Izražaj pro-apoptotskih i anti-apoptotskih čimbenika u jajnicima i seroznim tumorima jajnika

Poljičanin, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:898255

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Ana Poljičanin

IZRAŽAJ PRO-APOPTOTSKIH I ANTI-APOPTOTSKIH ČIMBENIKA U JAJNICIMA I SEROZNIM TUMORIMA JAJNIKA

Doktorska disertacija

U Splitu, svibanj 2013.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Ana Poljičanin

IZRAŽAJ PRO-APOPTOTSKIH I ANTI-APOPTOTSKIH ČIMBENIKA U JAJNICIMA I SEROZNIM TUMORIMA JAJNIKA

Doktorska disertacija

U Splitu, svibanj 2013.

Doktorska disertacija je izrađena u *Laboratoriju za istraživanje ranog razvoja čovjeka* pri *Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu*.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Katarini Vukojević, dr.med. na iznimnoj stručnoj i prijateljskoj potpori te ukazanom povjerenju i vodstvu tijekom izrade *Doktorske disertacije*.

Zahvala svim djelatnicima *Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju*, a posebno prof. dr. sc. Mirni Saragi Babić, dr.med. na omogućavanju ugodnog rada tijekom izrade *Doktorske disertacije* pri *Zavodu*.

Zahvaljujem se gospođi Asji Miletić na stručnoj tehničkoj pomoći pri izradi histoloških preparata te svesrdnoj podršci.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima koji su presudne niti u mom tkanju života.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

1.1. Jajnik 1

1.1.1. Embrionalni razvoj jajnika 1

1.1.2. Histologija zdravog reproduktivnog i postmenopauzalnog jajnika 3

1.1.3. Atrezija u jajniku 5

1.2. Novotvorine jajnika 6

1.2.1. Epidemiologija 6

1.2.2. Epitelno- stromalni tumori 9

1.2.3. Serozni tumori 9

1.2.3.1. Kancerogeneza 10

1.3. Apoptoza 11

1.3.1. Apoptotski putevi 14

1.3.1.1. Kaspaza ovisni put apoptoze 15

1.3.1.2. Kaspaza neovisni put apoptoze 16

1.3.2. Apoptoza u seroznim tumorima jajnika 16

1.3.3. Pro-apoptotski i anti-apoptotski čimbenici 17

1.3.3.1. Kaspaza-3 17

1.3.3.2. Bcl-2 obitelj 19

1.3.3.3. Inzulinu sličan čimbenik rasta Igf-1 20

2. CILJEVI RADA I HIPOTEZE 22

3. ISPITANICI I POSTUPCI 24

3.1. Ispitanici 24

3.2. Postupci ... 25

3.2.1. Vođenje, uklapanje i rezanje tkiva ... 25

3.2.2. Imunohistokemijsko bojanje ... 25

3.2.3. Bojanje diaminobenzidinom (DAB) ... 26

3.2.4. Imunofuorescencijsko bojanje ... 27

3.2.5. Detekcija apoptotskih stanica TUNEL metodom ... 29

3.3. Semikvantifikacija pozitivnih stanica ... 29

3.4. Etička načela ... 30

4. REZULTATI ... 31

4.1. Fetalni ovarij u 15. tjednu razvoja ... 31

4.1.1. Imunohistokemijsko bojanje sa Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 protutijelima u 15. tjednu fetalnog razvoja ... 32

4.2. Fetalni ovarij u 22. tjednu razvoja ... 35

4.2.1. Imunohistokemijsko bojanje sa Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 protutijelima u 22. tjednu fetalnog razvoja ... 36

4.2.2. Dvostruko imunofluorescentno bojanje fetalnog jajnika na Bcl-2/Bax i kaspazu-3/TUNEL ... 38

4.3. Zdravi jajnik žene reproduktivne dobi ... 40

4.3.1. Imunohistokemijsko bojanje zdravog jajnika reproduktivne dobi sa Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 protutijelima ... 41

4.3.2. Dvostruko imunofluorescentno bojanje zdravog jajnika reproduktivne dobi na Bcl-2/Bax ... 45

4.4. Zdravi jajnik žene postmenopauzalne dobi ... 47

4.4.1. Imunohistokemijsko bojanje zdravog jajnika postmenopauzalne dobi sa Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 protutijelima 48

4.4.2. Dvostruko imunofluorescentno bojanje zdravog jajnika postmenopauzalne dobi na Bcl-2/Bax 50

4.5. Serozni tumor jajnika 51

4.5.1. Imunohistokemijsko bojanje seroznog tumora jajnika sa Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 protutijelima 52

4.5.2. Dvostruko imunofluorescentno bojanje seroznog tumora jajnika na Bcl-2/Bax 54

5. RASPRAVA 56

6. ZAKLJUČCI 64

7. LITERATURA 67

8. SAŽETAK 83

9. SUMMARY 84

10. ŽIVOTOPIS 85

POPIS OZNAKA I KRATICA:

AIF čimbenik indukcije apoptoze *(eng. Apoptotic Inducing Factor)*

Apaf-1 apoptotski aktivirajući faktor proteaze-1 **(***eng. Apoptotic protease activating factor)*

ATP adenozin trifosfat *(eng. Adenosine-5'-triphosphate)*

Bax Bcl-2 vezani X protein **(***eng. BCL2-associated X protein)*

Bcl-2 B stanični protein limfoma 2 **(***eng. B-cell lymphoma protein 2)*

BRAF **(***eng. v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B)*

CAD kaspazom aktivirana DN-aza (*eng. Caspase Activated Dnase*)

CRL duljina tjeme zadak *(eng. crown-rump length)*

DAB diaminobenzidin

DAPI 4,6-diamino-2-fenilindol

DNK deoksiribonukleinska kiselina

EDTA etilendiamintetraoctena kiselina (*eng.Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

FIGO Međunarodna federacija ginekologa i opstetričara *(eng. International Federation of Gynecology and Obstetrics)*

FITC fluorescein izotiocijanat *(eng. fluorescein isothiocyanate)*

FSH folikularni stimulirajući hormon *(eng. Follicle-stimulating hormone)*

Igf-1 inzulinu sličan čimbenik rasta- 1 *(eng. Insulin Like Growth Factor 1*)

IGFBP vežući protein za inzulinu sličan čimbenik rasta*(eng. Insulin-like growth factor-binding protein)*

IGF-IIR receptor 2 za inzulinu sličan čimbenik rasta *(eng. The Insulin-like Growth Factor 2 Receptor)*

IGF-IR receptor 1 za inzulinu sličan čimbenik rasta *(eng. The Insulin-like Growth Factor 1 Receptor)*

kaspaza-3 citoplazmatska cisteinil-aspartatno-specifična endoproteaza 3 (*engl. caspase, cysteine aspartyl protease 3*)

kaspaza-8 citoplazmatska cisteinil-aspartatno-specifična endoproteaza 8 (*engl. caspase, cysteine aspartyl proteases 8*)

kaspaza-9 citoplazmatska cisteinil-aspartatno-specifična endoproteaza 9 (*engl. caspase, cysteine aspartyl proteases 9*)

KRAS **(***eng. V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)*

MAPK protein kinaza aktivirana mitogenom *(eng. Mitogen-activated protein*

PBS fosfatnog pufera (*eng. Phosphate Buffer Saline-*)

PI3K fosfatidilinozitid 3-kinaza *(eng. Phosphatidylinositide 3-kinases)*

SZO Svjetska zdravstvena organizacija

TdT deoksinukleotidil transferaza

TNFα čimbenika tumorske nekroze α (*eng. Tumor Necrosis Factor* α)

TP53 tumorski protein 53 *(eng. tumor protein 53)*

TUNEL *(eng. Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling, deoksinukleotidil-kinases)*

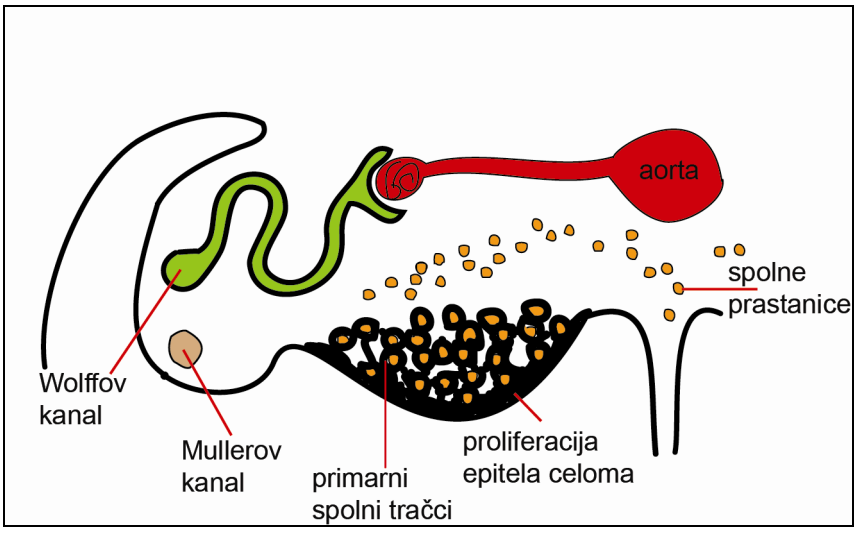
1. UVOD

1.1. Jajnik

Jajnik je parni, primarni organ ženskog spolnog sustava, koji proizvodi ženske jajne stanice (oocite) i spolne hormone. Tkivo jajnika sadrži nekoliko staničnih vrsta različitog embrionalnog porijekla koje uključuju: zametne stanice (oocite ili jajne stanice) i somatske stanice (granuloza stanice, teka stanice i stanice strome), čija je interakcija odgovorna za morfogenezu i fiziološku funkciju jajnika (1).

1.1.1. Embrionalni razvoj jajnika

Indiferentna osnova jajnika nastaje krajem petog tjedna embrionalnog razvoja u obliku parnog spolnog nabora (gonada) uslijed proliferacije celomskog epitela i podležećeg intermedijarnog menzenhima (2). Celomski epitel, koji prekriva površinu spolnih nabora, postaje jednoslojni pokrovni epitel jajnika. Iako u različitim fazama razvoja fetusa celomski epitel može biti i višeslojan, pred porod ponovno postaje jednoslojan, a epitelne stanice mogu varirati od jednostavnih pločastih i kubičnih do cilindričnih (3). Invaginacijom celomskog epitela razvija se i epitel Mullerovih kanala (buduća maternica, jajovod i dio rodnice) (4). Nediferencirane spolne prastanice, podrijetlom iz endoderma žumanjčane vreće, u 5 tjednu embrionalnog razvoja naseljavaju spolne nabore te se sad nazivaju oogonije. Tijekom 6 tjedna embrionalnog razvoja postupno se inkorporiraju unutar epitelnih tračaka koji nastaju proliferacijom celomskog epitela u mezenhim (**Slika 1.**).

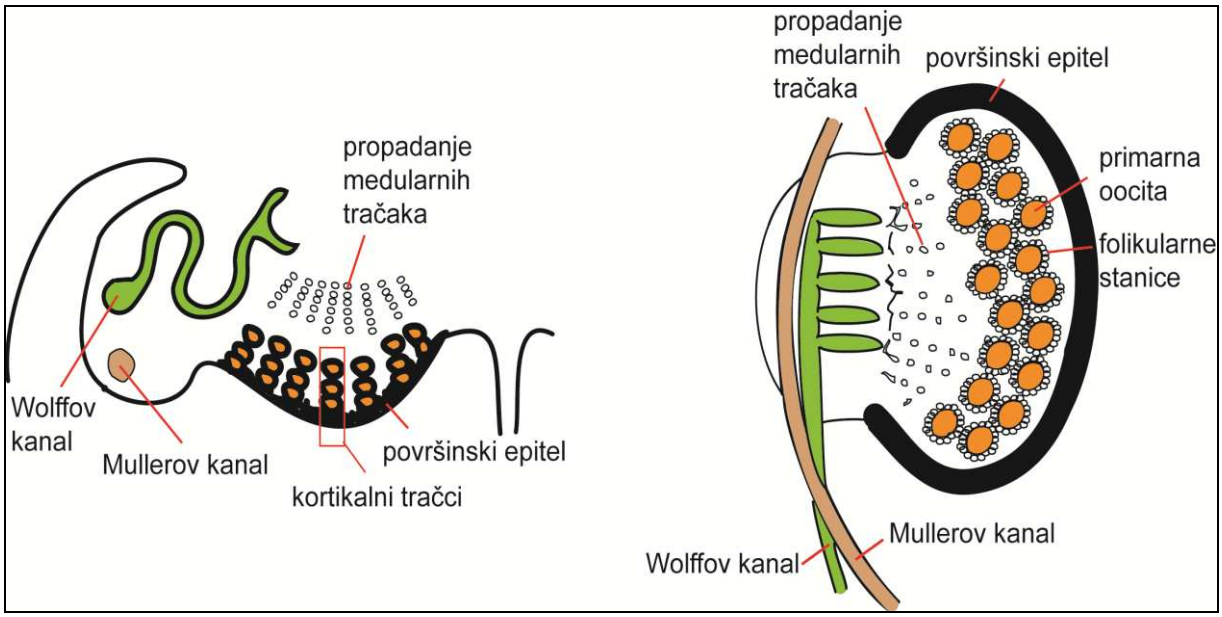


Slika 1. *Shematski prikaz poprečnog presjeka kroz slabinski dio zametka u šestom tjednu razvoja. Vide se spolni tračci u osnovi gonade koji okružuju spolne prastanice.*

Ovi epitelni tračci predstavljaju primarne spolne tračke koji nedugo nakon stvaranja propadaju i bivaju zamjenjeni vaskulariziranom stromom koja predstavlja buduću srž odraslog jajnika. Sekundarni spolni tračci koji se još nazivaju i kortikalni tračci proliferiraju u 7. tjednu embrionalnog razvoja inkorporirajući oogonije smještene u budućoj kori odraslog jajnika (**Slika 2.**) (5).

Tijekom 16. tjedna fetalnog razvoja kortikalni tračci se dijele na manje nakupine spolnih stanica čijom daljnjom podjelom dolazi do stvaranja primordijalnih folikula (6). Primordijalni folikuli u ljudskom fetusu mogu se zapaziti najranije u 18. tjednu razvoja kada sadrže jednu pojedinačnu jajnu stanicu (primarnu oocitu) okruženu jednim slojem epitelnih stanica (**Slika 2.**) (7). Broj jajnih folikula dosegne svoj maksimum oko 20-og razvojnog tjedna, od kojih će samo 1% proći proces ovulacije, dok će preostali jajni folikuli nestati tijekom procesa koji se naziva atrezija (8). Intenzivna mitotska proliferacija spolnih prastanica (oogonija) odvija se sve do 20. tjedna razvoja postupno se smanjujući do

28. tjedna. U trećem mjesecu trudnoće oogonije postupno ulaze u mejotsku diobu te prolaze kroz profazu I mejotske diobe koja biva zaustavljena u diplotenom stadiju i pretvaraju se u primarne oocite (8). Proces sazrijevanja spolnih stanica nastavlja se u pubertetu kada primordijalni folikuli podliježu folikulogenezi prolazeći kroz nekoliko razvojnih faza od primarnog, sekundarnog do tercijarnog folikula (9).



Slika 2. *Shematski prikaz poprečnog presjeka kroz zametak u području ovarija u osmom tjednu razvoja (lijevo). Vidi se propadanje medularnih tračaka i nastajanje kortikalnih tračaka. Na shemi desno je prikaz uzdužnog presjeka u području ovarija u dvadesetom tjednu razvoja. Kora jajnika sadržava skupine primarnih oocita okruženih folikularnim stanicama.*

1.1.2. Histologija zdravog reproduktivnog i postmenopauzalnog jajnika

Od mezenhima u jajniku odrasle žene nastaju dva neoštro razgraničena dijela: vezivna srž s mnoštvom krvnih žila i kora, u kojoj prevladavaju jajni folikuli u različitim stupnjevima razvoja i regresije (10, 11). Primordijalni folikuli od puberteta do menopauze

tijekom menstruacijskog ciklusa prolaze kroz proces folikulogeneze koji se sastoji od promjena oocite, granuloza stanica i fibroblasta strome koji okružuju folikule. Pod utjecajem hormona koji stimulira folikule (FSH), folikul prolazi kroz tri razvojna stadija od primarnog ili preantralnog u kojem je oocita okružena jednim ili više slojeva folikularnih stanica, preko sekundarnog ili antralnog u kojem dolazi do nakupljanja tekućine između slojeva granuloza stanica i stvaranja antruma odnosno do nastanka unutrašnjeg i vanjskog sloja teka stanica u tercijalnom (preovulacijskom ili Graafovom) folikulu (4, 10). Pravilan razvoj folikula ovisi o međusobnoj interakciji svih stanica koje ga tvore kao što su oocita, granuloza i teka stanice te izvanstaničnog matriksa i čimbenika rasta (12, 13).

Površinu jajnika prekriva modificirani sloj mezotela, koji se sastoji od pločastih ili kubičnih stanica, a tijekom razvoja nastaje iz pluripotentnih stanica celomskog epitela (10). Pokrovni epitel jajnika odrasle žene zadržava i epitelne i mezenhimalne karakteristike te pokazuje izuzetnu mogućnost diferencijacije u različitim smjerovima tijekom procesa postovulacijskog cijeljenja i nastanka novotvorina pokrovnog epitela jajnika (3, 14). Tijekom starenja glatka površina jajnika u odrasle žene postaje naborana. Naime, tijekom procesa postovulacijskog cijeljenja nastaju brojne invaginacije i inkluzijske ciste koje ostaju inkorporirane u kori jajnika (3). Epitelne stanice unutar invaginacija i inkluzijskih cista češće su kubičnog izgleda te imaju izraženu sklonost prema metaplastičnoj promjeni (15).

U postmenopauzi dolazi do atrofije tkiva jajnika te se veličinom smanjuju na polovinu veličine reproduktivnog jajnika. Histološki karakteriziran je nedostatkom primordijalnih folikula, a samim tim i folikula u razvoju, žutog tijela i atretičnih folikula. U stromi koja se u većini slučajeva sastoji od vezivnog tkiva i ožiljaka od bijelih tijela, vidljive su brojne inkluzijske ciste i žlijezde koje nastaju od pokrovnog epitela jajnika (9, 16).

1.1.3. Atrezija u jajniku

U jajniku, koji sadrži područja stanične proliferacije i regeneracije, odstranjivanje oštećenih stanica i očuvanje tkivne pregradnje odvija se putem degenerativnog procesa koji se zove atrezija (17). Dakle normalan razvoj i funkcija jajnika su povezani sa staničnom smrti zametnih i folikularnih stanica, stanica pokrovnog epitela jajnika te žutog tijela (18-20). Također se pretpostavlja da masivni gubitak zametnih stanica nastaje u kromosomski poremećenim jajnicima što dovodi do poremećaja u razvoju gonada i posljedičnog stvaranja fibroznih tračaka (21-23).

Tijekom prenatalnog razvoja odvija se atrezija oogonija paralelno sa njihovom proliferacijom, a najveća stopa atrezije podudara se s najvećom stopom proliferacije (20. tjedan) (7, 11). U reproduktivnom jajniku atrezija folikula koji nisu preodređeni za ovulaciju može se dogoditi na bilo kojem stadiju razvoja folikula, ali je posebice izražena u ranom antralnom stadiju (24-27).

Dok u primordijalnim i preantralnim folikulima atrezija započinje programiranom smrću oocite, glavno obilježje atrezije u preovulatornim folikulima je pojedinačna smrt granuloza stanica koja dovodi do ljuštenja velikog broja apoptotskih tjelešaca u antralni prostor te na koncu završava smrću oocite (18, 28-32). S druge strane, netom prije same ovulacije dolazi do atrezije stanica pokrovnog epitela janika isključivo u području koje prekriva tercijarni folikul (33, 34).

Studije na životinjskim modelima ukazuju da bi apoptoza mogla biti molekularni mehanizam odgovoran za proces atrezije (35-38).

1.2. Novotvorine jajnika

1.2.1. Epidemiologija

Novotvorine jajnika s pojavnosti od 10-15/100000 su jedne od najčešćih malignih promjena u tijelu žene te se po smrtnom ishodu nalaze na prvom mjestu u odnosu na ostale novotvorine spolnog sustava žene (39). U Hrvatskoj rak jajnika je peto najčešće sijelo raka u žena. Pojavnost i smrtnost od raka jajnika u Hrvatskoj su u porastu, posebice u dobnim skupinama iznad 60 godina (40).

Uzrok nastanka karcinoma jajnika još uvijek nije poznat, ali je nekoliko čimbenika povezano s porastom ili smanjenjem rizika za ovu bolest. Većina epidemioloških studija pokazuje da dob, rasa, neplodnost, karcinom jajnika u obitelji te karcinom dojke i endometrija u anamnezi povećavaju rizik za nastanak karcinoma ovarija. S druge strane veći broj poroda, dojenje te upotreba oralnih kontraceptiva smanjuju taj rizik (40, 41). Navedeni rezultati epidemioloških studija podupiru „hipotezu neprestanih ovulacija“ kojom se pokušava objasniti nastanak karcinoma jajnika. Ova hipoteza, prvi put predložena od strane Fathalla i suradnika 1971. godine, pretpostavlja da ponovljena mala oštećenja epitelne površine jajnika uzrokovana stalnim ovulacijama povećavaju vjerojatnost nastanka ovarijskog karcinoma (42). Cramer i Welch smatraju da je prvi korak u tumorigenezi pokrovnog epitela jajnika stvaranje inkluzijskih cista tijekom postovulacijskog perioda cijeljenja (43). U prilog hipotezi govori i činjenica da tijekom reproduktivnog razdoblja inkluzijske ciste u većine žena nestaju dok su kod žena koje imaju tumor jajnika inkluzijske ciste prisutne u samom tkivu jajnika (44).

S druge strane studija Barker-a i suradnika predlaže teoriju o razvojnom porijeklu karcinoma koji nastaje zbog izloženost visokim razinama spolnih hormona majke

(gonadotropini) tijekom fetalnog razvoja. U prilog teoriji idu i dokazi o djelovanju štetnih okolišnih čimbenika (različite kemijske tvari, pesticidi) tijekom fetalnog razvoja na povećan rizik za nastanak karcinoma jajnika (45, 46).

Novotvorine jajnika morfološki, histogenetski i klinički predstavljaju heterogenu skupinu novotvorina. Prema svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) ovisno o porijeklu možemo ih razvrstati u 11 skupina od kojih su tri najveće: epitelno-stromalne novotvorine pokrovnog epitela, tumori spolnih stanica i tumori specijalizirane strome jajnika (**Tablica 1.**) (16). Tumori nastali od epitela površine jajnika čine oko 60% svih novotvorina jajnika i 80-90% svih zloćudnih novotvorina (16). Prema biološkom ponašanju svaki od tumora iz pojedine skupine dalje se dijeli na: dobroćudne, atipično-proliferativne i zloćudno-invazivne novotvorine. Zloćudnost tumora određuje se na osnovi sposobnosti proliferacije epitela, stvaranju papilarnih izraslina i postojanju ili nepostojanju razarajuće invazije strome (41).

