

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**VPLIV AKTIVACIJE ESTROGENSKIH
RECEPTORJEV PRED PUBERTETO NA SPOLNO
DIFERENCIACIJO MOŽGANOV SAMIC MIŠI
THE EFFECTS OF ESTROGENE RECEPTORS
ACTIVATION ON SEXUAL DIFFERENTIATION OF
THE FEMALE MOUSE BRAIN BEFORE PUBERTY**

Amadeja Brečko

Ljubljana, 2023

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 612.43:612.82:612.6.057:612.8.05:612.621-31:577.171.6(043.2)

**VPLIV AKTIVACIJE ESTROGENSKIH RECEPTORJEV
PRED PUBERTETO NA SPOLNO DIFERENCIACIJO
MOŽGANOV SAMIC MIŠI**

**THE EFFECTS OF ESTROGENE RECEPTORS ACTIVATION
ON SEXUAL DIFFERENTIATION OF THE FEMALE MOUSE
BRAIN BEFORE PUBERTY**

Amadeja Brečko

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad
študentom pod mentorstvom doc. dr. Neže Grgurevič v Laboratoriju za
genomiko živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2023

IZVLEČEK

Ključne besede: nevroendokrinologija; spolna diferenciacija; feminizacija; možgani; spolno vedenje živali; lordoza; estrogenski receptor

Natančni mehanizem vpliva estrogenih hormonov na feminizacijo možganov še ni popolnoma raziskan. Po nekaterih podatkih poteka omenjen proces v obdobju pred puberteto. V naši raziskavi smo samice razdelili v pet skupin. Štirim smo 10. dan po rojstvu odstranili jajčnike in nato od 15. do 25. dneva starosti dodajali snovi, raztopljene v koruznem olju, ki aktivirajo različne signalne poti estrogenih hormonov: 1) estradiol benzoat, 2) agonist estrogenskega receptorja α ($ER\alpha$) propil pirazol triol, 3) agonist estrogenskega receptorja β diarilpropiontril, 4) koruzno olje (negativna kontrola). Za peto skupino (pozitivno kontrolo) smo uporabili samice, ki so prav tako prejemale koruzno olje, a smo jim odstranili jajčnike šele po puberteti (60. dan starosti). Feminizacijo smo ocenjevali s pomočjo ženskega spolnega obnašanja (lordoze), izražanja tirozin hidroksilaze v anteroventralnem delu periventrikularnega jedra hipotalamusa in $ER\alpha$ v ventromedialnem jedru hipotalamusa. Med skupinami nismo odkrili statistično pomembnih razlik niti v lordozi niti v izražanju omenjenih beljakovin v možganih. Lordoza je bila slabo izražena pri vseh skupinah, posebno pa pri pozitivni kontroli. Naši rezultati kažejo na to, da aktivacija signalnih poti estrogenih hormonov ni trajno vplivala na parametre, ki smo jih raziskovali, torej ni vplivala na feminizacijo. Kljub vsemu pa je velika verjetnost, da so na rezultate vplivali drugi dejavniki, ki bi lahko motili normalni potek aktivne feminizacije, posebno z vidika lordoze.

ABSTRACT

Key words: neuroendocrinology; sex differentiation; feminization; brain; sexual behaviour, animal; lordosis; receptors, estrogen

The precise mechanism by which estrogen hormones influence brain feminization is not fully understood. According to some data, this process occurs during the prepubertal period. In our study, we divided female subjects into five groups. Four of them had their ovaries removed on the 10th day after birth, and from the 15th to the 25th day of age, we administered substances dissolved in corn oil that activate various estrogen hormone signaling pathways: 1) estradiol benzoate, 2) agonist of estrogen receptor α (ER α) propyl pyrazole triol, 3) agonist of estrogen receptor β - diarylpropionitril, 4) corn oil (negative control). For the fifth group (positive control), we used females that also received corn oil, but whose ovaries were removed after puberty (at 60 days of age). We evaluated feminization by observing female sexual behavior (lordosis), expression of tyrosine hydroxylase in the anteroventral part of the periventricular nucleus of the hypothalamus, and expression of ER α in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. We found no statistically significant differences in lordosis or expression of these proteins in the brains of the different groups. Lordosis was weakly expressed in all groups, especially in the positive control. Our results suggest that activation of estrogen hormone signaling pathways had no lasting effects on the parameters we studied, and thus did not affect feminization. However, it is very likely that other factors influenced the results that may have disrupted the normal course of active feminization, particularly with respect to lordosis.

KAZALO VSEBINE

1.	UVOD	12
1.1.	OPREDELITEV PROBLEMA	12
1.2.	PREGLED LITERATURE.....	12
1.2.1.	Primarna spolna diferenciacija	12
1.2.2.	Sekundarna spolna diferenciacija.....	14
1.2.3.	Spolno dimorfna področja v možganih	17
1.2.4.	Estrogeni hormoni in njihovi receptorji.....	21
1.2.5.	Aktivna feminizacija	24
2.	NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	27
2.1.	CILJI RAZISKAVE	27
2.2.	DELOVNE HIPOTEZE.....	27
3.	MATERIALI IN METODE.....	29
3.1.	POSKUSNE ŽIVALI	29
3.2.	TEST ŽENSKEGA SPOLNEGA OBNAŠANJA	31
3.2.1.	Priprava živali	31
3.2.2.	Izvedba testa	32
3.3.	ŽRTVOVANJE POSKUSNIH ŽIVALI	34
3.4.	IMUNOHISTOKEMIJA.....	34
3.5.	FOTOGRAFIRANJE REZIN MOŽGANOV IN ŠTETJE CELIC	36

3.6. STATISTIČNA ANALIZA.....	38
4. REZULTATI	39
5. RAZPRAVA	45
6. SKLEPI	51
7. POVZETEK.....	52
8. SUMMARY.....	53
9. ZAHVALE.....	54
10. LITERATURA	55

KAZALO TABEL

Tabela 1: Skupine miši, vključene v raziskavo.....	31
Tabela 2: Povprečne vrednosti št. vstopov v nožnico, latence do vstopa v nožnico, potiskov z medenico in latence do potiska medenice v zadnjem (4.) testu $\pm$ standardna napaka.....	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Spolna sprejemljivost, ki se kaže z usločenjem hrbta (lorodzo), s katero smo ocenjevali spolno obnašanje.	33
Slika 2: Področje AVPV, kjer smo prešteli celice, pozitivne na TH (rdeč pravokotnik)	37
Slika 3: Področje VMH, kjer smo šteli celice, pozitivne na ER α (rdeč kvadrat)	37
Slika 4: Koeficient lordoze v 4. testu pri posameznih skupinah, povprečna vrednost $\pm$ standardna napaka.....	40
Slika 5: LQ v štirih zaporednih testih, povprečna vrednost.	42
Slika 6: Število ER α pozitivnih celic v VMH pri posameznih skupinah živali, povprečna vrednost $\pm$ standardna napaka.....	43
Slika 7: Število TH pozitivnih celic v AVPV pri posameznih skupinah živali, povprečje $\pm$ standardna napaka.....	44

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AFPKO	miši z izbitim genom za alfa-fetoprotein; α -fetoprotein knockout mice
AHC	prirojena hiperplazija nadledvičnih žlez; adrenal hyperplasia congenita
ArKO	miši z izbitim genom za aromatazo; aromatase knockout mice
	anteroventralni del periventrikularnega jedra; nucleus periventricularis ventralis;
AVPV	anteroventral periventricular nucleus
	C5 pozicija citozinov, ki so pred gvaninom na molekuli DNA; regions of DNA
CpG	where a cytosine nucleotide is followed by a guanine nucleotide
DAB	3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid; 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAR	oslička proti zajčja protitelesa; donkey anti rabbit
	DSS-AHC kritično področje na kromosomu X; DSSAHC critical region on the X
DAX1	chromosome
DMSO	dimetil sulfoksid; dimethyl sulfoxide
DPN	agonist estrogenskega receptorja beta diarilpropiontril; the selective ER β agonist
E2	17 β -estradiol
EB	estradiol benzoat; estradiol benzoate
ER α	estrogenski receptor α ; estrogen receptor α
ER α KO	miši z izbitim genom za ER α ; ER α knockout mice
ER β	estrogenski receptor β ; estrogen receptor β
ER β KO	miši z izbitim genom za ER β ; ER β knockout mice
GABA	γ -aminobutanojska kislina; γ -aminobutyric acid
GnRH	sproščujoči hormon gonadotropinov; gonadotrophin releasing factor
GP1R	membranski receptor sklopljen z G beljakovino; G-protein coupled receptor 1
HPG	os hipotalamus-hipofiza-spolne žleze; hypothalamic–pituitary–gonadal axis
KISS1	gen, ki kodira kisspeptin; gene that encodes kisspeptin
LH	luteinizirajoči hormon; luteinizing hormone
LQ	količnik lordoze; lordosis coefficient
	medialni del predoptičnega področja; nucleus preopticus medialis; medial preoptic
mPOA	area
NDS	normalni osličji serum; normal donkey serum
PB	fosfatni pufer; phosphate buffer
PBS	fosfatni pufer z NaCl; phosphate buffered saline
POA	predoptično področje; preoptic area
	agonist estrogenskega receptorja alfa propil pirazol triol; the selective ER α agonist
PTT	propylpirazole triol
SDN-POA	spolno dimorfno jedro v predoptičnem področju; sexually dimorphic nucleus of the preoptic area
SF-1	gen za steroidogeni faktor 1; steroidogenic factor 1
	spol določujoče področje na kromosomu Y; sex determining region on Y
Sry	chromosome
TBS	tris-pufer fiziološke raztopine; tris-buffered saline
TDF	testise determinirajoči faktor; testis-determining factor gene
TH	tirozin hidroksilaza; tyrosine hydroxylase
VMH	ventromedialno jedro hipotalamusa; ventromedial nucleus of hypothalamus
VPA	valprojična kislina; valproic acid

WT miši divjega tipa; wild type mice

1. UVOD

1.1. OPREDELITEV PROBLEMA

Razlike med moškim in ženskim spolom so prisotne tako na nivoju strukture, kot tudi na nivoju delovanja. Razvijejo se v procesu primarne in sekundarne spolne diferenciacije pod vplivom genetskih in hormonskih dejavnikov, njihovo prepoznavanje pa je možno že zelo zgodaj v razvoju osebka (Szadvari in sod., 2023). Poznavanje spolnih razlik je pomembno, saj prispevajo k različnim predispozicijam za razvoj določenih motenj in bolezni, prav tako pa tudi vplivajo na različne spolno odvisne učinke zdravil (Ngo in sod., 2014; Rubin in sod., 2020; Appelman in sod., 2015; Mielke, 2018; Soldin in Matison, 2009). Primarna spolna diferenciacija je pri sesalcih določena na podlagi spolnih kromosomov, XX pri ženskem in XY pri moškem spolu, medtem ko sekundarno spolno diferenciacijo uravnavajo spolni hormoni. Znano je, da pri zarodkih moškega spola v prisotnosti testosterona potečeta maskulinizacija, med katero se razvijejo možgani z moškimi značilnostmi, in defeminizacija, s katero se zavrejo ženske značilnosti možganov. Na kakšen način naj bi se razvili možgani ženskega spola ni povsem jasno. V obdobju fetalnega razvoja jajčniki za razliko od mod niso aktivni in v tem obdobju naj bi se možgani ženskega spola razvijali v odsotnosti spolnih hormonov (MacLusky in Naftolin, 1981), vendar pa obstajajo dokazi, da tudi možgani pri ženskem spolu potrebujejo za aktivno feminizacijo prisotnost estrogenih hormonov in to naj bi se zgodilo v obdobju po rojstvu (Kenney, 1970; Rubin in Barfield, 1983; Whalen in Edwards, 1967; Gerall in sod., 1973; Bakker in Baum, 2008). Raziskave na gensko spremenjenih miših dokazujejo, da aktivna feminizacija po vsej verjetnosti poteče v obdobju pred puberteto, vendar na kakšen način naj bi estrogeni hormoni aktivirali feminizacijo možganov ni povsem določeno (Bakker in Baum, 2008). V naši raziskavi želimo na samicah miši preučiti različne signalne poti estrogenih hormonov in njihov vpliv na aktivno feminizacijo možganov in obnašanja.

1.2. PREGLED LITERATURE

1.2.1. Primarna spolna diferenciacija

Prvi korak spolne diferenciacije se začne že ob fertilizaciji in sicer v trenutku, ko osebek po očetu podeduje bodisi X ali Y kromosom, ki skupaj z X kromosomom matere pomeni genetsko ženski (XX) ali moški (XY) spol. Prisotnost spolnih kromosomov XY ali XX je pogoj za začetek primarne spolne diferenciacije, ki narekuje razvoj spolnih žlez. Tekom prvih šestih tednov embrionalnega razvoja pri ljudeh oz. 11,5 dni po koitusu pri miših, med spolnimi žlezami moškega ali ženskega spola ne vidimo razlik (Rey in sod., 2000). Spolne žleze se sprva pojavijo kot par vzdolžnih spolnih grebenov in se pri ljudeh pojavijo nekje v četrtem do petem tednu embrionalnega razvoja na ventralnem delu primitivne ledvice (mezonefrosa) (Makiyan, 2016). Spolni greben nastane iz germinalnega epitelijskega in spodaj ležečega mezenhima. Celice epitelijskega spolnega grebena se razmnožujejo in tvorijo primarne spolne niti, ki v nadaljnjem razvoju pri moškem spolu postanejo tubuli seminiferi. Za nastanek genitalnega grebena so ključni predvsem trije geni: gen wilmsovega tumorja 1 (Wt-1), gen za steroidogeni faktor 1 (SF-1) in gen DAX-1 (angl. dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita (AHC) critical region on gene 1 of the X chromosome). Za zgodnji razvoj spolnih žlez pa so pomembni še številni drugi geni, npr. Lim1, Lhx9 in Emx2 (Sobel in sod., 2004).

Pri zarodku moškega spola se začne v celicah spolnega grebena izražati gen Sry med 41. in 44. dnevom starosti zarodka pri ljudeh in med 10,5. in 12,5. dnevom starosti zarodka pri miših (Hanley in sod., 2000; Grgurevič, 2011). Le-ta je odločilen, da se lahko začne razvoj mod, saj kodira testise determinirajoči faktor, TDF (ang. testis-determining factor), pod vplivom katerega se spolne niti razmnožujejo in prodrejo vedno globlje v sredico ter tvorijo testise oz. spolne niti, ki sestavljajo njihovo sredico (ang. medullary cords). Proti hilusu žleze se niti razdelijo v mrežo manjših trakov, ki kasneje postanejo osnova za mrežo mod oz. rete testis. Od spolnih niti, ki tvorijo testise, se med nadaljnjim razvojem oddvoji gosta plast fibroznega vezivnega tkiva, ki predstavlja ovojnico mod oz. tunico albuginea (Sadler, 2019). Pod vplivom gena Sry se v spolnem grebenu diferencirajo sertolijeve celice, ki začnejo izločati antimüllerjev hormon, zaradi katerega pride do zakrnitve müllerjevega voda, medtem ko se pod vplivom testosterona, ki ga izločajo leydigove celice, wolffov vod razvije v del nadmodka, semenovod in semenske mešičke. Nato se šele med puberteto razvoj nadaljuje, ko se iz spolnih niti razvijejo semenski kanalčki, znotraj katerih dozorevajo semenčice (Lachelin, 1991; Grgurevič, 2011).

Pri ženskih zarodkih, ki nimajo Y kromosoma, primitivne spolne niti razpadejo v otočke celic, ki vsebujejo skupke primitivnih zarodnih celic in zapolnjujejo sredico jajčnika. Kasneje te otočke nadomesti žilno omrežje, ki tvori sredico jajčnika. Epitelij ženskih spolnih žlez se za razliko od epitelijskega pri moškemu spolu še naprej deli in pri ljudeh v sedmem tednu nastane druga generacija niti, t.i. spolne niti skorje (ang. cortical cords), ki predrejo spodaj ležeče vezivo, a ostanejo blizu bodoče skorje. V tretjem mesecu razpadejo v otočke celic, znotraj katerih se celice delijo in obkrožijo posamezne zarodne celice (Sadler, 2019). Celice granulose nastanejo iz celic spolnih niti, ki obdajajo zarodno celico, celice teke pa iz mezenhimskega veziva, ki obdajajo spolne niti. Skupaj pa sestavljajo folikel, znotraj katerega bo kasneje potekalo zorenje jajčnih celic (Grgurevič, 2011). Pri ženskemu spolu, kot posledica odsotnosti antimüllerjevega hormona, müllerjevi vodi ostanejo, wolffov vod pa se brez testosterona ne razvije. Müllerjevi vodi so tako osnova za razvoj ženskega reproduktivnega trakta (Biswas in sod., 2021).

1.2.2. Sekundarna spolna diferenciacija

Razvoj in spolna diferenciacija spolnih žlez potečeta v primarni spolni diferenciaciji, ki je z nastankom bodisi testisov ali jajčnikov zaključena. Na tem mestu se začne sekundarna spolna diferenciacija, ki zajema razvoj spolno specifičnega fenotipa, kot odziv na spolne hormone, ki jih izločajo spolne žleze. To se pri obeh spolih dogaja med organogenezo, znotraj embrionalnega razvoja in kasneje, med puberteto (Biswas in sod., 2021).

