

**EFEKTI ESTROGENA I LUTEINIZIRAJUĆEG – OSLOBAĐAJUĆEG  
HORMONA NA HROMATIN U CA3 REGIONU HIPOKAMPUSA  
MUŽJAKA PACOVA\***

**EFFECTS OF ESTROGEN AND LUTEINIZING-RELEASING HORMONE  
ON CHROMATIN IN CA3 REGION OF MALE RAT HIPPOCAMPUS**

Petrović Bojana, Drekić D., Zorić Z., Jović S., Nikolić Milica, Čupić - Miladinović  
Dejana\*\*

---

*Struktura heterohromatina štiti genom od neželjenih rekombinacija, dok estrogen i luteinizirajući-oslobađajući hormon (LHRH) uzrokuju promene u samoj strukturi hromatina.*

*Studija je napravljena sa ciljem dokazivanja povezanosti neonatalno aplikovanog estrogena i LHRH, sa ispoljenim efektima na hromatinu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova.*

*Stereološki rezultati su pokazali da je ukupna površina neurona kod životinja tretiranih estrogenom značajno smanjena u odnosu na kontrolnu i grupe tretirane LHRH. Broj granula heterohromatina u grupama tretiranim estrogenom i LHRH je primetno povećan, dok je u poslednjoj, četvrtoj grupi tretiranoj i estrogenom i LHRH ova razlika još izraženija, kako u odnosu na kontrolnu, tako i u odnosu na ostale grupe.*

*Ključne reči: CA3 region, estrogen, hipokampus, LHRH, mužjak pacova*

\* Rad primljen za štampu 11. 05. 2015. godine

\*\* Dr sc. med. Bojana Petrović, profesor strukovnih studija, Odsek za farmaciju i farmakologiju, Visoka zdravstveno-sanitarna škola strukovnih studija, Beograd; dr sc. vet. med. DMITAR Drekić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sc. med. Zoran Zorić, stručni saradnik, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sc. vet. med. Slavoljub Jović, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; Milica Nikolić, student, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; Dejana Čupić Miladinović, istraživač pripravnik, dr vet. med., Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

## Uvod / Introduction

Struktura hromatina zavisi od stadijuma ćelijskog ciklusa. Tokom interfaze, hromatin je strukturno oslabljen da dozvoli pristup RNK i DNK polimerazama koje transkriptuju i replikuju DNK. Neposredna struktura hromatina tokom interfaze zavisi od gena prisutnih na DNK: DNK kodirajućih gena aktivno transkriptovanih. Ovi "uključeni" geni su mnogo slobodnije grupisani i u vezi su sa RNK polimerazama (euhromatin), dok su DNK kodirani inaktivni geni ("isključeni") u korelaciji sa strukturnim genima i mnogo gušće spakovani (heterohromatin) (Bancaud i sar., 2009; Hansen i sar., 2012). U interfazi jedro eukariota je visoko podeljene strukture. Opšte prihvaćeno je da su strukturna organizacija jedra i regulacija transkripcije funkcionalno povezane (Akhmanova i sar., 2000; Bernstein i sar., 2006). Hromatin ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena (Andrea i sar., 1999).

Region III (CA3) *hippocampus proper* je deo samog hipokampusa. CA označava latinski naziv *Cornu amonisi* – Amonovi rogovi. Region CA3 prima impulse preko mahovinastih vlakana granuliranih ćelija u *Gyrus dentatus* (DG) i formiraju projekciju ćelija entorinalnog korteksa duž perforiranog puta. Mahovinasta vlakna se završavaju u *Stratum lucidum*, dok perforirani put prolazi kroz *Stratum lacunosum* i završava se u *Stratum moleculare*. Piramidalne ćelije CA3 regiona, kojih kod pacova ima oko 200.000 u svakoj hemisferi, šalju nekolicinu aksona nazad u hilus, većina prelazi u regione CA2 i CA1 (*Schaffer* kolaterale) a deo njih se završava u samom CA3 regionu (rekurentne konekcije). I *Schaffer* kolaterale i rekurentne konekcije završavaju se u septumu dorzalno od ćelija od kojih polaze. Brojne teorije o memoriji i učenju uključuju CA3 i procese u samom hipokampusu, što predstavlja dodatni izazov za istraživanje ovog regiona. (Norman i sar., 2003). U Alchajmerovoj bolesti hipokampus je jedan od prvih regiona mozga gde se javlja oštećenje koje prati gubitak memorije i dezorijentacija kao rani simptomi. Oštećenje hipokampusa se može desiti i kao posledica hipoksije, encefalitisa ili epilepsije medijalnog temporalnog režnja (Nuñez i sar., 2007; Engel i sar., 2008; Di Paola i sar., 2008). Ljudi sa obilnim bilateralnim oštećenjem hipokampusa mogu iskusi anterogradnu amneziju ili nemogućnost zadržavanja kratkoročne memorije. Zato je od izuzetnog značaja zaštita ovog regiona mozga. Kod glodara, hipokampus se intenzivno proučava kao deo mozga odgovoran za prostornu memoriju i orijentaciju. Veliki broj neurona hipokampusa pacova i miševa reaguje na ćelije mesta (*engl. place cells*), odnosno ćelije koje odašilju veliki broj signala kada životinja prođe kroz poznato okruženje. Ove ćelije uzajamno deluju sa mrežnim ćelijama susednog entorinalnog korteksa (Moser i sar., 2008).

Testosteron se u organizmu pretvara u estrogen pod uticajem enzima aromataza (Narada i sar., 1993; Beyer i sar., 1994; Dellovade i sar., 1995; Tsuruo i sar., 1995) u CA3 regionu hipokampusa.