Tablica 1. *Pojednostavljena klasifikacija novotvorina prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (modificirana prema R.E. Scully) (16, 47)*

I Epitelno-stromalne novotvorine pokrovnog epitela
Serozni tumori
Mucinozni tumori
Endometrioidni tumori
Paramezonefrioidni tumori
Tumori prijelaznih stanica (Brennerov tumor i karcinom prijelaznih stanica)
Miješani epitelni tumor
Nediferencirani karcinom
Neklasificirani epitelni tumor

II Novotvorine specijalizirane strome jajnika
Granuloza-stromalni tumori Sertoli-Leydigov stanični tumor (androblastom) Steroido stanični (lipidno-stanični) tumori
III Lipoidne novotvorine
IV Novotvorine porijekla rete ovarii
V Novotvorine spolnih stanica
Dizgerminomi Tumori žumanjčane vreće Embrionalni karcinom Koriokarcinomi Teratomi
VI Novotvorine spolnih i stromalnih stanica
VII Novotvorine nesigurnog porijekla
VIII Novotvorine vezivnih tkiva koja nisu jedinstvena za jajnike
IX Novotvorine koje se ne mogu klasificirati
X Metastatske (sekundarne) novotvorine
XI Novotvorinama slične promjene

1.2.2. Epitelno-stromalni tumori

Uvriježeno je mišljenje da epitelno-stromalne novotvorine pokrovnog epitela jajnika nastaju iz jednoslojnog pločastog ili kubičnog epitela koji prekriva površinu jajnika ili epitela inkluzijskih cista. Međutim danas postoje i novije teorije koje smatraju da epitelno-stromalne novotvorine jajnika nastaju iz epitela jajovoda, endometrija ili peritoneuma (48, 49). Za razumijevanje histogeneze tumora pokrovnog epitela jajnika važno je naglasiti da tijekom razvoja pokrovni epitel jajnika nastaje iz pluripotentnih stanica celomskog epitela kao i Mullerovi kanali iz kojih nastaju budući jajovodi, endometrij i endocerviks. Morfološki, ovi tumori predstavljaju heterogenu skupinu novotvorina čije epitelne stanice imaju obilježja epitela jajovoda (serozni), endometrija (endometrioidni) ili endocerviksa (mucinozni) (47). Za razliku od ostalih tumora kod kojih tijekom tumorske progresije dolazi do dediferencijacije epitelnih stanica u tumorima pokrovnog epitela jajnika epitelne stanice obično su bolje diferencirane nego epitelne stanice iz kojih sam tumor i nastaje (50).

1.2.3. Serozni tumori

Serozni su tumori pretežno cistične novotvorine čija je unutrašnjost obložena visokim cilindričnim ili kubičnim epitelom što nalikuje na epitel jajovoda, a šupljine su ispunjene bistrom, seroznom tekućinom. Najčešće su cistični iako mogu biti i pretežno solidne građe (16, 47). Najučestaliji histološki tip tumora pokrovnog epitela jajnika su serozni tumori (51). Makroskopski zloćudni serozni tumori jajnika mogu biti različite veličine od izrazito malih do preko 25 cm u promjeru te u većini slučajeva istovremeno zahvaćaju oba jajnika (16). Dobro diferencirani tumori su solidne ili cistične tvorbe sa

mekanim papilama na unutrašnjoj ili vanjskoj strani površine dok su slabo diferencirani tumori multicistične ili solidne, multinodozne tvorbe sa područjima krvarenja i nekroze.

Mikroskopski zloćudne serozne novotvorine (*lat. cystadenocarcinoma serosum*) su građene od cilindričnih ili kubičnih stanica koje oblažu šupljine, ali ujedno tvore brojne makroskopske i mikroskopske papile. Nepravilna invazija strome je glavna osobina zloćudnih novotvorina i po tome se ovi tumori razlikuju od novotvorina niskog malignog potencijala. Invazivni rast uzrokuje stvaranje gustog vezivnog tkiva oko tumora (dezmoplastičku reakciju strome), nekrozu i krvarenje. Tumorske stanice pokazuju izrazite znakove atipije, a samo rijetko se može naći pločasta diferencijacija. Psamozna tjelešca se nalaze u dvije trećine bolesnica, a samo rijetko mogu prevladavati u histološkoj slici. Mitoze su brojne, a često i nepravilna oblika, s nekoliko vretena i nepravilnom segregacijom kromosoma. Prodor tumorskih stanica u limfne žile, vene i arterije te na površinu cista jasni su znaci zloćudnosti ovih novotvorina (47). S obzirom na stupanj diferencijacije ili anaplazije, prema Silverberg klasifikaciji, zloćudne serozne novotvorine ovarija mikroskopski možemo stupnjevati kao tumore niskog, srednjeg i visokog stupnja zloćudnosti (16, 52). Najčešći su serozni tumori visokog stupnja zloćudnosti (Svjetska zdravstvena organizacija-SZO stupanj III) sa izrazito lošom prognozom.

1.2.3.1. Kancerogeneza

Nedavno su Kurman i suradnici predložili novi model kancerogeneze novotvorina jajnika koji se temelji na molekularnim, kliničkim i histopatološkima razlikama koje su uočene između niskog i visokog stupnja zloćudnosti seroznih tumora jajnika. Prema predloženom modelu postoje dva puta kancerogeneze (51, 53). Tumori I skupine razvijaju se postupno iz dobro poznate prekursorne lezije, genetski su stabilne novotvorine i vrlo rano pokazuju mutacije u KRAS i BRAF genima. Tipičan predstavnik ove skupine je

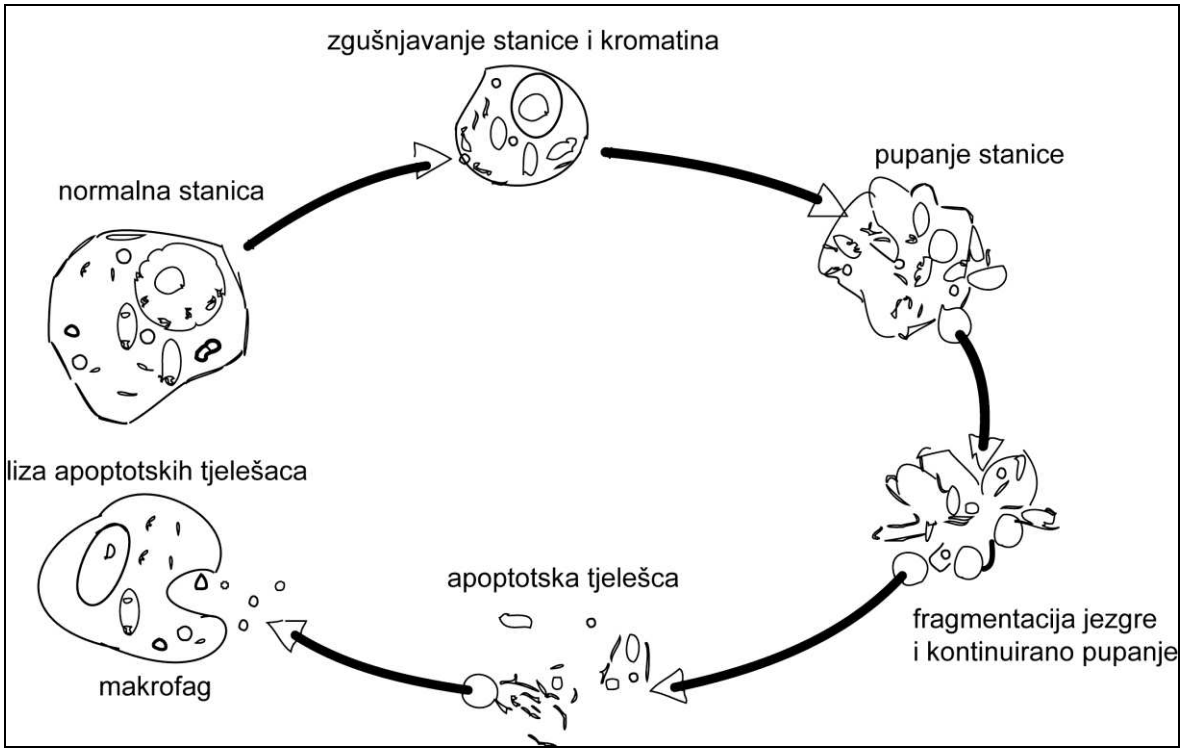
serozni mikropapilarni karcinom niskog stupnja zloćudnosti i obično su FIGO stadija I. Tumori II skupine su brzorastuće novotvorine koje nastaju de-novo iz pokrovnog epitela jajnika ili inkluzijskih cista, genetski su izrazito nestabilne novotvorine, karakterizirane mutacijom TP53. Tipičan predstavnik ove skupine je serozni karcinom visokog stupnja malignosti i visokog stadija (51, 53).

1.3. Apoptoza

Apoptoza ili „programirana smrt stanice“ (grč. a-po-toe-sis – otpadati s nečega kao lišće sa stabla) je aktivan, genetski kontroliran proces kojim pojedinačna stanica uz utrošak energije i sintezu bjelančevina pokreće vlastitu smrt uz održanu cjelovitost membrane te bez izazivanja upale (54-56). Apototske stanice otkrivene su još u XIX. stoljeću u razvojnim i histopatološkim istraživanjima, a po prvi put su opisane u Graafovom folikulu zečjeg jajnika kao karioliza (57-59).

Različite morfološke promjene koje se događaju tijekom apoptoze vidljive su svjetlosnim i elektronskim mikroskopom (54-56). Morfološke promjene vidljive navedenim tehnikama, a koje su karakteristične za apoptozu uključuju: smanjenje stanice sa zgusnutom citoplazmom te njeno izdvajanje iz okoline, bubrenje stanične membrane, kondenzaciju kromatina u polumjesečaste nakupine uz jezgrinu ovojnicu tijekom procesa piknoze koji je glavna karakteristika apoptoze, nuklearnu fragmentaciju (karioreksa), pupanje djelova stanične membrane i formiranje apoptotskih tjelešaca (54-56). Na histološkom preparatu obojenom hemalaunom i eozinom apoptotsku stanicu vidimo kao pojedinačnu stanicu ili nakupinu malih stanica ovalnog ili okruglog oblika s tamnom eozinofilnom citoplazmom i tamno ljubičastim nuklearnim fragmentima kromatina (54-56, 60). Mikroskopski nalaz apoptotskih stanica potrebno je potvrditi drugim tehnikama budući da se promjene vidljive mikroskopom u tkivu zadržavaju kratko vrijeme zbog brze

fagocitoze apoptotskih tjelešace te također zbog činjenice da se mikroskopom mogu vidjeti samo kasne promjene u procesu apoptoze dok rane promjene mogu ostati neprepoznate (61).



Slika 3. *Shematski prikaz morfoloških promjena stanice u apoptozi*

Na osnovu morfoloških osobitosti razlikuje se od nekroze u kojoj dolazi do onkoze, oticanja organela, pucanja stanične membrane i posljedičnog gubitka unutarstaničnog sadržaja (62). Osim apoptoze postoje i drugi oblici programirane stanične smrti poput autofagije, keratinizacija, anoikisa, kornifikacija, ekscitotoksičnosti, Wallerove degeneracije kao i mnogih drugih (62-65).

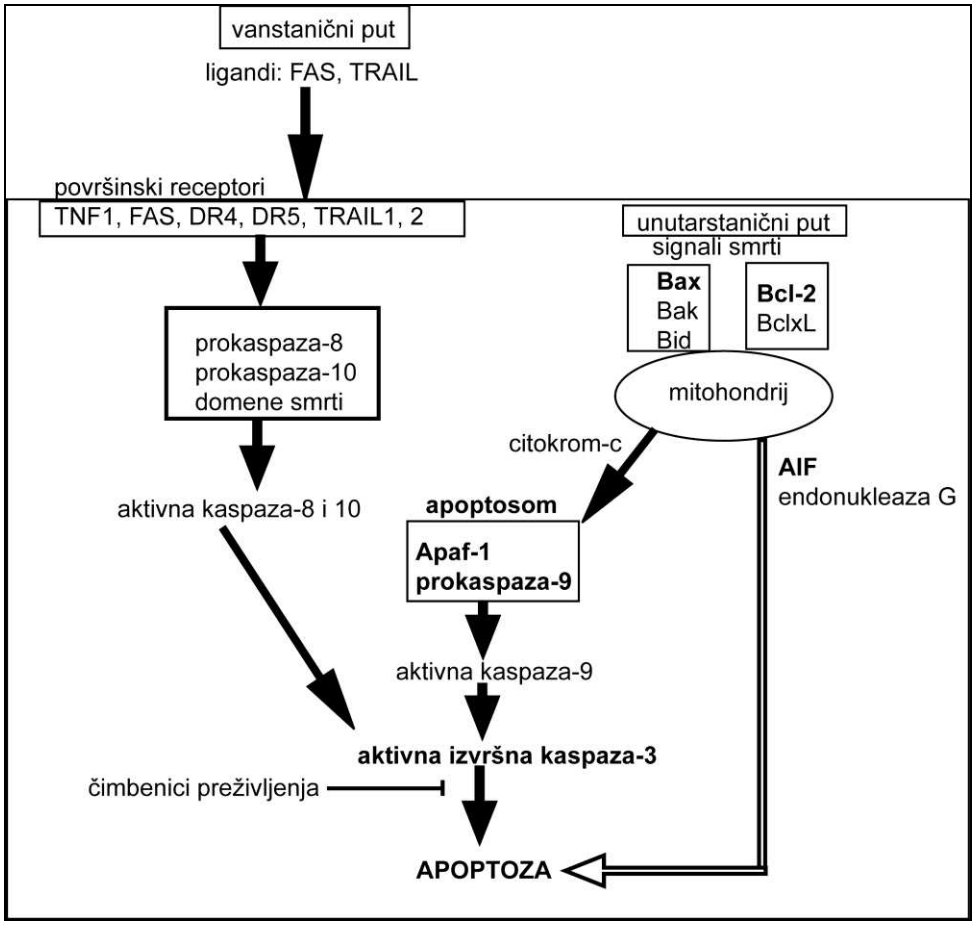
Kao evolucijski nepromijenjen oblik stanične smrti apoptoza je važan dio fiziološkog razvoja embrija, preobrazbe i obnavljanja tkiva te atrofije tkiva ovisne o hormonima (66-68). Upravo zato je za pravilan embrionalni razvoj i održavanje tkivne homeostaze ključan pravilan tijek apoptoze. Ukoliko je poremećen mehanizam

programirane stanične smrti nefunkcionalne, mutirane ili na bilo koji način oštećene stanice izmaknu ovom kontrolnom mehanizmu te mogu dovesti do razvoja teških bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Huntingtonova bolest, srčana ishemija, autoimuni poremećaji te različite novotvorine (69, 70). Zbog slabljenja ili izostanka pozitivnih signala potrebnih za preživljavanje stanica ili zbog primanja negativnih signala stanica pokreće vlastitu smrt. Pokretači samog procesa mogu biti brojni izvanstanični ili unutarstanični čimbenici kao što su: citokini, čimbenici rasta, hormoni, oštećenje DNA, ionizacijsko zračenje, keomoterapeutici, virus i brojni drugi (18).

Proces apoptoze za razliku od nekroze, odvija se putem četiri ustaljene i strogo kontrolirane faze: početna faza, faza prijenosa i integracije signala, izvršna (efektorska) faza te faza uklanjanja staničnih fragmenata. Važno je naglasiti da tijekom svake faze djeluju i agonistički i antagonistički čimbenici te da prevaga bilo agonističkih bilo antagonističkih čimbenika odlučuje o sudbini same stanice (47). U prvoj fazi brojni čimbenici, kao što su ultraljubičasto zračenje, toplina, NO, osmotski poremćaj i mnogi drugi, dovode do pokretanja apoptotskog procesa (70, 71). Za razliku od njih, endogeni čimbenici i stereoidni hormoni preskaču ovu fazu aktivacije apoptoze (47). U drugoj fazi apoptoze, koja je još uvijek reverzibilna, dolazi do aktivacije spojeva koji prenose i pojačavaju signale ili zaustavljaju prijenos signala. Među ovim molekulama najvažniji su enzimi pod imenom kaspaze. U kontroli prijenosa i integracije signala ključnu ulogu imaju proteini iz mitohondrija koji pripadaju velikoj obitelji Bcl-2 bjelančevina (47). U trećoj fazi izvršne kaspaze enzimatski razgrađuju stanične elemente i dovode do stvaranja apoptotskih tjelešaca, dok u četvrtoj fazi apoptotska tijelešca fagocitiraju makrofazi (47, 72).

Procjenjuje se da proces programirane smrti stanice ovisno o kojoj se stanici radi i koji je čimbenik potakne može trajati od 12 do 24 sata (61).

1.3.1. Apoptotski putevi



Slika 4. *Shematski prikaz dva apoptotska puta (unutarstanični i izvanstanični) preko kaskadne aktivacije kaspaza (pune strelice) koji se mogu preklapati te voditi zajedničkom putu aktivacije izvršnih kaspaza sa rezultirajućom apoptotskom smrti stanice. Dio unutarstaničnog puta koji ide preko AIF bjelančevine i endonukleaze G (prazna strelica) je kaspaza neovisan način apoptoze. Izvanstanični put: apoptotski signal induciran je specifičnim vezanjem liganda (FAS, TRAIL) za njihove receptore (TNF1, FAS, DR4, DR5, TRAIL1 i 2) smještene na staničnoj membrani. Unutarstanični put: apoptotski signal induciraju različiti nespecifični stresni čimbenici te djeluje preko Bcl-2 obitelji. Strelica u obliku horizontalno položenog slova T pokazuju inhibitorni učinak.*

1.3.1.1. Kaspaza ovisni put apoptoze

Najistraženiji putevi aktivacije apoptoze su: mitohondrijski ili unutarnji i receptorski ili vanjski put. U mitohondrijskom putu signali pokreću staničnu smrt aktivacijom pro-apoptotskih članova obitelji Bcl-2 koji djeluju na mitohondrijskoj membrani utječući na njenu propusnost što dovodi do otpuštanja citokroma c. Otpušteni citokrom c veže se uz medijatorske molekule Apaf-1 i kaspazu-9 te uz ATP tvoreći kompleks koji se naziva apoptozom (73). U receptorskom putu do apoptoze dolazi nakon vezanja molekula na receptore superobitelji čimbenika tumorske nekroze α (TNFα), koji sadrže domene smrti na citplazmatskom dijelu membrane (74). Oba puta aktiviraju sustav proteolitičkih enzima, kaspaze (citoplazmatske cisteinil-aspartatno-specifične endoproteaze) (*engl. caspase, cysteine aspartyl proteases*). U receptorskom putu prva se aktivira kaspaza-8, a u mitohondrijskom kaspaza-9. Navedene kaspaze aktiviraju kaspazu-3 (sinonimi CPP32, Yama i apopain) koja aktivira nukleazu CAD (*engl. Caspase Activated Dnase*) (75). Kaspaze su stoga ključni enzimi u kaspaza ovisnom putu apoptoze te neovisno o načinu njihova pokretanja cijepaju specifične supstrate i dovode do tipičnih biokemijskih i morfoloških promjena. Ova proteolitička kaskada u kojoj jedna kaspaza može aktivirati druge kaspaze važna je jer pojačava apoptotski signalni put i dovodi do vrlo brze smrti stanice (76). Iako ovdje govorimo o dva odvojena puta za pokretanje programirane smrti stanice novija istraživanja upućuju da među njima postoji komunikacija (77).

1.3.1.2. Kaspaza neovisni put apopotoze

Do sada opisani procesi aktivacije apoptoze uglavnom se uključivali kaspazu jer je apoptoza u većini slučajeva kaspaza ovisni proces, međutim istraživanja u posljednjih 10-ak godina govore da se proces apoptoze odvija i kaspaza neovisnim putem (78). Naime tijekom 90-ih godina prošlog stoljeća većina istraživača bila je uvjerena da su jedino kaspaze odgovorne za smrt stanice u apoptozi, međutim istraživanja s Jurkat stanicama u kojima je pronađena smrt stanice morfološki identična apoptozi iako je kaspazna aktivnost bila blokirana potvrdila je sumnje da postoji kaspaza neovisna apoptoza. U tim stanicama međutim pokazana je povećana ekspresija proapoptotske Bax bjelančevine (79). Daljnja istraživanja na in vivo stanicama opisala su još neke proteaze (osim kaspaza) kao što je kalpain, katepsin B, D, L, Omi/HtrA2 i granzim A i B koje su u konačnici dovodile do programirane smrti stanice morfološki identične apoptozi (78). Poznato je da čimbenik koji inducira apoptozu (AIF), a koji se nalazi u mitohondrijima može potaknuti apoptozu kaspaza neovisnim putem. Istraživanja su pokazala da iako kaspaza neovisni put i kaspaza ovisni put djeluju istovremeno kaspaza ovisni put može biti manje učinkovit (80, 81).

1.3.2. Apoptoza u seroznim tumorima jajnika

U tumorima je poremećena fina ravnoteža između stanične proliferacije i stanične smrti (82). Gharhemani i suradnici su predložili da je upravo poremećaj u regulaciji apoptotskog puta koji djeluje tijekom eliminacije pokrovnog epitela inkluzijskih cista odgovoran za nastanak novotvorina ovarija (44). Smatra se da poremećaja u regulaciji apoptoze može nastati na bilo kojoj od faza odvijanja apoptoze a mehanizmi putem kojih dolazi do izostanka apoptoze u tumorima mogu biti poremećaj ravnoteže proapoptotskih i

antiapoptotskih čimbenika, smanjena kaspazna aktivnost i oslabljena signalizacija putem receptora smrti (83).

Veličina apoptoze u histološkim preparatima tumora mjeri se apoptotskim indeksom (AI). U većini slučajeva apoptotski indeks se definira kao postotak apoptotskih stanica na 1000 izbrojanih stanica, ali neki autori ga opisuju kao broj apoptotskih stanica na 1000 izbrojanih stanica (60, 84).

Unatoč uvriježenom stajalištu o povezanosti smanjene apoptotske aktivnosti sa tumorskim rastom brojne studije koje su istraživale apoptozu u tumorima dokazale su da je apoptotska aktivnost u tumorima povećana (60). Također je pokazano da se količina apoptoze razlikuje ovisno o vrsti tumora, ali i o tumorskom gradusu, stadiju i progresiji (60). Tako serozni tumori višeg gradusa imaju viši apoptotski indeks nego tumori nižeg gradusa. Visoki apoptotski indeks se pokazao kao neovisni pokazatelje loše prognoze u tumorima ovarija (70).

1.3.3. Proapoptotski i antiapoptotski čimbenici

1.3.3.1. Kaspaza-3

Obitelj kaspaza ima važnu ulogu tijekom procesa programirane stanične smrti u jajniku, što su pokazale studije na genetski modificiranim modelima miševa („knockout“ modeli) i u kulturama stanica (6, 85). Kaspaze (*eng. cysteine – aspartic proteases***,** *hrv. cistein – aspartat proteaze*) su dobile ime zbog cisteina na njihovom aktivnom mjestu (86, 87). Četrnaest članovi obitelji kaspaza podijeljeni su u tri skupine: upalne kaspaze (1, 4, 5, 11, 12, 13, i 14), inicijacijske kaspaze (2, 8, 9 i 10) i izvršne kaspaze (3, 6 i 7) (86, 87). U stanici kaspaze postoje u neaktivnom obliku, kao prokaspaze, a bivaju aktivirane u pažljivo reguliranom procesu, nakon što stanica dobije poticaj za apoptozu. Aktivacija kaspaza

odvija se postupno, tako da svaka aktivirana kaspaza cijepa sljedeću prokaspazu u njezin aktivni oblik što dovodi do pojačavanja apoptotskog signalnog puta što u konačnici dovodi do vrlo brze stanične smrti (76).

Kaskadna aktivacija kaspaza je odgovorna za proteolitičko cijepanje bjelančevinskih supstrata, aktivaciju nukleaza i DNK razgradnju te konačno odstranjenje staničnog sadržaja uz pomoć makrofaga. Ključna efektorska kaspaza je kaspaza-3. Ona povezuje mitohondrijski i receptorski put u zajednički kaspaza ovisan proces apoptoze (76, 88, 89).

Kaspaza-3 uz TUNEL (*eng.* Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling, deoksinukleotidil-tranferaza – TdT) metodu, kojom se označavaju OH skupine na krajevima DNA fragmenata služi kao konačna potvrda procesa apoptoze (90).