Že leta 1894 je nemški fiziolog in zoolog Arnold Berthold (Berthold, 1894) dokumentiral prvi znanstveni poskus, pri katerem je ugotavljal vlogo spolnih žlez pri razvoju petelinov. Kastriral je peteline in njihove testise znova vstavil v trebušno votlino. Petelina, ki sta ponovno prejela testise, sta se za razliko od kastratov obnašala kot tipična samca. K razumevanju vloge hormonov je veliko prispevalo tudi opazovanje razvoja govejih zarodkov, poznanih pod imenom freemartin zarodki. Gre za fenomen, kjer se pojavi maskulinizacija reproduktivnega trakta samice pri dvojčkih različnih spolov. Ker se kri med obema zarodkoma meša, se samec razvije normalno, samica pa ima zaradi maskulinizacije težave v reprodukciji. Na podlagi teh

opazovanj so zaključili, da obstajajo hormoni, ki jih proizvajajo moški zarodki in povzročijo maskulinizacijo nasprotnega spola. Testosteron je skupina švicarskih endokrinologov izolirala leta 1935 iz testisov bika in isto leto so ga prvič tudi umetno sintetizirali (Kubiak in sod., 2020). Osnovna ideja, da lahko z manipulacijo izpostavitve živali testosteronu v zgodnjem obdobju vplivamo na izražanje spolno značilnih vedenjskih vzorcev v odraslosti, izhaja iz študije, ki so jo leta 1959 opravili Phoenix in sod. (1959) na morskih prašičkih. Samicam morskega prašička so med brejostjo dodajali testosteron in nato raziskali spolno obnašanje njihovih potomcev. Večji odmerki testosterona so povzročili pri potomcih ženskega spola maskulinizacijo zunanjih spolnih organov, povečane sramne ustnice in klitoris, ki se jih makroskopsko ni dalo ločiti od tistih pri novorojenih samcih. Te samice so v odraslem obdobju ovariektomizirali in testirali njihovo odzivnost na dodajanje 17β -estradiola (E2) in progesterona. Ugotovljeno je bilo, da se izražanje ženskega spolnega obnašanja, lordoze, močno poslabša, medtem ko se pojavi naskakovanje, ki je značilno za samce. Če so iste samice prejele testosteron, so izražale naskakovanje v podobnem deležu kot ga izražajo kastrirani samci s prejeto enako količino testosterona. Študija je jasno nakazovala, da ima androgeni hormon testosteron v obdobju pred rojstvom ireverzibilne organizacijske učinke na določene organe, ki se kažejo tudi v velikih spremembah obnašanja. Omenjena študija je predstavljala temelj za številne druge raziskave na tem področju.

Hormoni spolnih žlez imajo v grobem dve vrsti delovanja na živčni sistem: organizacijsko in aktivacijsko. Organizacijski učinki se večinoma odvijajo v zgodnji fazi razvoja, med kritičnimi ali občutljivimi razvojnimi stopnjami in dolgotrajno vplivajo na možgane. Hormon mora biti prisoten v točno določenem časovnem obdobju, da se lahko pokaže njegov učinek in čeprav je prisoten le kratek čas, učinek vztraja dlje časa in se ne izniči ob kasnejši odsotnosti hormona. Ime, organizacijski učinki, izhaja iz vpliva, ki ga imajo na organizacijo živčnega sistema med razvojem in se kažejo v prisotnosti spolnih razlik v možganih in v obnašanju. Na nivoju možganov zaznamo organizacijske razlike kot razlike med spoloma v velikosti nekaterih možganskih jeder, razlike v številu in velikosti nevronov, v številu sinaps, izražanju beljakovin in drugo. Testosteron, ki je prisoten pri razvijajočem se zarodku moškega spola, tako trajno vpliva na organizacijo živčnega sistema. V nasprotju pa se aktivacijski učinki pojavijo kasneje v življenju, navadno v odraslosti in se lahko izničijo ob odsotnosti hormona (Hines, 2017). Med puberteto hormoni spolnih žlez aktivirajo predhodno organizirane strukture v možganih, kar

se odraža v različnih vzorcih obnašanja, ki so tipični za moški ali ženski spol. Zarodki ženskega spola navadno niso izpostavljeni visokim nivojem testosterona in posledično razvijajo obnašanje, značilno za ženski spol (Zup in Forger, 2017).

Izraz maskulinizacija se uporablja v povezavi z okrepitevijo lastnosti, ki so bolj pogoste ali bolj izrazite pri moškem kot pri ženskem spolu. Najbolj raziskan primer maskulinizacije je vezan na moško spolno obnašanje, še posebej zaskok spolno dovzetnih samic in izražanje agresije. Na drugi strani pa je bil izraz feminizacija uporabljen v povezavi z okrepitevijo lastnosti, ki so bolj pogoste oz. izrazite pri ženskem spolu. V tem primeru je bil najbolj raziskan pojav značilne spolne drže, lordoze, ki ga izražajo spolno dovzetne samice (Hines, 2017).

Testosteron pri glodavcih nima neposrednega učinka na možgane, ampak se pod vplivom encima aromataze pretvori v E2. Ta pretvorba je pri glodavcih najpomembnejši mehanizem maskulinizacije možganov. Po aromatizaciji testosterona je tako E2 glavni hormon, ki pri samcih vpliva na razvoj nevroendokrinega sistema in spolnega obnašanja, značilnega za moški spol oz. za maskulinizacijo, zavre pa razvoj nevroendokrinega sistema in spolnega obnašanja, značilnega za ženski spol, torej povzroči defeminizacijo. Ker je pri glodavcih E2 tako pomemben za maskulinizacijo zarodkov, so se pojavila ugibanja ali lahko v času brejosti povišani estrogenski hormoni matere vplivajo na maskulinizacijo zarodkov ženskega spola. Odkrili so α -fetoprotein, ki se tvori v jetrih in dobro veže estrogene hormone, s čimer zarodke ščiti pred cirkulirajočimi estrogenimi hormoni matere (MacLusky in Naftolin, 1981; Swaab, 2007). Vloga α -fetoproteina je bila dokazana s študijami na miših brez gena za α -fetoprotein (ang. α -fetoprotein knockout mice, AFPKO). AFPKO samice za razliko od samcev niso bile plodne, kar je bila posledica izostanka ovulacije. V jajčnikih je bilo možno najti folikle v različnih faza razvoja, ne pa tudi rumenih teles, kar je sovpadalo z nizkimi dozami progesterona v serumu. Ovulacijo je bilo možno inducirati z injekcijo gonadotropinov, iz česar so sklepali, da neplodnost ni posledica napak na jajčnikih temveč nepravilnega delovanja osi hipotalamus-hipofiza-spolne žleze (ang. hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis). AFPKO miši prav tako niso izražale lordoze in so imele znižano število tiroksin hidroksilaznih (TH) nevronov v anteroventralnem delu periventrikularnega jedra (AVPV), kar je sicer značilno za samce in je povezano z maskulinizacijo možganov (Bakker in Baum, 2008). Raziskave kažejo, da po vsej

verjetnosti pri ljudeh maskulinizacijo povzroča testosteron in ne E2. Poleg tega α -fetoprotein kaže nižjo afiniteto do E2 v primerjavi z mišmi (Bakker in sod., 2006; Swartz in Soloff, 1974). Moški z mutacijami, ki povzročajo nepravilno delovanje encima aromataze, navadno kažejo normalne moške značilnosti navkljub odsotnosti aromatizacije v možganih ali kjerkoli drugje v telesu (Grumbach in Auchus, 1999). Testosteron v tem primeru deluje neposredno preko vezave na androgene receptorje v možganih. Eden najpomembnejših dokazov, da pri ljudeh poteka maskulinizacija preko testosterona, so osebe s sindromom testikularne feminizacije. Pri takih osebah sta prisotna kromosoma XY, razvita so moda, ki izločajo testosteron, vendar zaradi neobčutljivih androgenih receptorjev ta ne deluje. Otroci, ki se rodijo s tem sindromom izražajo ženski fenotip in so po navadi vzgajani kot deklice. V odraslem obdobju ženski fenotip ostane in osebe se identificirajo kot ženske (Zuloaga in sod., 2008).

Nepravilna izpostavljenost estrogenom je lahko tragična, kot se je izkazalo leta 1940, ko je bil sintetični estrogen dietilstilbestrol na široko predpisovan nosečim ženskam v upanju, da bi preprečil splave. Kasneje so odkrili, da so se pri potomkah pojavile patološke spremembe na rodilih: novotvorbe, metaplazije in strukturne abnormalnosti. Snovi, ki so prisotne v okolju in imajo podobno delovanje kot spolnih hormoni, se imenujejo hormonski motilci. Z vezavo na receptorje za spolne hormone lahko negativno vplivajo na razvoj in delovanje nevroendokrinega sistema. Tako je na primer prekomerna izpostavljenost ksenoestrogenom, kot je bisfenol A, povezana s pojavom kriptorhizma in hipospadije. Tudi ftalati lahko delujejo kot hormonski motilci in sicer lahko delujejo kot psevdo-estrogeni ali anti-androgeni (Rey in sod., 2000). Poleg motilcev iz okolja pa lahko na razvoj zarodka vplivajo tudi steroidni hormoni, ki nastajajo v telesu zarodka, na primer v nadledvični žlezi, v centralnem živčnem sistemu ali pa pridejo v telo od sosednjih plodov (Grgurevič, 2011).

1.2.3. Spolno dimorfna področja v možganih

Spolni dimorfizem v zgradbi možganov se lahko odraža kot razlika v volumnu celičnih skupin, nevronov in številu glia celic, kot spremembe v velikosti teles živčnih celic, dendritičnega

razvejanja ali različne stopnje mielinizacije, izražanje beljakovin, lahko pa tudi razne kombinacije naštetega (Juraska in sod., 2013).

En izmed prvih primerov spolnega dimorfizma v možganih izhaja iz študije Raismana in Fielda (1971), ki sta s pomočjo elektronskega mikroskopa pregledala 28,184 sinaps na mestu ventromedialnega jedra hipotalamusa (VMH) in predoptičnega področja (POA) možganov podgane. Odkrila sta spolni dimorfizem teh področij, pri čemer je šlo za razlike med razmerji posameznih tipov sinaps, ne pa za razlike v skupnem številu kateregakoli tipa sinapse. Na srečo niso bile vse razlike tako izmuzljive, leta 1976 so odkrili eno izmed prvih večjih spolnih razlik v možganih vretenčarjev, ki je bila vidna že s prostim očesom. Nottebohm in sod. (1976) so odkrili, da je volumen centra, ki kontrolira petje pri samcih avstralskega zebrastega ščinkavca dobrih petkrat večja od volumna le-tega pri samicah. Ker samci pojejo, samice pa ne, je bilo to odkritje, ki je spodbudilo idejo, da spolne razlike v možganih povzročajo spolne razlike v obnašanju.

Eno izmed najbolj široko poznanih in raziskanih področij spolnega dimorfizma pri živalih se nahaja v medialnem predoptičnem področju (ang. medial preoptic area, mPOA). Ugotovili so, da pri podganah to področje možganov predstavlja ključni element v reprodukcijskem obnašanju in endokrinem stanju živali (Cooke in sod., 1998). Že v študiji, ki so jo izvedli Gorski in sod. (1978) so ugotovili, da obstaja izrazit spolni dimorfizem v volumnu in številu nevronov mPOA podgane, ki je bil večji pri samcih in neodvisen od nivoja hormonov v odraslosti, verjetno pa vsaj delno določen preko nivoja hormonov v perinatalnem obdobju. Izkazalo se je, da ima mPOA številne pomembne funkcije, povezane s spolnim obnašanjem; uravnavanje kopulatornega obnašanja pri samcih, materinskega obnašanja in lordoze pri samicah ter sodelovanje v izločanju hormonov spolnih žlez (Grgurevič, 2011). Znotraj mPOA pri podganah se nahaja področje z visoko gostoto temno obarvanih celic, kjer je spolni dimorfizem še posebej izrazit. To področje je bilo poimenovano spolno dimorfno jedro predoptičnega področja (ang. sexually dimorphic nucleus of the medial preoptic area, SDN-POA) (Cooke in sod., 1998). Natančna vloga SDN je ostala neznanka, saj manjše poškodbe področja niso povzročile večjih sprememb v spolnem obnašanju samcev, čeprav je le-to pri samcih petkrat večje od tistega pri samicah (Arendash in Gorski, 1983). Obstajajo pa hipoteze, da naj bi bilo SDN povezano z libidom in izbiro partnerja, kar jim je uspelo dokazati vsaj pri dihurjih (Baum in sod., 1990).

Pri miših se v predoptičnem področju nahaja skupek spolno dimorfnih nevronov. Nevroni, ki so pozitivni na androgenski receptor, so razpršeni po tem področju tako pri samcih kot tudi pri samicah. Večje število celic pri samcu je vidno kot skupek nevronov, pozitivnih na androgenski receptor, ki se pojavijo, ko sprednja komisura prečka sredino in bi lahko bili enakovredni SDN-POA pri podgani (Shah in sod., 2004).

Še eno pomembno spolno dimorfno področje v možganih je že omenjeno, VMH. Povezano je predvsem z ženskim spolnim obnašanjem in v raziskavi, ki sta jo na podganah izvedla Dörner in Staudt (1969), je bilo ugotovljeno, da so jedra celic tega področja večja pri samicah kot pri samcih, medtem ko je skupni volumen VMH večji pri moškem spolu. Samci, ki so jih kastrirali prvi dan življenja, so razvili večja celična jedra in manjši skupni volumen VMH, kar so lahko povezali tudi s povečanim pojavljanjem ženskega spolnega obnašanja in zmanjšanjem moškega spolnega obnašanja. VMH je pomembno mesto delovanja estrogenih hormonov, najverjetneje v veliki meri preko estrogenskih receptorjev α ($ER\alpha$), saj so le-ti na tem področju izraženi v veliko večji meri kot estrogenski receptorji β ($ER\beta$), pri čemer je pri samicah to izražanje večje kot pri samcih. Ikeda in sod. (2003) so odkrili, da bi naj bili estrogeni hormoni vključeni tudi v uravnavanje spolno dimorfnega izražanja $ER\beta$ v VMH med zgodnjim neonatalnim razvojem podgane. Neonatalna izpostavljenost estrogenim hormonom je namreč povzročila zmanjšano izražanje $ER\beta$ v razvijajočem se VMH. VMH igra vlogo tudi v kontroliranju agresivnega obnašanja. Lin in sod. (2011) so z optogenetsko stimulacijo nevronov v ventrolateralnem delu VMH dosegli, da so samci miši napadali tako samice kot tudi nežive predmete in druge samce. Farmakogenetsko utišanje tega področja, torej aplikacija specifične učinkovine, s pomočjo katere so lahko raziskovalci zavrli delovanje nevronov tega področja, pa je reverzibilno inhibiralo agresijo med samci. Ker pa je natančna identifikacija nevronov, ki pri tem sodelujejo, ostala neznanka, so Yang in sod. (2013) preiskali vpliv nevronov z izraženimi receptorji za progesteron. Z njihovo ablacijo so pri mišjih samicah dosegli izrazito zmanjšanje spolne dovzetnosti, pri samcih pa je prišlo do zmanjšanja agresivnega obnašanja, povezanega s parjenjem in teritorialnostjo. S tem so dokazali, da majhna, spolno dimorfna populacija nevronov vpliva na spolno značilno obnašanje pri obeh spolih.

Omeniti je potrebno tudi anteroventralni del periventrikularnega jedra (AVPV), ki je v nasprotju s SDN večje pri ženskem spolu tako v skupnem volumnu kot tudi v številu celic. Pomembno je za regulacijo izločanja luteinizirajočega hormona (LH), ki sproži ovulacijo pri samicah. V njem se nahajajo številni tipi celic, med drugim GABAergični, glutamatergični in dopaminergični nevroni ter nevroni, ki izražajo kisspeptin – število vseh navedenih tipov nevronov se med spoloma razlikuje (Lenz in sod., 2012). Različne študije so prikazale, da pomankanje testosterona v perinatalnem obdobju pri samicah spodbudi smrt celic SDN in preživetje celic AVPV, medtem ko pri samcih poteka obraten proces; pod vplivom vrha testosterona v zgodnjem perinatalnem obdobju pri samcih poteka smrt celic v AVPV in preživetje celic SDN (Davis in sod., 1996a, Arai in sod., 1996, Döhler in sod., 1984, Murakami in Arai, 1989). Pri tem so Davis in sod. (1996b) ugotovili, da vpliv hormonov spolnih žlez na AVPV poteče neonatalno, a posledice v strukturi le-tega so nato vidne šele v obdobju pubertete, kar nakazuje, da proces spolne diferenciacije ni omejen zgolj na zgodnje postnatalno obdobje. AVPV vsebuje tudi izrazito spolno dimorfno distribucijo imuno-reaktivnih celic, ki izražajo encim TH, kar predpisujejo večjemu številu dopaminergičnih celic v AVPV samic, kar je posledica s testosteronom sprožene apoptoze teh celic pri samcih (Simerly in sod., 1985). Celice, ki izražajo encim TH, so potrebne za sproščanje gonadotropinov in ovulacijo (Northcutt in sod., 2007). V eni izmed študij so preučili ekspresijo TH na področju AVPV pri miših obeh spolov, ki so bile v obdobju pred rojstvom podvržene vplivu valprojične kisline. Valprojična kislina (VPA) je snov, ki je pri živalih in ljudeh povezana z nastankom motenj avtističnega spektra. Moški spol je veliko bolj občutljiv za nastanek te bolezni in predvideva se, da je pri osebkih z avtizmom prisotna hipermaskulinizacija. Rezultati so pokazali, da je VPA pri samcih znižala ekspresijo TH, pri samicah pa ni prišlo do sprememb, kar nakazuje, da je hipermaskulinizacijski učinek VPA prisoten le pri moškem spolu (Grgurevic, 2023). TH nevroni v AVPV so najverjetneje neposredno povezani s testosteronom. V študiji, ki jo je opravil Stephens in sod. (2017), so z ablacijo TH v Kiss1 pozitivnih celicah, ki so vključene v regulacijo GnRH in se skoraj izključno nahajajo na področju AVPV, dokazali znižano koncentracijo testosterona v krvi pri samcih.