Reprodukcija, kao i prenošenje genetskog materijala kod sisara oba pola direktno zavisi od adekvatne neurosekrecije luteinizirajućeg oslobađajućeg hormona (LHRH), poznatog i kao gonadotropin – oslobađajući hormon (GnRH), dekaeptida opisanog od strane dva Nobelova laureata – Gullemin i Schally. Ova činjenica je najbolje prikazana kroz eksperimente u kojima se dejstvo dekaeptida blokira antagonistima receptora, što dovodi do prestanka ili redukcije sekrecije gonadotropina, prekida funkcije gonada i neplodnosti (D'Souza i sar., 2004). LHRH se oslobađa u talasima i pokreće produkciju estrogena koji stimuliše razviće i oslobađanje jajnih ćelija iz ovarijuma (Moore i sar., 2000; Stricker, 2001). Ovo je dokazano eksperimentima u kojima je dejstvo dekaeptida blokirano imunoneutralizacijom ili receptorskim antagonistima, što neizbežno dovodi do prestanka ili redukcije sekrecije gonadotropina, poremećaja funkcije gonada i infertiliteta (Kalra i Kalra, 1983). Kalra je primetio da kompleksna serija mehanizama, uključujući i biogene amine, neuropeptide i cirkulišuće polne steroide, deluje na više hipotalamusnih i možda i ekstrapotalamusnih jedara, a svi učestvuju u regulaciji i zaštiti genoma (Kalra i Kalra, 1983). Kod pacova, aplikovanje LHRH antagonista u proestrusu rezultira brzom i potpunom inhibicijom ovulacije, ukazujući na važnost ovog neuropeptida u procesu prenosa genetskog materijala jedinke. Istraživanja pokazuju da aplikacija estrogena i LHRH u kombinaciji, povećava gustinu i površinu heterohromatina koji ne dozvoljava ćelijama nekontrolisanu ekspresiju gena i štiti genom od oštećenja u navedenom regionu hipokampa (Gore i sar., 1999; Temple i sar., 2004; Terasawa i sar., 2009; Varju i sar., 2009).

Studija je napravljena sa ciljem dokazivanja povezanosti aplikacije estrogena i LHRH sa ispoljenim zaštitnim efektima na hromatinu u hipokampusu mužjaka pacova.

#### **Materijal i metode rada / *Material and methods***

Za istraživanja smo koristili mužjake Wistar soja neonatalno tretiranih estrogenom (E2) i dekaeptidom, luteinizirajući-oslobađajućim homonom (LHRH), a dobijeni rezultati upoređivani su sa odgovarajućim kontrolama žrtvovanih u adultnom periodu starosti.

Prva grupa mužjaka pacova je kontrolna, intaktna grupa. Druga grupa pacova je tretirana jednom dozom (1 mg) estradiol-dipropionata (E2, Galenika, Beograd) 3. dana po rođenju. Treća grupa pacova je tretirana 82. i 83. dana života sa 24 µg LHRH. Četvrta grupa pacova je tretirana 3. dana sa 1 mg E2 plus 82. i 83. dana života sa 24 µg LHRH. Sve grupe životinja žrtvovane su 86. dana života. Mužjaci su čuvani u optimalnim mikroklimatskim laboratorijskim uslovima, hranjeni hranom za pacove proizvedene u Veterinarskom zavodu u Zemunu, a voda je bila stalno pristupačna.

Tokom eksperimenata, životinje su držane u standardnim laboratorijskim uslovima: sobna temperatura (20–25°C), stalna vlažnost vazduha, ciklus svetlost – tama po 12 sati, slobodan pristup hrani i vodi. Svi oglledi na životinjama su vršeni

u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja Srbije (Zakon o dobrobiti životinja, 2009). Pre žrtvovanja, životinje su bile omamljene u etarskoj narkozi i izvršena je dekapitacija i to u starosti od 86. dana života. CA3 region hipokampusa je izolovan i fiksiran u Bouin-ovoj tečnosti i sproveden kroz alkohole, ksilole, do parafina. Preparati su sečeni na mikrotomu serijski na 5  $\mu\text{m}$ , bojeni sa hematoksilin-eozinom (H&E) metodom (Švob, 1974; Brown S, 2012).

### **Stereologija / Stereology**

Za stereološku analizu neurona CA3 regiona hipokampusa uzorkovanje je vršeno tako da je analiza vršena na prvom, srednjem i zadnjem isečku CA3 regiona hipokampusa. Po svakom ispitivanom isečku pomoću imerzionog objektiva povećanja 100x, obrađeno je 5 testnih polja izabраниh intermitentnim načinom uzorkovanja (Witkin, 1990).

