



Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za biologiju i ekologiju

Uloga glukokortikoida u cirkadijalnoj sinhronizaciji endokrine funkcije Leydig-ovih ćelija

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: prof. dr Tatjana Kostić

Kandidat: Marija Medar

Novi Sad, 2022.

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Марија Медар
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Татјана Костић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Улога глукокортикоида у циркадијалној синхронизацији ендокрине функције Leydig-ових ћелија
Језик публикације (писмо):	Српски језик (латиница).
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 126 Поглавља: 8 Референци: 261 Табела: 16 Слика: 32 Графикона: - Прилога: -
Научна област:	Биологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Физиологија животиња
Кључне речи / предметна одредница:	Глукокортикоиди, тестостерон, циркадијални ритам, стрес, Leydig-ове ћелије

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

<p>Резиме на језику рада:</p>	<p>Два система, циркадијални часовник и механизам одговора на стрес, кључни су за прилагођавање и одржавање динамичке равнотеже организма. Утицај стреса, посредован глукокортикоидима, у циркадијалној синхронизацији ендокриних функција Leydig-ових ћелија одраслих пацова праћен је кроз различите <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i> експерименталне моделе. Експериментални модели обухватили су примену стреса имобилизације (ИМО), у различитим циркадијалним временима, и различитом броју понављања, као и третман примене синтетичких глукокортикоида. Прецизније, ове студије су дизајниране да испитају (1) да ли је ефекат глукокортикоида на образац експресије гена часовника, гена повезаних са стероидогенезом, као и других гена од значаја за ендокрину функцију Leydig-ових ћелија, временски зависан, као и (2) да ли је зависан од типа стресног догађаја (акутни и поновљени стрес). У анализираним експерименталним моделима, утврђено је да је стрес генерално повећао ниво глукокортикоида и смањено ниво тестостерона у крви. Међутим, запажено је да је ефекат поновљеног стреса на нивоу тестостерона у крви најмање био изражен у тамној (активној) фази дана. Транскрипциона анализа гена је открила различиту осетљивост на стресне догађаје у зависности од циркадијалног времена: већина гена повезаних са стероидогенезом (<i>Lhcgr</i>, <i>Nr3c1</i>, <i>Cyp11a1</i>, <i>Cyp17a1</i>, <i>Hsd3b1/2</i>) показала је смањену експресију у неактивној (светлој) фази, док је у тамној фази дана, њихова експресија непромењена или чак стимулирана. Стрес је такође утицао и на експресију гена и протеина часовника и стимулисао експресију <i>Bmal1/BMAL1</i>, <i>Per1/2/PER1</i>. Третман пацова применом синтетичког глукокортикоида показао је сличан одговор као и ИМО третман. Анализа главних компоненти (РСА) показала је одсуство значајних разлика између третмана, посебно на <i>Per1</i> и <i>Rev-erba</i>. Овакви резултати су потврђени <i>ex vivo</i> третманом Leydig-ових ћелија хидрокортисон-ом и блокатором глукокортикоидног рецептора. Резултати указују да утицај глукокортикоидне компоненте одговора на стрес на активност Leydig-ових ћелија, зависи од времена и типа стреса, наглашавајући важност циркадијалне активности у подршци и одржавању хомеостазе продукције андрогена, а самим тим и плодности код мушкараца.</p>
<p>Датум прихватања теме од стране надлежног већа:</p>	<p>13.07.2017.</p>
<p>Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)</p>	
<p>Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)</p>	<p>Председник: др Силвана Андрић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан, ментор: др Татјана Костић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Соња Каишаревић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p>

	<p>Члан: др Звездана Којић, медицински факултет, Универзитет у Београду</p> <p>Члан: др Ана Ђорђевић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, Универзитет у Београду</p>
Напомена:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF SCIENCES

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Marija Medar
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Dr Tatjana Kostić, full professor, Faculty of Science, University of Novi Sad
Thesis title:	The role of glucocorticoids in circadian synchronization of endocrine functions of Leydig cells
Language of text (script):	Serbian language (Latin)
Physical description:	Number of: Pages: 126 Chapters: 8 References: 261 Tables: 16 Illustrations: 32 Graphs: - Appendices: -
Scientific field:	Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Animal physiology
Subject, Key words:	Glucocorticoids, testosterone, circadian rhythm, stress, Leydig cells
Abstract in English language:	Two systems, the circadian clock, and the stress response mechanism are key to adjusting and maintaining the body's dynamic balance. The influence of glucocorticoid-mediated stress in the circadian

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>synchronization of the endocrine function of adult rats Leydig cells monitored through various <i>in vivo</i> and <i>ex vivo</i> experimental models. The experimental models included the application of stress by immobilization (IMO), at different circadian times, and with a different number of repetitions, as well as the treatment with the use of synthetic glucocorticoids. Specifically, these studies are designed to examine (1) are the effects of glucocorticoids on the pattern of clock gene expression, steroidogenesis-related genes, and other genes relevant to Leydig cell endocrine function time-dependent, and (2) are the effects dependent on the type of stressful event (acute and recurrent stress). In the analyzed experimental models, it was found that stress generally increased glucocorticoid levels and decreased blood testosterone levels. However, it was noticed that the effect of repeated stress on the level of testosterone in the blood was the least pronounced in the dark (active) phase of the day. Transcriptional analysis of genes revealed different susceptibility to stressful events depending on circadian time: most genes associated with steroidogenesis (<i>Lhcgr</i>, <i>Nr3c1</i>, <i>Cyp11a1</i>, <i>Cyp17a1</i>, <i>Hsd3b1/2</i>) showed reduced expression in the inactive (light) phase, while in the active dark) the phase of the day, their expression unchanged or even stimulated. Stress also affected the expression of clock genes and proteins and stimulated the expression of <i>Bmal1/BMAL1</i>, <i>Per1/2/PER1</i>. Treatment of rats with synthetic glucocorticoids showed a similar response as IMO treatment. Principal component analysis (PCA) showed no significant differences between treatments, especially on <i>Per1</i> and <i>Rev-erb</i>. These results were confirmed by <i>ex vivo</i> treatment of Leydig cells with Hydrocortison and a glucocorticoid receptor blocker. The results indicate that the effect of the glucocorticoid component of the stress response on Leydig cell activity depends on the time and type of stress, emphasizing the importance of circadian activity in supporting and maintaining androgen homeostasis, and male fertility.</p>
Accepted on Scientific Board on:	13.07.2017.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: Dr. Silvana Andrić, full professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>Member, mentor: Dr. Tatjana Kostić, full professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>Member: Dr. Sonja Kaišarević, PhD, full professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>Member: Dr. Zvezdana Kojić, PhD, full professor, Faculty of Medicine, University of Belgrade</p> <p>Member: Dr. Ana Đorđević Prinipal Research Fellow, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade</p>
Note:	

Zahvalnica

Zahvalnost za izradu ove doktorske disertacije dugujem mentoru prof. dr Tatjani Kostić kao i prof. dr Silvani Andrić na celokupnom angažovanju i zalaganju.

Članovima komisije hvala na korisnim savetima i komentarima.

Svim sadašnjim i bivšim članovima katedre za Fizilogiju životinja, hvala, na lepoj i lakoj saradnji, razumevanju, torelanciji i podeljenom znanju.

Hvala kolegama i kolegamicama članovima Katedre za biohemiju, kao i ostalim zaposlenima na Departmanu za biologiju i ekologiju sa kojima sam svakodnevno sarađivala.

Studentima Departmana za biologiju i ekologiju hvala, što su bili moja inspiracija i motivacija za učenje i trud.

Hvala familiji i prijateljima koji su me razumeli i podržavali.

Milanu Župunskom hvala na svemu što delimo.

Najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima Ljubiši Medar i Vesni Medar, i roditeljima mojih roditelja, na ljubavi, požrtvovanju, vaspitanju i obrazovanju koje su mi pružili. Mom bratu Stefanu Medar, hvala što je uvek oslonac, podrška i zdrav razum. Mom bratu Jovici Medar hvala na inspiraciji.

Marija Medar,
April 2022. u Novom Sad

LISTA SKRAĆENICA

ACT β -aktin

ACTH adrenokortikotropni hormon (*engl. adrenocorticotropic hormone*)

APS amonijum persulfat (*engl. ammonium peroxidesulfate*)

ARC arkuatni nukleus (*engl. arcuate nucleus*)

AVP arginin vazopresin (*engl. arginine vasopressin*)

AVPV anteroventralni periventrikularni nukleus (*engl. anteroventral periventricular nucleus*)

bHLH-PAS (*engl. basic helix-loop-helix – Period-Arnt-Sim*)

BMAL1 (*engl. brain-muscle Arnt-like protein 1*)

BSA (*engl. bovine serum albumin*)

C nivo kortikosterona u krvi

CCG geni kontrolisani genima časovnika (*engl. core clock genes*)

cDNA (*engl. complementary DNA*)

CSNK/ CK kazein kinaza (*engl. casein kinase*)

CLOCK (*engl. circadian locomotor output cycles kaput*)

CRE (*engl. cAMP response element*)

CREB CRE vezujući protein (*engl. CRE binding protein*)

CRH kortikotropin oslobađajući hormon, CRF (*engl. Corticotropin-releasing hormone*)

CRY1/2 (*engl. cryptochrome 1/2*)

CYP11A1 citohrom P450, familija 11, subfamilija A, polipeptid 1; ranije poznat kao P450scc (*engl. cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme*)

CYP17A1 citohrom P450, familija 17, subfamilija A, polipeptid 1; ranije poznat kao P450c17 (*engl. cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20 lyase enzyme*)

CYP19A1 citohrom P450, familija 19, subfamilija A, polipeptid 1; (P450arom)

DBP (*engl. albumin D-element binding protein*)

DEC1/2 (*engl. differentiated embryo chondrocyte 1/2*)

DEPC (*engl. diethylpyrocarbonate*)

DHT dihidrotestosteron

DMEM (*engl. Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMN dorzomedijalni nukleus hipotalamusa (*engl. dorsomedial nucleus of the hypothalamus*)

DMSO dimetilsulfoksid (*engl. dimethylsulfoxide*)

DTT ditiotritol (*engl. dithiothreitol*)

E4BP4 (*engl. Nuclear factor, interleukin 3 regulated, NFIL3*)

EDTA (*engl. ethylene diamine tetraacetic acid*)

EtHO etanol

F (*engl. forward*)

FSH Folikulostimulirajući hormon (*engl. follicle stimulating hormone*)

GAPDH Glicerinaldehid3fosfat dehidrogenaza (*engl. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GC glukokortikoidi

GCR glukokortikoidni receptor

GHT Genikulo-hipotalamički trakt (*engl. Geniculo-hypothalamic tract*)

GnRH Gonadotropin oslobađajući hormon (*engl. Gonadotropin-releasing hormone*)

GPCR familija receptora čija je funkcija vezana za G proteine (*engl. G protein-coupled receptor*)

hCG humani horionski gonadotropin (*engl. human chorionic gonadotropine*)

HEPES (*engl. 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid*)

HPA Hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina (*engl. hypothalamic-pituitaryadrenal axis*)

HPG Hipotalamo -hipofizno-gonadalna osovina (*engl. hypothalamo-pituitarygonadal axis*)

HPT Hipotalamo-hipofizno-testikularna osovina (*engl. hypothalamo-pituitarytesticular axis*)

HSD17B Hidroksisteroid dehidrogenaza 17b (*engl. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase*)

HSD3B Hidroksisteroid dehidrogenaza 3b (*engl. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase*)

iRNK informaciona ribonukleinska kiselina

IMO imobilizacija

1xIMO jednom ponovljena imobilizacija

10xIMO deset puta ponovljena imobilizacija
LHR luteinizujućeg hormona receptor (LH/hCG receptor) (*engl. luteinising hormone receptor*)
NUR77 nuklearni receptor 4A1 (*engl. nuclear receptor 4A1, NR4A1*)
PER (*engl. Period*)
PVN paraventrikularni nukleus (*engl. paraventricular nucleus*)
REV-ERBa/b (*engl. nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1, NR1D1*)
RGC ganglionske ćelije retine (*engl. retinal ganglion cells*)
RHT Retino-hipotalamički trakt (*engl. Retinohypothalamic tract*)
RIA radio-imuno analiza
RN Rapa nukleus (*engl. raphe nuclei*)
RNK ribonukleinska kiselina
ROR (*engl. retinoic acid related orphan receptor*)
RORE (*engl. ROR response element*)
RQ-PCR (*engl. Real-time polymerase chain reaction*)
RT (*engl. reverse transcription*)
R (*engl. reverse*)
SDS (*engl. sodium dodecyl sulphate*)
SEM (*engl. standard error of the mean*)
SF1 steroidogeni faktor 1 / nuklearni receptor subfamije 5, grupe A, član 1 (NR5A1)
StAR steroidogeni akutni regulatorni protein (*engl. steroidogenic acute regulatory protein*)
T nivo testosterona u krvi
T/C odnos nivo testosterona i kortikosterona u krvi
Taq *Thermophilus aquaticus*
TBS (*engl. TRIS buffered saline*)
TBS-T TBS-Tween
TEMED tetrametiletildiamin
WB Western blot
ZT (zeitgeber time)

Uloga glukokortikoida u cirkadijalnoj sinhronizaciji endokrine funkcije Leydig-ovih ćelija

Sažetak

Dva sistema, cirkadijalni časovnik i mehanizam odgovora na stres, ključni su za prilagođavanje i održavanje dinamičke ravnoteža organizma. Uticaj stresa, posredovan glukokortikoidima, u cirkadijalnoj sinhronizaciji endokrine funkcije Leydig-ovih ćelija adultnih pacova praćen je kroz različite *in vivo* i *ex vivo* eksperimentalne modele. Eksperimentalni modeli obuhvatali su primenu stresa imobilizacijom (IMO), u različitim cirkadijalnim vremenima, i različitom broju ponavljanja, kao i tretman primene sintetičkih glukokortikoida. Preciznije, ove studije su dizajnirane da ispituju (1) da li je efekat glukokortikoida na obrazac ekspresije gena časovnika, gena povezanih sa steroidogenezom, kao i drugih gena od značaja za endokrinu funkciju Leydig-ovih ćelija, vremenski zavisna, kao i (2) da li je zavisna od tipa stresnog događaja (akutni i ponovljeni stres). U analiziranim eksperimentalnim modelima, utvrđeno je da je stres generalno povećao nivo glukokortikoida i smanjio nivo testosterona u krvi. Međutim, zapaženo je da je efekat ponovljenog stresa na nivo testosterona u krvi najmanje bio izražen u tamnoj (aktivnoj) fazi dana. Transkripciona analiza gena je otkrila različitu osetljivost na stresne događaje u zavisnosti od cirkadijalnog vremena: većina gena povezanih sa steroidogenezom (*Lhcgr*, *Nr3c1*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1/2*) pokazala je smanjenu ekspresiju u neaktivnoj (svetloj) fazi, dok je u aktivnoj (tamnoj) fazi dana, njihova ekspresija nepromenjena ili čak stimulirana. Stres je takođe uticao i na ekspresiju gena i proteina časovnika i stimulirao ekspresiju *Bmal1/BMAL1*, *Per1/2/PER1*. Tretman pacova primenom sintetičkog glukokortikoida pokazao je sličan odgovor kao i IMO tretman. Analiza glavnih komponenti (PCA) pokazala je odsustvo značajnih razlika između tretmana, posebno na *Per1* i *Rev-erba*. Ovakvi rezultati su potvrđeni *ex vivo* tretmanom Leydig-ovih ćelija Hydrocortison-om i blokatorom glukokortikoidnog receptora. Rezultati ukazuju da uticaj glukokortikoidne komponente odgovora na stres na aktivnost Leydig-ovih ćelija, zavisi od vremena i tipa stresa, naglašavajući važnost cirkadijalne aktivnosti u podršci i održavanju homeostaze produkcije androgena, a samim tim i plodnosti kod muškaraca.