Spolne razlike v možganih so dokazali tudi pri ljudeh. Moški imajo večji volumen možganov kot ženske, kar so potrdili tudi ob upoštevanju popravkov glede na razlike v velikosti telesa nasploh. Splošno sprejeto dejstvo je tudi, da imajo ženske proporcionalno večji volumen sivine v primerjavi z volumnom beline v možganih, pa tudi debelejšo skorjo, prav tako pa so študije

pokazale povezavo med volumnom sivine in nivojem testosterona, E2 ali progesterona (Sacher in sod., 2013). Pomembnejše strukture v človeških možganih, ki so podvržene spolnemu dimorfizmu, so hipokampus, amigdala in hipotalamus. Razumevanje teh razlik je pomembno za boljše razumevanje spolnih razlik pri prevalenci in poteku različnih bolezni, posledično pa tudi za njihovo zdravljenje. Motnje avtističnega spektra so na primer pogostejše pri moških, medtem ko je prevalenca depresije in anksioznosti višja pri ženskemu spolu (Alshammari, 2021). Klinične študije so pokazale, da tudi Alzheimerjeva bolezen pogosteje prizadene ženske, ki imajo tudi hitrejši razvoj simptomov, natančni mehanizem, ki pogojuje te spolne razlike pa je zaenkrat še neznan (Fisher in sod., 2018). Pomembno je torej, da se pri biomedicinskih študijah kot biološki faktor v obzir vzame tudi spol, saj študije, ki so izvedene zgolj na enem spolu, pogosto ne prikažejo celotne slike bolezni in hkrati onemogočajo razvoj spolno različnega zdravljenja (Alshammari, 2021).

1.2.4. Estrogeni hormoni in njihovi receptorji

Estrogeni hormoni so prisotni pri številnih živalskih vrstah. Nastajajo in izločajo se pri obeh spolih, čeprav v večji količini pri ženskem spolu, kjer so odgovorni za delovanje ženskega reprodukcijskega sistema in razvoj sekundarnih spolnih znakov, ki se pojavijo med puberteto in spolnim dozorevanjem. Gre za skupino hormonov, kamor vključujemo predvsem estron, E2, estriol in estretol. Izmed vseh je E2 biološko najbolj aktiven. Estrogeni hormoni se v največji meri sintetizirajo v jajčnikih, v manjši količini tudi v nadledvični žlezi in maščobnem tkivu, lokalno pa tudi v možganih. Svoje naloge opravljajo preko vezave na specifične receptorje, imenovane estrogenski receptorji, ki nato aktivirajo transkripcijske procese in/ali signalizacijske dogodke, ki uravnavajo izražanje genov. E2, ki ga v glavnem izločajo celice granulose v jajčnih foliklih, rumeno telo, med nosečnostjo pa tudi placenta, je glavni estrogeni hormon pri ljudeh in živalih. Estretol in estriol se v višjih koncentracijah pojavljata predvsem med nosečnostjo. Estretol se za razliko od ostalih tvori izključno v jetrih zarodka in preide v materin obtok preko placente, estron pa nastane s pomočjo aromatizacije androstenediona v izven-žlezni tkivih in se v večjih koncentracijah pojavi med menopavzo. V perifernih tkivih, med katerimi so maščobno in mlečno tkivo, žilni endotelij, gladke mišične celice, možgansko tkivo ter kostne celice, se lahko estron s pomočjo encima 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaze

pretvori v E2. Ta preobrazba omogoča, da se estron nato presnavlja ali pa v manjših količinah vstopi v krvni obtok. E2 med puberteto vpliva na deljenje epitelijskih celic v endometriju in mlečnih žlezah. Med nosečnostjo estrogeni hormoni, ki jih tvori placenta, pomagajo pripraviti mlečno žlezo na produkcijo mleka. Na drugi strani pa so nizke koncentracije estrogenih hormonov pri moških pomembne za dozorevanje semenčic, erekcijo in libido (Fuentes in Silveyra, 2019).

Do danes so bili pri sesalcih odkriti trije pomembnejši estrogenski receptorji, od katerih sta dva, ER α in ER β , jedrna receptorja, ki delujeta kot transkripcijska faktorja, tretji pa je membranski receptor, sklopljen z G beljakovino, ki se uradno od leta 2007 imenuje GPER1 (Enmark in Gustafsson, 1999; Fuentes in Silveyra, 2019). GPER1 je bil prvi odkrit in lokaliziran membranski estrogenski receptor v možganih. Nahaja se predvsem v področjih, ki so povezana z vzpostavljanjem energetske homeostaze (Shi in sod., 2013).

Veliko znanja o ER so prinesle raziskave gensko spremenjenih miši in podgan, predvsem miši z izbitim genom za ER α (ER α KO miši) in/ali ER β (ER β KO miši) ter miši, ki imajo gen za omenjena receptorja izbit le v določenih organih. Ugotovljeno je bilo, da so samice ER α KO neplodne, imajo hipoplastične maternice in hiperemične jajčnike brez zaznavnih rumenih teles, pri čemer tudi kasnejše aplikacije E2 v obdobju odraslosti pri takih živalih niso vplivale na spremembe maternice ali vagine. Neplodni so tudi samci ER α KO, kar je posledica atrofije mod, zmanjšane spermatogeneze in neaktivnih spermijev (Lubahn in sod., 1993). Samice ER α KO miši so kazale slabše materinsko obnašanje, okoli 35% miši v študiji, ki so jo izvedli Ogawa in sod. (1996), so celo poskušale ubiti mladiče med izvajanjem testa. Dodatno je bila pri ER α KO miših povišana tudi agresija do drugih samic in izražena slabša lordoza v primerjavi z mišmi divjega tipa (ang. wild type (WT)), samci pa so take miši tudi napadli, kar je običajno značilno za agresijo med samci. Predvidevajo, da so bile ER α KO samice s strani samcev tretirane kot vsiljivci moškega spola. Še ena raziskava opravljena na ER α KO miših je pokazala, da čeprav pride do vezave radiooznačenega E2 v specifičnih področjih možganov, kot so amigdala ter preoptično in arkvatno jedro, sta število označenih celic in koncentracija E2 v jedru znatno znižana v primerjavi z mišmi divjega tipa (Shughrue in sod., 1997). Simerly in sod. (1997) so ugotovili, da so bili pri AVPV ER α KO miših odkriti zgolj posamezni nevroni, pozitivni na ER α

in da je bilo število nevronov pozitivnih na TH trikrat večje kot pri miših divjega tipa, kar kaže na dejstvo, da odsotnost gena za ER α vodi v feminizacijo števila nevronov, pozitivnih na TH. ER β KO mišji samci so sicer plodni, vendar imajo s spolno zreliimi samicami manj številčna in manj pogosta gnezda, kot samci divjega tipa (Krege in sod., 1998). Krege in sod. (1998) navajajo tudi, da kažejo znake hiperplazije prostate in mehurja, a slednje ni bilo ponovljeno v kasnejših študijah (Dupont in sod., 2000). Samice ER β KO pa imajo slabšo plodnost, ki je posledica blokade v zadnjem koraku razvoja foliklov pred ovulacijo (Enmark in Gustafsson, 1999). Študije so pokazale tudi, da čeprav ER α prevladuje nad ER β v maternici in vagini, lahko ER β najverjetneje delno kompenzira izgubo ER α v reproduktivnem traktu, saj sta hipoplazija maternice in vagine bolj izrazita pri ER $\alpha\beta$ KO miših, medtem ko pri ER β KO miših delujeta normalno (Dupont in sod., 2000). Kar se tiče obnašanja, so tako ER β KO samci kot tudi samice ohranile značilno spolno obnašanje, samci so v nekaterih primerih kazali celo višji nivo agresije kot samci divjega tipa (Ogawa in sod., 1999).

Estrogeni hormoni so lipofilni in lahko prehajajo skozi celično membrano. Znotraj celice se vežejo na jedrna receptorja, kompleks receptor-hormon pa se nato veže na specifična, na estrogen odzivna področja na DNA s čimer uravnava prepisovanje tarčnih genov. Tako imenovani genomski učinek estrogenih hormonov prinese počasne, a dolgo časa trajajoče aktivacije, ki povzročijo spremembe v izražanju tarčnih genov in se razlikujejo od negenomskih učinkov, ki potekajo hitreje in so bolj prehodne narave. Po nekaterih podatkih naj bi bilo 35% genov pod vplivom estrogenih hormonov, čeprav v svojem zapisu nimajo estrogensko odzivnih področij (O'Lone in sod., 2004). Proces uravnavanja izražanja teh genov je posreden, saj se kompleks hormon-receptor veže na prepisovalne dejavnike in ne neposredno na DNA, ti pa nato aktivirajo ali zavrejo izražanje tarčnih genov. Negenomski učinek estrogenih hormonov deluje po drugi poti, preko znotrajceličnih signalnih poti, ki se aktivirajo ob vezavi estrogenih hormonov na membranski receptor GPER1. Kljub poskusu jasne razdelitve delovanja estrogenskih receptorjev na genomske in negenomske pa raziskave ugotavljajo, da imajo vse tri vrste receptorjev sposobnosti učinkovanja na oba načina, če že ne neposredno, pa vsaj posredno, preko drugih beljakovin. Še več, imajo celo sposobnosti uravnavanja svojega lastnega izražanja in aktivacije signalnih poti brez specifičnega liganda (Khbouz in sod., 2019; Fuentes in Silveyra, 2019).

Membransko specifični estrogenski receptorji imajo pomembno vlogo pri razvoju možganov, še posebej v prenatalnem in zgodnjem postnatalnem obdobju. Raziskave kažejo, da ti receptorji, ki jih aktivirajo estrogenski hormoni, sprožijo različne celične signalne poti, ki nadzorujejo različne dele razvoja možganov (Micevych in Mermelstein, 2008). Aktivacija membransko specifičnih ER vzpodbuja nevrogenezo – nastanek novih nevronov v možganih (Micevych in Kelly, 2012). Vključeni so tudi v nadzor sinaptične plastičnosti, t.j. zmožnosti sinaps, da se ojačajo ali oslabijo skozi čas, kot odgovor na spremembe v aktivnosti nevronov (Solum in sod., 2003). Uravnavajo tudi apoptozo, t. j. programirano celično smrt, ki se odvija med normalnim razvojem možganov. Študije so pokazale, da lahko z aktivacijo membransko specifičnih ER estrogenski hormoni zaščitijo nevrone pred apoptozo, predvsem preko njihovega delovanja na glia celice v centralnem živčnem sistemu (Arevalo in sod., 2015). Vlogo igrajo tudi pri uravnavanju izražanja genov, kar je ključno za diferenciacijo in specializacijo posameznih možganskih celic (Boon in sod., 2015).

1.2.5. Aktivna feminizacija

Skozi obdobja raziskovanja spolnih razlik v možganih se je predvidevalo, da se možgani pri ženskem spolu razvijajo v odsotnosti spolnih hormonov, saj jajčniki za razliko od mod v obdobju pred rojstvom ne proizvajajo spolnih hormonov. Že nekaj desetletij nazaj so se začele raziskave vpliva jajčnikov na možgane in obnašanje živali ženskega spola v obdobju po rojstvu; raziskave so se osredotočale predvsem na primerjavo obdobja pred puberteto in po njej. Kenney (1970) je ugotovila, da odstranitev jajčnikov prvi dan po rojstvu statistično pomembno zmanjša spolno receptivnost samic podgan v primerjavi z odstranitvijo jajčnikov 40 dni po rojstvu.

Aromataza je encim, ki je pri sesalcih potreben za sintezo estrogenih hormonov v spolnih žlezah in ostalih organih tako pri ženskem kot tudi pri moškem spolu (Shay in sod., 2018). Študije z mišmi, ki imajo izbit gen za aromatazo (ang. aromatase knockout (ArKO)) nudijo natančnejši vpogled v vlogo E2 pri razvoju možganov in vzorcih obnašanja. Ta model miši omogoča preučevanje živali, ki zaradi pomanjkanja aromataze ne sintetizirajo lastnega E2, vendar pa

imajo delujoče estrogenske receptorje, kar pomeni, da je pomanjkanje estrogenov možno na nivoju fenotipa spremeniti s pomočjo dodajanja estrogenih hormonov. V študiji, ki sta jo opravila Bakker in Baum (2008), so ugotovili, da je bilo pri ArKO miših izražanje lordoze močno prizadeto in je tako tudi ostalo pri ponovnih testiranjih in kljub dodanemu E2 v odrasli dobi. Rezultati nakazujejo, da odsotnost E2 v zgodnejših obdobjih razvoja pri ArKO samicah očitno povzroči trajne spremembe v obnašanju. Pri ArKO samicah je bilo tudi število nevronov, pozitivnih na kisspeptin v rostralnem področju periventrikularnega dela tretjega ventrikla, nižje kot pri WT samicah. Kisspeptin je potreben za izločanje gonadotropin sproščujočega hormona (GnRH) in je pri samcih slabše izražen kot pri samicah kar nakazuje, da samice ArKO niso bile feminizirane oziroma so kazale fenotip podoben moškemu spolu. Mišji samci ArKO pa so imeli nekoliko povišano število kisspeptinskih nevronov, kar pomeni, da je prišlo do izgube spolne diferenciacije tega področja in nakazuje na organizacijsko vlogo E2 pri spolno različnem številu kisspeptinskih nevronov (Bakker in sod., 2010). Dalla in sod. (2004) so želeli raziskati, ali je kronično pomanjkanje estrogenov pri ArKO miših povezano tudi s spremembami v aktivnosti in pojavom depresiji podobnih vedenj. V testu prisilnega plavanja so ugotovili, da so ArKO samice manj plavale in več lebdele v vodi, kar kaže na povečanje depresiji podobnega vedenja. Te razlike so ostale tudi po dodatku E2 v odraslem obdobju. ArKO samcev v isti raziskavi niso preverili.

Še en pomemben vidik, ki bi lahko prispeval k feminizaciji možganov, je epigenetika oz. natančneje, različni epigenetski mehanizmi, kot je metilacija DNA, preoblikovanje histonov in prisotnost nekodirajočih RNA, ki uravnavajo izražanje genov, brez da bi pri tem prišlo do sprememb v zaporedju DNA. Vse več dokazov obstaja, da so epigenetski mehanizmi pomembni pri procesu sekundarne spolne diferenciacije. Dva pojavi med razvojem, v katerih je prisotna metilacija DNA, sta utišanje X-kromosoma in genomsko vtisnjenje (angl. genomic imprinting), pri čemer gre za proces, v katerem se izrazi le ena od starševskih kopij gena in je neodvisen od mendelskega dedovanja. Tako različni vzorci metilacije DNA na kontrolnih območjih moške oz. ženske zarodne linije povzročajo materinsko ali očetovsko specifično izražanje nekaterih genov v genomu, kljub identičnemu zaporedju DNA na obeh starševskih kromosomih (Piferrer, 2013). Podobno tudi študija, ki so jo opravili Nugent in sod. (2015) nakazuje, da feminizacija možganov vključuje aktivno inhibicijo maskulinizacije preko DNA metilacije. Ker dodajanje E2 pri novorojenih podganah maskulinizira POA in spolno obnašanje, pri čemer se zmanjša

število popolnih metilacij na mestu CpG, ki je prevladujoče mesto DNA metilacije, so predpostavili, da je na POA visoko število popolnih metilacij na mestu CpG, zaslužno za promocijo feminizacije in utišanje izražanja genov, ki povzročijo tako nevronske kot tudi vedenjsko maskulinizacijo. Ko so farmakološko zavrla DNA metiltransferazo, so ugotovili, da je le-to posnemalo učinke E2 in se pri samicah odražalo z maskulinizacijo spolnega obnašanja; samice so izvajale več naskokov in potiskov medenice v bližini drugih spolno receptivnih samic, medtem, ko je bilo pri miših, kjer tega utišanja ni bilo, to zelo redko (Nugent, 2015).

