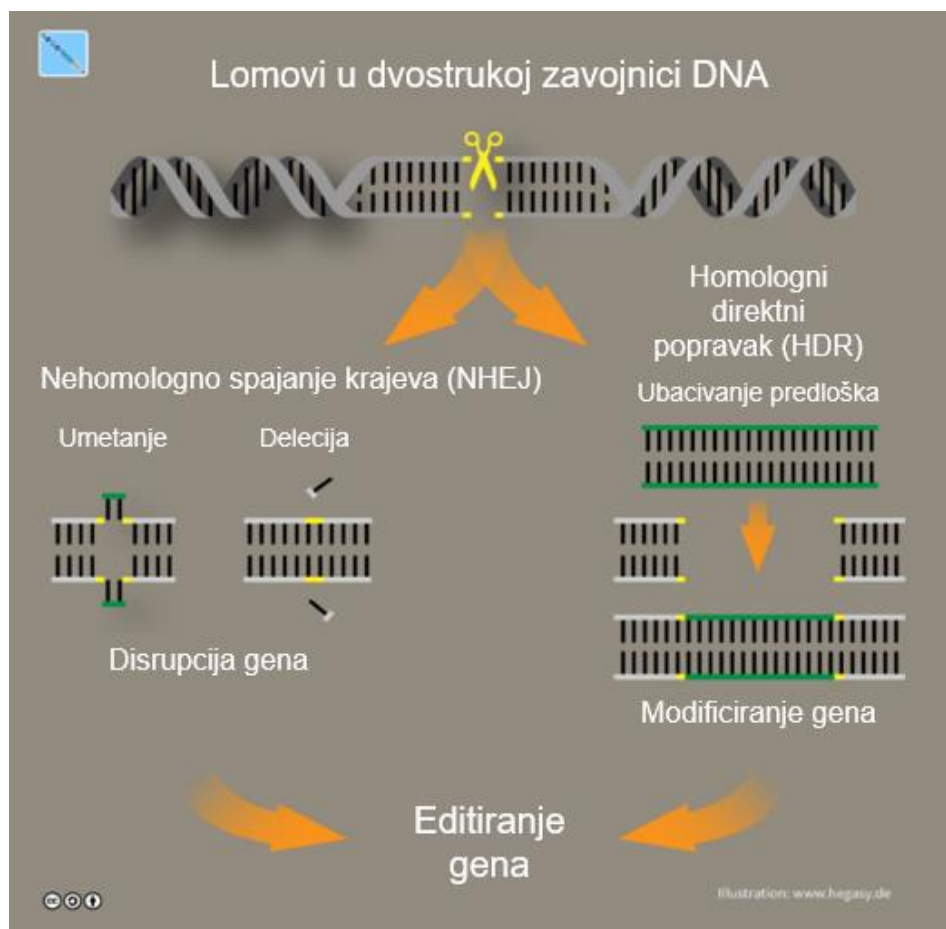
Danas, kada se, zbog pretjerane upotrebe, suočavamo sa sve većom otpornošću bakterija na antibiotike, CRISPR bi se mogao pokazati kao alternativa

ili dodatak standardnoj terapiji, bilo na način da onesposobljuje gene odgovorne za rezistenciju na antibiotike (239) ili direktnim baktericidnim učinkom tako što bi uništavao ključne gene patogenih bakterija odgovorne za njihovo preživljavanje (240).



Slika 19. CRISPR-Cas9 je molekularno oruđe koje može ciljano vršiti DSB DNA molekule. Spajajući tracrRNA (transaktivacijska crispr RNA) i crRNA (crispr RNA) veznom petljom, nastaje sgRNA (single guide RNA). Upravo iz razloga što sgRNA može biti kemijski sintetizirana, može se i usmjeriti na ciljno mjesto DNA gdje želimo DBS. Kompleks Cas9 i sgRNA skenira DNA molekulu u REC (recognition) Lobe i traži PAM (protospacer adjacent motif). Kad je ta sekvenca detektirana, komplementarna DNA nit biva uspoređena s crRNA. Ako se sekvenca podudara, DNA se reže 3 para baza dalje od PAM. U NUC (nuclease) Lobe Cas9, HNH domena reže nit koja je komplementarna vodećoj sekvenci, dok RuvC domena reže nasuprotnu nit.

(Preuzeto i prilagođeno iz Guido4 - Own work, CC BY-SA 4.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=63789047>)



Slika 20. Stanični mehanizma popravka DBS DNA se može koristiti za genetički inženjering. Nakon DBS DNA, popravak je moguć na dva načina. Lijevo je prikazan NHEJ (non-homologous end joining) u kojem se prekinuti krajevi DNA mogu popraviti umetanjem ili delecijom baza što obično dovodi do disrupcije gena. Desno je prikazan HDR (homology directed repair). On koristi DNA predložak (template) za popravak loma. Ako se taj predložak unese izvana, on može biti integriran u DNA kao novi gen u genom. Oba načina za rezultat imaju editiranje genetskog materijala. (Preuzeto i prilagođeno iz Guido4 - Own work, CC BY-SA4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=63789049>)

1.4. STEROIDOGENI FAKTOR 1

1.4.1. Steroidogeneza

Steroidni hormoni, u koje spadaju hormoni nadbubrežne žlijezde (glukokortikoidi kortikosteron i kortizol te mineralokortikoid aldosteron) i spolni hormoni (progesteron, estradiol i testosteron) se uglavnom stvaraju u kori NBŽ i gonadama. U novije vrijeme se pronašla ekspresija steroidnih enzima u živčanom sustavu (neurosteroidi), srčanom mišiću i crijevnom epitelu upućujući na to da bi i ova tkiva mogla sintetizirati steroidne hormone koji bi djelovali na autokrini ili parakrini način (241–244).

Glukokortikoidi, a kod sisavaca je najvažniji kortizol, se vežu za glukokortikoidne receptore u citoplazmi te se kompleks hormon-receptor translocira u jezgru gdje se veže na DNA „response“ elemente zvane „glucocorticoid response elements“ (GREs) i modulira transkripciju velikog broja gena. Koliko značajan utjecaj kortizol ima na fiziologiju svjedoči činjenica da 29% ljudskih gena posjeduje GREs (245). Osim regulacije metabolizma glukoze, glukokortikoidi imaju izrazito protuupalno i imunosupresivno djelovanje, bitni su prilikom reakcije na stres, djeluju na razvoj i sazrijevanje fetusa, zatim na kognitivne i mnoge druge funkcije.

Mineralokortikoidi, od kojih je najvažniji aldosteron, su esencijalni za održavanje života jer reguliraju ravnotežu soli i vode u organizmu dok su spolni hormoni neophodni za spolnu diferencijaciju, sekundarna spolna obilježja i reproduktivnu funkciju (246,247).

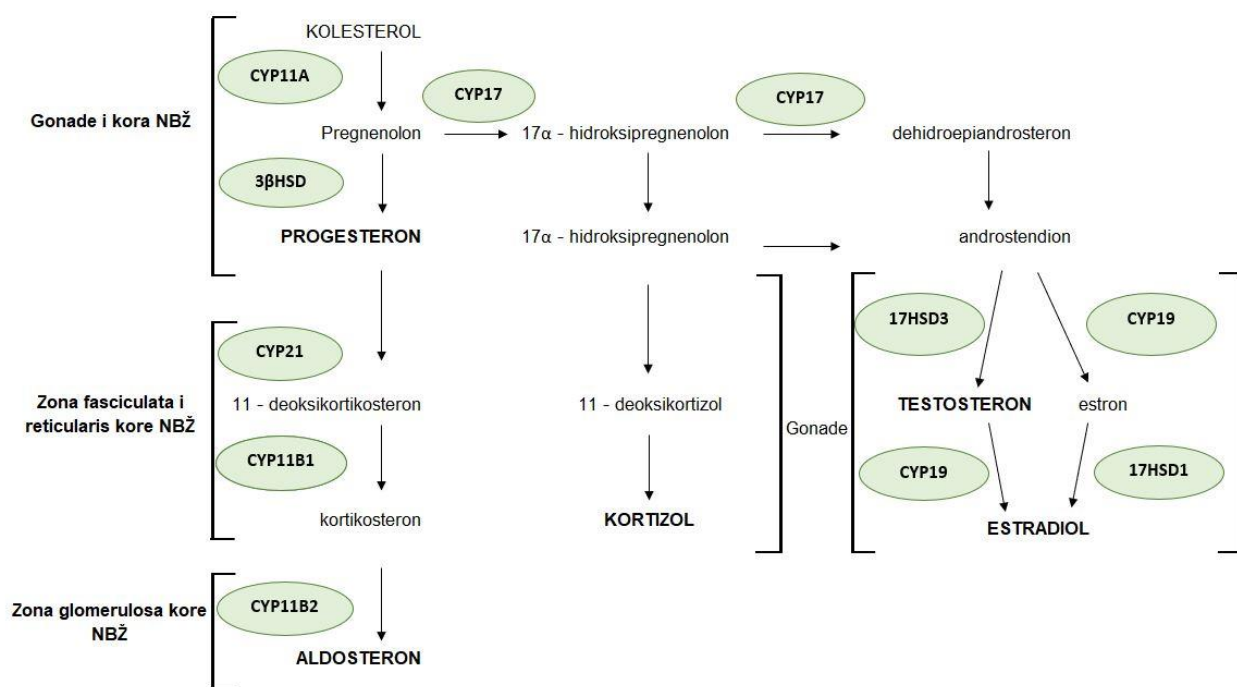
Svi ovi steroidi se sintetiziraju iz zajedničkog prekursora – kolesterola, u procesu koji se naziva **steroidogeneza**. Steroidogeneza se odvija pomoću enzima smještenih u mitohondrijima i glatkom endoplazmatskom retikulumu.

Ovaj proces je reguliran s više steroidogenih enzima koji se mogu podijeliti u dvije velike skupine proteina: citokrom P450 hem sadržavajući proteini (CYP) i hidroksisteroid dehidrogenaze (HSD). Sustav P450 citokroma katalizira velike alteracije u sterolima: rezanje postraničnog lanca, hidroksilaciju i aromatizaciju. dok HSD, sukladno nazivu, dehidrogeniraju hidroksisteroide (248). CYP, HSD i

drugi pomoćni proteini se selektivno izražavaju u različitim steroidogenim tkivima i sintetiziraju steroidne hormone na tkivno specifični način (sl. 20). Npr., proizvodnja glukokortikoida je omogućena specifičnom ekspresijom i aktivnošću CYP17 i citokroma b5 u zoni fasciculati, androgena u zoni reticularis, dok manjak CYP17 i posjedovanje specifičnog enzima CYP11B2 u zoni glomerulosi nadbubrežne žlijezde omogućuje sintezu mineralokortikoida (249,250).

Kao i mnogi drugi metabolički procesi, steroidogeneza također ima korak koji je ključan za brzinu odvijanja procesa, a to je transport kolesterola u mitohondrij. Kolesterol se transportira iz citoplazme na unutarnju membranu mitohondrija pomoću steroidogenog akutnog regulatornog proteina (StAR) (251–253). Čini se da je taj protein ključan za akutni odgovor na stimulaciju trofičkim hormonima i brzu produkciju potrebnog steroidnog hormona. Budući da su steroidni hormoni lipofilne prirode, ne mogu biti ranije sintetizirani i pohranjeni za slučaj potrebe, nego moraju biti promptno stvoreni i iskorišteni. Taj brzi odgovor nastupa u nekoliko minuta i jasno se razlikuje od sporog, kroničnog odgovora na stimulaciju koji traje nekoliko sati i uključuje mehanizme koji povećavaju transkripciju i translaciju enzima P450 citokroma i HDS.

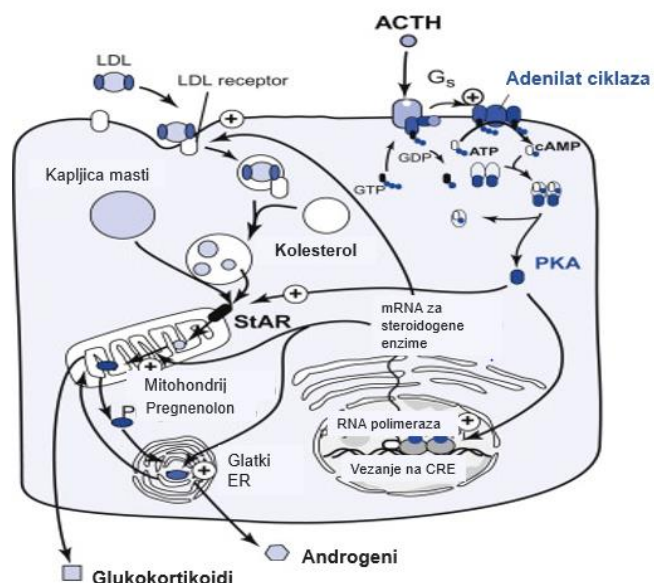
Na unutarnjoj membrani mitohondrija se kolesterol pomoću CYP11A1 (P450_{scc}) enzima pretvara u pregnenolon. Pregnenolon nije sam po sebi hormon, već neposredni prekursor za sintezu svih ostalih steroidnih hormona, kako je prikazano na slici 21. Pregnenolon izlazi iz mitohondrija i pretvara se u progesteron i druge steroidne hormone u glatkom endoplazmatskom retikulumu. Također, u nekim stanicama koje stvaraju steroidne hormone moguć je ponovni ulazak steroida i konverzija u steroidne hormone ovisno o skupu enzima koje posjeduju (254).



Slika 21. Biosinteza steroidnih hormona u nadbubrežnim žlijezdama i gonadama. Enzimi su zaokruženi, a završni steroidni hormon je napisan velikim slovima.

Ovi procesi i ekspresija gena koji kodiraju proteine uključene u steroidogenezu te njihovu aktivnost su regulirani trofičkim hormonima iz prednjeg režnja hipofize: adrenokortikotropin (ACTH), luteinizirajući hormon (LH) i folikul-stimulirajući hormon (FSH). U većini steroidogenih tkiva stimulacije sinteze hormona počinje vezanjem trofičkih hormona za receptore.

ACTH se veže za transmembranski G-protein melanokortin 2 receptor (MC2R). Taj kompleks stimulira adenilat ciklazu koja od ATP-a stvara cAMP. cAMP se veže na dvije R (regulatorne) podjedinice heterotetrameričkog enzima protein kinaze A (PKA), tako oslobađajući dvije C (katalitičke) podjedinice PKA. One fosforiliraju CREB (engl. *cAMP response element binding protein*) i druge ciljne proteine odgovorne za aktivaciju transkripcije gena (255). Povišena razina cAMP dovodi do brzog porasta u proizvodnji slobodnog kolesterola i njegovog transporta u mitohondrije, kao i koordinirane transkripcije svih gena uključenih u biosintezu steroida (sl. 22). ACTH također stimulira rast stanica nadbubrežne žlijezde, te potiče njihove mitoze.



Slika 22. Stimulacija steroidogeneze pomoću ACTH u stanici kore nadbubrežne žlijezde. ACTH povećava broj LDL receptora na staničnoj membrani, potiče aktivnost StAR-a koji prenosi kolesterol u mitohondrij i povećava količinu steroidogenih enzima. (Preuzeto i prilagođeno iz [Quantitative Human Physiology](#), 2012.)

U regulaciju transkripcije gena steroidogeneze je uključeno mnogo **transkripcijskih faktora** od kojih možemo istaknuti dva „*orphan*“ nuklearna receptora: steroidogeni faktor 1 (SF-1/NR5A1) i liver receptor homolog 1 (LRH-1/NR5A2), zatim članove GATA obitelji transkripcijskih faktora (GATA4 i GATA6), SREBPs (engl. *sterol response-element binding proteins*) (256,257) i C/EBPs (engl. *CCAAT/enhancer binding proteins*). Promotori velikog broja gena za steroidne enzime sadrže sekvence za koje se mogu vezati svi ovi TF, regulirajući njihovo prepisivanje.

U modulaciji raznih koraka steroidogeneze su također uključeni sfingolipidi (ceramid, sfingozin-1-fostat, sfingozin i sfingomijelin) koji reguliraju transkripciju gena, djeluju intracelularno kao drugi glasnici i/ili ekstracelularno kao parakrini ili autokrini regulatori te služe kao ligandi za jezgrine receptore (258).

Posttranskripcijska regulacija uključuje brojne alteracije u molekulama mRNA koje utječu na njihovu stabilnost. Funkcija TF također može biti modulirana posttranslacijskim modifikacijama koje uključuju fosforilaciju, ubikvitinaciju i SUMOilaciju (259) koji imaju neposredan učinak na razinu enzima i njihovu aktivnost.

1.4.2. Nuklearni ili jezgrini receptori (NR)

Nuklearni ili jezgrini receptori (NR) su obitelj transkripcijskih faktora koji su regulirani ligandima kao što su steroidni ili tiroidni hormoni i razne druge liposolubilne signalne molekule. Za razliku od drugih signalnih molekula, koje moraju djelovati preko receptora u membrani, ovi ligandi lako prelaze jezgrinu membranu te direktno djeluju na receptore smještene unutar jezgre (260).

Nakon aktivacije, transkripcijski faktori (TF) se sami ili u kompleksu s drugim proteinima vežu za specifičnu DNA sekvencu te aktiviraju ili blokiraju djelovanje RNA polimeraze, enzima koji vrši transkripciju genetske informacije iz DNA u RNA. Na taj način kontroliraju široku paletu bioloških procesa kao što su stanična proliferacija, diferencijacija, metabolizam i reprodukcija.

Jezgrini receptori dijele zajedničku strukturu. Visoko varijabilna amino-terminalna domena može uključivati aktivacijsku transkripcijsku regiju (A/B domena ili engl. *activation function 1*, AF1 domena). Centralno smještena DNA-vezujuća domena (engl. *DNA-binding domain*, DBD) uključuje dva cinkova prsta (engl. *zinc fingers*, ZNFs). Kratka zglobna (engl. *hinge*) regija povezuje DBD i LBD, te je odgovorna za nuklearnu lokalizaciju (D domena). Na karboksi kraju je velika dobro očuvana ligand-vezujuća domena (E domena ili engl. *ligand-binding domain*, LBD) koja sadrži aktivacijsku regiju 2 (engl. *activation function-2*, AF2) i bitna je za vezanje NR u heterodimere. Neki NR također posjeduju visoko varijabilan karboksi-terminalni rep (F domena) još nepoznate funkcije (259–261).

U ljudskom genomu je identificirano više od 2000 transkripcijskih faktora. Ključna značajka građe TF je postojanje bar jedne DNA vezujuće domene, DBD, i po njoj se klasificiraju u grupe. Drugi proteini kao što su kofaktori (koaktivatori i korepresori), remodelatori kromatina, histonske acetiltransferaze i deacetilaze, kinaze i metilaze također imaju bitnu ulogu u regulaciji gena, no budući da nemaju DBD, ne smatramo ih transkripcijskim faktorima (262).

Za razliku od klasičnih NR koji su prvi otkriveni i identificirani, te kojima je poznat ligand, u novije vrijeme je otkrivena superobitelj nuklearnih receptora kojima je ligand neidentificiran te ih zovemo „orphan“ ili siročad receptorima (263). Zadnjih desetljeća metodama molekularne biologije u genomu kralješnjaka

je identificirano 36 receptora siročadi koji su klasificirani u 6 grupa na osnovi filogenetske analize (264). Nakon što se endogeni ligand identificira, odgovarajući siročje receptor se tada smatra „usvojenim“.

Novije strukturalne studije vezujućih domena ovih receptora sugeriraju da neki od ovih receptora ne koriste ligande na klasični način ili da uopće nemaju sposobnost vezanja liganda što govori da su regulirani alternativnim mehanizmima, neovisnim o ligandu (265). Proučavanjem strukture NR, osobito LBD, došlo se do iznenađujućih rezultata. Neke LBD sadrže ogromne ligand-vezujuće džepove kojih kod drugih uopće nema, kod nekih AF2 domena varira od multifunkcionalne do potpuno inaktivne. Ovisno o tim rezultatima neki receptori siročad su „usvojeni“, neki pokazuju ligand- neovisno djelovanje, dok su neki visoko „promiskuitetno“ ligand-ovisni (266).

1.4.2.1. Androgeni i androgeni receptori (AR)

Četiri **androgena hormona** - dihidrotestosteron (DHT, testosteron (T), androstendion i dehidroepiandrosteron (DHEA) se sintetiziraju iz kolesterola u gonadama i kori nadbubrežne žlijezde (sl. 20).

DHT je biološki aktivniji oblik od testosterona, dok androstendion pokazuje tek 10% potentnosti testosterona, a DHEA oko 5% (267). No, testosteron od svih androgena ima najveću koncentraciju u serumu odraslog muškarca, a DHT čini tek jednu desetinu njegove koncentracije. Testosteron se djelovanjem 5 α reduktaze može konvertirati u aktivniji DHT. Testosteron se također može konvertirati u androstendion i obrnuto, dok se oba mogu pomoću enzima aromataze transformirati u estrogene. Od svih androgena jedino DHT ne može biti konvertiran u estrogene te je studije s ovim hormonom najlakše interpretirati (268).

Nasuprot tome, DHEA se, uz androgene receptore, veže i za α i β estrogene receptore, doduše s nešto nižim afinitetom. Štoviše, DHEA može biti reverzibilno modificiran u DHEA-sulfat, koji se periferno može metabolizirati u testosteron (osobito u žena u premenopauzi) i estrogene (u postmenopauzi), dodatno komplicirajući razumijevanje hormonskih učinaka androgena (269).

Androgen-receptor (AR) ili NR3C4 (nuklearni receptor, podobitelji 3, grupa C, član 4) je signalni transdukcijski protein i transkripcijski faktor koji je ključan za spolnu diferencijaciju te razvoj i ekspresiju muškog fenotipa. Kodira ga AR gen koji je smješten na X kromosomu (Xq11–12).

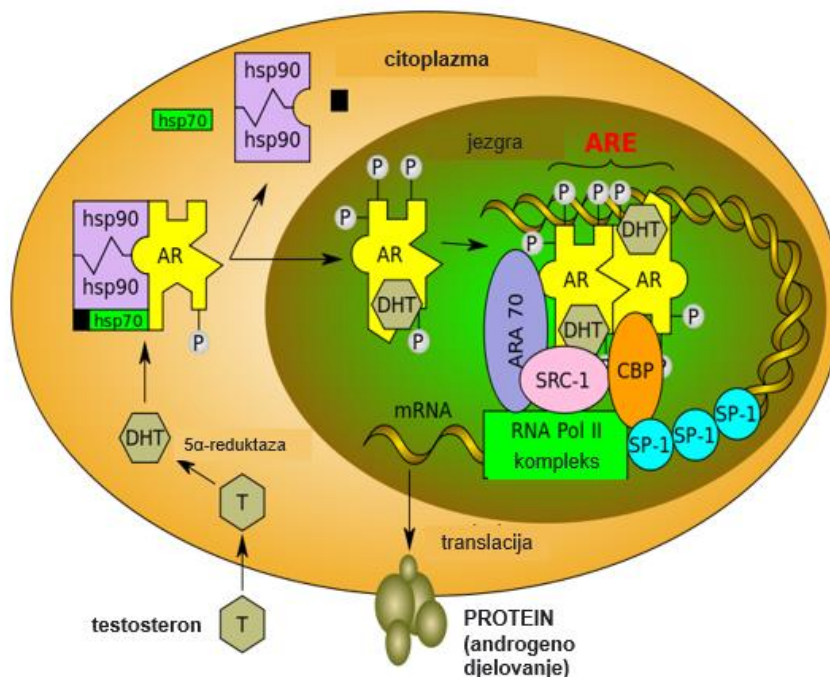
Kao i svi drugi jezgrini receptori, AR je modularan i sastoji se od više domena. A/B domena je N terminalna regulatorna domena koja sadrži AF-1, AF-5 i dimerizacijsku površinu. C domenu čini DNA vezujuća domena (DBD). D domena je hinge ili zglobna regija. E domena je ligand vezujuća domena (LBD) koja sadrži AF-2, NLS (engl. *nuclear localisation signal*) i NES (engl. *nuclear export signal*). F domenu čini karboksi terminalni kraj nuklearnog receptora.

AR su vezani za proteine toplinskog stresa (HSPs, engl. *heat shock proteins*) i šaperon (engl. *chaperone*) proteine u citoplazmi do trenutka vezanja liganda. Nakon vezanja liganda, zbog promjene konformacije receptora, događa se izmjena HSP i šaperona za kofaktore te se cijeli kompleks AR-ligand translocira u jezgru. U jezgri se kompleks, nakon dimerizacije, veže za specifične DNA regulatorne sekvence AREs (engl. *androgen response elements*), i regulira transkripciju. Zbog dva puta većeg afiniteta i 5 puta manje disocijacije, AR-DHT kompleks ostaje vezan za ARE dulje nego AR-T kompleks, što doprinosi većoj potentnosti DHT (sl. 23).

U zadnja dva desetljeća, istraživanja su pokazala da, uz klasični način djelovanja opisan u prethodnom ulomku, AR također mogu djelovati i kao dio signalnog puta bez vezanja na DNA i da čak mogu djelovati na ligand-neovisni način (267,270,271). Aktivacija ne-klasičnih AR (NC AR, engl. *non classical AR*) može uzrokovati aktivaciju drugih transkripcijskih faktora bez direktnog vezanja na DNA. AR mogu aktivirati unutarstanične signalne molekule, kao što su MAPK (engl. mitogen activated protein kinase) i ERK1/2 putem transkripcijski neovisnih mehanizama.

Možda najočuvaniji stanični odgovor na androgene, a i ostale steroidne hormone, koji isključuje djelovanje na DNA, je brzi porast intracelularne koncentracije kalcija. Taj efekt nastupa u roku od nekoliko sekundi do minuta i dovodi do aktivacije protein kinaze C (PKC), a preko kalmodulina (CAM) do

aktivacije protein kinaze A (PKA) i MAPK signalnih puteva. Tako konačno utječu na transkripciju gena putem fosforilacije. Zanimljivo je istaknuti da je mehanizam kojim androgeni utječu na povećanje koncentracije kalcija različit u različitim vrstama stanica.



Slika 23. Funkcija klasičnog androgenog receptora (AR). Testosteron (T) ulazi u stanicu te ga 5-alfa-reduktaza, ako je prisutna, pretvara u dihidrotestosteron (DHT). Nakon vezanja DHT na AR dolazi do konformacijske promjene, otpuštanja HSPs i fosforilacije. Kompleks AR-DHT se translocira u jezgru gdje se događa dimerizacija kompleksa, vezanje na DNA na ARE (engl. androgen-response element) i regrutiranje kofaktora. Dolazi do transkripcije ciljne DNA, te se nastala mRNA translatira u bjelančevine. (Preuzeto i prilagođeno iz Meehan KL, Sadar MD. *Front Biosci.* 2003;8:780-800).

Neklasični AR mogu biti smješteni u staničnoj membrani (mAR, engl. *membrane AR*), gdje se spajaju s receptorima spregnutim sa G-proteinom (GPCR, engl. *G protein-coupled receptor*) i internaliziraju se u citoplazmu. Također mogu vezati androgene direktno ili zajedno s njihovim proteinskim nosačima SHBG (engl. *steroid hormone binding globulin*). Također, što je bitno u procesu karcinogeneze, AR mogu biti aktivirani neovisno o androgenima, od strane raznih čimbenika rasta.

Zbog sličnosti s progesteronskim receptorom, progestini u visokim dozama mogu blokirati AR (272). Jedan od primjera je progestin ciproteron acetat (CPA) koji se koristi za liječenje androgen ovisnih poremećaja kao što su akne, pojačana dlakavost, preuranjeni pubertet i rak prostate ili u kombinaciji s estrogenima kao oralni kontraceptiv (273).

Androgeni i androgeni receptori imaju ključnu ulogu u regulaciji razvoja i normalnog funkcioniranja muškog spolnog i urinarnog sustava, te u razvoju sekundarnih spolnih obilježja. Iako većinu svojih učinaka ispoljavaju u tkivima koja su ovisna o spolnim hormonima, AR imaju široku ekspresiju u mnogim stanicama i tkivima, čak i onima se za koje se prije smatralo da nisu osjetljiva na androgene. Istraživanja na globalno i tkivno specifičnim KO miševima za AR su pokazala da AR ima važnu ulogu u razvoju i funkcioniranju mišićno-koštanog, kardiovaskularnog, imunološkog i hematopoetskog, te živčanog tkiva. Ima važnu ulogu u metabolizmu glukoze i masti. Također može biti uključen i u nastanak tumora prostate, mjehura, jetre, bubrega i pluća (274).

Razne funkcije androgena i AR su poznate i kod žena. Uključuju rast dlaka, libido, mišićnu snagu i volumen, produkciju eritropoetina i sazrijevanje matičnih stanica koštane srži, formiranje i rast kostiju, plodnost i ovulaciju. Novija istraživanja spominju androgene kao jedan od faktora u nastanku karcinoma dojke i jajnika (275,276).

1.4.2.2. Steroidogeni faktor 1

Važno otkriće u regulaciji tkivno specifične ekspresije steroidogenih enzima u gonadama i nadbubrežnoj žlijezdi je objavljeno 1992. godine u dva laboratorija. Lala je sa suradnicima klonirao mišji *Sf-1* gen iz adrenalne cDNA knjižnice koristeći hibridizacijsku sondu komplementarnu DNA-vezujućoj domeni (DBD) srodnog retinoid X receptora (277). Njegov goveđi homolog je identificiran pomoću dijela sekvence proteina pročišćenog iz ekstrakta goveđe NBŽ (278).

Ustanovljeno je da izolirani gen posjeduje 1383 parova baza koje kodiraju 461 aminokiselinu (279). Protein kodiran i mišjom i goveđom cDNA je bio nužan

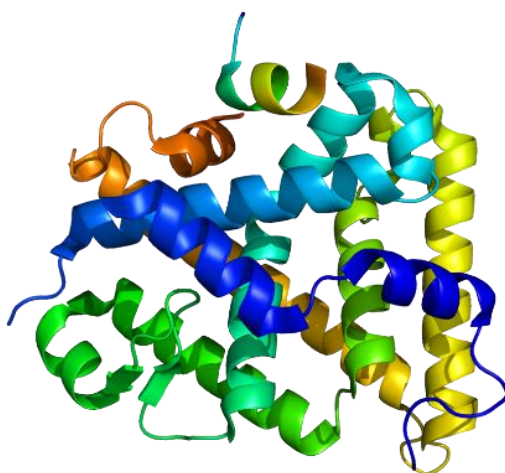
za ekspresiju P450 steroidogenih enzima kao i za izoformu 3 β -HSD u gonadama i NBŽ, što je sugeriralo da je identificiran zajednički steroidogeni faktor. Taj transkripcijski faktor su Lala i sur. nazvali **steroidogeni faktor 1 (SF-1)** (277), a Morohashi i sur. **Ad4BP, adrenal 4-binding protein** (280), jer se specifično veže za Ad4 promotorsku regiju citokrom P-450(11 β) gena (CYP11B).

Inicijalno je mišji gen na kromosomu 2 koji kodira SF-1 nazvan *Ftz-F1*, jer proteinski produkt pokazuje visoku homologiju s transkripcijskim faktorom FTZ-F1 (fushi tarazu faktor 1) u *Drosophila*, (281–283). Odgovarajući ljudski Sf-1 gen je također prvo nazvan FTZF1, a kasnije, budući da pripada superobitelji jezgrinih receptora (NR), sukladno standardnoj nomenklaturi za nuklearne receptore je nazvan **NR5A1** (nuclear receptor podobitelj 5, grupa A, član 1). Smješten je na dugom kraku kromosoma 9 (9q33), a čini ga 7 egzona koji se prostiru na oko 27 kb.

Transkripcijski faktor/nuklearni receptor **SF-1** ima molekularnu masu 53 kDa, i izgrađen je od 461 aminokiseline. Sadrži tipične domene kao i drugi članovi superobitelji nuklearnih receptora: N terminalnu regiju, DNA-vezujuću domenu koja sadrži dva cinkova prstena, fleksibilnu zglobnu („hinge“) regiju bogatu prolinom, ligand-vezujuću domenu (LBD) i C terminalnu AF-2 aktivacijsku domenu koja je potrebna za transkripciju i interakciju s kofaktorima. Za razliku od drugih NR, SF-1 ne sadrži klasičnu AF1 domenu na N terminalnom kraju (sl. 24 i 25).



Slika 24. Domene SF-1



Slika 25. Izgled SF-1

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_NR5A1_PDB_1ymt.png)

U svim proučavanim vrstama, SF-1 sadrži DBD s dva cinkova prstena koja je ključna u specifičnom prepoznavanju ciljne DNA sekvence. Za razliku od većine NR, SF-1 veže DNA kao monomer, a to vezanje stabilizira A box ili Ftz-F1 box (284), ekstenzija DBD na C terminalnom kraju koja se sastoji od 20 aminokiselina. Ftz-f1 box je domena specifična za članove obitelji NR5A (266,285).

DBD tvori specifični kompleks s DNA kroz dvodijelni motiv koji veže velike i male utore sa srži DBD i N kraja Ftz-F1 boxa. Kristalografska analiza pomoću X-zračenja kompleksa SF-1 DBD i promotorske regije *Inha* (inhibin α) gena je pokazala da Ftz-F1 box prepoznaje nukleotide bočno od 5'YCAAGGYCR3' (Y=T ili C; R=G ili A) motiva koji predstavlja mjesto direktnog kontakta te da također postoji zavojnica (H, engl. *helix*) na C terminalnom kraju Ftz-F1 boxa koja ulazi u interakciju i s DBD i s DNA time djelujući kao važan čimbenik u stabilnosti kompleksa (263,286,287). U DBD također nalazimo jednu NLS (engl. *nuclear localisation signal*) regiju, aminokiselinsku sekvencu koja „označava“ protein koji treba biti transportiran u staničnu jezgru.

Zglobna (engl. *hinge*) regija, koja leži između N-terminalne DBD i C-terminalne LBD ne služi samo za njihovo fleksibilno spajanje, već sudjeluje zajedno s Helixom 1 (H1) u stvaranju aktivne konformacije proteina dok

fosforilacija zglobne regije poboljšava stabilnost SF-1 i transkripcijsku aktivnost (288).

Iako SF-1 sadrži visoko konzerviranu ligand-vezujuću regiju (LBD) načinjenu od 12 zavojnica (H1-H12), do sada nije identificiran SF-1 ligand. Istraživanja kristalne strukture Fushi Tarazu Factora 1 (FTZ-F1) na embriju *Drosophila* su pokazala da je LBD u obliku džepa potpuno ispunjena zavojnicom 6 (Helix 6, H6) što bi onemogućilo vezanje liganda. Budući da je FTZ-F1 izrazito homologan ljudskim SF-1 i LRH-1, ovo istraživanje pokazuje da bi ta skupina jezgrinih receptora mogla pripadati novoj grupi ligand-neovisnih jezgrinih receptora (289).

Istraživanja su također pokazala da, neovisno o ligandu, H1 i H12 mogu zauzeti aktivnu konformaciju kao odgovor na fosforilaciju serina na poziciji 203 (288,290) te da bi mali fosfolipidi (npr. fosfatidilinozitol) mogli biti potencijalni ligandi za SF-1 i LRH-1 (291). Također je moguće da razni bioaktivni lipidi kao npr. sfingozin i drugi sfingolipidi kontroliraju aktivnost SF-1 kao medijatori steroidogeneze (292).

Na C terminalnom kraju se nalazi konzervirana AF-2 domena koja regrutira kofaktore. Kod klasičnih NR koji posjeduju AF-1 domenu, AF-2 suradnja s AF-1 na N kraju je nužna za aktivaciju transkripcije. Kod SF-1 koji ne posjeduje AF-1 domenu, AF-2 ulazi u suradnju s tzv. proksimalnom aktivirajućom domenom (koja obuhvaća dio zglobne regije i H1 LBD) i koaktivatorom SRC-1 (290), te s FP regijom (Ftz-F1 box i prolin bogata regija zglobne domene) i koaktivatorima c-jun i TFIIB (293).