The role of glucocorticoids in circadian synchronization of endocrine function of Leydig cells

Abstract

Two systems, the circadian clock, and the stress response mechanism are key to adjusting and maintaining the body's dynamic balance. The influence of glucocorticoid-mediated stress in the circadian synchronization of the endocrine function of adult rats Leydig cells monitored through various *in vivo* and *ex vivo* experimental models. The experimental models included the application of stress by immobilization (IMO), at different circadian times, and with a different number of repetitions, as well as the treatment with the use of synthetic glucocorticoids. Specifically, these studies are designed to examine (1) are the effects of glucocorticoids on the pattern of clock gene expression, steroidogenesis-related genes, and other genes relevant to Leydig cell endocrine function time-dependent, and (2) are the effects dependent on the type of stressful event (acute and recurrent stress). In the analyzed experimental models, it was found that stress generally increased glucocorticoid levels and decreased blood testosterone levels. However, it was noticed that the effect of repeated stress on the level of testosterone in the blood was the least pronounced in the dark (active) phase of the day. Transcriptional analysis of genes revealed different susceptibility to stressful events depending on circadian time: most genes associated with steroidogenesis (*Lhcgr*, *Nr3c1*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1/2*) showed reduced expression in the inactive (light) phase, while in the active dark) the phase of the day, their expression unchanged or even stimulated. Stress also affected the expression of clock genes and proteins and stimulated the expression of *Bmal1/BMAL1*, *Per1/2/PER1*. Treatment of rats with synthetic glucocorticoids showed a similar response as IMO treatment. Principal component analysis (PCA) showed no significant differences between treatments, especially on *Per1* and *Rev-erb*. These results were confirmed by *ex vivo* treatment of Leydig cells with Hydrocortison and a glucocorticoid receptor blocker. The results indicate that the effect of the glucocorticoid component of the stress response on Leydig cell activity depends on the time and type of stress, emphasizing the importance of circadian activity in supporting and maintaining androgen homeostasis, and male fertility.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. BIOLOŠKI RITMOVI	5
2.1.1. Biološki ritmovi, biološki časovnik i hronobiologija	5
2.1.2. Generalne karakteristike ritmova.....	6
2.1.2. Cirkadijalni časovnik kod sisara	9
2.1.2.1. Centralni časovnik u suprachiasmaticnom nukleusu (SCN).....	10
2.1.2.2. Periferni časovnici kod sisara i organizacija časovnika na molekularnom nivou.....	12
2.1.2.3. DEC petlja	15
2.1.2.4. Geni kontrolisani časovnikom i njihov značaj u reproduktivnoj funkciji	16
2.2. STRES I GLUKOKORTIKOIDI.....	18
2.2.1. Tipovi stresa i odgovor organizma na stres	18
2.2.1.1. Hipotalamo – hipofizno – adrenalna osovina (HPA)	21
2.2.1.2. Glukokortikoidni receptor	22
2.2.4. Ritam sekrecije glukokortikoida.....	25
2.2.5. Uticaj glukokortikoida na časovnik.....	27
2.3. LEYDIG - OVE ČELIJE	29
2.3.1. Izvori holesterola u Leydig-ovim ćelijama i proces steroidogeneze	30
2.3.3. Regulacija steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama	32
2.3.3.1. Uloga cirkadijalnog časovnika u regulaciji steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama.....	34
2.3.3.2. Uticaj glukokortikoida na regulaciju steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama.....	36
3. CILJEVI	38
4. MATERIJAL I METODE	40
4.1. HEMIKALIJE.....	41
4.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	42
4.3. EKSPERIMENTALNI MODELI	42
4.3.1. Eksperimentalni model akutnog psihofizičkog stresa primenom IMO u različitim vremenskim tačkama u toku 24h	43
4.3.2. Eksperimentalni model 10 puta ponovljene IMO u različitim vremenskim tačkama u toku 24h.....	44
4.3.3. Eksperimentalni model primene akutne IMO na početku svetle faze praćene analizom ritmičke steroidogene sposobnosti u satima nakon IMO tretmana;	45
4.3.4. Eksperimentalni model tretmana sintetičkim glukokortikoidom na početku svetle faze i praćenje ritmičke steroidogene sposobnosti u satima nakon tretmana.....	45
4.3.6. Eksperimentalni model ex vivo tretmana primarne kulture Leydig-ovih ćelija sa agonistom (Hydrocortisone) i antagonistom (Mifepristone, RU486) glukokortikoidnog receptora	46
4.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HORMONA	47
4.5. PRIPREMA PRIMARNE KULTURE LEYDIG-OVIH ČELIJA	47
4.6. ANALIZA EKSPRIMIRANJA GENA.....	49
4.6.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija	49
4.6.2. Relativna kvantifikacija iRNK u PCR analizi	50
4.7. KVANTITATIVNA I KVALITATIVNA ANALIZA PROTEINA.....	52
4.7.1. Određivanje količine ukupnih proteina u uzorcima	52
4.7.2. SDS-PAGE i Western blot	52
4.9. STATISTIČKA ANALIZA I ANALIZA RITMA.....	53

5. REZULTATI	55
5.1. ISPITIVANJE EFEKTA JEDNOKRATNOG STRESA, PRIMENJENOG U RAZLIČITIM CIRKADIJALNIM VREMENIMA NA AKTIVNOST LEYDIG-OVIH ČELIJA.....	56
5.1.1. ISPITIVANJE EFEKATA JEDNOKRATNE IMO NA NIVO HORMONA, GLUKOZE I EKSPRIMIRANOST GENA ADENOHIPOFIZE ..	56
5.1.2. ISPITIVANJE EFEKATA JEDNOKRATNE IMO NA EKSPRIMIRANOST GENA POVEZANIH SA STEROIDOGENEZOM.....	58
5.1.3. ISPITIVANJE EFEKATA JEDNOKRATNE IMO NA EKSPRIMIRANOST GENA I PROTEINA ČASOVNIKA	59
5.2. ISPITIVANJE EFEKTA PONAVLJANOG STRESA, PRIMENJENOG U RAZLIČITIM CIRKADIJALNIM VREMENIMA NA AKTIVNOST LEYDIG-OVIH ČELIJA.....	61
5.2.1. ISPITIVANJE EFEKATA 10xIMO NA NIVO NA NIVO HORMONA, GLUKOZE I EKSPRIMIRANOST GENA ADENOHIPOFIZE.....	62
5.2.2. Ispitivanje efekta 10xIMO na ekspimiranost gena uključenih u proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama	63
5.2.3. Ispitivanje efekata 10xIMO na ekspimiranost gena i proteina časovnika u Leydig-ovim ćelijama.	64
5.2.4. Efekti 1xIMO i 10xIMO na ekspimiranost Nr3c1/GR.....	65
5.3. ISPITIVANJE EFEKTA STRESA PRIMENJENOG NA POČETKU NEAKTIVNE FAZE NA CIRKADIJALNU AKTIVNOST LEYDIG-OVIH ČELIJA	70
5.3.1. Efekti stresa primenjenog na početku neaktivne faze na cirkadijalni ritam steroidogeneze	71
5.3.2. Efekti stresa primenjenog na početku neaktivne faze na aktivnost gena časovnika	73
Budući da je vreme stres događaja ključno za aktivnost steroidogenih gena, bilo je od interesa posmatrati ekspimiranost gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama u satima nakon IMO.....	73
5.4. ISPITIVANJE EFEKATA IN VIVO TRETMANA SINTETIČKIM GLUKOKORTIKOIDOM NA CIRKADIJALNU AKTIVNOST LEYDIG-OVIH ČELIJA	76
5.4.1. Efekti tretmana sintetičkim glukokortikoidom na diurnalnu steroidogenu aktivnost Leydig-ovih ćelija.....	76
5.4.2. Efekti tretmana sintetičkim glukokortikoidom na diurnalni ritam ekspimiranosti gena časovnika	79
5.5. ISPITIVANJE EFEKATA IN VIVO/INTRATESTIKULARNE BLOKADE GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA U USLOVIMA STRESA	82
5.6. ISPITIVANJE EFEKATA EX VIVO BLOKADE GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA U LEYDIG-OVIM ČELIJAMA	83
6. DISKUSIJA	84
6.2. ODGOVOR LEYDIG-OVIH ČELIJA NA PONAVLJANE STRESNE SITUACIJE U ZAVISNOSTI OD CIRKADIJALNOG VREMENA DEŠAVANJA STRESA	88
6.2.1. Poređenje odgovora nakon jednokratne i ponavljane IMO.....	91
6.3. ODGOVOR LEYDIG-OVIH ČELIJA NA PORAST NIVOVA GLUKOKORTIKOIDA IZAZVANOG STRESOM NA POČETKU SVETLE (NEAKTIVNE) FAZE.....	94
6.4. ODGOVOR LEYDIG-OVIH ČELIJA NA TRETMAN GLUKOKORTIKOIDIMA NA POČETKU SVETLE (NEAKTIVNE) FAZE	95
6.5. IN VIVO/EX VIVO BLOKADA GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA	97
7. ZAKLJUČCI	99
8. LITERATURA	102

1. Uvod

U prirodi ne postoji ništa konstantnije od promene (Heraklit, 535 p.n.e.). Neke promene u prirodi su predvidive, dok neke nisu. Prilagođavanje na promene, omogućava živim bićima da se menjaju i preživljavaju. Za uspešno prilagođavanje kao i preživljavanje, od velike važnosti su dva fiziološka sistema, sistem koji se aktivira kao odgovor na promene, odnosno stresore koji remete njegovu unutrašnju homeostazu, i sistem unutrašnjeg časovnika, koji organizam priprema na predvidljive promene. Ova dva sistema na različite načine, ali ipak u korelaciji, regulišu fiziologiju tela, uključujući i reproduktivnu sposobnost jedinke.

Sistem odgovora na stresore omogućava brzi adaptivni odgovor organizma na promene i zahtev za preživljavanjem u nepredvidivim situacijama. Stres pokreće brzu reakciju autonomnog nervnog sistema i sekreciju adrenalina što je praćeno aktivacijom sekrecije glukokortikoida (GC) putem hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalne osovine (Selye, 1952; Charmandari i sar., 2005).

Unutrašnji cirkadijalni časovnik organizma omogućava praćenje promena u životnoj sredini koje su prilagođene 24 časovnoj rotaciji Zemlje oko svoje ose, koordinišući brojne fiziološke procese, od ekspresije gena do ponašanja (Roenneberg i Merrow, 2005). Složeni cirkadijalni sistem koji se sastoji od glavnog časovnika u suprachiasmaticnom nukleusu (SCN) i perifernih časovnika u skoro svakoj ćeliji, omogućava usklađen vremenski poredak fizioloških procesa na različitim organizacionim nivoima. Na nivou ćelije, sistem časovnika čine geni koji kodiraju transkripcione faktore koji deluju kroz pozitivne i negativne regulatorne transkripciono-translatorne povratne sprege (Ko i Takahashi, 2006). Primarna povratna sprega, sastoji se od pozitivnih elemenata petlje časovnika (BMAL1/CLOCK ili NPAS2) koji aktiviraju negativne elemente (PER1/3 i CRY1/2). Negativni elementi stvaraju dimer i inhibiraju BMAL1/CLOCK, čime inhibišu i sopstvenu transkripciju. Ovu petlju mogu modifikovati inhibitorni REV-ERB i DEC ili stimulatívni ROR elementi (Ukai i Ueda, 2010; Albrecht, 2012). Ritam transkripcije gena časovnika dekodira se u fiziološke signale kroz specifičnu ćelijsku transkripcionu aktivnost, putem cirkadijalnih promotorskih elemenata kao što su E-box, D-box i RORE (Ukai i Ueda, 2010).

Poznato je takođe, da ekspresija gena časovnika može biti koordinisana i spoljašnjim putevima, a jedan od načina regulacije je i stresom-posredovana aktivacija glukokortikoidnog receptora (Koch i sar., 2017).

Kao što je pomenuto, oba sistema mogu značajno da utiču na reproduktivnu sposobnost jedinki. Kod muškaraca stres smanjuje nivo testosterona u serumu (Marić i sar., 1996; Andrić i sar., 2013) dok, u Leydig-ovim ćelijama testisa, stres umanjuje steroidogenu aktivnost (Andrić i sar., 2013). Steroidogeneza Leydig-ovih ćelija je ritmični proces, koji se pretežno reguliše ritmom sekrecije LH iz hipofize, ali i elementima perifernog časovnika (Alvarez i sar., 2008; Baburski i sar., 2019). Nivo testosterona u serumu pokazuje oscilatorni obrazac male amplitude (Baburski i sar., 2015). S obzirom na presudnu važnost testosterona za razvoj i održavanje muškog fenotipa, kao i reproduktivnu funkciju, poremećaj cirkadijalne ritmičnosti može prouzrokovati poremećaje u reproduktivnoj sposobnosti. Savremeni način života i konstantna izloženost stresorima, može promeniti ritam sekrecije hormona, odnosno, cirkulišućeg testosterona, što favorizuje promene koje mogu biti povezane sa neplodnošću (Sciarra i sar., 2020; Starovlah i sar., 2020). Stoga postoji potreba za istraživanjima koja povezuju stres i cirkadijalni ritam sa steroidogenim kapacitetom Leydig-ovih ćelija i produkcijom testosterona.

Ova doktorska disertacija je posvećena analizi odnosa između cirkadijalne funkcije Leydig-ovih ćelija i reakcije na stres koja uključuje delovanje GC, kao glavnih medijatora stresa. Tačnije, ove studije procenjuju vremenski zavisne posledice stresa na transkripciju gena odgovornih za dnevnu endokrinu funkciju Leydig-ovih ćelija povezujući ih sa GC signalizacijom.

2. Pregled literature

2.1. Biološki ritmovi

2.1.1. Biološki ritmovi, biološki časovnik i hronobiologija

Gotovo svi živi organizmi koji naseljavaju planetu Zemlju izloženi su prirodnim, **ritmovima** koji upravljaju promenama i prate celokupan životni vek jedinke. Ritmovi predstavljaju ponavljajuće promene koji se javljaju sa definisanom verovatnoćom i periodom (Aschoff, 1960). Kretanje planete Zemlje oko svoje ose i oko Sunca dovodi do redovnog smenjivanja dana i noći, odnosno, smenjivanja godišnjih doba. Najpreciznije, ritmovi se mogu definisati kao nizovi događaja, koji se tokom vremena ponavljaju na isti način i sa istim intervalom; drugim rečima, to su vremenski predvidljivi procesi u prirodi (Aschoff, 1960; Roenneberg i Merrow, 2005, Dickmeis i sar., 2013).

Živi organizmi razvili su **biološki časovnik** koji omogućava usklađivanje velikog broja metaboličkih, fizioloških i bihevioralnih procesa sa spoljašnjim vremenskim markerima, kao što je to smenjivanje noćne i dnevne faze dana. Dakle, razvojem unutrašnjeg, endogenog mehanizma definisanog kao biološki časovnik, omogućena je sinhronizacija sa egzogenim, spoljašnjim vremenskim signalima (Aschoff, 1960; Roenneberg i Merrow, 2005). Poznato je da postoje različiti spoljašnji signali koji mogu uticati na ritmičnost procesa u organizmu. Jednim imenom nazivaju se **zeitgebers** ili davaoci ritma. Rad biološkog časovnika može biti kontrolisan različitim davaocima ritma; socijalnim interakcijama, vremenskim režimom ishrane, aktivnošću/vežbanjem, promenom spoljašnje temperature, itd. Međutim, svetlost se smatra najvažnijim vremenskim signalom života sisara i ljudi (Roenneberg i Merrow 2005).

Grana biologije koja izučava mehanizme biološkog časovnika definisana je kao Hronobiologija (*chronos* - vreme, *bios* - život, *logos* - učenje). Razvoj hronobiologije počinje još u prvoj polovini 17 veka kada je, Jean Jacques d'Ortous De Mairan uočio prve ritmične promene u biljkama. Istraživanja Jean Jacques d'Ortous De Mairan su pokazala periodično kretanje listova *Mimosa pudica* u stalnim uslovima, kao što su stalna tama i konstantna temperature, bez obzira na cikluse dana i noći. U 19. veku istraživači koji su se bavili hronobiologijom predlažu da se ova pojava definiše kao "**free running**" odnosno postojanje endogenog ritma sa sopstvenim periodima, koji opstaju u uslovima u kojima se periodičnost spoljnog okruženja menja ili eliminiše (Vitaterna i sar. 2001). Za primer, free-running period

laboratorijskog pacova i miša, koji su noćne životinje, nešto je kraći od 24h. Ukoliko se pacov ili miš nađu u uslovima 12h dan – 12h noć, svetlosni stimulus će uskladiti njegovu lokomotornu aktivnost sa uslovima spoljašnje sredine, međutim, ako pacova/miša premestimo u uslove konstantnog svetla ili konstantnog mraka, njegova aktivnost zavisice isključivo od „free running” perioda suprashijazmatičnog nuklusa SCN (Miller i sar., 2007).