### **Ispitivanje površine tela neurona / Examining of neuron body surfaces**

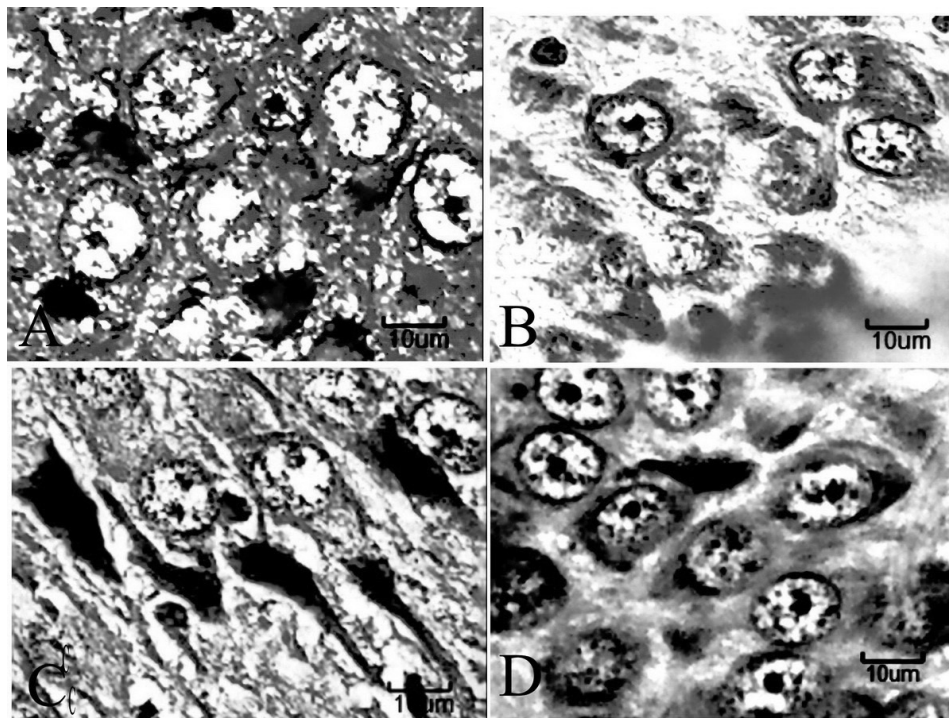
Merenje površine some, jedra i jedarceta, kao i broja granula heterohromatina i veličine granula heterohromatina neurona CA3 regiona hipokampusa kod kontrolnih i tretiranih životinja, rađeno je na preparatima bojenim sa hematoksilin-eozinom, pomoću istraživačkog mikroskopa *Motic Type 102M*, u programu *Motic Images Plus Version 2.0 ML*.

### **Statistička analiza / Statistical analysis**

Prikupljeni podaci su uneti u kompjutersku bazu podataka, a potom su obrađeni metodama deskriptivne statistike, uz korišćenje *SPSS-20 IBM* statističkog softvera za *Windows*. Za ispitivanje normalnosti raspodele obeležja korišćeni su testovi: *Kolmogorov-Smirnov* i *Shapiro-Wilk* (Corder i sar., 2009). Za poređenje srednjih vrednosti kontrolnih i tretiranih, grupa, korišćen je *Mann-Whitney U* test. Poređenje srednjih vrednosti grupa (86. dan) rađeno je pomoću *Kruskal-Wallisovog* testa, uz primenu Bonferonijeve korekcije alfa vrednosti. Deskriptivna statistika je prikazana pomoću: srednje vrednosti, medijane, standardne devijacije, minimalne i maksimalne vrednosti. Za poređenje vrednosti numeričke gustine korišćen je *chi- kvadrat* test.

### **Rezultati i diskusija / Results and Discussion**

Area neurona, jedra, jedarceta i veličinu granula heterohromatina, kao i njegov broj je ispitivano u CA3 regionu hipokampusa mužjaka kod svih grupa navedenih u ovom radu tokom postnatalnog razvoja.



Slika 1. Neuron CA3 regiona hipokampusa, bojeni hematoksilin-eozin tehnikom kod mužjaka pacova žrtvovanih 86. dana; uvećanje 100x; razmera 10 µm; A - Prva grupa - Kontrolna grupa, netretirani mužjaci žrtvovani 86. dana života; B - Druga grupa - Mužjaci tretirani 3. dana života sa 1mg E2, žrtvovani 86. dana života; C - Treća grupa - Mužjaci tretirani 82. i 83. dana života sa 24 µg LHRH, žrtvovani 86. dana života; D - Četvrta grupa - Mužjaci tretirani 3. dana života sa 1mg E2 i 82. i 83. dana sa 24 µg LHRH žrtvovani 86. dana starosti.

Picture 1. Neurons of CA3 hippocampus region, colored by hematoxylin-eosin technique in male rats sacrificed on the 86<sup>th</sup> day; enlargement 100 x; proportion 10 µm; A – First group – Control group, untreated males sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life; B – Second group – Males treated on the 3<sup>rd</sup> day of life with 1mg E2, sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life; C – Third group – Males treated on the 82<sup>nd</sup> and 83<sup>rd</sup> day of life with 24µg of LHRH, sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life; D – Fourth group – Males treated on the 3<sup>rd</sup> day of life with 1mg E2 and on the 82<sup>nd</sup> and 83<sup>rd</sup> day with 24 µg of LHRH, sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life

#### **Prva grupa – Kontrolna grupa, netretirani mužjaci žrtvovani 86. dana života / First group – Control group, untreated males, sacrificed on the 86th day of life**

Neuroni CA3 regiona hipokampusa - U ovom regionu neuroni su piramidalnog oblika, čiji su dendriti okrenuti prema slojevima hipokampusa - *Stratum oriens* i *Stratum lacunosum*, i prema *Girus Dentatus*-u. Citoplazma (pericarion) je tamno obojena (bazofilno), naročito na mestu okrenuto prema dendritima gde se nalazi *Nissl*-ova supstanca (tigroidna supstanca). To je u stvari granulirani endoplazmatičan retikulum (gER) (Vavasseur i sar., 2008). U CA3 regionu između

unutrašnjeg molekularnog i na spoljnjem delu piramidalnog sloja nalazi se po neki piknotični neuron. Međućelijski prostor (neuropil) je vakuolisan i u njemu se nalaze svetle i tamne glija ćelije. Svetla glija je mlada i aktivnija od tamne glija ćelije (Tabela 1; Grafikon 1).