Ena od hipotez pravi, da bi lahko feminizacija potekala tudi znotraj možganov, preko intrinzičnih dejavnikov; a je preučevanje natančnih mehanizmov aktivne feminizacije v možganih pri glodavcih oteženo, saj zaenkrat še ni znanega signala oz. dogodka, ki bi ta proces sprožil. Obstaja veliko vretenčarjev, ki nimajo spolnih kromosomov, imajo pa podobna, homologna področja možganov kot sesalci in pri katerih je spol določen preko zunanjih faktorjev, kot so temperatura, pH, gostota naselitve in podobno. Mednje spadajo tudi klovnske ribice (*A. ocellaris*), pri katerih je feminizacija možganov vsekakor aktiven proces, saj ribice odrastejo kot samci, nato pa v odraslosti spol spremenijo v ženski. Signali, ki sprožijo feminizacijo možganov so pri klovnski ribici dobro poznani in enostavni za manipulacijo, zaradi česar so dober model za preučevanje aktivne feminizacije. Tako so Dodd in sod. (2017) pri klovnski ribici želeli inducirati spremembo spola v laboratoriju, kot model za preučevanje aktivne feminizacije možganov. Želeli so ugotoviti, ali je tudi pri tej vrsti POA spolno dimorfno ter določiti časovnico pojava sprememb, ki vodijo v spolno preobrazbo iz moškega v ženski spol. Ugotovili so, da v POA pri klovnskih ribicah poteče aktivna feminizacija celo neodvisno od spolnih žlez. Če so v poskusu združili dva samca, med katerima se je začela izražati dominanca, se je preko nekaj mesecev do enega leta povečevala povprečna velikost celic v POA pri dominantni ribi, kar je značilno za ženski spol, istočasno pa je potekala tudi degeneracija spolnih žlez. Degenerirane spolne žleze in s tem povezani nivoji spolnih hormonov, značilni za moški spol, so se ohranili tudi več let, preden je nek neznan signal zaključil proces in sprožil feminizacijo spolnih žlez, skupaj z pojavom vitalnih oocitov. To podpira teorije, da pri sesalcih aktivna feminizacija POA med embriogenezo izvira iz možganov samih. Ti sicer morda lahko uporabijo prisotne hormone kot substrate, a je njihova aktivnost kontrolirana preko procesov, ki potekajo znotraj možganov, kot je lokalno sproščanje in nadzorovanje aromataze preko okoliških nevronov in možganskih signalnih poti.

2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE

2.1.CILJI RAZISKAVE

Želeli smo ugotoviti, preko katerih receptorjev za estrogene hormone poteče aktivna feminizacija možganov in v katerem obdobju. Osredotočili smo se na obdobje pred puberteto (15. – 25. dan starosti), v katerem smo ovariectomiziranim živalim dodajali snovi, ki aktivirajo različne signalne poti estrogenih hormonov: estradiol benzoat (EB), propil pirazol triol (PTT), ki je agonist ER α , diarilpropiontril (DPN), ki je agonist ER β . S pomočjo PTT in DPN smo želeli preveriti, ali aktivna feminizacija poteče preko ER α in ER β , s pomočjo EB pa smo želeli preveriti ali so v ta proces vključene tudi druge signalne poti estrogenih hormonov. Poleg treh testnih skupin smo imeli tudi dve kontrolni skupini živali. Negativna kontrolna skupina je bila ovariectomizirana pred puberteto in je dobivala nosilec (angl.vehicle) koruzno olje; pozitivna kontrolna skupina pa je bila ovariectomizirana šele po puberteti (60. dan starosti) in je prav tako prejela koruzno olje. S pozitivno kontrolo smo želeli preveriti ali so za popolno feminizacijo možganov potrebni jajčniki v celotnem obdobju razvoja, od rojstva do odrasle dobe, z negativno kontrolo pa smo ugotavljali ali odsotnost jajčnikov pred in po puberteto povzroči odsotnost feminizacije. Feminizacijo smo ocenjevali s pomočjo spolno različnih lastnosti, za katere je znano, da je njihov razvoj pod vplivom spolnih hormonov, to so: žensko spolno obnašanje (lordoza) in izražanje TH in ER α v možganih.

2.2.DELOVNE HIPOTEZE

H1: Estrogeni hormoni so v obdobju pred puberteto potrebni za feminizacijo možganov, ki se bo kazala v izboljšanju spolne sprejemljivosti (lordoze) in v povečanju števila živčnih celic, ki izražajo TH in ER α .

H2: Če so estrogeni hormoni potrebni v obdobju pred in po puberteti, bo spolna sprejemljivost (lordoza) in izražanje TH v AVPV in ER α v VMH povečana pri skupini živali s prisotnimi jajčniki (pozitivna kontrola) v primerjavi z ostalimi skupinami (EB, PTT, DPN, olje).

H3: Če so estrogeni hormoni potrebni pred puberteto, bo spolna sprejemljivost (lordoza) in izražanje TH v AVPV in ER α v VMH povečana pri skupini, ki bo prejela EB, PTT in DPN in pri skupini živali z jajčniki (pozitivna kontrola) v primerjavi s skupino brez jajčnikov, ki bo prejela olje.

H4: Če feminizacija možganov poteka predvsem preko ER α , bo spolna sprejemljivost (lordoza) in izražanje TH v AVPV in ER α v VMH povečana pri skupini PTT, EB in pri skupini z jajčniki (pozitivna kontrola) v primerjavi s skupino, ki bo prejela olje in DPN.

H5: Če feminizacija možganov poteka predvsem preko ER β , bo spolna sprejemljivost (lordoza) in izražanje TH v AVPV in ER α v VMH povečana pri skupini DPN, EB in pri skupini z jajčniki (pozitivna kontrola) v primerjavi s skupino, ki bo prejela olje in PTT.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. POSKUSNE ŽIVALI

V poskusu so bile uporabljene samice miši divjega tipa C57BL/6HJOlaHsd, vzgojene v Laboratoriju za genomiko živali na Veterinarski fakulteti Univerze Ljubljana pod standardnimi pogoji: temperatura 21-24°C, 50-60% vlažnost, osvetljava z umetno svetlobo s temnim in svetlim ciklom (12:12 ur). Miši so prejemale hrano brez fitoestrogenov (Teklad global 16% proteinska glodalska dieta®, BN 2916, Envigo, Udine, Italija) in vodo z dodano 37% klorovodikovo kislino (0,7 mL/L, Merck, Darmstadt, Nemčija; pH 3-4), ki zavira rast mikroorganizmov v vodi. Tako hrana kot voda sta bili živalim na voljo ves čas. Miši so bile nastanjene v odprtih, polikarbonatih kletkah (Tecniplast, Buguggiate, Italija) na stelji iz ostružkov lesa (Lignocel®, Rettenmaier & Söhne, Nemčija). Vse postopke na živalih je odobrila Etična komisija Uprave republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin z odločbo številka U34401-30/2020/8.

V poskusu smo uporabili 30 samic, ki smo jih razdelili v pet skupin (Tabela 1). Samicam smo 10. dan po rojstvu v anesteziji odstranili jajčnike (ovariektomija, OVX) in nato dodajali od 15. do 25. dneva po rojstvu različne snovi raztopljene v koruznem olju (Sigma, Steinheim, Nemčija): estradiol benzoat (Sigma, Steinheim, Nemčija), PTT (Sigma, Steinheim, Nemčija), DPN (Sigma, Steinheim, Nemčija) ter koruzno olje kot negativno kontrolo. Dodatni, peti skupini miši, jajčnikov v obdobju pred odraslostjo nismo odstranili in so služile kot pozitivna kontrola za normalen razvoj značilnosti samic. Te samice so bile 10. dan po rojstvu navidezno (ang. sham) ovariektomizirane (opisano spodaj), od 15. do 25. dneva po rojstvu so prejemale koruzno olje, jajčnike pa smo jim odstranili 60. dan starosti.

Jajčnike smo odstranili pod inhalacijsko anestezijo z isofluranom (Isoflurin®, VetPharma, Spain), preko zareze na vsaki strani ledvenega predela. Rane smo zašili z resorbtivno kirurško nitjo 6/0 (Safil, Braun, Esculap, Tuttlingen, Nemčija). Po posegu smo samicam dodali protibolečinsko terapijo butorfanola (Turbogesic, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, ZDA) s podkožno injekcijo 0,2 mL, v koncentraciji 1mg/kg v fiziološki raztopini z dodano

glukozo. Operirana samica je pol ure okrevala v inkubatorju na 31°C, skupaj z vsaj enim samcem iz gnezda. Njihova mama je bila tako vedno izpostavljena mladičem, operirani mladiči pa so že v inkubatorju okrevali v gnezdilnem materialu skupaj z brati. S tem smo želeli vsaj delno omiliti stres, ki so ga doživljale živali v času postopka. Tri dni po posegu smo operirane samice vsakodnevno tehtali in pregledovali rane. Samice pozitivne kontrole, so bile 10. dan po rojstvu navidezno ovariektomizirane. Pod anestezijo smo na ledvenem področju na vsaki strani naredili zarezo v kožo in potrebušnico ter vsako posebej zašili. Prav tako so prejele protibolečinsko terapijo. Istim samicam smo jajčnike odstranili na zgoraj opisan način v odraslem obdobju, pri 60 dneh starosti.

PTT in DPN smo po navodilih proizvajalca raztopili v dimetil sulfoksidu (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) in pripravili raztopine s koruznim oljem v koncentraciji 0,6 mg/mL. EB je bil prav tako raztopljen v koruznem olju v koncentraciji 2 µg/mL. Od 15. do 25. dneva po rojstvu so vsak drugi dan (vse skupaj 6 krat) samice s podkožno injekcijo prejele 25 µL snovi: EB v koncentraciji 0,05 µg/samico, DPN in PTT v koncentraciji 30 µg/samico in koruzno olje brez vsega prav tako v količini 25 µL. Vse živali so prejele enak volumen snovi.

Tabela 1: Skupine miši, vključene v raziskavo.

Tretiranje	Estradiol benzoat	PTT	DPN	Neg. kontrola (olje)	Poz. kontrola (olje)
Ovariektomija	Pred puberteto (10. dan starosti)	Pred puberteto (10. dan starosti)	Pred puberteto (10. dan starosti)	Pred puberteto (10. dan starosti)	Po puberteti (60. dan starosti)
Število živali v testu ženskega spolnega obnašanja	6	6	6	6	6
Število vzorcev možganov	5	5	5	5	6

3.2. TEST ŽENSKEGA SPOLNEGA OBNAŠANJA

3.2.1. Priprava živali

Poskusnim samicam smo umetno sprožili estrus tako, da smo jim 48 ur pred poskusom dodali 0,5 µg estradiol benzoata in 4–8 ur pred poskusom 0,8 mg progesterona, oba smo dodali z injiciranjem pod kožo v količini 50 µL. Estradiol benzoat (β-estradiol 3-benzoat, E-8515, Sigma, Steinheim, Nemčija) in progesteron (P-0130, Sigma, Steinheim, Nemčija) smo raztopili s koruznim oljem (Sigma, Steinheim, Nemčija).

Za stimulusne samce smo uporabili odrasle, spolno izkušene samce linije C57BL/6HJOIaHsd. Pod tem pogojem smo v test vključili 12 samcev, ki so predhodno uspešno zaplodili vsaj eno gnezdo. Najmanj tri dni pred testom smo vsakega samca posebej prestavili v akvarijsko posodo (26 × 42 cm) in mu s tem omogočili privajanje na domače okolje. V domačem okolju namreč

samci veliko hitreje pokažejo spolno zanimanje za samice. Eno uro pred začetkom testa smo samcem nastil odstranili in pod akvarij namestili ogledalo, ki je služilo boljšemu opazovanju vstopov penisa v nožnico. Nastil smo shranili in ga po opazovanju vrnil samcu. Vsa opazovanja smo snemali, steklen akvarij pa je bil uporabljen zaradi boljše kvalitete posnetkov.

3.2.2. Izvedba testa

Živali so bile testirane pri starosti tri do štiri mesece. Vsako samico smo testirali štirikrat, med ponovitvami pa je bilo vsaj tri dni premora. Opazovanja smo izvedli dve do štiri ure po začetku temnega cikla pod rdečo svetlobo, v akvarijskih posodah brez nastilja in brez rešetk za vodo in hrano. Žensko spolno obnašanje smo opazovali tako kot je navedeno v doktoratu Grgurevič (2011). Poskusno samico smo dali v akvarijsko posodo, kjer je bil nastanjen spolno izkušen samec. Če samec po najmanj petih minutah ni pokazal zanimanja za poskusno samico, smo ga zamenjali z novim samcem in postopek ponovili, dokler nismo dobili ustreznega samca, ki je pokazal zanimanje za poskusno samico in jo poskusil naskočiti. V primeru, da se je poskusna samica aktivno branila samca in ni kazala nobene spolne sprejemljivosti, smo poskus prekinili po 15 neuspešnih samčevih naskokih. Spolno sprejemljivost (Slika 1), smo ocenjevali od 1 do 5 po kriterijih, ki so navedeni v nadaljevanju. Če je bila spolna sprejemljivost ocenjena z 1 ali več, je poskus trajal do ejakulacije stimulusnega samca ali največ 20 minut. Če je samec ejakuliral, je imel pred naslednjim poskusom najmanj dan odmora.

Ocenjevali in beležili smo:

- število poskusov naskokov (za poskus naskoka smo šteli; kadar se je samec s sprednjimi tačkami poskušal vzpeti na ledveni predel poskusne miši, ki ni kazala spolne sprejemljivosti, je bežala, se dvignila od tal ali se celo branila);
- število naskokov (za naskok smo šteli, ko je bila poskusna miš z vsemi štirimi tačkami na tleh, stimulusni samec pa jo je s sprednjimi tačkami objemal v ledvenem predelu hrbta; naskok se je lahko nadaljeval samo s potiskanjem medenice ali pa s kopulacijo in potiskanjem medenice; pri vsakem naskoku smo ocenili tudi spolno sprejemljivost);

- spolno sprejemljivost poskusne miši smo opisovali kot usločenje hrbta (lordoza; L) in zmožnost samice, da samcu pusti naskok; ocenili smo jo s pomočjo lestvice od 1 do 5 podobno kot navajajo Dominguez-Salazar in sod. (2004).

L1 = miš se ob poskusu naskoka za kratek čas ustavi, vendar hitro konča stik s samcem;

L2 = miš pusti samcu, da se vzpne na ledveni del, vendar se ob poskusu kopulacije odmakne in tako prekine kopulacijo;

L3 = miš pusti samcu, da se vzpne na ledveni del; ko poskuša kopulirati, se premika in lahko tudi oglašja; kopulacijo prekine stimulusni samec;

L4 = miš pusti samcu naskok in kopulacijo, se pri tem lahko oglašja in lahko tudi rahlo premika; kopulacijo prekine samec;

L5 = miš pusti samcu naskok in kopulacijo; med kopulacijo je pri miru in se ne oglašja; kopulacijo prekine samec.



Slika 1: Spolna sprejemljivost, ki se kaže z usločenjem hrbta (lordoza), s katero smo ocenjevali spolno obnašanje.

Po končanih opazovanjih smo iz posnetkov ocenili lordozo poskusnih miši in ostale vzorce obnašanja. Obnašanje smo ocenili s pomočjo Stopwatch programa (Center for Behavioral Neuroscience, Atlanta, GA, ZDA). Pri ocenjevanju smo ločili lordoze brez kopulacije in lordoze s kopulacijo. Iz ocen lordoze smo izračunali količnik lordoze (LQ), ki je predstavljal delež naskokov z dobro lordozo (4 ali 5), glede na vse poskuse naskokov in naskoke. Za izračun

LQ smo upoštevali samo lordoze s kopulacijo. Količnik lordoze (LQ) smo izračunali na podoben način kot v raziskavi, ki so jo izvedli Grgurevic in sod. (2012) z enačbo:

$$LQ = ((L4 + L5) / \text{število vseh poskusov naskokov} + \text{število vseh naskokov}) * 100$$

Poleg tega smo beležili še število ejakulacij, vstopov v nožnico in potiskov z medenico.

3.3. ŽRTVOVANJE POSKUSNIH ŽIVALI

Po končanem testiranju smo miši žrtvovali z izkrvavitvijo. Miši smo anestetizirali s kombinacijo anestetikov ketamin (Ketamina, Vetoquinol Biowet, Gorzowie, Poljska, 100 µg/g telesne mase), acetopromazin (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, ZDA, 2 µg/g telesne mase) in ksilazin (Chanelle Pharmaceuticals Ltd., Loughrea, Irska, 10 µg/g telesne mase), prerezali prsni koš, jih s prerezom desnega ventrikla izkrvaveli ter preko levega prekata sprali krvni obtok z 0,05 M fosfatnim pufrom z dodanim NaCl v koncentraciji 137 mmol/L (PBS; pH 7,4; (Sigma, Steinheim, Nemčija) in nato fiksirali s 4% paraformaldehidom v 0,05 M PBS (pH 7,4; (Sigma, Steinheim, Nemčija)). Možgane smo odstranili iz lobanje in jih fiksirali v 4% paraformaldehidu v 0,05 M PBS (pH 7,4) preko noči in nato shranili v 0,01 M PB (pH 7,3) pri 4°C do uporabe za imunohistokemično barvanje.

3.4. IMUNOHISTOKEMIJA

Pripravili smo 5% agarozo (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) raztopljeno v destilirani vodi. V ohlajeno agarozo smo potopili možgane z vohalnimi betiči navzdol in jih poravnali vzporedno z dnom petrijevke. Ko se je agarosa popolnoma strdila smo možgane skupaj z agarozo odstranili iz petrijevke ter jih obrezali tako, da je bila fisura longitudinalis cerebri pravokotna na rezalno površino. Male možgane smo odstranili, saj jih za to raziskovalno nalogo nismo potrebovali.