Biološki ritmovi javljaju se u velikom broju bioloških procesa kao i u skoro svim organizmima. Iz tog razloga, hronobiologija zahteva vrlo široka i obimna istraživanja, u svim carstvima života. Ova podgrana biologije, velikom brzinom nastavlja da se razvija u 20. i 21. veku sa tendencijom da definiše organizaciju bioloških ritmova kod različitih grupa organizama, čime započinje era moderne hronobiologije.

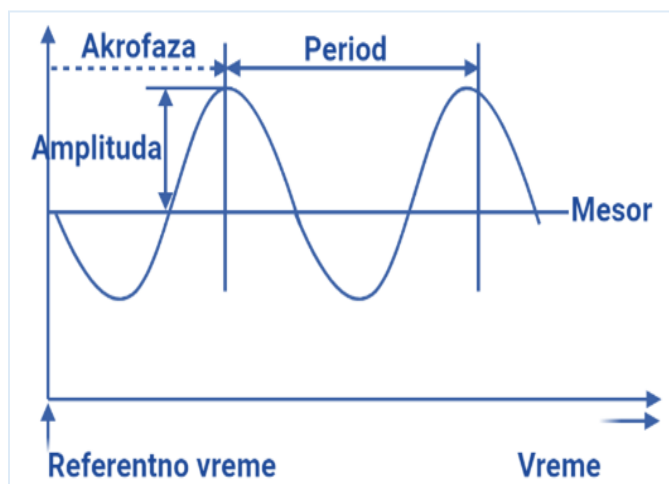
2.1.2 Generalne karakteristike ritmova

Period razvoja “moderne” hronobiologije, čijim se osnivačima smatraju Kolin Pittendrigh i Jurgen Aschoff, doneo je veliki broj naučnih saznanja u ovoj oblasti. Ova dva naučnika najpre su definisali i kategorisali ritmove prema dužini trajanja u nekoliko grupa. **Cirkadijalni ritam** (*circa* – otprilike, *dien* – dan) traje približno 24-časa kao i period rotacije Zemlje, **ultradijalni ritmovi** traju kraće od 24 sata; **infradijalni ritmovi** traju duže od 24 sata (Richter, 1922; Aschoff, 1960). Cirkadijalni ritam koji je sinhronizovan sa promenama svetle i tamne faze je **diurnalni ritam** (Aschoff, 1963).

Ustanovljeno je da kod ljudi, endogeno generisani cirkadijalni ritmovi, čiji period nije tačno 24h (nego je malo kraći ili malo duži) zavise od genotipa osob (Aschoff, 1960; Folkard i sar., 1984). Ubrzo je postavljena hipoteza postojanja cirkadijalnih ritmova na različitim nivoima, od molekula, preko ćelija do organa u gotovo svim carstvima života. Sada je poznato da su kod velikog broja kičmenjaka, cirkadijalnim ritmovima regulisani mnogi procesi: ciklus budnog stanja i sna, krvni pritisak, telesna temperatura, nivo hormona u cirkulaciji itd. (Roenneberg i Mellow, 2005). Postojanje cirkadijalnih ritmova kod sisara prvi je pokazao američki biolog i psiholog Curt Richter, uočivši cirkadijalnu regulaciju budnosti i sna kod pacova (Richter, 1922). Nešto kasnije, šezdesetih godina dvadesetog veka, Aschoff-ovi prvi eksperimenti koji su uključivali različite kategorije ispitanika pokazali su cirkadijalnu regulaciju budnosti i sna kod ljudi (Aschoff, 1965). Pored sisara, cirkadijalni ritmovi su uočeni i

kod *Drosophila melanogaster* (Belcher i Brett, 1973). Kasnije je utvrđeno da postoje ritmovi u oslobađanju spora gljivica *Neurospora crassa* (Feldman i Hoyle, 1973), kao i ritmično kretanje listova, i izduženje hipokotila u *Arabidopsis thaliana* (Millar, 1999).

Radi preciznije obrade podataka neophodno je bilo uvesti parametre koji opisuju jednu ritmičku pojavu. Ritmička pojava bilo koje funkcije, definiše se kroz nekoliko različitih pojmova koji omogućuju jasniju statističku obradu podataka. Najčešće korišćena kvantitativna metoda za analizu cikličnih pojava je kosinor tehnika, koja uključuje statističko uklapanje kosinusa vremenske serije podataka pomoću metode poznate kao linearni kvadrat najmanjih kvadrata regresije (Halberg, 1987). Ovaj matematički model je vrlo robustan u smislu da može analizirati vremenske serije, u kojima podaci nisu nužno jednako vremenski udaljeni. Analizom ritma neke pojave pomoću kosinor metode, dobija se kosinor kriva, koja kroz nekoliko različitih pojmova može definisati osnovne karakteristike ritma. **Period (τ)**



Slika 2.1. Definicija karakteristika cirkadijalnog ritma. Kreirano pomoću Biorender.com.

predstavlja vreme potrebno za završetak jednog ciklusa ritmičke pojave. Meri se u vremenskim jedinicama, od milisekundi do više od jednog veka. **Frekvencija (f)** je broj ciklusa ritmičke promene u jedinici vremena i recipročna je periodu ($f = 1/\tau$). **Amplituda** predstavlja vrednosti ritmičke promene koja se prati, od osnovne linije (obično srednja vrednost) do pika. **Faza** je trenutno stanje ritmične promene u okviru perioda. **Akrofaza** je pojam koji se koristi kada se kosinusna kriva koristi za kvantifikovanje karakteristika ritma, i označava vreme u kom se doseže pik ritmične promene. **Mesor** (*engl.* Midlane Estimating Statistic of Rhytham) je procena raspodele centralne tendencije vrednosti oscilirajuće promenljive (Cornelissen, 2014).

Dalje proučavanje cirkadijalnih ritmova i njihovih karakteristika dovodi do novih saznanja i pojmova. Grupa istraživača sa Instituta za fiziologiju, Univerziteta u Geteborgu, Švedska, sredinom 20. veka uvodi pojam i definiciju hronotipa. **Hronotip** definiše manifestaciju ponašanja osnovnih cirkadijalnih ritmova fizioloških procesa posmatrane

invidue. Hronotip sisara se, prema tome, najjednostavnije može definisati kao sklonost pojedinca da spava i vrši određene aktivnosti u određeno vreme tokom perioda od 24 sata (Roenneberg i sar., 2007; Roenneberg, 2015). Kod ljudi hronotipovi se klasifikuju prema razlici u potrebama za snom i prema vremenu pika nekih fizioloških procesa, pri čemu se individue mogu svrstavati u „jutarnji tip“ (ili M-tip) ili „večernji tip“ (ili E-tip). Na različitim internet izvorima dostupno je nekoliko upitnika koji mogu svrstati ispitanike u kategorije, isključivo na osnovu njihovih odgovora (Roenneberg i sar., 2003).

Istraživanja u oblasti hronobiologije i cirkadijalnih ritmova, doprinela su novom aspektu sagledavanja i razumevanja mnogih fizioloških procesa. U drugoj polovini dvadesetog veka hronobiologija dobija značajan prostor i u medicinskim istraživanjima. Nekoliko studija je sugerisalo da kod ljudi, rad u smenama značajno utiče na funkcionisanje časovnika što dovodi do mentalnih promena kao što su depresivno i anksiozno ponašanje (Moon i sar., 2015; Walker i sar., 2020). Uočeno je da postoji i vrlo važna veza između gena koji regulišu cirkadijalni časovnik i mehanizma odgovora na stres, te su izvedena istraživanja koja su pokazala da stres može dovesti do poremećaja ritma ekspresije nekih gena kao i ritma sekrecije hormona što takođe implicira određene mentalne, ali fiziološke poremećaje (Nader i sar., 2010; Landgraf i sar., 2014). Istovremeno počinju da se razvijaju ideje o usklađivanju vremena davanja leka sa ritmom bolesti i hronotipom osobe, čime je uspostavljen novi način terapije definisane kao **hronoterapija** (Ohdo, 2010). Biološki odgovori na mnoga sredstva kao što su lekovi, hemijske supstance i otrovi nisu konstantni tokom perioda od 24 sata. Danas se hronoterapija veoma uspešno primenjuje u lečenju mnogih fizioloških i psiholoških poremećaja (Kraft, 1995; Lévi, 2001; Hermida i sar., 2007; Cardinali i sar., 2021). Ipak, hronoterapija se još uvek ne primenjuje u lečenju infertiliteta i poremećaja u reproduktivnoj sposobnosti kod muškaraca i žena jer ritmičnost ćelija u okviru reproduktivnog sistema kao i poremećaji ritma ovih sistema još uvek nisu dovoljno definisani.

Na osnovu svega navedenog, jasno je da sav život na planeti Zemlji evoluirao ka što efikasnijem prilagođavanju i predviđanju promena u okruženju, a koje pokreće rotacija planete, promene svetlosnog režima, temperature, dostupnosti hrane. Sinhronizacija ovih pojava ali i mnogih drugih ulaznih signala koje mogu uticati na život jedinke omogućava optimalnu funkciju svakog organizma od onih vrlo jednostavnih do vrlo složenih sisarskih (Albrecht, 2012). Prema tome jasno je, da je cirkadijalni časovnik jedan od najvažnijih

mehanizama svih živih organizama kao i da su hronobiologija i hronoterapija među najvažnijim poddisciplinama biologije i medicine.

2.1.2 Cirkadijalni časovnik kod sisara

Prema podacima koje pretraživač Google Scholar pruža, blizu 830,000 studija u oblasti cirkadijalnih ritmova je izvedeno do jula 2021. Veliki broj naučnih laboratorija se u drugoj polovini 20. veka uključio u istraživanje cirkadijalnih ritmova i njihove organizacije. Može se reći da organizam sisara ima približno onoliko časovnika koliko ima pojedinačnih ćelija koje ga sačinjavaju (Earnest i sar., 1999; Jin i sar., 1999). Ovakva otkrića i tvrdnje dovele su do ključnog i vrlo važnog pitanja, na koji način su časovnici svih ćelija međusobno sinhronizovani i kako generišu jedan koherentan ritmički izlaz, što je postala enigma za veliki broj istraživačkih grupa.

Prvi uvid u hijerarhijsku organizaciju cirkadijalnog sistema sisara sa suprashijazmatičnim nukleusom (SCN) na vrhu pokazale su studije koje su podrazumevale leziju SCN kod pacova u ranom razvoju. Nakon selektivne lezije SCN, kod životinja je primećeno odsustvo cirkadijalne ritmičnosti lokomotorne aktivnosti, osećaja žeđi, regulacije telesne temperature i sekrecije glukokortikoida (Moore i Eichler, 1972; Meyer-Bernstein i Morin, 1999). Međutim, uprkos nedostatku neuronskih veza, transplantacija donatorskog SCN tkiva u domaćine (sa lezijom SCN) dovela je do obnove ovih ritmova, što je pokazalo da određeni sekretorni produkti ćelija SCN mogu biti odgovorni za prenos cirkadijalnih signala iz SCN (Aguilar-Roblero i sar., 1994; LeSauter i sar., 1996). Uočeno je takođe, da primera radi, cirkadijalna sekrecija glukokortikoida kod životinja sa transplatiranim SCN nije obnovljena, što sugeriše da su, pored sekretovanih faktora, neophodni i neuronski signali za generisanje određenih cirkadijalnih ritmova (Meyer-Bernstein i Morin, 1999).

Pored centralne komponente cirkadijalnog sistema smeštene u SCN, periferni časovnici su identifikovani u drugim moždanim regionima i perifernim tkivima (Stratmann i Schibler, 2006). Veruje se da ovi periferni časovnici imaju ulogu u tkivno-specifičnoj kontroli cirkadijalnih ritmova. Zajedno, SCN i periferni časovnici grade multi-oscilatornu mrežu koja prima vremenske informacije preko spoljnih signala i, zauzvrat, koordinira ritmove ponašanja i fiziološke izlaze u skladu sa okruženjem. Dok SCN registruje svetlosne ili druge nesvetlosne stimulse, periferni časovnici, uglavnom se sinhronizuju sa vremenskim

signalima koji dolaze iz SCN-a. Generalno, SCN se može nazvati dirigentom koji orkestrira periferne časovnike kako bi osigurao vremenski koordinisanu fiziologiju čitavog organizma (Koch i sar., 2009; Albrecht, 2012). Periferni časovnici mogu biti povezani međusobno ili mogu biti povezani sa glavnim pejsmejkerom u SCN (Schibler i Sassone-Corsi, 2002).

Cirkadijalni časovnici svih sisara podrazumevaju postojanje tri važne komponente; to su ulazni put, generator ritma (oscilator) i izlazni put (cirkadijalni ritmovi). Generator ritma prima vremenske signale kroz ulazni put i sinhronizuje svoju fazu i period sa frekvencijom ciklusa (Menaker i sar., 1978; Roenneberg i sar., 2003). Dakle, generator ritma kod sisara je SCN, odnosno centralni pejsmejker cirkadijalnog sistema. SCN, prema tome ima ulogu da prima informacije iz spoljašnje i unutrašnje sredine, obrađuje ih i na osnovu njih usklađuje funkcionisanje ostalih, perifernih časovnika. Ova regulacija podrazumeva kako sinhronizaciju aktivnosti pojedinačnih ćelija u okviru jednog tkiva ili organa, tako i sinhronizaciju rada različitih organa međusobno na vremenskoj skali. Međutim, neka istraživanja su pokazala da rad perifernih časovnika ne zavisi u potpunosti od centralnog časovnika. Molekularni časovnik ćelije je autonoman i može da održava ritam bez obzira na spoljašnje signale, čak i u ćelijskoj kulturi. Koordinacija iz SCN je ipak neophodna da bi se sinhronizovao njihov rad. Utvrđeno je da kada se ovi signali ukinu, posle izvesnog vremena aktivnost pojedinačnih ćelija postaje asinhrona, što na nivou organa rezultira potpunim gubitkom ritma (Miller i sar., 2007).

2.1.2.1. Centralni časovnik u suprachiasmaticnom nukleusu (SCN)

SCN je vrlo mali nukleus podeljen na dva segmenta i smešten iznad optičke hijazme u blizini treće moždane komore u prednjem delu hipotalamusa. Svaki od segmenata SCN formira heterogenu mrežu od oko 10 000 pojedinačnih neurona. Ovi neuronski oscilatori su međusobno povezani sinaptičkom interakcijom kako bi činili jedan cirkadijalni pejsmejker (Güldner, 1983). Na osnovu sekrecije peptida i morfologije neurona, SCN se segmentiše na dorzomedijalni/region kore i ventrolateralni/region jezgra (Güldner, 1985; Swaab i sar., 1985). Ventrolateralni SCN prima većinu inputa iz mrežnjače i moždanih regiona do kojih pristižu svetlosni signali. Suprotno tome, dorzomedijalni SCN uglavnom inerviše limbička područja. Neuroni jezgra proizvode primarno vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), dok se arginin-vazopresin (AVP) uglavnom sintetiše u regionu kore (Moore i Eichler, 1972). Za

razliku od AVP-a, koji je uglavnom uključen u posredovanje eferentnih signala, smatra se da je VIP uključen u održavanje sinhronizacije unutar SCN (Tonsfeldt i Chappell, 2012; Jones i sar. 2018).

Kako bi se metabolički procesi, fiziologija i ponašanje organizma optimalno prilagodili prirodnom okruženju, informacije iz spoljašnje sredine moraju doći do tela gde se vremenski povezane informacije mogu integrisati, i prenositi do različitih tkiva. Centralni časovnik u SCN-u funkcioniše kao spona između spoljašnjeg i unutrašnjeg sveta. Do sada su poznate tri glavne ulazne putanje do centralnog časovnika: retino-hipotalamički trakt (RHT), genikulo - hipotalamički trakt (GHT) i serotonergički (5-hidroksitriptamin, 5HT) put preko dorzalnog rafe nukleusa (DRN) i medijalnog rafe nukleusa (MRN). Smatra se da RHT pruža svetlosne informacije SCN-u, dok GHT i seronergički put prenose nesvetlosne (bihevioralne) informacije (Dibner i sar., 2010, Albrecht, 2012).