Studije na kulturama stanica ljudskih tumora povezale su djelovanje kaspaze-3 sa stvaranjem otpornosti na lijekove, dok su druge potvrdile povezanost izražaja kaspaze-3 i preživljenja pacijenata oboljelih od zloćudne bolesti (91, 92). Izražaj kaspaze-3 dokazan je u životinja u granuloza stanicama atretičnih folikula, teka stanicama zdravih folikula, teka i granuloza stanicama sekundarnih folikula te luteinskim stanicama žutog tijela, ali ne i u zametnim stanicama (93). Nasuprot tome, kod ljudskih fetalnih jajnika upravo je kaspaza-3 zadužena za apoptozu zametnih stanica te apoptozu granuloza stanica isključivo atretičnih sekundarnih folikula zdravih jajnika odrasle žene (7, 93, 94). Do sada je samo jedna studija imunohistokemijski istražila izražaj kaspaze-3 na folikularnim stanicama fetalnih jajnika starosti od 14-og do 20-og tjedna, dok su dvije studije na tumorima jajnika ispitivale isključivo epitelnu komponentu tumora (7, 27, 91).

1.3.3.2. Bcl-2 obitelj

Bcl-2 (*eng. b-cell lymphoma protein 2*) obitelj unutarstaničnih bjelančevina, djeluje kao glavni regulator kaspazne aktivnosti (95). Članovi ove obitelji smještene su na vanjskoj membrani mitohondrija gdje i pokazuju svoj pro-apoptotski ili anti-apoptotski učinak (96). Obzirom na funkciju i molekularnu građu obitelj Bcl-2 bjelančevina dijeli se u 3 podskupine. Antiapoptotske bjelančevine čine prvu podskupinu koja sadrži sve četiri bcl-2 homologne (BH) domene. Predstavnici te skupine su: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/bfl-1, Bcl-b/Bcl-2L10. Druga podskupina načinjena je od bjelančevina koji sadrže samo BH-3 domenu. Oni su inicijatori apoptoze te se aktiviraju djelovanjem staničnog stresa (npr. oštećenja DNK ili nedostatka čimbenika rasta). Neki od njenih članova su Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk, Bik. Članovi treće proapoptotske podskupine sadrže sve četiri BH domene, a predstavnici su Bax, Bak i Bok/mtd (97, 98). Dokazano je da su članovi Bcl-2 obitelji (Bcl-2 i Bax) među glavnim regulatorima apoptoze u stanicama jajnika (99). Tako Bcl-2 štiti stanicu od apoptoze tvoreći homo- ili heterodimere sa pro-apototskom bjelančevinom Bax (99).

Dokazi u *in vivo* i *in vitro* studijama, pokazali su da poremećaj izražaja Bcl-2 može doprinijeti razvoju tumora (100). Ravnoteža izražaja pro-apoptotskih i anti-apoptotskih čimbenika ima značajan utjecaj na prognozu oboljelih od tumora jajnika (101, 102). Zbog slabe dostupnosti zdravog fetalnog tkiva u čovjeka do sad je objavljeno samo nekoliko studija o apoptozi u fetalnim jajnicima (8). Bjelančevine Bcl-2 i Bax imale su različit vremenski i prostorni obrazac pojavljivanja u različitim staničnim vrstama unutar fetalnih jajnika (8, 99, 103). Mali broj radova na tumorskim uzorcima jajnika pokazao je postojanje obrnute povezanosti između izražaja Bcl-2 u epitelnim stanicama tumora i stupnja zloćudnosti tumora (104-108).

1.3.3.3. Inzulinu sličan čimbenik rasta Igf-1

Inzulinu sličan čimbenik rasta Igf-1 *(eng. insulin like growth factor 1*) je polipeptid koji kao važan posrednik djelovanja hormona rasta ima važnu ulogu u rastu i razvoju zdravih i tumorskih stanica te je jedan od inhibitora apoptoze (95, 109). Igf obitelj sastoji se od Igf čimbenika rasta (Igf-1 i Igf-2), receptora koji se nalaze na površini stanice: IGF-1 receptor (IGF-IR), IGF-II receptora (IGF-IIR) i inzulinskog receptor (IR), kao i obitelji IGF vežućih bjelančevina (IGFBPs) (110, 111). S obzirom da je izražaj Igf-1 i IGF-IR receptora dokazan u svim tkivima pretpostavlja se da ovi čimbenici rasta imaju i endokrino i autokrino/parakrino djelovanje na stanice tkiva (110). Djelovanje Igf-1 odvija se putem IGF-IR receptora, tirozin kinaze koja nalikuje receptoru za inzulin, a sama dostupnost slobodnog Igf-1 regulirana je putem obitelji IGF vežućih proteina (112). Putem IGF-1 receptora dolazi do stimulacije dvaju glavnih putova prijenosa signala u stanici odgovornih za poticanje proliferacije, diferencijacije te inhibiciju apoptoze: PI3K puta i MAPK puta koji se aktiviraju ovisno o vrsti stanice (113).

Do sada se na osnovu istraživanjim na miševima smatralo da Igf-2 kao glavni čimbenik rasta dijeluje isključivo tijekom prenatalnog razdoblja, a Igf-1 isključivo tijeko postnatalnog razdoblja. Međutim, danas se zna da su u ljudskom tkivu i Igf-1 i Igf-2 izraženi tijekom oba razdoblja (109, 114). Također, rezultati istraživanja na Igf-1 genetski modificiranim miševima upućuju na mogućnost važne uloge Igf-1 u razvoju normalne funkcije jajnika (115).

Interes za istraživanje uloge Igf obitelji u zdravim i tumorskim stanicama porastao je nakon provedbe dviju epidemioloških studija čiji su rezultati upućivali na moguću povezanost između povećane serumske razine cirkulirajućeg Igf-1 sa povećanim rizikom od nastanka novotvorina dojke, prostate, kolona i pluća (116, 117). U prilog teoriji o

uključenosti Igf-1 u nastanak novotvorina govori i činjenica o povezanosti povišene razine Igf-1 u pupčanoj vrpci sa porođajnom težinom i dužinom a samim tim s nastankom novotvorina dojke, prostate, kolona te novotvorina dječje dobi (118-120). Poremećaji nastali na bilo kojoj od razina Igf puta mogu biti odgovorni za nastanak i napredovanje tumora u različitim vrstama stanica (109).

Pokazano je da apoptoza unutar jajnih stanica folikula može nastati ili zbog odsustva ili nedovoljne razine čimbenika rasta Igf-1 (6). U kulturi životinjskih folikula dolazi do smanjenja apoptoze pod djelovanjem Igf-1, kao i do smanjenja apoptoze u kulturi normalnih stanica pokrovnog epitela i tumorskih stanica jajnika (121, 122). Također se smatra da Igf-1 ima ulogu u ubrzanju napredovanja tumora od stadija prekancerozne do invazivne lezije (123).

Studije o imunohistokemijskom izražaju Igf-1 na ljudskim fetalnim jajnicima i seroznim tumorima do sada nisu provedene.

Dosadašnja istraživanja na ljudskim fetalnim jajnicima i tumorskom tkivu su ili malobrojna ili istražuju ponašanje samo pojedine stanične populacije. Također nije sustavno istražena fina regulacija i ravnoteža u izražaju pro-apoptotskih (Bax i kaspaze-3) i anti-apoptotskih (Bcl-2 i Igf-1) čimbenika tijekom razvoja jajnika u odraslom jajniku kao i tijekom tumorogeneze jajnika. Ova će studija po prvi put sustavno istražiti međudjelovanje različitih čimbenika koji utječu na normalan razvoj kao i zloćudni preobražaj stanica jajnika.

2. CILJEVI RADA I HIPOTEZE

Cilj ove pokusne, temeljne studije bio je primjenom imunohistokemijskih biljega za Bcl-2, Bax, kaspazu-3 i Igf-1, u normalnom tkivu jajnika tijekom razvoja (15. i 22. tjedan), u normalnom tkivu jajnika reproduktivne dobi i postmenopauzi te u seroznim tumorima jajnika histološkog stupnja III istražiti slijedeće:

1) Prostornu i vremensku raspodjelu pojavljivanja anti-apoptotskih (bcl-2, Igf-1) i pro-apoptotskih bjelančevina (Bax, kaspaza-3) te njihovu moguću ulogu u regulaciji stanične smrti različitih staničnih vrsta u jajniku tijekom razvoja u normalnom i tumorski promijenjenom tkivu.
2) U normalnim jajnicima tijekom razvoja pokazati razlike u prisutnosti i jačini izražaja navedenih anti-apoptotskih i pro-apoptotskih bjelančevina unutar jajnih (oocita) i folikularnih stanica primarnih, sekundarnih i tercijarnih folikula kao i u stanicama površinskog epitela i strome.
3) Jačinu izražaja i prostornu raspodjelu navedenih anti-apoptotskih i pro-apoptotskih bjelančevina te njihovu moguću ulogu u regulaciji stanične smrti u epitelnim i stromalnim stanicama seroznih tumora jajnika histološkog stupnja III.
4) Primjenom dvostrukog bojanja (imunofluorescencije) dokazati istovremenu prisutnost (kolokalizaciju) nekoliko različitih čimbenika u istoj stanici (npr. Bax i Bcl-2) te prevagu jednog od čimbenika koji vodi u staničnu smrt ili preživljenje stanica u normalnim i tumorskim tkivima.
5) Usporedbom izražaja navedenih čimbenika na normalnim i tumorskim tkivima zaključiti o mogućim mehanizmima zloćudne preobrazbe jajnika.

Hipoteze istraživanja

Očekivali smo da će razvoj jajnika u čovjeka biti popraćen promjenom izražaja, vremena i mjesta pojavljivanja istraživanih biljega u različitim staničnim vrstama jajnika: izražaj Bax i Bcl-2 mijenjat će se ovisno o razvojnom stadiju jajnika i promatranim staničnim vrstama.

Obzirom na značajnu ulogu koju imaju stromalne stanice tijekom postovulacijske proliferacije površinskog epitela očekivali smo razlike u izražaju navedenih biljega u epitelnoj i stromalnoj komponenti, kao i na njihovoj granici.

Očekivali smo da će analiza rezultata ukazati na moguću ulogu ovih biljega u razvoju fetalnog jajnika, jajnika odraslih žena i tumorski promijenjenom tkivu jajnika.

Očekivali smo da će se temeljem praćenja istih staničnih vrsta u navedenim tkivima dobiti informacija o mogućem smjeru zloćudne preobrazbe tih staničnih vrsta.

Slične studije na humanom materijalu ne postoje vezane uz ovu temu istraživanja.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na 6 normalnih ljudskih zametaka u 15-om i 22-om tjednu razvoja, 5 uzoraka zdravih jajnika žena reproduktivne i 4 uzorka jajnika žena postmenopauzalne dobi te 9 uzoraka seroznih tumora jajnika histološkog stupnja III prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO-u).

Tkivo jednim dijelom potječe iz postojeće arhivske zbirke *Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu* i iz *Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split* (tkivo spontano pobačenih zametaka, tkivo zdravih jajnika i tumorsko tkivo). Uzeti su samo oni fetusi koji su dobro očuvani, normalne vanjske morfologije i bez vanjskih znakova maceracije plodovi bez patoloških promjena. Nakon makroskopskog pregleda, napravljena je mikrosekcija tkiva te je provjerena očuvanost rezova orijentacijskim bojenjem hemalaunom i eozinom na svakom 10-om rezu. Normalno i očuvano tkivo histološki se prikazalo urednom morfologijom stanica i međustaničnog prostora bez znakova upalnih promjena (nakupine limfocita u tkivu) koje su se mogle pojaviti uslijed možebitnih spontanih pobačaja uzrokovanih infektivnim oštećenjem ploda. Dakle, korištena su tkiva spontano pobačenih zametaka kod kojih nije došlo do infektivnih oštećenja. Obzirom na navedeno, istraživanje na fetalnom tkivu koje je korišteno u ovoj doktorskoj disertaciji dalo je rezultate koji su očekivani za normalan fetalni razvoj.

Starost zametaka određena je na temelju mjerenja dužine tjeme-zadak (eng. crown-rump length-CRL), glava-peta i dužine lijevog stopala. Također smo za potrebe ove doktorske disertacije uzeli tkivo zdravih jajnika žena reproduktivne i postmenopauzalne

dobi sakupljeno nakon operativnih zahvata izvršenih zbog patologije nevezane uz bolesti jajnika. Tkivo primarnih seroznih tumora jajnika histološkog stupnja III prema SZO-u uzeto je nakon operativnog zahvata učinjenog prije primjene kemoterapije.

3.2. Postupci

3.2.1. Vođenje, uklapanje i rezanje tkiva

Nakon pregleda vanjskog izgleda plodova napravljena je mikrosekcija kojom su odvojeni dijelovi tkiva koji sadrže jajnik. Pregledom jajnika odraslih žena uzeti su dijelovi tkiva zdravih jajnika i seroznih tumora jajnika. Uzeti komadići tkiva fiksirani su u 4% formaldehidu u fosfatnom puferu tijekom 24 sata te, nakon ispiranja u fosfatnom puferu, dehidrirani u uzlaznim koncentracijama alkohola. Nakon ispiranja u ksilolu uklopljeni su u parafin na 56°C. Serijski su izrezani na uzdužne rezove debljine 7 μm te nalijepljeni na predmetna stakla prethodno obrađena otopinom 3-aminopropil-trietoksilana (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA). Napravljeno je orijentacijsko bojenje svakog 10-tog stakla hemalaunom i eozinom kako bi se provjerila razina reza i očuvanost tkiva.

3.2.2. Imunohistokemijsko bojanje

Imunohistokemijski postupak započet je deparafiniranjem rezova u ksilolu, a zatim su rezovi rehidrirani u alkoholima sve niže koncentracije.

Uslijedila je inkubacija u 3% H2O2 (15 minuta pri sobnoj temperaturi) čime je inaktivirana endogena peroksidaza. Nakon toga, a radi otkrivanja antigenskih mjesta, rezovi su kuhani u citratnom puferu ili etilendiamintetraoctenoj kiselini (eng. ethylenediaminetetraacetic acid EDTA) u mikrovalnoj pećnici na 95°C kroz 17 min. i

isprani u otopini fosfatnog pufera (eng. phosphate buffer saline-PBS). Daljnji postupci provedeni su prema uputama proizvođača za uporabu protutijela i referentnim metodama *Laboratorija za istraživanje ranog razvoja čovjeka* pri *Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu*.

Korištena su slijedeća primarna protutijela:

- mišje monoklonalno na ljudske antigene:

  anti-human bcl-2 onkoprotein (M0887, DAKO, Glostrup, Denmark)

- kozje poliklonalno na ljudske antigene:

  anti-human IGF-1 antibody (AF-291-NA, R&D System Inc., Minneapolis Mi, USA)

- kunićje monoklonalno na ljudske antigene:

  anti-human, anti-mouse caspase-3 antibody (AF835, R&D System Inc., Minneapolis Mi, USA)

- kunićje poliklonalno na mišji antigen:

  anti-mouse bax antibody (AB 2915, Chemicon, Temecula, CA, USA)

Nakon jednosatne inkubacije s primarnim protutijelom i ispiranja u PBS-u korištena su dva načina za sekundarno utvrđivanje primarnih protutijela: bojenje diaminobenzidinom (DAB) i imunofluorescencijom.

3.2.3. Bojanje diaminobenzidinom (DAB)

Za utvrđivanje primarnih protutijela neovisno o njihovom životinjskom podrijetlu korišten je sustav streptavidin-biotin peroksidaze (eng. Streptavidin-Biotin Peroxidase System; K0690, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) te nakon ispiranja PBS-om rezovi su obojani DAB-om kroz 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga isprani su destiliranom vodom i obojani hemalaunom. Rezovi su zatim uklopljeni u medij za

uklapanje i prekriveni pokrovnim stakalcem. Stanice koje su reagirale s odgovarajućim primarnim protutijelima imale su smeđe obojenu citoplazmu ili jezgru. Stanice koje nisu reagirale s primarnim protutijelima, imale su plavo obojenu jezgru i svijetlu citoplazmu.

Preparati su pregledani mikroskopom Olympus BX40 (Olympus, Tokyo, Japan).

3.2.4. Imunofluorescencijsko bojanje

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

- Texas Red, sc-2780, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA u razrjeđenju 1:200
- Fluorescein izotiocijanat – FITC, sc-2024, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA u razrjeđenju 1:200
- Rodamin, AP124R, Jackson Immuno Research Lab., PA, USA u razrjeđenju 1:200
- Biotinizirano sekundarno protutijelo sc-2039 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA u razrjeđenju 1:200
- Streptavidin Alexa Fluor 488 konjugat, Invitrogen Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA u razrjeđenju 1:500

Rezovi su inkubirani jedan sat sa sekundarnim fluorescentnim protutijelom u tamnoj komori. Za dvostruko imunofluorescencijsko bojenje korištena je kombinacija dvaju primarnih protutijela koja je inkubirana jedan sat, a nakon ispiranja PBS-om dodana je kombinacija odgovarajućih sekundarnih protutijela i inkubirana također jedan sat. Nakon zadnjeg ispiranja PBS-om rezovi su uklopljeni u medij za uklapanje (Immuno-Mount, Shandom, Pittsburg, PA, USA) i prekriveni pokrovnim stakalcem. Analizirana je kolokalizacija primijenjenih biljega u tkivu.

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

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

NEGATIVNA KONTROLA

Rezovi namijenjeni negativnoj kontroli kod imunohistokemijskog bojenja svakog antigena prošli su zajedno s ostalim rezovima istovjetan postupak, osim što nisu inkubirani primarnim protutijelom nego su za to vrijeme bili u PBS-u. Negativna kontrola ima samo hemalaunom odnosno DAPI-jem plavo obojene jezgre stanica bez smeđe boje odnosno bez fluorescentnog signala citoplazmi ili jezgara stanica.

POZITIVNA KONTROLA

Pozitivna kontrola na istraživanim rezovima bila je smeđe obojenje (bojenje DAB-om) odnosno imala je fluorescentni signal (bojenje fluorescentnim sekundarnim protutijelima) pojedinih citoplazmi ili jezgara stanica u okolnim strukturama za koje se iz literature zna da reagiraju s primarnim protutijelima. Raspored i razlike pozitivnih od negativnih stanica u strukturama rezova dodatno su provjereni u literaturi i to za svaki traženi čimbenik.

3.2.5. Detekcija apoptotskih stanica TUNEL metodom

DNK-fragmentacija u apoptotskim stanicama dokazana je uporabom deoksinukleotdil-transferaza (TdT) metode označavanja hidroksilnih skupina na krajevima fragmenata DNK (TUNEL-metoda, Fluorescein FragEL^{TM} DNA Fragmentation Detection Kit, Calbiochem, USA). Deparafinizirani i rehidrirani rezovi prvo su inkubirani u proteinazi K 20 minuta, a zatim 30 minuta u izjednačavajućem puferu (PBS, pH 7.4), sve na sobnoj temperaturi. Rezovi su kasnije pokriveni TdT otopinom i inkubirani u tamnoj i vlažnoj komori tijekom 1.5 sati na 37°C. Nakon ispiranja u PBS-u rezovi su uklopljeni i pokriveni pokrovnim stakalcem.

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

3.3. Semi-kvantifikacija pozitivnih stanica

Semi-kvantifikacija pozitivnih stanica utvrđena je samo za preparate obojene DAB-om. Jačina obojenja u tkivu prikazana je u četiri kategorije: - odsustvo reaktivnosti, + blaga reaktivnost, ++ umjerena reaktivnost i +++ jaka reaktivnost. Za ovu analizu korišten je Olympus BX40 mikroskop. Statistička analiza uzoraka nije provedena u okviru ove doktorske disertacije jer je osnovni cilj bio dokazati prisutnost istraživanih biljega tijekom razvoja u zdravom odraslom tkivu i u tumorskom tkivu. Osnovna ideja ove doktorske disertacije bila je praćenje procesa u staničnim vrstama koje su u tumorskom tkivu izvor zloćudnih stanica. Statističke metode primjenjive na dostupnim uzorcima tkiva ovdje nisu bile metoda izbora, obzirom na ekskluzivnost humanog fetalnog materijala.

3.4. Etička načela

Istraživanje je provedeno na fetalnom ljudskom tkivu starosti od 15-og i 22-og tjedna te na tkivu zdravih jajnika i seroznih novotvorina jajnika iz arhivske kolekcije *Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu* i *Zavoda za patologiju, citologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split*. Istraživanje je provedeno u sklopu znanstvenog projekta *Ministarstva znanosti obrazovanja i športa «Genski izražaj u ranom razvoju čovjeka» (216.2160528-0507).* Za provođenje projekta dobivena je suglasnost *Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Splitu* i *Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split*.

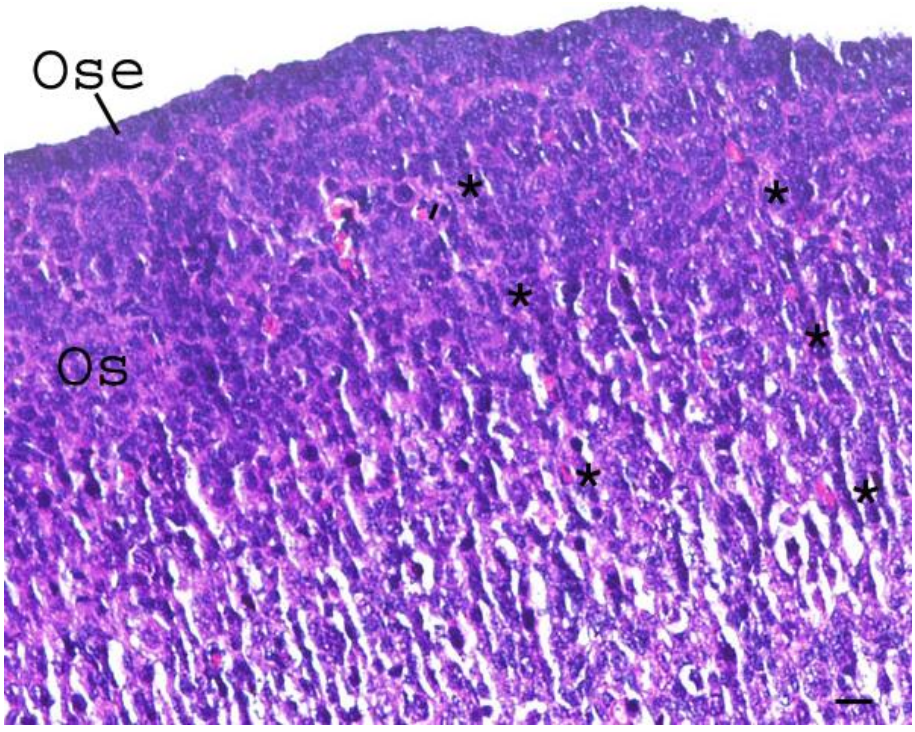
Izjavljujem da je istraživanje provedeno u skladu sa svim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje su sudjelovale u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, *Helsinšku deklaraciju*, *Zakon o zdravstvenoj zaštiti (NN 150/08, 71/10, 139/10, 22/11, 84/11, 154/11, 12/12, 35/12, 70/12, 144/12)* i *Zakon o zaštiti prava pacijenata (NN 169/04, 37/08).* Poštovana su etička načela o istraživanju fetalnog materijala u skladu s etičkim normama i međunarodnim ugovorima (124).