Možgane smo z vibratomom (Vibratome Leica, VT1000 S, Leica Biosystems, Nussloch, Nemčija) na hitrosti osem narezali na rezine debeline 50 μm . Rezine možganov smo prenesli v posodice napolnjene z 0,05 M PBS.

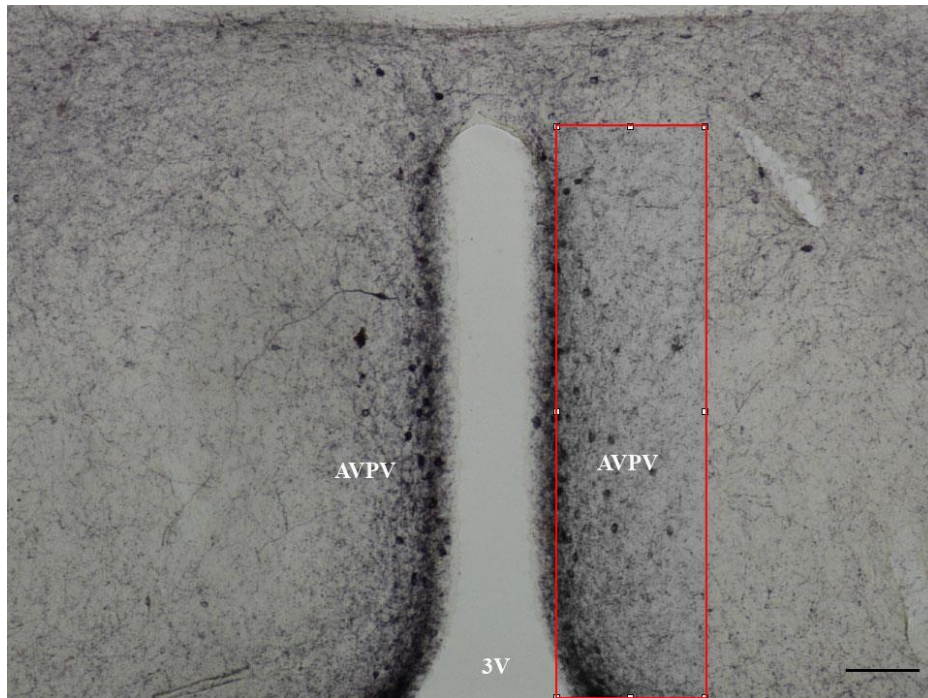
Vsa nadaljnja spiranja so potekala na stresalniku (Thermomixer, Compact, Eppendorf, Nemčija) pri hitrosti 50 obratov/minuto. Rezine smo inkubirali 30 min v 0,05 M PBS z 0,1 M glicinom (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) in jih trikrat zapored po pet minut spirali v 0,05 M PBS. Sledila je 15 minutna inkubacija v natrij borovem hidratu (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) in štiri pet minutna spiranja v 0,05 M PBS. Za blokiranje nespecifičnih beljakovin smo uporabili 5% NDS (ang. normal donkey serum) (Chemicon, Temecula, CA, ZDA), 0,5% triton (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA), 0,05 M PBS in 0,02% vodikov peroksid (Merck, Darmstadt, Nemčija). Blokiranje je trajalo od 30 minut do dve uri. Možgane smo inkubirali dva dni na 4°C s primarnimi zajčjimi protitelesi proti TH (Chemicon, Temecula, CA, ZDA, 201 Cat#AB152) v koncentraciji 1:4000 in protitelesi proti ER α (Temecula, California, ZDA) v koncentraciji 1:5000. Rezine smo spirali z raztopino 0,05 M PBS in 10 % tritona, in sicer štirikrat zapored po 15 minut. Sledila je najmanj dvourni inkubacija s sekundarnimi biotinilanimi protitelesi DAR (ang. donkey anti-rabbit), Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, ZDA, (1:500), ki smo jih pripravili z mešanjem 0,05 M PBS, 1% NDS in 0,5% tritona. Rezine smo nato sprali z raztopino 0,05 M PBS in 10% tritona, štirikrat zapored po 15 minut. Nato smo tej isti mešanici dodali raztopino encima hrenove peroksidaze, konjugirane s streptavidinom (Jackson Immunoresearch) redčeno v 0,05M PBS, 0,5% triton v razmerju 1:2500 in inkubirali eno uro. Rezine smo ponovno sprali štirikrat zapored po 15 minut, tokrat v 0,5 M Tris-pufri raztopine z dodanim 0,15 M NaCl, pH 7,5 (Trizma base (TBS): Sigma, Steinheim, Nemčija). Sledilo je pet minutno barvanje s 0,025 % 3'-diaminobenzidinom tetrahidrokloridom (DAB: Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) raztopljen v 0,5 M TBS in z dodanim nikljem amonijevega sulfata (Sigma, Steinheim, Nemčija) in 0,02 % vodikovim peroksidom ter nato spiranje rezin ponovno v 0,5 M TBS, trikrat zapored po 10 minut.

V dveh dneh smo rezine možganov zložili na predmetnice. S tankim čopičem smo zlagali do pet rezin v vrsto (3x5). Rezine smo poravnali s pinceto in postavitev preverili pod lupo z 10x povečavo. Rezine so se sušile na zraku čez noč. Naslednji dan smo predmetnico z rezinami

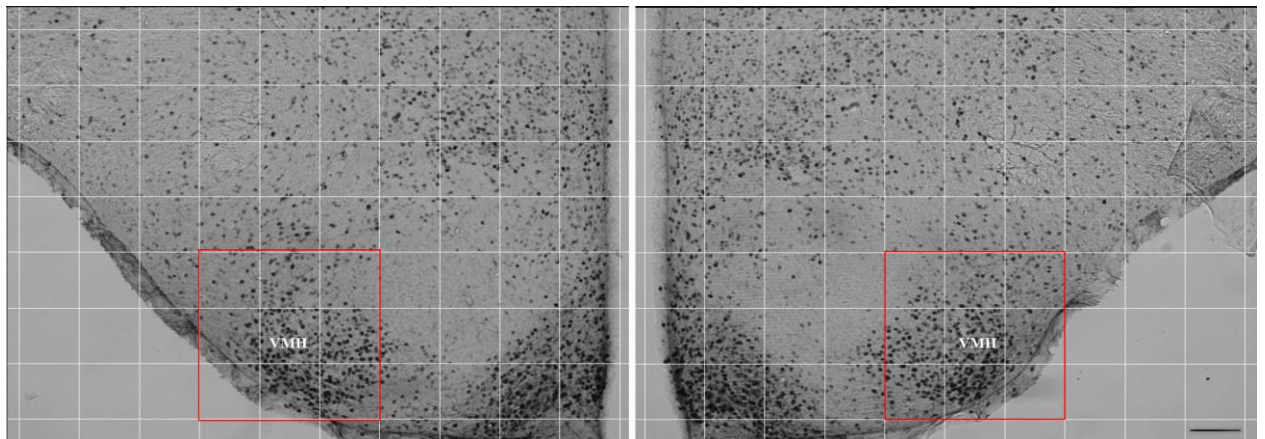
sprali z destilirano vodo, da smo odstranili ostanke soli, jih posušili in zalili s Pertexom (Pertex, Burdorf, Nemčija), da smo ustvarili trajni preparat.

3.5. FOTOGRAFIRANJE REZIN MOŽGANOV IN ŠTETJE CELIC

S pomočjo mikroskopa Eclipse 80i z vgrajeno digitalno kamero DS-Fi1 (Nikon, Minato-ku, Tokyo) smo na 100x povečavi analizirali izražanje TH na področju AVPV in ER α na področju VMH. Vse strukture in področja v možganih, ki so uporabljeni v tej nalogi, smo določili na osnovi atlasa mišjih možganov (Paxinos & Franklin, 2001). Za analizo AVPV smo uporabili dve zaporedni rezini in fotografirali celotno jedro (Slika 2), za analizo VMH smo uporabili tri zaporedne rezine in fotografirali levo in desno stran jedra posebej (Slika 3). Celice smo prešteli s pomočjo programa Image J (NIH, Bethesda, ZDA). V program smo vnesli merilo za 100x povečavo in na vsaki rezini možganov prešteli celice v določenem območju. Pri AVPV smo prešteli temno obarvane celice oddaljene 0,2 mm levo in desno od tretjega ventrikla (Slika 2), medtem ko smo pri VMH dodali na fotografijo mrežo in v območju 3 x 3 kvadratov kjer je prisotno jedro prešteli vse temno obarvane celice (Slika 3). Oseba, ki je štela celice, ni vedela iz katere skupine so posamezni vzorci.



Slika 2: Področje AVPV, kjer smo prešteli celice, pozitivne na TH (rdeč pravokotnik), AVPV - anteroventralni del periventrikularnega jedra, 3V – tretji ventrikel; merilo: 100 μ m



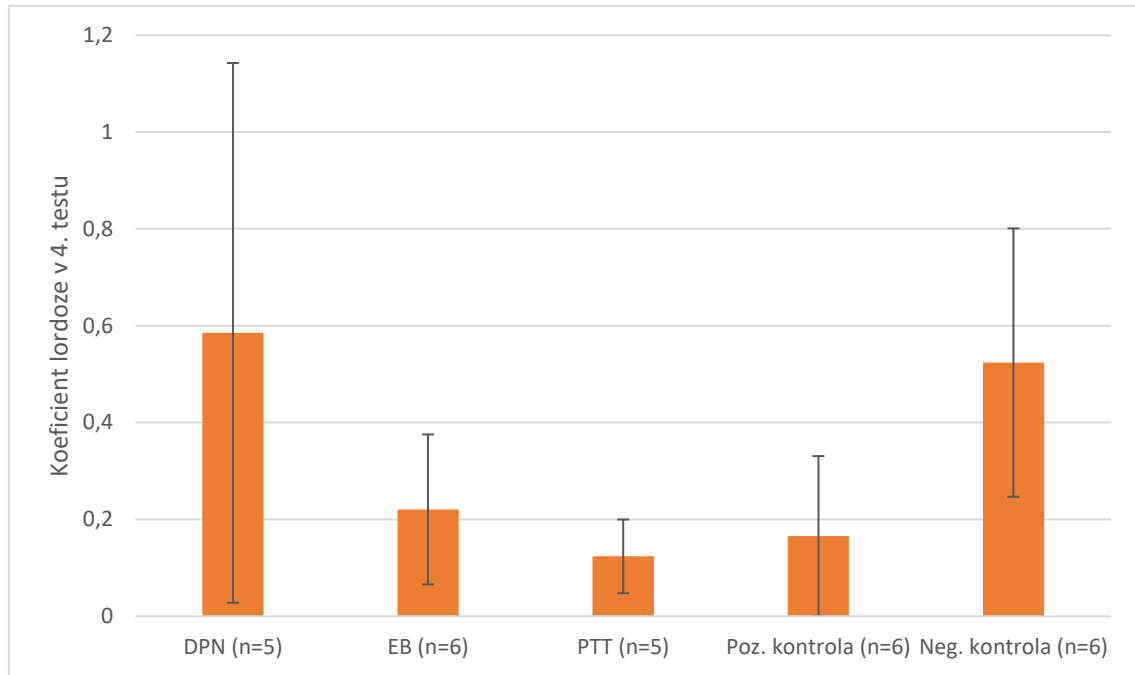
Slika 3: Področje VMH, kjer smo šteli celice, pozitivne na ER α (rdeč kvadrat), VMH – ventromedialno jedro hipotalamusa; merilo: 100 μ m

3.6. STATISTIČNA ANALIZA

Podatke smo analizirali s programsko opremo NCSS (NCSS statistical software, Kaysville, UT, ZDA). Iz analize smo izločili možgane, pri katerih zaradi neustreznega kota rezanja nismo dobili ustreznih rezin in vzorce pri katerih so nastale med postopkom imunohistokemije poškodbe, zaradi katerih celic na celotnem področju ni bilo možno prešteti. Dve samici, pri katerih smo med žrtvovanjem ugotovili prisotnost jajčnika, smo izločili iz raziskave. Ena samica je bila iz skupine PTT in ena iz skupine DPN. Število vstopov v nožnico, potiskov medenice in število posameznih lordoz smo v testih, ki so se zaradi ejakulacije končali prej, preračunali na skupen čas 20 minut. Normalno porazdelitev podatkov smo preverili s testom po Shapiru in Wilku, homogenost variance pa z Levenovim testom. Vsi podatki so bili analizirani z analizo variance (ANOVA linearni model), kateri je sledil Tukey-Kramerjev post-hoc test. Koeficient lordoze smo med skupinami in testi primerjali z ANOVO za ponavljajoče merjenje. Statistično pomembne razlike smo šteli pri $p < 0,05$. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardna napaka.

4. REZULTATI

Analiza variance ni pokazala statistično pomembnih razlik v ženskem spolnem obnašanju med posameznimi skupinami. Koeficient lordoze se v zadnjem (4.) testu ni razlikoval med posameznimi skupinami ($F(4, 27) = 0,58, p = 0,678$) (Slika 4). Prav tako so imele vse skupine v zadnjem testu podobno število vstopov v nožnico ($F(4, 27) = 1,51, p = 0,231$) in potiskov z medenico ($F(4, 27) = 1,36, p = 0,279$). Tudi latenci do vstopa v nožnico ($F(4, 27) = 1,52, p = 0,229$) in do potiskov z medenico ($F(4, 27) = 1,52, p = 0,229$) se nista statistično signifikantno razlikovali med skupinami (Tabela 2). Koeficient lordoze je s ponovitvami testiranja statistično pomembno naraščal ($F(3, 111) = 4,02, p = 0,011$), vendar pri vseh skupinah podobno, saj interakcija med testi in skupinami ni bila statistično pomembna ($F(12, 111) = 0,74, p = 0,709$) (Slika 5). Analiza variance prav tako ni pokazala statistično pomembnih razlik med skupinami niti v izraženosti TH v AVPV ($F(4, 16) = 1,72, p = 0,21$), niti v izraženosti ER α v VMH ($F(4, 25) = 0,76, p = 0,560$) (Slika 6, 7).



Slika 4: Koeficient lordoze v 4. testu pri posameznih skupinah, povprečna vrednost $\pm$ standardna napaka. Razlike med skupinami niso bile statistično pomembne.

Legenda:

DPN – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. – 25- dnevom prejemale DPN
EB – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale EB
PTT – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale PTT

Poz. kontrola – samice, ki so bile ovariektomizirane šele po puberteti (60. dan) in so med 15. in 25. dnevom prejemale olje.

Neg. kontrola – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale olje

Tabela 2: Povprečne vrednosti št. vstopov v nožnico, latence do vstopa v nožnico, potiskov z medenico in latence do potiska medenice v zadnjem (4.) testu $\pm$ standardna napaka.

	DPN (N = 5)	EB (N = 6)	PTT (N = 5)	Neg. kontrola (N = 6)	Poz. kontrola (N = 6)
Število vstopov v nožnico	7,07 ($\pm$ 4,41)	7,46 ($\pm$ 3,86)	2,0 ($\pm$ 1,38)	1,38 ($\pm$ 0,74)	0,83 ($\pm$ 0,65)
Latenca do vstopa v nožnico (s)	665,50 ($\pm$ 234,76)	526,93 ($\pm$ 217,0)	872,26 ($\pm$ 209,03)	874,47 ($\pm$ 185,46)	1119,27 ($\pm$ 66,35)
Število potiskov z medenico	143,05 ($\pm$ 94,11)	143,81 ($\pm$ 73,57)	26,37 ($\pm$ 25,63)	39,45 ($\pm$ 22,41)	19,70 ($\pm$ 18,90)
Latenca do potiska z medenico (s)	665,64 ($\pm$ 234,68)	527,10 ($\pm$ 216,95)	872,40 ($\pm$ 208,96)	874,30 ($\pm$ 185,37)	1119,42 ($\pm$ 66,28)

Legenda:

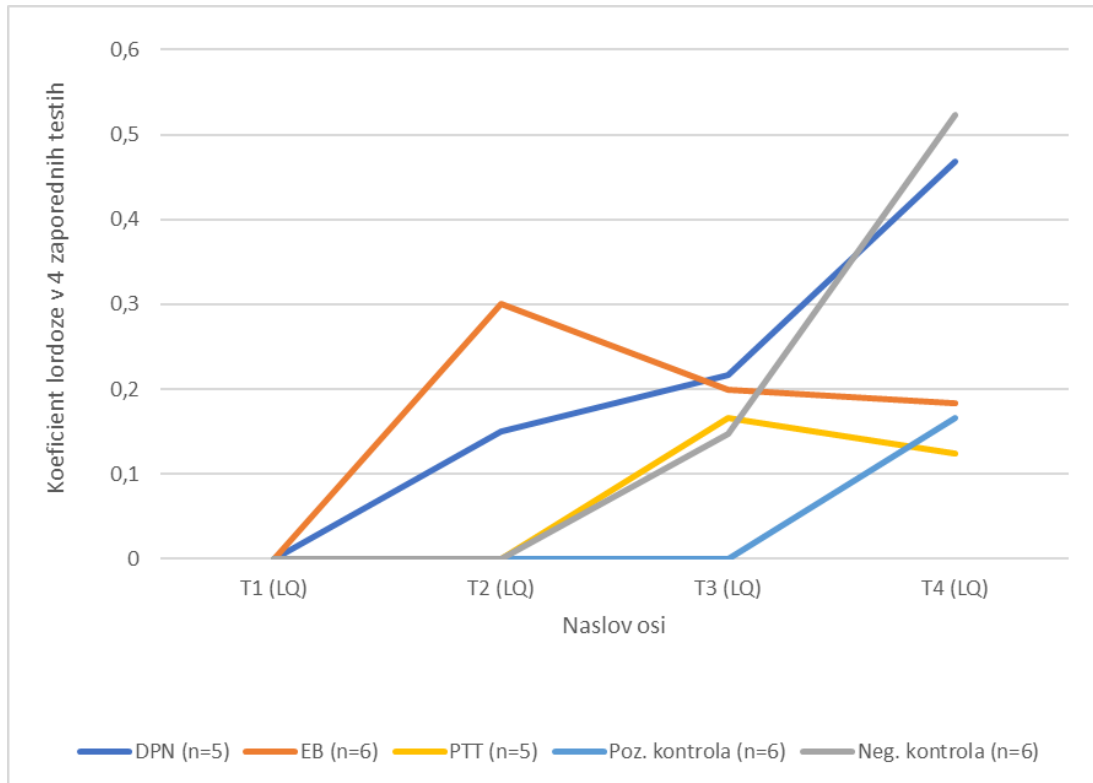
DPN – samice, ki so bile ovariectomizirane 10. dan in med 15. – 25- dnevom prejemale DPN

EB – samice, ki so bile ovariectomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale EB

PTT – samice, ki so bile ovariectomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale PTT

Poz. kontrola – samice, ki so bile ovariectomizirane šele po puberteti (60. dan) in so med 15. in 25. dnevom prejemale olje.