Mnoge bjelančevine koji sudjeluju u transkripciji (TF, histoni, remodelatori kromatina) podliježu posttranslacijskim modifikacijama sudjelujući u interakciji s obitelji proteina nazvanih SUMO (engl. *small ubiquitin-related modifier*), a proces se naziva SUMOilacija (engl. *SUMOylation*). Većina konjugacija sa SUMO dovodi do inhibicije jer promovira interakciju transkripcijskih faktora s korepresorima (294–296). No, novija istraživanja su pokazala da SUMOilacijski enzimi Ubc9 i PIAS1 djeluju kao koaktivatori SF1 te povećavaju transkripciju nekih steroidogenih enzima u kori nadbubrežne žlijezde (297,298).

- **Funkcija SF-1**

Steroidogeni faktor 1 je nužan u procesu steroidogeneze, za razvoj nadbubrežnih žlijezda i gonada te za spolnu diferencijaciju.

Ekspresija SF-1 je dobro istražena u miševa, štakora, ljudi i drugih kralješnjaka. Budući da je glavni koordinator ekspresije gena koji kodiraju steroidogene enzime (277,278), nalazimo ga u tkivima koja proizvode steroidne hormone: u kori nadbubrežne žlijezde, Leydigovim i Sertolijevim stanicama testisa, zatim u intersticiju, theca i granulosa stanicama ovarija, te nešto slabije u žutom tijelu (279,299,300). Također je uočena ekspresija SF-1 u nesteroidogenim tkivima: u hipofizi, ventromedijalnoj jezgri hipotalamusa, koži i endotelu vena slezene (301–304).

Inicijalno je identificiran kao transkripcijski faktor koji direktno aktivira promotore gena P450 enzima (P450_{scc}, CYP11B1, CYP21, CYP17 i CYP19) (278,305). SF-1 također regulira transkripciju gena koji kodiraju 3 β -HSD (306), StAR, koji je nužan za transport kolesterola do unutarnje membrane mitohondrija (307) i SULT2A1 (enzim u stanicama nadbubrežne žlijezde koji je odgovoran za sulfataciju hidroksisteroida uključujući stvaranje dehidroepiandrosterona sulfata) (308). Dakle, SF-1 je uključen u proizvodnju svih steroidnih hormona u kori NBŽ i gonadama (261,309,310).

SF-1 ima ključnu ulogu u razvoju steroidogenih organa. U istraživanjima je uočena obilna ekspresija *Sf-1* gena tijekom embrionalnog razvoja te je ustanovljeno da je neophodan za embrionalni opstanak i razvoj primarnih steroidnih organa - gonada i nadbubrežnih žlijezda (311–314). Stanice NBŽ tijekom fetalne faze trebaju SF-1 da bi se mogle diferencirati u adultne funkcionalne stanice, a gubitak SF-1 dovodi do radikalne promjene u morfologiji stanica te gubitka identiteta (310).

Jedan od mehanizama koji bi mogli biti odgovorni za poremećen embrionalni razvoj steroidogenih stanica je inhibicija aktivnosti lizosoma čije djelovanje je faktor stabilnosti SF-1 proteina. Tretman stanice s lizosomalnim inhibitorima reducira rast steroidogenih stanica *in vitro* (315). Studije su također pokazale da su i geni koji kodiraju glikolitičke enzime jedni od ciljnih gena za SF-1 i na taj način SF-1 utječe na dostatan dotok energije potrebne za staničnu

proliferaciju (316). Također, uz funkciju transkripcijskog faktora, uočena je lokalizacija SF-1 u centrosomu, gdje održava konfiguraciju centrosoma potrebnu za pravilnu mitozu i integritet genoma (317,318).

U miša se prva ekspresija SF-1 uočava 9. embrionalnog dana (E9.0) u adrenogonadalnom primordiju (AGP). Nakon razdvajanja AGP na gonadalnu i adrenalnu osnovu (E11.0), SF-1 pokazuje izražaj tijekom gestacije u razvijajućoj steroidogenoj zoni, te u kori NBŽ odrasle jedinke. U stanicama neuralnog grebena koje migriraju u srž te u samoj srži NBŽ nema ekspresije SF-1. Tijekom spolno neodređenog stadija razvoja gonada (E9.0-E12.0), uočena je ekspresija SF-1 u genitalnom naboru kod svih embrija.

Poslije spolne determinacije, kako se počinju formirati sjemenski kanalići u mužjaka, SF-1 se difuzno eksprimira u testisu, dok mRNA za scc (engl. *side-chain cleavage*) enzime ostaje limitirana u intersticiju budućeg testisa. SF-1 je nužan za pravilan razvoj fetalnih i adultnih Leydigovih stanica ali s tom razlikom da kod fetalnih regulira diferencijaciju, a kod adultnih stvaranje i opstanak progenitornih stanica (319). Istraživanja su pokazala da je SF-1 nužan za preživljavanje i kontrolu staničnog ciklusa Sertolijevih stanica tijekom diferencijacije (320).

Za razliku od trajne ekspresije u embrionalnom testisu, SF-1 transkripti nestaju iz osnove za jajnik između E13.5 i E16.5, da bi se ponovo pojavili kasnije u gestaciji (E18.5) te na početku folikulogeneze u granuloza, theca i lutealnim stanicama jajnika odrasle jedinke (321,322). Dakle, ekspresija SF-1 u gonadama pokazuje prostorni i vremenski spolni dimorfizam te ima ulogu u razvoju gonada različitu od regulacije steroidogenih enzima.

E-box, vezujuće mjesto unutar bazalnog promotora *Sf-1* gena se pokazalo ključno za ekspresiju SF-1 (323). Vezujući se za E-box, transkripcijski faktor TCF21 (POD1/kapsulin) smanjuje ekspresiju SF-1 (324), dok WT1 ima ulogu pozitivnog regulatora ekspresije SF-1 u razvoju gonada (45). Također, transkripcijski kofaktor CITED2 zajedno s WT1 potiče ekspresiju SF-1 u ključnom razdoblju adrenogonadalnog primordija prije razdvajanja te dvije osnove (325).

U novije vrijeme dobro je istražena i uloga transkripcijskih pojačivača (TE, engl. *transcriptional enhancer*). Pojačivač je mali segment DNA (oko 200 pb) koji,

kad je na njega vezan transkripcijski faktor, izrazito povećava vjerojatnost da će određeni gen biti prepisan. Mnogi pojačivači kontroliraju stanično specifičnu ekspresiju gena. U tkivno specifičnoj ekspresiji SF-1 možemo istaknuti 4 pojačivača: fAdE (engl. *fetal adrenal enhancer*), PGE (engl. *pituitary gonadotrope enhancer*), VMHE (engl. *VMH enhancer*) i fLE (engl. *fetal Leydig cell enhancer*) (326–328) koji aktiviraju transkripciju *Sf-1* gena u specifičnom tkivu i u specifično vrijeme. SF-1 SUMOilacija pojačava vezanje DAX1 na *Sf-1* gen. Posljedica je inaktivacija aktivnosti fAdE, represija transkripcije *Sf-1* te regresija fetalne X zone kore NBŽ (329). Aktivnost pojačivača je u korelaciji s njihovim DNA metilacijskim statusom: hipometilirani su u tkivima u kojima su aktivni, dok su hipermetilirani u tkivima u kojima nisu aktivni. Ova istraživanja pokazuju da je tkivno specifična ekspresija *Sf-1* epigenetički regulirana (330).

SF-1 također ima značajnu ulogu u reguliranju gena uključenih u određivanje spola u sisavaca. Kako je objašnjeno ranije u poglavlju o determinaciji spola, ključni događaj je aktivacija *Sry* gena te posljedična up-regulacija i održavanje ekspresije *Sox9* u gonadalnim prekursorima Sertolijevih stanica (33).

U miša, *Sox9* regulacija je pod transkripcijskom kontrolom SRY, SF-1 i samog SOX9 preko evolucijski sačuvanog testis specifičnog pojačivača gena *Sox9* (TES), dok u čovjeka SRY i SF-1 zajednički aktiviraju humani homolog *Sox9* pojačivača (hTES). Za taj proces SF-1 mora biti fosforiliran. SOX9, potpomognut SF-1, također aktivira hTES, održavajući svoju vlastitu ekspresiju autoregulacijom (33,331,332). *Sox9* pojačava aktivnost SF-1 i djelomično je odgovoran za spolno dimorfnu ekspresiju SF-1 koja se očituje tijekom gonadalne diferencijacije (333).

Inicijalno *Sf-1* gen ima izražaj u mišjim gonadama oba spola, ali kasnije je njegova ekspresija pojačana u testisima i prigušena u ovarijima. Jedan od puteva njegove aktivacije i održavanja je putem transkripcijskih faktora WT1 i LHX9 (LIM homeobox 9), dok FOXL2 (Forkhead box L2) negativno regulira *Sf-1* ekspresiju djelujući kao WT1 antagonist tijekom ranog razvoja ovarija (334).

Osobito je bitna i dobro istražena korelacija DAX 1 i SF-1. *Dax1*, gen na X kromosomu, kodira represor gena steroidogeneze i djeluje kao antagonist SF1

te tako modulira njegovu aktivnost. Mutacija tog gena dovode do sličnog fenotipa kao i mutacije *Sf-1* gena, adrenalne displazije i hipogonadotropnog hipogonadizma. Kolokalizacija SF-1 i DAX-1 sugerira njihovu blisku povezanost u zajedničkom putu razvoja endokrinih organa, uz ekspresiju SF-1 nešto prije DAX1 (48). Imunohistokemijske analize su pokazale prostornu i vremensku ekspresiju DAX-1 tijekom razvoja tkiva koja pripadaju hipotalamo-pituitarno-gonadalnoj osi. Tijekom razvoja gonada, DAX1 ekspresija nastupa nešto nakon ekspresije SF-1, pokazujući također spolno dimorfni uzorak i involviranost u spolnu diferencijaciju u najranijim fazama (335).

Antimilerijanski hormon, (AMH) je potreban za pravilnu spolnu diferencijaciju tako što regulira regresiju Müllerovih kanala u mužjaka. SF-1 se direktno veže za regulatorni element *AMH* gena u prekursorima Sertollijevih stanica i potiče njegovu transkripciju (336). Također, nedavne studije pokazuju da bi mogao bitan u održavanju rezerve folikula u jajnicima. SF-1 je nužan za pravilan razvoj folikula u jajnicima. Interakcija između proteina FOXL2 i SF-1 je potrebna za regulaciju *AMH* koji je ciljni gen u jajnicima za SF-1 (337).

Sf-1 se također pokazuje izražaj u embrionalnom ventralnom diencefalonu i bitan je za razvoj ventromedijalne jezgre hipotalamusa. Neuroendokrini mozak ili hipotalamus je regija mozga u sisavaca koja pokazuje izraziti seksualni dimorfizam. Jezgre hipotalamusa imaju ključnu ulogu u reguliranju reprodukcije, metabolizma i hranjenja te integriranju unutarnjih i vanjskih signala u održavanju energetske homeostaze (338). VMH eferentne projekcije su vidljive rano, oko E10.5, dok je malo postmitotskih SF1 neurona rođeno, što sugerira da formiranje VMH neuronske mreže počinje na samom začetku neurogeneze. (339,340). Također, imunohistokemijske analize i *in situ* hibridizacija hipofize *Sf-1* KO miševa su pokazale selektivni gubitak beta jedinica gonadotropno-specifičnih markera (LH β , FSH β i receptor za GnRH) dok su alfa jedinice snižene ali detektabilne ekspresije (301). Dakle, SF-1 ima ulogu na svim razinama hipotalamo/hipofizno/gonadalne osi.

Dokazano je da SF-1 pozitivni neuroni u ventromedijalnom hipotalamusu (VMH) integriraju hranjenje i emocionalna stanja povezana s nabavkom hrane u potencijalno opasnoj okolini. Manipuliranje SF1 neuronima mijenja unos hrane i

ponašanja povezano s jedenjem (apetit, kretanje i istraživanje okoline, anksioznost). Intrinzična aktivnost SF-1 neurona je niska tijekom hranjenja i raste sa završetkom hranjenja i stresnim faktorima (341). SF-1 neuroni u VMH imaju veliko značenje u regulaciji energetske homeostaze, tjelesne težine i homeostaze glukoze, regulirajući unos hrane i potrošnju energije (342–344).

Novije analize ciljnih gena za SF-1 su također ustanovile značajnu ulogu SF-1 u regulaciji proliferacije i apoptoze stanica NBŽ te u kontroli različitih bioloških procesa, kao što su angiogeneza, eritropoeza, adhezija za ekstracelularni matriks, dinamika citoskeletona,. Uz ulogu transkripcijskog faktora, SF-1 je također značajan u posttranskripcijskoj regulaciji ekspresije gena kore NBŽ (345).

1.5. SF-1 KO MIŠEVI

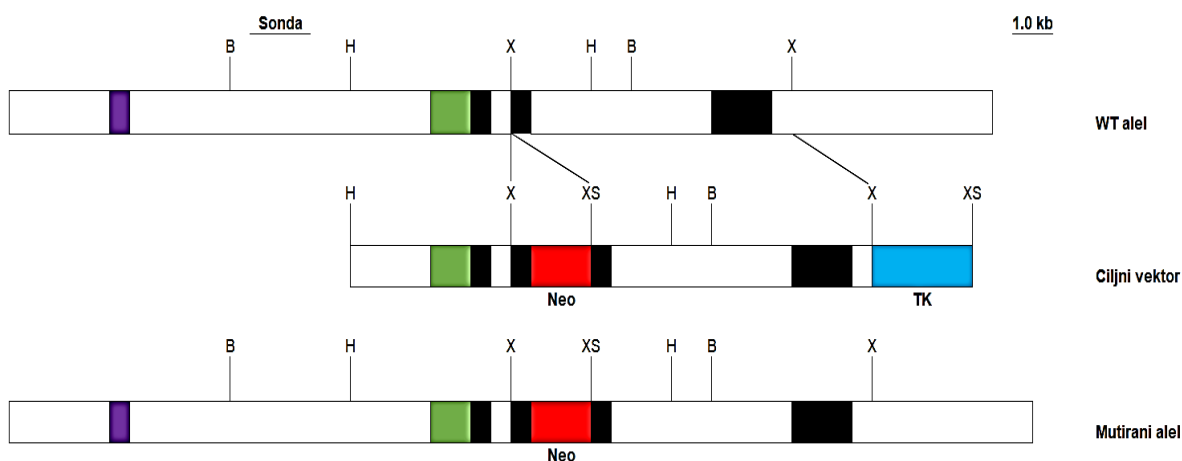
Gen koji kodira transkripcijski faktor SF-1 je evolucijski dobro očuvan među višestaničnim organizmima i nazvan je *Ftz-f1* (u čovjeka *SF-1*, a miša *Sf-1*). On kodira 4 različita proteina: ELP1 (engl. embryonal long terminal repeat-binding protein1), ELP2, ELP3 i SF-1, korištenjem različitih egzona i promotora te alternativnim izrezivanjem RNA. Dok ELP-i vjerojatno suprimiraju određene nuklearne receptore (346), SF-1 je, kako smo ranije opisali, ključni aktivator steroidogeneze.

SF-1 i ELP izoforme su izbačene ili nokautirane u miša simultano od strane tri tima (302,313,347). Luo je sa suradnicima 1994. osmislio strategiju za ciljanu disrupciju mišjeg *Ftz-F1* gena te je dobio prve *Sf-1 knock-out* miševe (*Sf-1 KO*) (347).

Genomska sekvenca koja sadrži *Ftz-F1* kodirajuću sekvencu je izolirana iz mišje genomske biblioteke te je područje veličine od 10 kb faga subklonirano i iskorišteno da se pripremi genski vektor. Neomicin fosfotransferaza (Neo) marker je ubačen unutar egzona 4 u smjeru transkripcije. Ovaj egzon kodira aminokiseline koje formiraju drugi cinkov prsten koji je nužan za vezanje na DNA. Da se omogući negativna selekcija nehomolognih rekombinanti, timidin kinaza

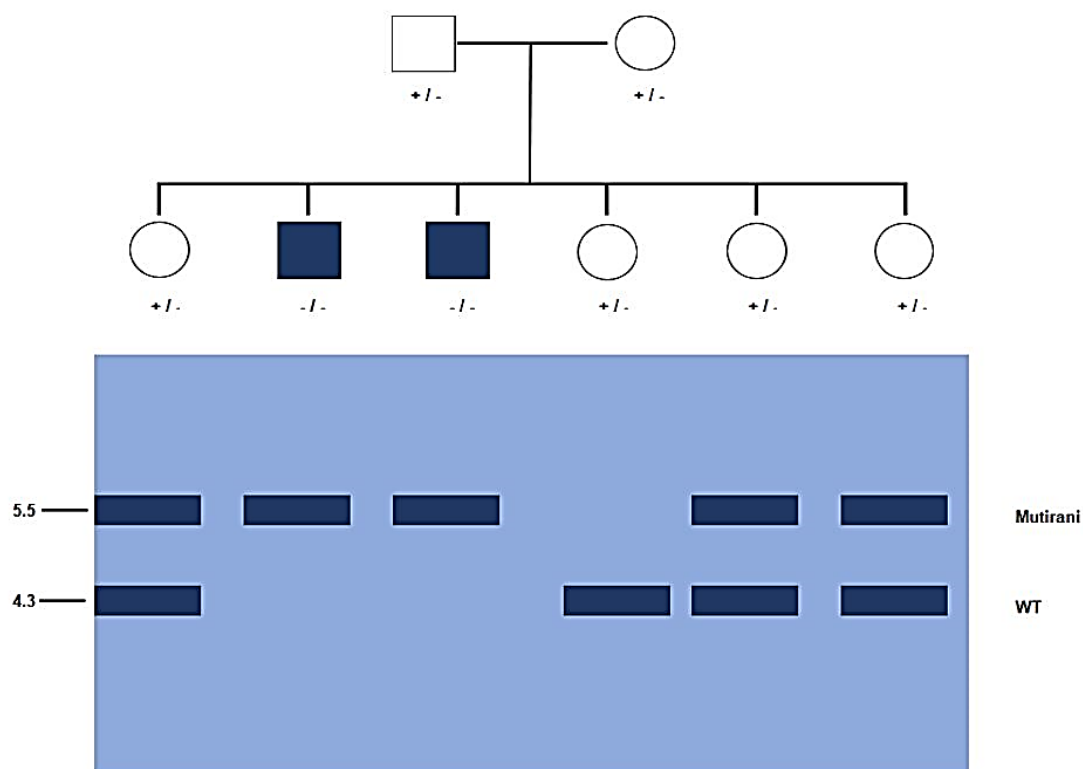
(TK) gen iz herpes simplex virusa je također ubačen na 3' kraj *Ftz-F1* sekvence (sl. 26). Učinjena je transfekcija embrionalnih matičnih stanica elektroporacijom. Genetecin (G418) - rezistentne kolonije su selekcionirane te je učinjen probir na disrupciju *Ftz-F1* gena hibridizacijom po Southernu (sl. 27), na način da je DNA podvrgnuta digestiji pomoću restrikcijske endonukleaze BglIII i hibridizirana sandom prikazanom na slici 26. Spolni genotip je određen pomoću PCR analize primerom specifičnim za *Sry*. S dvije neovisne stanične linije koje su nosile poremećeni alel gena generiran je miš kimer a te je zatim taj disruptirani alel prenesen na potomke kimeričnih životinja (sl. 18).

Križanjem +/- heterozigota (engl. *breed to homozygosity*) dobili su potomke u omjeru 1:2:1 (-/-: +/-: +/+), što je sugeriralo da nije bilo većeg gubitka nokaut (KO) mladunčadi prenatalno. Sva mladunčad se kretala i sisala normalno, bez očitih vanjskih anomalija. No, počevši od 12 sati pa završno s 8. dana nakon rođenja, svi KO miševi su uginuli zbog akutne adrenokortikalne insuficijencije. Srednja razina kortikosterona je bila značajno niža nego u +/- mladunčadi iz legla (koji su imali jedan alel divljeg tipa) i +/+ mladunčadi iz legla (s oba alela divljeg tipa), dok je razina ACTH bila značajno povišena zbog izostanka negativne povratne sprege od strane glukokortikoida. Supstitucijska terapija s kortikosteroidima je produžavala život mladunčadi.



Slika 26. Shematski prikaz strategije korištene za disrupciju *Ftz-F1* gena. Crni kvadratići označavaju zajedničke egzone, ljubičasti SF-1 specifične egzone, a zeleni ELP-specifične egzone. Neo marker (Neo) označen crvenim kvadratićem i timidin kinaza gen (TK) označen plavim kvadratićem su umetnuti u plazmid koji sadrži *Ftz-F1* genomsku sekvencu i tako je

formiran ciljni vektor. Neo gen (umetnut u XhoI mjesto kreirano direktnom usmjerenom mutagenezom) vrši disrupciju drugog cinkovog prsta koji je nužan za vezanje transkripcijskog faktora na DNA. Označena je i pozicija sonde korištene za hibridizaciju po Southernu.



Slika 27. Na gornjem dijelu je shematski prikazan rodovnik križanja dva heterozigota za disruptirani Ftz-F1 alel. Na donjem sliku je prikazan rezultat hibridizacije po Southernu. Alel divljeg tipa (WT) daje band od 4.3 kb, a mutirani od 5.5 kb.

Sf-1 u miševa ima izražaj u svim primarnim steroidogenim tkivima i u urogenitalnom naboru (314). Ima centralnu ulogu u diferencijaciji stanica u stanice steroidogene linije (311). Spolni nabori, koji su osnova za spolne žlijezde, se normalno formiraju oko 10 dana embrionalnog razvoja (E10.5), no podliježu izrazitoj apoptozi neposredno nakon toga i oko E12.5 nestaju. Osnova nadbubrežne žlijezde također normalno nastaje, no bez Sf-1 gena nastupa brza regresija i nestajanje žlijezde do 11. dana (E11.5) embrionalnog razvoja.

Histološka analiza KO miševa je pokazala kompletnu agenezu nadbubrežnih žlijezda i gonada. Također, Sf-1 KO miševi, neovisno kojeg su genetskog spola, imaju ženske unutarnje i vanjske genitalije (engl. *male to female*

sex reversal). Zbog izostanka formiranja testisa, te posljedičnog manjka androgena i AMH, u mužjaka perzistiraju Müllerovi kanali koji formiraju ženske unutarnje spolne organe dok istovremeno Wolffovi kanali regrediraju i nestaju. Ovi rezultati pokazuju da je SF-1 nužan za diferencijaciju i održavanje primordija nadbubrežnih žlijezda i gonada, ali ne i za njihovo nastajanje. Disrupcija *Sf-1* gena također uzrokuje poremećaje u razvoju slezene (304), slične kao u miša s disrupcijom mišjeg polikomb *Cbx2* gena što sugerira moguću interakciju CBX2 i SF-1 u razvoju slezene.

SF-1 je potreban za diferencijaciju gonadotropnih stanica prednjeg režnja hipofize i neurona ventromedijalne jezgre hipotalamusa (VMH). *Sf-1* KO miševi pokazuju poremećenu morfologiju VMH uz promjenu lokacije stanica i vlakana koja sadrže oreksigenične i anoreksigenične peptide: NPY (neuropeptid Y), AgRP (engl. *agouti-related peptide*) i CART (engl. *cocaine and amphetamine-regulated transcript*) (126,302,348).

Također, u *Sf-1* KO miševa nema ekspresije LH β i FSH β , markera gonadotropnih stanica prednjeg režnja hipofize (301,349). Slično kao kod adrenalnog i gonadalnog primordija, u *Sf-1* null homozigota stanice iz ove dvije regije su prisutne na E.17, ali nakon toga ubrzano nestaju (339). Kisspeptin je regulator reproduktivne funkcije i nastupa puberteta u sisavaca. Njegova ekspresija je uočena u antroventralnoj periventrikularnoj jezgri (AVPV) i arkuatnoj jezgri (Arc). Istraživanje na *Sf-1* KO i WT miševima je pokazalo da je maturacija kisspeptinskog sustava u Arc spolno dimorfna te da je regulirana mehanizmima neovisnim o gonadalnim hormonima (350).

Budući da lezije VMH obično dovode do hiperfagije i pretilosti, bitno je istaknuti da *Sf-1* KO miševi, održani na životu pomoću transplantacije NBŽ, nakon 8 tjedna života razvijaju izrazitu pretilost. Oko 6. mjeseca života njihova tjelesna masa je dvostruko veća u usporedbi s WT miševima tj. miševima divljeg tipa (sl. 28). Istraživanja su pokazala da *Sf-1* KO miševi nemaju pojačan apetit, nego se razlika u postotku masnog tkiva može pripisati značajno smanjenoj fizičkoj aktivnosti transgeničnih miševa (351).



Slika 28. Usporedba *Sf-1* KO miša i WT miša (Centar za animalnu genomiku, Veterinarski fakultet u Ljubljani)

Postoje globalni (kompletni, null-mutante) *Sf-1* knock out miševi i tkivno specifični *Sf-1* KO miševi u kojima je učinjena inaktivacija *Sf-1* gena samo u određenom tkivu.

Kada govorimo o globalnim *Sf-1* KO miševima, ženke imaju hipoplastične ovarije s malim brojem folikula i bez žutih tijela. Pokazuju abnormalne estrus cikluse i na hiperstimulaciju gonadotropinima odgovaraju s malim brojem oocita i niskom koncentracijom estradiola u plazmi. Granuloza stanice pokazuju reduciranu ekspresiju AMH, aromataze CYP19A1 i ciklina D2, kao i povišenu bazalnu ekspresiju α -inhibina. Snižena je imunohistokemijska reakcija na faktore proliferacije Ki-67 i ciklina D2, te povišena ekspresija faktora p27 (Cdkn1b) koji inhibira ciklin ovisne kinaze što sve dovodi do smanjene funkcije i proliferacije granuloza stanica i neplodnosti (352).

Primjenom Cre/lox metode dobiveni su miševi kojima *Sf-1* gen može biti izbačen samo u gonadotropnim stanicama hipofize, zatim neuronima VMH (353) ili gonadama (311,352). Npr. mužjaci gonadalno specifičnih *Sf-1* KO miševa imaju kriptorhične, hipoplastične testise, poremećenu spermatogenezu i sterilni su. Odrasle ženske imaju smanjen broj folikula, uz izostanak žutih tijela te su također neplodne (311). Studije na hipofizno specifičnim *Sf-1* KO miševima pokazuju hipogonadizam i posljedičan sterilitet životinja (354).

Posebno je zanimljiva studija u kojoj su korišteni CNS specifični *Sf-1* KO

miševi (*Sf-1* KO^{nCre}). Iako mušjaci ne pokazuju značajnija odstupanja u ponašanju i razmnožavanju, ženke su ili smanjeno plodne ili neplodne. Značajna dezorganizacija u i oko VMH zbog manjka SF-1 interferira s pokretanjem GnRH i LH gonadotropina. Iako odrasle *Sf-1* KO^{nCre;F/-} ženke pokazuju smanjen broj ili nepostojanje žutih tijela u jajnicima, egzogena primjena gonadotropina dovodi do normalizacije ovulacije i pojave multiplih žutih tijela, što pokazuje da su jajnici funkcionalno uredni i da SF-1 ima ključnu ulogu u reproduktivnoj funkciji ženki, vjerojatno organizirajući preciznu mrežu neurona i njihovu međusobnu komunikaciju u VMH (355). Također možemo istaknuti istraživanje spolnog ponašanja u ženki kojim se dokazalo da *Sf-1* KO ženke miševa unatoč manjku estrogena pokazuju tipično žensko spolno ponašanje (npr. zauzimanje položaja lordoze), dakle prisutan je direktni genetski utjecaj (356).

Za razliku od homozigotnih ženki, *Sf-1* KO heterozigotne ženke miša su fertilne, no pokazuju snižene materinske instinkte (vraćaju manje mladunčadi u gnijezdo koje je lošije kvalitete, pokazuju latenciju u vraćanju i prikrivanju mladunčadi) te lošije reproduktivno ponašanje, vjerojatno radi nepotpune doze *Sf-1* gena (357). Heterozigotni miševi za *Sf-1* gen imaju smanjen volumen NBŽ, posljedičnu smanjenu produkciju kortikosteroida u odgovoru na stres te smanjene testise. Razlike u razvoju NBŽ između heterozigota i WT životinja su bile više uočljive tijekom embrionalnog razvoja, jer postnatalno dolazi do parcijalne kompenzacije adrenalne funkcije (358).

Ustanovljeno je da optogenetska visokofrekventna stimulacija SF1 neurona u VMH uzrokuje izrazito obrambeno ponašanje, uključujući „smrzavanje“ i pokušaje bijega (341). Nasuprot tome, odrasli *Sf-1* KO miševi pokazuju agresivnije ponašanje u usporedbi s kontrolnom skupinom (359).

CNS-specifični *Sf-1* KO (Cre/loxP) miševi su pokazivali više izraženu anksioznost od WT miševa, te su imali smanjenu ekspresiju ili promijenjenu distribuciju nekoliko gena mediobazalnog hipotalamusa koji su povezani s reakcijom na stres i anksioznim ponašanjem, kao što su *Bdnf* (engl. *brain-derived neurotrophic factor*), *Crhr2* (receptor za CRH tip2) i *Ucn3* (urokortin 3) (353). SF-1 je kolokaliziran u VMH neuronima s kanabinoidnim receptorom 1 (CB1R) koji sudjeluje u regulaciji energetske homeostaze i anksioznosti. Agonisti CB1R

moduliraju električnu aktivnost SF-1 neurona. SF-1 direktno regulira ekspresiju *Cnr1* gena, a CNS specifični *Sf-1* KO miševi pokazuju smanjenu ekspresiju kanabinoidnih receptora (360).

1.5.1. Mutacije SF-1 gena u čovjeka

U ljudi, poremećaj spolnog razvoja (engl. *disorder of sexual development*, DSD) ili interseksualizam uključuje sva prirođena stanja u kojima je razvoj kromosomskog, gonadalnog ili anatomskog spola atipičan (361). Ova stanja mogu biti uzrokovana genetskim ili hormonskim poremećajima te neželjenim događajima u perinatalnom razdoblju. Učestalost varira od 1:2000-1:4500. Interseksualizam se može očitovati pri rođenju (dvosmislene genitalije ili nesklad između vanjskih i unutarnjih spolnih organa) ili kasnije kao virilizacija, odgođeni pubertet ili neplodnost (362).

U pravom gonadalnom interseksualizmu osoba ima i tkivo testisa i tkivo jajnika, koje može biti odvojeno ili zajedno tvoriti strukturu nazvanu ovotestis. Pogođena osoba ima spolne kromosome koji pokazuju muško-ženski mozaicizam (XY/XX). Najčešće osoba posjeduje komplet 46,XX uz Y kromosomski materijal smješten na nekom od autosomalnih kromosoma. Fenotipski takva osoba obično ima izražen falus, te ih se najčešće smatra muškarcima. No, obično tijekom puberteta razviju dojke i dobiju menstruaciju, a u izuzetno rijetkim slučajevima mogu proizvesti i spermu.

U ljudskoj embriogenezi, poremećaje spolnog razvoja mogu izazvati gubitak *SRY*, *SOX9* ili *SF-1* gena (331). **Mutacije SF-1 gena** su među najčešćim poznatim genetskim uzrocima poremećaja razvoja gonada u čovjeka te su povezane sa širokim rasponom fenotipova (363,364). Pretpostavlja se da su kod osoba s poremećajem spolnog razvoja različite mutacije *SF-1* gena prisutne u čak 15% slučajeva.

Najčešći fenotip 46,XY s mutacijom *SF-1* gena uključuje ženske vanjske genitalije s klitoromegalijom, palpabilne gonade, te odsutnost razvoja struktura koje nastaju iz Müllerovih kanala (jajovodi, maternica). Pri rođenju su vanjske

genitalije obično nevirilizirane, no dolazi do spontane virilizacije tijekom puberteta. Testosteron, inhibin B i AMH obično pokazuju niske vrijednosti. Poznati su i blaži slučajevi kao što su hipospadija i kriptorhizam koji nastaju zbog manjeg defekta u sintezi androgena.

Mutacije *SF-1* gena kod 46,XX su rjeđi genetski uzroci primarne ovarijalne insuficijencije: primarna ili sekundarna amenoreja, neplodnost, hipoestrogenizam uz povišene razine gonadotropina. Kod nekih osoba je čak moguće pronaći testise u različitim stupnjevima razvoja. Uz sve navedeno, čini se da bi poremećaji *SF-1* gena mogli predstavljati veći čimbenik u neplodnosti muškaraca i žena nego što se dosad mislilo (365).

Mutacije *SF-1* gena također mogu, no vrlo rijetko, uzrokovati adrenalnu insuficijenciju. Zanimljivo je istaknuti da uz obično ozbiljnu dezorganizaciju spolnog sustava, u većini slučajeva nema adrenalne insuficijencije (366,367). Ta činjenica ukazuje na to da je razvoj nadbubrežnih žlijezda kod čovjeka, za razliku od miša, otporniji na *SF-1* deficijenciju. Također treba naglasiti da kod čovjeka zbog postojanja široke lepeze fenotipova ne postoji jasna veza genotip-fenotip kod *SF-1* mutacija, što sugerira postojanje raznih modifikatora genetskih faktora koji doprinose različitom izgledu individua (368–370).

Također se pronašla ekspresija *SF-1* gena u koži (303) i slezeni u humanim tkivima (300,304). Novija istraživanja su pokazala da je u čovjeka *SF-1* neophodan za razvoj slezene, te da neke specifične mutacije mogu, uz poremećaj spolnog razvoja, dovesti do asplenije (371).

SF-1, uz reguliranje gena steroidogeneze, također regulira i transkripciju *BDNF* (engl. brain-derived neurotrophic factor). *BDNF* je važan regulator energetske ravnoteže u VM jezgri hipotalamusa. Mutacije *SF-1* gena uzrokuju smanjenje *BDNF* promotorske aktivnosti, što može dovesti do razvoja pretilosti koja je potvrđena i opisana kod *Sf-1* KO miševa (351). No, klinički podaci pokazuju da ljudi pogođeni mutacijom *SF-1* gena, iako imaju poremećenu transkripciju *BDNF*, ne pokazuju povećanje tjelesne težine (372).

2. HIPOTEZA

Hipoteza predloženog doktorskog rada je da će se očitovati spolni dimorfizam u izvanorbitalnoj suznoj žlijezdi *Sf-1* KO miševa, a usporedbom između *Sf-1* KO/M i *Sf-1* KO/M TP+ veći izražaj androgenih receptora u suznoj žlijezdi će biti u miševa koji su dobivali supstitucijsku terapiju testosteronom (*Sf-1* KO/M TP+), a manji kod *Sf-1* KO/M miševa bez terapije.

3. CILJEVI RADA

Opći cilj doktorskog rada je istražiti pojavu spolnog dimorfizma izvanorbitalnih suznih žlijezda *Sf-1* KO miševa i izražaj androgenih receptora.

Specifični ciljevi su:

1. provesti kvalitativnu histološku i kvantitativnu stereološku analizu suznih žlijezda *Sf-1* KO/M i *Sf-1* KO/F koristeći svjetlosni mikroskop i računalni sustav Stereoinvestigator te usporediti slijedeće parametre: volumensku gustoću acinusa (V_{va}), kanalića (V_{vd}) i vezivnog tkiva (V_{vct}), te duljinsku gustoću intralobularnih (L_{vi}) i pravih odvodnih kanalića (L_{ve});

2. provesti navedenu stereološku analizu histoloških preparata *Sf-1* KO/M TP+ te dobivene vrijednosti usporediti sa *Sf-1* KO/M i *Sf-1* KO/F;

3. provesti imunohistokemijsku analizu androgenih receptora (AR) radi utvrđivanja izražaja i smještaja AR u tkivu suznih žlijezda *Sf-1* KO/M i *Sf-1* KO/M TP+ miševa.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. ŽIVOTINJE - držanje, žrtvovanje i uzimanje tkiva

U istraživanju smo koristili tkivo suznih žlijezdi transgeničnih *Sf-1* KO mužjaka i ženki miša (*Mus musculus*). Uzgoj miševa i cjelokupni eksperimentalni postupak na pokusnim životinjama je proveden na Veterinarskom fakultetu u Ljubljani, na Centru za animalnu genomiku.