Informacije o spoljašnjoj svetlosti, sisari dobijaju putem mrežnjače oka. Vrlo važnu ulogu u cirkadijalnoj fototransdukciji ima podgrupa ganglijskih ćelija mrežnjače koje sadrže fotopigment melanopsin koji ima vrlo važnu ulogu u prenosu nevizulениh svetlosnih signala (Foster i sar., 1991; Jones i sar. 2018). Ove ganglijske ćelije reaguju na svetlost i projektuju se kroz RHT na ventrolateralni region SCN gde se nalaze ćelije "primaoci". Dakle, nakon svetlosne stimulacije, glutamat se oslobađa na sinaptičkim krajevima neurona RHT. To dovodi do priliva kalcijuma u SCN neurone, koji pokreće aktivaciju kalcijum zavisnih kinaza, proteaza i faktora transkripcije (Moore i Lenn, 1972). Usled toga indukuje se fosforilacija cikličnih adenzin monofosfat-reaktivnih elemenata koji se vežu za protein CREB (*engl.* cAMP response element-binding protein) u SCN neuronima. Fosforilisani CREB se vezuje za ciklične elemente (CRE) koji se nalaze u promotorskom regionu gena cirkadijalnog časovnika i resetuje njihovu fazu nezavisno od aktivacije E-boxa koji inače kontroliše glavni kompleks cirkadijalnog časovnika CLOCK: BMAL1. Ovo resetovanje se brzo uspostavlja jer su pojedinačni SCN oscilatori čvrsto povezani jedni sa drugima. Međutim, svetlost može da izazove fazne pomake aktiviranjem transkripcije gen-časovnika samo tokom ranih ili kasnih noći (period aktivnosti kod glodara) (Dibner i sar., 2010). Pored postojanja direktne monosinaptičke veze sa SCN-om, utvrđeno je da RHT takođe projektuje IGL (*engl.* intergeniculate islet) putem kojih GHT signalizira centralni časovnik. GHT pruža informacije

o indirektnoj svetlosti SCN-u tako što oslobađa neuropeptid I i GABA (Gama-aminobuterna kiselina). Treća aferentna projekcija SCN potiče iz jezgra raphe (kod pacova i medijalno i leđno jezgro raphe). Kao i za RHT, ova vlakna takođe završavaju u jezgru regiona SCN-a i pružaju nesvetlosne (tj. ponašanjem indukovane) inpute u centralni časovnik (Johnson i sar., 1989). Da bi SCN funkcionisao kao pejsmejker i sinhronizator, signali koji dolaze od njega moraju se preneti na ostale delove tela. Smatra se da ulogu u tome pored AVP i VIP, imaju i brojni SCN izlazni faktori koji mogu biti neuronski i hormonski. Ovi faktori mogu da deluju kao vremenski koordinatori perifernih oscilatora, u cilju kontrole različitih oblika ponašanja i fizioloških funkcija organizma.

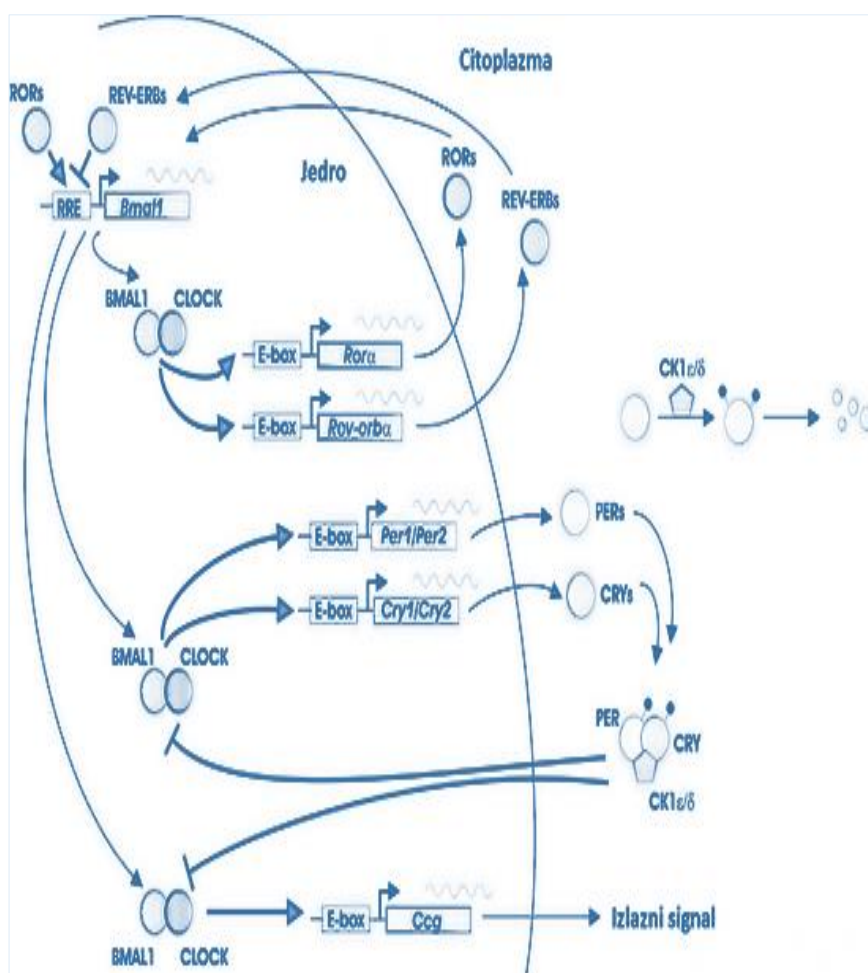
2.1.2.2. Periferni časovnici kod sisara i organizacija časovnika na molekularnom nivou

Periferni časovnici se u nekim aspektima razlikuju od glavnog pejsmejкера. Ekspresija cirkadijalnih gena u perifernim tkivima je približno 4 - 6h fazno odložena u poređenju sa SCN (Yamamoto i sar., 2004, Albrecht, 2012). Utvrđeno je da se periferni oscilatori utišavaju nakon nekoliko dana u ćelijskoj kulturi, što je prikazano genetskim spajanjem reportera luciferaze sa promotorom nekih od gena uključenih u regulaciju ritma (Yamazaki i sar., 2000). Zapravo, svakodnevna resetovanja signala iz SCN-a (direktno ili indirektno) potrebna su za fazno usaglašavanje časovnika perifernog tkiva. Za razliku od centralnog pejsmejкера u SCN, periferni časovnici nisu zavisni od svetlosnih signala, osim, smatra se, nadbubrežne žlezde i epifize, kako je *ex vivo* i *in vivo* pokazano (Ishida i sar. 2005; Fukuhara i Tosini, 2008). Ritmovi unosa hrane važni su ulazni signali za mnoge periferne organe, uključujući jetru i bubrege, mada je jasno da su ciklusi unosa hrane i gladovanja, u skladu sa ritmovima aktivnosti i odmora. Sva ova i slična otkrića, počela su da nameću nova pitanja. Kakav je biološki smisao postojanja autonomnih perifernih časovnika? Ako je poznato da SCN koordinira sve ćelijske populacije, zašto su pojedinačnim ćelijama potrebni sopstveni časovnici?

Svrha perifernih časovnika jeste da pruže odgovor na lokalne promene i regulišu lokalni odgovor (Kriegsfeld i Silver, 2006; Albrecht, 2012). Dakle, periferni časovnici optimizuju ćelijsku fiziologiju i imaju ulogu da različite hemijske reakcije usklade u različite vremenske okvire. Kao što je ranije navedeno, periferni časovnici mogu se odvojiti od SCN

ako to diktiraju njihove specifične potrebe, takav primer dešava se u jetri ili bubrežima nakon stimulacije hranom. Istraživanja sve više ukazuju da su povratne informacije od perifernih časovnika do centralnog časovnika, od suštinskog značaja za održavanje robusnosti i stabilnosti određenih cirkadijalnih ritmova, kao što je oslobađanje glukortikoida iz nadbubrežne žlezde (Barclay i sar., 2012; Schibler, 2017).

Elementi molekularnih časovnika su slični u svim ćelijama, uključujući i neurone SCN. Molekularni mehanizam cirkadijalnog časovnika zasnovan je na auto-regulatornim transkripciono-translacionim povratnim petljama (*engl.* **T**ranscription-**T**ranslation **F**eedback **L**oop (TTFL)) koje se sastoje od pozitivnih i negativnih elemenata. TTFL pokreće



Slika 2.2. Mreža transkripciono-translacionih petlji povratne sprege molekularnog časovnika sisara, preuzeto uz izmenu Ko i Takahashi, 2006.

cikličnu transkripciju gena i ekspresiju proteina elemenata časovnika u periodu od približno 24 sata (Reppert i Weaver, 2002; Cox i Takahasi, 2019).

U **pozitivne elemente** cirkadijalnog sistema se ubrajaju BMAL1 i CLOCK. Miševi sa mutacijom *Clock* gena pokazali su produženi cirkadijalni period sa postepenim gubitkom ritmičnosti. Miševi kojima je nedostajao *Bmal1* nisu mogli da generišu endogene cirkadijalne ritmove, što ukazuje na

njegovu ključnu ulogu u kontroli cirkadijalnog ritma (Vitaterna i sar., 1994; Bunker i sar., 2000). CLOCK i BMAL1 proteini pripadaju bHLHPAS (*engl.* *basic helix-loop-helix – Period-*

Arnt-Sim) familiji transkripcionih faktora. Gradeći heterodimer, vezuju se za cis-regulatornu sekvencu E-box (CACGTG) koja se nalazi u promotoru velikog broja ciljnih gena čime se aktivira njihova transkripcija (Bunger i sar., 2000; Ja i sar., 2000; Kondratov i sar., 2006). Među pozitivne regulatore svrstava se i NPAS2 koji se smatra paralogom CLOCK proteina. NPAS2 može da formira heterodimer sa BMAL1 i aktivira ekspresiju ciljnih gena i na taj način menja ulogu CLOCK proteina. Ukoliko se desi mutacija i *Clock*^{-/-}/*Npas2*^{-/-} dolazi do gubitka ritma u uslovima konstantnog mraka (DeBruyne i sar., 2007). **Negativni regulatori** cirkadijalne mašinerije su *Per1/2* i *Cry1/2*. Homozigotni *Per1* mutirani miševi pokazuju kraći cirkadijalni period (Albrecht i sar., 2001; Zheng i sar., 2001). *Per2* mutirani miševi pokazuju kraći cirkadijalni period, ali i postepeni gubitak ritmičnosti u stalnom mraku (Zheng i sar., 1999, 2001). S druge strane, pokazano je da u odsustvu oba kriptohroma (*Cry1* - / -, *Cry2* - / -) dolazi do potpunog i trenutnog gubitka ritmične aktivnosti (van der Horst i sar., 1999). Ovakve studije su pokazale da PER i CRY protein, takođe, predstavljaju srž kontrole cirkadijalnog časovnika kod sisara. Ekspresiju gena koji se smatraju negativnim regulatorima, aktiviraju pozitivni regulatori. Ovakav sled događaja čini primarnu transkripciono-translacionu povratnu spregu koja je odgovorna za održavanje funkcije sisarskog cirkadijalnog časovnika. Dakle, CLOCK/BMAL1 vezuju se za cis-regulatornu sekvencu E-box (CACGTG) čime regulišu ekspresiju, Period (*Per1*, *Per2*) i Cryptochrome (*Cry1*, *Cry2*) gena. PER i CRY proteini izlaze iz jedra u citoplazmu, gde grade komplekse koji se nakon nekoliko sati translociraju u nukleus i inhibiraju transkripciju gena koja je pokrenuta CLOCK/BMAL1 kompleksom. Shodno tome, PER/CRY inhibiraju i sopstvenu transkripciju zatvarajući tako primarnu transkripciono-translacionu negativnu povratnu spregu (Lee i sar., 2001). Utvrđeno je da se negativni elementi primarne petlje degradiraju. PER proteini se akumuliraju u citoplazmi, ali ih fosforilišu (P) kinaze, kao što su kazein kinaze (*engl.* Casein kinase (CKI)) ϵ i δ i kinaza glikogen sintaze 3β . Ovi fosforilisani oblici PER proteina su nestabilni i razgrađuju se u proteazomima. Čitav proces degradacije se dešava sa zaostatkom od nekoliko sati. Na taj način inhibicija se ukida, a ceo ciklus se zatim ponavlja (Steven M. Reppert i Weaver, 2002; Cox i Takahasi, 2019). Pravilnom funkcionisanju časovnika, pored centralne petlje, doprinose i pomoćne regulatorne petlje. Jedna od bolje istraženih pomoćnih petlji čine nuklearni receptori iz porodice REV-ERB (*engl.* reverse erythroblastosis virus) i porodice ROR (receptori povezani sa receptorima retinoične

kiseline), koji se transkripciono regulišu pozitivnom vezom i aktiviraju (ROR) ili inhibiraju (REV-ERBB) transkripciju *Bmal1* (Steven M. Reppert i Weaver, 2002). REV-ERB i ROR vezuju se za RORE (*engl.* Retinoic acid related orphan receptor response element) DNK sekvencu. Funkcija ROR proteina je da održava određeni nivo eksprimiranosti *Bmal1* bez velikog uticaja na cirkadijalni ritam transkripcije. REV-ERB ima ulogu u uspostavljanju ritmičnog obrazca ekspresije *Bmal1* tako što ritmično utišava njegovu transkripciju (Ko i Takahashi, 2006; Takahashi, 2017). Uzajamna regulacija CLOCK, BMAL1 i REV-ERB i ROR definisana je kao sekundarna ili pomoćna petlja (*engl.* auxiliary loop).

2.1.2.3. DEC petlja

U organizaciji molekularnog časovnika sisara uključena je i sporedna DEC petlja koju čine dva proteina DEC1 i DEC2. DEC1 (takođe definisan kao BHLHB2, STRA13 ili SHARP2) i DEC2 (BHLHB3 ili SHARP1) svrstavaju se u bHLH familiju transkripcionih faktora. Ekspresija *Dec1* i *Dec2* gena pokazuje robusne cirkadijalne ritmove u SCN i različitim perifernim tkivima. U promotoru gena *Dec1* i *Dec2* nalazi se E-box sekvenca (5'-CACGTG-3') putem koje ekspresiju ovih gena pozitivno regulišu CLOCK/BMAL1 dimeri. DEC proteini mogu da inhibišu transkripciju koju pokreću CLOCK/BMAL1 dimeri najverovatnije kompeticijom sa ovim proteinima za E-box (Honma i sar., 2002). Pokazano je da *Dec1* i *Dec2* ovim putem mogu da regulišu i eksprimiranje gena *Per1*, *Rev-erba* i *Dbp* (*engl.* albumin D-element binding protein), ali imaju slabiji uticaj na eksprimiranje gena koji u promotoru imaju E'-box (5'-CACGTT-3'), kao što su *Per2* i *Cry1*. DPB i E4BP4 omogućuju drugi način cirkadijalne regulacije putem pozitivne, odnosno negativne, transkripcione regulacije *Per1* i *Per2* preko D-box-a; ROR i REV-ERB stimulišu i inhibiraju ekspresiju BMAL1 i CLOCK putem RORE (Ueda i sar., 2005; Kato i sar., 2014). Smatra se da ova mreža proteina časovnika fino kontroliše i stabilizuje robusne cirkadijalne ritmove u organizmu (Alvarez i Sehgal, 2002). Mutanti *Dec1*^{-/-} i *Dec2*^{-/-} ne pokazuju značajne promene u ritmu aktivnosti međutim dupli *Dec1/Dec2* KO mutant ima značajno duži period aktivnosti što ukazuje da ovi proteini imaju ulogu negativnog regulatora u održavanju rada molekularnog biološkog časovnika (Honma i sar., 2002; Nakashima i sar., 2008).

2.1.2.4. Geni kontrolisani časovnikom i njihov značaj u reproduktivnoj funkciji

Cirkadijalna transkripcija osnovnih gena časovnika daje ritmičnost ekspresiji brojnih gena koji su uključeni u različite biološke procese. Ovi takozvani geni kontrolisani časovnikom (*engl.* Clock Controlled Gens (CCG)) čine preko 10% transkriptoma tkiva. Važno je pomenuti da se CCG razlikuju u svakom specifičnom tkivu (Miller i sar., 2007).