Za potrebe ove doktorske disertacije proveden je izračun veličine uzorka. Kao temelj za izračun odabran je izražaj proteina bax u granuloza stanicama jajnika i to zbog postojanosti izražaja između 15., 22. i 38. tjedna (8). Prema literaturnim izvorima, očekivani udio stanica pozitivnih na bax u fetalnom jajniku je 95±15 %, dok je očekivani udio stanica pozitivnih na bax u jajniku odrasle žene 25±14 % (102). Uzimajući u obzir te podatke te uz snagu istraživanja od 80% i vrijednost alpha od 0.05, potrebno je uključiti barem tri uzorka po skupini. Proračun veličine uzorka izrađen je u programu G*Power 3.1.2 (Franz Faul, Universitaet Kiel, Njemačka).

4. REZULTATI

4.1. Fetalni ovarij u 15. tjednu razvoja

U 15. tjednu razvoja fetalni ovarij sastoji se od bogate, celularne strome koja sadrži nakupine oogonija nastalih od zametnih stanica, a koje su okružene folikularnim epitelom. Površina ovarija prekrivena je kubičnim pokrovnim epitelom. Sa površine u podležeći mezenhim pružaju se sekundarni spolni tračci koji sadrže nakupine oogonija. Poneke oogonije u unutarnjem dijelu kore jajnika već se nalaze u I mejotskoj diobi te se nazivaju primarnim oocitama. Dobro razvijeni primordijalni folikuli koji sadrže oocite mogu se vidjeti u dubljim dijelovima kore fetalnog jajnika (**Slika 5.**).



Slika 5. *Fetalni ovarij u 15. tjednu razvoja. Vidi se pokrovni epitel jajnika (Ose), stroma jajnika (Os) te kortikalni tračci (zvjezdice). Hematoksilin & eozin. Povećanje 20×, ljestvica 40µm.*

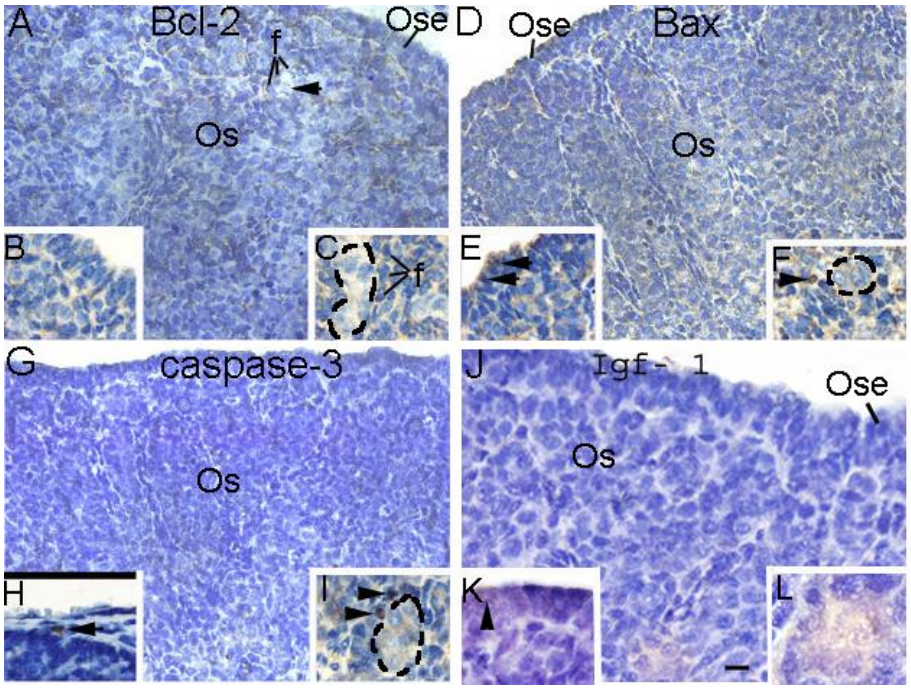
4.1.1. Imunohistokemijsko bojanje sa Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 protutijelima u 15. tjednu fetalnog razvoja

Folikularne stanice pokazale su umjeren izražaj anti-apoptoske Bcl-2 bjelančevine, izražaj u stanicama pokrovnog epitela je bio blag, dok je u oogonijama izražaj varirao od blagog do umjerenog. U stromalnim stanicama nije bilo izražaja Bcl-2 bjelančevine (**Tablica 2., Slika 6. (a)-(c)**).

Pro-apoptotska bjelančevina Bax bila je umjereno izražen u stromalnim stanicama, dok je u folikularnim stanicama postojala značajna razlika u izražaju koja se kretala od umjerene do jake reaktivnosti. Izražaj Bax-a u oogonijama i stanicama pokrovnog epitela jajnika bio je u rasponu od blagog do umjerenog (**Tablica 2., Slika 6 (d)-(f)**).

Kaspaza-3 bjelančevina bila je umjereno izražena u oocitama i folikularnim stanicama, blago u ponekim stromalnim stanicama, dok je izražaj u oogonijama bio u rasponu od blagog do umjerenog. Stanice pokrovnog epitela jajnika nisu pokazale reaktivnost na kaspazu -3 (**Tablica 2., Slika 6. (g)-(i)**).

Blagi izražaj Igf-1 bjelančevine zamijećen je u pojedinim stanicama pokrovnog epitela jajnika te u pojedinim oocitama. U stromalnim i folikularnim stanicama nije bilo izražaja Igf -1 bjelančevine (**Tablica 2., Slika 6. (k)-(l)**).



Slika 6. *Jajnik u 15. tjednu fetalnog razvoja. (a)–(c) Bcl-2 imunohistokemijsko bojenje. Stanice strome (Os) su negativne, dok stanice pokrovnog epitela jajnika (Ose) pokazuju umjereno izražaj Bcl-2 protutijela ((a), uvećani okvir (b)). Folikularne stanice (f) su umjereno pozitivne na Bcl-2 (smeđe obojena citoplazma), dok oocite pokazuju blag (vrh strelice, odijeljene isprekidanom crtom u uvećanom okviru) do umjeren ((a), uvećani okvir (c)) izražaj Bcl-2. (a) Povećanje 40×, (b-c) povećanje 100×.(d)–(f) Bax imunohistokemijsko bojenje. U stromi ovarija (Os) vide se izrazito Bax pozitivne folikularne stanice (vrh strelice) dok su stanice pokrovnog epitela jajnika (Ose) (strelica) umjereno pozitivne ((d), uvećani okvir (e) i (f)), dok su oocite (odijeljene isprekidanom crtom) umjereno pozitivne ((d), uvećani okvir (f)). Bax pozitivne stanice imaju smeđe obojenu citoplazmu (strelice). (d) Povećanje 40×, (e)–(f) povećanje 100×. (g)–(i) Kaspaza-3 imunohistokemijsko bojanje. Ispod pokrovnog epitela jajnika vidi se kaspaza 3 pozitivna stanica vezivnog*

tkiva sa kondeziranom, smeđe obojenom jezgrom (strelica) ((g), uvećani okvir (h)) te u stromi pozitivne folikularne stanice (vrhovi strelica) (uvećani okvir (i)), dok oocita ima svijetlo smeđe obojenu citoplazmu (odijeljena isprekidanom crtom). Oocite sa svijetlo smeđe obojanom citoplazmom (odijeljena isprekidanom crtom) su blago pozitivne na kaspazu 3 (uvećani okvir (i)). (g) Povećanje 40×, (h)-(i) povećanje 100×. (j)–(l) Igf-1 imunohistokemijsko bojenje. Folikularne stanice i stanice strome su negativne. Blagi pozitivitet vidi se u pojedinim oocitama (uvećani okvir (l)) i stanicama pokrovnog epitela (vrh strelice u uvećanom okviru (k)). (j). Povećanje 40×, (k)–(l). povećanje 100×. (a)-(j) ljestvica 25μm.

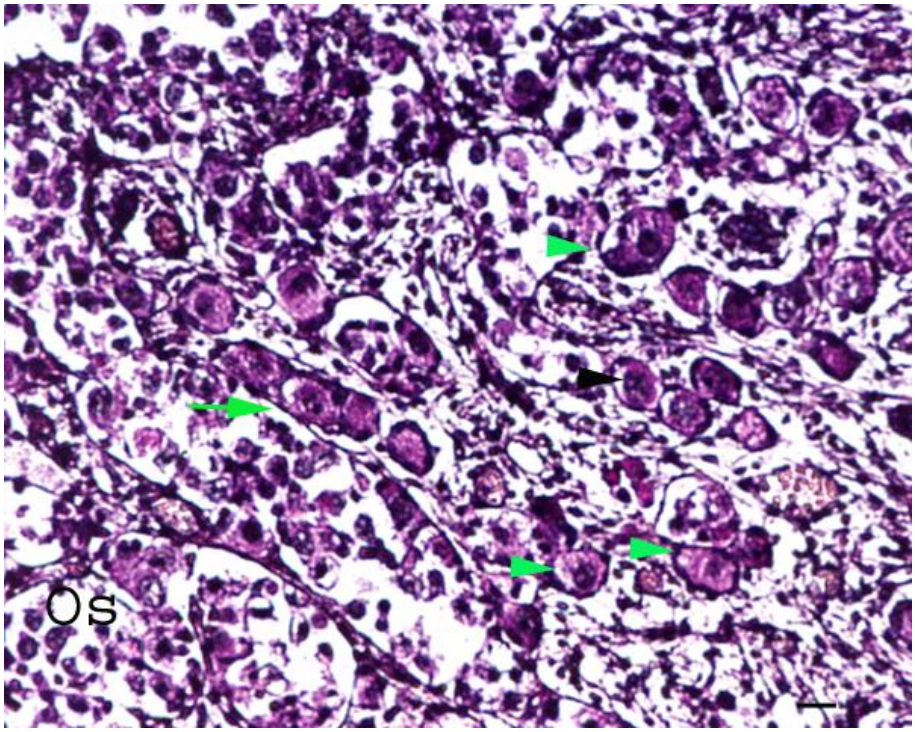
Tablica 2. *Imunohistokemijski izražaj Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 čimbenika u ljudskom fetalnom ovariju tijekom 15. i 22. tjedna razvoja*

Protutijelo	*Razvojni tjedan*	*Pokrovni epitel jajnika*	*Stanice strome*	*Primordijalni folikul*	
				Oocita/Oogonia	*Folikularnestanice*
Bcl-2	15	**+**	**-**	**+/++**	**++**
	22	**+/++**	**-**	**+/++**	**+/++**
Bax	15	**+/++**	**++**	**+/++**	**+/+++**
	22	**++**	**-/+**	**+/+++***	**+/+++**
kaspaza-3	15	**-**	**-/+**	**+/++**	**++**
	22	**++**	**++**	**+/+++**	**++**
Igf-1	15	**-/+**	**-**	**-/+**	**-**
	22	**-**	**-**	**+/+++**	**+/++**

+++ jaka reaktivnost; ++ umjerena reaktivnost; + blaga reaktivnost;
- odsustvo reaktivnosti; +/+++; reaktivnost u rasponu od blage, umjerene do jake*

4.2. Fetalni ovarij u 22. tjednu razvoja

U 22. tjednu fetalni jajnika je na višem stupnju razvoja. Većina nakupina oocita su podjeljene na primordijalne folikule okružene vlastitim folikularnim stanicama. Folikuli su smješteni u kori fetalnog jajnika, a količina stromalnih stanice između njih se značajno povećala. Ovarij je bio prekriven jednoslojnim do kubičnim epitelom. Područje srži moglo se sa sigurnošću razlikovati od kore jer je sadržavalo brojne krvne žile uronjene u rahlo vezivno tkivo.



Slika 8. *Fetalni ovarij u 22. tjednu razvoja. Vidi se stroma jajnika (Os), gnjezda oocita (zelena strelica) i primordijalni folikuli (vrh zelene strelice). Hematoksilin & eozin. Povećanje 40×, ljestvica 25µm.*

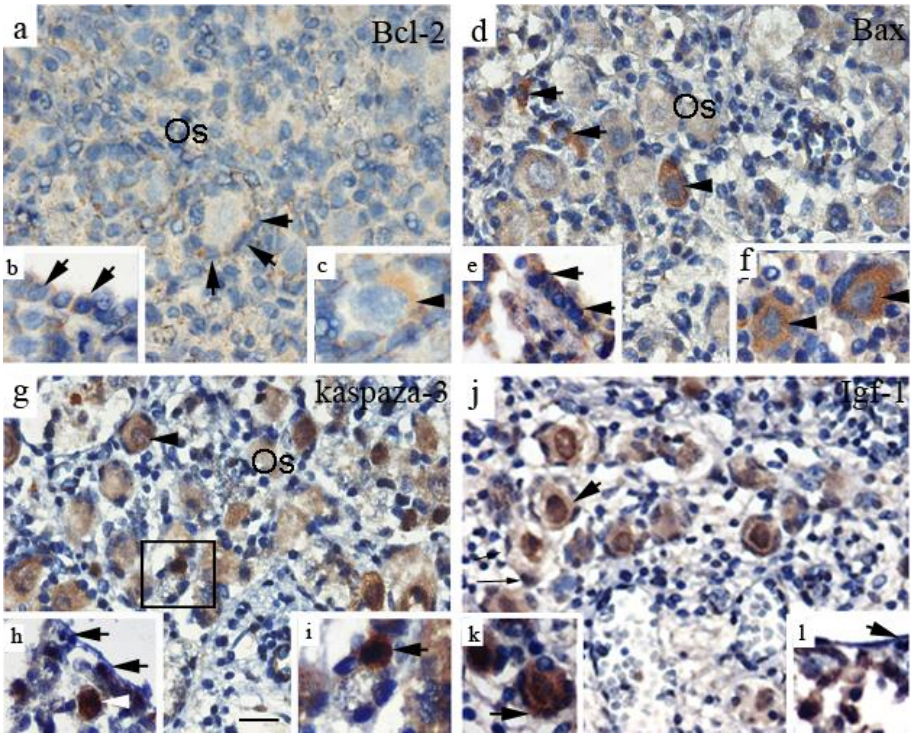
4.2.1. Imunohistokemijsko bojenje sa Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 protutijelima u 22. tjednu fetalnog razvoja

Izražaj Bcl-2 bjelančevine u stanicama pokrovnog epitela jajnika bio je blag do umjeren. Oocite i folikularne stanice pokazale su također blag do umjeren izražaj, dok u pojedinim stanicama strome nije bilo izražaja (**Tablica 3., Slika 9. (a)-(c)**).

Tijekom fetalnog razvoja izražaj Bax bjelančevine je postupno rastao. Tako je pokrovni epitel jajnika u 22. tjednu razvoja pokazao umjeren izražaj Bax bjelančevine dok je broj oocita i folikularnih stanica koje su pokazale jak izražaj porastao. Pojedine stanice strome pokazale su samo blag izražaj Bax bjelančevine (**Tablica 3., Slika 9. (d)-(f)**).

U ovom stadiju fetalnog razvoja primijećene su pozitivne kaspaza-3 stanice u svim istraživanim staničnim vrstama jajnika. U oocitama izražaj je varirao od blagog do jakog (**Tablica 3., Slika 9. (g)-(i)**).

U pokrovnom epitelu jajnika i stanicama strome nije bilo izražaja Igf-1 bjelančevine. U oocitama izražaj Igf-1 bio je blag do izrazit. Blag do umjeren izražaj Igf-1 bjelančevine uočen je u folikularnim stanicama primordijalnih folikula (**Tablica 3., Slika 9. (j)-(l)**).



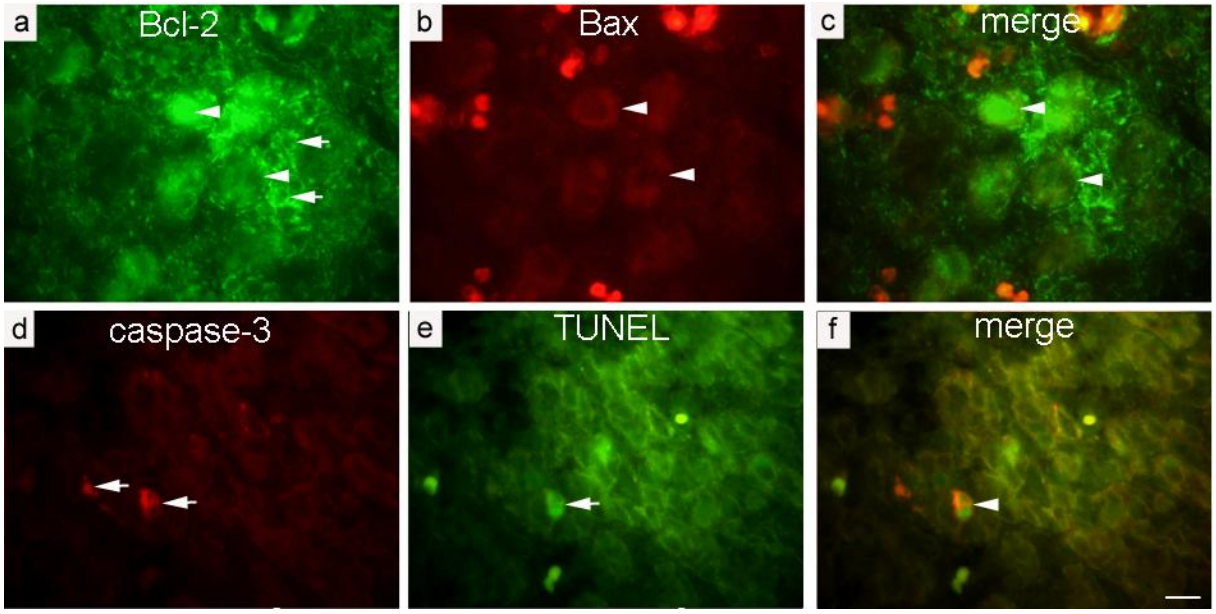
Slika 9. *Jajnik u 22. tjednu fetalnog razvoja. (a)–(c). Imunohistokemijsko bojanje na Bcl-2. Umjereno pozitivne Bcl-2 pozitivne stanice mogu se vidjeti u pokrovnom epitelu jajnika (strelice). (uvećani okvir (b)), u folikularnim stanicama (strelice) u ovarijskoj stromi (Os) (a) i u pojedinim oocitama (vrh strelice) (uvećani okvir (c)). (a) Povećanje 40×, (b)-(c) povećanje 100×. (d)–(f) Imunohistokemijsko bojanje na Bax. Pojedine folikularne stanice (strelice) i oocite (vrh strelice) su izrazito pozitivne na Bax, dok su pojedine stanice strome (Os) negativne do umjereno pozitivne ((d), uvećani okvir (f)). Izrazito Bax pozitivne stanice vide se u pokrovnom epitelu jajnika (strelice) (uvećani okvir (e)), (d) Povećanje 40×, (e) i (f) povećanje 100×. (g)-(i) Imunohistokemijsko bojanje na kaspazu-3. Kaspaza-3 pozitivne stanice u ovarijskoj stromi (Os) imaju umjeren (crni vrh strelice) do jak izražaj (crne strelice) ((g) uvećani okvir (i)), također jak izražaj vidi se u*

oocitama (bijeli vrh strelice) (uvećani okvir (h)) i jako pozitivnefolikularne stanice(strelica uvećani okvir (i)). U stanicama pokrovnog epitela nema aktivnosti kaspaze-3 (crne strelice) (uvećani okvir (h)). (g) Povećanje 40×, (h)-(i) povećanje 100×. (j)-(l) Imunohistokemijsko bojanje na Igf-1. U stromi jajnika vidi se umjeren (strelica) do jak (strelica) (uvećani okvir (k)) izražaj u oocitama. Izražaj Igf-1 u folikularnim stanicama (tanke strelice) je umjeren (j). U pokrovnom epitelu jajnika nema izražaja Igf-1 (strelica uvećani okvir (l)). (j) Povećanje 40×, (k)-(l) povećanje 100×, (a)-(j) ljestvica 25μm.

4.2.2. Dvostruko imunofluorescentno bojanje fetalnog jajnika na Bcl-2/Bax i kaspazu-3/TUNEL

U 22. tjednu fetalnog razvoja, izražaj Bcl-2 i Bax bjelančevine uočen je i u oocitama i folikularnim stanicama. U nekim oocitama dominirao je izražaj Bcl-2 bjelančevine, a u nekim oocitama izražaj Bax bjelančevine. Preklapanjem slika uočeno je postojanje istovremene prisutnosti (koekspresija) obiju bjelančevina u istoj oociti koja je preodređena za odumiranje. Koekspresija u umirućim oocitama očitovala se kao žuto do narančasto obojenje citoplazme. U oocitama koje su preodređene za preživljavanje nije bilo koekspresije (zeleno obojenje) (**Slika 10. (a)-(c)**).

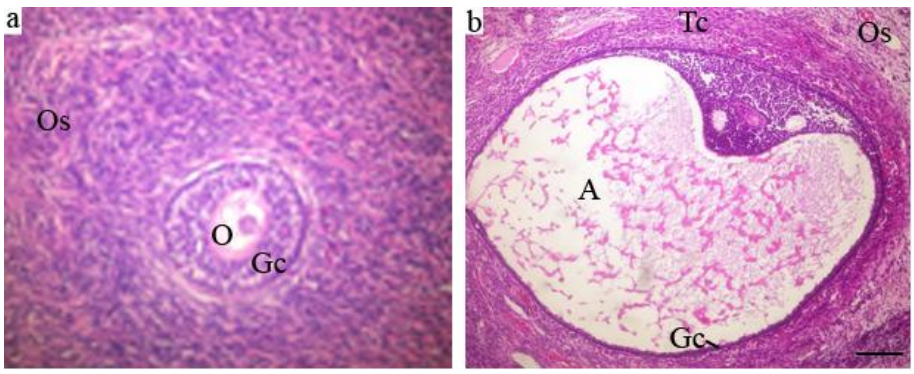
Kaspaza-3 pozitivne stanice mogle su se vidjeti u 15. tjednu fetalnog razvoja kao crveno obojenje jezgre. Također je u pojedinim stanicama jajnika TUNEL metodom (zeleno obojenje jezgre) dokazana DNA fragmentacija jezgre. Preklapanjem slika uočeno je postojanje zajedničkog izražaja kaspaze-3 i TUNEL-a u pojedinim stanicama jajnika, dok u pojedinim stanicama nije bilo koekspresije (**Slika 10. (d)-(f)**).