Jedro (nukleus) – Jedra neurona CA3 regiona hipokampusa kod kontrolnih mužjaka površine su okrugle a pojedina su ovalnog oblika. U interfaznom jedru hromatin se nalazi u dve forme, kao: heterohromatin (spirilizovani, kondenzovani hromatin, tamniji i obojen), čiji je broj iznosio  $46,12 \pm 12,57$ , a veličina je iznosila  $34,09 \pm 15,35 \mu\text{m}^2$  i euhromatin (despirilizovani aktivni hromatin svetlije obojen) (Tabela 1; Grafikon 4). Heterohromatin se u nukleusu vidi kao tamne granule i one su čvrsto spirilizovane, tako da na njemu geni nisu dostupni za transakciju na iRNK. Raspoređen je po periferiji jedra uz jedrovu membranu. Jedro ima ulogu u sintezi iRNK i tRNK (transkripcija) koje se upravo u njemu stvaraju odakle se transportuju u citoplazmu, gde su zajedno sa ribozomima angažovane u sintezi proteina. Totalna površina jedra zavisi od ćelijske aktivnosti, tj. od sadržaja DNK. (Lodish i sar., 2000; Oberdoerffer i sar., 2007; Vavasseur i sar., 2008). Membrana jedra odvaja DNK od citoplazme (pericarion). Sa spoljašnje strane na nju se nastavljaju membrane gER-a. Količina hetreohromatina u neuronima govori nam da je aktivnost u CA3 regionu bila manja u odnosu na mužjake tretirane sa estrogenom (Lodish i sar., 2000; Oberdoerffer i sar., 2007; Vavasseur i sar., 2008) (Tabela 1; Grafikon 2).

Jedarce (nucleolus) – Jedarce je jedrova organela smeštena u nukleoplazmi. Uočava se u interfaznom jedru i pred kraj mitoze (telofaza). Kod kontrolnih mužjaka površina jedarceta je lokalizovana centralno u jedru (Tabela 1; Grafikon 3).

### **Druga grupa – Mužjaci tretirani 3. dana života sa 1mg E2 žrtvovani 86. dana života / *Second group – Males treated on the 3rd day of life with 1mg of E2, sacrificed on the 86th day of life***

Neuroni CA3 regiona hipokampusa – Neuroni kod mužjaka tretiranih estrogenom su piramidalnog i ovalnog oblika, gde su dendriti dobro izraženi i prekriveni spinama. Citoplazma (pericarion) je takođe tamno obojena (bazofilna), naročito Nissl-ova supstanca odnosno gER. U CA3 regionu nema piknotičnih neurona, jer je estrogen svojim dugim delovanjem zaštitio neurone od oštećenja. Međućelijski prostor (neuropil) je homogenog izgleda i u njemu se nalaze svetle glija ćelije. Totalna površina je značajno smanjena u odnosu na vrednosti kod kontrolne grupe mužjaka (Tabela 1; Grafikon 1).

Jedro (nukleus) – Površina jedra neurona CA3 regiona hipokampusa kod tretiranih mužjaka sa E2 je okrugla, a pojedine su ovalnog oblika. U interfaznom jedru hromatin se nalazi u obliku heterohromatina, čiji je broj iznosio  $26,48 \pm 10,90$  značajno smanjen, a veličina granula je iznosila  $58,95 \pm 17,80 \mu\text{m}^2$  značajno uvećane u odnosu na kontrolu iste starosti. Više je bio zastupljen euhromatin (Tabela 1; Grafikon 4). Totalna površina jedra je značajno smanjena u odnosu na kontrolu iste starosti. Sa spoljašnje strane na membranu jedra se nastavljaju

membrane gER-a. Količina heterohromatina u ćeliji je značajno smanjena, što ukazuje na veću vrednost euhromatina i uvećanu aktivnost neurona izazvano sa jednom dozom od 1 mg E2 datog u neonatalnom periodu života (Bowers i sar., 2010; McEwen i sar., 2012). U ovom hromatinu nalazi se najveća količina DNK koja je aktivirana za transkripciju. (Tabela 1; Grafikon 2).

Jedarce (nucleolus) – Jedarce je smešteno u nukleoplazmi. Kod tretiranih mužjaka postoji jedno hipertrofisano jedarce ili 2 do 3 manja jedarceta u jedru neurona. Bilo je značajne razlike u poređenju sa grupom kontrolnih mužjaka u odnosu na njegovu totalnu površinu (Tabela 1; Grafikon 3).

**Treća grupa – Mužjaci tretirani 82. i 83. dana života sa 24 µg LHRH žrtvovani 86. dana života / *Third group – Males treated on the 82nd and 83rd day of life with 24µg of LHRH, sacrificed on the 86th day of life***

Neuroni CA3 regiona hipokampusa – Neuroni kod mužjaka tretiranih sa LHRH su piramidalnog i izduženog, vretenastog oblika, gde su dendriti dobro izraženi i bele boje. Citoplazma (pericarion) je izrazito tamne boje. U CA3 regionu ima veliki broj piknotičnih neurona, na kojima se dobro vide tamno obojeni dendriti. Međućelijski prostor (neuropil) je vakuolisan i u njemu se nalaze piknotične glija ćelije. Totalna površina je značajno povećana u odnosu na vrednosti kod kontrolne grupe mužjaka. (Tabela 1; Grafikon 1).