Da bi se neki gen smatrao CCG genom, potrebno je da ispunjava određene uslove. Generalno, ideja je da taj gen nije sam po sebi gen časovnika, ali da se ritmički eksprimira u istom periodu kao i geni cirkadijalnog časovnika u datoj ćeliji. Dalje, potrebno je pratiti ritam ekspresije gena kandidata u normalnim ćelijama i uporediti sa ritmom ekspresije u ćelijama sa mutacijom za određene gene časovnika koji će dovesti do produženog “free running” perioda. Period CCG gena kandidata, takođe treba da bude produžen. Na kraju, potrebno je “izbaciti” CCG gen kandidat iz genoma. Ukoliko ritam ekspresije gena časovnika ostane nepromenjen, onda gen kandidat zaista spada u grupu CCG. Pojednostavljeno, CCG su oni geni koji imaju ritam ekspresije kao geni časovnika u datoj ćeliji, ali ni na koji način ne mogu uticati na mehanizam funkcionisanja gena časovnika (Bozek i sar., 2009; Mazzoccoli i sar., 2012)

Cirkadijalna kontrola gena koji su uključeni u razne ćelijske procese najčešće se ostvaruje preko tri regulatorne sekvence: **E/E'-box** (jutro), **D-box** (dan) i **RRE** (noć). Transkripcija posredovana preko E-box sekvence, CACGT[G/T], uključuje aktivatore BMAL1, NPAS2, CLOCK i represore PER1/2, CRY1/2, DEC1/2, transkripcija preko D-box sekvence, TTA[T/C]GTAA, aktivatore DBP, TEF, HLF i represor E4BP4, a transkripcija preko RRE sekvence, [A/T]A[A/T]NT[A/G]GGTCA, represore REV-ERBA/B i aktivatore RORA/B (Albrecht, 2012). Oscilirajući geni daju ritmičnost mnogim fiziološkim procesima, uključujući lučenje hormona, metabolizam lekova i ksenobiotika, homeostazu glukoze i proliferaciju ćelija. S obzirom na značaj cirkadijalnog časovnika i širok spektar fizioloških procesa koji regulišu, geni časovnika smatraju se vrlo važnim za održavanje homeostaze organizma (Miller i sar., 2004; Gamble i sar., 2014; Cox i Takahasi, 2019).

Dosadašnja istraživanja, ukazuju da su pojedini geni značajni za reproduktivnu sposobnost muškog (detaljnije u poglavlju 2.3.3.) ali i ženskog pola pod kontrolom gena

cirkadijalnog časovnika (Pan i sar., 2020). Ovakva saznanja otvorila su veliki broj pitanja o značaju i ulozi časovnika u reprodukciji.

Nekoliko studija je pokazalo da mutacije gena časovnika dovode do raznih reproduktivnih poremećaja. Ženke miševa sa pojedinačnim mutacijama gena *Per1* i *Per2*, pokazale su značajno niži reproduktivni uspeh od kontrolne grupe (Sellix, 2015). *Clock* Δ 19/ Δ 19 transgeni mužjaci miševa pokazuju smanjenu plodnost i smanjenu veličinu novorođenih miševa nakon oplodnje, takođe spermatozoidi pokazuju smanjenu funkcionalnost i stepen *ex vivo* oplodnje. *Bmal1* nokaut mužjaci miševa bili su neplodni i pokazali nizak nivo testosterona i visok nivo LH u serumu, što ukazuje na disfunkciju Leydigovih ćelija. Ovakve studije ukazuju na značaj gena časovnika u reprodukciji, koji se ostvaruje putem interakcija sa genima uključenim u proces steroidogeneze (Alvarez i sar., 2008; Cheng i sar., 2016). Istraživanja vršena na ciljnim grupama ljudi, kod kojih postoji poremećaj u ciklusu sna i budnosti, takođe su pokazala poremećaj u sekreciji reproduktivnih hormona i smanjenu reproduktivnu sposobnost. U svetu postoji sve veći trend obavljanja poslovnih aktivnosti van normalnog dnevnog vremena, ovakav način života menja vreme izlaganja svetlosti i potencijalno menja ritmove u SCN i ritmičnost perifernih tkiva. Ove promene utiču na fiziološke sisteme koji su pod uticajem cirkadijalnog časovnika, uključujući i reproduktivni sistem. Neke studije su pokazale da žene koje rade poslove u smenama imaju povećan rizik od promena i izostanak menstrualnih ciklusa, kao i povećanu učestalost prevremenih porođaja (Knutsson, 2003). Studije fokusirane na uticaj rada u smenama na reproduktivno zdravlje muškaraca, pokazale su pozitivnu korelaciju sa pojavom hipogonadnih simptoma, loših parametara semene tečnosti i pokretljivosti spermatozoida (Deng i sar., 2018). Međutim, ovakvih ispitivanja još uvek nema dovoljno da bi se mogli doneti precizni zaključci.

Dosadašnji rezultati pokazali su da su ispitivanje interakcija između gena časovnika i gena uključenih u proces steroidogeneze, od velike važnosti ne samo sa molekularno-biološkog aspekta već i kao doprinos lečenju i prevenciji mnogih biomedicinskih problema koji mogu dovesti do infertiliteta.

2.2. Stres i glukokortikoidi

Početak 19. veka matematičar Cauchy uveo je pojam stresa ili pritiska, u svoju teoriju elastičnosti, definišući taj pojam kao količinu sile koja deluje na jedinicu površine koja se zatim, pod dejstvom te sile, savija i deformiše u odnosu na prvobitno stanje. U 20. veku naučnici su pokušali da primene termin stresa i na biološke sisteme, definišući ga kao stanje koje narušava ravnotežu fizioloških procesa jednog organizma.

Američki fiziolog Cannon je 1929. definisao pojam homeostaze kao težnju svih živih organizama da održe složenu dinamičku ravnotežu, kako bi očuvali stabilnost unutrašnjeg stanja. Svaki poremećaj ovog ravnotežnog stanja izazvan od strane nekog stimulusa dovodi do aktivacije organskih sistema, koji teže ka ponovnom uspostavljanju homeostaze (Cannon, 1929). Endokrinolog Hans Selye je termin „stres“ definisao kao „nespecifični odgovor tela na bilo kakvu promene sredine“. Selye je takođe rekao da je stres medicinski, sociološki i filozofski najznačajnija tema za čovečanstvo (Selye, 1952).

Tokom dvadesetog veka nizale su se razne definicije stresa, međutim u novije vreme prihvaćene su hipoteze da stres treba smatrati procesom koji uključuje stimulus, perceptivnu obradu ulaznih podataka i bihevioralni i fiziološki izlaz (Koolhaas i sar., 2011, Fink, 2017). U savremenom svetu koji se brzo menja, izloženost stresu postaje sve veća. Iako postoji veliki broj istraživanja koja se bave stresom i ovaj pojam postaje jedan od citiranih u biomedicinskoj literaturi, još uvek je teško dati jasnu i preciznu definiciju stresa. Svetska zdravstvena organizacija stres je definisala kao bilo koju vrstu promene koja uzrokuje fizičko, emocionalno ili psihičko opterećenje i nazvala ga „epidemijom“ 21. veka (Fink, 2017).

2.2.1. Tipovi stresa i odgovor organizma na stres

Proučavajući stres, Hans Selye je definisao i pojam stresora, kao stimulus, koji može da dovede do narušavanja homeostaze organizma. Stresori se mogu klasifikovati na različite načine, a prema tome definisani su i različiti tipovi stresa.

Prema kvalitetu stresori se mogu podeliti na pozitivne ili negativne, u zavisnosti da li izazivaju eustres (pozitivne reakcije) ili distres (negativne reakcije).

Prema tipu stresori se mogu podeliti na one koji izazivaju psihološke i fiziološke promene homeostaze.

Prema načinu pojavljivanja se mogu klasifikovati kao predvidljivi (tj. isti stresori) ili nepredvidljivi (promenljivi stresori).

Prema trajanju stresori se dele na **akutne**, koji se ponavljaju samo jednom i izazivaju akutni stres, i hronične stresore koji se ponavljaju više puta i izazivaju dugotrajni, hronični stres. Hronično izlaganje stresnom stimulusu može biti kontinuirano ili isprekidano. Ukoliko je izlaganje hroničnom stresnom stimulusu isprekidano, onda se ovaj tip stresa karakteriše kao **ponovljeni stres** (Selye, 1952; Dhabhar, 2000; Pacák i Palkovits, 2001).

Proučavajući različite vrste stresa, Hans Selye je opisao odgovor organizma na stres kroz aktivaciju dva vrlo kompleksna sistema, **simpaticičko – adrenalno medularnu osovinu (SAM)** i **hipotalamo-hipofizno – adrenalnu osovinu (HPA)** (Selye, 1952). Sterling i Eyer 1988. godine uveli termin „alostaza“ da bi opisali aktivne procese u organizmu čiji je cilj obnavljanje homeostaze, posredovane aktiviranjem SAM i HPA u uslovima izazvanim različitim tipom stresora (Sterling i Eyer, 1988, McEwen, 2000).

Aktiviranjem SAM i HPA, kao reakcije na stresore, u organizmu se oslobađaju dve grupe hormona, kateholamini i glukokortikoidi. Kateholamini predstavljaju deo SAM i deluju veoma brzo, efekti preko nervnog sistema ostvarljivi su u roku od nekoliko sekundi. Na taj način omogućena je trenutna fizička reakcija organizma, povezana sa reakcijom „bekstva ili borbe“. Može se reći da glukokortikoidi koji predstavljaju deo HPA, podržavaju aktivnost kateholamina ali sa vremenskim zaostatom. Povećana sekrecija kateholamina i glukokortikoida može rezultirati privremeno povećanom dostupnošću energije, povećanom mišićnom snagom, povećanom memorijskom funkcijom, i smanjenom osetljivosti na bol (Nygren i Olson, 1977; Goldstein, 2003). Utvrđeno je da glukokortikoidi utiču na ekspresiju približno 10% gena i vrše veliki broj interakcija u telu koje su od suštinskog značaja za održavanje homeostaze i omogućavaju organizmu da se pripremi za fizički i emocionalni stres i odgovori na njega (Sapolsky i sar., 2000; Koch i sar., 2009). Istraživanja pokazuju da su mikro RNK molekuli verovatno ključni regulatori odgovora na stres (Roufaley i Kadry, 2020).

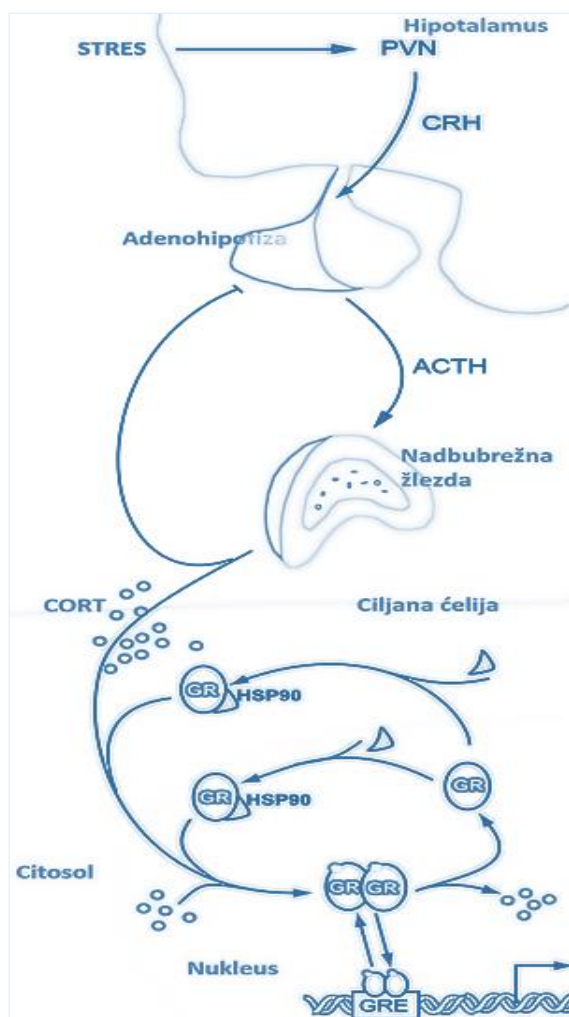
Zavisno od tipa stresora, organizam može aktivirati različite mehanizme odgovora. Poznato je da akutno izlaganje stresoru izaziva snažan porast koncentracije kateholamina u plazmi kod ljudi, dostižući pik u roku od 1 - 5 minuta, dok se pik glukokortikoida (GC) u krvi javljaju u roku od 15 - 30 minuta i polako opadaju na nivo pre stresa u roku od 60 - 90 minuta

(Armario i sar., 2004, Ulrich-Lai i Herman, 2009). Nasuprot tome, zabeleženi su trajni povišeni nivoi GC u plazmi nakon hroničnog stresa kod ljudi. Ovako povišen nivoa GC u plazmi može imati vrlo štetne efekte na funkcionisanje celog organizma, i sveopšte zdravstveno stanje (van der Pompe i sar., 1996; Chrousos, 2009; Manenschijn i sar., 2013; Yaribeygi i sar. 2017). Ipak, neke studije su pokazale da se nivo GC u plazmi ne povećava nužno nakon ponovljenog ili hroničnog izlaganja stresoru. Ponovljena izloženost istom stresoru može se povezati sa postepenim prilagođavanjem organizma na taj stresor, što dovodi do procesa navikavanja i desenzibilizacije. Slabiji fiziološki odgovor na poznati stimulus, štiti organizam od potencijalno zdravstveno ugrožavajućih efekata i primećuje se kod životinja izloženih ponovljenoj hladnoći ili stresu koji je izazvan bukom (Armario i sar., 1984; Yaribeygi i sar. 2017). Smatra se da navikavanje zavisi od karakteristika stresa i javlja se češće ukoliko je stresor nesocijalne prirode (Armario i sar., 1984). Precizan mehanizam koji leži u osnovi prilagođavanja odgovora na poznate stresore i senzibilizaciji vrlo je interesantna i nedovoljno istražena tema.

Radi proučavanja odgovora organizma na stres u laboratorijskim uslovima primenjuju se veoma veliki broj različitih modela izlaganja eksperimentalnih životinja stresorima. Jedan od najčešće primenljivijih metoda je primena psihofizičkog stresa imobilizacijom (IMO) (Kvetňanský i sar. 1970).

2.2.1.1. Hipotalamo – hipofizno – adrenalna osovina (HPA)

Poznato je da stresni stimulus aktiviraju HPA. Aktivacija HPA predstavlja glavni fiziološki događaj koji u stresnim uslovima doprinosi održavanju homeostaze, što podrazumeva i održavanje cirkadijalnog ritma mnogih procesa (Selye, 1976; Dickmeis i sar., 2007). Kod većine kičmenjaka zapažen je povećan nivo GC u krvi, početkom aktivne faze. Međutim, utvrđeno je da se ritam ekspresije GC usled delovanja stresnih stimulusa menja



Slika 2.3. Hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina, glukokortikoidni signaling, preuzeto uz izmene iz Dickmeis i sar. 2013.

(Buckingham, 2006). Informacije o promeni homeostaze organizma dolaze do hipotalamičkih neurona u PVN. Neuron PVN kao odgovor na stresne stimule luče kortikotropin-oslobađajući hormon (CRH) u portalnu cirkulaciju na nivou eminencije medijane. CRH se vezuje za CRH tip 1 receptor (CRH-R1) i AVP tip 1b receptor (AVP-R1b), na ćelijama kortikotropa, i pokreću sekreciju adrenokortikotropnog hormona (ACTH) (Barrett i sar., 2010). ACTH se za ćelije korteksa nadbubrežne žlezde vezuje preko receptora za melanokortin-2 (MC2R) i pokreće signalne puteve uključene u sintezu GC hormona.

Nakon ACTH-indukovane aktivacije MC2R, nivo unutarćelijskog cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) raste. Porast nivoa cAMP povećava preuzimanje holesterola. Slobodni holesterol je prekursor za sintezu GC. Sintaza GC je prilično brz proces i odvija se u nekoliko koraka (Noti i sar., 2009; Ahmed i sar., 2019).