Slika 10. *Dvostruko imunohistokemijsko bojenje na Bcl-2/Bax čimbenike (a)-(c) i kaspaza-3/TUNEL čimbenike (d)-(e). (a)-(c) Dvostruko imunohistokemijsko bojenje na Bcl-2/Bax čimbenike. Ljudski jajnik u 22. tjednu fetalnog razvoja. Vidljiv je slab do jak izražaj Bcl-2 u oocitama (vrhovi strelica) te umjeren izražaj u folikularnim stanicama (strelice) (a). Izražaj Bax-a u oocitama je umjeren (vrhovi strelica) (b). Kolokalizacijom (merge) (c) Bcl-2 i Bax pozitivnih oocita vide se razlike u izražaju između ova dva čimbenika (vrhovi strelica) (c). Povećanje 100×. (d)-(e) Dvostruko imunohistokemijsko bojenje na kaspazu-3/TUNEL. Ljudski jajnik u 15. tjednu fetalnog razvoja. Kaspaza-3 pozitivne stanice (strelice) vidljive su u stromi jajnika (d). TUNEL pozitivne stanice (strelice) vidljive su u fetalnom ovariju (e). Kolokalizacija (merge) (f) kaspaza-3 i TUNEL pozitivnih stanica (vrh strelice) vidljiva je samo u pojedinim stanicama jajnika. (d)-(f) Povećanje 100×, ljestvica 10 µm.*

4.3. Zdravi jajnik žene reproduktivne dobi

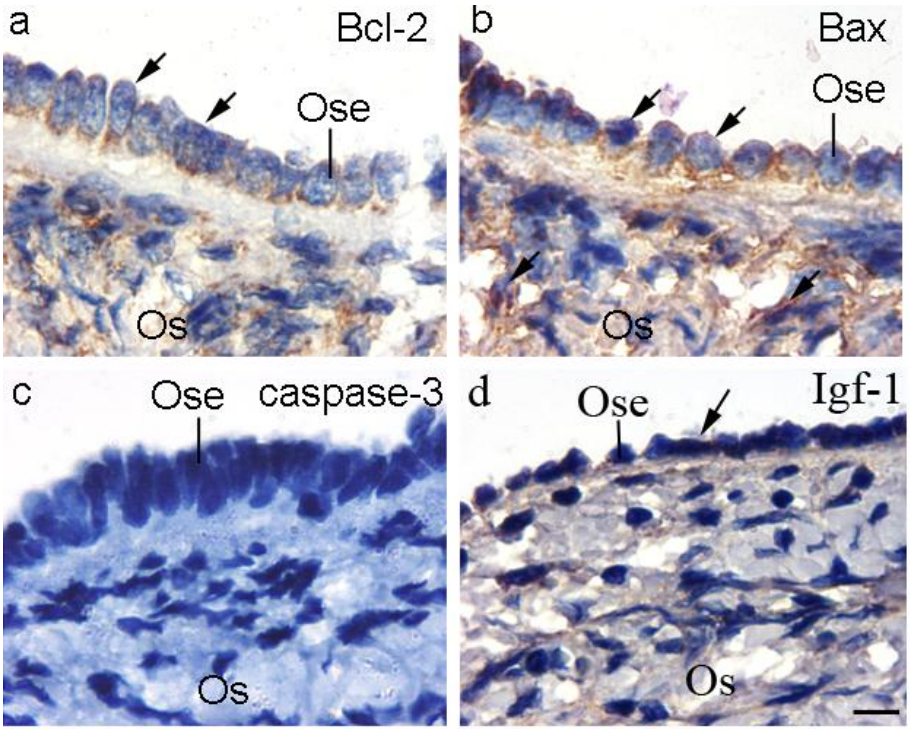
Zdravi jajnici odrasle žene imaju oblik badema. Površina jajnika prekrivena je jednim redom pločastih do kubičnih stanica pokrovnog epitala jajnika odvojenim dobro razvijenom bazalnom membranom od vezivnog tkiva tunike albuginee. Područje kore jajnika nalazi se ispod tunike albuginee, a sadrži brojne folikule u različitim stadijima razvoja. U najdubljem dijelu jajnika nalazi se područje srži koje sadrži brojne krvne žile. Primarni folikul jajnika sastoji se od oocite okružene s jednim ili više slojeva folikularnih (granuloza) stanica. Antralni (sekundarni) i zreli (tercijalni) folikuli okruženi su još i slojem stanica teke interne i teke externe. U mnogim folikulima jajnika mogu se uočiti atretične promjene karakterizirane propadanjem granuloza sloja, a potom i same oocite (**Slika 11.**).



Slika 11. *Zdravi jajnik žene u reproduktivnoj dobi. (a) Sekundarni folikul. Vidi se stroma jajnika (Os), višeslojni red granuloza stanica (Gc) i oocita (O). (b) Tercijarni folikul. Vidi se stroma jajnika (Os), antrum (A), jednoredni sloj granuloza stanica (Gc), te teka stanice (T). Hematoksilin & eozin. Povećanje 40×, ljestvica 25μm.*

4.3.1. Imunohistokemijsko bojenje zdravog jajnika reproduktivne dobi sa Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 protutijelima

Izražaj Bcl-2 bjelančevine bio je umjeren u stanicama pokrovnog epitela jajnika, a blag u stanicama strome (**Tablica 3., Slika 12. (a)**). Stanice pokrovnog epitela jajnika pokazale su jak izražaj Bax bjelančevine dok je u stanicama stome izražaj bio blag do jak (**Tablica 3., Slika 12. (b)**). Kaspaza-3 pozitivne stanice nisu nađene u stanicama pokrovnog epitela jajnika, ali su uočene u stanicama strome te granuloza stanicama zrelog tercijarnog folikula (**Tablica 3., Slika 12. (c)**). Umjeren do jak izražaj Igf-1 bjelančevine imale su stanice pokrovnog epitela jajnika dok je izražaj u stanicama strome bio blag do umjeren (**Tablica 3., Slika 12. (d)**).

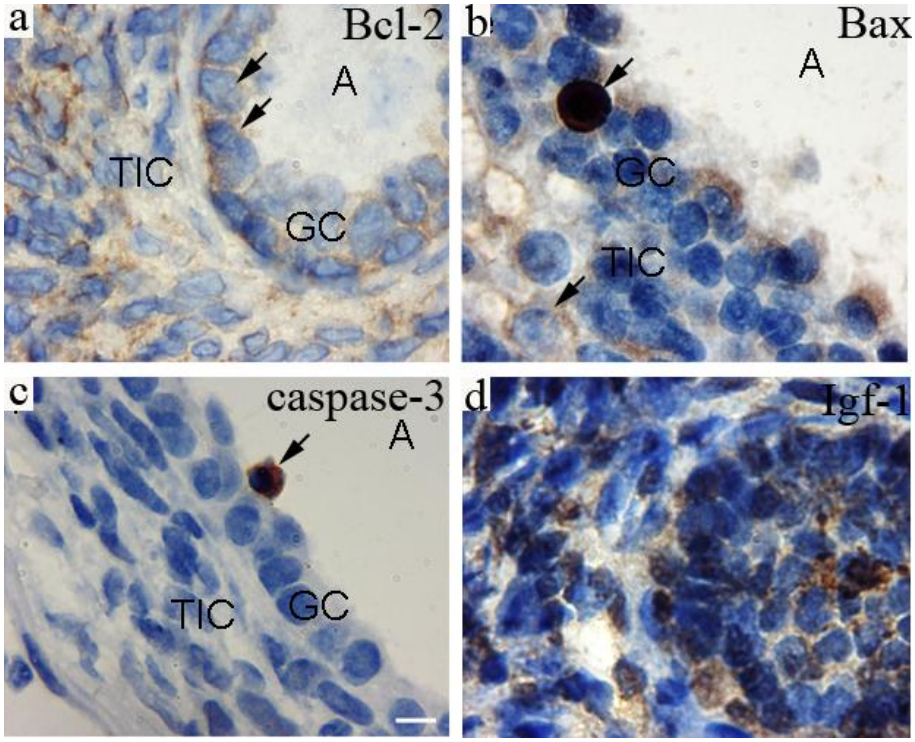


Slika 12. *Zdravi jajnik žene reproduktivne dobi (a)-(d). (a) Imunohistokemijsko bojanje na Bcl-2. Vide se umjereno pozitivne stanice pokrovnog epitela*

jajnika (Ose, strelice) i strome (Os). (b) Imunohistokemijsko bojanje na Bax. Vide se izrazito pozitivne stanice pokrovnog epitela (Ose, strelice) i strome (Os). Imunohistokemijsko bojanje na kaspazu-3 (c). Vide se negativne stanice pokrovnog epitela jajnika (Ose) i strome (Os). (d) Imunohistokemijsko bojanje na Igf-1. Vidi se jak izražaj pojedinih stanica pokrovnog epitela jajnika (Ose, strelica) i blag izražaj u stanicama strome (Os). Povećanje 40×, ljestvica 25μm.

Izražaj Bcl-2 i Bax bjelančevina ovisio je o stadiju razvoja jajnih folikula te o napredovanju same atrezije. Granuloza i teka stanice sekundarnih folikula pokazale su blag od jak izražaj Bcl-2 i Bax protutijela. U granuloza stanicama i stanicama teke interne atretičnih sekundarnih folikula izražaj Bcl-2 bio je blag do jak. U istraživanim preparatima sekundarnih folikula nismo mogli zaključivati o izražaju Bcl-2 i Bax protutijela u oocitama, jer ih nije bilo zbog uznapredovalog stadija atrezije. Izražaj Bcl-2 u stromalnim stanicama bio je blag (**Tablica 3., Slika 13. (a)-(b)**). Oocite sekundarnih folikula pokazale su blag izražaj Igf-1 bjelančevine dok izražaja nije bilo u granuloza i teka stanicama (**Tablica 3.**).

Umjeren do jak izražaj Bax bjelančevine uočen je u granuloza stanicama i stanicama teke interne tercijarnih folikula. Na rezu nedostaje oocita (**Tablica 3., Slika 13. (b)**). Kaspaza-3 pozitivne stanice uočene su u pojedinim granuloza stanicama tercijarnih folikula, dok su teka stanice bile negativne na kaspazu-3 (**Tablica 3., Slika 13. (c)**). Također je u granuloza i teka stanicama primjećen blagi izražaj Igf-1 bjelančevine (**Tablica 3.**).



Slika 13. *Folikuli u različitim fazama razvoja u zdravom jajniku žene reproduktivne dobi (a)-(d). (a) Imunohistokemijsko bojanje na Bcl-2. Sekundarni folikul sa umjereno pozitivnim (strelica) granuloza stanicama (GC) i blago pozitivnim teka interna stanicama (TIC), antralna šupljina (A). (b) Imunohistokemijsko bojanje na Bax. Trecijarni folikul sa umjereno do jako pozitivnim granuloza stanicama (strelice) i umjereno pozitivnim stanicama teke interne (TIC), antralna šupljina (A). (c) Imunohistokemijsko bojanje na kaspazu-3. Tercijarni folikul sa kaspaza-3 pozitivnim (strelice) granuloza stanicama (GC), kaspaza 3 negativnim stanicama teke interna (TIC), antralna šupljina (A). (d) Imunohistokemijsko bojanje na Igf-1. Sekundarni folikul sa blago pozitivnim granuloza stanicama. Oocita nedostaje na rezu. Povećanje 100×, ljestvica 10μm.*

Tablica 3. *Imunohistokemijski izražaj Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 čimbenika u reproduktivnom jajniku*

Stanične vrste jajnika	*Protutijela*			
	Bcl-2	Bax	kaspaze-3	Igf-1
Pokrovni epitel jajnika	**++**	**+++**	**-**	**++/+++**
Stanice strome	**+**	**+/+++**	**-/+++**	**+/++**
Primarni folikul				
Oocita	**+/++**	**+/+++**		**+**
Granuloza stanice	**++**	**+/+++**		**+**
Sekundarni folikul				
Oocita	**/**	**/**	**/**	**+**
Granuloza stanice	**+/+++**	**+/+++**	**/**	**-**
Teka stanice	**+/+++**	**+/+++**	**/**	**-**
Tercijarni folikul				
Oocita	**/**	**/**	**/**	**/**
Granuloza stanice	**+/+++**	**++/+++**	**-/+++**	**+**
Teka stanice	**+/+++**	**++/+++**	**-**	**+**

+++, jaka reaktivnost ;
++, umjerena reaktivnost;
+, blaga reaktivnost;
- odsustvo reaktivnosti;
+/+++, reaktivnost u rasponu od blage, umjerene do jake;*
/ nedostaje struktura na tkivnom presjeku

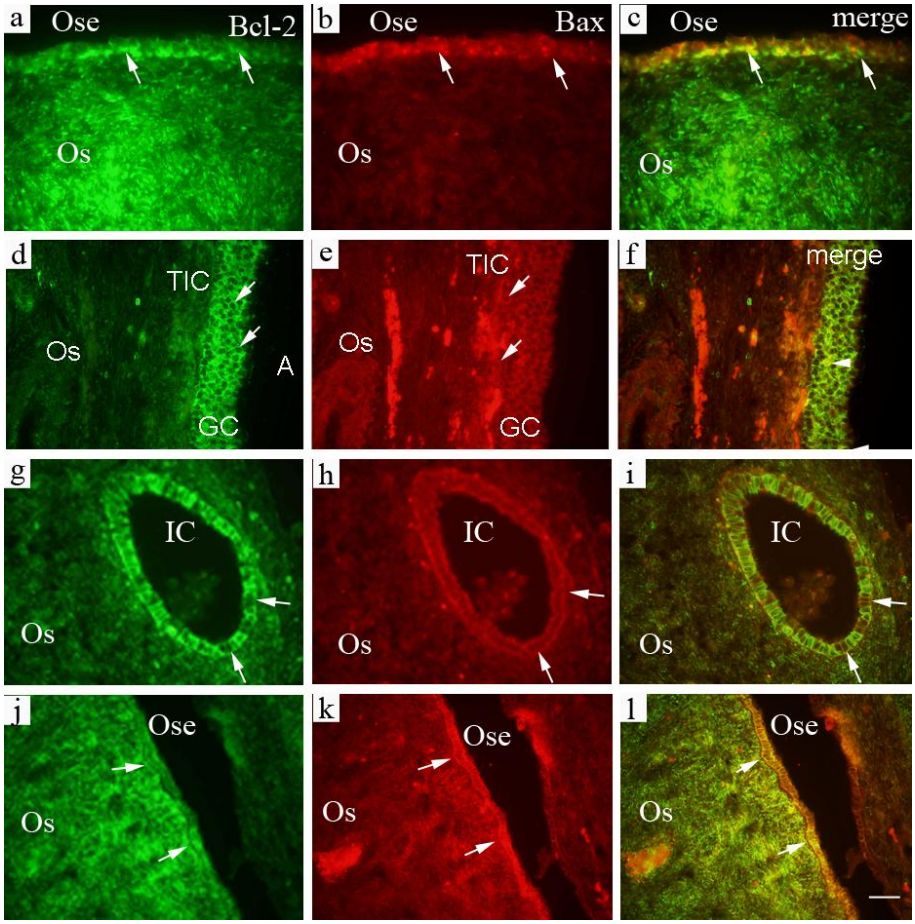
4.3.2. Dvostruko imunofluorescentno bojanje zdravog jajnika reproduktivne dobi na Bcl-2/Bax

U zdravom jajniku žene reproduktivne dobi izražaj Bcl-2 bio je jak u stanicama pokrovnog epitela jajnika kao i stanicama strome (**Slika 14. (a)**). Jak izražaj Bax-a mogao se uočiti samo u stanicama epitela (**Slika 14. (b)**). Preklapanjem slika uočeno je postojanje zajedničkog izražaja Bcl-2 i Bax bjelančevina u pojedinim stanicama pokrovnog epitela (**Slika 14. (c)**).

U tercijarnom folikulu koji je bio u početnom stadiju atrezije uočen je jak izražaj Bcl-2 u svim granuloza stanicama te umjeren izražaj u stanicama teke interne. Pojedine stanice teke eksterne i strome također su pokazale jak izražaj Bcl-2 bjelančevine (**Slika 14. (d)**). Umjeren izražaj Bax-a primijećen je u granuloza stanicama, dok je u stanicama teke interne izražaj bio jak. Nespecifično bojanje viđeno je u eritrocitima unutar krvnih žila (**Slika 14. (e)**). Preklapanjem slika uočen je zajednički izražaj Bcl-2 i Bax bjelančevine u granuloza stanicama: Bcl-2 je dominirao u većini stanica, dok je Bax dominirao u stanicama koje su okruživale antalnu šupljinu. S druge strane izražaj Bax-a dominirao je u stanicama teke interne i pojedinim stanicama strome (**Slika 14. (f)**).

U stanicama epitela inkluzijskih cista uočenje je jak izražaj Bcl-2 (**Slika 14. (g)**), dok je izražaj Bax bjelančevine bio blag (**Slika 14. (h)**). Preklapanjem slika u pojedinim stanicama uočen je zajednički izražaj Bcl-2 i Bax bjelančevina, dok je u većini preostalih stanica domirao izražaj Bcl-2 (**Slika 14. (i)**).

U invaginaciji površine jajnika pokrovni epitel jajnika pokazao je blag izražaj Bcl-2 (**Slika 14. (j)**) dok je izražaj Bax-a bio izrazit (**Slika 14. (k)**). Preklapanjem slika uočen je zajednički izražaj Bcl-2 i Bax bjelančevina (**Slika l4. (l)**).

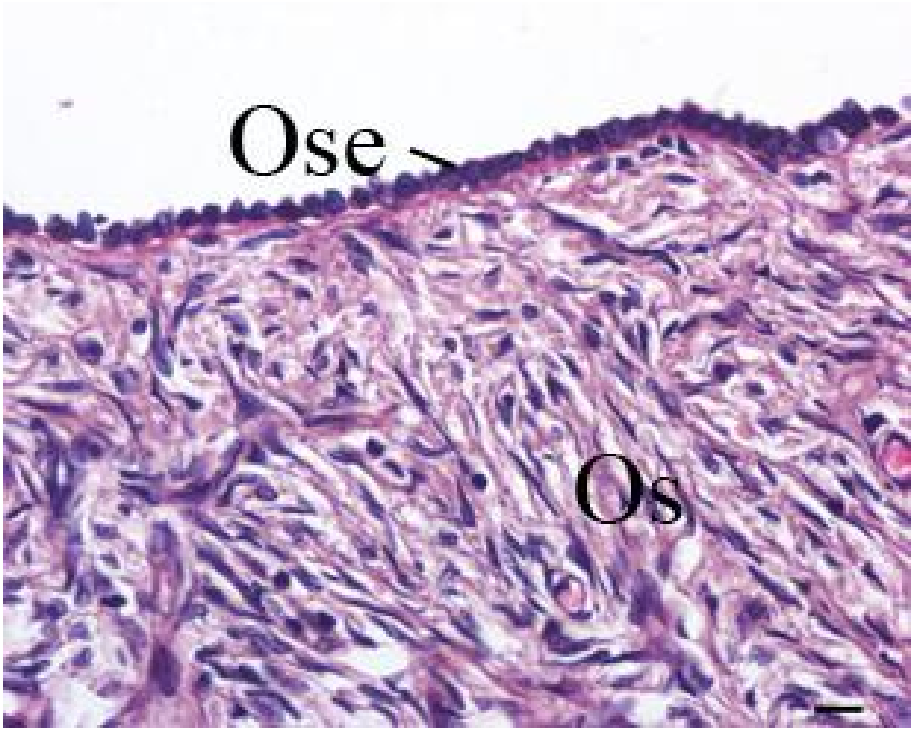


Slika 14. *Dvostruko imunofluorescentno bojanje zdravog jajnika na Bcl-2/Bax. (a)-(c) Pokrovni epitel jajnika. Vidi se jak izražaj Bcl-2 (strelice (a)) i Bax-a (strelice (b)) u epitelnim stanicama, dok je samo Bcl-2 izražen u stromi. Preklapanjem slika (merge) (a) i (b) vidi se zajednički izražaj (strelice (c)) obaju protutijela samo u epitelnim stanicama. (d)-(f) Tercijarni folikul. (d) Vidi se jak izražaj Bcl-2 bjelančevine (strelice) u granuloza stanicama (GC) i blago pozitivne stanice teke interne (TIC) i strome (Os), antralna šupljina (A). (e). Vidi se jak izražaj Bax bjelančevine (strelice) u stanicama teke interne (TIC) te blago pozitivne granuloza stanice (GC) i stanice strome (Os) (e). Preklapanjem slika (merge) (d) i (e) vidi se prevladavajući izražaj Bcl-2 u većini granuloza*

stanica dok Bax prevladava samo u pojedinim granuloza stanicama (vrhovi strelica) (f). (g)-(i) Inkluzijska cista. Vidi se jak izražaj (strelice) Bcl-2 u epitelu (g), dok je izražaj Bax bjelančevine blag (strelice (h)). Preklapanjem slika (g) i (h) vidi se dominantan izražaj Bcl-2 u epitelnim stanicama, smo u pojedinim stanicama vidi se zajednički izražaj (strelice (i)). (j)-(l) Invaginacija pokrovnog epitela jajnika.Vidi se blag izražaj (strelice) Bcl-2 u stanicama pokrovnog epitela jajnika (j) dok je izražaj Bax-a izrazit (strelice (k)).Preklapanjem slika (j) i (k) vidi se zajednički izražaj Bcl-2 i Bax-a u stanicama pokrovnog epitela (l).

4.4. Zdravi jajnik žene postmenopauzalne dobi

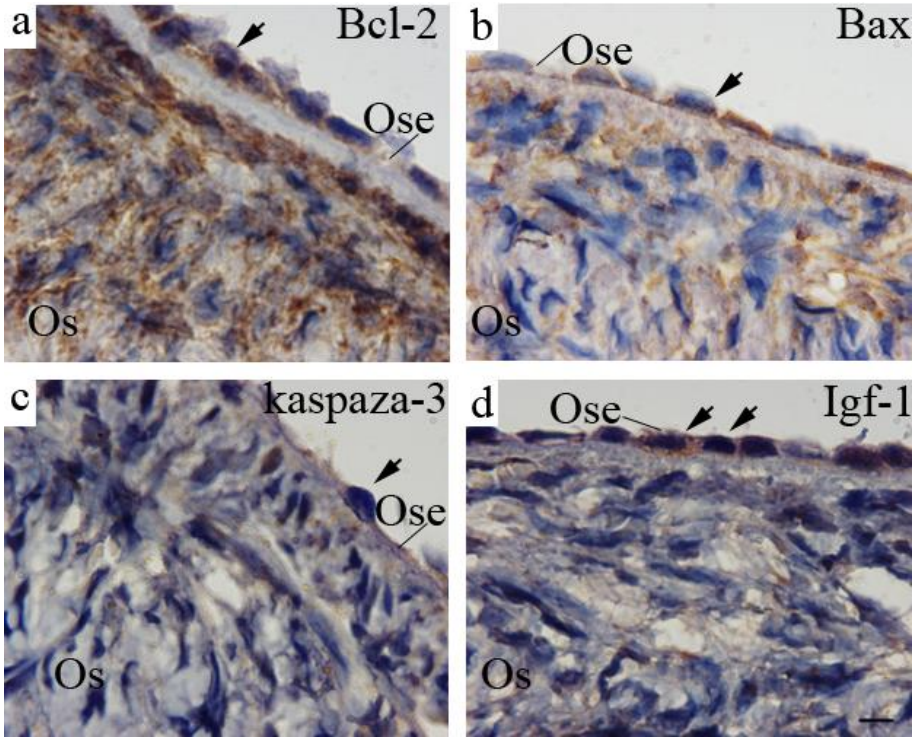
U postmenopauzalnom janiku došlo je do atrofije tkiva jajnika te se jajnik sastoji od vezivnog tkiva i ožiljaka bijelih tijela. U vezivnom tkivu jajnika mogu se vidjeti i inkluzijske ciste, ali nema primordijalnih folikula, folikula u razvoju, atretičnih folikula kao ni žutog tijela. Pokrovni epitel jajnika često je vrlo teško dobiti na histološkom preparatu zbog slabe povezanosti epitela sa stromom te se prilikom uzorkovanja odljušti s površine jajnika što dovodi do poteškoća u tumačenju morfološkog izgleda samog epitela (**Slika 15.**).



Slika 15. *Zdravi jajnik žene u postmenopauzi. Vidi se pokrovni epitel (Ose) i stroma (Os) Hematoksilin & eozin. Povećanje 40×, ljestvica 25μm.*

4.4.1. Imunohistokemijsko bojanje zdravog jajnika postmenopauzalne dobi sa Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 protutijelima

Izražaj Bcl -2 protutijela u stanicama pokrovnog epitela jajnika i stanicama strome bio je slab do umjeren dok je izražaj Bax protutijela bio blag (**Tablica 4., Slika 16.**). Dok u stanicama pokrovnog epitela jajnika nije zapažen izražaj kaspaza 3 protutijela, pojedine stanice strome pokazale su jaku reaktivnost (**Tablica 4., Slika 16.**). Prisustvo Igf 1 bjelančevine nije uočeno u stanicama strome, dok je u stanicama pokrovnog epitela izražaj bio blag (**Tablica 4., Slika 16.**).