Homozigotni miševi bez gena *Sf-1* su neplodni zbog odsutnosti spolnih žlijezda. Zbog toga su međusobno pareni C57BL/6J *Sf-1* heterozigotni miševi (*Sf-1*+/- se povratno križaju s C57BL/6J više od 10 generacija) tako da se u istom leglu dobiju *Sf-1* KO i WT (engl. *wild type*) miševi (sl. 26). Svi heterozigoti korišteni su 3 ili 4 puta (normalan broj parenja za miševe) za parenje, a poslije toga eutanazirani.

Sf-1 KO miševi, budući da su rođeni bez spolnih i nadbubrežnih žlijezda, obično umiru u prva 24 h po okotu zbog adrenalne insuficijencije. Majdič je sa svojim suradnicima na Veterinarskom fakultetu u Ljubljani pronašao način da *Sf-1* KO miševi prežive do zrele dobi. Stoga su svi mladunci od okota do određivanja genotipa primali dnevne subkutane injekcije kortikosteroida u kukuruznom ulju (400µg/ml hidrokortizona, 40ng/ml deksametazona i 25ng/ml fludrokortizonacetata). U dobi od 6-7 dana starosti određen je spol i genotip svim miševima koristeći PCR metodu na tkivu repa miševa. DNA uzorci su dobiveni uzimanjem tkiva repa dužine 0,5-1mm i digestijom u termostatskoj mješalici u 200µL PCR DNA pufera (Promega, Madison,WI) koji sadrži 0,15 mg Proteinaze K (Sigma) na 55 °C preko noći. Tri mikrolitra lizata je korišteno za PCR reakciju. Kod miševa mlađih od 7 dana ne upotrebljava se anestezija jer bi samo davanje anestezije bilo bolnije nego uzimanje veoma malog uzorka repa.

Sf-1 KO mladuncima oba spola je 7. ili 8. dan transplantirana nadbubrežna žlijezda od WT (*Sf-1* +/+) ženki donora da bi se osigurala potpuno funkcionalna žlijezda jer žlijezda uzeta od heterozigota (*Sf-1* +/-) može biti manjkava (358). Donori su bezbolno usmrćeni pomoću CO₂ te su im neposredno nakon toga izvađene nadbubrežne žlijezde. *Sf-1* KO miševi su fiksirani, te im je iglom 16G

probodena koža u potpazušnom području i umetnute dvije NBŽ donora (351). Također se nije pribjeglo nikakvom obliku anestezije jer zahvat predstavlja dva uboda injekcijskom iglom, te bi sama anestezija predstavljala veću patnju životinjama. Nakon transplantacije mladunci su dobili još 4 supkutane injekcije kortikosteroida do 21. dana života. Smrtnosti tijekom transplantacije nije bilo, stopa preživljenja poslije transplantacije je bila između 80 i 90 %.

Sve životinje su držane u kavezima pod standardnim uvjetima - 12:12 satni ciklus svjetlo-tama, hrana za glodavce bez fitoestrogena (Global 16% protein rodent diet (2016), Harlan Teklad, Bicester, Oxfordshire, UK) i voda *ad libitum*.

Jednoj grupi *Sf-1* KO mužjaka (n=8) je administrirana hormonska supstitucijska terapija u obliku testosteron propionata (TP) u kukuruznom ulju (0,1mg s.c.) svakodnevno dva tjedna prije žrtvovanja. Sve životinje su nakon 6 mjeseci podvrgnute žrtvovanju.

Zbog što bezbolnijeg postupka, žrtvovanje se načinilo uz pomoć intramuskularno aplicirane mješavine ketamina (Vetoquinol Biowet, Gorzowie, Poland; 100 µg/g tjelesne težine), ksilazina (Chanelle Pharmaceuticals, Loughrea, Ireland; 10 µg/g tjelesne težine) i acepromazina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA; 2 µg/g tjelesne težine).

Neposredno nakon žrtvovanja, životinjama su odstranjene izvanorbitalne suzne žlijezde, numerirane i stavljene u Bouinov fiksativ, te dopremljene u laboratorij Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Životinjske lešine je zbrinula nadležna veterinarsko higijenska služba Veterinarskog fakulteta u Ljubljani. Svi postupci na miševima su odobreni od državne veterinarske uprave Slovenije te su napravljeni u skladu sa etičkim principima i EU direktivom 86/609/EEC (Odobrenje Slovenskog Ministarstva za zaštitu okoliša, br. potvrde 35417-2/2006-6).

4.2. HISTOLOŠKE METODE

4.2.1. Obrada tkiva

U našem istraživanju korišteno je tkivo suznih žlijezda *Sf-1* KO mužjaka (n=10) i ženki (n=11) miševa te suzne žlijezde *Sf-1* KO mužjaka koji su dobili supstitucijsku terapiju testosteronom, *Sf-1* KO/M TP+ (n=8) (tbl. 1). Terapija je administrirana kao testosteron propionat (TP) u kukuruznom ulju (0,1mg s.c.) svakodnevno dva tjedna prije žrtvovanja.

Tablica 1

Grupa	N=
Mužjaci <i>Sf-1</i>	10
Ženke <i>Sf-1</i>	11
Mužjaci <i>Sf-1</i> TP+	8

U laboratoriju Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu tkivo je podvrgnuto standardnoj histološkoj obradi. Nakon ispiranja Bouinovog fiksativa do nestanka žute boje (48h), uslijedila je dehidracija tkiva uzlaznim nizom alkohola, prožimanje u intermediju (ksilol i ksilol-parafin) te uklapanje u parafin.

Nakon montiranja parafinskih blokova na podloške učinjeni su rezovi parafinskih blokova debljine 5 μ m te obojani na 4 načina: hemalaun-eozinom, histokemijskom PAS metodom, modificiranim trikromnim bojanjem po Massonu i trikromnim bojanjem po Azanu. PAS metodu smo koristili za prikaz sekretornih zrnaca u citoplazmi stanica acinusa, dok smo metodama po Azanu i po Massonu odlično prikazali kolagena vlakna u intralobularnom i interlobularnom vezivu suzne žlijezde. Acinusi i odvodni kanali se dobro prikazuju na preparatima bojanim svim navedenim metodama.

4.2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza

Kvalitativna analiza histoloških preparata i fotografiranje su učinjeni na svjetlosnim mikroskopima Nikon Eclipse E200 i Olympus Bx61.

Kvantitativna analiza je napravljena pomoću mikroskopa Olympus Bx61 i softwara za stereološku analizu Stereoinvestigator 10 (MBF Bioscience, Williston, VT, USA) na Hrvatskom Institutu za istraživanje mozga u Zagrebu.

4.2.3. Imunohistokemija

Za detekciju androgenih receptora u jezgrama stanica acinusa koristili smo tkivo suznih žlijezda hormonski naivnih *Sf-1* KO mužjaka (n=10) i *Sf-1* KO mužjaka koji su 2 tjedna prije žrtvovanja dobivali supstitucijsku terapiju testosteron propionatom (n=8).

Imunohistokemija na AR je učinjena pomoću Vectastain ABC-AP Kita (Rabbit IgG) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) i ImmPACT Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kita (Vector Laboratories).

Imunohistokemijsko bojanje je izvedeno na u parafin uklopljenim rezovima debljine 4 mikrona. Rezovi za svaki uzorak su montirani na silanizirana stakla. Potom su rezovi deparafinizirani u dvije promjene u ksilenu (po 5 minuta svaka) te potom rehidrirani u silaznom nizu alkohola.

Otkrivanje antigena (engl. *antigen retrieval*) je učinjeno kuhanjem u citratnom puferu (10mM Citric Acid, 0.05% Tween 20, pH 6.0) u mikrovalnoj pećnici 40 minuta („microwave oven method“). Rezovi su ohlađeni 20 minuta na sobnoj temperaturi i nakon toga 5 minuta ispirani u PBS-u Tween 20. Zatim su blokirani 20 minuta s razrijeđenim normalnim serumom za blokiranje koji je uključen u Vectastain ABC-AP Kit.

Primarna antitijela na antiandrogene receptore (Rabbit monoclonal /EPR1535(2)/ to Androgen Receptor, Abcam) su razrijeđena u omjeru 1:100 te su rezovi inkubirani preko noći na 4 °C. Nakon inkubacije u primarnom protutijelu rezovi su ispirani 3 puta po 5 minuta u PBS Tween 20 kupki. Rezovi su zatim

inkubirani u sekundarnom biotiniliranom anti-rabbit IgG protutijelu jedan sat na sobnoj temperaturi i potom ispirani 3 puta po 5 minuta u PBS Tween 20 kupki.

Nakon tretmana sa sekundarnim protutijelom rezovi su izloženi Vectastain ABC-AP reagensu (Vector) na razrijeđenju 1 na 100 u PBS-u 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon daljnjeg ispiranja u PBS-u, vizualizacija je učinjena pomoću inkubacije rezova 40 minuta u mraku u supstratu ImmPACT Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Vector Laboratories). Nakon provjere intenziteta bojanja, rezovi su isprani u vodi.

Na kraju su svi rezovi uronjeni 1 minutu u hematoksilin radi boljeg prikaza stanica i jezgara i dehidrirani u uzlaznom nizu alkohola. Ksilen je iskorišten za bistenje rezova prije montiranja u BioMount.

U ovom istraživanju su korištena pozitivna (tkivo mišjih testisa) i negativna (tkivo mišjih pluća) kontrola. Izražaj AR je detektiran i kvalitativno analiziran na mikroskopu Nikon Eclipse E200.

Protokol za imunohistokemiju na AR:

1. Ksilen 1 (15 min)
2. Ksilen 2 (5 min)
3. 100% alkohol 1 (5 minuta)
4. 100% alkohol 2 (5 minuta)
5. 96% alkohol (5 minuta)
6. 70% alkohol (5 minuta)
7. Ispiranje u destiliranoj vodi (5 minuta)
8. „Antigen retrieval“ – kuhanje u citratu
9. Ispiranje u PBS-u 5 minuta
10. Inkubacija s razrijeđenim blocking serumom (3 kapi otopine u 10 ml PBS-a) 20 minuta
11. Uklanjanje viška seruma, PAP pen
12. Inkubacija s primarnim protutijelom (dilucija 1/100) preko noći na 37 °C u vlažnoj komori
13. Ispiranje PBS-om (3 puta po 5 minuta)

14. Inkubacija s razrijeđenim sekundarnim protutijelom 30 minuta (1 kap u 10 ml PBS-a)
15. Ispiranje PBS-om (3 puta po 5 minuta)
16. Inkubacija u Vectastain ABC-AP reagensu 30 minuta
17. Ispiranje PBS-om (3 puta po 5 minuta)
18. Inkubacija u supstratu Immimpact Vector Red 30 minuta, u mraku
19. Ispiranje PBSom 5 minuta
20. Ispiranje destiliranom vodom
21. Pozadinsko bojanje (engl. *counterstaining*) u Mayerovom hematoksilinu (1 minuta)
22. Ispiranje u destiliranoj vodi
23. Pokrivanje medijem za montiranje i pokrovnim stakalcem

4.2.4. Statistička obrada podataka

Statistička značajnost razlike između tri skupine analizirana je ANOVA testom, dok je razlika u srednjoj duljini odvodnih kanala analizirana Kruskal-Wallisovim testom. Podaci dobiveni istraživanjem su statistički analizirani pomoću GraphPad softverskog programa (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

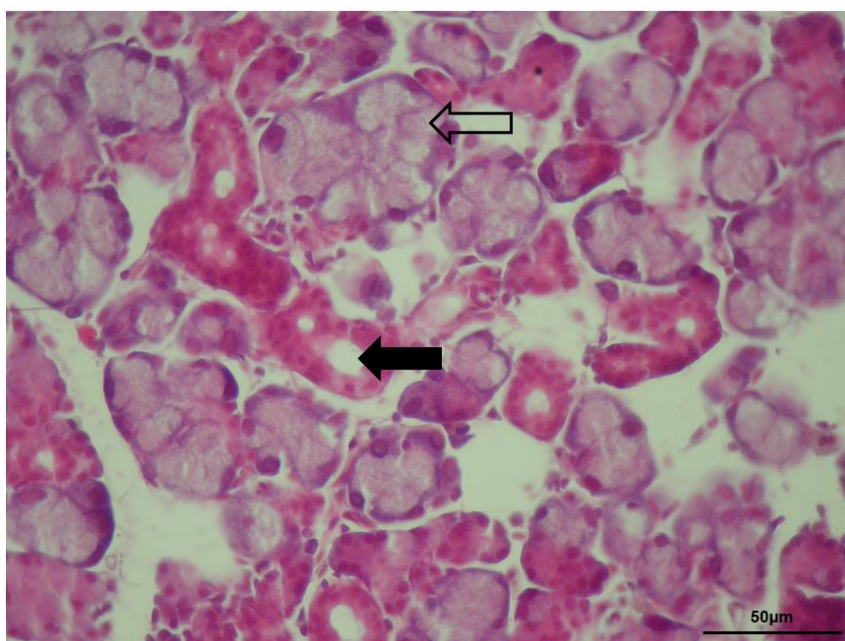
5. REZULTATI

5.1. KVALITATIVNA HISTOLOŠKA ANALIZA SUZNIH ŽLIJEZDA

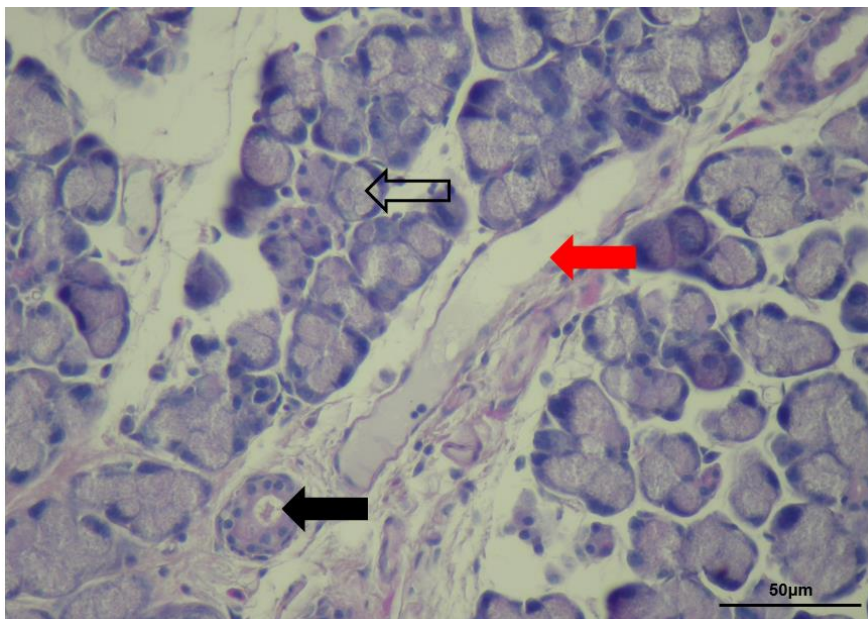
Kvalitativna analiza histoloških preparata i fotografiranje su učinjeni na svjetlosnim mikroskopima Nikon Eclipse E200 i Olympus Bx61.

Rezove parafinskih blokova debljine 5 μm smo obojali na četiri načina. Prvo bojanje koje smo učinili za prikaz jezgre i citoplazme stanica je bojanje hemalaun-eozinom (H&E) (sl. 29). Zatim smo preparate obojali histokemijskom PAS metodom (engl. *periodic acid-Shiff reaction*) (sl. 30), modificiranom trikromnom metodom po Massonu (sl. 31) i trikromnim bojanjem po Azanu (sl. 32).

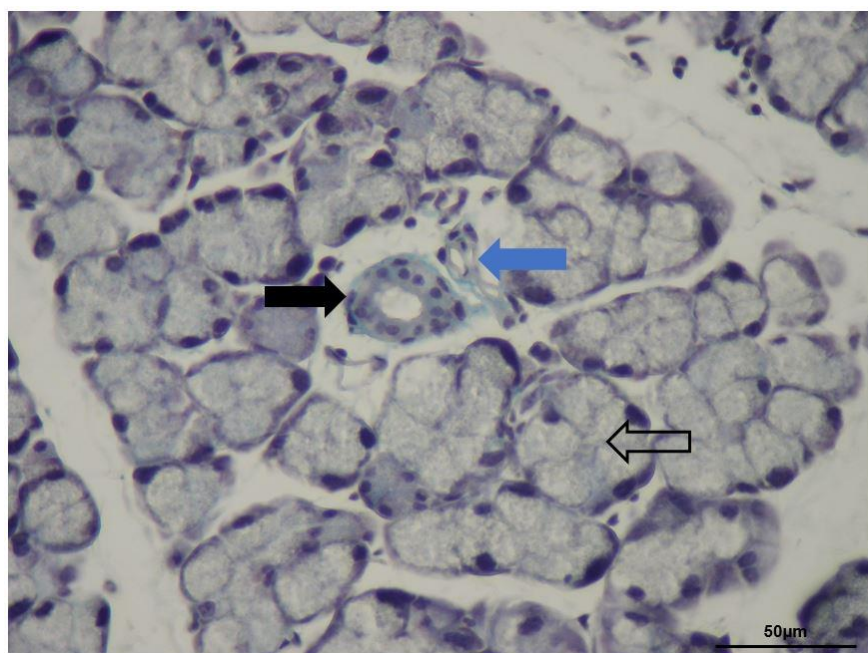
PAS metodu smo koristili za prikaz granula u citoplazmi stanica acinusa, dok smo bojenje po Azanu i modificiranu metodu po Massonu koristili za identifikaciju kolagenih vlakana u vezivnom tkivu suzne žlijezde. Kao što se vidi na slikama, acinusi i odvodni kanali se dobro prikazuju na preparatima bojanim svim navedenim metodama.



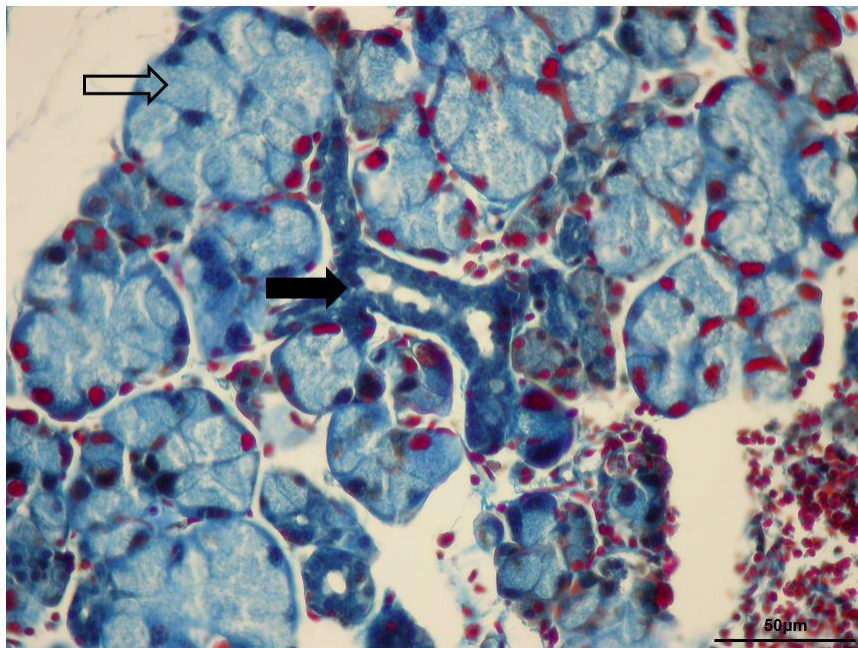
Slika 29. Preparat izvanorbitalne suzne žlijezde obojan hemalaun-eozinom (H-E). Prazna strelica označava acinus, a crna strelica intralobularne odvodne kanale. (Opažanje na povećanju 40x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 50 μm)



Slika 30. Preparat izvanorbitalne suzne žlijezde obojan PAS metodom. Prazna strelica označava acinus, crna strelica odvodni kanal, a crvena strelica venu u interlobularnom vezivu. (Opažanje na povećanju 40x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 50μm)



Slika 31. Preparat izvanorbitalne suzne žlijezde obojan metodom po Massonu. Prazna strelica označava acinus, crna strelica intralobularni odvodni kanal, a plava strelica kolagena vlakna u vezivu. (Opažanje na povećanju 40x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 50μm)



Slika 32. Preparat izvanorbitalne suzne žlijezde obojan po Azanu. Prazna strelica označava acinus, crna strelica intralobularni odvodni kanal. (Opažanje na povećanju 40x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 50μm)

Izvanorbitalna suzna žlijezda mužjaka i ženki Sf-1KO miševa sastoji se od više režnjeva koji su međusobno povezani vezivnim tkivom, a u njemu se nalaze krvne i limfne žile, živčana vlakna i pravi odvodni kanali koji prema hilusu žlijezde postaju sve veći. Vezivno tkivo postupno prelazi u ovojnicu žlijezde i potpuno je okružuje u obliku čahure.

Svaki režanj žlijezde (lobus) građen je od većeg broja režnjića (lobulusa) (sl. 33). Režnjići su građeni od seroznih acinusa, intralobularnih odvodnih kanala i rahlog vezivnog tkiva. U intralobularnom i interlobularnom rahlom vezivu, koje se osobito dobro prikazuje bojenjem modificiranom metodom po Massonu, nalazimo stanice vezivnog tkiva - fibroците, limfocite, mastocite, makrofage (sl. 34), te krvne kapilare (sl. 35) i živčane okrajine koje su uklopljene u izvanstanični matriks.

Acinusi su građeni od stanica piramidnog oblika koje imaju široku bazu i užu apikalni dio (sl. 36). Jezgre stanica se nalaze bliže bazalnom dijelu te su većinom okrugle do ovalne. Kromatin u jezgri je većinom rahli uz rubna zgusnuća. U jezgri se pri većem povećanju mogu ponekad primijetiti jedna ili više jezgrića.

Na mnogo preparata smo uočili polimorfizam jezgara stanica acinusa, kao i kariomegaliju (sl. 37 i 38).

Lumen samog acinusa i početnog dijela odvodnih kanala je obično slabije vidljiv zbog gustog rasporeda stanica acinusa. Citoplazma acinusnih stanica je obilna i bazofilna, s bazalnim bolje obojenim dijelom i apikalnim svijetlijim dijelom u kojem se nalaze brojna sekretna zrnca (sl. 38 i 39). Sekretna zrnca su u nekih stanica gušća i tamnije obojana, dok su kod nekih stanica rjeđa, svijetlija i gotovo prozirna. Stanice acinusa su stoga podijeljene na „svijetle“ i „tamne“. Stanice koje sadrže „nezrela“ sekretna zrnca u kojima je dosta vode su svijetlije. Gubitkom vode zrnca postaju „zrela“ i egzocitozom izlaze van iz stanice.

Ponekad svjetlosnim mikroskopom možemo uočiti izdužene stanice koje su smještene oko samih acinusa i početnog dijela prijelaznih cijevi. To su mioepitelne stanice (sl. 40). Na rezovima uglavnom vidimo njihovu izduženu citoplazmu, dok se izdužena jezgra nešto rjeđe može naći na rezovima.

Prijelazne cijevi (sl. 41, 42 i 43) čine početni dio odvodnog sustava žlijezde i povezuju lumen acinusa s lumenom intralobularnih odvodnih kanala. Proksimalni dio prijelaznih cijevi sastoji se od stanica koje su izgledom slične stanicama acinusa, a na bazalnom dijelu stanica nalazimo mioepitelne stanice. Distalnije prema intralobularnom kanalu stanice postaju niže i sploštenije i više ne nalazimo mioepitelne stanice.

Prijelazne cijevi se nastavljaju u intralobularne odvodne kanale unutar režnjića i interlobularne kanale koji se nalaze između režnjića (sl. 44 i 45). Oni se pak spajaju u jedan intralobarni kanal koji skuplja sekret iz jednog režnja (sl. 46). Više intralobarnih kanala ujedinjuje se u interlobarni kanal koji odvodi sekret žlijezde kroz njen hilus na površinu oka. Interlobarni kanali su obavijeni gušćim vezivnim tkivom. U području hilusa se ponekad u njima može vidjeti prijelaz između jednoslojnog cilindričnog u višeslojni epitel, te neravni, naborani epitel koji lumen čini manje vidljivim.

U vezivnom tkivu oko interlobarnih odvodnih kanala mogu se, kao i u drugom vezivu žlijezde, osim uobičajenih fibrocita i fibroblasta vidjeti i druge stanice, uglavnom stanice imunološkog sustava. Grananjem sustava odvodnih kanala uočavamo da epitel odvodnih kanala raste od kubičnog do cilindričnog te

da je svaki slijedeći dio odvodnog sustava žlijezde obuhvaćen većom količinom vezivnog tkiva i pratećih krvnih žila. Jezgre stanica odvodnih kanala su ovalnog do okruglog oblika smještene većinom u središnjem ili bazalnom dijelu stanice, rahlog kromatina s ponekad vidljivom jezgrićom. Lumen odvodnih kanala je dobro vidljiv.

U preglednom radu o morfologiji i spolnom dimorfizmu suznih žlijezda mužjaka i ženki (181) se navodi da makroskopski gledano u mužjaka nalazimo velike, nepravilne acinuse šireg lumena, dok su u ženki manji, pravilniji i užeg lumena. Citoplazma acinusnih stanica mužjaka je "mrljasta", zrnata i bazofilnija. U ženki je citoplazma svjetlija i manje strukturirana, uz jaču bazofiliju oko jezgre koja blijedi prema periferiji. Jezgra acinusnih stanica je u mužjaka centralno smještena, uz izražen polimorfizam, poliploidiju i obično jasno vidljivu jezgriću. Kod ženki nalazimo bazalno smještenu jezgru, koja je obično pravilnija po veličini i obliku. U radu je navedeno da su granice među stanicama acinusa u mužjaka slabije vidljive, dok su u ženki konture acinusnih stanica jasne.

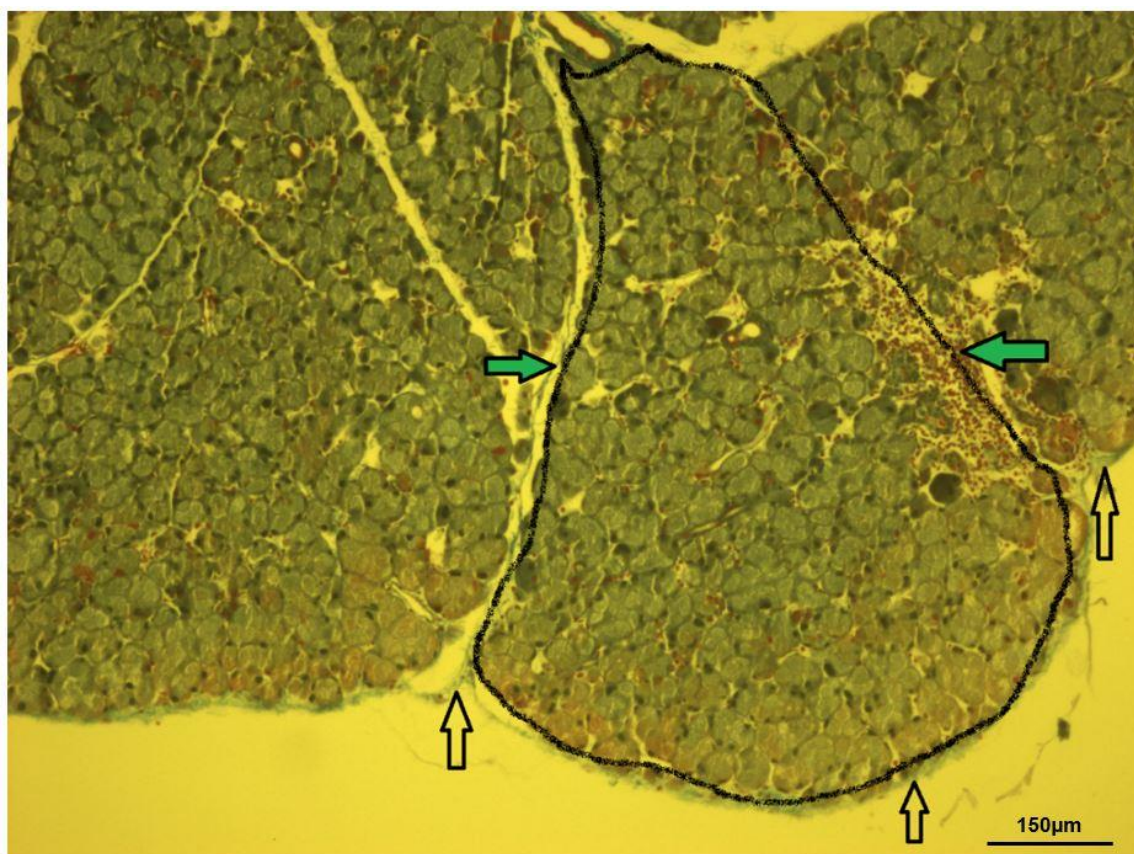
Pažljivim promatranjem histoloških preparata prilikom kvalitativne analize mi te razlike nismo mogli uočiti, tj. gledanjem preparata kroz mikroskop nema razlike između muške i ženske suzne žlijezde niti se može odrediti koja žlijezda pripada *Sf-1* KO mužjaka, a koja ženki.

Iako *Sf-1* KO miševi prilikom žrtvovanja nisu bili stari, tijekom kvalitativne analize naših histoloških preparata smo pronašli promjene u morfologiji žlijezde koje se obično nalaze kod starih životinja, osobito mužjaka. Te promjene smo pronašli u sve tri grupe transgeničnih miševa – i u ženki, i mužjaka sa i bez supstitucijskom terapijom testosteron propionatom. Našli smo područja promijenjenih režnjića zbog atrofije i destrukcije acinusa (sl. 47) i nakupljanje odvodnih kanala u žlijezdi („duktularizacija“) (sl. 48). Uočili smo displaziju, citomegaliju, te morfološke promjene jezgara stanica acinusa - kariomegaliju i polimorfizam (sl. 37 i 38).

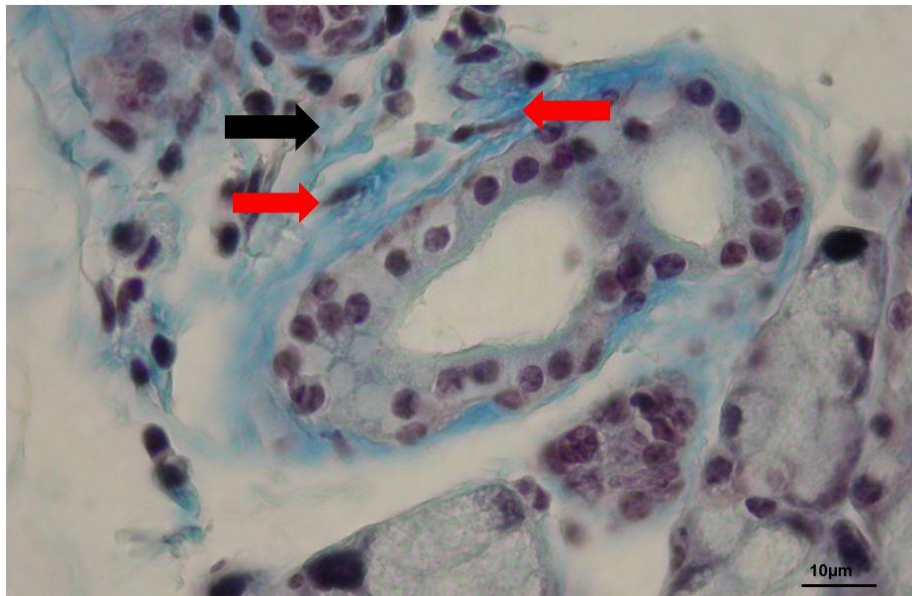
Također, neki acinusi su imali jako izražen lumen radi snižene visine stranica koje su poprimile kubični, ili gotovo pločasti oblik – za strukture smo koristili naziv „pseudofolikuli“ korišten u istraživanju Ježeka (184) (sl. 49).

Na većini preparata u sve tri grupe smo uočili masivnu limfocitnu infiltraciju

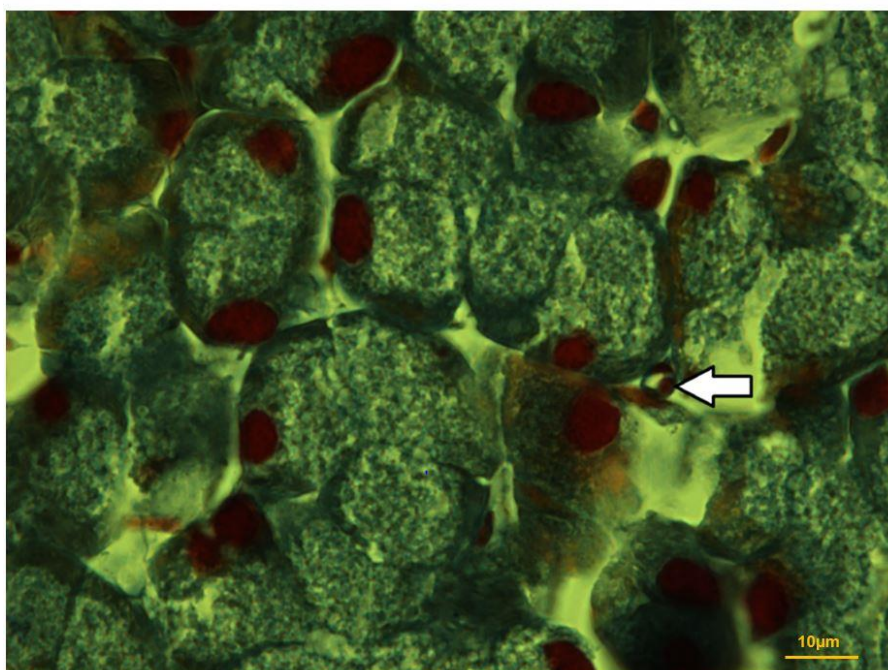
veziva oko interlobularnih odvodnih kanala (sl. 50 i 51). Na dosta preparata smo također uočili prodor limfocita u tkivo režnjića, limfocitnu infiltraciju oko acinusa te destrukciju acinusa te značajno oštećenje strukture suzne žlijezde kao posljedicu upalnog djelovanja stanica imunološkog sustava (sl. 47, 52. i 53).