Glavni endogeni GC su kortizol i kortikosteron (CORT). Iako oba steroidna hormona proizvodi većina organizama sisara, odnos u kome se oni luče varira od vrste do vrste. Kao što je pomenuto, kod ljudi je kortizol dominantno sintetisan, dok glodari isključivo proizvode CORT. GC ostvaruju svoje efekte vezujući se za unutarćelijske receptore. Prema njihovom

afinitetu za GC i njihovoj distribuciji, okarakterisana su dva različita tipa receptora, glukokortikoidni receptor (GR) i mineralokortikoidni receptor (MR) (Buckingham, 2006). Oba receptora su eksprimirana u mozgu i u gotovo svim perifernim organima. MR receptori imaju približno 10 puta veći afinitet za CORT od GR. Kako se nivo CORT povećava, bilo tokom reakcija na stres, ili usled cirkadijalnog ciklusa, MR postaju sve više zasićeni (jer je njihova primarna uloga vezivanje aldosterona) i GR postaju glavno mesto vezivanja CORT (Reul i Kloet, 1985; Croennandari i sar., 2005).

U neaktivnom stanju, ovi receptori postoje u citoplazmi kao deo multiproteinskog kompleksa, koji se sastoji od jednog molekula receptora i nekoliko proteina toplotnog šoka. GC pasivno difundiraju kroz ćelijsku membranu, a nakon vezivanja za receptore dolazi do konformacione promene receptora, što omogućava translokaciju iz citoplazme u jezgro. Unutar jezgra, aktivirani receptori se najčešće kao homodimeri vezuju za DNK u regulatornim sekvencama ciljnih gena (*engl.* glucocorticoids response element, GRE). GRE je sekvenca koja je duga 15 baznih parova, sastavljena od 2 palindromski ponovljene sekvence dužine 6 baznih parova, koje su odvojene razmakom od 3 bp. Opšteprihvaćena GRE konsenzusna sekvenca kod pacova i čovek je AGAACAnnnTGTTCT (Scheschowitsch i sar., 2017; Timmermans i sar., 2019).

U nekim slučajevima receptori mogu kao monomeri ili heterodimeri da regulišu transkripciju ciljnih gena (Raison i Miller, 2003). Ova biološka dejstva se uglavnom sporo odvijaju i traju neko vreme nakon što se steroid ukloni iz cirkulacije. Iako se reakcije GC uglavnom ostvaruje putem promene u transkripciji gena, pokazano je da se javljaju i neki brzi, negenomski efekti i ne mogu se objasniti na ovaj način (Panettieri, 2019).

2.2.1.2. Glukokortikoidni receptor

Glukokortikoidni receptor (GR) pripada superfamiliji nuklearnih receptora transkripcionih faktora i protein je koji se konstitutivno i sveprisutno ekspresuje u gotovo svim tkivima kod većine sisara. Ipak, GC mogu da vrše različite ćelijske i tkivno-specifične efekte zbog postojanja različitih izoformi GR, ali i zbog njegove alosterne regulacije specifične za različite ćelijske tipove (Scheschowitsch i sar., 2017).

Gen koji kodira GR je gen „podfamilije nuklearnih receptora 3. grupe c član 1“ (*Nr3c1*). *Nr3c1* je kod ljudi lokalizovan na hromozomu 5q31.3, dok je njegov ortolog kod pacova

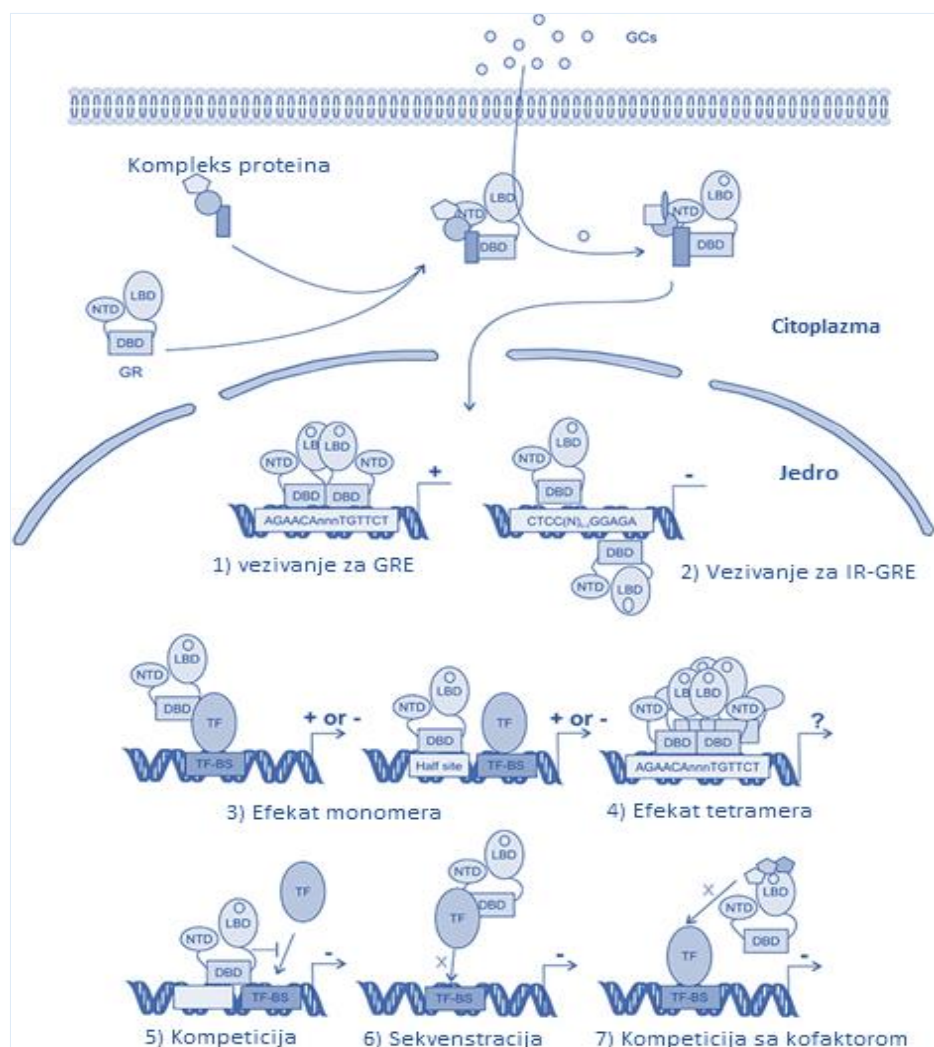
lokalizovan na hromozomu 18p11. Utvrđeno je da je struktura GR promotora visoko konzervirana između čoveka i pacova i da alternativnim spajanjem egzona dolazi do formiranja različitih varijanti GR, kao što su GR α i GR β (Hollenberg i sar. 1985; Timmermans i sar. 2019, Ramos-Ramírez i Tliba, 2021).

Prema nekim autorima GR α i GR β izoforme se značajno razlikuju. Alternativno splajsovanje na egzonu 9 rezultira dvema različitim varijantama GR, koje se razlikuju prema broju aminokiselina klasična forma GR α sadrži 777 aminokiselina ili GR β forma koja sadrži 742 aminokiseline. Obe izoforme su identične do 727. aminokiseline, a nakon toga sadrže nehomologe krajeve. Dakle, GR β je značajno kraća izoforma i smatra se da ne vezuje GC (Kino i sar., 2009b). Uprkos tome, GR β se nalazi u jedru gde obavlja nekoliko funkcija. GR β kompetituje sa GR α za GRE, ali pored uloge antagoniste može i da reguliše transkripciju gena koji nisu regulisani od strane GR α (Oakley i sar., 1996; Kino i sar., 2009). Takođe, utvrđeno je da iako ne veže endogen GC, GR β može da se veže za antagonistu GR, RU486 koji može da modulira njegovu aktivnost (Lewis-Tuffin i sar., 2007). Identifikovano je osam varijanti GR α (GR α -A, -B, -C1, -C2, -C3, -D1, D2 i D3) što je rezultat postojanja 8 visoko konzerviranih AUG početnih kodona u egzonu br. 2 (Lu i Cidlowski, 2005). Kod pacova je do sad utvrđeno prisustvo GR β u jetri (DuBois i sar. 2012) i plućima i (Cheng i sar. 2018).

Kao što je već pomenuto, u odsustvu unutarćelijskih GC, GR se nalazi kao monomer u citoplazmi u obliku multiproteinskog kompleksa. Sastav kompleksa se menja tokom različitih stanja aktiviranja GR. Za GR se vezuju različiti oblici proteina toplotnog šoka (*engl.* heat shock proteins (Hsp40, 70, 90)). U prisustvu GC ovaj kompleks se odvaja od GR i reorganizuje. Kada uđe u nukleus, aktivirani GR može nastaviti da vrši svoju funkciju. U jedru, GR deluje kao TF koji može da aktivira (trans-aktivacija) ili inhibira (trans-represija) gen (Lu i Cidlowski, 2005; Vandevyver i sar., 2014).

GR funkcioniše tako što reguliše ekspresiju gena koji reaguju na GC u pozitivnom ili negativnom maniru. Procenjuje se da postoji između 1,000 i 2,000 gena koji podležu regulaciji posredovanoj GR-om, a neke studije navode da je do 20% svih gena na neki način kontrolisano od strane GR (Scheschowitsch i sar., 2017). Poznato je da GR ostvaruje i negenomske efekte. Negenomski efekti ne zahtevaju delovanje na transkripciju mRNA ili sintezu proteina i mogu se u širem smislu definisati kao (a) interakcija GC sa GR-om vezanim za membranu (mGR), (b) interakcija GC-a sa citosolnim GR (cGR) i povezanim proteinima, i

(c) interakciju GC direktno sa ćelijskom membranama (Buckingham i sar., 2006; Panettieri i sar., 2019; Vettorazzi i sar. 2021). Negenomska dejstva GC/GR su brza i ne zahtevaju transkripciju ili sintezu proteina. GC deluju na lipide membrane čime se menjaju njihove fizičko-hemijske osobine. Dalje, takođe je primećeno da GC deluju na membranski vezan GR koji je povezan sa klasičnim GR i verovatno rezultira diferencijalno spajanje. Smatra se da postoji još jedan membranski receptor, koji nije povezan sa klasičnim GR. Ovaj protein je verovatno G protein, koji deluje preko cAMP signalnog puta (Buttgereit i Scheffold, 2002; Strehl i sar., 2011). Još jedan vid delovanja GR je njegov uticaj na funkciju mitohondrija. Pokazalo se da se GR može translocirati u mitohondrije. Mitohondrijski GR može da reguliše transkripciju gena mitohondrijskog hromozoma (Du i sar., 2009; Psarra i Sekeris, 2011; Timmermans i sar., 2019).



Slika 2.4. Aktivacija i funkcija glukokortikoidnih receptora. GC difunduju kroz ćelijsku membranu, u citoplazmi se vezuju za glukokortikoidni receptor (GR). Ovo indukuje promenu u kompleksu proteina vezanih za GR. GR se translocira u jedro da aktivira (+) ili inhibira (-) transkripciju gena. GR može transaktivirati gene vezivanjem za GRE kao dimer (1). Kao monomer (3) može se vezivati za transkripcione faktore (TF) ili za kompozitne elemente. GR može funkcionisati kao tetramer (4), ali njegovi efekti nisu poznati. GR može transrepresirati ekspresiju gena vezivanjem za obrnute ponavljajuće sekvence (IR-GBS) (2). Transrepresiju može vršiti i kompeticijom za mesta vezivanja transkripcionih faktora za DNK (5), sekvestracijom TF (6) i kompeticijom za kofaktorom sa ostalim TF-ovima (7). Preuzeto uz izmene Timmermans i sar., 2019.

2.2.4. Ritam sekrecije glukokortikoida

Kao što je pomenuto, sekrecija glukokortikoida u bazalnim uslovima, pokazuje izraženu vremensku regulaciju, kako pulsirajućom (ultradijalnom), tako i cirkadijalnom ritmičnošću. Pik u oslobađanju glukokortikoida uglavnom je vezan za aktivnu fazu kod životinja, odnosno, javlja se rano ujutro kod dnevnih, i rano uveče kod noćnih životinja (Chrousos i sar., 1998). Ovi ritmovi su paralelni sa ritmovima sekrecije ACTH, mada manje robusni i niže amplitude (Gudmundsson i Carnes, 1997). ACTH oslobađaju ćelije adenohipofize, vezuje se za receptore melanokortina tipa 2 u kori nadbubrežne žlezde i deluje na stimulisanje sinteze GC (Barrett i sar., 2010). Oslobađanje ACTH zauzvrat stimuliše sekrecija CRH, arginin vazopresin (AVP) i oksitocin, koji se oslobađaju u portalni krvotok. Istraživanja su pokazala da je i sekrecija CRH ritmična jer i mRNA ovog hormona pokazuje dnevne varijacije (Watts i sar., 2004). Negativne povratne informacije posredovane GC važne su za inhibiciju HPA ose i u bazalnim, ali i u uslovima stresa. Studije na glodarima pokazale su dva vremenski različita odgovora na negativne povratne informacije: brzi, negenomski odgovori koji traju nekoliko sekundi do nekoliko minuta i spori genomski odgovori koji traju nekoliko sati. Brzi odgovor podrazumeva inhibiciju sekrecije CRH i ACTH. Spor odgovor podrazumeva takođe inhibiciju sekrecije CRH ali i suzbijanje transkripcije ACTH prekursora pro-opiomelanokortina (POMC) u ćelijama kortikotrofa adenohipofize (Gjerstad i sar., 2018).

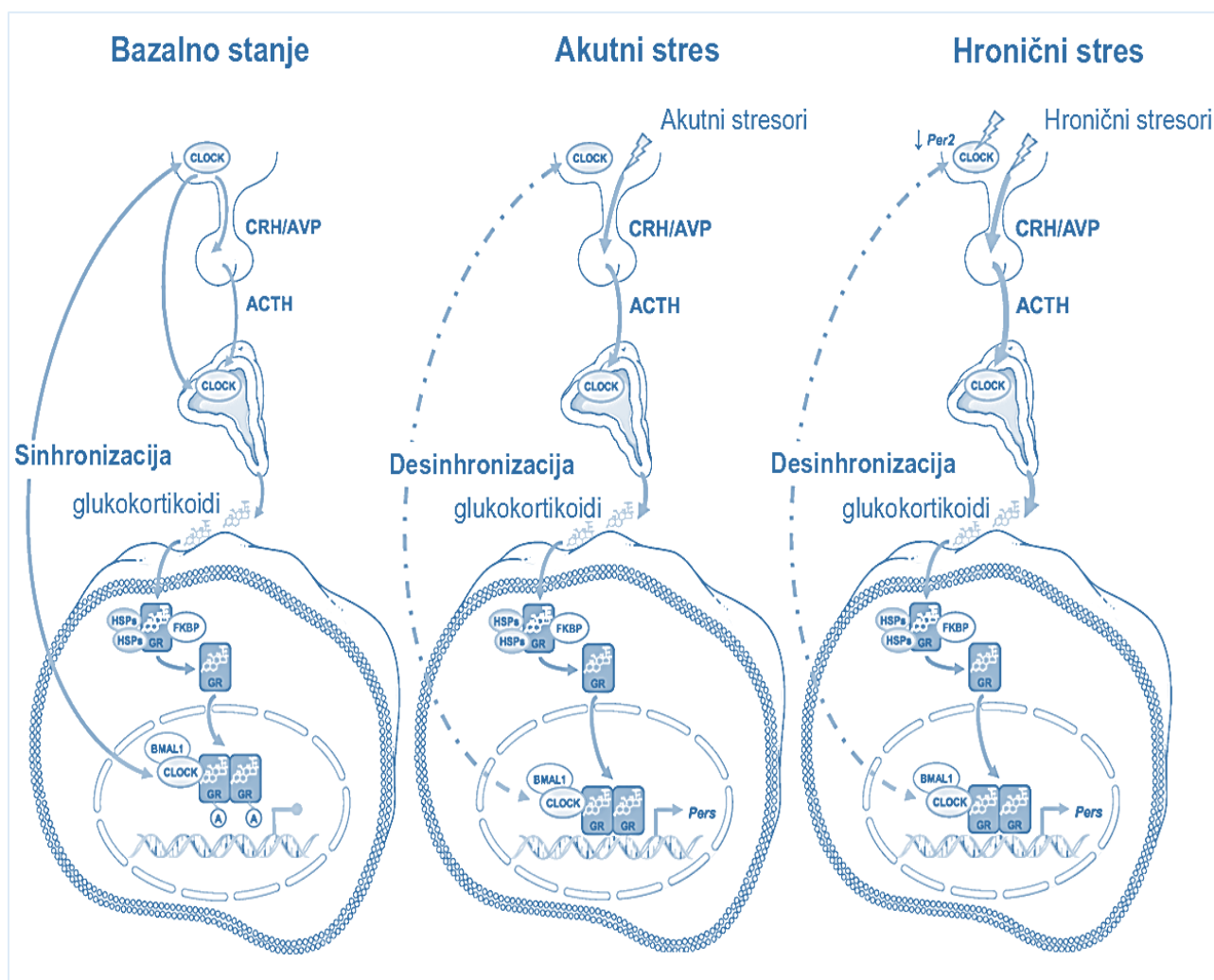
Smatra se da SCN kontroliše cirkadijalni ritam lučenja GC. Kod glodara, lezija SCN uzrokuje potpuni gubitak cirkadijalnog obrasca sekrecije kortikosterona (Kalsbeek i sar., 2011). Međutim studije na pacovima koji su gajeni u konstantnom svetlu nekoliko nedelja, pokazali su da se, iako je cirkadijalni ritam GC ukinut, održava njihov pulsatorni obrazac sekrecije (Waite i sar., 2012). Ova zapažanja dovela su do daljeg ispitivanja mehanizama pomoću kojih se stvara i održava ritam sekrecije GC. Utvrđeno je da postoji neusklađenost između frekvencije pulsa CRH (3 impulsa na sat) i frekvencije pulsa ACTH i GC (~ 1 puls na sat). Koristeći interdisciplinarni pristup matematičkog modeliranja i eksperimentalni *in vivo* rad sa pacovima, grupa naučnika dolaze do hipoteze da se ultradijalni ritam GC javlja nezavisno od centralne kontrole hipotalamusa i da zavisi od dinamičnih interakcija adenohipofize i nadbubrežne žlezde (Walker i sar., 2010, 2012). Ovaj mehanizam zasnovan