Jedro (nukleus) – Jedra neurona CA3 regiona hipokampusa kod tretiranih mužjaka su okrugla i izbočena iz tela neurona. U jedru se nalazi heterohromatin, čiji je broj iznosio  $27,01 \pm 6,30$ , značajno smanjen, a prosečna površina granula heterohromatina je iznosila  $59,43 \pm 21,23 \mu\text{m}^2$ , značajno uvećana u odnosu na kontrolu iste starosti. Više je bio zastupljen euhromatin (Tabela 1; Grafikon 4). Totalna površina jedra je značajno smanjena u odnosu na kontrolu iste starosti. Broj granula heterohromatina u ćeliji je značajno povećan, što ukazuje na manji broj euhromatina i smanjenu aktivnost neurona izazvanu sa dve doze 24 µg LHRH datog u adultnom periodu života (Andrea i sar., 1999; Moore i sar., 2000). Veći broj heterohromatina ukazuje na slabu aktivnost neurona. U pojedinim jedrima vidi se liza hromatina i vakuolizacija jedra (Tabela 1; Grafikon 2).

Jedarce (nucleolus) – Jedarce je smeštena u nukleoplazmi. Kod tretiranih mužjaka sa LHRH postoje 3 do 4 manja jedarceta u jedru neurona koja su sa tamnim vlaknima povezana za jedrovu membranu. Postoji značajna razlika u poređenju sa kontrolnim mužjacima u odnosu na totalnu površinu jedarceta. Jasno se razlikuje tamni i svetli deo jedarceta (Tabela 1; Grafikon 3).

**Četvrta grupa – Mužjaci tretirani 3. dana života sa 1mg E2 i 82. i 83. dana sa 24 µg LHRH žrtvovani 86. dana starosti / *Fourth group – Males treated on the 3rd day of life with 1mg of E2, and on the 82nd and 83rd day with 24µg of LHRH, sacrificed on the 86th day of life***

Neuroni CA3 regiona hipokampusa – Neuroni kod mužjaka tretiranih zajedno, neonatalno sa E2 plus u adultnom periodu sa dve doze LHRH su piramidalnog

i ovalnog oblika gde su dendriti dobro izraženi. Citoplazma (pericarion) je tamno obojena naročito Nissl-ova supstanca okrenuta prema apikalnom dendritu. U CA3 regionu takođe nema piknotičnih neurona, jer je estrogen svojim dugim efektom delovanja zaštitio neurone od oštećenja (Bowers i sar., 2010; McEwen i sar., 2012). Međucelijski prostor je homogenog izgleda i u njemu se nalaze tamne glijia ćelije. Totalna površina je značajno smanjena u odnosu na vrednosti kod kontrolne grupe mužjaka (Tabela 1; Grafikon 1).

Jedro (nukleus) – Površina jedra neurona CA3 regiona hipokampusa kod tretiranih mužjaka sa E2 + LHRH je okrugla, a pojedine su ovalnog oblika. U interfaznom jedru se nalazi heterohromatin, čiji je broj granula iznosio  $23,81 \pm 12,75$  za polovinu smanjen, a veličina granula je iznosila  $128,49 \pm 85,73 \mu\text{m}^2$ , tri puta uvećana u odnosu na kontrolu iste starosti. Značajno je bio zastupljen euhromatin (Tabela 1; Grafikon 4). Totalna površina jedra značajno je smanjena u odnosu na kontrolu iste starosti. Količina heterohromatina u ćeliji je značajno smanjena, što ukazuje na veću vrednost euhromatina i uvećanu aktivnost neurona izazvano jednom dozom od 1 mg E2 date u neonatalnom periodu i plus dve doze LHRH datog u adultnom periodu života (Temple i sar., 2004; Varju i sar., 2009). U heterohromatinu najveća je količina DNK i aktivirana za transkripciju. (Tabela 1; Grafikon 2).

Jedarce (nucleolus) – Jedarce je smeštena centralno u nukleoplazmi. Kod tretiranih mužjaka zajedno sa estrogenom i LHRH postoji jedno hipertofisano jedarce u jednom neuronu. Od njega se protežu tamne niti do membrane jedra, odnosno iRNK. Totalna površina je smanjena u odnosu na kontrolne mužjake pacova (Tabela 1; Grafikon 3).

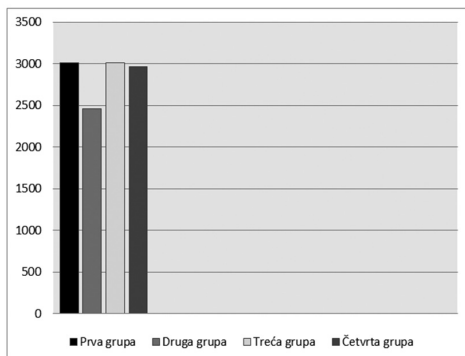
Tabela 1. Podaci svih grupa u studiji  
Table 1. Data on all the groups in the study

Grupe / Groups	n	Ukupna površina tela neurona $\mu\text{m}^2$ / Total body surface of neurons in $\mu\text{m}^2$	Ukupna površina jedra $\mu\text{m}^2$ / Total surface of nucleus in $\mu\text{m}^2$	Ukupna površina jedarceta $\mu\text{m}^2$ / Total surface of nucleolus in $\mu\text{m}^2$	Prosečna površina granula heterohromatina $\mu\text{m}^2$ / Average surface area of heterochromatin granules in CA3 region in $\mu\text{m}^2$
1.	6	$3012,19 \pm 278,90$	$191,72 \pm 39,32$	$7,40 \pm 1,70$	$34,09 \pm 15,35$
2.	6	$2463,80 \pm 298,74$	$120,24 \pm 37,47$	$7,90 \pm 1,50$	$58,95 \pm 17,80$
3.	6	$3017,43 \pm 231,98$	$134,35 \pm 24,16$	$7,42 \pm 1,30$	$59,43 \pm 21,23$
4.	6	$2936,69 \pm 228,33$	$145,88 \pm 17,63$	$7,02 \pm 1,70$	$128,49 \pm 85,73$