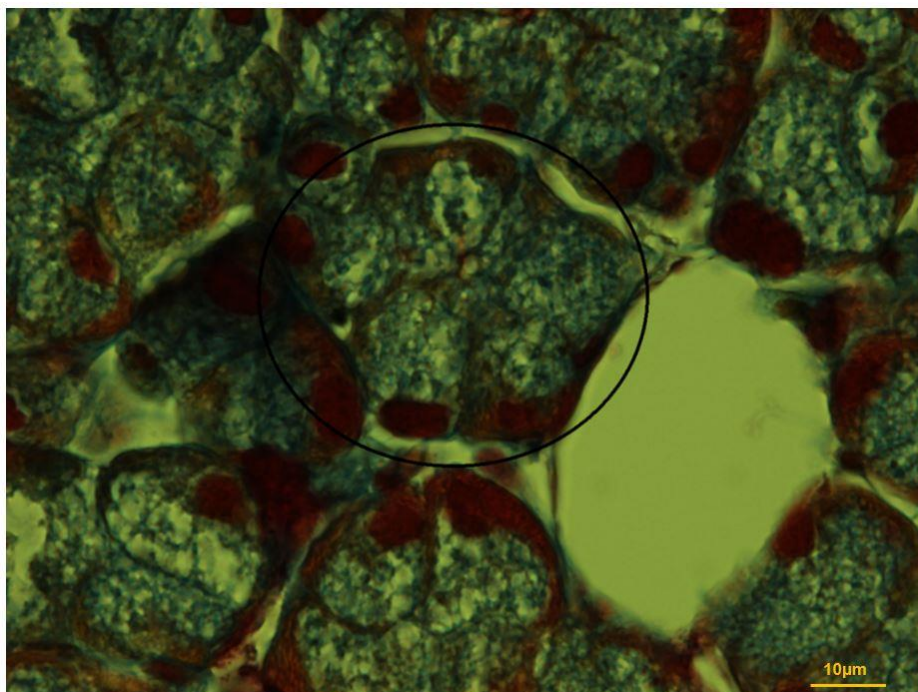
Slika 33. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Azanu crna linija označava granicu režnjića, plave strelice interlobularno vezivno tkivo, a prazne strelice čahuru.
(Opažanje na povećanju 10x, Olympus Bx61, mjerilo 150 μm)



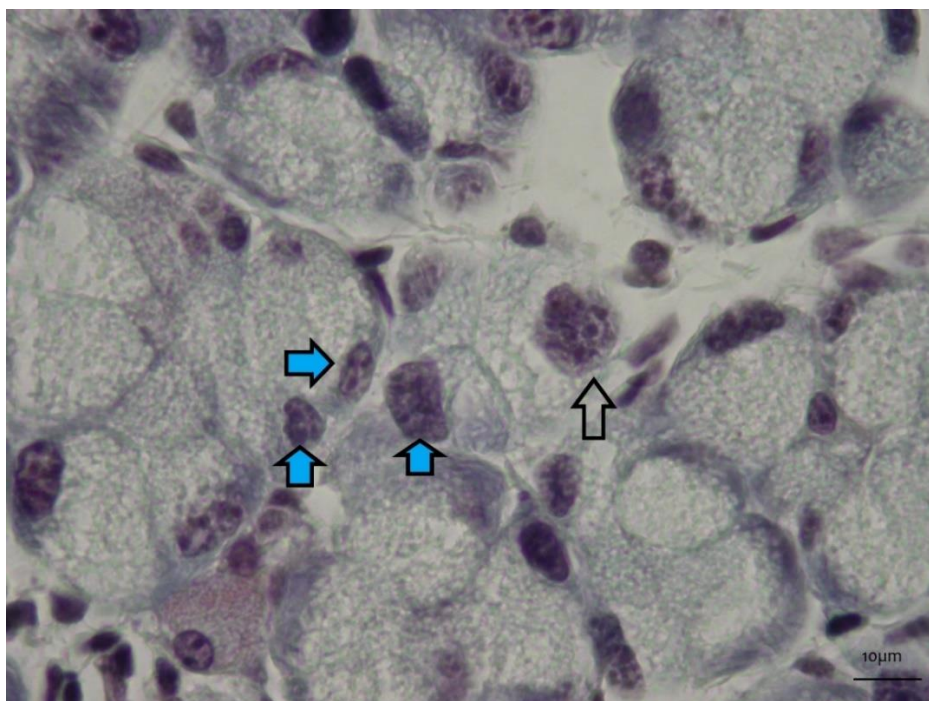
Slika 34. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Massonu crna strelica označava interlobularno vezivo i stanice vezivnog tkiva. Crvene strelice označavaju izdužene jezgre koje vjerojatno pripadaju fibrocitima. (Opažanje na povećanju 100x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 10 µm)



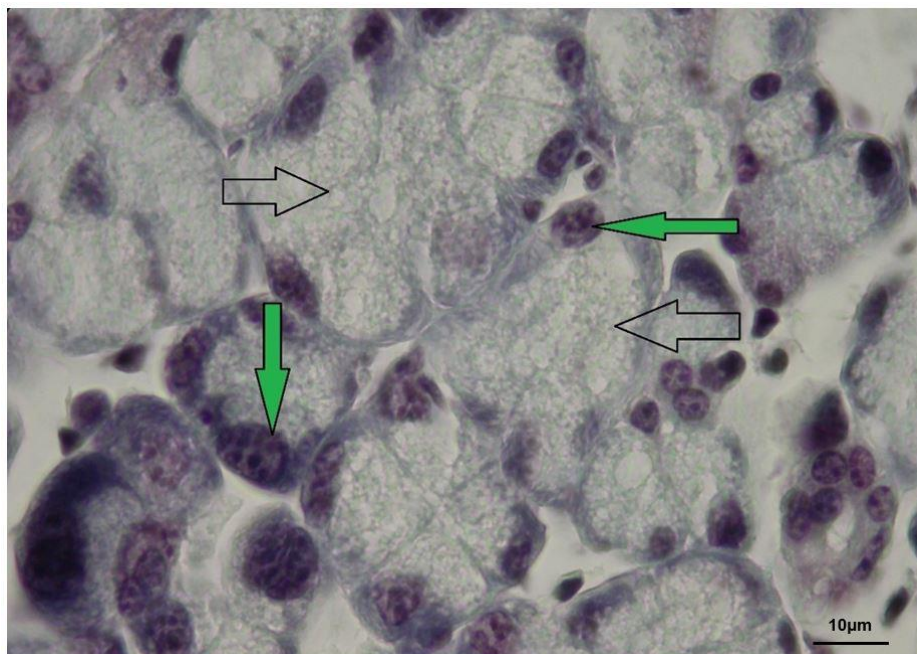
Slika 35. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Azanu bijela strelica označava krvnu kapilaru u režnjiću. (Opažanje na povećanju 100x, Olympus Bx61, mjerilo 10 µm)



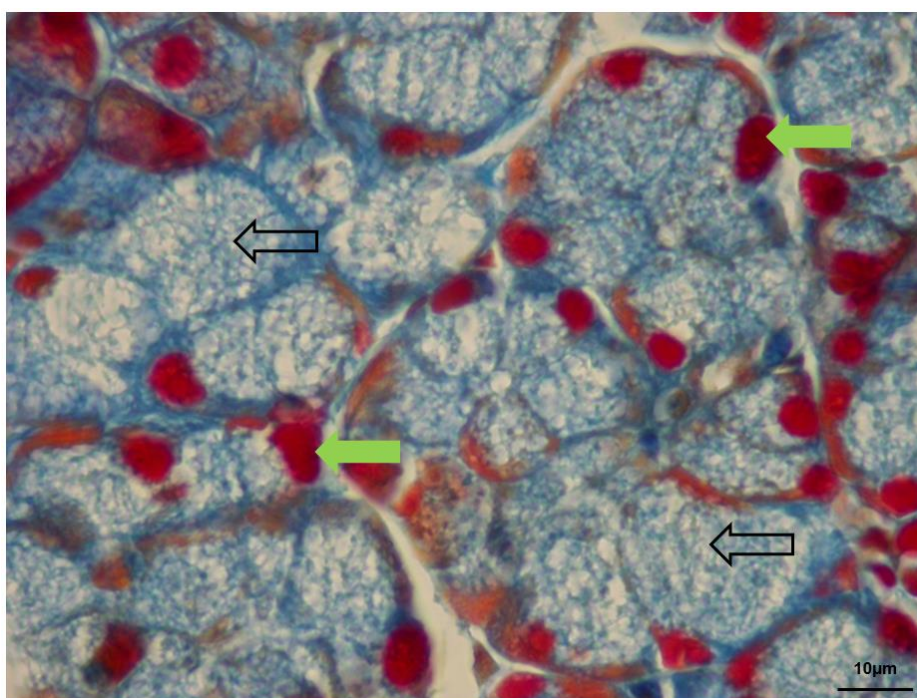
Slika 36. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Azanu u kružnici je označen acinus suzne žlijezde s jasno vidljivim lumenom u središtu. (Opažanje na povećanju 100x, Olympus Bx61, mjerilo 10 μ m)



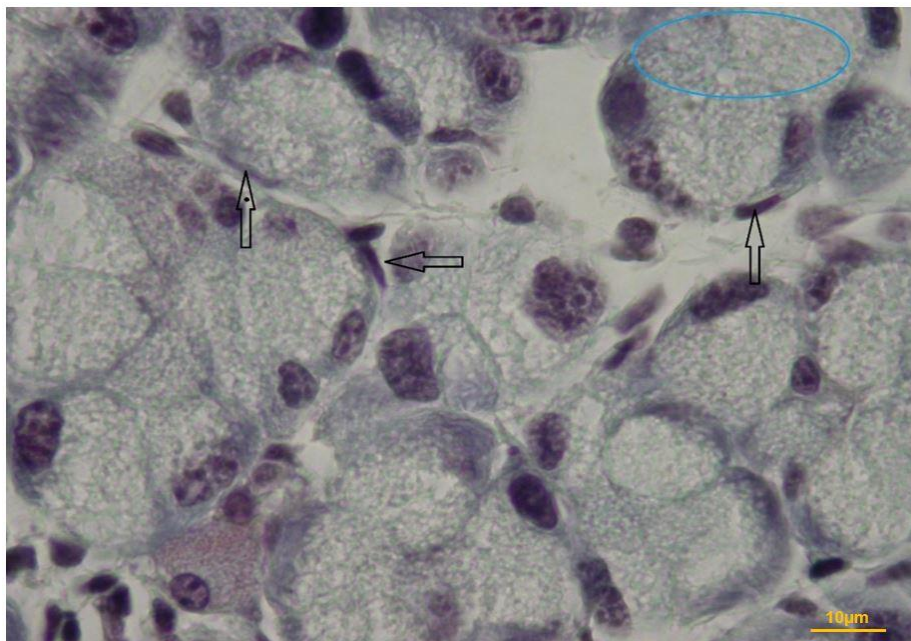
Slika 37. Polimorfizam jezgara acinusnih stanica (plave strelice) i kariomegalija (prazna strelica) na rezu tkiva izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Massonu. (Opažanje na povećanju 100x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 10 μ m)



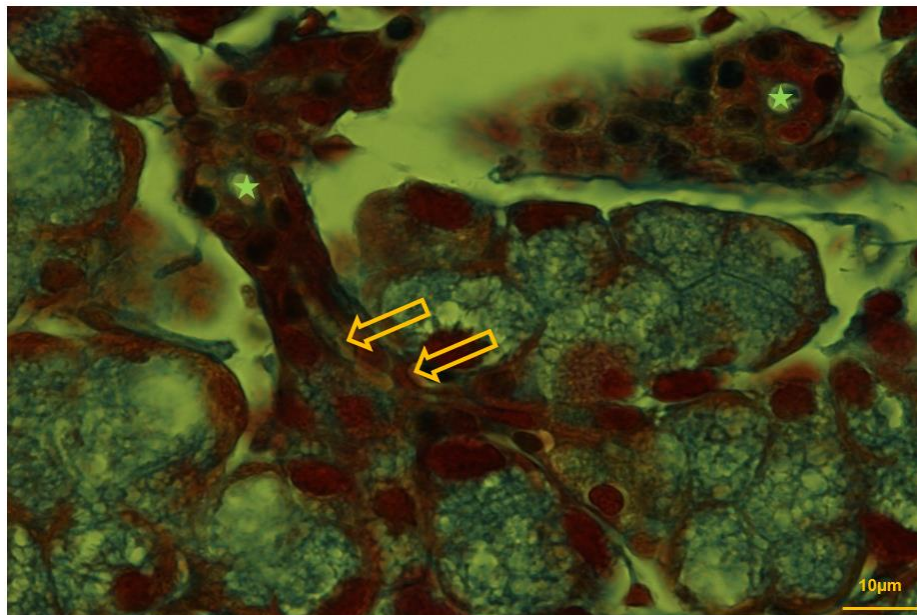
Slika 38. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Massonu zelene strelice označavaju jezgre, a prazne strelice citoplazmu acinusih stanica ispunjenu sekretnim zrcima. (Opažanje na povećanju 100x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 10μm)



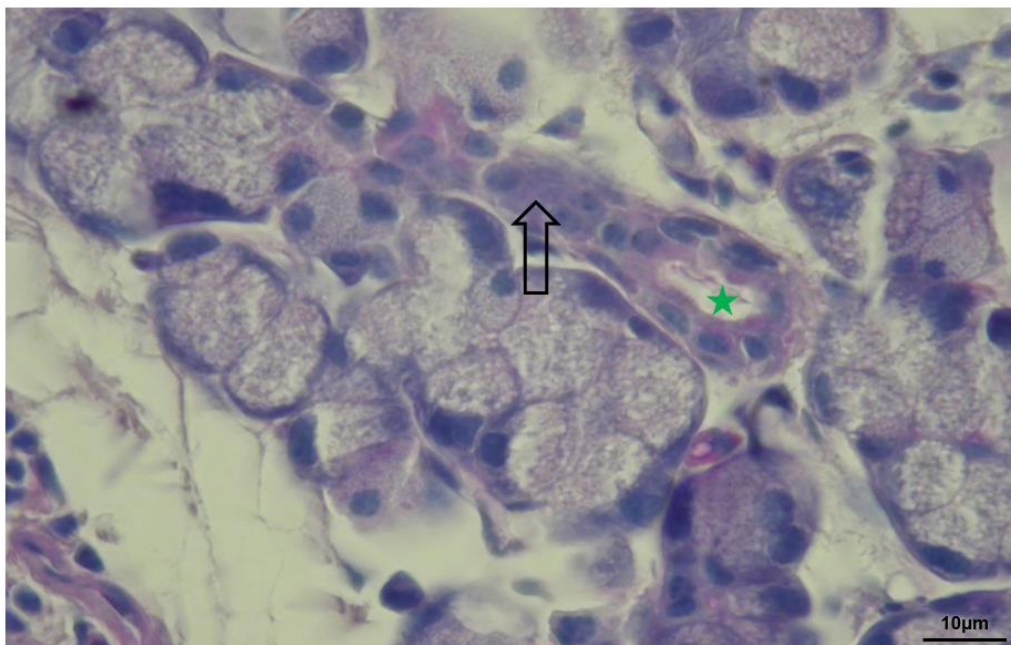
Slika 39. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Azanu zelene strelice označavaju jezgre, a prazne strelice citoplazme acinusih stanica ispunjene sekretnim zrcima. (Opažanje na povećanju 100x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 10μm)



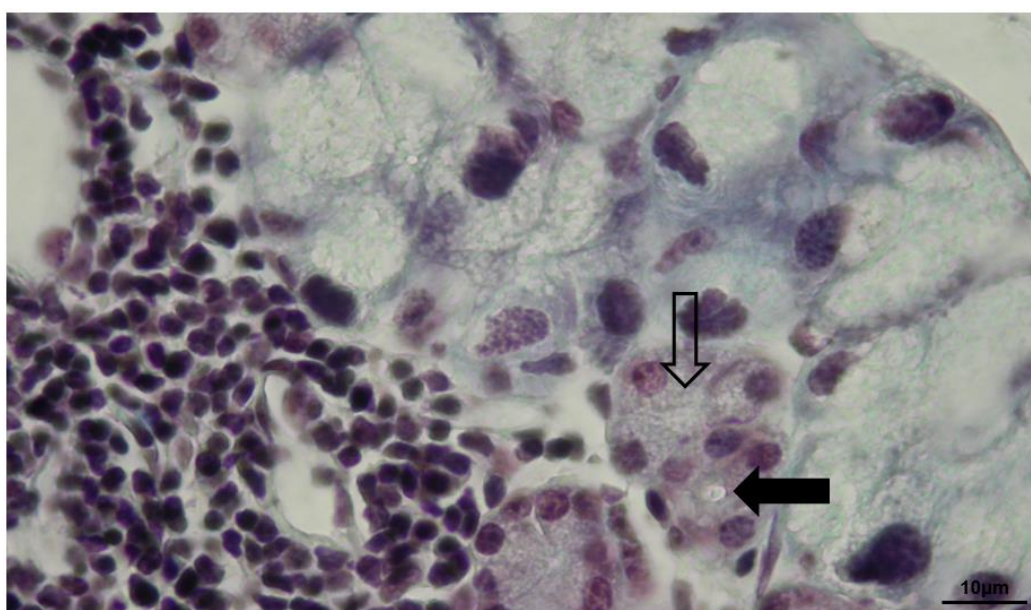
Slika 40. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Massonu prazne strelice označavaju jezgre mioepitelnih stanica. Lumen jednog acinusa i apikalni dio acinusih stanica je označen plavim ovalom. (Opažanje na povećanju 100x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 10 μm)



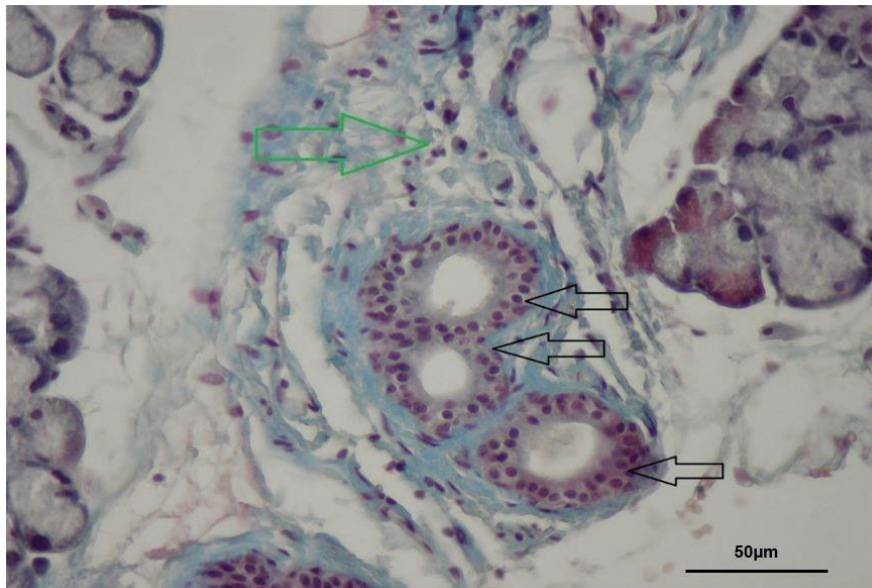
Slika 41. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Azanu žute strelice označavaju prijelaznu cijev, a zelene zvjezdice lumene intralobularnih odvodnih kanala. (Opažanje na povećanju 100x, Olympus Bx61, mjerilo 10 μm)



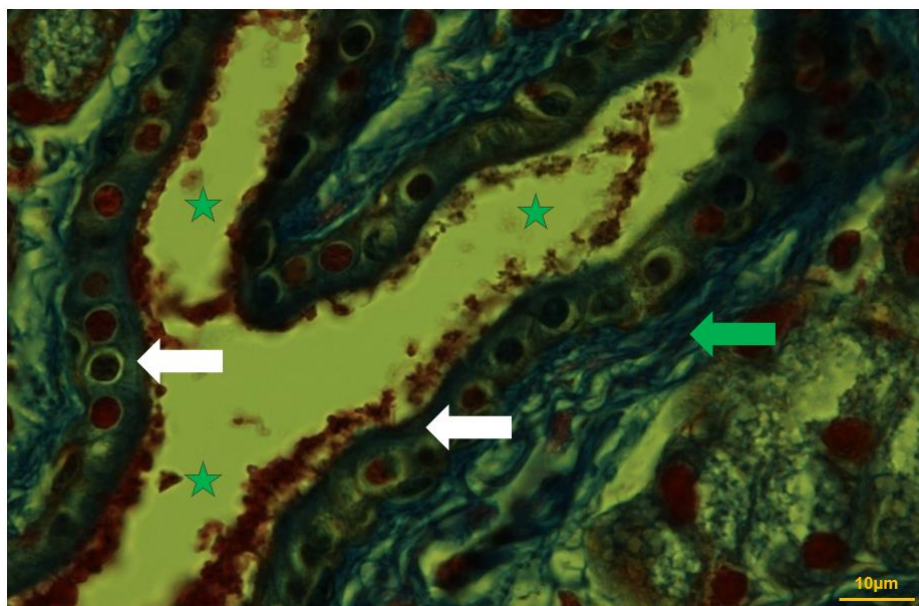
Slika 42. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane PAS metodom strelica označava uzdužni presjek kroz prijelaznu cijev, a zelena zvjezdica lumen intralobularnog odvodnog kanala. (Opažanje na povećanju 100x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 10 μm)



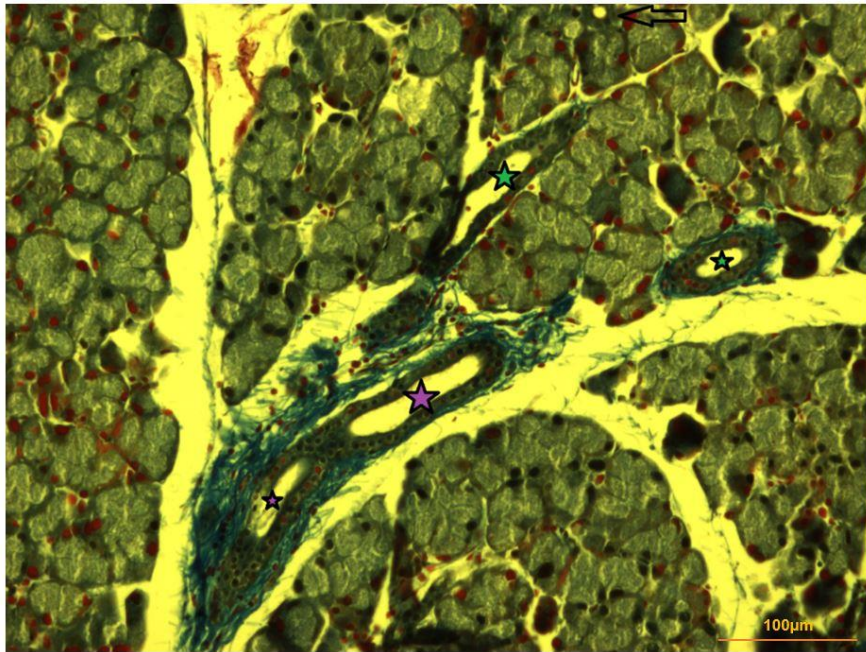
Slika 43. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Massonu prazna strelica označava poprečni presjek kroz prijelaznu cijev. Crna strelica označava poprečni presjek kroz intralobularni odvodni kanal. (Opažanje na povećanju 100x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 10 μm)



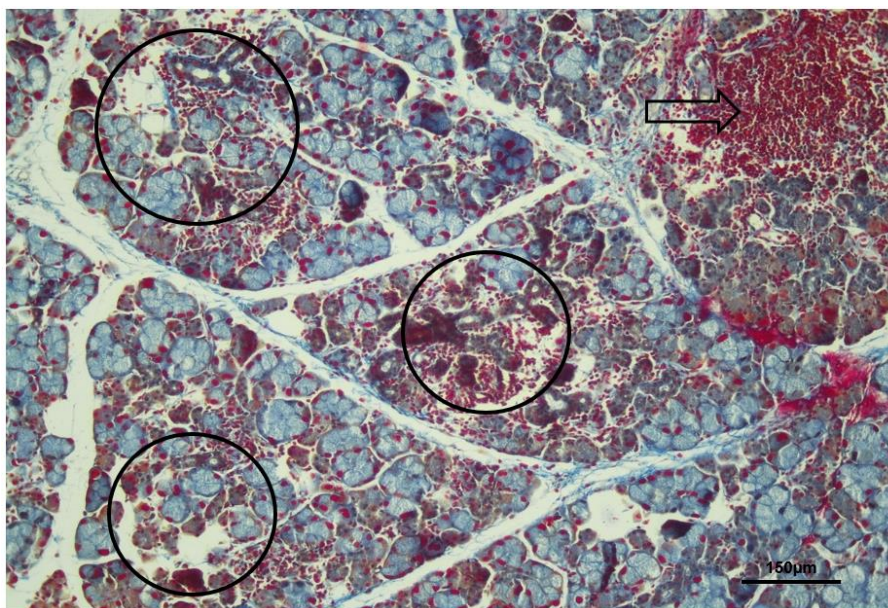
Slika 44. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Massonu crne strelice označavaju interlobularne ili prave odvodne kanale smještene u interlobularnom vezivu koje je označeno zelenom strelicom. (Opažanje na povećanju 40x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 50 μm)



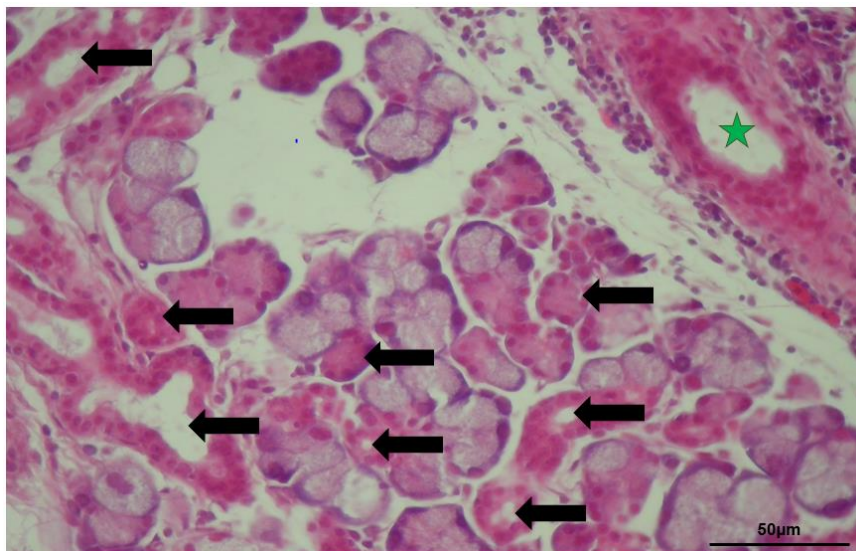
Slika 45. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Azanu bijele strelice označavaju kubični epitel interlobularnih ili pravih odvodnih kanala smještenih u interlobularnom vezivu koje je označeno zelenom strelicom. Lumen pravih odvodnih kanala je označen zelenim zvjezdicama. (Opažanje na povećanju 100x, Olympus Bx61, mjerilo 10 μm)



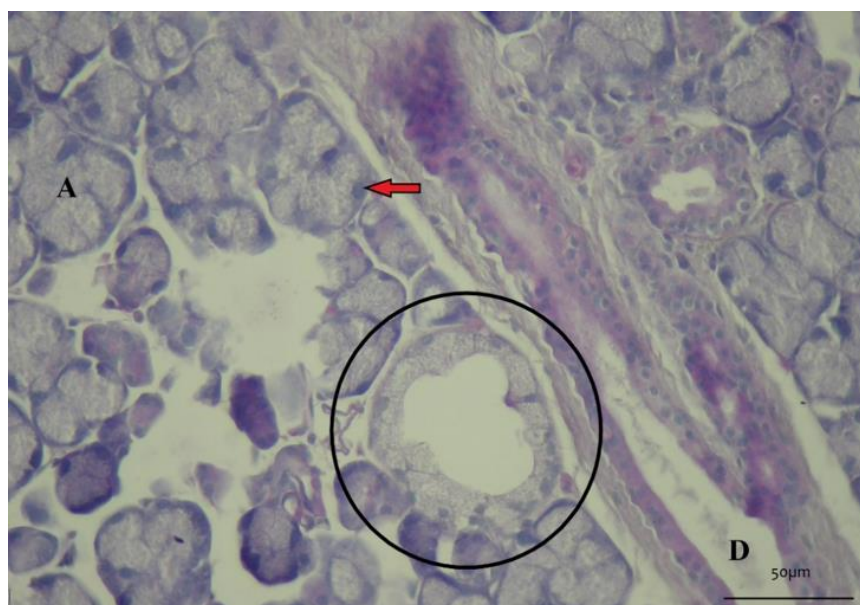
Slika 46. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Azanu zelene zvjezdice označavaju lumen interlobularnih, a ljubičaste zvjezdice lumen intralobarnih odvodnih kanala. (Opažanje na povećanju 20x, Olympus Bx61, mjerilo 100 μm)



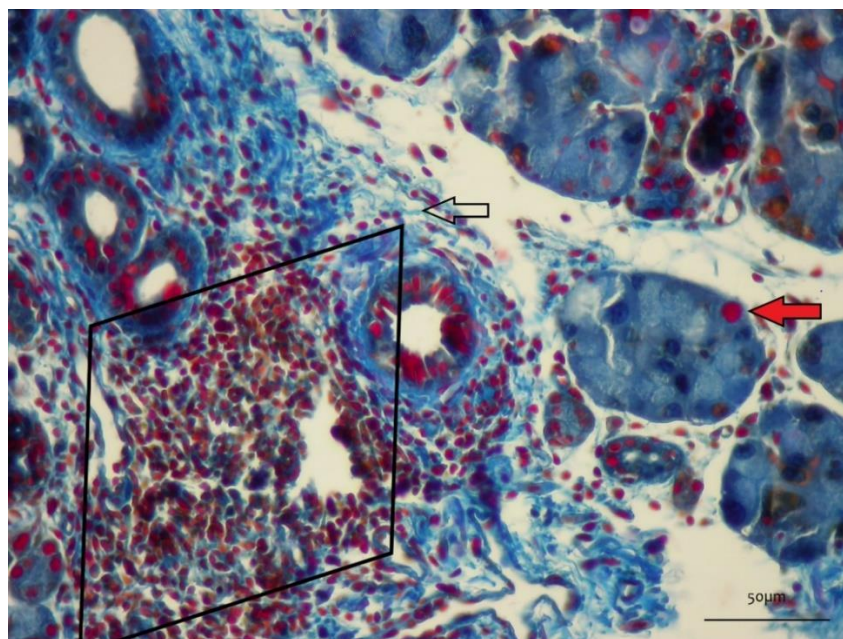
Slika 47. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Azanu crnim krugovima su označena područja smanjenja i destrukcije režnjića te limfocitna infiltracija. U gornjem desnom kutu je praznom strelicom označena masivna infiltracija tkiva suzne žlijezde limfocitima. (Opažanje na povećanju 10x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 150 μm)



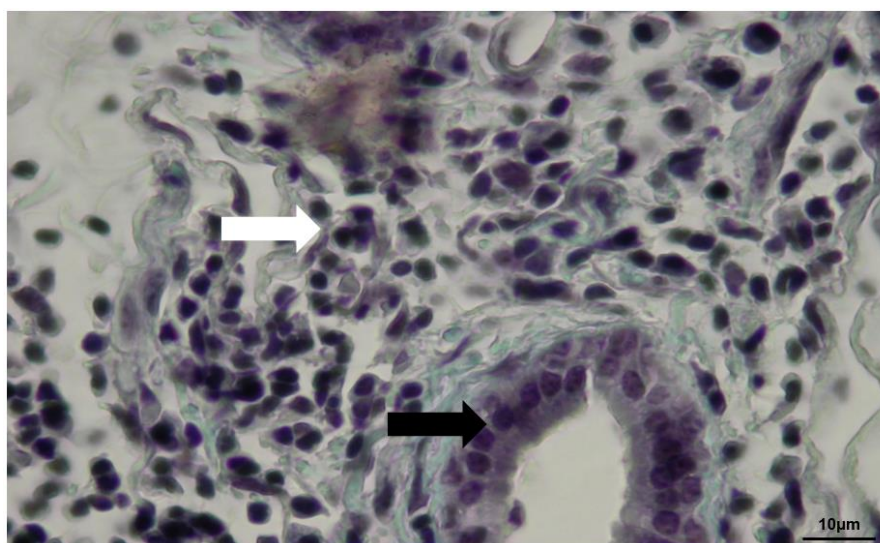
Slika 48. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane H-E crnim strelicama je označeno nakupljanje odvodnih kanala u režnjiću („duktularizacija“). U gornjem desnom kutu zelenom zvjezdicom označen je interlobularni odvodni kanal. (Opažanje na povećanju 40x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 50 μm)



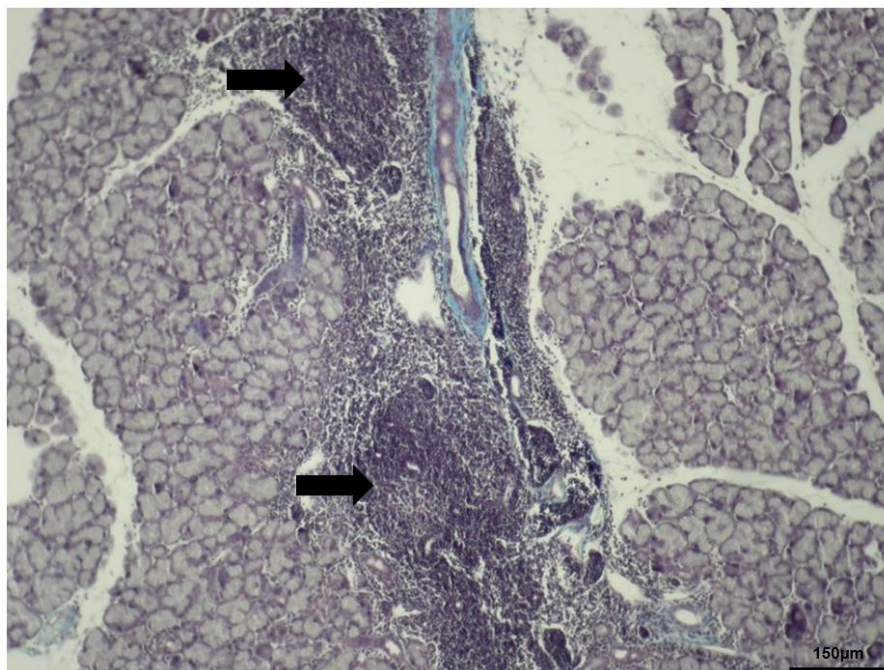
Slika 49. „Pseudofolikul“ označen u krugu na rezu tkiva suzne žlijezde obojane PAS metodom. Jezgra acinusne stanice je označena crvenom strelicom, jedan do acinusa slovom A, a uzdužni presjek jednog intralobularnog odvodnog kanala slovom D. (Opažanje na povećanju 40x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 50 μm)



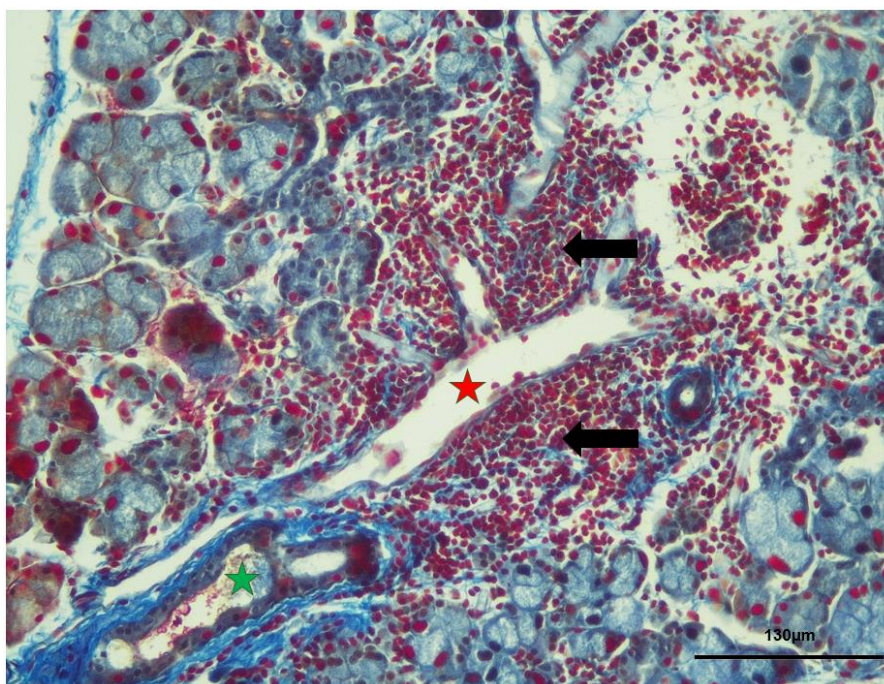
Slika 50. Limfocitna infiltracija u periduktalno tkivo u rombu na rezu suzne žlijezde obojane metodom po Azanu. Prazna strelica označava kolagena vlakna u vezivu, crvena strelica jezgru acinusne stanice. (Opažanje pri povećanju 40x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 50 μm)



Slika 51. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Massonu u središtu preparata je bijelom strelicom označena limfocitna infiltracija u interlobularnom vezivu. Crna strelica označava pravi odvodni kanal koji je obložen jednoslojnim cilindričnim epitelom. (Opažanje na povećanju 100x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 10 μm)



Slika 52. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Massonu u središtu preparata je strelicama označena limfocitna infiltracija oko pravih odvodnih kanala. (Opažanje na povećanju 10x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 150 μm)



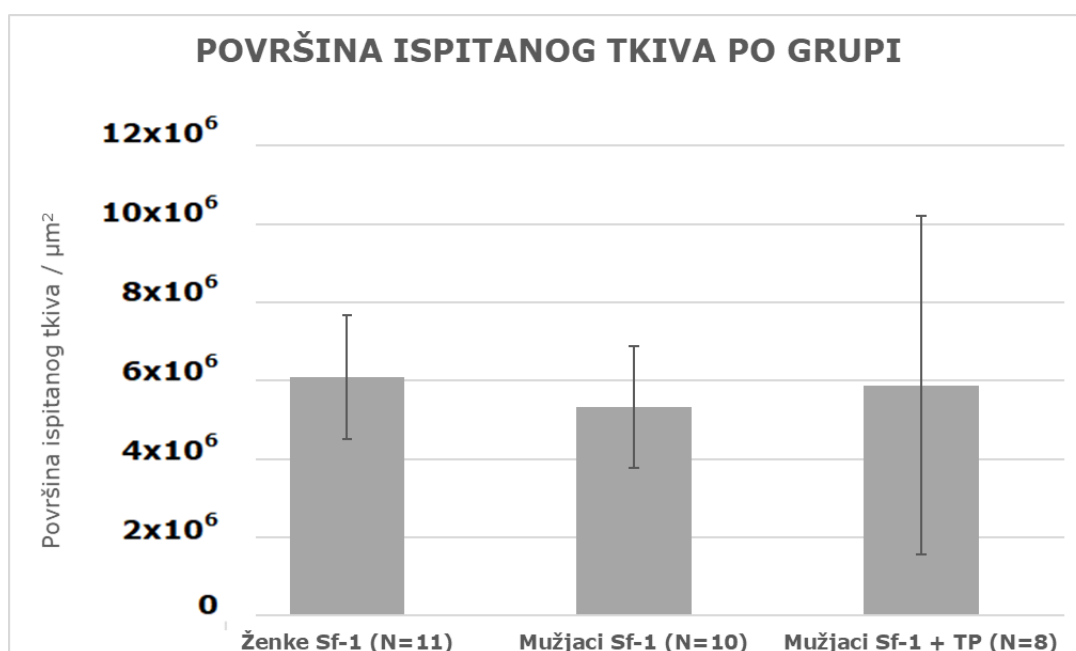
Slika 53. Na preparatu izvanorbitalne suzne žlijezde obojane metodom po Azanu u središtu preparata je strelicama označena limfocitna infiltracija oko uzdužnog presjeka interlobularne vene koja se grana. Lumen vene je označen crvenom, a lumen pravog odvodnog kanala zelenom zvjezdicom. (Opažanje na povećanju 20x, Nikon Eclipse E200, mjerilo 130 μm)

5.2. KVANTITATIVNA HISTOLOŠKA ANALIZA SUZNIH ŽLIJEZDA SF-1 KO MIŠEVA

5.2.1. Stereološka analiza građevnih elemenata suznih žlijezda

Stereološkom analizom smo proveli procjenu trodimenzionalne građevnih elemenata suznih žlijezda iz dvodimenzionalnih presjeka.