Neg. kontrola – samice, ki so bile ovariectomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale olje

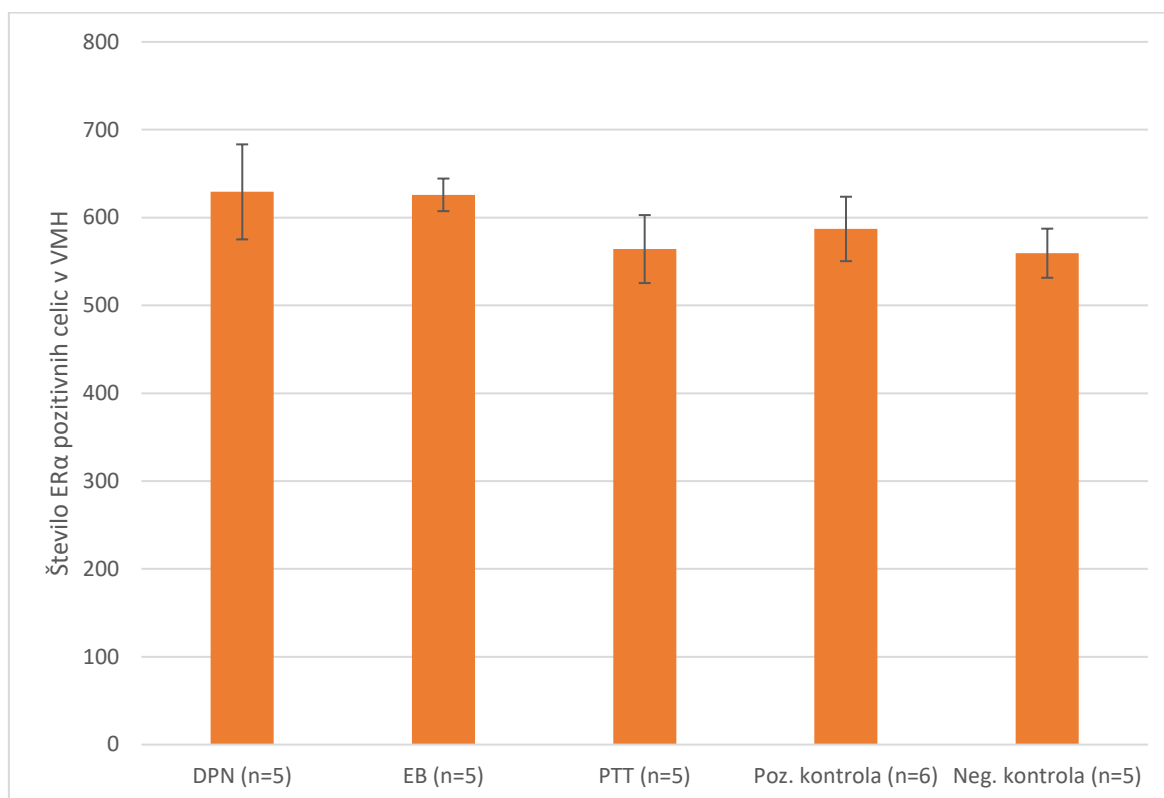


Slika 5: LQ v štirih zaporednih testih, povprečna vrednost. LQ je statistično pomembno naraščal ($p < 0,05$) s ponovitvami testov, ni pa dosegel statistično pomembnih razlik med posameznimi skupinami.

Legenda:

DPN – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. – 25. dnevom prejemale DPN
EB – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale EB
PTT – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale PTT

Poz. kontrola – samice, ki so bile ovariektomizirane šele po puberteti (60. dan) in so med 15. in 25. dnevom prejemale olje.
Neg. kontrola – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale olje



Slika 6: Število ERα pozitivnih celic v VMH pri posameznih skupinah živali, povprečna vrednost ± standardna napaka. Razlike med skupinami niso bile statistično pomembne.

Legenda:

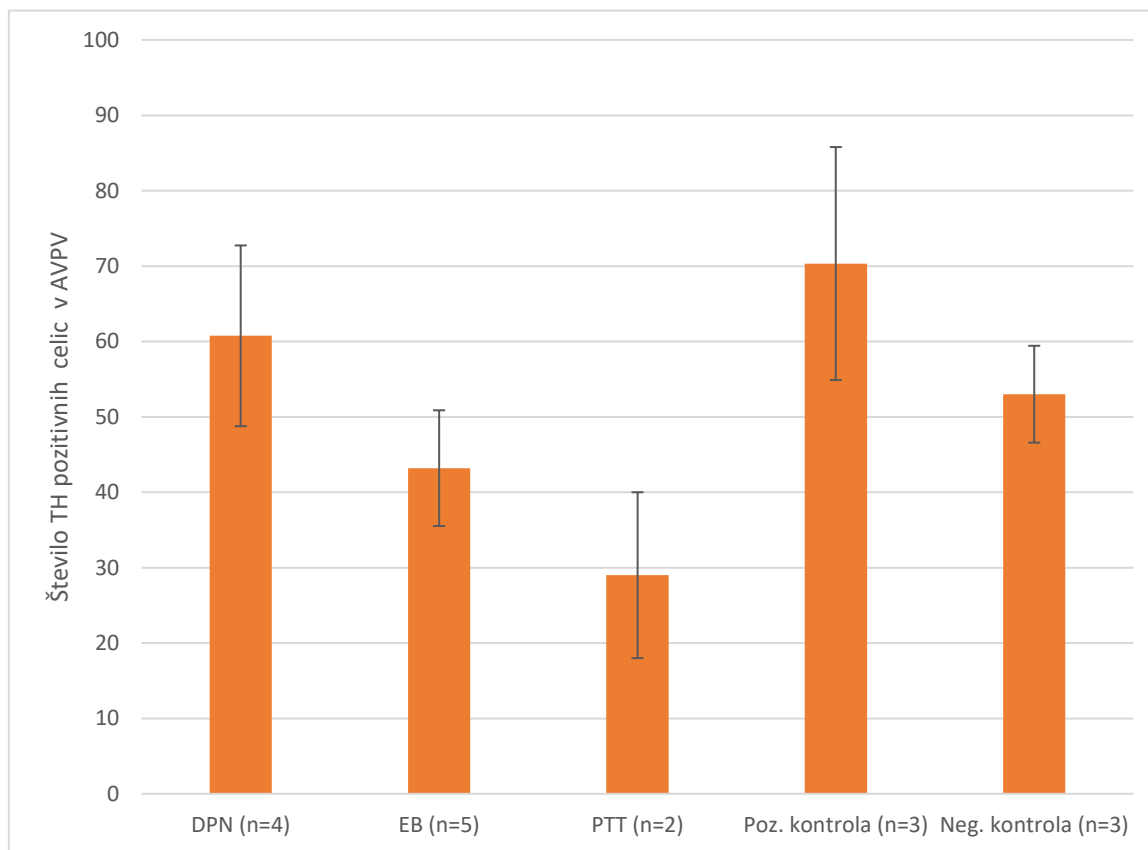
DPN – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. – 25. dnevom prejemale DPN

EB – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale EB

PTT – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale PTT

Poz. kontrola – samice, ki so bile ovariektomizirane šele po puberteti (60. dan) in so med 15. in 25. dnevom prejemale olje.

Neg. kontrola – samice, ki so bile ovariektomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale olje



Slika 7: Število TH pozitivnih celic v AVPV pri posameznih skupinah živali, povprečje $\pm$ standardna napaka. Razlike med skupinami niso bile statistično pomembne.

Legenda:

DPN – samice, ki so bile ovariectomizirane 10. dan in med 15. – 25. dnevom prejemale DPN

EB – samice, ki so bile ovariectomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale EB

PTT – samice, ki so bile ovariectomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale PTT

Poz. kontrola – samice, ki so bile ovariectomizirane šele po puberteti (60. dan) in so med 15. in 25. dnevom prejemale olje.

Neg. kontrola – samice, ki so bile ovariectomizirane 10. dan in med 15. in 25. dnevom prejemale olje

5. RAZPRAVA

Natančni mehanizem vpliva estrogenih hormonov na feminizacijo možganov še ni popolnoma raziskan. V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, ali so estrogeni hormoni v obdobju pred puberteto pomembni za feminizacijo možganov in ali ta proces poteka specifično preko receptorjev ER α , ER β ali preko vseh signalnih poti, ki jih lahko aktivira glavni estrogeni hormon, E2. Feminizacijo možganov smo želeli preveriti z vrednotenjem izražanja ženskega spolnega obnašanja (lordozo) in številom TH in ER α pozitivnih celic v AVPV in VMH. Mišjim samicam smo 10. dan po rojstvu odstranili jajčnike in nato od 15. do 25. dneva starosti dodajali snovi, ki aktivirajo različne signalne poti estrogenih hormonov EB, PTT, DPN. Poleg treh naštetih skupin smo imeli tudi dve kontrolni skupini. Negativni kontroli smo odstranili jajčnike 10. dan po rojstvu, pozitivni kontroli pa po puberteti, 60. dan starosti. Obema smo od 15. do 25. dneva starosti dodajali nosilec, koruzno olje. Pri negativni kontroli smo predvidevali, da bo feminizacija najšibkejša ali pa je sploh ne bo, medtem ko smo pri pozitivni kontroli pričakovali normalen potek feminizacije. Pričakovali smo, da bodo samice, ki so prejele EB, PTT in DPN kazale večji koeficient lordoze, ki kaže na boljšo spolno sprejemljivost in izražale večje število TH in ER α pozitivnih v AVPV in VMH, v primerjavi z negativno kontrolno skupino, kateri so bili odstranjeni jajčniki pred puberteto in je prejela zgolj olje, vendar pa med skupinami nismo ugotovili statistično pomembnih razlik. Prav tako se pozitivna kontrola ni razlikovala od ostalih skupin. Ena od možnih razlag je, da estrogeni hormoni niso ključni za razvoj ženskega spolnega obnašanja (lordoze) v obdobjih, ki smo jih raziskovali v raziskavi.

Že Gerall in sod. (1973) niso opazili razlik pri koeficientu lordoze med skupinami miši, ki so jim jajčnike odstranili v različnih obdobjih (1., 5., 10., 35., in 60. dan po rojstvu), podobno pa sta ugotovila že Whalen in Edwards (1967), ki nista odkrila statistično pomembnih razlik v koeficientu lordoze med neonatalno ovariektomiziranimi mišmi in mišmi, ki so jim jajčnike odstranili po puberteti. Kljub vsemu, v istem obdobju raziskava, ki jo je opravila Kenney (1970) ugotavlja, da odstranitev jajčnikov prvi dan po rojstvu statistično pomembno zmanjša spolno receptivnost samic podgan v primerjavi z odstranitvijo jajčnikov 40 dni po rojstvu. Razlike med našo raziskavo in omenjenimi raziskavami bi lahko izhajale iz razlik med podganami in mišmi. Čeprav je veliko fizioloških procesov pri podgani in miši precej podobnih, pa je pri primerjanju

tovrstnih rezultatov potrebna previdnost. Na področju spolne diferenciacije na primer ugotavljajo, da je neonatalna izraženost receptorjev za progesteron na področju VMH pri miših spolno različna, medtem ko to ne drži za podgane (Quadros in Wagner 2008). Dodatno Burns-Cusato in sod. (2004) ugotavljajo, da so nekatera spolna vedenja pri samcih različno odvisna od izpostavljenosti spolnim hormonom v kritičnih obdobjih razvoja, ne samo pri podganah in miših, temveč tudi pri različnih linijah miši.

Ena izmed možnosti je, da obdobje pred puberteto, torej med 15. – 25. dnevom, ki smo ga raziskali v naši študiji, ni ključno za aktivno feminizacijo. Kritično obdobje le-te je še vedno predmet debat. Nekatere raziskave kažejo, da bi lahko bilo pomembno obdobje pubertete, ki se pri miših začne okoli 35. dneva starosti in v katerem imajo hormoni spolnih žlez spolno specifične vplive na vedenje osebkov in strukturo možganov (Stewart in Cygan, 1980; Schulz in Sisk, 2016; Juraska in sod., 2013). Kercmar in sod. (2014a) so ugotovili, da ima že kratkotrajna izolacija med puberteto lahko močan vpliv na slabše izražanje lordoze. Spolno obnašanje so preverjali pri samicah, ki so bile izolirane od 25. dneva naprej, samicah, ki so bile izolirane od 25.-60. dneva in pri samicah, ki so ves čas bivale v skupini (socializirane samice). Socializirane samice so imele višje LQ v primerjavi z obema izoliranimi skupinama in tudi ponovna socializacija v obdobju odraslosti ni bila zadostna za izboljšanje lordoze pri izoliranih samicah. V isti študiji so ugotovili tudi povečano izražanje celic pozitivnih na ER α v VMH pri obeh skupinah izoliranih samic v primerjavi z socializirano skupino. Podobne ugotovitve navajata tudi Blaustein in Ismail (2013), ki sta ugotovila, da so miši, ki so bile transportirane bodisi v četrtem, petem ali šestem tednu starosti, izražale nenormalni odziv na E2 in progesteron v obdobju odraslosti, medtem ko je bil odziv miši, ki so bile transportirane v sedmem tednu, popolnoma normalen, kar je vodilo do zaključka, da obstaja občutljivo obdobje, med katerim je stres izrazito vplival na spolno obnašanje živali, v odgovor na aplikacijo E2 in progesterona. Dodatno so pri živalih, ki so bile transportirane v četrtem ali šestem tednu starosti preučili tudi izražanje celic pozitivnih na ER α v področju VMH. Število celic je bilo zmanjšano pri živalih, ki so bile transportirane šesti teden, kar nakazuje tudi na biokemijsko podlago za opažano spremembo v obnašanju. Zanimivo pa Kercmar in sod. (2014b) ne ugotavljajo pomembnih razlik v lordozi med samicami, ovariektomiziranimi pred puberteto, in samicami, ovariektomiziranimi po puberteti, medtem ko ugotavljajo razlike v materinskem obnašanju med

obema skupinama. Odstranitev jajčnikov pred puberteto namreč značilno poslabša starševsko vedenje v primerjavi s samicami, kjer so bili jajčniki med puberteto prisotni.