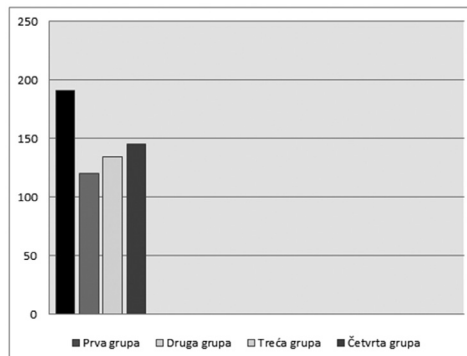
Prva grupa – Kontrolna grupa, netretirani mužjaci žrtvovani 86. dana života; Druga grupa – Mužjaci tretirani 3. dana života sa 1mg E2, žrtvovani 86. dana života; Treća grupa – Mužjaci tretirani 82. i 83. dana života sa 24  $\mu\text{g}$  LHRH, žrtvovani 86. dana života; Četvrta grupa – Mužjaci tretirani 3. dana života sa 1mg E2 i 82. i 83. dana sa 24  $\mu\text{g}$  LHRH, žrtvovani 86. dana starosti

First group – Control group, untreated males sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life; Second group – Males treated on the 3<sup>rd</sup> day of life with 1mg E2, sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life; Third group – Males treated on the 82<sup>nd</sup> and 83<sup>rd</sup> day of life with 24  $\mu\text{g}$  of LHRH, sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life; Fourth group – Males treated on the 3<sup>rd</sup> day of life with 1mg E2, and on the 82<sup>nd</sup> and 83<sup>rd</sup> day with 24  $\mu\text{g}$  of LHRH, sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life

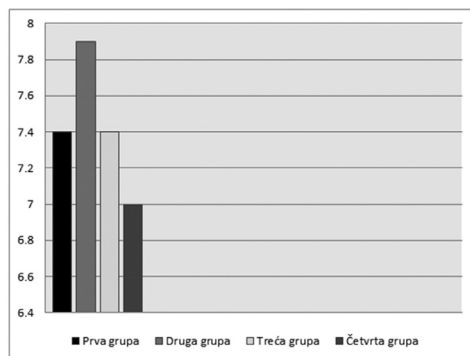




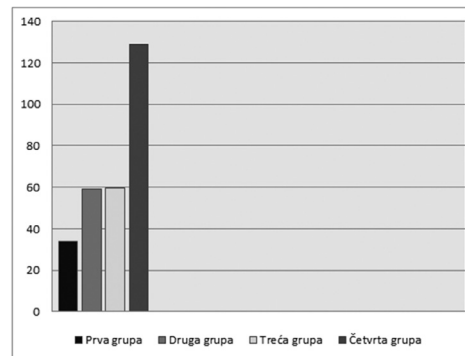
Grafikon 1. Ukupna površina tela neurona  $\mu\text{m}^2$  / Graph 1. Total body surface of neurons in  $\mu\text{m}^2$



Grafikon 2. Ukupna površina jedra  $\mu\text{m}^2$  / Graph 2. Total surface of nucleus in  $\mu\text{m}^2$



Grafikon 3. Ukupna površina jedarceta  $\mu\text{m}^2$  / Graph 3. Total surface of nucleolus in  $\mu\text{m}^2$



Grafikon 4. Prosečna površina granula heterohromatina u CA3 regionu  $\mu\text{m}^2$  / Graph 4. Average surface area of heterochromatin granules in CA3 region in  $\mu\text{m}^2$

Legenda za grafikone 1, 2, 3 i 4:

Prva grupa – Kontrolna grupa, netretirani mužjaci žrtvovani 86. dana života; Druga grupa – Mužjaci tretirani 3. dana života sa 1mg E2, žrtvovani 86. dana života; Treća grupa – Mužjaci tretirani 82. i 83. dana života sa 24  $\mu\text{g}$  LHRH, žrtvovani 86. dana života; Četvrta grupa – Mužjaci tretirani 3. dana života sa 1mg E2 i 82. i 83. dana sa 24  $\mu\text{g}$  LHRH, žrtvovani 86. dana starosti

Legend for Graphs 1, 2, 3 and 4:

First group – Control group, untreated males sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life; Second group – Males treated on the 3<sup>rd</sup> day of life with 1mg E2, sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life; Third group – Males treated on the 82<sup>nd</sup> and 83<sup>rd</sup> day of life with 24  $\mu\text{g}$  of LHRH, sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life; Fourth group – Males treated on the 3<sup>rd</sup> day of life with 1mg E2, and on the 82<sup>nd</sup> and 83<sup>rd</sup> day with 24  $\mu\text{g}$  of LHRH, sacrificed on the 86<sup>th</sup> day of life

Dokazi da hromatin velikih razmera ima svoj doprinos u aktivaciji transkripcije dolaze iz nekoliko važnih studija. Sistematska evaluacija drugih transgenih inserata, zajedno sa markerima antitela za nuklearne proteine, može pomoći u rasvetljavanju dodatnih determinanti različitih formi heterohromatina u interfazi. Tumačenje stereoloških rezultata koji ukazuju na promene u vrednostima ispitivanih parametara kod mužjaka pacova posle tretmana estrogenom i LHRH kao