U našem istraživanju smo koristili tkivo 29 izvanorbitalnih suznih žlijezda Sf-1 KO miševa (tbl.1). Cijela žlijezda je serijski izrezana. Koristili smo svaki deseti rez da bi bili sigurni da u brojanju ne koristimo isti acinus. Cijela žlijezda je markirana i konturirana na povećanju 4x, dok je analiza učinjena na povećanju objektiva 40x. Označeni rez je uzorkovan po SURS principu (*Systematic Uniform Random Sampling*). „Area fraction/fractionator“ program (dio softvera Stereo Investigator 10) je korišten za procjenu postotka tkiva koje je zauzeto acinusima, vodovima ili vezivnim tkivom. Cjelokupna ispitana površina tkiva po grupama je prikazana u grafikonu na slici 54.



Slika 54. Grafikon pokazuje totalnu površinu ispitano tkiva izvanorbitalne suzne žlijezde (μm^2) u 3 grupe životinja: ženki Sf-1, mužjaka Sf-1 i mužjaka Sf-1 TP+

U suznim žlijezdama triju grupa životinja određeni su slijedeći stereološki parametri:

1. volumenska gustoća acinusa (V_{va})
2. volumenska gustoća odvodnih kanalića/kanala (V_{vd})
3. volumenska gustoća vezivnog tkiva (V_{vct})
4. duljinska gustoća intralobularnih odvodnih kanalića (L_{vi})
5. duljinska gustoća pravih odvodih (ekskrecijskih) kanala (L_{ve}).

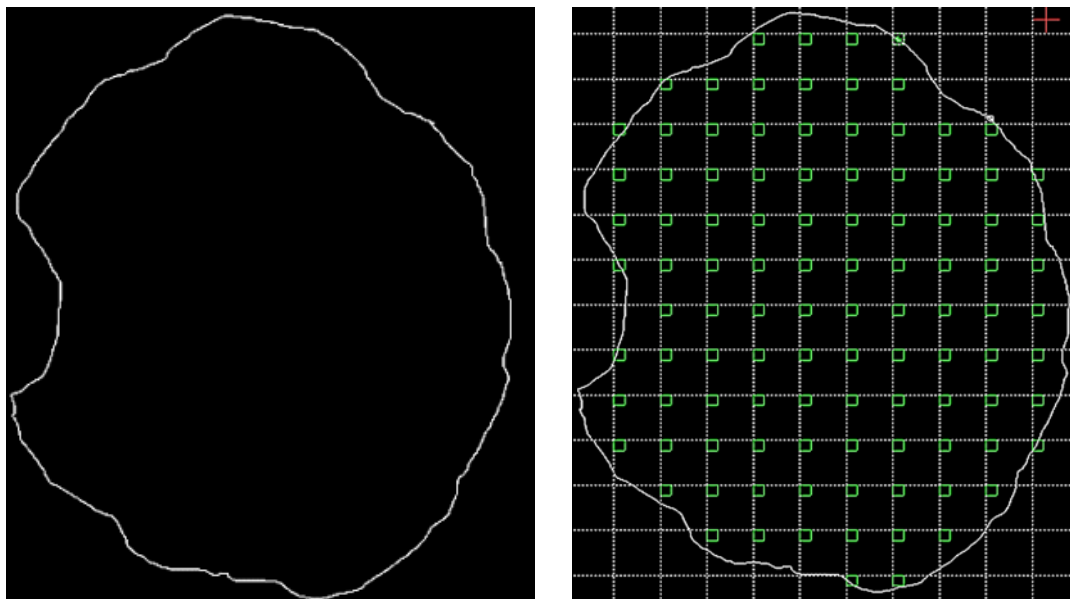
Kvantitativna analiza tkiva suznih žlijezda za sve tri grupe Sf-1 KO miševa je napravljena pomoću mikroskopa Olympus Bx61 i programske podrške za stereološku analizu Stereo Investigator 10 (MBF Bioscience) na Hrvatskom Institutu za istraživanje mozga u Zagrebu.

Na preparatu smo odredili okvir za brojanje (engl. *counting frame*) od 70x70 mikrona, te mrežu za uzorkovanje (engl. *sampling grid*) koja je iznosila 300x300 mikrona. Razmak za koji je sistem automatski pomicao brojač (engl. *grid spacing*) je bio 18 mikrona. Primjer izračuna parametara za preparat broj 62.1-06A je prikazan u tablici 2. Nakon unošenja parametara i ručnog određivanja kontura tkiva na kojem će se vršiti mjerenje, Stereo Investigator je odredio polja u kojim smo vršili mjerenje (engl. *sampling sites*) te je automatski pomicao okvir za brojanje po preparatu (sl. 55). Pomoću pokazivača smo označavali „pogodke“ i registrirali ih različitim ikonama. Za pogodak na acinus izabrali smo ikone bijelog trokuta, za pogodak na odvodni kanal crveni kvadrat, a za pogodak na vezivno tkivo ljubičasti romb (sl. 56, 57 i 58). Kompjuterski softver je na kraju označavanja pogodaka na cijelom preparatu iz dobivenih podataka izračunao ukupnu površinu preparata te postotak volumena koji u njemu čine acinusi, vezivno tkivo i odvodni kanali (sl. 58 i 59).

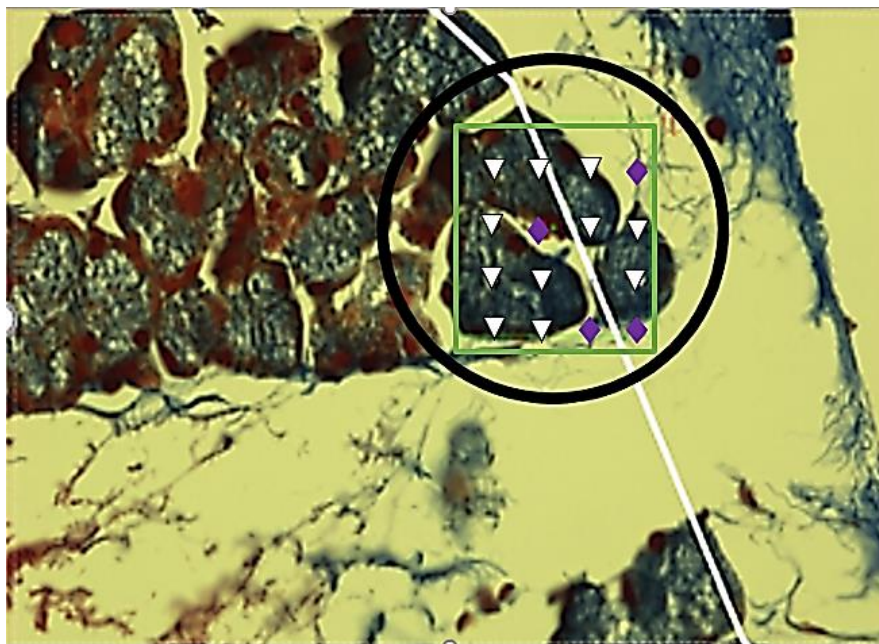
Na tablicama 3, 4 i 5 je prikazan konačni izračun volumenske gustoće acinusa, odvodnih kanala i veziva u ukupnoj površini preparata 62.1-06A koju je kompjuterski sustav izračunao s obzirom na broj pogodaka na cijelom preparatu. Isti postupak je učinjen i za duljinsku gustoću odvodnih kanala, s razlikom da kompjuterski sustav ne može znati radi li se o intralobularnom ili pravom odvodnom kanalu, pa je taj dio brojanja učinjen manualno.

Tablica 2. Primjer određivanja parametara za stereološku analizu za preparat 62.1-06A. Uz okvir za brojanje od 70x70 μm , mrežu za uzorkovanje od 300x300 μm i pomak brojača za 18 μm na ovom preparatu se dobilo 95 mjesta za brojanje (engl sampling sites).

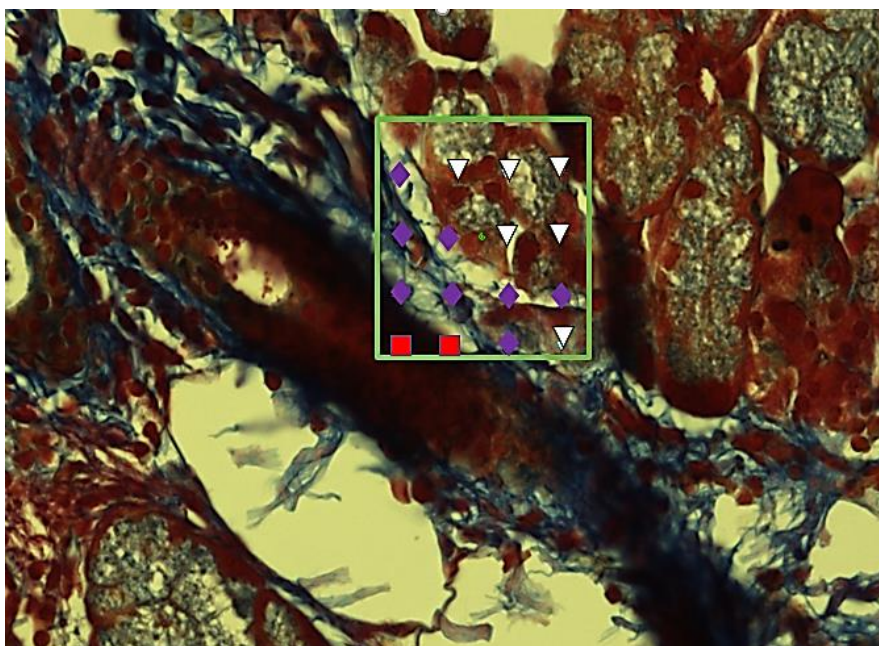
Regija	62.1-06A
Broj polja za mjerenje	95
Površina okvira za brojanje (XY) (μm^2)	4900
Širina okvira za brojanje (X) (μm)	70
Visina okvira za brojanje (Y) (μm)	70
Mreža za uzorkovanje (X) (μm)	300
Mreža za uzorkovanje (Y) (μm)	300
Površina mreže za uzorkovanje (XY) (μm^2)	90000
Pomak brojača (μm)	18



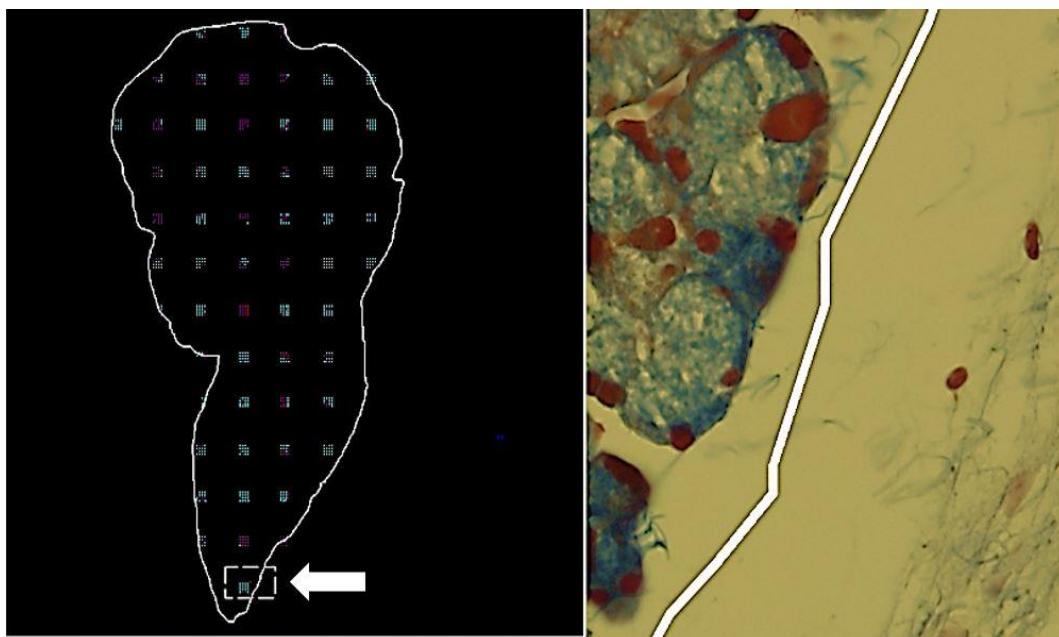
Slika 55. Konturiranje preparata 62.1-06A suzne žlijezde (lijevo) te mreža za uzorkovanje (desno). Zeleni kvadratići na mreži za uzorkovanje označavaju polja u kojim je izvršeno brojanje (engl. sampling sites). (Opažanje na mikroskopu Olympus Bx61 i softveru za stereološku analizu Stereo Investigator 10, MBF Bioscience)



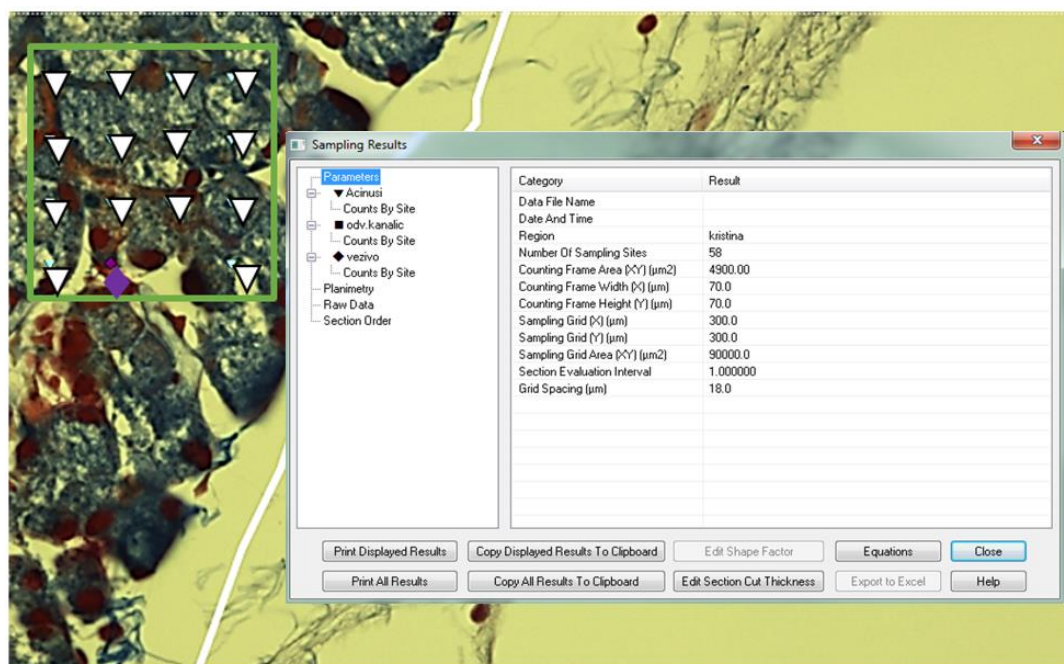
Slika 56. Označavanje „pogodaka“ ikonama. U krugu je označen zeleni okvir za brojanje, „pogodak“ na acinus označen je ikonom bijelog trokuta, a pogodak na vezivo ljubičastim rombom. (Opažanje na mikroskopu Olympus Bx61 i softveru za stereološku analizu Stereo Investigator 10, MBF Bioscience)



Slika 57. Označavanje „pogodaka“ ikonama. U krugu je označen zeleni okvir za brojanje, „pogodak“ na acinus označen je ikonom bijelom trokuta, pogodak na vezivo ljubičastim rombom (Opažanje na mikroskopu Olympus Bx61 i softveru za stereološku analizu Stereo Investigator 10, MBF Bioscience)



Slika 58. Konačan rezultat nakon označavanja „pogodaka“ prikazan je na lijevom dijelu slike, bijelom strelicom je označen jedan okvir za brojanje (Opažanje na mikroskopu Olympus Bx61 i softveru za stereološku analizu Stereo Investigator 10, MBF Bioscience)



Slika 59. Završetak označavanje „pogodaka“ ikonama. U lijevom gornjem kutu slike je vidljiv zadnji okvir za brojanje, a u središtu slike izračun stereoloških podataka (Opažanje na mikroskopu Olympus Bx61 i softveru za stereološku analizu Stereo Investigator 10, MBF Bioscience)

Tablica 3. Postotak površine koju zauzimaju acinusi u ukupnoj površini preparata 62.1-06A označen je žutom bojom.

Acinusi (62.1-06A)	
Kategorija	Rezultati
Svi pogodci na acinuse	868
Svi pogodci na preparatu	1255
Udio površine koju zauzimaju acinusi	0.6916
Pomak brojača (μm)	18
Površina mreža za uzorkovanje (μm^2)	324
Udio uzorkovane površine	0.0544
Procijenjena površina (μm^2)	5165490

Tablica 4. Postotak površine koju zauzimaju odvodni kanalići u ukupnoj površini preparata 62.1-06A označen je žutom bojom.

Odvodni kanalići (62.1-06A)	
Kategorija	Rezultati
Svi pogodci na odvodne kanaliće	33
Svi pogodci na preparatu	1255
Udio površine koju zauzimaju odvodni kanali	0.0263
Pomak brojača (μm)	18
Površina mreža za uzorkovanje (μm^2)	324
Udio uzorkovane površine	0.0544
Procijenjena površina (μm^2)	196384

Tablica 5. Postotak površine koju zauzima vezivo u ukupnoj površini preparata 62.1-06A označen je žutom bojom.

Vezivo (62.1-06A)	
Kategorija	Rezultati
Svi pogodci na vezivo	354
Svi pogodci na preparatu	1255
Udio površine koju zauzima vezivo	0.2821
Pomak brojača (μm)	18
Površina mreža za uzorkovanje (μm^2)	324
Udio uzorkovane površine	0.0544
Procijenjena površina (μm^2)	2106660

5.2.2. Statistička analiza dobivenih stereoloških podataka o suznoj žlijezdi

Statistička značajnost razlike između tri skupine analizirana je ANOVA testom, dok je razlika u srednjoj duljini odvodnih kanala analizirana Kruskal-Wallisovim testom. Podaci dobiveni istraživanjem su statistički analizirani pomoću software-a GraphPad (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

5.2.2.1. Volumenska gustoća acinusa, odvodnih kanala i veziva, te duljinska gustoća odvodnog sustava

Na tablicama 6, 7 i 8 su prikazane jednosmjerne analize varijance (ANOVA) za podatke koje smo dobili pomoću stereološke analize, i to za volumen acinusa izvanorbitalne suzne žlijezde triju eksperimentalnih grupa životinja tj. Sf-1 KO miševa (mužjaka, ženki i mužjaka koji su dobivali supstitucijsku terapiju testosteron propionatom prije žrtvovanja), zatim za volumen odvodnih kanala i volumen veziva. U tablicama 9 i 10 je prikazana statistička analiza duljine odvodnih kanala, gdje je zbog nehomogenosti varijance u podacima za duljinu pravih odvodnih kanala, primijenjen neparametrijski Kruskal-Wallisov test.

Tablica 6. Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) za volumen acinusa u izvanorbitalnoj suznoj žlijezdi za 3 grupe životinja (Sf-1 KO mužjaci, ženke i mužjaci koji su dobivali terapiju testosteron propionatom), $p=0.16$

1wayANOVA					
8	R kvadrat	0.1159			
9					
10	Brown -Forsytheov test				
11	F(DFn, DFd)	0.3539 (2, 30)			
12	P vrijednost	0.7048			
13	Sažetak P vrijednosti	nesignifikantno			
14	Značajno različita standardna devijacija? (P< 0.05)	Ne			
15					
16	Bartlettov test				
17	Bartlettova statistika (korekcija)	0.3810			
18	P vrijednost	0.8265			
19	Sažetak P vrijednosti	nesignifikantno			
20	Značajno različita standardna devijacija? (P< 0.05)	Ne			
21					
22	ANOVA tablica	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
23	Analiza između kolonni	0.02076	2	0.01038	F 82, 30) = 1.966
24	Analiza unutar kolonni	0.1584	29	0.005279	P = 0.1576
25	Kompletna analiza	0.1791	31		
26					
27	Sažetak podataka				
28	Broj grupa (kolonni)	3			
29	Broj vrijednosti (totalno)	29			

Tablica 7. Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) za volumen odvodnih kanala u izvanorbitalnoj suznoj žlijezdi Sf-1 KO miševa, $p=0.46$

1wayANOVA	
1	Analizirana Tablica
2	
3	ANOVA sažetak
4	F
5	P vrijednost
6	Sažetak P vrijednosti
7	Da li je razlika među srednjim vrijednostima statistički značajna? ($P < 0.05$)
8	R kvadrat
9	
10	Brown-Forsytheov test
11	F (DFn, DFd)
12	P vrijednost
13	Sažetak P vrijednosti
14	Značajno različita standardna devijacija? ($P < 0.05$)
15	
16	Bartlettov test
17	Bartlettova statistika (korekcija)
18	P vrijednost
19	Sažetak P vrijednosti
20	Značajno različita standardna devijacija? ($P < 0.05$)

Tablica 8. Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) za volumen veziva u izvanorbitalnoj suznoj žlijezdi Sf-1 KO miševa, $p=0.21$

1wayANOVA	
1	Analizirana Tablica
2	
3	ANOVA sažetak
4	F
5	P vrijednost
6	Sažetak P vrijednosti
7	Da li je razlika među srednjim vrijednostima statistički značajna? ($P < 0.05$)
8	R kvadrat
9	
10	Brown-Forsytheov test
11	F (DFn, DFd)
12	P vrijednost
13	Sažetak P vrijednosti
14	Značajno različita standardna devijacija? ($P < 0.05$)
15	
16	Bartlettov test
17	Bartlettova statistika (korekcija)
18	P vrijednost
19	Sažetak P vrijednosti
20	Značajno različita standardna devijacija? ($P < 0.05$)

Tablica 9. Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) za duljinu intralobularnih odvodnih kanala u izvanorbitalnoj suznoj žlijezdi Sf-1 KO miševa, $p=0.74$

1wayANOVA		
1	Analizirana Tablica	INTRALOB. ODVODNI
2		
3	ANOVA sažetak	
4	F	0.3043
5	P vrijednost	0.7400
6	Sažetak P vrijednosti	nesignifikantno
7	Da li je razlika među srednjim vrijednostima statistički značajna? ($P < 0.05$)	Ne
8	R kvadrat	0.02055
9		
10	Brown-Forsytheov test	
11	F (DFn, DFd)	1.456 (2, 29)
12	P vrijednost	0.2496
13	Sažetak P vrijednosti	nesignifikantno
14	Značajno različita standarna devijacija? ($P < 0.05$)	Ne
15		
16	Bartlettov test	
17	Bartlettova statistika (korekcija)	3.531
18	P vrijednost	0.1711
19	Sažetak P vrijednosti	nesignifikantno
20	Značajno različita standarna devijacija? ($P < 0.05$)	Ne

Tablica 10. Kruskal-Wallisov test za duljinu pravih odvodnih kanala u izvanorbitalnoj suznoj žlijezdi Sf-1 KO miševa, $p=0.70$

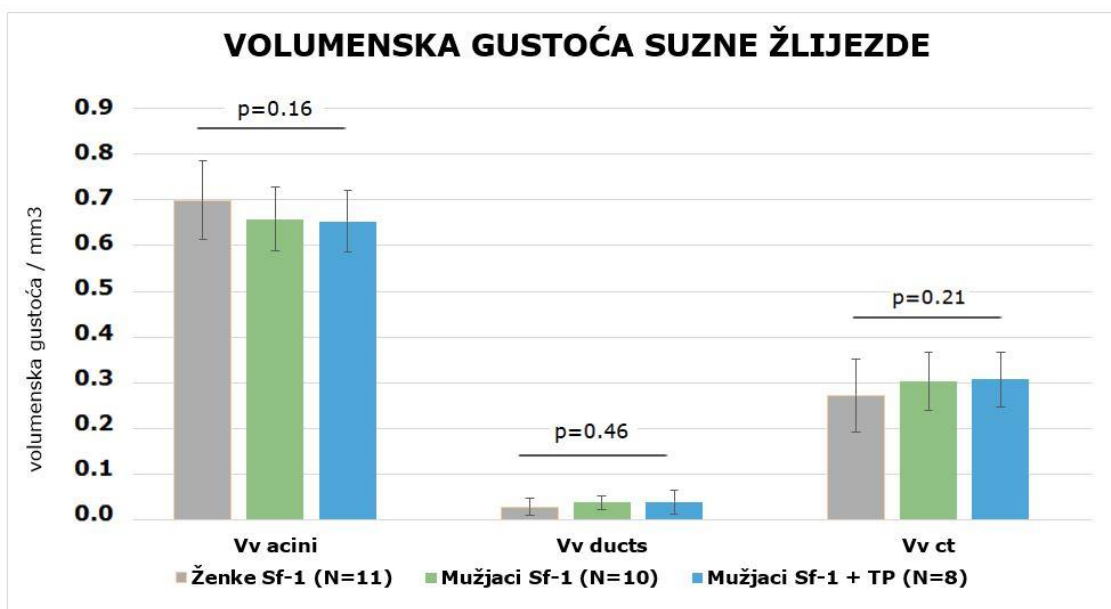
1wayANOVA		
1	Analizirana Tablica	PRAVI ODVODNI
2		
3	Kruskal-Wallisov test	
4	P vrijednost	0.7009
5	Točna ili aproksimativna P vrijednost?	Aproksimativna
6	Sažetak P vrijednosti	nesignifikantno
7	Da li medijani značajno variraju? ($P < 0.05$)	Ne
8	Broj grupa	3
9	Kruskal-Wallisova statistika	0.7107
10		
11	Sažetak podataka	
12	Broj grupa (kolumni)	3
13	Broj vrijednosti (totalno)	29

5.2.2.2. Srednji volumen acinusa, vezivnog tkiva i odvodnih kanala

Naši rezultati su pokazali da ne postoji statistička razlika u srednjem volumenu acinusa, vezivnog tkiva i odvodnih kanala između 3 skupine Sf-1 KO životinja: ženki Sf-1 (Sf-1 KO/F), mužjaka Sf-1 (Sf-1 KO/M) i mužjaka koji su dobivali supstitucijsku terapiju testosteronom (Sf-1 KO/M+TP). Dakle, $p > 0.05$ u sve tri ispitane komponente suzne žlijezde (acinusi, vezivo i odvodni kanali) između 3 grupe životinja, a razlika među njima nije signifikantna. Rezultati su prikazani u tablici 11 te na grafikonu na slici 60.

Tablica 11. Srednji volumen ($\bar{x} \pm$ standardna devijacija) acinusa (Vva), vezivnog tkiva (Vvct) i odvodnih kanala (Vvd) po mm³ tkiva suzne žlijezde u 3 skupine životinja

	Vva ($\bar{x} \pm$ SD) /mm ³	Vvd ($\bar{x} \pm$ SD) /mm ³	Vvct ($\bar{x} \pm$ SD) /mm ³
Sf-1 KO/F	0,698673 $\pm$ 0,09	0,029445 $\pm$ 0,02	0,271873 $\pm$ 0,08
Sf-1 KO/M	0,658058 $\pm$ 0,07	0,038825 $\pm$ 0,01	0,303142 $\pm$ 0,06
Sf-1 KO/M TP+	0,652482 $\pm$ 0,07	0,039655 $\pm$ 0,03	0,307882 $\pm$ 0,06



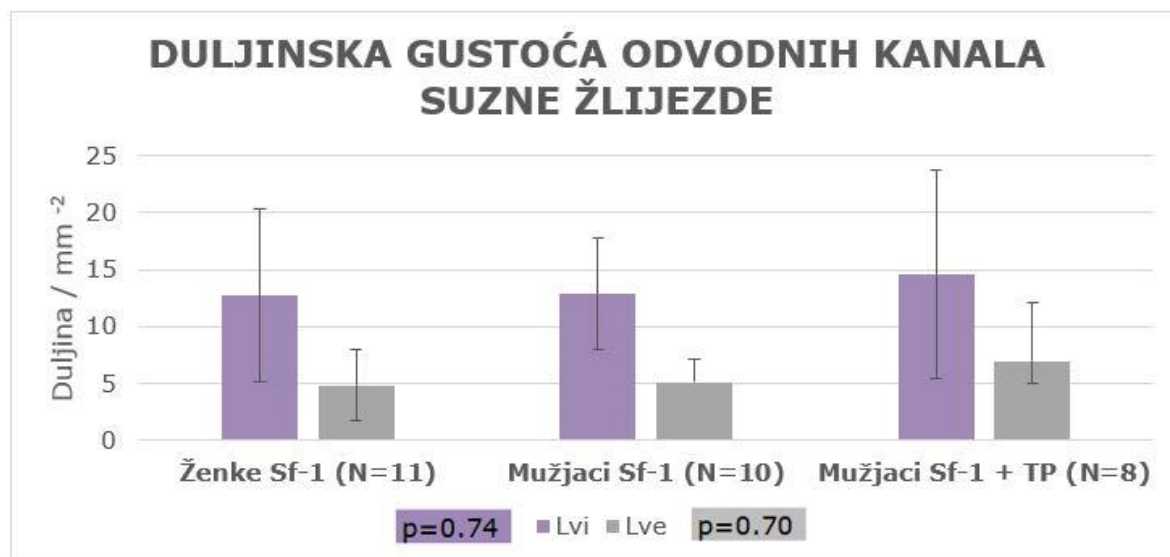
Slika 60. Na grafikonu je prikazana srednja volumenska gustoća u mm³ ($\bar{x} \pm$ SD) acinusa (Vv acini), odvodnih kanala (Vv ducts) i veziva (Vv ct) u izvanorbitalnoj suznoj žlijezdi Sf-1 KO ženki, Sf-1 KO mužjaka i mužjaka koji su dobivali testosteron propionat (mužjaci Sf-1 + TP).

5.2.2.3. Srednja duljina interlobularnih i pravih odvodnih kanala

Naši rezultati su pokazali da je p vrijednost nakon statističke analize duljine intralobularnih odvodnih kanala iznosila $p=0.74$, a pravih odvodnih kanala (Lve) $P=0.70$, dakle $p>0.05$ (tbl. 9 i 10). Dakle, ne postoji statistička razlika u srednjoj dužini intralobularnih (Lvi) i pravih (Lve) odvodnih kanala između 3 skupine Sf-1 KO životinja: ženki (Sf-1 KO/F), mužjaka (Sf-1 KO/M) i mužjaka koji su dobivali supstitucijsku terapiju testosteronom (Sf-1 KO/M TP+). Rezultati su prikazani u tablici 12 te na grafikonu na slici 61.