Slika 16. *Zdravi jajnik žene u postmenopauzi (a)-(d). (a) Imunohistokemijsko bojanje na Bcl-2. Vidi se umjeren izražaj (strelica) u stanicama pokrovnog epitela (Ose) i strome (Os) (b) Imunohistokemijsko bojanje na Bax. Vidi se blag (blag) izražaj u stanicama pokrovnog epitela jajnika (Ose) i strome (Os). (c) Imunohistokemijsko bojanje na kaspazu-3. Vide se stanice pokrovnog epitela jajnika (Ose) negativne (strelica) na kaspazu-3 i negativne do umjereno pozitivne stanice strome (Os). (d) Imunohistokemijsko bojanje na Igf-1. Vide se blago pozitivne (strelica) stanice pokrovnog epitela jajnika (Ose) i negativne stanice strome (Os). Povećanje 100×, ljestvica 10μm.*

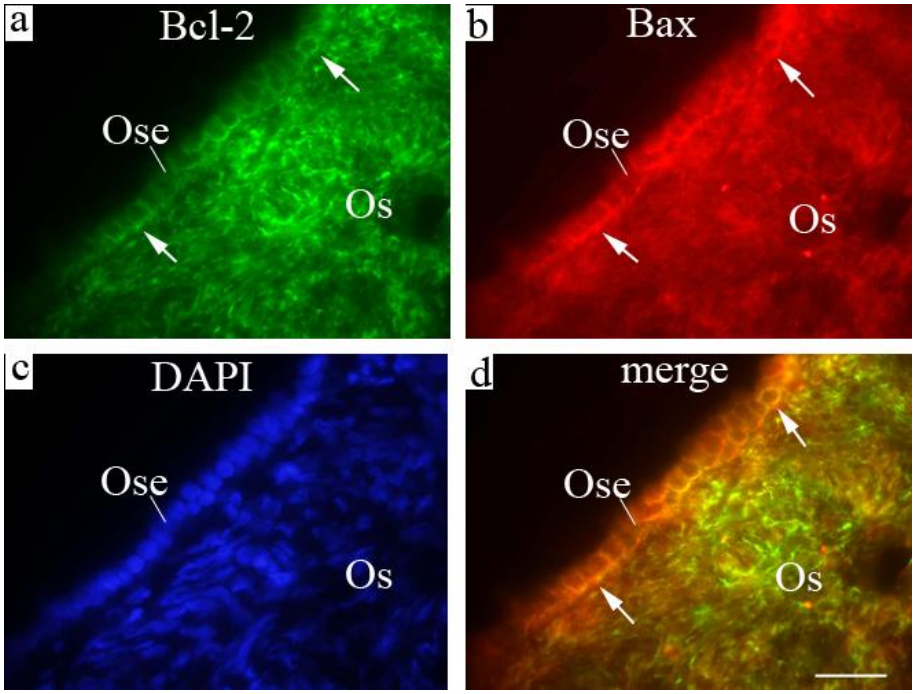
Tablica 4. *Imunohistokemijski izražaj Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 čimbenika u jajniku u postmenopauzi*

Protutijelo	Pokrovni epitel jajnika	Stanice strome
Bcl-2	**+/++**	**+/++**
Bax	**+**	**+**
kaspaza-3	**-**	**-/+++**
Igf-1	**+**	**-**

+++ jaka reaktivnost;
++ umjerena reaktivnost;
+ blaga reaktivnost;
- odsustvo reaktivnosti;
+/+++ reaktivnost u rasponu od blage, umjerene do jake*

4.4.2. Dvostruko imunofluorescentno bojanje zdravog jajnika postmenopauzalne dobi na Bcl-2/Bax

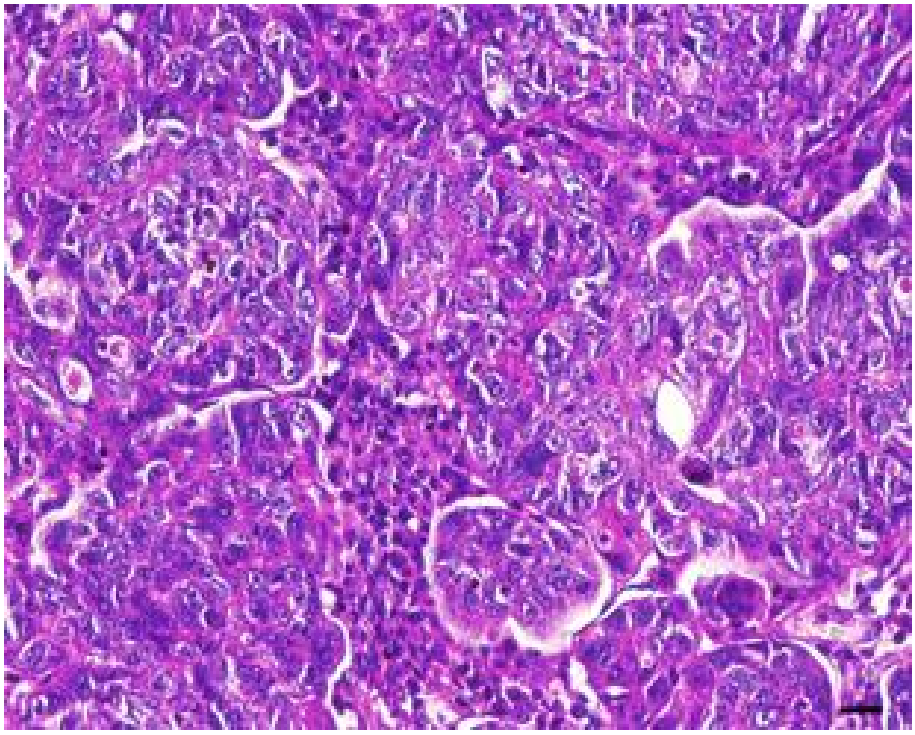
U pokrovnom epitelu jajnika uočen je umjeren izražaj Bcl-2 u većini stanica, dok je u pojedinim stanicama izražaj bio jak. Jak izražaj Bcl-2 također je uočen i u stanicama strome. Bax aktivnost bila je izrazita u stanicama pokrovnog epitela, dok je u stromi izražaj bio blag. Preklapanjem dviju slika uočeno je prisustvo kooekspresije bjelančevina Bcl-2 i Bax u stanicama pokrovnog epitela jajnika i stanicama strome (**Slika 17., (a)-(d)**).



Slika 17. *Dvostruko imunofluorescentno bojanje zdravog jajnika postmenopauzalne dobi na Bcl-2/Bax. (a) Vidi se umjeren izražaj Bcl-2 u većini stanica, dok je u pojedinim stanicama izražaj jak (strelice). (b) Vidi se izrazita Bax aktivnost u stanicama pokrovnog epitela (strelice), dok je u stromi izražaj blag. (d) Preklapanjem dviju slika vidi se prisustvo kooekspresije bjelančevina Bcl-2 i Bax u stanicama pokrovnog epitela jajnika (strelice). Povećanje 100×, ljestvica 10μm.*

4.5. Serozni tumor jajnika

Tumorsko tkivo građeno je od žljezda, resica ili solidnih nakupina atipičnih epitelnih stanica naznačenog nuklearnog polimorfizma. Mitoze su brojne, a često i nepravilna oblika s nekoliko vretena i nepravilnom segregacijom kromosoma. Mjestimice se mogla vidjeti pokoja orijaška stanica sa više jezgara. Tkivo je mjestimično nekrotično, a vide se i područja vaskularne invazije.



Slika 18. *Serozni tumor jajnika, histološkog gradusa III. Hematoksilin & eozin. Povećanje 20×, ljestvica 50μm.*

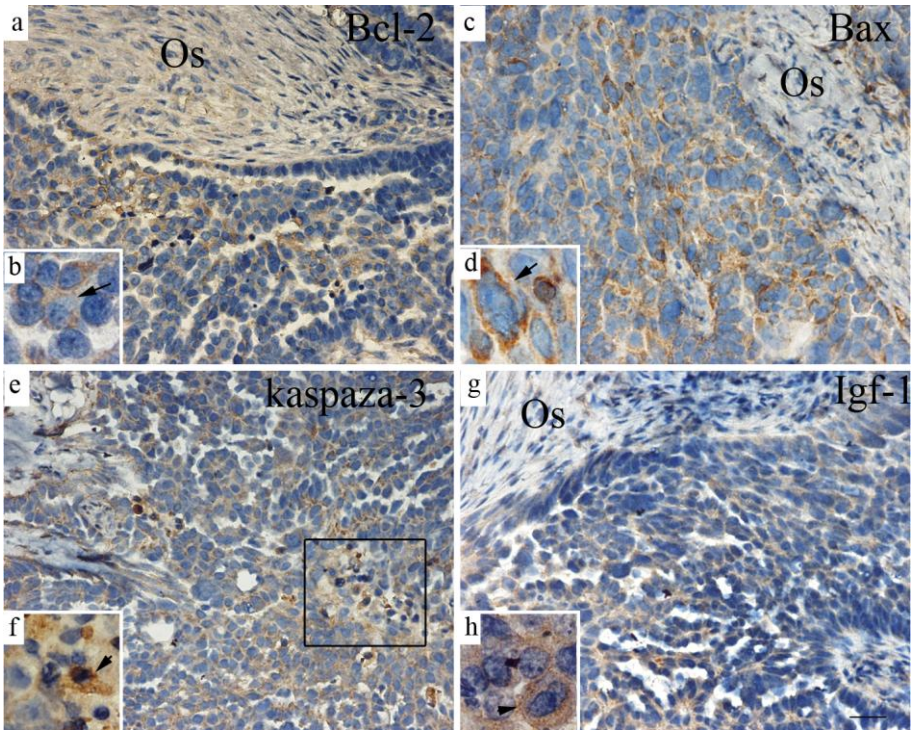
4.5.1. Imunohistokemijsko bojanje seroznog tumora jajnika sa Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 protutijelima

Samo su pojedine tumorske stanice pokazale blag izražj Bcl-2 protutijela, dok u stanicama strome nije bilo aktivnosti (**Tablica 4., Slika 19. (a)**).

U pojedinim tumorskim stanicama izražaj Bax bjelančevine bio je umjeren dok pojedine stanice nisu pokazivale izražaj, također aktivnost nije uočena u stanicama strome (**Tablica 4., Slika 19. (b)**).

Jak izražaj kaspaze-3 uočen je u pojedinim tumorskim stanicama, a stanice strome nisu pokazivale kaspaza-3 reaktivnost (**Tablica 4., Slika 19. (c)**).

U obje vrste ispitivanih staničnih vrsta uočen je različit izražaj Igf-1 bjelančevine koji se kretao od blagog do jakog, dok u pojedinim stanicama izražaja nije bilo (**Tablica 4., Slika 19. (d)**).



Slika 19. *Serozni tumor jajnika (a)-(h). (a)-(b) Imunohistokemijsko bojanje na Bcl-2. Vidi se blagi izražaj (strelica u uvećanom okviru (b)) u tumorskim stanicama. Stanice strome (Os) su negativne. (a) Povećanje 40×, ljestvica 25μm. (b) Povećanje 100×(c)-(d) Imunohistokemijsko bojanje na Bax. Vidi se umjeren izražaj (strelica u uvećanom okviru (d)) u tumorskim stanicama, stanice strome (Os) su negativne. (c) Povećanje 40×, ljestvica 25μm. (d) Povećanje 100×(e)-(f) Imunohistokemijsko bojanje na kaspazu 3. Vidi se kaspaza-3 pozitivna apoptotska tumorska stanica (strelica u uvećanom okviru (e)). Postoji infiltracija brojnih limocita (četverokut) u tkivo tumora koji se nespecifično bojaju. (e) Povećanje 40×, ljestvica 25μm. (f) povećanje*

100×. (g)-(h) Imunohistokemijsko bojanje na Igf-1. Vidi se umjeren izražaj (strelica u uvećanom okviru (h)) u tumorskim stanicama, stanice strome (Os) su negativne. (g) Povećanje 40×, ljestvica 25μm. (h) povećanje 100×.

Tablica 5. *Imunohistokemijski izražaj Bcl-2, Bax, kaspaza-3 i Igf-1 čimbenika u seroznim tumorima jajnika histološkog stupnja III*

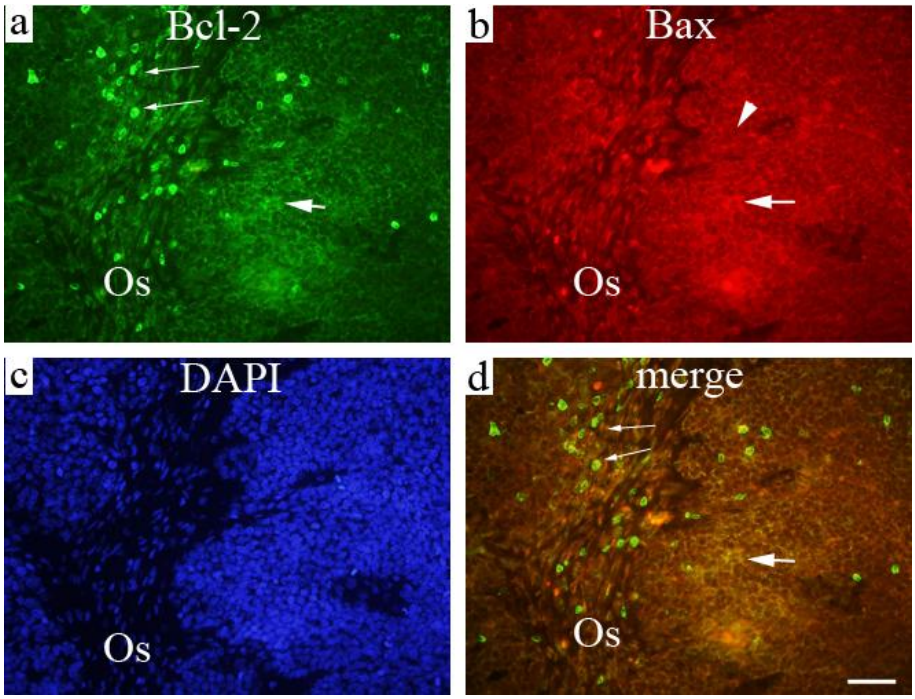
Protutijelo	Tumorske stanice	Stanice strome
Bcl-2	-/+	-
Bax	-/++	-
kaspaza-3	-/+++	-
Igf-1	-/+++	-/+++

+++ jaka reaktivnost;
++ umjerena reaktivnost;
+ blaga reaktivnost;
- odsustvo reaktivnosti;
+/+++ reaktivnost u rasponu od blage, umjerene do jake*

4.5.2. Dvostruko imunofluorescentno bojanje seroznog tumora janika na Bcl-2/Bax

Blag izražaj Bcl-2 bjelančevine uočen je u tumorskim stanicama, dok je izražaj Bax bjelančevine bio blag do umjeren. Izražaja obiju bjelančevina nije bilo u stanicama strome. Preklapanjem dviju slika uočen je zajednički izražaj Bcl-2 i Bax bjelančevine u pojedinim

tumorskim stanicama. Jak izražaj Bcl-2 primijećen je u upalnim stanicama tumora (**Slika 20., (a)-(d)**).



Slika 20. *Dvostruko imunofluorescentno bojanje seroznog tumora janika na Bcl-2/Bax (a) vidi se blag izražaj Bcl-2 u tumorskim stanicama (strelica). Vidi se jak izražaj Bcl-2 u upalnim stanicama (tanke strelice), stroma (Os) (b) Vidi se blag (vrh strelice) do umjeren (strelica) izražaj Bax-a u tumorskim stanicama, stroma (Os) (d) Preklapanjem (merge) slika (a) i (b) vidi se zajednički izražaj Bcl-2 i Bax bjelančevine (strelica) u pojedinim tumorskim stanicama. Povećanje 100×, ljestvica 10μm.*

5. RASPRAVA

Razvoj ljudskog jajnika obilježen je intezivnim razdobljima stanične proliferacije i stanične smrti, dvaju procesa koji odvijajući se istodobno osiguravaju smanjenje velikog broja oocita do konačnog broja u trenutku rođenja. Najintezivnije razdoblje proliferacije spolnih stanica ljudskog fetusa odvija se od 8. do 20. tjedna smanjujući se postupno do rođenja. Međutim, rana proliferacija i apoptoza primordijalnih spolnih stanica može se uočiti već u 5. tjednu embrionalnog razvoja tijekom njihove migracije iz žumanjčane vreće u spolne nabore kao i tijekom nastajanja primarnih i sekundarnih (kortikalnih) tračaka čiji nastanak prati naseljavanje spolnih stanica u tkivo jajnika (125). Naša studija upravo istražuje najintezivnije razdoblje proliferacije, folikulogeneze i apoptoze u ljudskom ovariju tijekom fetalnog razvoja te tijekom reproduktivnog razdoblja i postmenopauze.

Studije, rađene uglavnom na miševima i štakorima, predlažu članove Bcl-2 obitelji kao odgovorne za aktivaciju i suzbijanje apoptoze u jajniku sisavaca (126). U nekolicini imunohistokemijskih studija na ljudskom jajniku tijekom prenatalnog razdoblja istraživan je vremenski izražaj Bcl-2. Najraniji izražaj Bcl-2 bjelančevine uočen je u spolnim stanicama tijekom 6. tjedna pa sve do 17. tjedna razvoja nakon kojega izražaj Bcl-2 do danas nije uočen (8, 99, 103, 127).

U ovoj studiji, intezitet izražaja Bcl-2 bjelančevine tijekom fetalnog razvoja mijenjao se ovisno o analiziranom stadiju razvoja te ovisno o staničnim vrstama. Dok u stanicama strome nije bilo Bcl-2 izražaja, blag izražaj uočen je u folikularnim stanicama i stanicama pokrovnog epitela jajnika tijekom 15. tjedna razvoja. Samo u rijetkim oocitama uočen je blag do umjeren izražaj Bcl-2 bjelančevine. Za razliku od prijašnjih studija, u našoj studiji, izražaj Bcl-2 bjelančevine uočen je u svim staničnim vrstama jajnika u 22. tjednu fetalnog razvoja uključujući i oocite. Na osnovu opažanja naše studije može se

zaključiti o mogućoj ulozi Bcl-2 u očuvanju oocita tijeko ranog perioda razvoja prije formiranja primordijalnih folikula, ali i nakon formiranja, a ne samo tijekom ranog perioda kao se prije pretpostavljalo (8, 99).

S druge strane, u našoj studiji izražaj Bax bjelančevine uočen je tijekom svih istraživanih razvojnih razdoblja te u svim staničnim vrstama. Opisani izražaj Bax bjelančevine u oocitama fetalnih jajnika upućuje da Bax može igrati glavnu ulogu u kontroli stanične smrti. Međutim, rasprostranjen izražaj Bax proteina možda nije u skladu s količinom apoptoze u tkivu, jer djelovanje Bax-a ovisi o unutarstaničnoj lokalizaciji i stvaranju homodimera s ostalim antiapoptotskim članovima Bcl-2 obitelji (8, 99).

Do sada imunohistokemijski izražaj Igf-1 bjelančevine u ljudskom fetalnom jajniku nije istraživan (109, 111). Na moguću ulogu Igf-1 gena u reproduktivnoj funkciji upućuju studije provedene na Igf-1 genetski modificiranim miševima koji su neplodni (115). U ovom istraživanju uočen je različit izražaj Igf 1 bjelančevine ovisno o fetalnom razdobju ili istraživanim staničnim vrstama jajnika. Vremenski i prostorni izražaj Igf-1 bjelančevine u oocitama i folikularnim stanicama fetusa u skladu je sa intezivnom proliferacijskom aktivnošću koja je karakteristična za istraživana razdoblja fetalnog razvoja jajnika, ali ne i sa intezivnom apoptotskom aktivnošću.

Naša studija je također pokazala da su u zdravim jajnicima odraslih žena u reproduktivnom razdoblju i Bcl-2 i Bax izraženi u istim stanicama primarnih, sekundarnih i tercijarnih folikula. U tercijarnim folikulima zajednički izražaj Bax i Bcl-2 protutijela uočen je u granuloza i teka stanicama, dok je intezitet izražaja u folikulima bio različit, ovisno o stupnju napretka atrezije u samom folikulu. Već je u prijašnjim studijama predloženo kako prevaga jednog od navedenih bjelančevina može odrediti konačnu sudbinu stanice te da odluka o preživljenju ili smrti stanice ovisi o koncentraciji bjelančevina u stanici (99, 128, 129). Ova pretpostavka potvrđena je i rezultatima naše

studije. Također se pretpostavlja da je povećana pro-apoptotska aktivnost Bax bjelančevine zadana u jajniku sisavaca te je odgovorna za smrt fetalnih spolnih stanica i atreziju folikula u jajnicima odraslih žena (126).

Po prvi put u našoj studiji istraživan je imunohistokemijski izražaj Igf-1 bjelančevine u stanicama ljudskog jajnika. Prema studiji na genetski moodificiranim miševima kod kojih je razvoj folikula bio zaustavljen u ranom antralnom stadiju, a zreli Graafovi folikuli se ne proizvode, pretpostavlja se da Igf-1 gen ima važnu ulogu u razvoju folikula jajnika (130). Rezultati naše studije pokazali su izražaj Igf-1 bjelančevine kako u stanicama jajnih folikula tako i u ostalim staničnim vrstama. Međutim, izražaj Igf-1 bjelančevine razlikovao se ovisno o razvojnom stadiju folikula. Razlike u izražaju IGFBP gena u oocitama ljudskog ovarija ovisne o stadiju razvoja folikula pronađene su i u studiji Buyalos i suradnika te se može zaključiti da Igf obitelj ima važnu ulogu u razvoju folikula koja se vjerojatno razlikuje u različitim folikularnim stadijima (131). Također se na osnovu rezultata brojnih studija na životinjama, gdje se vidjelo da su granuloza stanice glavno mjesto izražaja Igf-1 gena, pretpostavilo da bi Igf-1 gen mogao imati važnu ulogu u odabiru folikula koji će proći proces ovulacije (132, 133). Rezultati naše studije također govore u prilog toj tvrdnji.

Naš nalaz prisutnosti Igf-1 bjelančevine, koja je odgovorna i za staničnu proliferaciju, ali i za inhibiciju apoptoze te istovremene prisutnosti proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika u istoj stanici, govori u prilog pretpostavci da su regulacija apoptoze i staničnog ciklusa usko povezani u jajniku te da bi zajednička kontrola ovih dvaju procesa mogla pridonijeti održavanju fine ravnoteže između proliferacije i smrti stanica (134-137).

U našoj studiji, tijekom prenatalnog perioda, uočeno je postojanje apoptoze u svim staničnim vrstama jajnika, osim u stanicama pokrovnog epitela jajnika. Apoptotske stanice

bile su pozitivne na kaspazu-3. U kasnijem fetalnom razvoju, tijekom stvaranja primordijalnih folikula, kaspaza-3 aktivnost uočena je i u oocitama i u folikularnim stanicama. U prijašnjim studijama, najintezivnija aktivnost kaspaze-3 uočena je u 18. i 19. tjednu fetalnog razvoja, dakle u razdoblju prije nastajanja primordijalnih folikula. Ovo povećanje kaspazne aktivnosti podudaralo se sa povećanjem apoptoze u spolnim stanicama. Tijekom daljnjeg razvoja, smanjenje aktivnosti kaspaze-3 uočeno je tijekom 20. tjedna razvoja (7, 103). Na osnovu rezultata ovih studija pretpostavilo se da nema smrti oocita u primordijalnim folikulima zbog toga što folikuli štite oocitu od apototske smrti (7). Za razliku od tih zapažanja, u našoj studiji, uočen je izražaj kaspaza-3 bjelančevine u 22. tjednu fetalnog razvoja i u oocitama i u granuloza stanicama koje tvore primordijalne folikule.