V naši raziskavi so miši iz vseh skupin kazale nizek koeficient lordoze. Test ženskega spolnega obnašanja smo v našem laboratoriju izvedli že v preteklosti (Grgurevic in sod., 2012). V navedeni raziskavi so Grgurevic in sod. (2012) ugotovili, da so samice, ovariectomizirane v odraslem obdobju, dosegle v povprečju nekaj manj kot 0,4 LQ v štirih testih obnašanja, medtem ko so samice v naši raziskavi dosegle v povprečju le 0,2 LQ. V omenjeni raziskavi je bilo opravljenih sedem ponovitev testa in LQ teh samic je naraščal tudi po četrtem testu ter dosegel v sedmem testu v povprečju 0,8 LQ. Podobne rezultate so dobili tudi v raziskavi Kercmar in sod. (2014a), kjer so samice opazovali le v petih ponovitvah testa, v četrti ponovitvi pa so kontrolne živali dosegle LQ 0,6. Tudi v naši raziskavi smo opazili naraščanje LQ z nadaljnjimi ponovitvami testa, zato je možno, da bi se razlike lahko pokazale šele s ponovitvami testa, vendar, čeprav statistično nepomembno, pa je bilo to naraščanje presenetljivo bolj očitno pri DPN skupini in negativni kontroli, pri kateri smo pričakovali najslabše izražanje lordoze. Najbolj nas je presenetil rezultat LQ pri pozitivni kontroli, kjer smo samicam odstranili jajčnike šele v odraslem obdobju. Le ena samica iz te skupine je kazala spolno dovzetnost, ki je omogočala samcu kopulacijo. Prav tako je do ejakulacije samca prišlo le pri štirih samicah iz skupin DPN, EB, PTT in iz negativne kontrole, ne pa pri pozitivni kontroli. Samci so skupno ejakulirali le v štirih testih, kar je nenavadno pri testiranju ženskega spolnega obnašanja. Glede na navedeno menimo, da je v naši raziskavi prišlo do nepričakovanih vplivov, ki bi lahko zmotili normalni potek feminizacije in s tem izražanje lordoze še posebno pri samicah pozitivne kontrole, pri katerih smo pričakovali normalno žensko spolno obnašanje. Ta dejavnik bi lahko predstavljal stres, za katerega so že v številnih raziskavah ugotovili, da vpliva na obnašanje živali (Holson in sod., 1995; Palanza in sod., 2001; Dadomo in sod., 2018). Predpostavljamo, da je operativni poseg 10. dan po rojstvu in injiciranje vsak drugi dan od 15. do 25. dneva starosti predstavljal stres tako za mamo kot tudi za mladiče. Čeprav samice iz pozitivne kontrole niso bile ovariectomizirane, pa so bile prav tako kot živali iz ostalih skupin podvržene primerljivemu operativnemu postopku - pod anestezijo smo na ledvenem področju na vsaki strani naredili zarezo v kožo in potrebušnico ter vsako posebej zašili. Še več, ponovni operaciji odstranitve jajčnikov so bile podvržene po puberteti. Možno je, da so samice pozitivne kontrole zaradi dveh operativnih posegov doživele veliko večji stres kot samice ostalih skupin in da je

ravno to vplivalo na tako slabo izražanje lordoze. Edini način, da bi lahko to teorijo potrdili bi bil, da bi v raziskavo vključili skupino miši na katerih se ne bi opravljalo nobenih posegov. Za natančnejšo določitev glavnega stresorja, ki bi lahko vplival na rezultate, bi poleg skupine na kateri ne bi opravljali nobenih posegov, lahko vključili še eno skupino, pri kateri bi se opravila zgolj navidezna ovariektomija, ne pa tudi ponavljajoča injiciranja in eno, kjer bi opravili ponavljajoče aplikacije olja, ne pa tudi ovariektomije. Rhees in sod. (2001) so pri podganah ugotovili, da je ločitev od matere v neonatalnem obdobju pri samcih povzročila spremembe v spolnem obnašanju in sicer manjši procent naskokov in daljšo latenco do prvega naskoka in koitusa. Pri samicah sicer niso ugotovili sprememb v spolnem obnašanju, je pa prišlo do razlik v nivoju kortikosterona, ki je po izpostavitvi stresorju ostal višji kot pri kontrolnih živalih. Podobno navajata tudi Tsuda in Ogawa (2012), ki sta ugotovila, da neonatalna ločitev od matere pri ovariektomiziranih miših povzroči dolgotrajne spremembe v socialnem obnašanju in poveča obnašanje, podobno anksioznosti. Neonatalni stres bi lahko na feminizacijo vplival preko epigenetskih mehanizmov kot sta DNA metilacija in preoblikovanje histonov, ki uravnavajo ekspresijo genov. Murgatroyd in sod. (2009) so na primer ugotovili, da ločitev od matere v neonatalnem obdobju povzroči povišan nivo kortikosterona in spremembe v procesiranju stresa in spomina v primerjavi s kontrolnimi mišmi, kar je bilo povezano z DNA hipometilacijo pomembne regije promotorja arginin vasopresina (AVP) in je povzročilo povišano izražanje AVP v nevronih, povečano aktivnost HPG osi in spremembe v obnašanju. Tudi zgoraj omenjena raziskava, ki sta jo opravila Blaustein in Ismail (2013), ugotavlja, da bi transport živali v določenem obdobju lahko predstavljal stres, ki ima trajen vpliv na razvoj spolnih razlik v možganih. Ista skupina raziskovalcev je preučevala, ali bi lahko imeli tudi drugi stresorji podobne učinke, pri čemer so raziskali mnoge stresorje, kot je omejevanje hrane, svetlobe ali toplote, a rezultati niso bili ponovljivi. Šele, ko so mišim injicirali bakterijski endotoksinlipopolisaharid, so opazili podoben vzorec. Miši, ki so jim endotoksin injicirali četrty, peti ali šesti teden, so izražale slabše spolno obnašanje kot kontrolne živali. Smiselno je torej sklepati, da imajo samo določeni stresorji skupno etiologijo, ki pripelje do podobnih rezultatov. Poleg samega kirurškega postopka, ki bi lahko predstavljal stres za poskusne samice, pa bi lahko na razvoj možganov vplivala tudi anestezija, saj so negativne učinke le-te v neonatalnem obdobju dokazali že v različnih študijah. Samci so zaradi vplivov anestetikov kazali anksioznosti podobne vedenjske vzorce, pri samicah pa je prišlo predvsem do okvar v prostorskem spominu (Cabrera in sod., 2020). Anestetiki so lahko nevrotoksični za razvijajoče

se možgane, saj na primer ketamin pri mladičih glodavcev povzroči nevrodegeneracijo preko aktivacije apoptoze (Cabrera in sod., 2017), podoben učinek pa imajo tudi vse učinkovine, ki aktivirajo GABA receptorje, kot je tudi isofluran, ki smo ga uporabili pri naši raziskavi (Jevtovic-Todorovic in sod., 2003). Dodatno lahko glede na velikost standardnih napak opazimo, da je med živalmi velika variabilnost znotraj posameznih skupin, k čemer so lahko prispevali različni, težko določljivi dejavniki tekom poskusa.

Kot že omenjeno, smo se v tej raziskavi osredotočili tudi na izražanje feminizacije možganov preko števila TH pozitivnih celic v AVPV in ER α pozitivnih celic v VMH. Tudi pri analizi možganov nismo dobili statistično pomembnih razlik med skupinami. Čeprav je bilo končno število živali pri analizi TH v AVPV v nekaterih skupinah premajhno, da bi podali dokončne zaključke, pa tudi pri ER α v VMH nismo dobili statistično pomembnih razlik. Vse skupine samic so imele podobno število ER α pozitivnih celic v VMH, kar se ujema z rezultati ženskega spolnega obnašanja. Že zgoraj omenjene raziskave namreč ugotavljajo povezavo med izraženostjo ER α v VMH in lordozo (Blaustein in Ismail, 2013; Kercmar in sod., 2014a). Estrogeni hormoni kontrolirajo številne nevrokemične povezave v možganih, ki vplivajo na žensko spolno obnašanje, kar pomeni, da zagotovo obstajajo še dodatne signalne poti, ki v naši študiji niso bile zajete. V nadaljnjih raziskavah bi bilo zanimivo vključiti še druge markerje, kot je na primer kisspeptin, ki je znana tarča spolnih hormonov tako pri živalih moškega kot tudi ženskega spola (Oakley in sod., 2009). Nevroni, pozitivni na kisspeptin, domnevno sodelujejo pri sprožitvi preovulatornega vrha LH pri samicah, saj so ključni za uravnavanje delovanja gonadotropin sproščujočih nevronov pri vretenčarjih (Dungan in sod., 2006; Pinila in sod., 2012). Še ena smiselna možnost nadaljnjih raziskav je melanokortinski sistem. Gelez in sod. (2010) so ugotovili, da je število nevronov, pozitivnih na melanokortin-4 receptor, v možganih glodavcev statistično pomembno večje pri samicah v primerjavi s samci, prav tako pa je bilo pri ljudeh ugotovljeno, da ima melanotan II vlogo pri spolni funkciji – poveča namreč erektilno aktivnost pri moških in poviša nivo spolnega poželenja pri ženskah (Hadley, 2005). Dodatno bi bilo v raziskavo smiselno vključiti tudi receptor za progesteron, saj so študije v preteklosti pokazale, da lahko spolno obnašanje najbolj zanesljivo sprožimo z aplikacijo E2, ki mu sledi aplikacija progesterona, še več, ugotovljeno je bilo, da je slednji ob omejenih količinah E2 celo ključen za popolno receptivnost samic (Boling in Blandau, 1939; Lisk, 1969; Rubin in Barfield, 1983). Brown in Blaustein (1984) sta dokazala, da se je z aplikacijo antagonista receptorja za

progesteron močno zmanjšala izraženost lordoze pri morskih prašičkih, kar nakazuje, da progesteron preko delovanja na progesteronske receptorje v možganih vpliva na spolno obnašanje pri morskih prašičkih. Grgurevic in sod. (2012) so ugotovili spolno razliko med izraženostjo celic, pozitivnih na progesteronski receptor na področju VMH, na katero je vplivala prisotnost spolnih kromosomov. V isti raziskavi je bil receptor za progesteron bolje izražen pri skupinah živali, ki so imele boljšo lordozo. Znano je, da je receptor za progesteron bolje izražen pri odraslih samicah kot pri samcih tako pri miših, kot pri podganah, ter da je to izražanje uravnavano preko ER α (Wagner in sod., 2001; Qudaros in sod., 2002; Quadros in Wagner, 2008; Grgurevic, 2012). Zanimivo bi bilo torej raziskati, ali je izraženost receptorjev za progesteron odvisna od izpostavitve estrogenim hormonom v različnih obdobjih razvoja možganov tudi v naši raziskavi in ali obstaja povezava med številom le-teh in ženskim spolnim obnašanjem (lordozo). V to smer kaže tudi študija, ki so jo opravili Frye in sod. (2014), kjer so ugotovili, da je utišanje izražanja receptorjev za progesteron v ventralnem tegmentalnem področju srednjih možganov pri miših povzročilo slabše izražanje lordoze in povečalo agresijo do samcev.

Potrebne bi bile še nadaljnje raziskave, da bi skušali odkriti nepredvideni faktor, ki je v naši raziskavi vplival na aktivno feminizacijo, ter določiti skupno etiologijo, ki je tudi v drugih raziskavah prinesla podobne rezultate (Blaustein in Ismail, 2013). Pri tem bi se bilo potrebno osredotočiti predvsem na natančno obdobje, v katerem bi imel tak dejavnik največjo vlogo, mehanizme, preko katerih deluje in ali je njegovo delovanje spolno specifično. Razumevanje spolno specifičnih razlik in natančnega poteka aktivne feminizacije ima velik pomen za razumevanje razlik med spoloma pri razvoju določenih bolezenskih stanj in odziva na nekatere farmakološke spojine. V preteklosti je bila pogosta neustrezna uporaba le enega spola v znanosti; sesalci ženskega spola so bili pogosto zanemarjeni v znanstvenih raziskavah in čeprav je nacionalni inštitut za zdravje (NIH) vpeljal obvezno vključevanje žensk v klinične poskuse na ljudeh, pa le-to ne obstaja pri raziskavah na drugih vrstah (Beery in Zucker, 2011). Izključevanje enega spola lahko tako vodi v pristranske oz. nepopolne zaključke. Boljše razumevanje dejavnika, ki je v našem primeru najverjetneje vplival na rezultate, bi posredno nudilo še dodatni vpogled v natančne mehanizme aktivne feminizacije.

6. SKLEPI

Na osnovi rezultatov naše raziskovalne naloge smo prišli do sledečih sklepov:

- Z vidika ženskega spolnega obnašanja lahko rečemo, da naša raziskava ni niti potrdila niti ovrgla nobene od hipotez, ki smo si jih postavili. Ženskega spolnega obnašanja nismo uspeli spodbuditi z aktivacijo katerekoli signalne poti estrogenih hormonov. Po vsej verjetnosti je na žensko spolno obnašanje v naši raziskavi vplival neznan dejavnik, ki ga nismo predvideli.
- Z vidika izražanja beljakovin v možganih lahko zaključimo dvoje; da izraženost ER α in TH nista odvisna od aktivne feminizacije v obdobju, ki smo ga preučevali, ali pa so drugi dejavniki prekrili razlike, ki bi lahko nastale zaradi aktivacije različnih signalnih poti estrogenih hormonov.
- Neznani dejavniki, ki so lahko vplivali na naše rezultate, bi lahko bili različni stresorji, katerim so bile izpostavljene poskusne živali. Tak stresor bi lahko predstavljalo injiciranje spojin v zgodnjem obdobju razvoja in operativni posegi.
- Raziskavo bi lahko izboljšali, če bi vključili kontrolno skupino pri kateri se ne bi opravilo nobenih posegov, skupino na kateri bi opravili zgolj injiciranje koruznega olja in skupino pri kateri bi opravili zgolj navidezno ovariektomijo, da bi lahko določili glavni negativni dejavnik, ki bi lahko vplival na naše rezultate. Poleg tega bi bilo zaželeno tudi uporabiti večje število živali v posameznih skupinah.

7. POVZETEK

Razlike med moškim in ženskim spolom so prisotne tako na nivoju strukture kot tudi na nivoju delovanja. Razvijejo se pod vplivom genetskih in hormonalnih dejavnikov v procesu spolne diferenciacije. Pri moškem spolu testosteron omogoča maskulinizacijo in defeminizacijo možganov, medtem ko naj bi pri ženskem spolu feminizacijo in demaskulinizacijo možganov uravnavali estrogenski hormoni. Natančni mehanizem vpliva estrogenskih hormonov na feminizacijo možganov še ni popolnoma raziskan. V naši raziskavi smo zato želeli ugotoviti, ali so estrogenski hormoni v obdobju pred puberteto pomembni za feminizacijo možganov in ali ta proces poteka specifično preko receptorjev ER α , ER β ali preko vseh signalnih poti, ki jih lahko aktivira E2. Feminizacijo možganov smo želeli preveriti z merjenjem izražanja ženskega spolnega obnašanja (lordozo) in številom TH in ER α pozitivnih celic v spolno različnih področjih, AVPV in VMH. Mišjim samicam smo 10. dan po rojstvu odstranili jajčnike in nato od 15. do 25. dneva starosti dodajali snovi, ki aktivirajo različne signalne poti estrogenskih hormonov in jih razdelili na skupine: EB, PTT, DPN, negativna kontrola, ki je prejela zgolj koruzno olje in pozitivna kontrolna skupina, ki je prav tako prejela koruzno olje, a smo živalim v tej skupini odstranili jajčnike šele po puberteti (60. dan starosti). S pozitivno kontrolo smo želeli preveriti ali je prisotnost jajčnikov v celotnem obdobju razvoja, od rojstva do odrasle dobe, nujna za popolno feminizacijo možganov. Med skupinami nismo odkrili statistično pomembnih razlik, kar bi lahko pomenilo, da estrogenski hormoni nimajo trajnega učinka na TH in ER α v AVPV in VMH ter na spolno obnašanje samic v obdobju, ki smo ga raziskovali. Dejstvo, da pri pozitivni kontroli samic nismo dobili pričakovane spolne sprejemljivosti, kaže na možnost, da so na rezultate naše raziskave vplivali tudi drugi dejavniki, katerih učinkov nismo predvideli. Po vsej verjetnosti bi to lahko bili stresni dejavniki, katerim so bile izpostavljene samice v zgodnjem obdobju razvoja. To bi bilo potrebno preučiti v nadaljnjih raziskavah.

8. SUMMARY

Differences between the male and female sex are present at both the structural and functional levels. They develop under the influence of genetic and hormonal factors during the process of sexual differentiation. In males, testosterone enables masculinization and defeminization of the brain, while in females, estrogen hormones are believed to regulate feminization and demasculinization of the brain. The precise mechanism of how estrogen hormones influence brain feminization is not yet fully understood. In our study, we aimed to determine whether estrogen hormones are important for brain feminization during the pre-pubertal period and whether this process specifically occurs through the ER α and ER β receptors or through all signaling pathways activated by E2. To assess brain feminization, we measured the expression of female sexual behavior (lordosis) and the number of TH and ER α positive cells in sexually distinct areas, AVPV and VMH. We removed the ovaries from female mice on the 10th day after birth and then administered substances that activate various estrogen hormone signaling pathways from day 15 to day 25 of age. We divided them into groups: EB, PTT, DPN, negative control (receiving only corn oil), and positive control (also receiving corn oil but with ovaries removed after puberty on the 60th day of age). The positive control group was intended to determine whether the presence of ovaries throughout the entire developmental period, from birth to adulthood, is necessary for complete brain feminization. Among the groups, we did not find statistically significant differences, which could imply that estrogen hormones do not have a lasting effect on TH and ER α in AVPV and VMH, nor female sexual behavior during the studied period. The fact that we did not observe the expected sexual receptivity in the positive control group suggests the possibility that other factors, which we did not anticipate, might have influenced the results of our study. Likely, stress factors to which the females were exposed during early development could have played a role. This would need to be examined in further research.

9. ZAHVALE

Na prvem mestu bi se rada zahvalila svoji mentorici doc. dr. Neži Grgurevič za njeno pomoč in potrpežljivost ob mojih prvih korakih v svet raziskovalnega dela. Res sem hvaležna za vso usmerjanje med pisanjem te naloge, za vzpodbudne besede in pa tudi za vse nasvete, ki jih bom vsekakor skušala upoštevati pri mojem nadaljnjemu delu. Dodatno bi se rada zahvalila tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za genomiko živali, ki so mi nemalokrat priskočili na pomoč v laboratoriju, še posebej pa gre zahvala Sari Prošek za njeno pomoč pri izvedbi praktičnega dela.

Iskrena hvala tudi g. Stanislavi Ujc za njen hiter in natančen pregled literature.