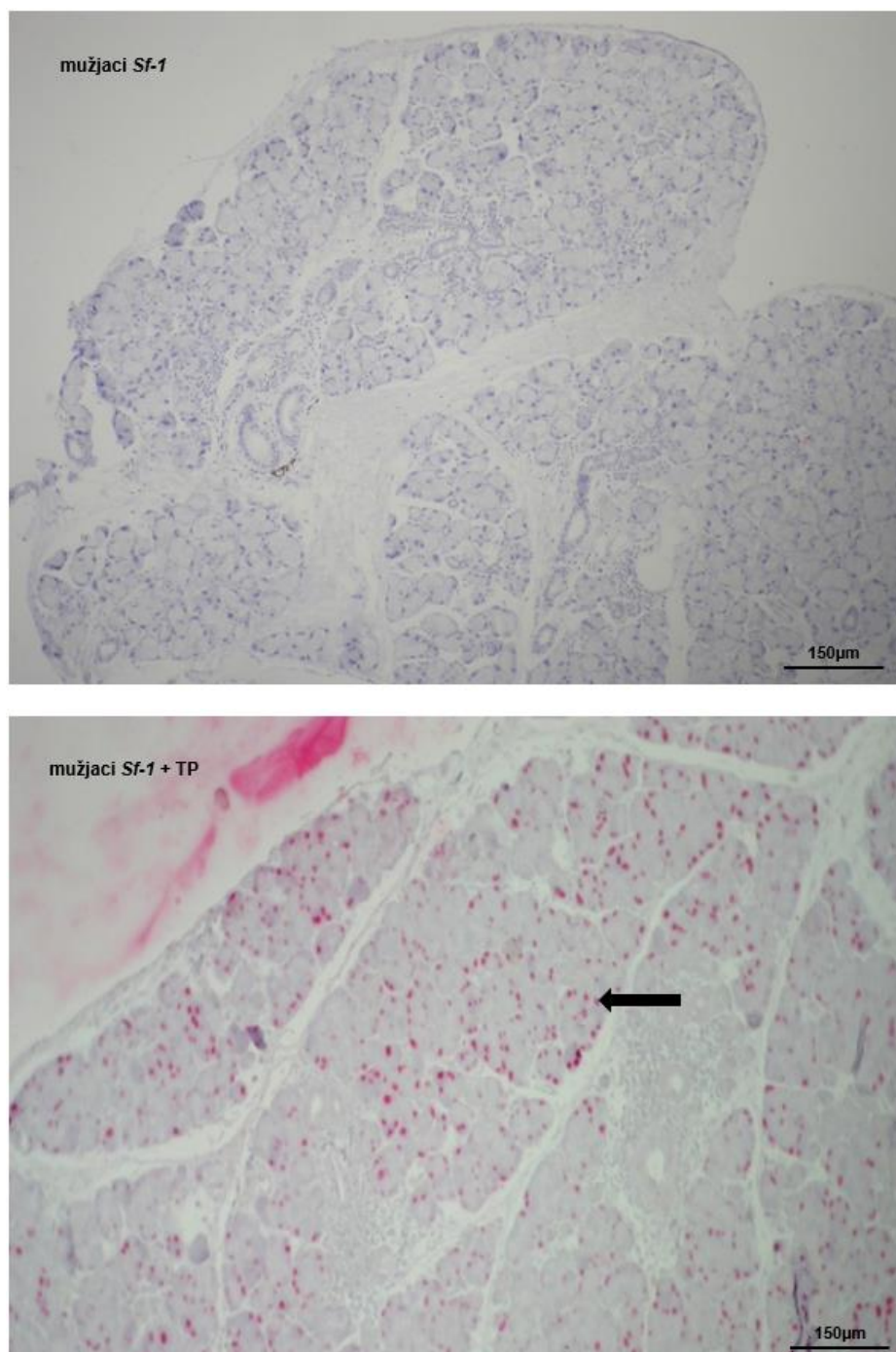
Tablica 12. Srednja dužina intralobularnih (Lvi) i pravih (Lve) odvodnih kanala ($\bar{x} \pm$ standardna devijacija) u izvanorbitalnoj suznoj žlijezdi u 3 skupine životinja

	Lvi ($\bar{x} \pm$ SD) /mm ²	Lve ($\bar{x} \pm$ SD) /mm ²
Sf-1 KO/F	12,76811641 $\pm$ 7,57	4,8439202 $\pm$ 3,08
Sf-1 KO/M	12,8800848 $\pm$ 4,90	5,139011882 $\pm$ 1,95
Sf-1 KO/M TP+	14,56059567 $\pm$ 9,17	6,971221629 $\pm$ 5,20

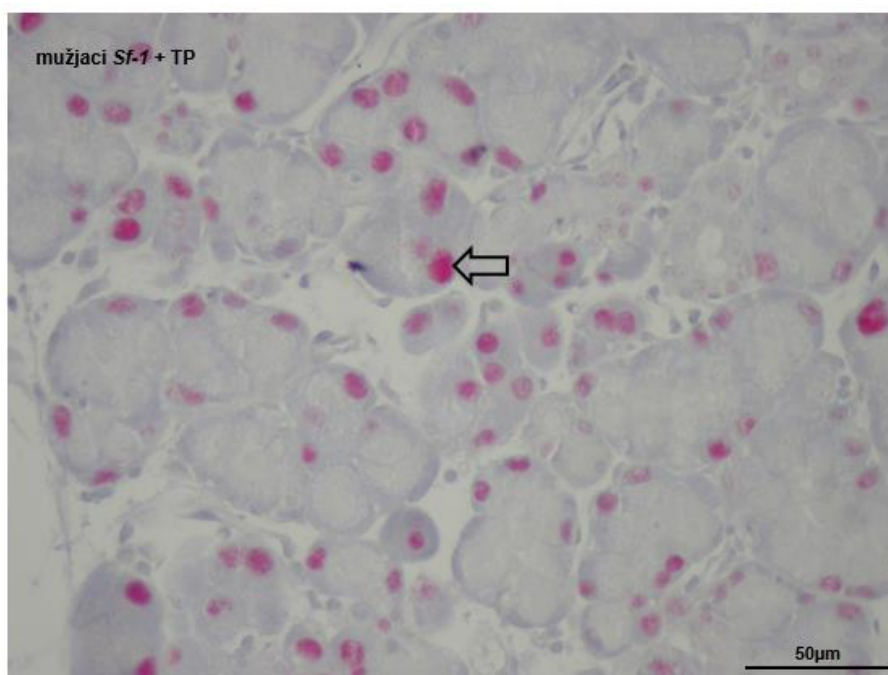
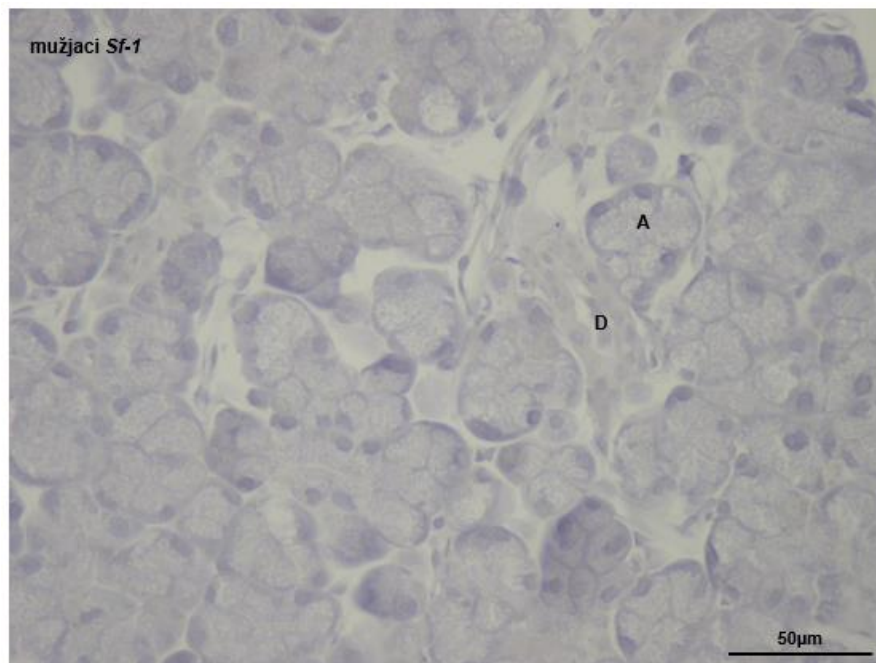


Slika 61. Na grafikonu je prikazana srednja duljina u mm² ($\bar{x} \pm$ SD) intralobularnih (Lvi) i pravih (Lve) odvodnih kanala u izvanorbitalnoj suznoj žlijezdi Sf-1 KO ženki, Sf-1 KO mužjaka i mužjaka koji su dobivali testosteron propionat (male Sf-1 TP+).

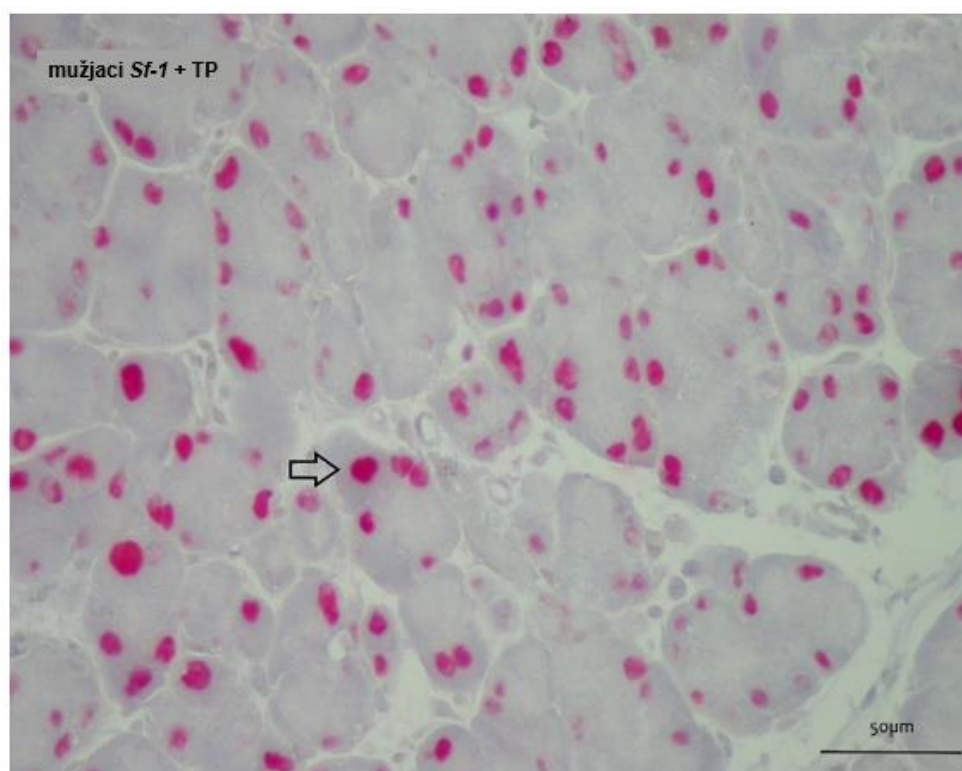
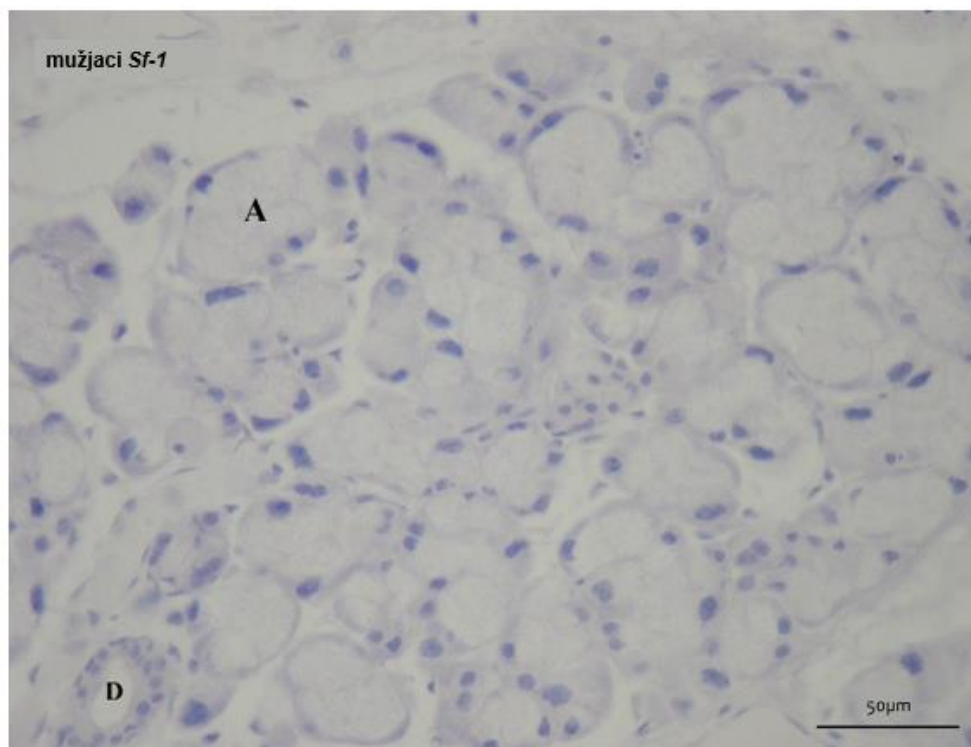
5.3. EKSPRESIJA ANDROGENIH RECEPTORA U SUZNOJ ŽLIJEZDI



Slika 62. Imunohistokemijska analiza androgenih receptora (AR) na rezovima izvanorbitalne suzne žlijezde na tkivu mužjaka Sf-1 KO miševa, Sf-1 KO M (gornja slika) i mužjaka Sf-1 KO miševa sa supstitucijskom terapijom testosteron propionatom, Sf-1 KO/M TP+ (donja slika). Crvena boja označava imunopozitivnost na AR u jezgrama stanica acinusa (strelica).



Slika 63. Imunohistokemijska analiza androgenih receptora (AR) na rezovima izvanorbitalne suzne žlijezde na tkivu mužjaka Sf-1 KO miševa, SF-1 KO M (gornja slika) i mužjaka Sf-1 KO miševa sa supstitucijskom terapijom testosteron propionatom Sf-1 KO/M TP+ (donja slika). Crvena boja označava imunopozitivnost na AR u jezgrama stanica acinusa (strelica), A označava acinus, D označava odvodni kanal.



Slika 64. Imunohistokemijska analiza androgenih receptora (AR) na rezovima izvanorbitalne suzne žlijezde na tkivu mužjaka Sf-1 KO miševa, SF-1 KO M (gornja slika) i mužjaka Sf-1 KO miševa sa supstitucijskom terapijom testosteron propionatom, Sf-1 KO/M TP+ (donja slika). Crvena boja označava imunopozitivnost na AR u jezgrama stanica acinusa (strelica), A označava acinus, D označava odvodni kanal.

Ekspresija androgenih receptora je detektirana i kvalitativno analizirana pomoću mikroskopa Nikon Eclipse E200. U učinjenoj imunohistološkoj detekciji androgenih receptora, ImmPACT Vector Red supstrat dao je intenzivno crvenu reakciju u prisutnosti enzima alkalne fosfataze (AP). Boja se uočavala isključivo u jezgrama stanica acinusa suzne žlijezde (193,373).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da su skoro sve jezgre stanica acinusa u mužjaka na supstitucijskoj terapiji testosteron propionatom (*Sf-1* KO/M TP+) bile pozitivne na izražaj androgenih receptora za razliku od mužjaka bez supstitucijske terapije (*Sf-1* KO/M) gdje je signal bio potpuno negativan (sl. 62, 63 i 64).

6. RASPRAVA

Osnovna svrha spolne diferencijacije je opremanje organizma anatomskim i fiziološkim značajkama potrebnim za spolno razmnožavanje. Iako je u sisavaca spolna sudbina određena prilikom oplodnje spajanjem spolnih gameta, tj. prisutnošću ili odsutnošću *Sry* gena, kad govorimo o genetičkoj razini, najznačajniji procesi se odvijaju prije i tijekom diferencijacije fetalnih gonada - ili u jajnike ili testise (19). Iako se dugo smatralo da se sve sekundarne spolne karakteristike razvijaju nakon razvoja i preuzimanja endokrine funkcije gonada i da ovise isključivo o djelovanju spolnih hormona na tkiva, u novije vrijeme sve češće se spominje „efekt spolnih kromosoma“ tj. urođena neravnoteža ekspresije gena smještenih na spolnim kromosomima i epigenetski utjecaj X i Y kromosoma na spolni dimorfizam negonadalnih tkiva (374,375).

Proučavanje odvojenog utjecaja gonadalnih hormona i spolnih kromosoma je danas moguće korištenjem mišjih modela (npr. FCG mišji model, engl. *the four core genotypes* ili *Sf-1* KO miševi) u kojima je gonadalno određenje odvojeno od spolnih kromosoma (376), omogućujući usporedbu XX i XY miševa s istim tipom gonada ili bez njih. Jednom kada se pomoću ovih modela jasno detektiraju utjecaji spolnih kromosoma na spolni dimorfizam, daljnjim istraživanjima se lista potencijalnih gena kandidata na X ili Y kromosomu suzuje, te se identificiraju pojedinačni spolno određujući geni (374).

Steroidogeni čimbenik 1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) je produkt istoimenog gena *Sf-1* i pripada skupini jezgrinih receptora. Budući da njegov endogeni ligand još nije identificiran svrstavamo ga u siročad receptore. SF-1 je transkripcijski faktor i ključni je regulator tkivno specifične ekspresije gena steroidogeneze (277). Tijekom embrionalnog razvoja miša uočena je obilna ekspresija *Sf-1* gena, te je ustanovljeno da je neophodan za embrionalni opstanak primarnih steroidnih organa (347). Uz to što regulira gene ključne za razvoj nadbubrežnih žlijezda i gonada, bitan je i razvoj spolno dimorfnih područja mozga sisavaca (348) te urednu funkciju hipotalamo-pituitarno-gonadalne osi (301,377).

Miševi bez gena *Sf-1* (*Sf-1* KO miševi) rađaju se bez spolnih i nadbubrežnih žlijezda. Spolni nabori, koji su osnova za spolne žlijezde, se normalno formiraju oko 10 dana embrionalnog razvoja (E10.5), no podliježu izrazitoj apoptozi neposredno nakon toga i oko E12.5 nestaju. Osnova nadbubrežne žlijezde također normalno nastaje, no bez *Sf-1* gena nastupa brza regresija i nestajanje žlijezde do E11. Uz agenezu nadbubrežne žlijezde i gonada, mužjaci i ženke ovih transgeničnih miševa imaju žensko vanjsko spolovilo i očuvane strukture koje nastaju od Müllerovih kanala (313,347). Gonadotropne stanice prednjeg režnja hipofize su u *Sf-1* KO miševa afunkcionalne uz dezorganizaciju ventromedijalne hipotalamičke jezgre (302).

Mnogobrojne studije na globalnim i tkivno specifičnim varijantama *Sf-1* nokaut miševa su pokazale da je transkripcija mnogih gena ovisna o regulaciji pomoću SF-1, također ovisno i o broju kopija gena, te da mnogi proteini zauzvrat ulaze u interakciju sa SF-1 i moduliraju njegovu aktivnost (378,379). *Sf-1* KO miševi, budući da su rođeni bez nadbubrežnih žlijezda, umiru najkasnije do 8 dana života zbog akutne adrenalne insuficijencije.

No, održavani na životu supstitucijskom kortikosteroidnom terapijom do transplatacije nadbubrežne žlijezde 7. ili 8. dan nakon rođenja, *Sf-1* KO miševi prežive do zrele dobi (351). Ove transgenične životinje stoga predstavljaju jedinstven i vrijedan model za proučavanje spolne diferencijacije u odsutnosti steroidnih hormona. Naime, nije uvijek potpuno jasno da li je spolni dimorfizam genetski ili hormonski uvjetovan tj. nastaje li u mužjaka i ženki zbog izloženosti različitim spolnim hormonima ili zahvaljujući drugim čimbenicima koji su povezani uz različit kromosomski spol.

Istraživanja razvoja mozga *Sf-1* KO miševa koja je proveo Majdič sa suradnicima su pokazala da su neka područja ventromedijalnog hipotalamusa i preoptičke regije prednjeg hipotalamusa spolno dimorfna zbog djelovanja različitog seta kromosoma (XX ili XY), a unatoč manjku djelovanja spolnih hormona tijekom prenatalnog i postnatalnog života (80,81). Ta i druga istraživanja na mozgovima *Sf-1* KO miševa (69,70,79) su nas usmjerila u prilog hipotezi da bi u razvoju spolnog dimorfizma suzne žlijezde značajnu ulogu mogli imati genetski čimbenici i da bi se različite suzne žlijezde u mužjaka i ženki mogle

razviti neovisno o utjecaju spolnih hormona.

Suzna žlijezda je tubuloacinusna egzokrina žlijezda koja zajedno s rožnicom, konjuktivom, Meibomovim, Zeisovim i Mollovim žlijezdama sudjeluje u sekreciji suznog filma. Suzni film oblaže prednju površinu oka. Ključan je za zdravlje i urednu funkciju oka, čini glatku refrakternu površinu iznad rožnice, hidrira i podmazuje rožnicu i konjuktivu, podržava metabolizam površine oka i te ispire komadiće prašine i štetne tvari. Od vanjske površine prema stanicama očne površine sastoji od tri sloja: vanjski lipidni, srednji vodenasti i unutarnji mukozni sloj. Suzni film je esencijalni dio površinske mikrookoline oka.

Poremećaj homeostaze tog mikrookoliša dovodi do stanja koje zovemo sindrom suhog oka (DES, engl. *dry eye syndrome* ili lat. *keratoconjunctivitis sicca*). Klinički konsenzus eksperata u ovom području se usuglasio oko definicije koja navodi da je „suho oko multifaktorijalna bolest koju karakterizira nestabilni i/ili deficijentni suzni film, uzrokuje nelagodu i /ili oštećenje vida, a praćeno je varijabilnim stupnjem oštećenja površnog epitela, upale i neurosenzornog poremećaja“ (380).

Klasični tip suhog oka je prvi puta opisan kao dio Sjögrenovog sindroma 1933.god. a kasnije su u klasifikaciju uključena i ostala stanja sa smanjenom sekrecijom vodenastog dijela suza (engl. *aqueous deficient dry eye*) kao što su kronična GVHD, bolest transplantata protiv primatelja (engl. *graft-versus-host disease*), očni cikatricijalni pemfigoid, Stevens-Johnsonov sindrom i dr. Zanimljivo da je u ovu kategoriju uključeno i suho oko koje se javlja kod osoba kao posljedica dugotrajnog korištenja ekrana (381). Zbog smanjenja vodenaste komponente, dolazi do nestabilnosti suznog filma, a kad su suze gotovo nepostojeće, nema uspostave suznog filma nakon treptanja.

Novije epidemiološke studije pokazuju da je danas sve veća učestalost i evaporativnog oblika. Kod ovog tipa suhog oka, vodenasti dio suza je urednog volumena ili čak povećan, no lipidna komponenta suznog filma nedostaje ili je loše kvalitete, što dovodi pojačanog isparavanja suza i nestabilnosti suznog filma. Najučestalije stanje koje dovodi do evaporativnog oblika je disfunkcija Meibomovih žlijezda. Treći tip je miješani oblik koji ima nedostatnu i vodenastu i

evaporativnu komponentu (382).

U zadnjih nekoliko desetljeća, broj ljudi s DESom je u dramatičnom porastu, te je postala najčešća bolest površine oka na svijetu (383). Procijenjeno je da pogađa od 7,4% do čak 33,7% populacije, te izrazito negativno utječe na kvalitetu života pacijenata (384). Simptomi mogu varirati od nelagode, intolerancije kontaktnih leća, osjećaja pečenja i svrbeža do uporne boli, oštećenja rožnice, zamućenja vida, a u najtežem obliku poremećaj može čak dovesti i do sljepoće. Ovo stanje također dovodi do čestih infekcija oka. Uznapredovala dob, perimenopauza u žena i hormonski disbalans su neki od faktora koji mogu doprinijeti razvoju bolesti. Također se u literaturi navodi da dugotrajno nošenje kontaktnih leća, pušenje, laserske refraktivne operacije oka, produžena izloženost ekranima, te niska vlažnost zraka u uredskim prostorijama mogu biti okidač za pojavu simptoma ili ih mogu jako pogoršati (385).

Iako je etiologija ovog stanja multifaktorijalna, žene češće od muškaraca oblijevaju od sindroma suhog oka, te osobito od autoimune varijante bolesti, Sjögrenovog sindroma. Sa starenjem se učestalost povećava bez obzira na spol. Budući da su glavni rizični faktori za obolijevanje od sindroma suhog oka ženski spol i uznapredovala dob, niska razine testosterona se može smatrati jednim od uzroka koji dovode do ovog stanja.

Podrobnija istraživanja na suznoj žlijezdi su počela sredinom 20. stoljeća. Od tog razdoblja do danas brojne studije su pokazale da je suzna žlijezda kod većine sisavaca spolno dimorfni organ i da androgeni imaju ključnu ulogu u uspostavljanju normalne anatomije i funkcije „muške“ i „ženske“ žlijezde. Dokazano je da orhidektomija ili davanje antagonista androgenih receptora dovodi do degenerativnih promjena u žlijezdi, dok davanje androgena „reaktivira“ suznu žlijezdu. Dakle, prijašnji eksperimenti, kako na žlijezdama slinovnicama, tako i na suznim žlijezdama, dokazali su ključnu ulogu androgena u razvoju spolnog dimorfizma i održavanju funkcije ovih ciljnih organa.

No, sve studije do sada su provedene na odraslim životinjama koje su imale normalnu morfologiju suzne žlijezde i njenu urednu funkciju prije fizičke ili kemijske kastracije. Mi smo u ovom istraživanju željeli analizirati suzne žlijezde mužjaka i ženki miša koje uopće tijekom života nisu bile izložene djelovanju

spolnih hormona. Zbog toga smo koristili *Sf-1* KO miševe. Iako ove životinje imaju uredne spolne kromosome i genetski spol, manjak *Sf-1* gena i njegovog produkta, transkripcijskog faktora SF-1 dovodi do ageneze tkiva koja stvaraju steroidne hormone. Dakle, *Sf-1* KO miševi se rađaju bez testisa i jajnika te *in utero* i poslije rođenja ne postoji stvaranje niti djelovanje spolnih hormona (androgena i estrogena). Primarno pitanje koje smo si postavili u ovom istraživanju je da li spolni dimorfizam suznih žlijezda postoji kod ovih hormonski „naivnih“ životinja. Kao što je ranije navedeno, studije učinjene na mozgovima *Sf-1* KO miševa su pokazale da postoji spolni dimorfizam u dvije regije za koje se od ranije znalo da su izrazito spolno dimorfne u sisavaca: preoptička regija i ventromedijalna jezgra hipotalamusa (79,80,81). Naša radna hipoteza je također bila u skladu s ovim rezultatima – da će suzna žlijezda *Sf-1* KO miševa također pokazivati spolni dimorfizam.

No, suprotno očekivanjima, rezultati našeg istraživanja pokazali su da nema spolnog dimorfizma suzne žlijezde kod ove vrsta transgeničnih životinja. Samo genetski faktori, u odsutnosti hormonskih čimbenika nisu bili dovoljni da izazovu morfološki spolni dimorfizam suzne žlijezde. Na svim promatranim komponentama suzne žlijezde (acinusi, odvodni kanali, vezivo) pokazali smo da ne postoji statistička razlika u volumenskoj gustoći acinusa, odvodnih kanala i vezivnog tkiva između tri promatrane grupe životinja: *Sf-1* KO ženki, *Sf-1* KO mužjaka i *Sf-1* KO mužjaka koji su dobivali testosteron propionat svakodnevno dva tjedna prije žrtvovanja (sl. 60).

Također smo ustanovili da ne postoji statistička razlika u srednjoj dužini odvodnog sustava (intralobularni i pravi odvodni kanali) između sve tri grupe nokaut miševa. Zanimljivo je istaknuti da je statistička analiza pokazala malu, no ne i statistički značajnu razliku u dužini odvodnih kanala *Sf-1* KO + TP mužjaka. Naime, miševi koji su primali supstitucijsku terapiju testosteron propionatom su imali duže i intralobularne i prave odvodne kanale od životinja bez takve supstitucije (sl. 61). Istraživanja ranije učinjena na parotidnoj žlijezdi štakora (185) su pokazala da osmi dan nakon orhidektomije počinje skraćivanje odvodnih kanala i da to može biti prvi pokazatelj morfoloških promjena zbog manjka testosterona. Moguće je da je u našem istraživanju supstitucijska terapija

testosteronom mogla dovesti do suprotnog učinka, no daljnja istraživanja su potrebna, možda s duljim vremenskim periodom supstitucije androgenima.

Oko je jedan od ciljnih organa za androgene i potvrđena je široka rasprostranjenost androgenih receptora u suznoj žlijezdi, rožnici i drugim očnim tkivima ljudi, zečeva i miševa (386,387). U suznoj žlijezdi miša androgene receptore nalazimo u jezgrama stanica acinusa (373), dok u čovjeka, uz izražaj u acinusnim stanicama, ekspresiju AR također nalazimo i u stanicama smještenim u intralobularnom vezivu, između ostalih i u imunološkim stanicama (388). Naše istraživanje je također potvrdilo da davanje androgena mužjacima transgeničnih miševa dva tjedna prije žrtvovanja uzrokuje pojavu androgenih receptora u jezgrama acinusnih stanica u usporedbi s kontrolnom grupom koja nije dobivala supstitucijsku terapiju (sl. 62,63 i 64). To nam potvrđuje da androgeni mogu inducirati i povećati broj svojih receptora (engl. *up-regulation*) u vremenskom periodu od 14 dana, potvrđujući značajnu ulogu testosterona u očnim tkivima (193,194).

Starenje je kompleksan proces koji za rezultat ima postupno smanjivanje i gašenje normalnih funkcija organizma. Starenjem suzne žlijezde također pokazuju značajne morfološke i funkcionalne promjene koje su osobito izražene u mužjaka. Makroskopski gledano, suzne žlijezde mladih životinja su ružičaste i glatke, dok su u starijih blijede boje i lobularnije, vjerojatno radi većeg udjela masnog i vezivnog tkiva. Analizom na elektronskom mikroskopu je uočena destrukcija ER i Golgijevog aparata, te progresivni gubitak seroznih sekretornih zrnaca u citoplazmi acinusnih stanica, kao i postupna promjena tipa acinusa od seroznih, preko seromukoznih do prevladavajuće mukoznih u starih životinja (389).

Na morfološkoj razini se nalaze promjene u parenhimu suzne žlijezde koje uključuju kako uvećavanje acinusa i njegovog lumena, tako i atrofiju i metaplaziju acinusa. Također je uočeno pretvaranje acinusa u strukture koje karakteriziraju Harderove žlijezde – „harderizacija“. Mikroskopskom analizom tkiva starijih životinja pronalazi se displazija i polimorfizam stanica acinusa, kao i citomegalija i kariomegalija. Promjene odvodnih kanala uključuju njihovo nakupljanje u režnjićima („duktularizacija“) i dilataciju, te u kasnijim fazama opstrukciju.

Promjene povezane sa starenjem u stromi suzne žlijezde su karakterizirane limfocitnom infiltracijom strome, zadebljanjem kapsule te povećanjem količine vezivnog tkiva i fibrozom u kasnijim fazama (390–392). U starijih životinja je također, uz značajan broj limfocita, pronađen i velik porast broja mastocita u odnosu na mlađe životinje, kao i redukcija u inervaciji acinusnih stanica (393). Na završnom stupnju promjena povezanih sa starenjem, suzna žlijezda je morfološki nalik neoplazmi, ali bez drugih tumorskih karakteristika (390). Na koncu, progresivna destrukcija, prvenstveno acinusa, te potom i odvodnog sustava i neurovaskularnih struktura, dovodi do smanjenja u sekreciji proteina, promjena u sastavu i volumenu suza i disfunkcije suzne žlijezde, što se klinički manifestira kao sindrom suhog oka.

Iako su životinje korištene u našem istraživanju bile mlade u trenutku kad su žrtvovane (6 mjeseci starosti), zanimljivo je da su tijekom kvalitativne analize histoloških preparata u sve tri grupe životinja pronađene gotovo istovjetne morfološke žlijezde koje su opisane u suznih žlijezda starih mužjaka. Mi smo, slično prijašnjim istraživanjima, uočili područja kronične upale s nakupljanjem limfocita, osobito oko interlobularnih odvodnih kanala, širenje upalnih stanica u područje režnjića, te vakuolizaciju i destrukciju stanica acinusa (sl. 47,50,51 i 52). Pronašli smo i ranije spomenutu „duktularizaciju“ tj. nakupljanje odvodnih vodova unutar režnjića (sl. 48). Također, neki acinusi su imali jako izražen lumen radi snižene visine stranica koje su poprimile pločasti do kubični oblik. Te strukture smo nazvali „pseudofolikuli“, a izraz je prvi puta korišten u istraživanju Ježek i sur. (184) (sl. 49). Također smo pronašli displastične promjene acinusnih stanica – polimorfizam i citomegaliju, kao i morfološke promjene jezgara stanica acinusa – kariomegaliju i poliformizam (sl. 37 i 38).

Uzroci ovih promjena nisu u cijelosti poznati i vjerovatno su multifaktorijalni. Jedan od najvažnijih uzročnih faktora koji se dovodi u vezu s ovih patološkim stanjima je pad cirkulirajućeg testosterona prilikom starenja. Brojna istraživanja su dokazala da androgeni imaju značajan učinak na ekspresiju gena, sintezu proteina, sekreciju i imunološki odgovor očnih tkiva, osobito suzne žlijezde (191,192,373,394). Također, androgeni imaju protuupalni učinak u suznoj žlijezdi. Jedan od mehanizama je indukcija sinteze i up-regulacija TGF- β . To je

citokin kojeg proizvode sve linije leukocita i ima mnogobrojne funkcije u reguliranju proliferacije, diferencijacije i aktivacije stanica imunološkog sustava. TGF- β smanjuje koncentraciju interleukina 1 β i TNF- α što za posljedicu ima supresiju T limfocita (395). Za održavanje strukture i funkcije suzne žlijezde potrebna je kritična razina androgenih hormona, a u trenutku kada ta razina padne ispod ove razine pokreće se apoptoza i nekroza stanica acinusa posredovana imunološkim stanicama. Također, budući da fragmenti nekrotičnih stanica mogu biti izvor autoantigena, koji se prezentiraju imunološkom sustavu, pokreće se i autoimuna upalna reakcija kakvu nalazimo kod Sjögrevog sindroma (396). Novija istraživanja su pokazala da gubitak imunološke tolerancije može nastati zbog formiranja apoptotičkih tjelešaca. Ona nastaju od odumrlih stanica acinusa i sadrže autoantigene α -fodrin, SS-A i hy1-RNA. Dendritičke stanice fagocitiraju ova apoptotička tjelešca i eksprimiraju TLR-7 i TLR-9 (engl. toll-like receptors) te potiču produkciju proupalnih citokina i autoimuni odgovor. Androgeni štite stanice od apoptoze i smanjuju ekspresiju TLRs na dendritičkim stanicama (397). Za retinoide se zna da imaju antagonističko djelovanje androgenima. Primjena retinoične kiseline na kulturi stanica suzne žlijezde zeca je dovela do down-regulacije androgenih receptora i inhibicije proliferacije stanica suzne žlijezde (398). Dakle, manjak androgena je povezan s upalnim promjenama suzne žlijezde i smanjenom sekrecijom suza (195,399,400).

Istraživanja su pokazala da i drugi faktori kao što su oksidativni stres, imunološki faktori i upalom posredovan gubitak živčane opskrbe funkcije živaca (401,402) mogu dovesti do takvih promjena. Također, snižena razina estrogena i androgena nakon ovarijektomije u miševa dovodi do limfocitne infiltracije i apoptoze stanica suzne žlijezde, dok hormonska supstitucija prevenira razvoj ovih promjena (403). I ovdje estrogeni i androgeni imaju suprotno djelovanje, estrogeni povećavaju ekspresiju MMP-2 (engl. *matrix metalloproteinase 2*), enzima odgovornog za razgradnju ekstracelularnog matriksa i aktivaciju mnogih proupalnih citokina, dok ga androgeni suprimiraju (404). Neravnoteža spolnih hormona, naročito redukcija razine androgena, može predisponirati osobu za razvoj sindroma suhog oka i ostala patološka stanja koja pogađaju površinu oka. Dakle, možemo pretpostaviti da su ove promjene uočene na *Sf-1* KO životinjama

također, barem djelomično, posljedica manjka spolnih hormona, osobito testosterona čija je jedna od uloga održavanje funkcije suzne žlijezde.

Budući da je naše istraživanje za cilj imalo istražiti da li će se, u odsutnosti hormona, a pod utjecajem spolnih kromosoma, razviti spolni dimorfizma u suznoj žlijezdi transgeničnih miševa, metode na kojima se temeljio naš rad su bile morfološke. U budućnosti bi se istraživanje suznih žlijezda Sf-1 KO miševa moglo proširiti, te bi se mogla učiniti analiza tkiva pomoću elektronskog mikroskopa. Za istražiti također ostaje koliko je, s obzirom na sve patološke promjene koje smo uočili na preparatima, suzna žlijezda ovih miševa doista funkcionalna, koji je volumen i sastav sekreta te da li životinje imaju klinički manifestan sindrom suhog oka. Što se tiče imunohistokemijskog dijela istraživanja, daljnji korak u istraživanju bi mogao biti administriranje testosterona Sf-1 KO ženka, te promatranje da li će se androgeni receptori pojaviti u jezgrama acinusnih stanica i u kojoj količini u odnosu na mužjake. Također bi bilo zanimljivo učiniti imunohistokemijsku analizu ekspresije estrogenih receptora u Sf-1 KO ženki i analizu markera proliferacije kao što je npr. Ki-67.

Dugo vremena je liječenje sindroma suhog oka bilo simptomatsko oslanjajući se uglavnom na tople obloge, vlaženje očne površine pomoću umjetnih suza i gelova te punktalnu okluziju. U zadnja dva desetljeća postignut je značajan napredak uvođenjem u terapiju antiupalnih i imunomodulacijskih lijekova (topikalna primjena ciklosporina i lifitegrasta) te sekretagoga koji stimuliraju sekreciju suza (405).

Jedna od razmatranih terapijskih linija je i topikalna aplikacija androgena (406–408). Također, učinjeno je nekoliko istraživanja s biljkama koje sadrže flavonoide koji imaju slično kemijsko strukturu i djelovanje kao androgeni – imela i *Buddleja officinalis*. Ova istraživanja ukazuju da topička primjena ekstrakta Buddleje na kastriranim štakorima može spriječiti razvoj sindroma suhog oka nakon sniženja razine testosterona te održati osnovni volumen izlučenih suza i stabilnost suznog filma (409). Flavonoidi iz Buddleje potiču fosforilaciju STAT1 proteina (engl. *signal transducers and activators of transcription 1*) koji regulira ekspresiju gena i omogućava biološko djelovanje citokina, faktora rasta i

hormona te promoviranje ekspresije mRNA za AR u *in vitro* epitelnim stanicama suzne žlijezde (410,411). Istraživanje na ženama u postmenopauzi također je pokazalo da imela može ublažiti simptome sindroma suhog oka (412).

Budući da su sve ove nabrojane metode zapravo palijativne i ne mogu izliječiti bolesnike sa DES, regenerativna medicina se pokazala kao jedna od obećavajućih strategija za trajno i pouzdano liječenje. Nekoliko studija je ukazalo na činjenicu da matične, odnosno progenitorne stanice koje su prisutne u suznoj žlijezdi odrasle osobe mogu uključiti iste signalne putove i aktivirati embrionalne transkripcijske faktore te pokrenuti proliferaciju i diferencijaciju u zrele lakrimalne stanice. Trenutno postoje dvije glavne strategije za popravak i regeneraciju suzne žlijezde: poticanje unutarnjeg regenerativnog kapaciteta i razvijanje tkiva suzne žlijezde za transplantaciju metodama bioinženjeringa (413).