i potvrdu naših rezultata nalazimo u brojnim radovima (McEwen 2005; Arnold, 2009; McCarthy i sar., 2009; McEwen i sar., 2012; Poling i sar., 2013) koji ukazuju na dve značajne uloge polnih steroida na centralni nervni sistem: “organizacionu” (podrazumeva promene strukture i organizacije za vreme razvoja mozga) i “aktivacionu” (odnosi se na reorganizaciju i regulaciju uspostavljenih struktura i veza), koje se ostvaruju preko njihovih specifičnih receptora. Na mozak sisara estrogen deluje dvojnim poreklom: iz gonada, a može biti i neuronskog porekla (*de novo* sintezom ili procesom aromatizacije). Fetusi i novorođene životinje izloženi su delovanju estradiola koji potiče i od majke, svojih gonada i adrenalnih žlezda, kao i lokalno sintetisanog iz sopstvenog tkiva mozga, kao što je prethodno navedeno (Nuñez i sar., 2007; Swaab i sar., 2007; Bowers i sar., 2010). U skladu sa tim, novija istraživanja u razumevanju svih delovanja estradiola su se proširila, od receptorskog delovanja estradiola, preko kontrolisane nuklearne transkripcije, do brzih membranskih efekata koji su indukovani lokalno sintetisanim steroidima (Swaab i sar., 2007). Više od 40 godina poznato je da je i mozak, a posebno regioni mozga koji su uključeni u kontrolu kognitivnih funkcija, kao što je hipokampus, target organi za njegovo delovanje (McCarthy, 2008; Bowers i sar., 2010). Mehanizam delovanja u mozgu je uglavnom receptorski, preko transkripcionih faktora jedra koji regulišu gensku ekspresiju, ali i delovanjem preko membranskih elemenata (McCarthy i sar., 2009). Pored toga, podaci ukazuju na sinergističko dejstvo LHRH i estrogena koji dovode do jačeg ispoljavanja efekta na heterohromatin u cilju očuvanja i zaštite od štetnih uticaja (Gore i sar., 1999; Temple i sar., 2004; Terasawa i sar., 2009; Varju i sar., 2009).

#### Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih stereoloških rezultata, možemo zaključiti da upotreba estrogena i LHRH u kombinaciji, povećava broj i površinu granula heterohromatina. Ukupna površina neurona kod životinja tretiranih estrogenom je značajno smanjena u odnosu na kontrolnu i grupe tretirane LHRH. Broj granula heterohromatina u grupama tretiranim estrogenom i LHRH je приметно povećan, dok je poslednjoj, četvrtoj grupi tretiranoj i estrogenom i LHRH ova razlika još izraženija, kako u odnosu na kontrolnu, tako i u odnosu na ostale grupe. Pretpostavka je i da je dati estrogen mužjacima pacova, u oba slučaja, zaštitio neurone CA3 regiona hipokampusa. Međutim, LHRH, dat u adultnom periodu, tri dana pred žrtvovanje, izazvao je veliki broj atrofičnih, piknotičnih neurona u navedenim regionima, ali možda i u drugim regionima CNS. Dalja istraživanja u ovom polju mogu doprineti napretku primene genske terapije kod mnogih neurodegenerativnih bolesti.

#### ZAHVALNICA / ACKNOWLEDGEMENTS:

Rezultati rada su deo naučno istraživačkog projekta u oblasti osnovnih istraživanja, evidencioni broj: 173034, finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

## Literatura / References

1. Akhmanova Anna, Verkerk T, Langeveld A, Grosveld F, Galjart N. Characterisation of transcriptionally active and inactive chromatin domains in neurons. *J Cell Sci* 2000; 113: 4463-74.
2. Andrea C. Gore, James L. Roberts and Marie J. Gibson 1999. Mechanism for the regulation of gonadotropin releasing hormone gene expression in the developing mouse. *Endocrinology* 140 (5): 2280-2287.
3. Arnold PA. The organizational–activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Horm Behav* 2009; 55: 570-8.
4. Bancaud A, Huet S, Daigle N, Mozziconacci J, Beaudouin J, Ellenberg J (2009) Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J* 28: 3785–3798.
5. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125(2): 315-26.
6. Beyer C, Green SJ, Hutchison JB. Aromatase-immunoreactivity is localised specifically in neurones in the developing mouse hypothalamus and cortex. *Endocrinology*. 1994;135(3):1220-6.
7. Bowers JM, Waddell J, McCarthy MM. A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biol Sex Differ* 2010; 1: 8.
8. Brown S. Science and Application of Hematoxylin and Eosin Staining. The Comprehensive Cancer Center, 2012.
9. Corder GW, Foreman DI. Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach. Wiley, 2009.
10. Dellovade TL, Rissman EF, Thompson N, Harada N, Ottinger MA. Co-localization of aromatase enzyme and estrogen receptor immunoreactivity in the preoptic area during reproductive aging. *Brain Res*, 1995; 674(2), 181-7.
11. Di Paola M, Caltagirone C, Fadda L, Sabatini U, Serra L, Carlesimo GA. Hippocampal atrophy is the critical brain change in patients with hypoxic amnesia. *Hippocampus*. 2008;18:719–728.
12. D'Souza SS, Selmin F, Murty SB, Qiu W, Thanoo BC, DeLuca PP. Assessment of fertility in male rats after extended chemical castration with a GnRH antagonist. *AAPS PharmSci* 2004; 6: 10.
13. Engel J., Pedley T., Aicardi J., Dichter M., Moshé S., Perucca E., Trimble M. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook in Three Volumes*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008
14. Gore AC, Roberts JL, Gibson MJ. Mechanism for the regulation of gonadotropin releasing hormone gene expression in the developing mouse. *Endocrinology* 1999; 140(5): 2280-7.
15. Hansen J. Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *EMBO J* 2012; 31(7): 1621-3.
16. Kalra SP, Kalra PS. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocr Rev* 1983; 4: 311-51.
17. Lodish H, Berk A, Zipursky SA, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*, 4th edition, New York: W. H. Freeman; 2000.
18. McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* 2008; 88(1): 91-124.
19. McCarthy M, DeVries G, Forger N. Sexual differentiation of the brain: mode, mechanisms and meaning. *Hormones Brain Behav* 2009; 1707-44.
20. McEwen. Estrogen effects on the brain: much more than sex. *Karger Gazette Hormones* 2005; 66: 1-9.

21. McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav Neurosci* 2012; 126(1): 4-16.
22. Moore JP, Wray S. Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) biosynthesis and secretion in embryonic LHRH neurons, *Endocrinology* 2000; 141: 4486-95.
23. Moser EI, Kropf E, Moser MB. Place Cells, Grid Cells, and the Brain's Spatial Representation System. *Ann Rev Neurosci* 2008; 31: 69.
24. Narada N, Abe-Dohmae S, Loeffen R, Foidart A, Balthazart J. Synergism between androgens and estrogens in the induction of aromatase and its messenger RNA in the brain. *Brain Res* 1993; 622: 243-56.
25. Norman, K. A., & O'Reilly, R. C. (2003). Modeling hippocampal and neocortical contributions to recognition memory: A complementary-learning-systems approach. *Psychological Review*, 110, 611–646.
26. Nuñez J, Yang Z, Jiang Y, Grandys T, Mark I, Levison SW. 17 $\beta$ -Estradiol protects the neonatal brain from hypoxia-ischemia. *Exp Neurol* 2007; 208(2): 269-76.
27. Oberdoerffer, P; Sinclair, D . The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8: 692–702.
28. Poling CM, Kauffman AS. Organizational and activational effects of sex steroids on kisspeptin neuron development. *Front Neuroendocrinol* 2013; 34(1): 3-17.
29. Stricker HJ. Luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in prostate cancer. *Urology* 2001; 58: 24-7.
30. Švob M. *Histološke i histokemijske metode*. Sarajevo: Svjetlost, 1974.
31. Swaab DF. Sexual differentiation of the brain and behavior. *Best Pract Res Cl En* 2007; 21(3): 431-44.
32. Temple JL, Laing E, Sunder A, Wray S. Direct action of estradiol on gonadotropin-releasing hormone-1 neuronal activity via a transcription-dependent mechanism. *J Neurosci*. 2004;24:6326–6333.
33. Terasawa E. Sekoni DN, Kim LK. Rapid Action of Estrogen in LHRH neurons: The Role of GPR30. *J Neuroendocrinol*. 2009 Mar; 21(4): 316–321.
34. Tsuruo Y, Ishimura K, Osawa Y. Presence of estrogen receptors in aromatase-immunoreactive in the mouse brain. *Neurosci Lett* 1995; 195: 49-52.
35. Varju P, Chang KC, Hrabovszky E, Merchenthaler I, Liposits Z. Temporal profile of estrogen-dependent gene expression in LHRH-producing GT1-7 cells. *Neurochem Int*. 2009 Feb;54(2):119-34.
36. Vavasseur A, Todeschini LT, Verdel A. Heterochromatin Assembly and Transcriptional Gene Silencing under the Control of Nuclear RNAi: Lessons from Fission Yeast. *RNA and the Regulation of Gene Expression: A Hidden Layer of Complexity*. 2008; Caister Academic Press.
37. Witkin WJ. *Microscopy research and technique* 1999; 44(1): 11-8 CRC Press, INC.
38. Zakon o dobrobiti životinja, Sl. glasnik RS, 41/09; 2009.

ENGLISH

### EFFECTS OF ESTROGEN AND LUTEINIZING-RELEASING HORMONE ON CHROMATIN IN CA3 REGION OF MALE RAT HIPPOCAMPUS

**Petrovic Bojana, Drekcic D., Zoric Z., Jovic S., Nikolic Milica, Cupic - Miladinovic Dejana**

The structure of heterochromatin protects genome from undesirable recombinations, while estrogen and luteinizing-releasing hormone (LHRH) cause changes in structure of chromatin.

The objective of this study was to prove the connection of neonatally applied estrogen and LHRH, with shown effects on chromatin in hippocampus of adult male rats.

Stereological results have shown that total surface of neuron area in estrogen treated animals significantly reduced in regard to the control group as well as groups treated with LHRH. The number of heterochromatin granules in either estrogen or LHRH treated groups significantly increased, while in the last fourth group treated with both estrogen and LHRH the difference is even more expressed, both in regard to the control group and other groups.

Key words: CA3 region, estrogen, hippocampus, LHRH, male rat

РУССКИЙ

### ЭФФЕКТЫ ЭСТРОГЕНА И ЛУТЕИНИЗИРУЮЩЕГО РЕЛИЗИНГ-ГОРМОНА НА ХРОМАТИН В ОБЛАСТИ СА3 ГИППОКАМПА САМЦОВ КРЫС

**Петрович Бояна, Дрекич Д., Зорич З., Йович С, Николич Милица, Чупич - Миладинович Деяна**

Структура гетерохроматина защищает геном от нежелательных рекомбинаций, а эстроген и лютеинизирующий релизинг-гормон (LHRH) становятся причиной изменений в самой структуре хроматина.

Целью исследования было доказательство связи неонатально введенного эстрогена и LHRH с эффектами воздействия на хроматин в гиппокампе взрослых самцов крыс.

Стереологические результаты показали, что общая площадь нейронов у животных, получавших эстроген, значительно сокращена по сравнению с контрольной группой и группами, получавшими LHRH. Количество гранул гетерохроматина в группах, получавших эстроген и LHRH заметно выше, при этом в последней, четвертой группе, получавшей и эстроген, и LHRH эта разница еще более выражена, как по сравнению с контрольной, так и с остальными группами.

Ключевые слова: область СА3, эстроген, гиппокамп, LHRH, самец крысы