Iz srca se zahvaljujem tudi svoji družini za njihovo neomajno podporo in da so vedno moji največji navijači. Prav tako se zahvaljujem svojim prijateljem, še posebej pa Lavri in Paulini za tiste prave pogovore v ključnih trenutkih. In na koncu, a ne najmanj pomembno, bi se rada zahvalila tudi Alešu, brez katerega tale naloga verjetno nikoli ne bi ugledala luči sveta.

10. LITERATURA

1. Alshammari TK. Sexual dimorphism in pre-clinical studies of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2021; 105: e110120 (10 str.)

doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.110120
2. Appelman Y, van Rijn BB, Ten Haaf ME, Boersma E, Peters SA. Sex differences in cardiovascular risk factors and disease prevention. *Atherosclerosis* 2015; 241(1): 211–8.
3. Arai Y, Sekine Y, Murakami S. Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. *Neurosci Res* 1996; 25: 403–7.
4. Arendash GW, Gorski RA. Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. *Brain Res Bull* 1983; 10(1): 147–54.
5. Arevalo, MA, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Actions of estrogens on glial cells: implications for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2015; 1840(9): 2496–500.
6. Bakker J, Baum MJ. Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29(1): 1–16.
7. Bakker J, De Mee C, Douhard Q, et al. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat Neurosci* 2006; 9(2): 220–6.
8. Bakker, J, Pierman, S, González-Martínez, D. Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav* 2010; 57(4/5): 390–5.
9. Baum, MJ, Carroll, RS, Cherry, JA, Tobet, SA. Steroidal control of behavioural, neuroendocrine and brain sexual differentiation: studies in a carnivore, the ferret. *J Neuroendocrinol* 1990;2(4): 401–18.

10. Berthold AA. On the transplantation of the testes. *Arch Anat Physiol Wiss Med.* 1849:42–6.
11. Beery AK, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35(3): 565–72.
12. Biswas PG, Steffi A, Sundharam S. Sex Determination and Sex Differentiation. *J Forensic Dent Sci* 2021; 2(1): 72–8.
13. Blaustein JD, Ismail N. Enduring influence of pubertal stressors on behavioral response to hormones in female mice. *Horm Behav.* 2013; 64(2): 390–8.
14. Boling, JL., Blandau, RJ. The Estrogen-Progesterone induction of mating responses in the spayed female rat. *Endocrinology* 1939; 25(3): 359–64.
15. Boon WC, Chow, JD, Simpson, ER, Clyne CD. The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase. *Prog Brain Res* 2010; 181: 209–32.
16. Brown TJ, Blaustein JD. Inhibition of sexual behavior in female guinea pigs by a progesterone receptor antagonist. *Brain Res.* 1984; 301(2): 343–9.
17. Burns-Cusato M, Scordalakes EM, Rissman EF. Of mice and missing data: what we know (and need to learn) about male sexual behavior. *Physiol Behav* 2004; 83(2):217-32.
18. Cabrera OH, Gulvezan T, Symmes B, Quillinan N, Jevtovic-Todorovic V. Sex differences in neurodevelopmental abnormalities caused by early-life anaesthesia exposure: a narrative review. *Br J Anaesth* 2020; 124(3): e81–e91.

doi: 10.1016/j.bja.2019.12.032
19. Cabrera OH, O'Connor SD, Swiney BS, et al. Caffeine combined with sedative/anesthetic drugs triggers widespread neuroapoptosis in a mouse model of prematurity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017; 30(22): 2734–41.
20. Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. Sexual Differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19(4): 323–62.
21. Dadomo, H, Gioiosa, L, Cigalotti, J, Ceresini, G, Parmigiani, S, Palanza, P. What is stressful for females? Differential effects of unpredictable environmental or social stress in CD1 female mice. *Horm Behav* 2018; 98: 22–32.

22. Dalla C, Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z, Balthazart J, Bakker J. Oestrogen-deficient female aromatase knockout (ArKO) mice exhibit depressive-like symptomatology. *Eur J Neurosci* 2004; 20(1): 217–28.
23. Davis EC, Popper P, Gorski RA. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res* 1996; 734(1/2): 10–8. (a)
24. Davis EC, Shryne JE, Gorski RA. Structural sexual dimorphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. *Neuroendocrinology* 1996; 63(2): 142–8. (b)
25. Dodd LD, Nowak E, Lange D, et al. Active feminization of the preoptic area occurs independently of the gonads in *Amphiprion ocellaris*. *Horm Behav* 2019; 112:65–76.
26. Döhler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, Gorski RA. Pre- and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain Res* 1984; 302(2): 291–5.
27. Dörner G, Staudt J.(1969). Structural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinology* 1969; 4(4/5): 278–81.
28. Dungan, HM, Clifton, DK, Steiner, RA. Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2006; 147(3): 1154–8.
29. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000; 127(19): 4277–91.
30. Enmark, E, Gustafsson, JA. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* 1999; 246(2): 133–8.
31. Fisher DW, Bennett DA, Dong H. Sexual dimorphism in predisposition to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2018; 70: 308–24.

32. Frye CA, Walf AA, Kohtz AS, Zhu Y. Progesterone-facilitated lordosis of estradiol-primed mice is attenuated by knocking down expression of membrane progesterin receptors in the midbrain. *Steroids*. 2014; 81:17-25.
33. Fuentes N, Silveyra P. Chapter three: estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2019; 116: 135–70. DOI 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001
34. Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 2001; 63(1): 29–60.
35. Gelez, H, Poirier, S, Facchinetti, P, et al. Neuroanatomical distribution of the melanocortin-4 receptors in male and female rodent brain. *J Chem Neuroanat*. 2010; 40(4): 310–24.
36. Gerall, AA, Dunlap, JL, Hendricks, SE. Effect of ovarian secretions on female behavioral potentiality in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1973; 82(3): 449–65.
37. Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res* 1978; 148(2): 333–46.
38. Grgurevic N, Büdefeld T, Spanic T, Tobet SA, Majdic G. Evidence that sex chromosome genes affect sexual differentiation of female sexual behavior. *Horm Behav* 2012; 61(5): 719–24.
39. Grgurevic N. Testing the extreme male hypothesis in the valproate mouse model; sex-specific effects on plasma testosterone levels and tyrosine hydroxylase expression in the anteroventral periventricular nucleus, but not on parental behavior. *Front Behav Neurosci* 2023; 17: e1107226. (10 str.)

doi:10.3389/fnbeh.2023.1107226
40. Grgurevič N. Genetsko pogojene razlike med obnašanjem samcev in samic pri miših brez gena za steroidogeni faktor 1. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2011. Doktorska disertacija.
41. Grumbach MM, Auchus RJ. Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(12): 4677–94.
42. Hadley, ME. Discovery that a melanocortin regulates sexual functions in male and female humans. *Peptides* 2005; 26(10): 1687–9.

43. Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, et al. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 2000; 91(1-2): 403-7.
44. Hines M. Gonadal hormones and sexual differentiation of human brain and behavior. In: Adjan VV, Adkins-Regan E, Amdam GV, eds. *Hormones, brain and behavior*. Cambridge: Academic Press, 2017: 247–78. doi: 10.1016/b978-0-12-803592-4.00103-6
45. Holson, RR, Gough, B, Sullivan, P, Badger, T, Sheehan, DM. Prenatal dexamethasone or stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats. *Neurotoxicol Teratol* 1995; 17(4): 393–401.
46. Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, Hayashi S. Sexually dimorphic and estrogen-dependent expression of estrogen receptor β in the ventromedial hypothalamus during rat postnatal development. *Endocrinology* 2003; 144(11): 5098–104.
47. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 2003; 23(3): 876–82.
48. Juraska J, Sisk CL, DonCarlos LL. Sexual differentiation of the adolescent rodent brain: Hormonal influences and developmental mechanisms. *Horm Behav* 2013; 64:203–10.
49. Kenney, A. The Effects of neonatal androgen and duration of ovarian tenancy on reproductive behavior and physiology of the adult female rat. New Orleans : Tulane University, 1970. Doktorska disertacija
50. Kercmar J, Tobet SA, Majdic G. Social isolation during puberty affects female sexual behavior in mice. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: e337. (8 str.) doi:10.3389/fnbeh.2014.00337 (a)
51. Kercmar J, Snoj T, Tobet SA, Majdic G. Gonadectomy prior to puberty decreases normal parental behavior in adult mice. *Horm Behav* 2014; 66(4): 667–73. (b)
52. Khbouz B, Taziaux M, Court L, et al. Role for the membrane estrogen receptor alpha in the sexual differentiation of the brain. *Eur J Neurosci* 2019; 52(1): 2627–45.

53. Krege, JH, Hodgin, JB, Couse, JF et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95(26): 15677–82.
54. Kubiak JZ, Kloc M, Piprek RP. History of the research on sex determination. *Biomed J Sci Tech Res* 2020; 25(3): 19104– 12.
55. Lachelin Gillian CL. *Introduction to Clinical Reproductive Endocrinology: Sexual differentiation*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991: 36-41.
56. Lenz KM, Nugent, BM, McCarthy MM. Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. *Front Neurosci* 2012; 6: e26 (13 str.)

doi:10.3389/fnins.2012.00026
57. Lin D, Boyle MP, Dollar P, Lee H, Lein ES, Perona P, Anderson DJ. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature* 2011; 470(7333): 221–6.
58. Lisk RD. Progesterone: biphasic effects on the lordosis response in adult or neonatally gonadectomized rats. *Neuroendocrinology*. 1969; 5(3):149-60.

doi: 10.1159/000121857
59. Lubahn, DB, Moyer, JS, Golding, TS, Cous, JF, Korach, KS, Smithies, O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:11162–6.
60. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; 211(4488): 1294–302.
61. Makiyan Z. Studies of gonadal sex differentiation. *Organogenesis* 2016; 12(1): 42–51.
62. Micevych PE, Kelly MJ. Membrane estrogen receptor regulation of hypothalamic function. *Neuroendocrinology* 2012; 96(2): 103–10.
63. Micevych PE, Mermelstein PG. Membrane estrogen receptors acting through metabotropic glutamate receptors: an emerging mechanism of estrogen action in brain. *Mol neurobiol* 2008; 38(1) :66–77.

64. Mielke MM. Sex and gender differences in Alzheimer's disease dementia. *Psychiatr Times* 2018; 35(11): 14–7.
65. Murakami S, Arai Y. Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal androgen treatment. *Neurosci Lett* 1989; 102(2/3): 185–90.
66. Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y et al. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci* 2009; 12(12): 1559–66.
67. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol* 2014; 35(3): 347–69.
68. Northcutt KV, Wang Z, Lonstein JS. Sex and species differences in tyrosine hydroxylase-synthesizing cells of the rodent olfactory extended amygdala. *J Comp Neurol* 2006; 500(1):103–15.
69. Nottebohm F, Arnold A. Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science* 1976; 194(4261): 211–3.
70. Nugent, BM, Wright, CL, Shetty, AC et al. Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat Neurosci* 2015; 18(5): 690–7.
71. Oakley, AE, Clifton, DK, Steiner, RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009; 30(6):713–43.
72. Ogawa, S, Chan, J, Chester, AE, Gustafsson, JA, Korach, KS, Pfaff, DW. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (beta ERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96(22): 12887–92.
73. Ogawa, S, Taylor, JA, Lubahn, DB, Korach, KS, Pfaff, DW. Reversal of sex roles in genetic female mice by disruption of estrogen receptor gene. *Neuroendocrinology* 1996; 64(6): 467–70.
74. O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2004; 18(8): 1859-75.
75. Palanza, P, Gioiosa, L, Parmigiani, S. Social stress in mice. *Physiol Behav* 2001; 73(3): 411–20.

76. Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young W. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 1959; 65(3): 369–82.
77. Piferrer F. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Dev Dyn*. 2013 Apr;242(4):360-70.
78. Quadros PS, Goldstein AY, De Vries GJ, Wagner CK. Regulation of sex differences in progesterone receptor expression in the medial preoptic nucleus of postnatal rats. *J Neuroendocrinol*. 2002; 14(10):761-7.
79. Quadros PS, Wagner CK. Regulation of progesterone receptor expression by estradiol is dependent on age, sex and region in the rat brain. *Endocrinology*. 2008; 149(6):3054-61.
80. Raisman G, Field PM. Sexual dimorphism in the preoptic area of the rat. *Science* 1971; 173(3998): 731–3.
81. Rey R, Josso N, Racine C, et al. Sexual Differentiation. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, eds. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth: MDText.com, Inc 2000.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905232/> (2.3.2023)
82. Rhee RW, Lephart ED, Eliason D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behav Brain Res* 2001; 123(1): 1-10.
83. Rubin BS, Barfield RJ. Induction of estrous behavior in ovariectomized rats by sequential replacement of estrogen and progesterone to the ventromedial hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 1983;37(3):218–24.
84. Rubin JB, Lagas JS, Broestl L, et al. Sex differences in cancer mechanisms.

Biol Sex Differ 2020; 11(1): e17 (29 str.) doi:10.1186/s13293-020-00291-x.
85. Sacher J, Neumann J, Okon-Singer H, Gotowiec S, Villringer A. Sexual dimorphism in the human brain: evidence from neuroimaging. *Magn Reson Imaging* 2013;31: 366–75.
86. Sadler TW. *Langman's medical embryology*. 14th ed. Philadelphia; Wolters Kluwer, 2019: 267-276.

87. Schulz, KM, Sisk, CL. The organizing actions of adolescent gonadal steroid hormones on brain and behavioral development. *Neurosci Biobehav Rev* 2016; 70: 148–58.
88. Shah NM, Pisapia DJ, Maniatis S, Mendelsohn MM, Nemes A, Axel R. Visualizing sexual dimorphism in the brain. *neuron* 2004; 43(3): 313–9.
89. Shay, DA, Vieira-Potter, VJ, Rosenfeld, CS. Sexually dimorphic effects of aromatase on neurobehavioral responses. *Front Mol Neurosci* 2018; 11: e374 (12 str.)

doi: 10.3389/fnmol.2018.00374
90. Shi H, Kumar SPDS, Liu Xian. G. G Protein-coupled estrogen receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 114: 193–250.
91. Shughrue, PJ, Lubahn, DB, Negro-Vilar, A, Korach, KS, Merchenthaler, I. Responses in the brain of estrogen receptor disrupted mice. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94(20): 11008–12.
92. Simerly RB, Swanson LW, Handa RJ, Gorski RA. Influence of perinatal androgen on the sexually dimorphic distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 1985; 40(6): 501–10.
93. Simerly, RB, Zee, MC, Pendleton, JW, Lubahn, DB, Korach, KS. Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94(25): 14077–82.
94. Sobel V, Zhu YS, Imperato-McGinley J. Fetal hormones and sexual differentiation. *Obstet Gynecol Clin* 2004; 31(4): 837–56.
95. Soldin OP, Mattison DR. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48(3): 143–57.
96. Solum DT, Handa, RJ, Lorens SA. Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. *J Neurosci Res* 2003; 74(4): 530–41.
97. Sowell ER, Peterson BS, Kan E, Woods RP, Yoshii J, Bansal R, Xu D, Zhu H, Thompson PM, Toga AW. Sex differences in cortical thickness mapped in 176 healthy individuals between 7 and 87 years of age. *Cereb Cortex* 2007; 17(7): 1550–60.

98. Stephens SBZ, Rouse ML, Tolson KP et al. Effects of selective deletion of tyrosine hydroxylase from kisspeptin cells on puberty and reproduction in male and female mice. *eNeuro* 2017; 4(3): e0150-17.2017 (12 str.)

doi: 10.1523/ENEURO.0150-17.2017
99. Stewart, J, Cygan D. Ovarian hormones act early in development to feminize adult open-field behavior in the rat. *Horm Behav* 1980; 14(1): 20–32.
100. Swaab DF. Sexual differentiation of the brain and behavior. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 21(3): 431–44.
101. Swartz S, Soloff MS. The lack of estrogen binding by human α fetoprotein. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 39(3): 589–91.
102. Szadvari I, Ostatníková D, Durdiakova JB. Sex differences matter: males and females are equal but not the same. *Physiol Behav* 2023; 259: e114038. (9 str.)

doi: 10.1016/j.physbeh.2022.114038
103. Tsuda MC, Ogawa S. Long-lasting consequences of neonatal maternal separation on social behaviors in ovariectomized female mice. *PLoS One* 2012; 7(3): e33028 (11 str.)

doi: 10.1371/journal.pone.0033028
104. Wagner CK, Pfau JL, De Vries GJ, Merchenthaler IJ. Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor alpha expression. *J Neurobiol.* 2001; 47(3):176-82.
105. Whalen, RE, Edwards, DA. Hormonal determinants of the development of masculine and feminine behavior in male and female rats. *Anat Rec* 1967; 157: 173–80.
106. Yang CF, Chiang MC, Gray DG, et al. Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males. *Cell* 2013; 153(4): 896–909.
107. Zuloaga DG, Puts DA, Jordan CL, Breedlove SM. The role of androgen receptors in the masculinization of brain and behavior: what we've learned from the testicular feminization mutation. *Horm Behav.* 2008; 53(5): 613–26.

108. Zup SL, Forger NG. Hormones and sexual differentiation. In: Abbadie C, Abbadie GW, Absher JR, eds. Encyclopedia of the human brain. Cambridge: Academic Press, 2002: 323–41.