TSG-6 je citokin odgovoran za regenerativne i imunomodulatorne efekte, a njegova topička primjena poboljšava produkciju suza i poboljšava oštećenja očne površine na mišjem modelu suhog oka (414). Injekcija plazme obogaćene trombocitima (engl. *platelet rich plasma*, PRP) u blizinu suzne žlijezde također dovodi do poboljšanja sekrecije suza u pacijenata sa Sjögrenovim sindromom, vjerojatno zbog čimbenika rasta i citokina koji su prisutni u plazmi (415). Direktna stanična transplantacija mezenhimalnih matičnih stanica je također jedan od modaliteta u regenerativnoj medicini. Nakon aplikacije mezenhimalnih matičnih stanica periorbitalnom injekcijom, dokazano je smanjenje količine proupalnih citokina te poboljšanje volumena suza i stabilnosti suznog filma (416). Jedna od potencijalnih strategija liječenja bi mogla biti i transplantacija suzne žlijezde, koja bi bila uzgojena *in vitro* od humanih pluripotentih matičnih stanica (417). U ovom pristupu nužno je poznavanje embriologije, biologije matičnih stanica i regenerativnog potencijala suzne žlijezde.

Spoznaje koji smo stekli ovim istraživanjem također bi mogle poslužiti u istraživanjima liječenja poremećaja funkcije suzne žlijezde. Vrlo bitno saznanje da je testosteron nužan za normalnu funkciju i održavanje funkcije lakrimalne žlijezde, kako kod muškaraca, tako i kod žena, također bi mogla imati značenje u pokušajima liječenja topičkim preparatima androgena ili bioflavonoidima te u poticanju regeneracije tkiva suzne žlijezde. Također, spoznaja da je testosteron

nužan za uspostavu spolnog dimorfizma suzne žlijezde bi mogla imati ulogu u najnovijim metoda kojima bi se afunkcija suzne žlijezde liječila transplantacijom žlijezde uzgojene *in vitro* od matičnih stanica pacijenta. Budući da je ovo istraživanje imalo za cilj istražiti da li i koliki utjecaj spolni kromosomi bez djelovanja hormonskih faktora imaju na morfologiju suzne žlijezde, daljnja istraživanja bi se mogla usmjeriti na biokemijske i genetičke mehanizme kojima spolni hormoni, osobito testosteroni, ostvaruju svoje djelovanje. Također bi jedan od smjerova u budućim istraživanjima mogao biti povezivanje morfoloških promjena suznih žlijezda *Sf-1* KO miševa s kliničkom slikom sindroma suhog oka.

7. ZAKLJUČAK

U odsutnosti spolnih hormona, genetski spol i posjedovanje spolnih kromosoma su se pokazali nedovoljnima da induciraju spolni dimorfizam suzne žlijezde. Davanje testosterona 2 tjedna prije žrtvovanje potaklo je ekspresiju androgenih receptora u jezgrama stanica acinusa u mužjaka *Sf-1* KO miševa, no nije imalo utjecaj na morfologiju suzne žlijezde. *Sf-1* KO miševi su dobar model za istraživanje učinaka koje genetski faktori imaju na razvoj i funkciju organskih sustava, jer ageneza spolnih žlijezda zbog izbačenog *Sf-1* gena isključuje djelovanje spolnih hormona.

Ovo istraživanje se temeljilo na analizi morfologije izvanorbitalne suzne žlijezde transgeničnih miševa. Daljnja istraživanja bi se mogla usmjeriti na genetičke, biokemijske i imunološke faktore u suznim žlijezdama *Sf-1* KO miševa. Stečene spoznaje bi svoju primjenu mogle naći u prevenciji, dijagnostici i novim metodama liječenja bolesti suzne žlijezde i sindroma suhog oka.

8. KRATKI SADRŽAJ

Spolni dimorfizam (SD) kao razlika u karakteristikama mužjaka i ženki iste vrste poznat je i u suznoj žlijezdi, a postoje i podaci o utjecaju testosterona na SD. U nokaut-miševima za steroidogeni faktor 1 (*Sf-1* KO) ne razvijaju se gonade. Cilj doktorskog rada bio je istražiti pojavu spolnog dimorfizma žlijezde *Sf-1* KO mužjaka i ženki miševa te suzne žlijezde *Sf-1* KO mužjaka koji su dobivali nadomjesnu testosteronsku terapiju (TP). Provedena je detaljna histološka analiza i imunohistokemijska analiza izražaja androgenih receptora (AR) uz stereološku kvantifikaciju i statističku analizu rezultata. Nije bilo statistički značajne razlike u srednjem volumenu acinusa, vezivnog tkiva ni duljine odvodnih kanala između mužjaka, ženki kao ni mužjaka na nadomjesnoj terapiji testosteronom. Stanice acinusa mužjaka koji su dobivali TP bile su pozitivne na androgene receptore, a u mužjaka bez primjene TP signal je bio negativan. Davanje TP je induciralo pojavu AR, ali nije dokazan utjecaj na morfologiju. Može se zaključiti da spolni dimorfizam suzne žlijezde *Sf-1* KO miševa različitog genetskog spola nije prisutan, pa spolni hormoni imaju presudnu ulogu u razvoju spolnog dimorfizma suzne žlijezde.

9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU - SUMMARY

Sexual Dimorphism of the Extraorbital Lacrimal Glands in Sf-1 Knockout Mice

Sexual dimorphism (SD), a difference in the characteristics of males and females of the same species was found in lacrimal glands together with data on the influence of testosterone. Knockout mice for steroidogenic factor 1 (*Sf-1 KO*) do not develop gonads. We aimed to investigate the lacrimal gland sexual dimorphism in male and female *Sf-1 KO* mice and the lacrimal glands of *Sf-1 KO* males receiving replacement testosterone therapy (TP). Detailed histological analysis and immunohistochemical analysis of androgen receptor expression (AR) were carried out with stereological quantification and statistical analysis of the results. There was no statistically significant difference in the mean volume of acini, connective tissue or ductal system length between males and females nor males on testosterone replacement therapy. TP induced androgen receptor in male acini-cells, and in males without TP administration, the signal was negative. Administering TP induces the occurrence of AR, but no impact on morphology has been demonstrated. It can be concluded that the sexual dimorphism of the lacrimal gland in *Sf-1 KO* mice of different genetic sex is not present, so sex hormones play a crucial role in the development of sexual dimorphism in the lacrimal glands.

Kristina Šemanjski, 2021.

10. POPIS LITERATURE

1. McPherson FJ, Chenoweth PJ. Mammalian sexual dimorphism. *Anim Reprod Sci.* 2012;131(3-4):109–22.
2. Bardin CW, Catterall JF. Testosterone: A major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science.* 1981;211(4488):1285–94.
3. Seifarth JE, McGowan CL, Milne KJ. Sex and life expectancy. *Gend Med.* 2012;9(6):390–401.
4. Sikora M, Seguin-Orlando A, Sousa VC i sur. Ancient genomes show social and reproductive behavior of early Upper Paleolithic foragers. *Science.* 2017;358(6363):659–62.
5. Trompoukis C, Kalaitzis C, Giannakopoulos S, Sofikitis N, Touloupidis S. Semen and the diagnosis of infertility in Aristotle. *Andrologia.* 2007;39(1):33–7.
6. Muendel J. Sexuality and Medicine in the Middle Ages. *JAMA.* 1989;262(14):2023.
7. Urquhart Grindlinger B. The X in sex: how the X chromosome controls our lives. *J Clin Invest.* 2003;112(11):1602.
8. De Castro M. Johann Gregor Mendel: Paragon of experimental science. *Mol Genet Genomic Med.* 2016;4(1):3–8.
9. Ogilvie MB, Choquette CJ. Nettie Maria Stevens (1861-1912): her life and contributions to cytogenetics. *Proc Am Philos Soc.* 1981;125(4):292-311.
10. Casas L, Saborido-Rey F, Ryu T, Michell C, Ravasi T, Irigoien X. Sex Change in Clownfish: Molecular Insights from Transcriptome Analysis. *Sci Rep.* 2016;6:35461.
11. Normark BB. Parthenogenesis. U: Stanley Maloy i Kelly Hughes, ur. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition.* Academic Press 2013, str. 233–5.
12. Wilson EB. Studies on chromosomes. III. The sexual differences of the chromosomegroups in Hemiptera, with some considerations on the determination and inheritance of sex. *J Exp Zool.* 1906;3(1):1–40.
13. Furman BLS, Metzger DCH, Darolti I i sur. Sex Chromosome Evolution:

- So Many Exceptions to the Rules. *Genome Biol Evol.* 2020;12(6):750–63.
14. Van Wilgenburg E, Driessen G, Beukeboom LW. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: An “unintelligent” design? *Front Zool.* 2006;3:1.
 15. Cho S, Huang ZY, Green DR, Smith DR, Zhang J. Evolution of the complementary sex-determination gene of honey bees: Balancing selection and trans-species polymorphisms. *Genome Res.* 2006;16(11):1366–75.
 16. Nipitwattanaphon M, Wang J, Ross KG i sur. Effects of ploidy and sex-locus genotype on gene expression patterns in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2014;281(1797):20141776.
 17. Cornejo-Páramo P, Lira-Noriega A, Ramírez-Suástegui C i sur. Sex determination systems in reptiles are related to ambient temperature but not to the level of climatic fluctuation. *BMC Evol Biol.* 2020;20(1):103.
 18. Schlafer DH, Foster RA. Female Genital System. U: M. Grant Maxie, ur. Jubb, Kennedy and Palmer’s Pathology of Domestic Animals: Sixth Edition. Saunders Ltd. 2016, str. 358-464.
 19. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* 2007;87(1):1–28.
 20. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS i sur. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990;346(6281):240–4.
 21. Gubbay J, Collignon J, Koopman P i sur. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature.* 1990;346(6281):245–50.
 22. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 1991;351(6322):117–21.
 23. Josso N. Professor Alfred Jost: The builder of modern sex differentiation. *Sex Dev.* 2008;2:55–63.
 24. She ZY, Yang WX. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *J Mol Endocrinol.* 2014;53(1):R21-37.
 25. Wilhelm D, Yang JX, Thomas P. Mammalian Sex Determination and

Gonad Development. *Curr Top Dev Biol.* 2013;106:89–121.

26. Tanaka SS, Nishinakamura R. Regulation of male sex determination: Genital ridge formation and Sry activation in mice. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(24):4781–802.

27. Anderson R, Copeland TK, Schöler H, Heasman J, Wylie C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev.* 2000;91(1–2):61–8.

28. Sadler TW Urogenitalni sustav U: Sadler TW, ur. Langmanova medicinska embriologija, sedmo izdanje, Školska knjiga 1996, str. 272-311.

29. Makiyan Z. Studies of gonadal sex differentiation. *Organogenesis.* 2016;12(1):42–51.

30. Albrecht KH, Eicher EM. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol.* 2001;240(1):92–107.

31. Hiramatsu R, Matoba S, Kanai-Azuma M i sur. A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development.* 2009;136(1):129–38.

32. Larney C, Bailey TL, Koopman P. Switching on sex: Transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Development.* 2014;141(11):2195–205.

33. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature.* 2008;453(7197):930–4.

34. Vidal VPI, Chaboissier MC, De Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet.* 2001;28(3):216–7.

35. Ross AJ, Capel B. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(1):19–25.

36. Kocer A, Reichmann J, Best D, Adams IR. Germ cell sex determination in mammals. *Mol Hum Reprod.* 2009;15(4):205–13.

37. Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell.* 2001;104(6):875–89.

38. Kim Y, Kobayashi A, Sekido R i sur. Fgf9 and Wnt4 Act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination. *PLoS Biol.* 2006;4(6):e107.

39. Miura K, Tomita A, Kanai Y. Sex Determination and Differentiation in

- Mammals. U: Kobayashi K, Kitano T, Iwao Y i Kondo M, ur. Reproductive and Developmental Strategies. The Continuity of Life. Springer Japan 2018, str. 407–33.
40. Minkina A, Lindeman RE, Gearhart MD i sur. Retinoic acid signaling is dispensable for somatic development and function in the mammalian ovary. *Dev Biol.* 2017;424(2):208–20.
 41. Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development.* 2002;129(19):4627–34.
 42. Gierl MS, Gruhn WH, von Seggern A, Maltry N, Niehrs C. GADD45G Functions in Male Sex Determination by Promoting p38 Signaling and Sry Expression. *Dev Cell.* 2012;23(5):1032–42.
 43. Pilon N, Daneau I, Paradis V i sur. Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1. *Biol Reprod.* 2003;68(4):1098–106.
 44. Katoh-Fukui Y, Miyabayashi K, Komatsu T i sur. Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice. *Endocrinology.* 2012;153(2):913–24.
 45. Wilhelm D, Englert C. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev.* 2002;16(14):1839–51.
 46. Fujimoto Y, Tanaka SS, Yamaguchi YL i sur. Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development. *Dev Cell.* 2013;26(4):416–30.
 47. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol.* 2008;9:44.
 48. Ikeda Y, Swain A, Weber TJ i sur. Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: Potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol.* 1996;10(10):1261–72.
 49. Tamai KT, Monaco L, Alastalo TP, Lalli E, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Hormonal and developmental regulation of DAX-1 expression in Sertoli cells. *Mol Endocrinol.* 1996;10(12):1561–9.

50. Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature*. 1998;391(6669):761–7.
51. McCabe ERB. DAX1: Increasing complexity in the roles of this novel nuclear receptor. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;265-266:179–82.
52. Meeks JJ, Crawford SE, Russell TA, Morohashi KI, Weiss J, Jameson JL. Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development*. 2003;130(5):1029–36.
53. Yu T, Wang J, Yu Y i sur. X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism: Identification and in vitro study of a novel small indel in the NR0B1 gene. *Mol Med Rep*. 2016;13(5):4039–45.
54. Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol*. 1999;215(2):208–20.
55. Raymond CS, Murphy MW, O’Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev*. 2000;14(20): 2587-2595.
56. Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*. 2011;476(7358):101–5.
57. Lindeman RE, Gearhart MD, Minkina A, Krentz AD, Bardwell VJ, Zarkower D. Sexual cell-fate reprogramming in the ovary by DMRT1. *Curr Biol*. 2015;25(6):764–71.
58. Pedone E, Marucci L. Role of β -catenin activation levels and fluctuations in controlling cell fate. *Genes*. 2019;10(2):176.
59. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*. 1999;397(6718):405–9.
60. Zhou L, Chakraborty T, Zhou Q, Mohapatra S, Nagahama Y, Zhang Y. Rspo1-activated signalling molecules are sufficient to induce ovarian differentiation in XY medaka (*Oryzias latipes*). *Sci Rep*. 2016;6:19543.
61. Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination-insights from humans

and mice. *Chromosom Res.* 2012;20(1):215–38.

62. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K i sur. The murine winged-helix transcription factor *Foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development.* 2004;131(4):933–42.

63. Georges A, Auguste A, Bessière L, Vanet A, Todeschini AL, Veitia RA. *FOXL2*: A central transcription factor of the ovary. *J Mol Endocrinol.* 2014;52(1):R17-33.

64. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K i sur. Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by *FOXL2* Ablation. *Cell.* 2009;139(6):1130–42.

65. Weiss J, Meeks JJ, Hurley L, Raverot G, Frassetto A, Jameson JL. *Sox3* Is Required for Gonadal Function, but Not Sex Determination, in Males and Females. *Mol Cell Biol.* 2003;23(22):8084–91.

66. Richards J. Sex Determination : How Genes Determine a Developmental Choice. U: Richards J i Hawley RS, ur. *The Human Genome Third Edition*, Academic Press 2010, str. 273–98.

67. Haqq CM, Donahoe PK. Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiol Rev.* 1998;78(1):1–33.

68. Ammerpohl O, Bens S, Appari M i sur. Androgen Receptor Function Links Human Sexual Dimorphism to DNA Methylation. *PLoS One.* 2013;8(9):e73288.

69. Peterson MP, Rosvall KA, Choi JH i sur. Testosterone Affects Neural Gene Expression Differently in Male and Female Juncos: A Role for Hormones in Mediating Sexual Dimorphism and Conflict. *PLoS One.* 2013;8(4): e61784.

70. Snell DM, Turner JMA. Sex Chromosome Effects on Male–Female Differences in Mammals. *Curr Biol.* 2018;28(22):R1313–24.

71. Barrett SCH, Hough J. Sexual dimorphism in flowering plants. *J Exp Bot.* 2013;64(1):67–82.

72. Stehlik I, Barrett SCH. Mechanisms governing sex-ratio variation in dioecious *Rumex nivalis*. *Evolution.* 2005;59(4):814–25.

73. Sakai AK, Burris TA. Growth in male and female aspen clones: a twenty-five-year longitudinal study. *Ecology.* 1985;66(6):1921–7.

74. Cox RM, Calsbeek R. Sexually antagonistic selection, sexual dimorphism, and the resolution of intralocus sexual conflict. *Am Nat.* 2009;173(2):176–87.

75. Bateman AJ. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* (Edinb). 1948;2(3):349–68.
76. Trivers RL. Parental investment and sexual selection. U: Campbell BG, ur. *Sexual Selection and the Descent of Man: The Darwinian Pivot*. Routledge 2017, str. 136–79.
77. Shuster SM, Wade MJ. *Sexual Selection and Alternative Mating Strategies*. U: *Mating Systems and Strategies*, Vol. 61, Princeton University Press 2019, str. 386–422.
78. Janicke T, Häderer IK, Lajeunesse MJ, Anthes N. Evolutionary Biology: Darwinian sex roles confirmed across the animal kingdom. *Sci Adv*. 2016;2(2):e1500983.
79. Hosken DJ, House CM. Sexual selection. *Curr Biol*. 2011;21(2):R62–5.
80. McLean CJ, Garwood RJ, Brassey CA. Sexual dimorphism in the Arachnid orders. *PeerJ*. 2018;2018(11):1–59.
81. Wilder SM, Rypstra AL. Sexual size dimorphism mediates the occurrence of state-dependent sexual cannibalism in a wolf spider. *Anim Behav*. 2008;76(2):447–54.
82. Ota K, Kohda M, Sato T. Unusual allometry for sexual size dimorphism in a cichlid where males are extremely larger than females. *J Biosci*. 2010;35(2):257–65.
83. Schütz D, Pachler G, Ripmeester E, Goffinet O, Taborsky M. Reproductive investment of giants and dwarfs: Specialized tactics in a cichlid fish with alternative male morphs. *Funct Ecol*. 2010;24(1):131–40.
84. Andersson S, Ornborg J, Andersson M. Ultraviolet sexual dimorphism and assortative mating in blue tits. *Proc R Soc B Biol Sci*. 1998;265(1395):445–50.
85. Karubian J, Swaddle JP. Selection on females can create “larger males.” *Proc R Soc B Biol Sci*. 2001;268(1468):725–8.
86. Dale J, Dunn PO, Figuerola J, Lislevand T, Székely T, Whittingham LA. Sexual selection explains Rensch’s rule of allometry for sexual size dimorphism. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2007;274(1628):2971–9.
87. Lindenfors P, Tullberg BS, Biuw M. Phylogenetic analyses of sexual selection and sexual size dimorphism in pinnipeds. *Behav Ecol Sociobiol*.

2002;52(3):188–93.

88. Lindenfors P, Tullberg BS. Phylogenetic analyses of primate size evolution: The consequences of sexual selection. *Biol J Linn Soc.* 1998;64(4):413–47.

89. Van Hooff J. Males and females: The big little difference. U: Gijs Beets, Joop Schippers i Egbert R. te Velde, ur. *The Future of Motherhood in Western Societies: Late Fertility and its Consequences.* Springer 2011, str. 17–31.

90. Plavcan JM. Sexual dimorphism in primate evolution. *Am J Phys Anthropol.* 2001;Suppl33:25–53.

91. Plavcan JM, Ruff CB. Canine size, shape, and bending strength in primates and carnivores. *Am J Phys Anthropol.* 2008;136(1):65–84.

92. Federman DD. The Biology of Human Sex Differences. *N Engl J Med.* 2006;354(14):1507–14.

93. Pulit SL, Karaderi T, Lindgren CM. Sexual dimorphisms in genetic loci linked to body fat Distribution. *Biosci Rep.* 2017;37(1): BSR20160184.

94. Wells JCK. Sexual dimorphism of body composition. *Best Prac Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21(3):415–30.

95. Callewaert F, Sinnesael M, Gielen E, Boonen S, Vanderschueren D. Skeletal sexual dimorphism: Relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. *J Endocrinol.* 2010;207(2):127–34.

96. Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM, Ross R. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol.* 2000;89(1):81–8.

97. Frontera WR, Hughes VA, Lutz KJ, Evans WJ. A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45- to 78-yr-old men and women. *J Appl Physiol.* 1991;71(2):644–50.

98. Sparling PB, O'Donnell EM, Snow TK. The gender difference in distance running performance has plateaued: An analysis of world rankings from 1980 to 1996. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(12):1725–9.

99. Dominelli PB, Ripoll JG, Cross TJ i sur. Sex differences in large conducting airway anatomy. *J Appl Physiol.* 2018;125(3):960–5.

100. Torres-Tamayo N, García-Martínez D, Lois Zolniski S, Torres-Sánchez I,

- García-Río F, Bastir M. 3D analysis of sexual dimorphism in size, shape and breathing kinematics of human lungs. *J Anat.* 2018;232(2):227–37.
101. Nunn CL, Lindenfors P, Pursall ER, Rolff J. On sexual dimorphism in immune function. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2009;364(1513):61–9.
102. Jaillon S, Berthenet K, Garlanda C. Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019;56(3):308–21.
103. Bouman A, Jan Heineman M, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update.* 2005;11(4):411–23.
104. Konttinen YT, Stegaev V, MacKiewicz Z, Porola P, Hänninen A, Szodoray P. Salivary glands-an unisex organ? *Oral Dis.* 2010;16(7):577–85.
105. Srivastava A, Wang J, Zhou H, Melvin JE, Wong DT. Age and gender related differences in human parotid gland gene expression. *Arch Oral Biol.* 2008;53(11):1058–70.
106. Ueno H, Arij E, Izumi M, Uetani M, Hayashi K, Nakamura T. MR imaging of the lacrimal gland: Age-related and gender-dependent changes in size and structure. *Acta radiol.* 1996;37(5):714–9.
107. Rehman KS, Carr BR. Sex differences in adrenal androgens. *Semin Reprod Med.* 2004;22(4):349–60.
108. Tahaei E, Coleman R, Saritas T, Ellison DH, Welling PA. Distal convoluted tubule sexual dimorphism revealed by advanced 3D imaging. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2020;319(5): F754-F764.
109. Dhir RN, Dworakowski W, Thangavel C, Shapiro BH. Sexually dimorphic regulation of hepatic isoforms of human cytochrome P450 by growth hormone. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(1):87–94.
110. Waxman DJ, Holloway MG. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol Pharmacol.* 2009;76(2):215–28.
111. MacMaster FP, Keshavan M, Mirza Y i sur. Development and sexual dimorphism of the pituitary gland. *Life Sci.* 2007;80(10):940–4.
112. Mittendorfer B. Sexual dimorphism in human lipid metabolism. *J Nutr.* 2005;135(4):681–6.
113. Wang X, Magkos F, Mittendorfer B. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: It's not just about sex hormones. *J Clin Endocrinol Metab.*

2011;96(4):885–93.

114. Gur RC, Turetsky BI, Matsui M i sur. Sex differences in brain gray and white matter in healthy young adults: Correlations with cognitive performance. *J Neurosci.* 1999;19(10):4065–72.

115. Mutlu AK, Schneider M, Debbané M, Badoud D, Eliez S, Schaer M. Sex differences in thickness, and folding developments throughout the cortex. *Neuroimage.* 2013;82:200–7.

116. Sacher J, Neumann J, Okon-Singer H, Gotowiec S, Villringer A. Sexual dimorphism in the human brain: Evidence from neuroimaging. *Magn Reson Imaging.* 2013;31(3):366–75.

117. Gong G, He Y, Evans AC. Brain connectivity: Gender makes a difference. *Neuroscientist.* 2011;17(5):575–91.

118. Szalkai B, Varga B, Grolmusz V. Brain size bias compensated graph-theoretical parameters are also better in women's structural connectomes. *Brain Imaging Behav.* 2018;12(3):663–73.

119. Miller DI, Halpern DF. The new science of cognitive sex differences. *Trends Cogn Sci.* 2014;18(1):37–45.

120. Haier RJ, Jung RE, Yeo RA, Head K, Alkire MT. The neuroanatomy of general intelligence: Sex matters. *Neuroimage.* 2005;25(1):320–7.

121. Tsukahara S, Morishita M. Sexually Dimorphic Formation of the Preoptic Area and the Bed Nucleus of the Stria Terminalis by Neuroestrogens. *Front. Neurosci.* 2020;14:797.

122. Lenz KM, McCarthy MM. Organized for sex - steroid hormones and the developing hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 2010;32(12):2096–104.

123. Bramble MS, Lipson A, Vashist N, Vilain E. Effects of chromosomal sex and hormonal influences on shaping sex differences in brain and behavior: Lessons from cases of disorders of sex development. *J Neurosci Res.* 2017;95(1-2):65–74.

124. Büdefeld T, Grgurevic N, Tobet SA, Majdic G. Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. *Dev Neurobiol.* 2008;68(7):981–95.

125. Büdefeld T, Tobet SA, Majdič G. Gonadal Hormone Independent Sex

Differences in Steroidogenic Factor 1 Knockout Mice Brain. *Slov Vet Zb.* 2010;47(4):167–70.

126. Büdefeld T, Tobet SA, Majdic G. Altered position of cell bodies and fibers in the ventromedial region in SF-1 knockout mice. *Exp Neurol.* 2011;232(2):176–84.

127. Knoll JG, Wolfe CA, Tobet SA. Estrogen modulates neuronal movements within the developing preoptic area/anterior hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 2007;26(5):1091–9.

128. Majdic G, Tobet S. Cooperation of sex chromosomal genes and endocrine influences for hypothalamic sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol.* 2011;32(2):137–45.

129. Pollitzer E. Biology: Cell sex matters. *Nature.* 2013;500(7460):23–4.

130. Deasy BM, Lu A, Tebbets JC i sur. A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: Female cells have higher muscle regeneration efficiency. *J Cell Biol.* 2007;177(1):73–86.

131. Penalosa C, Estevez B, Orlanski S i sur. Sex of the cell dictates its response: differential gene expression and sensitivity to cell death inducing stress in male and female cells. *FASEB J.* 2009;23(6):1869–79.

132. Mittelstrass K, Ried JS, Yu Z i sur. Discovery of sexual dimorphisms in metabolic and genetic biomarkers. *PLoS Genet.* 2011;7(8):e1002215.

133. Gershoni M, Pietrokovski S. The landscape of sex-differential transcriptome and its consequent selection in human adults. *BMC Biol.* 2017;15(1):7.

134. Gershoni M, Pietrokovski S. Reduced selection and accumulation of deleterious mutations in genes exclusively expressed in men. *Nat Commun.* 2014;5:4438.

135. Marais GAB, Gaillard JM, Vieira C i sur. Sex gap in aging and longevity: can sex chromosomes play a role? *Biol Sex Differ.* 2018;9:33

136. Maklakov AA, Lummaa V. Evolution of sex differences in lifespan and aging: Causes and constraints. *Bioessays.* 2013;35(8):717–24.

137. Austad SN, Fischer KE. Sex Differences in Lifespan. *Cell Metab.* 2016;23(6):1022–33.

138. Durazzo M, Belci P, Collo A i sur. Gender specific medicine in liver diseases: A point of view. *World J Gastroenterol*. 2014;20(9):2127–35.
139. Franconi F, Rosano G, Campesi I. Need for gender-specific pre-analytical testing: The dark side of the moon in laboratory testing. *Int J Cardiol*. 2015;179:514–35.
140. Zucker I, Beery AK. Males still dominate animal studies. *Nature*. 2010;465(7299):690.
141. Mehta LS, Beckie TM, DeVon HA i sur. Acute Myocardial Infarction in Women: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(9):916–47.
142. De Luca L, Marini M, Gonzini L i sur. Contemporary trends and age-specific sex differences in management and outcome for patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(12):1–13.
143. Clocchiatti A, Cora E, Zhang Y, Dotto GP. Sexual dimorphism in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(5):330–9.
144. Straface E, Gambardella L, Brandani M, Malorni W. Sex differences at cellular level: Cells have a sex. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;214:49–65.
145. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*. 2005;434(7031):400–4.
146. Pinheiro I, Dejager L, Libert C. X-chromosome-located microRNAs in immunity: Might they explain male/female differences? The X chromosome-genomic context may affect X-located miRNAs and downstream signaling, thereby contributing to the enhanced immune response of females. *Bioessays*. 2011;33(11):791–802.
147. Gal-Oz ST, Maier B, Yoshida H i sur. ImmGen report: sexual dimorphism in the immune system transcriptome. *Nat Commun*. 2019;10(1):4295(1).
148. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):626–38.
149. Pennell LM, Galligan CL, Fish EN. Sex affects immunity. *J Autoimmun*. 2012;38(2-3):J282–91.
150. Finley JK, Farmer D, Emmerson E, Pacheco NC, Knox SM. Manipulating the murine lacrimal gland. *J Vis Exp*. 2014;(93): e51970.

151. Payne AP. The harderian gland: a tercentennial review. *J Anat.* 1994;185 (Pt1):1–49.
152. R. Hebel und M. W. Stromberg: *Anatomy of the Laboratory Rat*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1976, str. 146-48.
153. Schechter JE, Warren DW, Mircheff AK. A lacrimal gland is a lacrimal gland, but rodent's and rabbit's are not human. *Ocul Surf.* 2010;8(3):111–34.
154. Treuting PM, Wong R, Daniel CT, Phan I. Special senses: Eye U: Treuting PM i Dintzis DM, ur. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. Academic Press 2012. str. 395-418.
155. Alexander JH, van Lennep EW, Young JA. Water and electrolyte secretion by the exorbital lacrimal gland of the rat studied by micropuncture and catheterization techniques. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 1972;337(4):299–309.
156. Mircheff AK. Lacrimal fluid and electrolyte secretion: A review. *Curr Eye Res.* 1989;8(6):607–17.
157. Hennigar RA, Schulte BA, Spicer SS. Immunolocalization of carbonic anhydrase isozymes in rat and mouse salivary and exorbital lacrimal glands. *Anat Rec.* 1983;207(4):605–14.
158. Alexander JH, Young JA, van Lennep EW. The ultrastructure of the duct system in the rat extraorbital lacrimal gland. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1973;144(4):453–66.
159. Dartt DA. Signal transduction and control of lacrimal Gland protein secretion: A review. *Curr Eye Res.* 1989;8(6):619–36.
160. Dartt DA, Møller M, Poulsen JH. Lacrimal gland electrolyte and water secretion in the rabbit: localization and role of (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase. *J Physiol.* 1981;321(1):557–69.
161. Ding C, Walcott B, Keyser KT. Sympathetic neural control of the mouse lacrimal gland. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(4):1513-20.
162. Tiffany J. The normal tear film. *Dev Ophthalmol.* 2008;41:1–20.
163. Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):347–60.
164. Warwick R. Eugene Wolff's *Anatomy of the Eye and Orbit*. *Optom Vis Sci.* 1977;54(7):496.

165. Sweeney DF, Millar TJ, Raju SR. Tear film stability: A review. *Exp Eye Res.* 2013;117:28–38.
166. Tirindelli R, Dibattista M, Pifferi S, Menini A. From pheromones to behavior. *Physiol Rev.* 2009;89(3):921–56.
167. Ferrero DM, Moeller LM, Osakada T i sur. A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behaviour through the vomeronasal system. *Nature.* 2013;502(7471):368–71.
168. Kimoto H, Haga S, Sato K, Touhara K. Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature.* 2005;437(7060):898–901.
169. Abe T, Touhara K. Structure and function of a peptide pheromone family that stimulate the vomeronasal sensory system in mice. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(4):873–7.
170. Cavaliere RM, Ghirardi F, Tirindelli R. Lacrimal gland removal impairs sexual behavior in mice. *Front Neuroanat.* 2014;8:101.
171. Kimoto H, Sato K, Nodari F, Haga S, Holy TE, Touhara K. Sex- and Strain-Specific Expression and Vomeronasal Activity of Mouse ESP Family Peptides. *Curr Biol.* 2007;17(21):1879–84.
172. Baum MJ. Sexual differentiation of pheromone processing: Links to male-typical mating behavior and partner preference. *Horm Behav.* 2009;55(5):579–88.
173. Hasson O. Emotional tears as biological signals. *Evol Psychol.* 2009;7(3):363–70.
174. Gelstein S, Yeshurun Y, Rozenkrantz L i sur. Human tears contain a chemosignal. *Science.* 2011;331(6014):226–30.
175. Pinkstaff CA. Salivary gland sexual dimorphism: A brief review. *Eur J Morphol.* 1998;36 Suppl:31–4.
176. Lacassagne A. Dimorphisme sexuel de la glande sous-maxillaire chez la souris. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1940;133:180–1.
177. Junqueira LC, Fajer A, Rabinovitch M, Frankenthal L. Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. *J Cell Comp Physiol.* 1949;34(1):129–58.

178. Pardini LC, Taga R. Stereological Study of the Sexual Dimorphism in Mouse Submandibular Glands. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 1996;73(2–3):119–24.
179. Caramia F. Ultrastructure of mouse submaxillary gland. I. Sexual differences. *J Ultrastructure Res.* 1966;16(5–6):505–23.
180. Treister NS, Richards SM, Lombardi MJ, Rowley P, Jensen R V., Sullivan DA. Sex-related differences in gene expression in salivary glands of BALB/c mice. *J Dent Res.* 2005;84(2):160–5.
181. Cornell-Bell AH, Sullivan DA, Allansmith MR. Gender-related differences in the morphology of the lacrimal gland. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1985;26(8):1170–5.
182. Sashima M, Hatakeyama S, Satoh M, Suzuki A. Harderianization is another sexual dimorphism of rat exorbital lacrimal gland. *Cells Tissues Organs.* 1989;135(4):303–6.
183. Ferrara D, Monteforte R, Baccari GC, Minucci S, Chieffi G. Androgen and estrogen receptors expression in the rat exorbital lacrimal gland in relation to “harderianization.” *J Exp Zool Part A Comp Exp Biol.* 2004;301(4):297–306.
184. Ježek D, Banek L, Banek T. Effects of orchietomy on the rat parotid gland -an ultrastructural and stereological study. *Cells Tissues Organs.* 1996;155(3):172–83.
185. Ježek D, Banek L, Pezerović-Panijan R, Pezerović D. Quantitative study on the rat parotid gland after orchietomy. *Vet Arh.* 1999;69(1):49–59.
186. Ježek D, Banek L, Jurić-Lekić G, Grgić M. Effects of orchietomy on the structure of the exorbital lacrimal gland acini in the rat - A histologic and morphometric study. *Vet Arh.* 1996;66(5):189–97.
187. Dzierzykray-Rogalska I, Chodynicky S, Wisniewski L. The Effect of Gonadectomy on the Parotid Salivary Gland and Loeventhal's Gland in White Mice. *Acta Med Pol.* 1963;4:221–8.
188. Chrétien M. Action of Testosterone on the Differentiation and Secretory Activity of a Target Organ: The Submaxillary Gland of the Mouse. *Int Rev Cytol.* 1977;50(C):333–96.
189. Sawada K, Noumura T. Effects of castration and sex steroids on sexually dimorphic development of the mouse submandibular gland. *Acta Anat (Basel).*

1991;140(2):97–103.

190. Morrell JI, Gresik EW, Barka T. Autoradiographic localization of dihydrotestosterone binding in the major salivary glands and other androgen-responsive organs of the mouse. *J Histochem Cytochem.* 1987;35(10):1053–8.

191. Richards SM, Liu M, Jensen R V. i sur. Androgen regulation of gene expression in the mouse lacrimal gland. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;96(5):401–13.