je na ACTH zavisnoj povratnoj sprezi koja reguliše nadbubrežnu sintezu i sekreciju GC, i GC negativnim povratnim informacijama koje regulišu sekreciju ACTH na nivou prednje hipofize. Ono što ovu povratnu vezu dovodi do pulsirajuće aktivnosti je postojanje vremenskog kašnjenja u sekretornom odgovoru nadbubrežne žlezde kao odgovor na stimulaciju ACTH, i u mehanizmu negativnih povratnih informacija koji inhibiraju sekreciju ACTH na nivou hipofize. Budući da GCs ne mogu biti unapred sintetisani i uskladišteni u nadbubrežnim steroidogenim ćelijama zbog svoje lipofilne prirode, javlja se kašnjenje u odgovoru (Walker i sar., 2015; Oster, 2017).

Glukokortikoidni hormoni se brzo sintetišu i izlučuju iz nadbubrežne žlezde kao odgovor na stres. Akutni stresori indukuju aktivnost HPA, povećavajući sintezu i sekreciju GC. Nakon vezivanja za $GR\alpha$, glukokortikoidi fazno menjaju ekspresiju nekoliko gena časovnika, kao što su *Per1* i *Per2*, i resetuju periferne časovnike, ali ne i centralni časovnik, jer je utvrđeno odsustvo $GR\alpha$ u SCN (Rosenfeld i sar., 1988; Balsalobre i sar., 2000). Stoga se faza cirkadijalnog ritma perifernih časovnika pomera u odnosu na fazu centralnog časovnika. Nakon prestanka akutnog stresa, centralni časovnik može resetovati periferne časovnike na početnu fazu u roku od nekoliko dana (Cheon i sar., 2013; Nicolaidis i sar., 2017).

Pretpostavlja se da tokom hroničnog ili ponovljenog stresa, SCN počinje da prima indirektnu povratnu informaciju o nivou GC iz perifernih tkiva koja ekspimiraju $GR\alpha$, kao što su jezgra raphe nukleusa, dorzomedijalno jezgro hipotalamusa i PVN. Tako na indirektan način koji još uvek nije u potpunosti razjašnjen dolazi do smanjenja ekspresija *Per2* u SCN, što ukazuje na uticaj hroničnog stresa na funkciju SCN (Kinoshita i sar., 2012). Hronični stres pokreće lučenje glukokortikoida u sistemsku cirkulaciju nezavisno od dnevnog regulisanja osovine HPA, faza sekrecije glukokortikoida pomera se i resetuje periferne časovnike što dovodi do razdvajanja perifernog i centralnog časovnika. Pretpostavka je da produženi adaptivni odgovor možda neće dozvoliti vraćanje pravilnog ritma perifernog časovnika što može dovesti do raznih patoloških stanja (Nicolaidis i sar., 2017). Lamia i sar. Predvideli su da CRY proteini časovnika mogu da inhibiraju funkciju GR direktnim vezivanjem, što dovodi

do pitanja, kako ostale interakcije koje se ostvaruju među genima i proteinima časovnika mogu uticati na ritam GR (Lamia i sar., 2011)

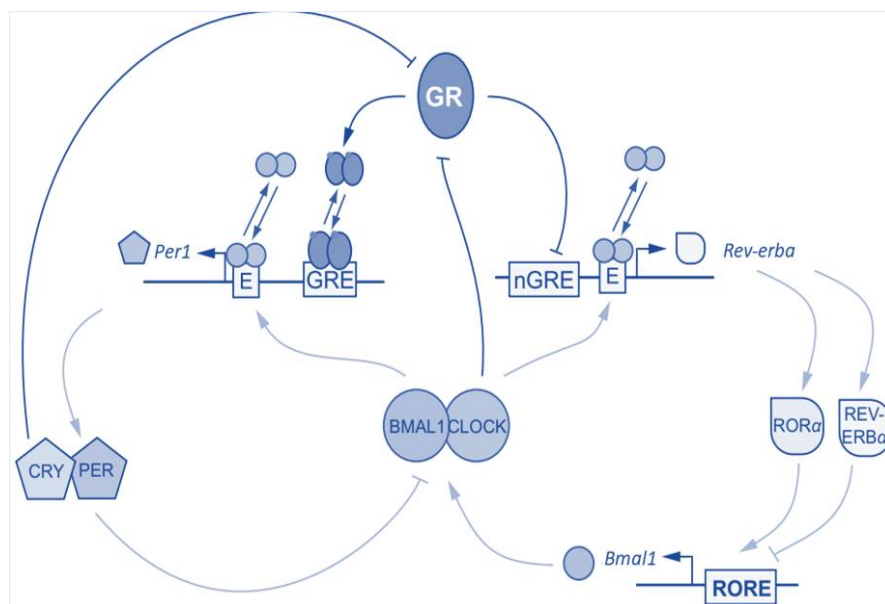


Slika 2.5. Molekularne interakcije između (HPA) i sistema cirkadijalnog časovnika u bazalnim uslovima, uslovima akutnog i hroničnog stresa. Preuzeto uz izmene Nicolaides i sar., 2017.

2.2.5. Uticaj glukokortikoida na časovnik

Utvrđeno je da je dnevni GCs ritam u plazmi izuzetno stabilan i održava se, kada su ispitanici u mirovanju sa normalnim dnevnim aktivnostima (Kalsbeek i sar., 2011). Međutim, kao što je pomenuto, promene u cirkadijalnoj sekreciji GC nakon akutnog i hroničnog stresa primećene su i kod ljudi i kod glodara (Miller i sar., 2007, 2008; Sterlemann i sar., 2008; Kinoshita i sar., 2012; Cheon i sar., 2013). Nekoliko studija ukazuje da vreme primene

stresora određuje fiziološki odgovor. Pacovi izloženi buci tokom 10 minuta reagovali su dodatnim oslobađanjem GC u vreme kad je endogeni bazalni nivo GC povećan, dok pacovi izloženi buci tokom 10 minuta nisu značajno povećali nivo GC kada je bazalni nivo GC bio nizak. Ovo bi moglo da ukazuje na to da bazalni ritam GC dinamički komunicira sa sposobnošću organizma da reaguje na stres. Pretpostavlja se da tokom sekretorne faze brzo rastući GC izazivaju brzu povratnu informaciju o oslobađanju ACTH iz hipofize što rezultira inhibitornom fazom pulsa. Ova inhibitorna faza je kratkotrajna, što omogućava pokretanje novog pulsa u kratkom vremenskom okviru (Lightman, 2008). Promene na izlazu cirkadijalnog sistema mogu se pripisati biološkom časovniku u SCN-u ili mogu nastati usled promena izazvanih u perifernim oscilatorima. Smatra se da postoji direktan efekat GC-a na periferne časovnike. Resetovanje perifernih oscilatora posredovano GC može biti posebno važno u akutnim i hroničnim stresnim situacijama, jer organizam treba da prilagodi aktivnost povezanu sa ritmom svog tela kako bi pravilno reagovao na stresor (Nader i sar.,



Slika 2.6. Interakcije između glukokortikoida i povratne petlje cirkadijanskog časovnika preuzeto uz izmene iz Dickmeis i sar. 2013.

2010). Geni časovnika, poput *Per1/Per2* poseduju GRE u svom promotorskom regionu. To omogućava da GR utiču na ekspresiju nekoliko gena časovnika i srodnih gena, što može dovesti do resetovanja cirkadijalnih ritmova. *Ex vivo* je pokazano je da sintetički glukokortikoid Deksametazon indukuje

ekspresiju *Per1* mRNA u kultivisanim fibroblastima pacova, kao i mRNA *Bmal1* i *Clock* u neutrofilima i limfocitima (Balsalobre i sar., 2000). Slično tome, miševi izloženi akutnom stresu pokazali su povećanu ekspresiju *Per1* u perifernim organima, poput jetre, srca i bubrega (Yamamoto i sar., 2005). Suprotno tome, pokazano je da je transkripcija *Rev-erba* i *Rora* smanjena usled delovanja sintetičkog glukokortikoida u tkivu jetre (Torra i sar.,

2000). Poslednje decenije spekuliše se o tome da hronični stres može dovesti do trajne desinhronizacije između SCN i časovnika u perifernim tkivima (Albrecht, 2010). Hronični stres kod miševa izmenio je ritmičku ekspresiju osnovnih gena časovnika, kao što su *Clock*, *Bmal1*, *Per1* i *Cry1* u jetri, ali ne i SCN, što je doprinelo metaboličkim poremećajima poput rezistencije na insulin (Takahashi i sar., 2013).

2.3. Leydig - ove ćelije

Leydig - ove ćelije su ćelije intersticijalnog tkiva testisa. Sisarski testisi smešteni su van abdominalne duplje, u skrotumu i čine ih nevaskularizovani seminiferne tubule i vaskularizovano intersticijalno tkivo. Seminiferne tubule čine Sertoli-jeve ćelije i germinativne ćelije, okružene peritubularnim mioidnim ćelijama. Intersticijum, je smešten između seminiferne tubule i kao što je već pomenuto, sadrži Leydig-ove ćelije, ali i testikularne makrofage, fibroblaste, krvne i limfne sudove i nerve. Utvrđeno je da u testisu pacova seminiferne tubule iznose 82,4% zapremine, 15,7% zapremine je intersticijsko tkivo i 1,9% je zapremina kapsule kojom je tkivo obmotano (Christensen i Fawcett, 1966; Mori i Christensen, 1980).

Različitost u veličini i građi Leydig-ovih ćelija kod sisara zavisi od vrste i razvojnog perioda (Kerr i Knell, 1988). Najvažnija karakteristika Leydig-ovih ćelija je produkcija androgena, čime one zauzimaju vrlo važnu ulogu u kontroli fizioloških procesa. Rani dokazi o endokrinoj funkciji Leydig-ove ćelije su proizašli iz različitih studija, još početkom dvadesetog veka. 1929. je utvrđeno da je testosteron hormon koji luče ćelija testisa, Leydig-ove ćelije (Gallagher i Koch, 1929; Christensen, 2007). Da je funkcija Leydig-ovih ćelija kontrolisana hipofiznim hormonima prvi put je demonstrirao Smith 1930. Kasnije su Hall i sar. 1969. godine pokazali da se konverzija holesterola u testosteron dešava u Leydig-ovim ćelijama (Dupont i sar., 1993; Christensen i Peacock, 1980; Christensen, 2007).

Kompleksna funkcionalna organizacija Leydig-ovih ćelija i njihovog okruženja je u skladu sa njihovom vrlo značajnom ulogom, odnosno produkcijom androgena. Međutim, iako se godinama istražuje, određeni segmenti građe i funkcionalnosti, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.

2.3.1. Izvori holesterola u Leydig-ovim ćelijama i proces steroidogeneze

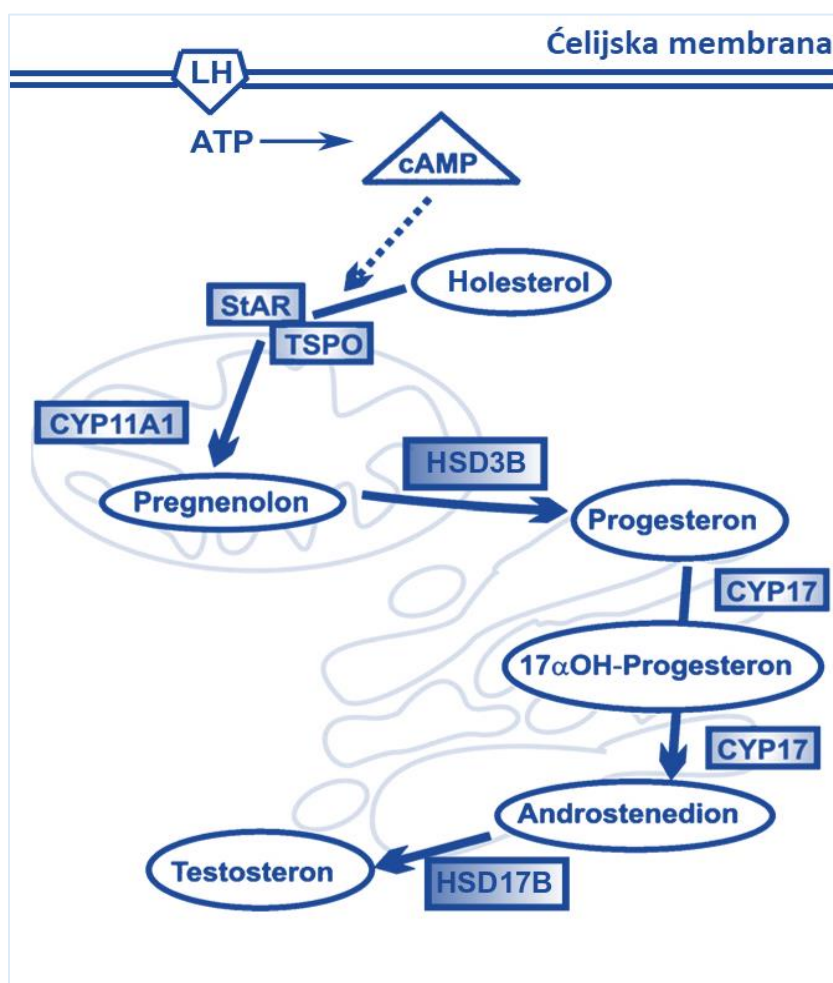
U Leydig-ovim ćelijama kao i u drugim steroidogenim tkivima kao što su nadbubrežne žlezde, jajnici i placenta, holesterol se koristi kao prekursor tokom produkcije steroida, odnosno steroidogeneze. Do sada su ustanovljena četiri potencijalna izvora holesterola za steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama: *de novo* sinteza, egzogeni holesterol iz lipoproteina, skladišteni holesterol estri i holesterol iz plazma membrane.