U brojnim životinjskim vrstama izražaj kaspaze-3 primijećen je u većini slučajeva u granuloza stanicama atretičnih antralnih folikula, a povremeno i pojedinim teka stanicama (24, 88, 138-140). Kaspaza-3 aktivnost uočena je i u granuloza stanicama atretičnih antralnih folikula u odraslim ljudskim jajnicima (88, 93, 94) što se podudara s rezultatima naše studije. Broj apoptotskih, kaspaza-3 pozitivnih stanica bio je veći što je atrezija više napredovala.

Također smo u našoj studiji uočili izražaj kaspaze-3 i Bax-a u ponekim teka stanicama, što je uočeno i od strane drugih autora (99). Ovo zapažanje podudara se s pretpostavkom da tijekom procesa atrezije pojedine teka stanice podliježu apoptozi dok preostale bivaju inkorporirane unutar intersticija jajnika (38, 140).

S druge strane pokazalo se da je prokaspaza-3 prisutna u svim stadijima razvoja folikula što upućuje na mogućnost da bi atrezija u ranim stadijima razvoja folikula mogla biti potaknuta kaspaza neovisnim putem smrti (6, 93). Kao što je pokazano u našoj studiji, DNA fragmentacija u jezgri umrle stanice (prikazana TUNEL metodom) nije uvijek

pokazivala zajednički izražaj sa kaspazom-3 u istoj stanici prenatalnog jajnika. Na osnovu ovog nalaza može se zaključiti da kaspaza-3 ovisna smrt stanice možda nije jedini način umiranja stanica koji je uključen u kontrolu broja stanica u jajniku. Rezultati naše prethodne studije pokazali su prisutnost p53 ovisne smrti granuloza stanica u najranijim stadijima razvoja jajnika, dok se tijekom daljnjeg razvoja u masovno odstranjenje folikularnih stanica uključuju i kaspaza ovisni i kaspaza neovisni put (125).

Naše istraživanje ljudskih različitih staničnih vrsta u ljudskim fetalnim i odraslim jajnicima reproduktivne dobi pokazalo je različitost u izražaju proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika kao i razlike u mehanizmu stanične smrti. Omjer Bcl-2 i Bax bjelančevina regulira konačnu sudbinu jajnih stanica prije i tijekom stvaranja primarnih folikula. Kaspaza-3 ovisna smrt stanica čini se jednim od najvažnijih puteva odumiranja stanica u jajniku, ali ne i jedini. Dok je tijekom embrionalnog razvoja za smrt granuloza stanica odgovoran kaspaza neovisni put, tijekom fetalnog razdoblja kaspaza-3 ovisan put postaje najvažniji mehanizam odumiranja stanica. U postnatalnom razdoblju kaspaza-3 ovisan put djeluje prvenstveno u granuloza stanicama, ali ne i u oocitama. Zbog svega navedenog apoptoza u ljudskom prenatalnom i postnatalnom jajniku je proces koji se odvija putem različitih staničnih puteva u različitim staničnim vrstama jajnika, a ovisan je o stadiju razvoja folikula ili stadiju atrezije folikula.

Osim u stanicama zdravih prenatalnih i postnatalnih jajnika izražaj proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika za potrebe ove studije istraživan je i u epitelnim stanicama seroznih tumora jajnika histološkog stupnja III kao i u stanicama strome. U našoj studiji tumorske stanice pokazale su blag izražaj Bcl-2 bjelančevine što je uskladu s nalazima prijašnjih studija koje govore o tendenciji smanjenja inteziteta izražaja Bcl-2, ovisno o tumorskoj progresiji (105, 107, 108, 141).

Za razliku od Bcl-2, izražaj Bax bjelančevine bio je umjeren. Dokazano je da jači izražaj Bax bjelančevine u stanicama tumora može utjecati na smanjenje antiapoptotske aktivnosti Bcl-2 u samim stanicama (96). Rezultati dvostrukog imunohistokemijskog bojanja u kojem smo dokazali istovremenu prisutnost obiju bjelančevina govori u prilog navedenoj tvrdnji. Omjer izražaja Bax/Bcl-2 čimbenika manji od jedan povezan je sa boljom prognozom u tumorima ovarija (101).

U našoj studiji nismo imali izražaj čimbenika Bcl-2 obitelji u stromalnim stanicama tumora za razliku od studije Andersona i sur. koji su pokazali izražaj Bcl-2 bjelančevine i u stromalnim stanicama (105). Budući je izražaj Bcl-2 manji u seroznim tumorima histološkog gradusa III moguće je da zbog manjeg broja uzoraka u našoj studiji izražaj Bcl-2 nije zamijećen u stranicama strome.

Po prvi put u ovoj studiji opisan je izražaj antiapoptotske Igf-1 bjelančevine u seroznim tumorima jajnika koji je bio jakog inteziteta i u stromalnim i u tumorskim stanicama. Moguća uloga Igf puta u razvoju tumora jajnika uočena je u in vitro studijama koje su pokazale da Igf-1 utječe na povećan rast tumorskih stanica te njihovu invazivnost (142-145). Do sada u tumorima jajnika opisan je izražaj IGF-1 receptora te prisustvo genetskih varijacija Igf1, IGFBP1 i IGFBP3 gena koje su povezane sa povećanim rizikom od nastanka karcinoma jajnika (146-148).

U našoj studiji imali smo jak izražaj kaspaze-3 u pojedinim apoptotskim tumorskim stanicama karcinoma jajnika dok izražaja u stanicama strome nije bilo. Upravo izražena apoptotska aktivnost u tumorskim stanicama karakteristika je novotvorina jajnika (91). Nekoliko ranijih studija koje su također imunohistokemijski istraživale izražaj kaspaze-3 u seroznim tumorima jajnika pokazale su povezanost izražaja kaspaze-3 i lošije prognoze (105, 107). Naši rezultati su u suglasnosti i sa studijom Diebold-a i suradnika kao i Chan-a

i suradnika koji su također primijetili izraženu apoptotsku aktivnost u tumorima jajnika visokog histološkog gradusa (107, 108).

U istraživanim seroznim tumorima histološkog gradusa 3 postoji izražena proliferacijska aktivnost koja se očituje jakim intezitetom izražaja Igf-1 bjelančevine, međutim u istim tumorskim uzorcima povećana je i apoptotska aktivnost koja se očituje jakim intenzitetom izražaja kaspaze-3. Navedeni rezultati govore u prilog velikim promjenama u broju stanica u tumorima jajnika, a pretpostavlja se da prevladavanje procesa proliferacije nad apoptozom dovodi do zloćudnog napredovanja tumora (107, 108).

Osim zbog promjena u apoptotskim putevima smatra se da tumori mogu nastati i zbog promjena u tumorskom mikrookolišu (27). Naime serozni tumori jajnika vjerojatno nastaju iz epitela inkluzijskih cista koji je tijekom reproduktivnog i postmenopauzalnog razdoblja pod izravnim utjecajem stromalnih stanica koje luče brojne čimbenike rasta odgovorne za autokrino i parakrino stimuliranu proliferaciju epitela jajnika. Kako je interakcija između stanica strome i pokrovnog epitela važna za normalnu funkcionalnu aktivnost reproduktivnog jajnika tako se smatra da je važna i za nastanak seroznog tumora ovarija (27, 43, 149). Utjecaj stromalnih stanica na nastanak tumora dokazan je u studijama na tumorima dojke, mjehura, grlića maternice, kolona, prostate i jajnika (150).

U našoj studiji uočen je jedino izražaj antiapoptotske bjelančevine Igf-1 i u tumorskim i u stormalnim stanicama što govori o izraženoj proliferacijskoj aktivnosti koja može pridonijeti malignom napredovanju tumora o čemu govore i neke ranije studije (105, 107).

Budući je u našoj studiji uočen sličan izražaj Igf-1 bjelančevine u stanicama jajnika tijekom reproduktivnog razdoblja kao i u tumorima pretpostavljamo da se isti čimbenici koji dovode do pojačane ekspresije Igf-1 ponovno aktiviraju i u tumorima, ali očito uz

gubitak normalne kontrole njegovog izražaja. S druge strane u prilog ovoj tvrdnji govori i naš nalaz da smo tijekom razdoblja postmenopauze imali smanjen izražaj Igf-1 te je bilo za očekivati da će njegov izražaj ostati smanjen i u seroznim tumorima jajnika koji najčešće i nastaju za vrijeme postmenopauze. Istraživanje na melanomima pokazalo je da je proizvodnja čimbenika rasta od strane tumorskih stanica ili stanica tumorskog mikrookoliša ključan čimbenik u stjecanju malignog fenotipa (95). S obzirom na to Igf-1 kao čimbenik rasta može i u slučaju tumora jajnika biti jedan od čimbenika malignog fenotipa.

Usporedbom izražaja Bcl-2 i Bax bjelančevine u epitelnim i stromalnim stanicama uočeno je oponašanje fetalnog izražaja navedenih čimbenika u tumorskim stanicama čiji je intezitet izražaja smanjen u odnosu na izražaj tijekom reproduktivnog perioda. Rezultati naše studije idu u prilog novijim teorijama koje smatraju da je nastanak tumora usko povezan s embrionalnim razvojem te da se razvoj tumora može smatrati neprirodnim oblikom organogeneze (151).

6. ZAKLJUČCI

1. Naše istraživanje ljudskih različitih staničnih vrsta u ljudskim fetalnim i odraslim jajnicima reproduktivne dobi pokazalo je različitost u izražaju proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika kao i razlike u mehanizmu stanične smrti.
2. Omjer Bcl-2 i Bax bjelančevina regulira konačnu sudbinu jajnih stanica prije i tijekom stvaranja primarnih folikula.
3. Kaspaza-3 ovisna smrt stanica čini se jednim od najvažnijih puteva odumiranja stanica u jajniku, ali ne i jedini. Tijekom fetalnog razdoblja kaspaza-3 ovisan put postaje najvažniji mehanizam odumiranja stanica. U postnatalnom razdoblju kaspaza-3 ovisan put djeluje prvenstveno u granuloza stanicama, ali ne i u oocitama.
4. U različitim staničnim vrstama ljudskog prenatalnog i postnatalnog jajnika, apoptoza je proces koji se odvija različitim apoptotskim putevima, a ovisan je o stadiju razvoja folikula ili stadiju atrezije folikula.
5. U našoj studiji po prvi put je imunohistokemijskim bojanjem dokazano prisustvo Bcl-2 biljega u svim staničnim vrstama jajnika u 22. tjednu fetalnog razvoja na osnovu čega se može zaključiti o mogućoj ulozi Bcl-2 u očuvanju oocita tijekom ranog razdoblja razvoja jajnika prije, ali i nakon formiranja primordijalnih folikula, a ne samo tijekom ranog perioda kao se prije pretpostavljalo.
6. Izražaj Bax bjelančevine uočen je tijekom svih istraživanih razvojnih razdoblja te u svim staničnim vrstama. Opisani izražaj Bax bjelančevine u oocitama fetalnih jajnika upućuje da Bax može imati glavnu ulogu u kontroli stanične smrti.

7. Vremenski i prostorni izražaj Igf-1 bjelančevine u oocitama i folikularnim stanicama fetusa u skladu je sa intenzivnom proliferacijskom aktivnošću koja je karakteristična za istraživana razdoblja razvoja fetalnog jajnika, ali ne i sa intenzivnom apoptotskom aktivnošću te je vjerojatno neophodna za rast i razvoj rane ljudske gonade.
8. Izražaj Igf-1 bjelančevine vjerojatno je odgovoran i za staničnu proliferaciju, ali i za inhibiciju apoptoze.
9. Istovremena prisutnost proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika u istoj stanici govori u prilog pretpostavci da su apoptoza i stanični ciklus u jajniku tijekom prenatalnog i postnatalnog razvoja usko povezani te da bi poremećaj njihove fine ravnoteže mogao utjecati na razvoj tumora.
10. U istraživanim seroznim tumorima histološkog stupnja 3 postoji izražena proliferacijska aktivnost koja se očituje jakim intezitetom izražaja Igf-1 bjelančevine, međutim u istim tumorskim uzorcima povećana je i apoptotska aktivnost koja se očituje jakim intenzitetom izražaja kaspaze-3 što govori u prilog velikim promjenama u broju stanica u tumorima jajnika, te se može pretpostaviti da prevladavanje procesa proliferacije nad apoptozom dovodi do zloćudnog napredovanja tumora.
11. U našoj studiji uočen je jedino izražaj antiapoptotske bjelančevine Igf-1 i u tumorskim i u stormalnim stanicama što govori o izraženoj proliferacijskoj aktivnosti kako u tumorskim stanicama tako i stanicama mikrookoliša koja može pridonijeti malignom napredovanju tumora.

12. Na osnovu sličnog izražaj Igf-1 bjelančevine u stanicama jajnika tijekom reproduktivnog razdoblja kao i u tumorima pretpostavljamo da se isti čimbenici koji dovode do pojačane ekspresije Igf-1 ponovno aktiviraju i u tumorima.
13. Usporedbom izražaja Bcl-2 i Bax bjelančevine u epitelnim i stromalnim stanicama uočeno je oponašanje fetalnog izražaja navedenih čimbenika u tumorskim stanicama čiji je intezitet izražaja smanjen u odnosu na izražaj tijekom reproduktivnog perioda. Rezultati naše studije idu u prilog novijim teorijama koje smatraju da je nastanak tumora usko povezan s embrionalnim razvojem te da se razvoj tumora može smatrati neprirodnim oblikom organogeneze.

7. LITERATURA

1. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. J Clin Invest. 2010;120(4):963-72.

2. Fitzgerald M, Fitgerald M. Human Embryology. London: W.B. Saunders Company; 1994

3. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. Endocrine reviews. 2001;22(2):255-88.

4. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd ed. Zagreb: Školska knjiga; 2008.

5. Moore K, Pertsaud, TVN. The Developing Human - Clinically Oriented Embryology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1993.

6. Johnson AL, Bridgham JT. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. Reproduction. 2002;124(1):19-27.

7. Fulton N, Martins da Silva SJ, Bayne RA, Anderson RA. Germ cell proliferation and apoptosis in the developing human ovary. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2005;90(8):4664-70.

8. Albamonte MS, Willis MA, Albamonte MI, Jensen F, Espinosa MB, Vitullo AD. The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ-cell-specific VASA protein, BCL-2/BAX expression balance and apoptosis. Hum Reprod. 2008;23(8):1895-901.

9. Clement P, Young R. Atlas of gynecologic surgical pathology. 2nd ed. New York: Saunders; 2008.

10. Junqueria C, Carneiro, J. Basic histology, 11th ed. International edition: Mcgraw Hill Medical Publishing Division; 2005.

11. Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. Ann N Y Acad Sci. 2008;1127:1-9.

12. Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1997;82(11):3748-51.

13. Oktay K, Karlikaya G, Akman O, Ojakian GK, Oktay M. Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. Biology of reproduction. 2000;63(2):457-61.

14. Hudson LG, Zeineldin R, Stack MS. Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: unique cadherin profiles in tumor progression. Clin Exp Metastasis. 2008;25(6):643-55.

15. Gillett WR, Mitchell A, Hurst PR. A scanning electron microscopic study of the human ovarian surface epithelium: characterization of two cell types. Hum Reprod. 1991;6(5):645-50.

16. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.

17. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 1980;68:251-306.

18. Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. Dev Biol. 1999;213(1):1-17.

19. Murdoch WJ. Proteolytic and cellular death mechanisms in ovulatory ovarian rupture. Biol Signals Recept. 2000;9(2):102-14.

20. Pru JK, Tilly JL. Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. Mol Endocrinol. 2001;15(6):845-53.

21. Modi DN, Sane S, Bhartiya D. Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. Mol Hum Reprod. 2003;9(4):219-25.

22. Singh RP, Carr DH. The anatomy and histology of XO human embryos and fetuses. Anat Rec. 1966;155(3):369-83.

23. Reynaud K, Cortvrindt R, Verlinde F, De Schepper J, Bourgain C, Smitz J. Number of ovarian follicles in human fetuses with the 45,X karyotype. Fertil Steril. 2004;81(4):1112-9.

24. Berardinelli P, Russo V, Martelli A, Nardinocchi D, Di Giacinto O, Barboni B, et al. Colocalization of DNA fragmentation and caspase-3 activation during atresia in pig antral follicles. Anat Histol Embryol. 2004;33(1):23-7.

25. Hsueh AJ, Billig H, Tsafriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocrine reviews. 1994;15(6):707-24.

26. Markstrom E, Svensson E, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. Reproduction. 2002;123(1):23-30.

27. Slot KA, de Boer-Brouwer M, Voorendt M, Sie-Go DM, Ghahremani M, Dorrington JH, et al. Irregularly shaped inclusion cysts display increased expression of Ki67, Fas, Fas ligand, and procaspase-3 but relatively little active caspase-3. Int J Gynecol Cancer. 2006;16(1):231-9.

28. Baker TG. A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1963;158:417-33.

29. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocrine reviews. 1996;17(2):121-55.

30. Byskov AG. Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. J Reprod Fertil. 1974;37(2):277-85.

31. Kasuya K. Elimination of apoptotic granulosa cells by intact granulosa cells and macrophages in atretic mature follicles of the guinea pig ovary. Arch Histol Cytol. 1997;60(2):175-84.

32. Inoue S, Watanabe H, Saito H, Hiroi M, Tonosaki A. Elimination of atretic follicles from the mouse ovary: a TEM and immunohistochemical study in mice. J Anat. 2000;196 (Pt 1):103-10.

33. Kuranaga E, Kanuka H, Bannai M, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M. Fas/Fas ligand system in prolactin-induced apoptosis in rat corpus luteum: possible role of luteal immune cells. Biochem Biophys Res Commun. 1999;260(1):167-73.

34. Murdoch WJ, McDonnel AC. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. Reproduction. 2002;123(6):743-50.

35. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. The American journal of pathology. 1990;136(3):593-608.

36. Hughes FM, Jr., Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. Endocrinology. 1991;129(5):2415-22.

37. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. Annual review of physiology. 1997;59:349-63.

38. Yang MY, Rajamahendran R. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. Biology of reproduction. 2000;62(5):1209-17.

39. Leung PC, Choi JH. Endocrine signaling in ovarian surface epithelium and cancer. Hum Reprod Update. 2007;13(2):143-62.

40. Ćorušić A, BD, Šamija M, Šobat H, ur. Ginekološka onkologija. In: Jukic S, editor. Tumori jajnika-patologija. 1 izd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2005. p. 295-311.

41. S J, D B, Jadranka I-F, M N. Bolesti ženskog spolnog sustava. In: Damjanov I, Jukic S, Nola M, editors. Patologija. 3 izd. ed. Zagreb: Medicinska Naklada; 2011.

42. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? Lancet. 1971;2(7716):163.

43. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. Journal of the National Cancer Institute. 1983;71(4):717-21.

44. Ghahremani M, Foghi A, Dorrington JH. Etiology of ovarian cancer: a proposed mechanism. Medical hypotheses. 1999;52(1):23-6.

45. Barker DJ, Osmond C, Thornburg KL, Kajantie E, Eriksson JG. A possible link between the pubertal growth of girls and ovarian cancer in their daughters. Am J Hum Biol. 2008;20(6):659-62.

46. Perera F. Molecular Epidemiology, prenatal exposure and prevention of cancer. Environ Health. 2011;10 Suppl 1:S5.

47. Jukić S Damjanov I. Specijalna patologija. zagreb: Medicinska naklada; 2004.

48. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. Lancet Oncol. 2008;9(12):1191-7.

49. Kurman RJ, Shih Ie M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. Am J Surg Pathol. 2010;34(3):433-43.

50. Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG. Ovarian carcinogenesis and the biology of ovarian surface epithelium. J Cell Physiol. 1997;173(2):261-5.

51. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. The American journal of pathology. 2004;164(5):1511-8.

52. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. Int J Gynecol Pathol. 2000;19(1):7-15.

53. Kurman RJ, Shih Ie M. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. Int J Gynecol Pathol. 2008;27(2):151-60.

54. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. Am J Surg Pathol. 1997;21(1):88-101.

55. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer. 1994;73(8):2013-26. Epub 1994/04/15.

56. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer. 1972;26(4):239-57. Epub 1972/08/01.

57. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. The American journal of pathology. 1995;146(1):3-15.

58. Clarke PG, Clarke S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. Anat Embryol (Berl). 1996;193(2):81-99.

59. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. Hum Reprod Update. 2005;11(2):162-77.

60. Soini Y, Paakko P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. The American journal of pathology. 1998;153(4):1041-53.

61. Potten CS. What is an apoptotic index measuring? A commentary. British journal of cancer. 1996;74(11):1743-8.

62. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. 2009;16(1):3-11.

63. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? Autophagy. 2005;1(2):66-74.

64. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, et al. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. J Cell Physiol. 2000;182(1):41-9.

65. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(26):14376-81.

66. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. Int Rev Exp Pathol. 1991;32:223-54.

67. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. Annu Rev Immunol. 1992;10:267-93.

68. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. Annu Rev Cell Biol. 1991;7:663-98.

69. Nicholson DW. ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. Nat Biotechnol. 1996;14(3):297-301.

70. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995;267(5203):1456-62.

71. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. Blood. 1996;88(2):386-401.

72. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, et al. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. J Exp Med. 1997;186(1):25-37.

73. Zhang Y, Herman B. Ageing and apoptosis. Mech Ageing Dev. 2002;123(4):245-60.

74. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. Ann Hematol. 2005;84(10):627-39.

75. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407(6805):770-6.

76. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

77. Khosravi-Far R, Esposti MD. Death receptor signals to mitochondria. Cancer biology & therapy. 2004;3(11):1051-7.

78. Qi R LXY. New advance in caspase-independent programmed cell death and its potential in cancer therapy. IJBS. 2006;2:211-6.

79. Jones BE, Lo CR, Liu H, Srinivasan A, Streetz K, Valentino KL, et al. Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways. The Journal of biological chemistry. 2000;275(1):705-12.

80. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. Trends Pharmacol Sci. 2004;25(5):259-64.

81. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. Science. 2002;297(5579):259-63.

82. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res. 2011;30:87.

83. Bauer JH, Helfand SL. New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. Aging Cell. 2006;5(5):437-40.

84. Shinohara T, Ohshima K, Murayama H, Kikuchi M, Yamashita Y, Shirakusa T. Apoptosis and proliferation in gastric carcinoma: the association with histological type. Histopathology. 1996;29(2):123-9.

85. Khan SM, Dauffenbach LM, Yeh J. Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulosa cells. Biochem Biophys Res Commun. 2000;269(2):542-5.

86. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ. 1999;6(11):1028-42.

87. Wyllie AH. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. Mol Neurobiol. 2010;42(1):4-9.

88. Matikainen T, Perez GI, Zheng TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, et al. Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. Endocrinology. 2001;142(6):2468-80.

89. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell death and differentiation. 1999;6(2):99-104.

90. Wei P, Jin X, Zhang XS, Hu ZY, Han CS, Liu YX. Expression of Bcl-2 and p53 at the fetal-maternal interface of rhesus monkey. Reprod Biol Endocrinol. 2005;3:4.

91. Materna V, Surowiak P, Markwitz E, Spaczynski M, Drag-Zalesinska M, Zabel M, et al. Expression of factors involved in regulation of DNA mismatch repair- and apoptosis pathways in ovarian cancer patients. Oncol Rep. 2007;17(3):505-16.

92. Yang X, Zheng F, Xing H, Gao Q, Wei W, Lu Y, et al. Resistance to chemotherapy-induced apoptosis via decreased caspase-3 activity and overexpression of antiapoptotic proteins in ovarian cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2004;130(7):423-8.

93. Glamoclija V, Vilovic K, Saraga-Babic M, Baranovic A, Sapunar D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. Fertil Steril. 2005;83(2):426-31.