192. Vanaken H, Vercaeren I, Claessens F i sur. Primary rat lacrimal cells undergo acinar-like morphogenesis on reconstituted basement membrane and express secretory component under androgen stimulation. *Exp Cell Res.* 1998;238(2):377–88.

193. Rocha FJ, Wickham LA, Pena JDO i sur. Influence of gender and the endocrine environment on the distribution of androgen receptors in the lacrimal gland. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993;46(6):737–49.

194. Rocha FJ, Kelleher RS, Edwards JA, Pena JDO, Ono M, Sullivan DA. Binding Characteristics, Immunocytochemical Location and Hormonal Regulation of Androgen Receptors in Lacrimal Tissue. U: Sullivan DA, ur. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 350, Springer, Boston, MA 1994, str.157–60.

195. Sullivan DA, Krenzer KL, Sullivan BD, Tolls DB, Toda I, Dana MR. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(6):1261–5.

196. McClellan KA, Robertson FG, Kindblom J i sur. Investigation of the role of prolactin in the development and function of the lacrimal and Harderian glands using genetically modified mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):23–30.

197. Suzuki T, Schirra F, Richards SM i sur. Estrogen's and progesterone's impact on gene expression in the mouse lacrimal gland. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(1):158–68.

198. Darabad RR, Suzuki T, Richards SM i sur. Does estrogen deficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous-deficient dry eye in mice? *Exp Eye Res.* 2014;127:153–60.

199. Paliwal A, De PK. Marked sexual dimorphism of lacrimal gland peroxidase

- in hamster: Repression by androgens and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(4):1286–93.
200. Remington SG, Nelson JD. Secretoglobins: Sexually dimorphic expression of androgen-binding protein mRNA in mouse lacrimal glands. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(1):31–8.
201. Acevedo-Rocha CG. The synthetic nature of biology. U: Hagen K, Engelhard M i Toepfer G, ur. *Ambivalences of Creating Life: Societal and Philosophical Dimensions of Synthetic Biology*, Springer International Publishing 2016, str. 9–53.
202. Hobom B. Genchirurgie: an der Schwelle zur synthetischen Biologie. *Med Klin.* 1980;75(24):834–41.
203. Benner SA, Sismour AM. Synthetic biology [Internet]. *Nat Rev Genet.* 2005;6(7):533–43.
204. Brent R. A partnership between biology and engineering. *Nat Biotechnol.* 2004;22(10):1211–4.
205. Breitling R, Takano E, Gardner TS. Judging synthetic biology risks. *Science* 2015;347(6218):107.
206. Modric T, Mergia A. The use of viral vectors in introducing genes into agricultural animal species. *Anim Biotechnol.* 2009;20(4):216–30.
207. Gunn KS, Singh N, Giambrone J, Wu H. Using transgenic plants as bioreactors to produce edible vaccines. *J Biotech Res.* 2012;4(1):92–9.
208. Zerbini FM, Silva FN, Urquiza GPC, Basso MF. Transgenic Plants. U: Borem A i Fritsche-Neto R: *Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. Academic Press 2014, str. 179–99.
209. Houdebine LM. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res.* 2000;9(4-5):305–20.
210. Wang Y, Zhao S, Bai L, Fan J, Liu E. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *Biomed Res Int.* 2013;2013(58046):1-9
211. Tadesse T, Koricho D. Biomedical Application and Future Prospects of Transgenic Animal: Review. *J Nat Sci Res.* 2017;7(23):82–8.
212. Doyle A, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ. The construction of transgenic and

- gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res.* 2012;21(2):327–49.
213. Houdebine LM. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J Biotechnol.* 2002;98(2-3):145–60.
214. Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(4):1250–4.
215. Genentech. First Recombinant DNA Product Approved By The Food And Drug Administration. Genentech Press Releases, 1982, str. 1. Dostupno na: <http://www.gene.com/media/press-releases/4193/1982-10-29/first-recombinant-dna-product-approved-b>.
216. Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science.* 1991;252(5013):1668–75.
217. Keasling JD. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science.* 2010;330(6009):1355–8.
218. Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: Generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science.* 2002;297(5583):1016–8.
219. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV i sur. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science.* 2005;310(5745):77–80.
220. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C i sur. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science.* 2010;329(5987):52–6.
221. Montague MG, Lartigue C, Vashee S. Synthetic genomics: Potential and limitations. *Curr Opin Biotechnol.* 2012;23(5):659–65.
222. Annaluru N, Muller H, Mitchell LA i sur. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science.* 2014;344(6179):55–8.
223. Pezeshki A, Ovsyannikova IG, McKinney BA, Poland GA, Kennedy RB. The role of systems biology approaches in determining molecular signatures for the development of more effective vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2019;18(3):253–67.
224. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era.

Clin Microbiol Rev. 2019;32(2):1–25.

225. Jasin M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. Trends Genet. 1996;12(6):224–8.

226. Porteus MH, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases. Nat Biotechnol. 2005;23(8):967–73.

227. Sun N, Zhao H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. Biotechnol Bioeng. 2013;110(7):1811–21.

228. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol. 2013;31(7):397–405.

229. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: Prospects and challenges. Nat Med. 2015;21(2):121–31.

230. Pennisi E. The CRISPR craze. Science. 2013;341(6148):833–6.

231. Loureiro A, Da Silva GJ. Crispr-cas: Converting a bacterial defence mechanism into a state-of-the-art genetic manipulation tool. Antibiotics. 2019;8(1):18.

232. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science. 2014;346(6213):1258096.

233. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. Nature. 2020;578(7794):229–36.

234. Schwank G, Koo BK, Sasselli V i sur. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. Cell Stem Cell. 2013;13(6):653–8.

235. Li C, Ding L, Sun CW i sur. Novel HDAd/EBV Reprogramming Vector and Highly Efficient Ad/CRISPR-Cas Sickle Cell Disease Gene Correction. Sci Rep. 2016;6:30422.

236. Liu T, Shen JK, Li Z, Choy E, Hornicek FJ, Duan Z. Development and potential applications of CRISPR-Cas9 genome editing technology in sarcoma. Cancer Lett. 2016;373(1):109–18.

237. Kennedy EM, Bassit LC, Mueller H i sur. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. Virology 2015;476:196–205.

238. Lin SR, Yang HC, Kuo YT i sur. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:e186.
239. Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol.* 2014;32(11):1141–5.
240. Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol.* 2013;31(3):233–9.
241. Baulieu EE. Neurosteroids: A novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology.* 1998;23(8):963–87.
242. Mellon SH, Griffin LD. Neurosteroids: Biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(1):35–43.
243. Kayes-Wandover KM, White PC. Steroidogenic Enzyme Gene Expression in the Human Heart. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2519–25.
244. Mueller M, Atanasov A, Cima I, Corazza N, Schoonjans K, Brunner T. Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines. *Endocrinology.* 2007;148(3):1445–53.
245. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids. Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016;42(1):15–31.
246. Kuo T, McQueen A, Chen TC, Wang JC. Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Adv Exp Med Biol.* 2015;872:99–126.
247. Selvaraj V, Stocco DM, Clark BJ. Current knowledge on the acute regulation of steroidogenesis. *Biol Reprod.* 2018;99(1):13–26.
248. Strauss JF, Modi B, McAllister JM. Defects in Ovarian Steroid Hormone Biosynthesis. U: *Cellular Endocrinology in Health and Disease.* Elsevier Inc. 2014, str.285-30.
249. Katagiri M, Kagawa N, Waterman MR. The role of cytochrome b5 in the biosynthesis of androgens by human P450c17. *Arch Biochem Biophys.* 1995;317(2):343–7.
250. Pandey AV., Miller WL. Regulation of 17,20 lyase activity by cytochrome b5 and by serine phosphorylation of P450c17. *J Biol Chem.*

2005;280(14):13265–71.

251. Kruegger RJ, Orme-Johnson NR. Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein. *J Biol Chem*. 1983;258(16):10159–67.

252. Pon LA, Hartigan JA, Orme-Johnson NR. Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. Rapid accumulation of a phosphoprotein. *J Biol Chem*. 1986;261(28):13309–16.

253. Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone- induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR). *J Biol Chem*. 1994;269(45):28314–22.

254. Miller WL. Early steps in androgen biosynthesis: From cholesterol to DHEA. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1998;12(1):67–81.

255. Penny MK, Finco I, Hammer GD. Cell signaling pathways in the adrenal cortex: Links to stem/progenitor biology and neoplasia. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;445:42–54.

256. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997;89(3):331–40.

257. Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(2):177–81.

258. Lucki NC, Sewer MB. The interplay between bioactive sphingolipids and steroid hormones. *Steroids*. 2010;75(6):390–9.

259. Sever R, Glass CK. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(3):1–5.

260. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M i sur. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*. 1995;83(6):835–9.

261. He J, Cheng Q, Xie W. Minireview: Nuclear receptor-controlled steroid hormone synthesis and metabolism. *Mol Endocrinol*. 2010;24(1):11–21.

262. Brivanlou AH, Darnell JE. Transcription: Signal transduction and the control of gene expression. *Science*. 2002;295(5556):813–8.

263. Mullican SE, DiSpirito JR, Lazar MA. The orphan nuclear receptors at their

- 25-year reunion. *J Mol Endocrinol*. 2013;51(3):115–40.
264. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):685–704.
265. Benoit G, Malewicz M, Perlmann T. Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: Insights from structural studies. *Trends Cell Biol*. 2004;14(7):369–76.
266. Ingraham HA, Redinbo MR. Orphan nuclear receptors adopted by crystallography. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;15(6):708–15.
267. Bupp MRG, Jorgensen TN. Androgen-induced immunosuppression. *Front Immunol*. 2018;9:794.
268. Swerdloff RS, Dudley RE, Page ST, Wang C, Salameh WA. Dihydrotestosterone: Biochemistry, physiology, and clinical implications of elevated blood levels. *Endocr Rev*. 2017;38(3):220–54.
269. Prough RA, Clark BJ, Klinge CM. Novel mechanisms for DHEA action. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(3):R139–55.
270. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(6):813–27.
271. Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ. Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol*. 2008;29(2):169–81.
272. Raudrant D, Rabe T. Progestogens with antiandrogenic properties. *Drugs*. 2003;63(5):463–92.
273. Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R i sur. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*. 2003;46(Suppl1):S7-16.
274. Davey RA, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev*. 2016;37(1):3–15.
275. Giovannelli P, Di Donato M, Galasso G, Di Zazzo E, Bilancio A, Migliaccio A. The androgen receptor in breast cancer. *Front Endocrinol*. 2018;9:492.
276. Mizushima T, Miyamoto H. The Role of Androgen Receptor Signaling in Ovarian Cancer. *Cells*. 2019;8(2):176.
277. Lala DS. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol*.

1992;6(8):1249–58.

278. Morohashi KI, Honda SI, Nomura M, Takayama K, Omura T. A transcription factor, Ad4BP, regulating all the steroidogenic P450 genes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 1992;3(Suppl):44–5.

279. Honda SI, Morohashi KI, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem*. 1993;268(10):7494–502.

280. Morohashi KI, Honda SI, Inomata Y, Handa H, Omura T. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J Biol Chem*. 1992;267(25):17913–9.

281. Ueda H, Sonoda S, Brown JL, Scott MP, Wu C. A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression. *Genes Dev*. 1990;4(4):624–35.

282. Lavorgna G, Ueda H, Clos J, Wu C. FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science*. 1991;252(5007):848–51.

283. Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP, Parker KL. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol*. 1993;7(7):852–60.

284. Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol*. 1993;13(9):5794–804.

285. Solomon IH, Hager JM, Safi R, McDonnell DP, Redinbo MR, Ortlund EA. Crystal structure of the human LHRH-1 DBD-DNA complex reveals Ftz-F1 domain positioning is required for receptor activity. *J Mol Biol*. 2005;354(5):1091–102.

286. Little TH, Zhang Y, Matulis CK i sur. Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: A helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. *Mol Endocrinol*. 2006;20(4):831–43.

287. Florence B, Handrow R, Laughon A. DNA-binding specificity of the fushi tarazu homeodomain. *Mol Cell Biol*. 1991;11(7):3613–23.

288. Desclozeaux M, Krylova IN, Horn F, Fletterick RJ, Ingraham HA.

- Phosphorylation and Intramolecular Stabilization of the Ligand Binding Domain in the Nuclear Receptor Steroidogenic Factor 1. *Mol Cell Biol.* 2002;22(20):7193–203.
289. Yoo J, Ko S, Kim H i sur. Crystal structure of Fushi tarazu factor 1 ligand binding domain/Fushi tarazu peptide complex identifies new class of nuclear receptors. *J Biol Chem.* 2011;286(36):31225–31.
290. Hammer GD, Krylova I, Zhang Y i sur. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: Integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell.* 1999;3(4):521–6.
291. Krylova IN, Sablin EP, Moore J i sur. Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell.* 2005;120(3):343–55.
292. Urs AN, Dammer E, Kelly S, Wang E, Merrill AH, Sewer MB. Steroidogenic factor-1 is a sphingolipid binding protein. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;265-266:174–8.
293. Li LA, Chiang EFL, Chen JC, Hsu NC, Chen YJ, Chung BC. Function of steroidogenic factor 1 domains in nuclear localization, transactivation, and interaction with transcription factor TFIIB and c-Jun. *Mol Endocrinol.* 1999;13(9):1588–98.
294. Gill G. Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(5):536–41.
295. Lyst MJ, Stancheva I. A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 6):1389–92.
296. Yang W-H, Heaton JH, Brevig H, Mukherjee S, Iñiguez-Lluhí JA, Hammer GD. SUMOylation Inhibits SF-1 Activity by Reducing CDK7-Mediated Serine 203 Phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2009;29(3):613–25.
297. Suda N, Shibata H, Kurihara I i sur. Coactivation of SF-1-mediated transcription of steroidogenic enzymes by Ubc9 and PIAS1. *Endocrinology.* 2011;152(6):2266–77.
298. Lee FY, Faivre EJ, Suzawa M i sur. Eliminating SF-1 (NR5A1) Sumoylation In Vivo Results in Ectopic Hedgehog Signaling and Disruption of Endocrine Development. *Dev Cell.* 2011;21(2):315–27.

299. Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL, White BA. Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol Endocrinol*. 1993;7(6):776–86.
300. Ramayya MS, Zhou J, Kino T, Segars JH, Bondy CA, Chrousos GP. Steroidogenic Factor 1 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Steroidogenic and Nonsteroidogenic Human Tissues: Northern Blot and in Situ Hybridization Studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(6):1799–806.
301. Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y i sur. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev*. 1994;8(19):2302–12.
302. Shinoda K, Lei H, Yoshii H i sur. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn*. 1995;204(1):22–9.
303. Patel M V., McKay IA, Burrin JM. Transcriptional regulators of steroidogenesis, DAX-1 and SF-1, are expressed in human skin. *J Invest Dermatol*. 2001;117(6):1559–65.
304. Morohashi KI, Tsuboi-Asai H, Matsushita S i sur. Structural and functional abnormalities in the spleen of an mFtz-F1 gene-disrupted mouse. *Blood*. 1999;93(5):1586–94.
305. Rice DA, Mouw AR, Bogerd AM, Parker KL. A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol Endocrinol*. 1991;5(10):1552–61.
306. Leers-Sucheta S, Morohashi KI, Mason JI, Melner MH. Synergistic activation of the human type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem*. 1997;272(12):7960–7.
307. Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M, Strauss JF. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry*. 1996;35(28):9052–9.
308. Saner KJ, Suzuki T, Sasano H i sur. Steroid sulfotransferase 2A1 gene transcription is regulated by steroidogenic factor 1 and GATA-6 in the human adrenal. *Mol Endocrinol*. 2005;19(1):184–97.

309. Val P, Lefrançois-Martinez AM, Veyssi re G, Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept*. 2003;1(1):8.
310. Buaas FW, Gardiner JR, Clayton S, Val P, Swain A. In vivo evidence for the crucial role of SF1 in steroid-producing cells of the testis, ovary and adrenal gland. *Development*. 2012;139(24):4561–70.
311. Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP, Zhao L, De Rooij DG, Themmen APN, et al. Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol*. 2004;18(7):1610–9.
312. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. The cell-specific nuclear receptor steroidogenic factor 1 plays multiple roles in reproductive function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1995;350(1333):279–83.
313. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG i sur. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(24):10939–43.
314. Crawford PA, Sadovsky Y, Milbrandt J. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 directs embryonic stem cells toward the steroidogenic lineage. *Mol Cell Biol*. 1997;17(7):3997–4006.
315. Syu JS, Baba T, Huang JY i sur. Lysosomal activity maintains glycolysis and cyclin E1 expression by mediating Ad4BP/SF-1 stability for proper steroidogenic cell growth. *Sci Rep*. 2017;7(1):240.
316. Baba T, Otake H, Sato T i sur. Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Nat Commun*. 2014;5:3634.
317. Lai PY, Wang CY, Chen WY i sur. Steroidogenic Factor 1 (NR5A1) resides in centrosomes and maintains genomic stability by controlling centrosome homeostasis. *Cell Death Differ*. 2011;18(12):1836–44.
318. Wang CY, Chen WY, Lai PY, Chung BC. Distinct functions of steroidogenic factor-1 (NR5A1) in the nucleus and the centrosome. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;371(1-2):148–53.
319. Karpova T, Ravichandiran K, Insisienmay L, Rice D, Agbor V, Heckert LL. Steroidogenic factor 1 differentially regulates fetal and adult leydig cell

- development in male mice. *Biol Reprod.* 2015;93(4):83–4.
320. Anamthathmakula P, Miryala CSJ, Moreci RS i sur. Steroidogenic Factor 1 (Nr5a1) is Required for Sertoli Cell Survival Post Sex Determination. *Sci Rep.* 2019;9(1):4452.
321. Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M i sur. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev.* 1999;87(1–2):175–80.
322. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol.* 1994;8(5):654–62.
323. Nomura M, Bartsch S, Nawata H, Omura T, Morohashi KI. An E box element is required for the expression of the ad4bp gene, a mammalian homologue of ftz-f1 gene, which is essential for adrenal and gonadal development. *J Biol Chem.* 1995;270(13):7453–61.
324. Cui S, Ross A, Stallings N, Parker KL, Capel B, Quaggin SE. Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. *Development.* 2004;131(16):4095–105.
325. Val P, Martinez-Barbera JP, Swain A. Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Development.* 2007;134(12):2349–58.
326. Gardiner JR, Shima Y, Morohashi KI, Swain A. SF-1 expression during adrenal development and tumourigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(1):12–8.
327. Shima Y, Miyabayashi K, Baba T i sur. Identification of an enhancer in the Ad4BP/SF-1 gene specific for fetal leydig cells. *Endocrinology.* 2012;153(1):417–25.
328. Shima Y, Zubair M, Ishihara S i sur. Ventromedial hypothalamic nucleus-specific enhancer of Ad4BP/SF-1 gene. *Mol Endocrinol.* 2005;19(11):2812–23.
329. Xing Y, Morohashi KI, Ingraham HA, Hammer GD. Timing of adrenal regression controlled by synergistic interaction between Sf1 SUMOylation and Dax1. *Dev.* 2017;144(20):3798–807.
330. Hoivik EA, Bjanesoy TE, Mai O i sur. DNA methylation of intronic

- enhancers directs tissue-specific expression of steroidogenic factor 1/adrenal 4 binding protein (SF-1/Ad4BP). *Endocrinology*. 2011;152(5):2100–12.
331. Knower KC, Kelly S, Ludbrook LM i sur. Failure of SOX9 regulation in 46XY disorders of sex development with SRY, SOX9 and SF1 mutations. *PLoS One*. 2011;6(3):e17751.
332. Sekido R. SRY: A transcriptional activator of mammalian testis determination. Vol. 42, *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(3):417–20.
333. Shen JHC, Ingraham HA. Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol Endocrinol*. 2002;16(3):529–40.
334. Takasawa K, Kashimada K, Pelosi E i sur. FOXL2 transcriptionally represses Sf1 expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice. *FASEB J*. 2014;28(5):2020–8.
335. Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S, Morohashi KI. Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev Dyn*. 2001;220(4):363–76.
336. Shen WH, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: A link to the sex determination cascade. *Cell*. 1994;77(5):651–61.
337. Jin H, Won M, Park SE, Lee S, Park M, Bae J. FOXL2 is an essential activator of SF-1-Induced transcriptional regulation of anti-müllerian hormone in human granulosa cells. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159112
338. Krause WC, Ingraham HA. Origins and functions of the ventrolateral VMH: A complex neuronal cluster orchestrating sex differences in metabolism and behavior. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1043:199–213.
339. Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol*. 1995;9(4):478–86.
340. Cheung CC, Kurrasch DM, Liang JK, Ingraham HA. Genetic labeling of steroidogenic factor-1 (SF-1) neurons in mice reveals ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) circuitry beginning at neurogenesis and development of a separate non-SF-1 neuronal cluster in the ventrolateral VMH. *J Comp Neurol*.

2013;521(6):1268–88.

341. Viskaitis P, Irvine EE, Smith MA i sur. Modulation of SF1 Neuron Activity Coordinately Regulates Both Feeding Behavior and Associated Emotional States. *Cell Rep.* 2017;21(12):3559–72.

342. Kim KW, Sohn JW, Kohno D, Xu Y, Williams K, Elmquist JK. SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: A key regulator of homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;336(1-2):219–23.

343. Choi YH, Fujikawa T, Lee J, Reuter A, Kim KW. Revisiting the ventral medial nucleus of the hypothalamus: The roles of SF-1 neurons in energy homeostasis. *Front Neurosci.* 2013;7:71

344. Lee J, Yang DJ, Lee S, Hammer GD, Kim KW, Elmquist JK. Nutritional conditions regulate transcriptional activity of SF-1 by controlling sumoylation and ubiquitination. *Sci Rep.* 2016;6:19143.

345. Lalli E, Doghman M, Latre de Late P, El Wakil A, Mus-Veteau I. Beyond steroidogenesis: Novel target genes for SF-1 discovered by genomics. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;371(1-2):154–9.

346. Kotomura N, Ninomiya Y, Umesono K, Niwa O. Transcriptional regulation by competition between ELP isoforms and nuclear receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;230(2):407–12.

347. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 1994;77(4):481–90.

348. Dellovade TL, Young M, Ross EP i sur. Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. *J Comp Neurol.* 2000;423(4):579–89.

349. Zhao L, Bakke M, Krimkevich Y i sur. Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development.* 2001;128(2):147–54.

350. Büdefeld T, Tobet SA, Majdic G. The Influence of Gonadal Steroid Hormones on Immunoreactive Kisspeptin in the Preoptic Area and Arcuate Nucleus of Developing Agonadal Mice with a Genetic Disruption of Steroidogenic Factor 1. *Neuroendocrinology.* 2016;103(3–4):248–58.

351. Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E i sur. Knockout mice lacking

- steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*. 2002;143(2):607–14.
352. Pelusi C, Ikeda Y, Zubair M, Parker KL. Impaired follicle development and infertility in female mice lacking steroidogenic factor 1 in ovarian granulosa cells. *Biol Reprod*. 2008;79(6):1074–83.
353. Zhao L, Ki WK, Ikeda Y i sur. Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior. *Mol Endocrinol*. 2008;22(6):1403–15.
354. Zhao L, Bakke M, Parker KL. Pituitary-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;185(1–2):27–32.
355. Kim KW, Li S, Zhao H i sur. CNS-specific ablation of steroidogenic factor 1 results in impaired female reproductive function. *Mol Endocrinol*. 2010;24(6):1240–50.
356. Grgurevic N, Büdefeld T, Spanic T, Tobet SA, Majdic G. Evidence that sex chromosome genes affect sexual differentiation of female sexual behavior. *Horm Behav*. 2012;61(5):719–24.
357. Spanic T, Grgurevic N, Majdic G. Haploinsufficiency for steroidogenic factor 1 affects maternal behavior in mice. *Front Behav Neurosci*. 2016;10:131
358. Bland ML, Fowkes RC, Ingraham HA. Differential requirement for steroidogenic factor-1 gene dosage in adrenal development versus endocrine function. *Mol Endocrinol*. 2004;18(4):941–52.
359. Grgurevic N, Büdefeld T, Rissman EF, Tobet SA, Majdic G. Aggressive Behaviors in Adult SF-1 Knockout Mice That Are Not Exposed to Gonadal Steroids During Development. *Behav Neurosci*. 2008;122(4):876–84.
360. Kim KW, Jo YH, Zhao L, Stallings NR, Chua SC, Parker KL. Steroidogenic factor 1 regulates expression of the cannabinoid receptor 1 in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol*. 2008;22(8):1950–61.
361. Griffiths DA. Shifting syndromes: Sex chromosome variations and intersex classifications. *Soc Stud Sci*. 2018;48(1):125–48.
362. Witchel SF. Disorders of sex development. *Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;48:90–102.
363. Martínez de LaPiscina I, Mahmoud RA, Sauter KS i sur. Variants of STAR,

AMH and ZFPM2/FOG2 may contribute towards the broad phenotype observed in 46,XY DSD patients with heterozygous variants of NR5A1. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8554

364. Robevska G, van den Bergen JA, Ohnesorg T i sur. Functional characterization of novel NR5A1 variants reveals multiple complex roles in disorders of sex development. *Hum Mutat.* 2018;39(1):124–39.

365. Lin L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B i sur. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):991–9.

366. El-Khairi R, Martinez-Aguayo A, Ferraz-De-Souza B, Lin L, Achermann JC. Role of DAX-1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (NR5A1) in human adrenal function. *Endocr Dev.* 2011;20:38–46.

367. Ferraz-de-Souza B, Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;336(1-2):198–205.

368. Köhler B, Achermann JC. Update - Steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1). *Minerva Endocrinol.* 2010;35(2):72–85.

369. Domenice S, Zamboni Machado A, Moraes Ferreira F i sur. Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46,XY and 46,XX individuals. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2016;108(4):309–20.

370. El-Khairi R, Achermann J. Steroidogenic factor-1 and human disease. *Semin Reprod Med.* 2012;30(5):374–81.

371. Zangen D, Kaufman Y, Banne E i sur. Testicular differentiation factor SF-1 is required for human spleen development. *J Clin Invest.* 2014;124(5):2071–5.

372. Malikova J, Camats N, Fernández-Cancio M i sur. Human NR5A1/SF-1 mutations show decreased activity on BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), an important regulator of energy balance: Testing impact of novel SF-1 mutations beyond steroidogenesis. *PLoS One.* 2014;9(8):e104838.

373. Rocha EM, Wickham LA, da Silveira LA i sur. Identification of androgen receptor protein and 5 α -reductase mRNA in human ocular tissues. *Br J Ophthalmol.* 2000;84(1):76–84.

374. Burgoyne PS, Arnold AP. A primer on the use of mouse models for

identifying direct sex chromosome effects that cause sex differences in non-gonadal tissues. *Biol Sex Differ*. 2016;7:68.

375. Arnold AP, Chen X, Itoh Y. What a difference an X or Y makes: Sex chromosomes, gene dose, and epigenetics in sexual differentiation. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;214:67–88.

376. Arnold AP. Rethinking sex determination of non-gonadal tissues. *Curr Top Dev Biol*. 2019;134:289–315.

377. Morohashi KI. Gonadal and extragonadal functions of Ad4BP/SF-1: Developmental aspects. *Trends Endocrinol Metab*. 1999;10(5):169–73.

378. Schimmer BP, White PC. Minireview: Steroidogenic factor 1: Its roles in differentiation, development, and disease. *Mol Endocrinol*. 2010;24(7):1322–37.

379. Doghman M, Figueiredo BC, Volante M, Papotti M, Lalli E. Integrative analysis of SF-1 transcription factor dosage impact on genome-wide binding and gene expression regulation. *Nucleic Acids Res*. 2013 Oct;41(19):8896–907.

380. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK i sur. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf*. 2017;15:276–83.

381. Nakamura S, Kinoshita S, Yokoi N i sur. Lacrimal hypofunction as a new mechanism of dry eye in visual display terminal users. *PLoS One*. 2010;5(6):e11119.

382. Tsubota K, Yokoi N, Watanabe H i sur. New Perspective on Dry Eye Classification: Proposal by the Asia Dry Eye Society. *Eye Contact Lens*. 2020;46Suppl 1(1):S2–13.

383. Sahai A, Malik P. Dry eye: Prevalence and attributable risk factors in a hospital-based population. *Indian J Ophthalmol*. 2005;53(2):87–91.

384. Yeo S, Tong L. Coping with dry eyes: A qualitative approach. *BMC Ophthalmol*. 2018;18(1):8

385. Zeev MS, Miller DD, Latkany R. Diagnosis of dry eye disease and emerging technologies. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:581–90.

386. Sullivan DA, Edwards JA, Wickham LA i sur. Identification and endocrine control of sex steroid binding sites in the lacrimal gland. *Curr Eye Res*. 1996;15(3):279-91.

387. Wickham LA, Gao J, Toda I, Rocha EM, Ono M, Sullivan DA. Identification

of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol Scand.* 2000;78(2):146–53.

388. Smith RE, Taylor CR, Rao NA, Young LL, Rife LL. Immunohistochemical identification of androgen receptors in human lacrimal glands. *Curr Eye Res.* 1999;18(4):300–9.

389. Draper CE, Adeghate E, Lawrence PA, Pallot DJ, Garner A, Singh J. Age-related changes in morphology and secretory responses of male rat lacrimal gland. *J Auton Nerv Syst.* 1998;69(2–3):173–83.

390. Goncharova OS, Manskikh VN. Age-related changes in the rat lacrimal gland: specific morphology and unknown nature. *Ontogenez.* 2014;45:289–98.

391. Ríos JD, Horikawa Y, Chen LL i sur. Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response. *Exp Eye Res.* 2005;80(4):477–91.

392. El-Fadaly AB, El-Shaarawy EAA, Rizk AA, Nasralla MM, Shuaib DMA. Age-related alterations in the lacrimal gland of adult albino rat: A light and electron microscopic study. *Ann Anat.* 2014;196(5):336–51.

393. Williams RM, Singh J, Sharkey KA. Innervation and mast cells of the rat exorbital lacrimal gland: the effects of age. *J Auton Nerv Syst.* 1994;47(1–2):95–108.

394. Truong S, Cole N, Stapleton F, Golebiowski B. Sex hormones and the dry eye. *Clin Exp Optom.* 2014;97(4):324–36.

395. Beauregard C, Brandt PC. Down regulation of interleukin-1 β -induced nitric oxide production in lacrimal gland acinar cells by sex steroids. *Curr Eye Res.* 2004;29(1):59–66.

396. Azzarolo AM, Wood RL, Mircheff AK i sur. Androgen influence on lacrimal gland apoptosis, necrosis, and lymphocytic infiltration. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(3):592-602.

397. Ainola M, Porola P, Takakubo Y i sur. Activation of plasmacytoid dendritic cells by apoptotic particles – mechanism for the loss of immunological tolerance in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2018;191(3):301–10.

398. Ubels JL, Wertz JT, Ingersoll KE, Jackson RS, Aupperlee MD. Down-regulation of androgen receptor expression and inhibition of lacrimal gland cell

- proliferation by retinoic acid. *Exp Eye Res.* 2002;75(5):561–71.
399. Azzarolo AM, Mircheff AK, Kaswan RL i sur. Androgen support of lacrimal gland function. *Endocrine.* 1997;6(1):39-45.
400. Versura P, Giannaccare G, Campos EC. Sex-steroid imbalance in females and dry eye. *Curr Eye Res.* 2015;40(2):162–75.
401. Rocha EM, Alves M, Rios JD, Dartt DA. The aging lacrimal gland: Changes in structure and function. *Ocul Surf.* 2008;6(4):162–74.
402. de Souza RG, de Paiva CS, Alves MR. Age-related autoimmune changes in lacrimal glands. *Immune Netw.* 2019;19(1):e3.
403. Mostafa S, Seamon V, Azzarolo AM. Influence of sex hormones and genetic predisposition in Sjögren's syndrome: A new clue to the immunopathogenesis of dry eye disease. *Exp Eye Res.* 2012;96(1):88–97.
404. Song X, Zhao P, Wang G, Zhao X. The effects of estrogen and androgen on tear secretion and matrix metalloproteinase-2 expression in lacrimal glands of ovariectomized rats. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2013;55(2):745–51.
405. Zhang X, Vimalin Jeyalatha M, Qu Y i sur. Dry eye management: Targeting the ocular surface microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1398.
406. Worda C, Nepp J, Huber JC, Sator MO. Treatment of keratoconjunctivitis sicca with topical androgen. *Maturitas.* 2001;37(3):209–12.
407. Li L, Kang Q, Wang S, Zheng X. Effects of androgen on ultrastructure of corneal epithelium and function of the tear film in BALB/c mice. *Cornea.* 2015;34(3):334–41.
408. Wang L, Deng Y. The applications of androgen in the treatment of dry eye disease: A systematic review of clinical studies. *Endocr J.* 2020;67(9):893–902.
409. Peng QH, Yao XL, Wu QL, Tan HY, Zhang JR. Effects of extract of *Buddleja officinalis* eye drops on androgen receptors of lacrimal gland cells of castrated rats with dry eye. *Int J Ophthalmol.* 2010;3(1):43–8.
410. Wang F, Peng QH, Yao XL, Wu QL, Li D. Effect of *Buddleia* flavonoids drug-containing plasma on the expression of STAT1 phosphoprotein in lacrimal gland epithelial cells in vitro. *Int J Ophthalmol.* 2010;10(1):5–8.
411. Wang F, Peng QH, Yao XL, Li HF, Chen JW, Li D. Intervention of *Buddleja officinalis* total flavonoids drug-containing plasma on the expression of AR mRNA

- in dry eye apoptosis model. *Int J Ophthalmol*. 2011;11(2):220–2.
412. Jiang N, Ye LH, Ye L i sur. Effect of mistletoe combined with carboxymethyl cellulose on dry eye in postmenopausal women. *Int J Ophthalmol*. 2017;10(11):1669–77.
413. Garg A, Zhang X. Lacrimal gland development: from signaling interactions to regenerative medicine. *Dev Dyn*. 2017;246(12):970–80.
414. Lee MJ, Kim DH, Ryu JS i sur. Topical TSG-6 administration protects the ocular surface in two mouse models of inflammation-related dry eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(9):5175–81.
415. Avila MY. Restoration of human lacrimal function following platelet-rich plasma injection. *Cornea*. 2014;33(1):18–21.
416. Beyazyıldız E, Pınarlı FA, Beyazyıldız Ö i sur. Efficacy of topical mesenchymal stem cell therapy in the treatment of experimental dry eye syndrome model. *Stem Cells Int*. 2014;2014:250230.
417. Hirayama M, Ko SBH, Kawakita T i sur. Identification of transcription factors that promote the differentiation of human pluripotent stem cells into lacrimal gland epithelium-like cells. *NPJ Aging Mech Dis*. 2017;3:1.

11. ŽIVOTOPIS

Kristina Šemanjski, dr. med., specijalist opće kirurgije, subspecijalist abdominalne kirurgije, Odjel za abdominalnu kirurgiju KB „Sveti Duh“

Kristina Šemanjski je rođena 05.09.1978. godine. Osnovnu i srednju školu završila je u Slavonskom Brodu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 1998., a diplomu stječe 2004. godine. Tijekom studija obavljala je dužnost demonstratora na Katedrama iz fizike, histologije i embriologije, patologije i interne medicine. Nakon završenog studija postaje znanstveni novak na Katedri za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i upisuje postdiplomski studij Biomedicina i zdravstvo. Specijalistički ispit iz opće kirurgije položila je 2012. godine, a subspecijalist abdominalne kirurgije postaje 2017. godine.

Uz rad na Odjelu za abdominalnu kirurgiju Klinike za kirurgiju KB „Sveti Duh“ sudjeluje kao vanjski suradnik u nastavi na hrvatskom i engleskom jeziku iz predmeta Histologija i embriologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te surađuje u aktualnom projektu CERRM-a *„the European Union through the European Regional Development Fund, Operational Programme Competitiveness and Cohesion, under Grant Agreement No. KK.01.1.1.01.0008, Reproductive and Regenerative Medicine—Exploring New Platforms and Potentials“*. Sudjelovala je u pisanju više znanstvenih i stručnih radova u domaćim i stranim časopisima, te kao predavač na brojnim domaćim i inozemnim medicinskim kongresima.