94. Hurst PR, Mora JM, Fenwick MA. Caspase-3, TUNEL and ultrastructural studies of small follicles in adult human ovarian biopsies. Hum Reprod. 2006;21(8):1974-80.

95. Hilmi C, Larribere L, Giuliano S, Bille K, Ortonne JP, Ballotti R, et al. IGF1 promotes resistance to apoptosis in melanoma cells through an increased expression of BCL2, BCL-X(L), and survivin. J Invest Dermatol. 2008;128(6):1499-505.

96. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes & development. 1999;13(15):1899-911.

97. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292(1):C45-51.

98. Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. Cell. 2000;103(6):839-42.

99. Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, te Velde ER, et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2001;86(7):3421-9.

100. Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. Semin Cancer Biol. 2003;13(2):115-23.

101. Lohmann CM, League AA, Clark WS, Lawson D, DeRose PB, Cohen C. Bcl-2: bax and bcl-2: Bcl-x ratios by image cytometric quantitation of immunohistochemical expression in ovarian carcinoma: correlation with prognosis. Cytometry. 2000;42(1):61-6.

102. Vital-Reyes V, Rodriguez-Burford C, Chhieng DC, Alvarado-Cabrero I, Reyes-Fuentes A, Grizzle WE. Ovarian expression of markers associated with proliferation or apoptosis in women with diminished ovarian reserve. Fertil Steril. 2006;86(1):176-85.

103. Hartley PS, Bayne RA, Robinson LL, Fulton N, Anderson RA. Developmental changes in expression of myeloid cell leukemia-1 in human germ cells during oogenesis and early folliculogenesis. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2002;87(7):3417-27.

104. Zusman I, Gurevich P, Gurevich E, Ben-Hur H. The immune system, apoptosis and apoptosis-related proteins in human ovarian tumors (a review). Int J Oncol. 2001;18(5):965-72.

105. Anderson NS, Turner L, Livingston S, Chen R, Nicosia SV, Kruk PA. Bcl-2 expression is altered with ovarian tumor progression: an immunohistochemical evaluation. J Ovarian Res. 2009;2:16.

106. Baekelandt M, Kristensen GB, Nesland JM, Trope CG, Holm R. Clinical significance of apoptosis-related factors p53, Mdm2, and Bcl-2 in advanced ovarian cancer. J Clin Oncol. 1999;17(7):2061.

107. Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell DA, et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. The American journal of pathology. 2000;156(2):409-17.

108. Diebold J, Baretton G, Felchner M, Meier W, Dopfer K, Schmidt M, et al. bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas. Am J Clin Pathol. 1996;105(3):341-9.

109. Yakar S, Leroith D, Brodt P. The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16(4-5):407-20.

110. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. Endocrine reviews. 2001;22(1):53-74.

111. LeRoith D, Roberts CT, Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. Cancer letters. 2003;195(2):127-37.

112. Greenberg RK, Srivastava SD, Ouriel K, Waldman D, Ivancev K, Illig KA, et al. An endoluminal method of hemorrhage control and repair of ruptured abdominal aortic

aneurysms. Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists. 2000;7(1):1-7.

113. J.F. H. Kinase cascades and apoptosis. In: Walters D LM, editor. Signalling pathways in apoptosis. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 1999. p. 123–46.

114. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. Endocrine reviews. 1989;10(1):68-91.

115. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. Cell. 1993;75(1):73-82.

116. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. Science. 1998;279(5350):563-6.

117. Wolk A, Mantzoros CS, Andersson SO, Bergstrom R, Signorello LB, Lagiou P, et al. Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. Journal of the National Cancer Institute. 1998;90(12):911-5.

118. Juul A, Main K, Blum WF, Lindholm J, Ranke MB, Skakkebaek NE. The ratio between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients. Clinical endocrinology. 1994;41(1):85-93.

119. Stavola BL, Hardy R, Kuh D, Silva IS, Wadsworth M, Swerdlow AJ. Birthweight, childhood growth and risk of breast cancer in a British cohort. British journal of cancer. 2000;83(7):964-8.

120. McCormack VA, dos Santos Silva I, De Stavola BL, Mohsen R, Leon DA, Lithell HO. Fetal growth and subsequent risk of breast cancer: results from long term follow up of Swedish cohort. BMJ. 2003;326(7383):248.

121. Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Tsuruta Y, Kusakari T, Kariya M, et al. Human ovarian surface epithelial (OSE) cells express LH/hCG receptors, and hCG inhibits apoptosis of OSE cells via up-regulation of insulin-like growth factor-1. International journal of cancer Journal international du cancer. 2001;91(3):309-15.

122. Spaczynski RZ, Tilly JL, Mansour A, Duleba AJ. Insulin and insulin-like growth factors inhibit and luteinizing hormone augments ovarian theca-interstitial cell apoptosis. Mol Hum Reprod. 2005;11(5):319-24.

123. Furstenberger G, Senn HJ. Insulin-like growth factors and cancer. The lancet oncology. 2002;3(5):298-302.

124. Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. Bull World Health Organ. 2008;86(8):650-2.

125. Vukusic Pusic T, Janjic T, Dujmovic I, Poljicanin A, Soljic V, Saraga-Babic M, et al. The involvement of proliferation and apoptosis in the early human gonad development. Journal of molecular histology. 2013;44(1):55-63.

126. Kim MR, Tilly JL. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. Biochim Biophys Acta. 2004;1644(2-3):205-10.

127. Quenby SM, Gazvani MR, Brazeau C, Neilson J, Lewis-Jones DI, Vince G. Oncogenes and tumour suppressor genes in first trimester human fetal gonadal development. Mol Hum Reprod. 1999;5(8):737-41.

128. Tilly JL. Apoptosis and the ovary: a fashionable trend or food for thought? Fertil Steril. 1997;67(2):226-8.

129. Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2(11):838-48.

130. Hu CL, Cowan RG, Harman RM, Quirk SM. Cell cycle progression and activation of Akt kinase are required for insulin-like growth factor I-mediated suppression of apoptosis in granulosa cells. Mol Endocrinol. 2004;18(2):326-38.

131. Buyalos RP. Insulin-like growth factors: clinical experience in ovarian function. The American journal of medicine. 1995;98(1A):55S-66S.

132. Hammond JM, Samaras SE, Grimes R, Leighton J, Barber J, Canning SF, et al. The role of insulin-like growth factors and epidermal growth factor-related peptides in intraovarian regulation in the pig ovary. Journal of reproduction and fertility Supplement. 1993;48:117-25. Epub 1993/01/01.

133. Murphy LJ, Bell GI, Friesen HG. Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. Endocrinology. 1987;120(4):1279-82. Epub 1987/04/01.

134. Guo M, Hay BA. Cell proliferation and apoptosis. Current opinion in cell biology. 1999;11(6):745-52.

135. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. Annual review of physiology. 1998;60:601-17.

136. Meikrantz W, Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle. Journal of cellular biochemistry. 1995;58(2):160-74.

137. Schutte B, Ramaekers FC. Molecular switches that govern the balance between proliferation and apoptosis. Progress in cell cycle research. 2000;4:207-17.

138. Fenwick MA, Hurst PR. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. Reproduction. 2002;124(5):659-65.

139. Feranil J, Isobe N, Nakao T. Apoptosis in the antral follicles of swamp buffalo and cattle ovary: TUNEL and caspase-3 histochemistry. Reprod Domest Anim. 2005;40(2):111-6.

140. Palumbo A, Yeh J. In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. Biology of reproduction. 1994;51(5):888-95.

141. Henriksen R, Wilander E, Oberg K. Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours. British journal of cancer. 1995;72(5):1324-9.

142. Chakrabarty S, Kondratick L. Insulin-like growth factor binding protein-2 stimulates proliferation and activates multiple cascades of the mitogen-activated protein kinase pathways in NIH-OVCAR3 human epithelial ovarian cancer cells. Cancer biology & therapy. 2006;5(2):189-97.

143. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. Endocrine reviews. 2000;21(3):215-44.

144. Lee EJ, Mircean C, Shmulevich I, Wang H, Liu J, Niemisto A, et al. Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes ovarian cancer cell invasion. Molecular cancer. 2005;4(1):7.

145. Resnicoff M, Ambrose D, Coppola D, Rubin R. Insulin-like growth factor-1 and its receptor mediate the autocrine proliferation of human ovarian carcinoma cell lines. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1993;69(6):756-60.

146. Berns EM, Klijn JG, Henzen-Logmans SC, Rodenburg CJ, van der Burg ME, Foekens JA. Receptors for hormones and growth factors and (onco)-gene amplification in human ovarian cancer. International journal of cancer Journal international du cancer. 1992;52(2):218-24.

147. Terry KL, Tworoger SS, Gates MA, Cramer DW, Hankinson SE. Common genetic variation in IGF1, IGFBP1 and IGFBP3 and ovarian cancer risk. Carcinogenesis. 2009;30(12):2042-6.

148. Van Dam PA, Vergote IB, Lowe DG, Watson JV, van Damme P, van der Auwera JC, et al. Expression of c-erbB-2, c-myc, and c-ras oncoproteins, insulin-like growth factor receptor I, and epidermal growth factor receptor in ovarian carcinoma. Journal of clinical pathology. 1994;47(10):914-9.

149. Karlan BY, Baldwin RL, Cirisano FD, Mamula PW, Jones J, Lagasse LD. Secreted ovarian stromal substance inhibits ovarian epithelial cell proliferation. Gynecologic oncology. 1995;59(1):67-74.

150. Pritchett TR, Wang JK, Jones PA. Mesenchymal-epithelial interactions between normal and transformed human bladder cells. Cancer research. 1989;49(10):2750-4.

151. Naora H. Developmental patterning in the wrong context: the paradox of epithelial ovarian cancers. Cell Cycle. 2005;4(8):1033-5.

8. SAŽETAK

U ovoj doktorskoj disertaciji imunohistokemijskim metodama istraživan je utjecaj pro-apoptotskih Bax i anti-apoptotskih Bcl-2 i Igf-1 čimbenika na staničnu smrt (kaspaza-3, TUNEL) u različitim staničnim vrstama šest fetalnih, devet odraslih zdravih jajnika te devet uzoraka seroznog tumora jajnika kako bi se otkrio mogući mehanizam kontrole broja stanica u tkivu jajnika. U različitim staničnim vrstama ljudskih fetalnih i odraslih jajnika reproduktivne dobi pokazana je različitost u izražaju proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika kao i razlike u mehanizmu stanične smrti. Omjer Bcl-2 i Bax bjelančevina regulira konačnu sudbinu jajnih stanica prije i tijekom stvaranja primarnih folikula. Kaspaza-3 ovisna smrt stanica čini se jednim od najvažnijih puteva odumiranja stanica u jajniku, ali ne i jedini. Dok je tijekom embrionalnog razvoja za smrt granuloza stanica odgovoran kaspaza neovisni put, tijekom fetalnog razdoblja kaspaza-3 ovisan put postaje najvažniji mehanizam odumiranja stanica. U postnatalnom razdoblju kaspaza-3 ovisan put djeluje prvenstveno u granuloza stanicama, ali ne i u oocitama. Zbog svega navedenog apoptoza u ljudskom prenatalnom i postnatalnom jajniku je proces koji se odvija putem različitih staničnih puteva u različitim staničnim vrstama jajnika, a ovisan je o stadiju razvoja folikula ili stadiju atrezije folikula. Osim u stanicama zdravih prenatalnih i postnatalnih jajnika izražaj proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika za potrebe ove studije istraživan je i u epitelnim stanicama seroznih tumora jajnika histološkog stupnja III kao i u stanicama strome. U istraživanim seroznim tumorima histološkog stupnja III postoji izražena proliferacijska aktivnost koja se očituje jakim intezitetom izražaja Igf-1 bjelančevine, međutim u istim tumorskim uzorcima povećana je i apoptotska aktivnost koja se očituje jakim intenzitetom izražaja kaspaze-3. Navedeni rezultati govore u prilog velikim promjenama u broju stanica u tumorima jajnika, a pretpostavlja se da prevladavanje procesa proliferacije nad apoptozom dovodi do zloćudnog napredovanja tumora. Budući je u našoj studiji uočen sličan izražaj Igf-1 bjelančevine u stanicama jajnika tijekom reproduktivnog razdoblja kao i u tumorima pretpostavljamo da se isti čimbenici koji dovode do pojačane ekspresije Igf-1 ponovno aktiviraju i u tumorima, ali očito uz gubitak normalne kontrole njegovog izražaja. Usporedbom izražaja Bcl-2 i Bax bjelančevine u epitelnim i stromalnim stanicama uočeno je oponašanje fetalnog izražaja navedenih čimbenika u tumorskim stanicama čiji je intezitet izražaja smanjen u odnosu na izražaj tijekom reproduktivnog perioda. Rezultati naše studije idu u prilog novijim teorijama koje smatraju da je nastanak tumora usko povezan s embrionalnim razvojem te da se razvoj tumora može smatrati neprirodnim oblikom organogeneze.

9. SUMMARY

The influence of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 and Igf-1 proteins on the cell death (caspase-3, TUNEL) ovarian cell lineages was immunohistochemically analyzed in six fetal, nine adult human ovaries and nine serous ovarian tumors in order to disclose possible mechanisms of cell number control. Our investigation of human fetal and adult ovaries in the reproductive stage disclosed that ovarian cell populations displayed differences in expression of pro-apoptotic and pro-survival factors, as well as differences in mechanisms of cell death. Levels of Bcl-2 and Bax protein regulate the final destiny of the germ cells prior and during primary follicles formation. Caspase-3 dependent apoptosis seems to be the most important, but not the only pathway of cell death in the human fetal ovary. While during embryonic stages of human development caspase-independent cell death pathway operates in the process of germs cell disintegration, during fetal development caspase-3 dependent pathway takes over the role of the major cell death mechanism. In post-natal ovaries, caspase-dependent cell death starts primarily in granulosa cells and not in the germ cells. Therefore, apoptosis in human ovaries appears to be a selective process which is executed by different cell death pathways in different ovarian cell populations, and is dependent on the stage of follicle development/atresia analyzed. Except in the cells of healthy prenatal and postnatal ovaries expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in the present study was investigated in epithelial cells of serous ovarian tumors of histological grade III as well as in the stromal cells. In the investigated serous tumors high proliferative activity was noticed and was reflected by strong intensity of IGF-1 protein expression. However in the same tumor samples increased apoptotic activity that was manifested with high intensity of caspase-3 expression. These results suggest significant changes in the number of cells turnover in ovarian tumors, and it is assumed that the process of proliferation overcomes apoptosis leading to the progression of malignant tumors. Since in our study a similar expression of IGF-1 protein was observed in the cells of the ovaries during the reproductive period, as well as in tumors it is suggested that the same factors that lead to increased expression of IGF-1 were re-activated in tumors, but obviously with the loss of normal control of its expression. By comparing the expression of Bcl-2 and Bax proteins in epithelial and stromal cells imitation of fetal expression of these factors was observed in tumor cells whose expression decreased in intensity compared to expression during the reproductive period. The results of our study support the newer theories which regard tumors closely associated with embryonic development and the development of tumors can be considered as aberrant form of organogenesis.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Ana Poljičanin

Adresa: KBC Split, Marmontova 4

Telefon: 021 394 475

Elektronička pošta: ana.poljicanin@mefst.hr

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 01.08.1978. u Splitu

IZOBRAZBA:

2005.	Poslijediplomski znanstveni doktorski studij ″Temeljne i kliničke medicinske znanosti″, smjer Klinička medicina pri Medicinskom fakultetu u Splitu
1997. – 2004.	Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

RADNO ISKUSTVO:

2012.-	specijalizant iz Fizikalne medicine i rehabilitacije pri Kliničkoj bolnici Split
2009.- 2012.	asistent pri Katedri za antomiju Medicinskog fakulteta u Splitu
2007. – 2009.	znanstveni novak u suradničkom zvanju asistenta na znanstvenom projektu ″Uloga apoptoze u kancerogenezi ženskog spolnog sustava″, šifra projekta: 216-0000000-0479, voditelj projekta prof. dr. sc. Katarina Vilović, dr. med.
2006. – 2007.	doktor opće medicine na zamjeni
2005. – 2006.	liječnički staž pri Zavodu za javno zdravstvo Županije splitsko-dalmatinske
2005. – 2007.	Voditelj projekta „Edukacija o reproduktivnom zdravlju“, Udruga za pomoć mladima – HELP, Split

NASTAVNE AKTIVNOSTI:

2007.-2011.	Izvođenje nastave iz predmeta Anatomija za studente svih smjerova na Medicinskom fakultetu u Splitu
2007.-2011.	Izvođenje nastave iz izbornih predmeta Radiološka anatomija i Miologija u teretani za studente svih smjerova na Medicinskom fakultetu u Splitu
2005. – 2007.	Izvođenje nastave iz predmeta Psihološku medicinu, dodiplomski studij medicine pri Medicinskom fakultetu u Split
2005. – 2007.	Izvođenje nastave iz predmeta Zdravstvena psihologija, dodiplomski stručni studij sestrinstva i fizioterapije pri Medicinskom fakultetu u Splitu
2005. – 2007.	Izvođenje nastave iz predmeta Komunikacijske vještine, dodiplomski stručni studij sestrinstva i fizioterapije pri Medicinskom fakultetu u Splitu
2005. – 2007.	Izvođenje nastave iz predmeta Psihički razvoj čovjeka, dodiplomski stručni studij sestrinstva i fizioterapije pri Medicinskom fakultetu u Splitu
2006. – 2007.	Izvođenje nastave iz predmeta Medicinsku etiku i psihologiju, dodiplomski stručni studij radioterapije pri Medicinskom fakultetu u Splitu
2001. – 2002.	demonstrator pri katedri za Patologiju i citologiju
1998. – 2000.	demonstrator pri katedri za Građu i razvoj ljudskog tijela I

PREVODILAŠTVO

2009. – 2010.	Aktivno sudjelovanje u projektu „Hrvatsko stomatološko nazivlje-HRSTON“ u sklopu programa „Izgradnja hrvatskog strukovnog nazivlja“
2009.	Prijevod Medicinskog rječnika s engleskog na hrvatski jezik, Zagreb: Masmedia
2009.	Anatomski vodič za vježbe snage / Vilović, Katarina (ur.) Zagreb : Medicinska naklada, 2009 (priručnik).

IZVORNI ZNANSTVENI RADOVI

1. **Poljicanin A**, Vukusic Pusic T, Vukojevic K, Caric A, Vilovic K, Tomic S, Soljic V, Saraga-Babic M. The expression patterns of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human fetal and adult ovary. Acta Histochem. Jan 4. 2013
2. Vukusic Pusic T, Janjic T, Dujmovic I, **Poljicanin A**, Soljic V, Saraga-Babic M, Vukojevic, K. The involvement of proliferation and apoptosis in the early human gonad development. J Mol Histol. 2013 Feb;44(1):55-63.
3. Novak, Katarina; Mirić, Dino; Jurin, Ana; Vukojević, Katarina; Aljinović, Jure; Čarić, Ana; Marinović Guić, Maja; **Poljičanin, Ana**; Košta, Vana; Rako, Dalibora; Marušić, Ana; Marušić, Matko; Puljak, Livia. Awareness and use of evidence-based medicine databases and The Cochrane Library among physicians in Croatia. // Croatian Medical Journal. 51 (2010) , 2; 157-164.
4. Grković, Ivica; Marinović Guić, Maja; Košta, Vana; **Poljičanin, Ana**; Čarić, Ana; Vilović, Katarina. Designing anatomy program in modern medical curriculum: matter of balance. // Croatian Medical Journal. 50 (2009) , 1-3; 49-54 (članak, znanstveni).
5. **Poljičanin, Ana**; Čarić, Ana; Vilović, Katarina; Košta, Vana; Marinović Guić, Maja; Aljinović, Jure; Grković, Ivica. Daily mini quizzes as means for improving student performance in anatomy course. // Croatian Medical Journal. 50 (2009) , 1-3; 55-60.
6. J. Bezić, et al., Apocrine adenoma of the breast coexistent with invasive carcinoma, Pathol. Res. Practice (2007)

KONGRESNA PRIOPĆENJA

1. Novak K, Miric D, Jurin A, Vukojevic K, Aljinovic J, Caric A, Marinovic Guic M, **Poljicanin A**, Kosta V, Rako D, Marusic A, Marusic M, Puljak L, Sambunjak D. Awareness and use of evidence-based medicine databases and The Cochrane Library among physicians in Croatia. Cochrane Colloquium 2010. Keystone, CO, USA, 18-22. 10. 2010.
2. **Poljičanin, A.** Why are we celebrating Abraham flexner?//Scientific approach to Medical Education – International Symposium on the Occasion of 100 Year Anniversary of Abraham Flexners Report, 26-27.03.2010. Split. Croatia (predavanje)

3. Košta, V., Marinović Guić, M., Aljinović, J., Čarić, A., **Poljičanin, A**., Vilović, K., Grković, I. Learning anatomical principles of basic clinical skills // Anatomy 2010 ; 4 Suppl 1 / Akkin, Murat Salih ; Celik, Hakan Hamdi (ur.). - Istanbul : Deomed Medical Publishing, 2010. ; p 40.(predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,stručni).
4. Grković, Ivica; Marinović Guić, Maja; Košta, Vana; Aljinović, Jure; Čarić, Ana; **Poljičanin, Ana**; Vilović, Katarina. Basic medical imaging training integrated in anatomy course: an added value // Anatomy 2010 ; 4 Suppl 1 / Akkin, Murat Salih ; Celik, Hakan Hamdi (ur.). Istanbul : Deomed Medical Publishing, 2010. 40-40 (predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).
5. **Poljičanin, Ana**; Čarić, Ana; Tomić, Snježana; Vilović, Katarina. PTEN immunohistochemical expression is determined by organ of origin in endometrioid histologic homologue of endometrial and ovarian tumors //
6. Čarić, Ana; **Poljičanin, Ana**; Košta, Vana; Prović, Ivana; Tomić, Snježana; Vilović, Katarina. Caspase 3 immunohistochemical expression in borderline and invasive serous ovarian tumours // Abstracts of the 16th Euroconference on Apoptosis and 5th Swiss Apoptosis Meeting.
7. **Sikavica, A**.; Kardum, G.; Tomić,S. Usporedba kliničkih dijagnoza i obdukcijskih nalaza u KB Split u periodu 2000.-2002.g.// III. hrvatski kongres Patologije i sudske medicine s međunarodnim sudjelovanjem/Hrvatska, Opatija, 08. – 11. svibnja 2005.
8. Tot, T.; Tolić, A.; **Sikavica, A**.; Tomić, S. The influence of histological type of tumour on survival prognosis in patients with ovarian cancer// III. Zagreb International Medical Summit for Medical Students and Young Doctors (ZIMS)/ Hrvatska, Zagreb, 06. – 09. studenoga 2003.
9. **Sikavica, A.;** Tolić, T.; Tot, T.; Miljević, J.; Tomić, S. Utjecaj stupnja diferencijacije tumora na prognozu u bolesnika s karcinomom jajnika//II. Zagreb International Medical Summit for Medical Students and Young Doctors (ZIMS)/Hrvatska, Zagreb, 25. – 27. listopada 2002.

SEMINARI

2009. Ljetna škola znanstvene komunikacije (Research design and Workshop Teaching Method), Trilj, Hrvatska

2007. Edukacija edukatora- INTEL- M Project Integrated Learning in Medicine (Mikroteaching, PBL, OSCE, Clinical skills, Sandwich),Split, Hrvatska

MATERINSKI JEZIK

- Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

Engleski jezik – aktivno znanje (University of Cambridge; Centar za strane jezike)

Talijanski jezik – pasivno znanje

ČLANSTVA U STRUČNIM UDRUŽENJIMA

Hrvatsko društvo za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu

Hrvatska liječnička komora