De novo sinteza holesterola od acetil-koenzima A (acetyl-CoA) u Leydig-ovim ćelijama, dešava se u endoplazmatičnom retikulumu i uključuje veći broj enzimskih reakcija. Holesterol koji je *de novo* sintetisan može se koristiti za sintezu hormona ili može biti skladišten kao slobodni holesterol u membranama ili kao holesterol estar u vidu lipidnih kapljica. Količina *de novo* sintetisanog holesterola nije dovoljna za funkcionisanje ćelije, pa ćelije moraju obezbediti holesterol i na druge načine (Azhar i Reaven, 2007; Wayne, 1990). Leydig-ove ćelije holesterol unose procesom endocitoze uz pomoć LDL (*engl. low-density lipoprotein*) receptora i ovo predstavlja neselektivni put unosa holesterola (*engl. "non-selective" cholesterol uptake pathway*) (Brown i Goldstein, 1986, Payne i Hardy, 2007). Preuzimanje holesterola iz lipoproteina velike gustine (HDL) označava se kao put selektivnog unosa holesterola (*engl. "selective" cholesterol uptake pathway*). Ovo je osnovni i najvažniji put dopremanja holesterol estara do steroidogenih tkiva kod čoveka i glodara (Azhar i Reaven, 2007). Sve steroidogene ćelije nastoje da deo holesterola sačuvaju u njegovoj esterifikovanoj formi u vidu lipidnih kapi kao rezervu koja može biti kasnije upotrebljena za održavanje membrana, ali i kao supstrat za sintezu steroidnih hormona. Holesterol estri se generišu u endoplazmatičnom retikulumu posredstvom enzima acil-CoA:holesterol-acil-transferaza i sa triacilglicerolom ugrađuju se u centralni deo lipidnih kapi. U ovom slučaju, kao i pri unosu holesterola preko receptora, da bi bio iskorišćen, holesterol mora prvobitno biti preveden do slobodnog, aktivnošću enzima (Payne i Hardy, 2007).

U testisima, proces prevođenja holesterola u steroide u Leydig-ovih ćelija hormonski je regulisana putem hipotalamo-hipofizno-testikularne osovine. Osnova funkcionisanja ove osovine je tonična pulsatorna električna aktivnost hipotalamičnih neurona i posledična

sekrecija GnRH (gonadotropnog hormona oslobađajućeg), koji reguliše sekreciju adenohipofiznih gonadotropin. Za regulaciju steroidogeneze u testisima odgovoran je luteinizirajući hormon (LH). Krajnji rezultat testikularne steroidogeneze, testosteron, putem negativnih povratnih sprega na nivou hipotalamusa i adenohipofize, reguliše sopstvenu produkciju (Dufau i sar., 1971, Zirkin i sar. 2018).

Stimulisanje sinteze i sekrecije testosterona započinje vezivanjem LH za receptore visokog afiniteta na površini Leydig-ovih ćelija (Catt i sar., 1972). Vezivanje LH za njegov receptor dovodi do povećane proizvodnje cikličnog adenozin 3', 5'-monofosfata (cAMP)



Slika 2.7. Biosinteza steroida u Leydig-ovim ćelijama, preuzeto uz izmene Payne i Youngblood, 1995 i Midžak i sar. 2009.

(Dufau i sar., 1973). Efekat LH ili cAMP je povećanje transporta holesterola u unutrašnju membranu mitohondrija. Prenos holesterola od spoljašnje membrane mitohondrija do CYP11A1 enzima koji omogućuje početak steroidogeneze, vrši se pomoću vrlo specifične proteinske mašinerije. Dakle, usled stimulacije hormonom, kompleks koga čine TSPO (engl. translocator protein) i VDAC1 (engl. voltage-dependent anion channel 1), regrutuje ACBD3 (engl. TSPO-associated

acylcoenzyme A binding domain containing 3), što vodi ka regrutaciji PRKA-RIa (engl. protein kinase A regulatory subunit RI α). U prisustvu hormona indukovana je i StAR protein

(*engl.* steroidogenic acute regulatory protein), koji se nakuplja na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani. StAR i VDAC intereaguju, PRKA lokalno fosforiliše StAR što dovodi do njegove povećane aktivnosti. Navedeni proteini su okarakterisani kao transducozom (*engl.* transduceosome) jer učestvuju u prenesu cAMP do spoljašnje mitohondrijalne membrane. VDCA i TSPO sa proteinima unutrašnje membrane, ATAD3 (*engl.* ATPase family AAA Domain-containing protein 3) i CYP11A1, predstavljaju deo kompleksa koji se naziva metabolon, i ima za cilj transportovanje holesterola do CYP11A1 gde steroidogeneza počinje (Zirkin i sar. 2018).

CYP11A1 (P-450_{scc}) katalizuje cepanje bočnog lanca holesterola i kao krajnji produkt nastaje steroid C21, pregnenolon (Fevold i sar., 1989).

HSD3B (3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza) je enzim koji može da katališe konverziju Δ 5 steroida u Δ 4 steroide (pregnenolona u progesteron, 17 α -hidroksipregnenolona u 17 α hidroksiprogesteron, dehidroepiandrosterona u androstendion). Postoje dva puta testikularne steroidogeneze. Δ 5 put steroidogeneze u testisima dominantno je zastupljen kod ljudi i viših primata. Δ 4 put testikularne steroidogeneze u testisima je dominantan kod pacova. U Leydig-ovim ćelijama pacova HSD3B katalizuje konverziju pregnenolona u progesteron. Progesteron se dalje transportuje kroz membranu mitohondrija do glatkog endoplazmatičnog retikuluma gde se C21 steroid konvertuje u C19 steroid (pregnenolona u dehidroepiandrosteron ili progesterona u androstendion). Ova reakcija je katalisana enzimom P450_{c17} (CYP17A1) i odvija se u dva koraka (Zirkin i sar. 2018). 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza (HSD17B) katališe poslednji korak u biosintezi testosterona odnosno konverziju androstendiona u testosteron (Payne, 1990, Payne i Hales, 2004).

2.3.3. Regulacija steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama

Kao što je pomenuto, steroidogeneza u Leydig-ovim ćelijama je primarno regulisana hipotalamo-hipofizno-testikularnom osovinom (*engl.* hypothalamo-pituitary-testicular axis (HPT)). Pored toga, steroidogenezu regulišu i koordinisana aktivnost nervnih, neuro-endokrinih/endokrinih, parakrinih i autokrinih signalnih mehanizama (Payne i Hales, 2004). Dakle, iako mnogi delovi mozga mogu uticati na reproduktivnu funkciju, hipotalamus se može smatrati konačnim zajedničkim putem kroz koji se vrši kontrola sekrecije androgena.

Aktivnost HPT osovine zavisi od tonične pulsatorne električne aktivnosti neurona hipotalamusa što dovodi do sekrecije gonadotropnog-oslobađajućeg hormona GnRH (*engl.* Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)). GnRH sekrecija je zavisina od aktivacije GPR54 receptora, koji se nalaze na površini GnRH neurona. GPR54 receptore aktivira kipeptin. Kipeptin sintetišu neuroni smešteni u arkuatnom nukleusu (ARC), periventralnom nukleusu, anteroventralnom periventralnom nukleusu (AVPV) i anterodorzalnom preoptičkom nukleusu. Aktivacijom receptora GPR54 dolazi do sinteze GnRH, koji biva transportovan duž aksona i čuva se u nervnim završecima eminencije medijane, odakle se pulsatorno oslobađa u portalni krvotok. Kao rezultat sekrecije GnRH gonadotropne ćelije adenohipofiza sekretuju oba gonadotropina, luteinizirajućeg (LH) i folikulostimulirajućeg hormona (FSH), a koji će od njih biti stimulisan zavisi od frekvence oslobađanja GnRH (Payne i Hardy, 2007).

Gonadotropin-inhibitornim hormonom (GnIH) deluje na hipofizu i na GnRH neurone u hipotalamusu preko G protein vezanog receptora (GPR147). GnIH smanjuje sintezu i oslobađanje gonadotropina, inhibirajući razvoj i održavanje gonada. Nedavni dokazi dalje ukazuju da GnIH deluje na nivou gonada kao autokrini/parakrini regulator steroidogeneze i gametogeneze. Istraživanja sugerišu da GnIH, takođe deluje i uzvodno od GnRH sistema i na nivou gonada kako bi na odgovarajući način regulisao reproduktivnu aktivnost tokom godišnjih doba i tokom stanja kao što je stres (Tsutsui i sar. 2012).

LH svoju aktivnost ispoljava tako što se vezuje za LH receptor (LHR) na membrani Leydig-ovih ćelija. LH receptor ima sposobnost da veže i humani horionski gonadotropin (hCG). Vezivanje LH za LHR na membrani Leydig-ovih ćelija predstavlja stimulus za produkciju testosterona. Testosteron proizveden u Leydig-ovim ćelijama zajedno sa FSH ima ulogu u regulaciji spermatogeneze preko Sertolijevih ćelija. Testosteron, takođe, preko negativne povratne sprege, reguliše eksprimiranje kipeptina na nivou arkuatnog nukleusa i AVPV, GnRH na nivou hipotalamusa i LH na nivou hipofize (Dufau, 1988; Saez, 1994; Payne i Hales, 2004; Andric i Kostic, 2019).

2.3.3.1. Uloga cirkadijalnog časovnika u regulaciji steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama

Poznato je da pik nivoa testosterona gotovo uvek prati pik nivo sekrecije LH (Sanford i sar., 2011). Prilikom merenja koncentracija LH i testosterona u cirkulaciji adultnih muškaraca utvrđeno je da se pik testosterona uglavnom javlja oko 45 minuta nakon pika LH (Veldhuis i sar., 1987). Pokazano je da su generatori ovih pulseva smešteni u hipotalamusu i preoptičkoj regiji i da regulišu oslobađanje GnRH u hipotalamo-hipofizni portni sistem čime se implicira oslobađanje LH (Bergendahl i sar., 1996). Odgovor Leydig-ovih ćelija na LH zavisi od njegovog pulsatornog obrazca sekrecije, koji aktivira signale puteva u Leydig-ovim ćelijama pa time i oslobađanje testosterona (Bittman, 2016). Funkcionisanje ovog pulsatornog sistema može biti izmenjen u stresu, tokom starenja, prilikom poremećaja u ishrani, metaboličkim ili sistemskim bolestima, što svakako utiče i na vreme pika testosterona (Bergendahl i sar., 1996).

Kod ljudi pik sekrecije testosterona je na početku svetle faze (Brambilla i sar., 2009). Kod adultnih pacova, Keating i Tcholakian (1979) su pokazali da je nivo testosterona najveći tokom noći, a najniži u ranim jutarnjim časovima (Keating i Tcholakian, 1979). Rezultat potpuno suprotan ovome dobili su Thorpe i sar. (2012), dok su Mock i sar. (1978) dobili rezultate sa pikovima testosterona u sredini dana, večernjim časovima i sredini noći (Mock i Frankel, 1978; Thorpe i sar., 2012). Baburski i sar. pokazali su da je pik testosterona u sredini dana neposredno pred ili na početku tamne faze (Baburski i sar., 2019, 2016, 2015). Kao što je ranije navedeno na ovakve rezultate mogu uticati razna stanja u kojem se organizam nalazi, međutim, ono što i dalje nije potpuno razjašnjeno jeste pitanje da li na ovakve razlike u vremenu pika testosterona isključivo utiče centralni oscilator i ritam sekrecije LH ili ulogu ima i periferni časovnik u samim ćelijama. Testis se često navodi kao izuzetak od pravila funkcionisanja molekularnih časovnika. Za razliku od nekih drugih organa eksprimiranost gena časovnika u testisima više je konstantna nego ritmična, tako da prema nekim autorima, funkcionisanje časovnika u ovom organu odstupa od klasičnog (Alvarez i sar., 2003). Istraživanja na Leydig-ovim ćelijama pokazala su, međutim cirkadijalan obrazac sekrecije glavnih gena časovnika (Baburski i sar., 2016, 2015).

Do sada je pokazano da kod pacova geni časovnika (*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba*, *Rev-erbb*, *Rorb*) kao i geni uključeni u proces steroidogeneze (*Nur77*, *Star*, *Cyp17a1*, *Cyp11a1*) imaju ritmičke ekspresije u Leydig-ovim ćelijama (Baburski, 2015; Baburski, 2016). Knock-out BMAL1 životinje pokazale su značajno smanjen nivo mRNK *Per2*, *Nr1d1*, *Dbp*, *Star*, *Sf1*, *Nur7*, dramatično smanjen nivo proteina StAR i HSD3B2 kao i produkcija testosterona. Suprotno tome, prekomerna ekspresija BMAL1 značajno je povećala nivoe ekspresije mRNK i proteina StAR i HSD17B3 i poboljšala proizvodnju testosterona (Alvarez i sar., 2008; Xiao i sar., 2010). Eksperimentima je takođe utvrđeno su da je BMAL1, aktivirao transkripciju HSD17B3 *ex vivo* (Xiao i sar., 2010.). Farmakološkom blokadom *Per1* u ćelijskoj liniji humanih nadbubrežnih žlezda NCI-H295R, pokazano je da *Per1* reguliše ekspresiju *Hsd3b ex vivo*. Ovi rezultati su potvrđeni *in vivo*: miševi sa smanjenom ekspresijom *Per1* imali su smanjene nivoe aldosterona u plazmi i smanjenu ekspresiju mRNA *Hsd3b* (Richards i sar., 2013).

Tabela 2.1. Uticaj delecije gena časovnika na reprodukciju kod muškog pola.

Gen	Vrsta	Efekat	Referenca
<i>Bmal1</i> (-/-)	Miš	Nizak testosteron i visok LH u serumu.	Alvarez, 2008.
		Redukcija ekspresije steroidogenih gena.	
		Redukcija boja spermatozoida.	
<i>Bmal1</i> (-/-)	Miš	Skraćen životni vek.	Kondratov, 2006
<i>Bmal1</i> (-/-)	Leydig-ove ćelije jarca	Smanjena ekspresija steroidogenih gena i proteina.	Xiao, 2021
<i>Clock</i> (-/-)	Miš	Smanjena fertilnost spermatozoida.	Dolatshad, 2006.
		Promene u nivou testosterona.	
		Smanjena aktivnost akrozina.	
		Smanjena plodnost.	
<i>Cry1</i> (-/-)	Miš	Izmenjena ekspresimiranost gena uključenih u spermatogenezu.	Li, 2018

2.3.3.2. Uticaj glukokortikoida na regulaciju steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama

Brojne studije pokazale su da glukokortikoidi inhibiraju steroidogenezu *in vivo* (Doerr i sar., 1976; Briski i Sylvester, 1991; Marić i sar., 1996; Daniel i Newell-Price, 2015). Takođe je pokazano da glukokortikoidi inhibiraju steroidogenezu *ex vivo* u Leydig-ovim ćelijama (Chen, 2013).

Glukokortikoidi na Leydig-ove ćelije testisa deluju direktno, putem vezivanja za glukokortikoidni receptor (GR). Brojne studije su pokazale da GC direktno inhibiraju transkripciju gena koji kodiraju enzime uključene u steroidogenezu, čime dovode do smanjenja nivoa testosterona u serumu. Primećena je inhibicija transkripcije *Cyp11a1*, *Star*, kao i *Cyp17a1* gena (Hales i Payne, 1989; Payne, 1990; Wang i sar., 2000). Xiao i sar. su u svom *ex vivo* istraživanju na primarnoj kulturi progenitornih Leydig-ovih ćelija potvrdili ove rezultate i primetili smanjenu ekspresiju *Hsd3b* gena usled delovanja sintetskih glukokortikoida (Xiao i sar., 2010). Zanimljivo je da promotori nekih od ovih steroidogenih gena inhibirani glukokortikoidima ne sadrže GRE, što može sugerisati postojanje indirektnih mehanizama regulacije. Stepenu u kom GC inhibiraju funkciju Leydig-ovih ćelija u korelaciji je sa unutarćelijskom koncentracijom GC i oksidativnom aktivnošću HSD11B, enzima koji katalizuje i oksidativne i reduktivne reakcije glukokortikoida. Postoje dve izoforme HSD11B pomoću kojih Leydig-ove ćelije regulišu unutarćelijsku koncentraciju nivoa glukokortikoida. HSD11B1 u Leydig-ovim ćelijama ima ulogu dehidrogenaza, dok je HSD11B2 oksidativni enzim. U stresnim okolnostima, oksidativni kapacitet HSD11B1 u Leydig-ovim ćelijama može biti premašen visokim nivoom glukokortikoida što dovodi do suzbijanja biosinteze testosterona. Postoje studije o dinamičkoj sprezi između HSD11B1 i drugih enzima odgovornih za biosintezu testosterona. HSD11B1 enzim obezbeđuje redoks potencijal za enzime CYP17A1 i HSD17B3. Ovo bi takođe moglo objasniti brze efekte glukokortikoida na smanjenu produkciju testosterona (Ge i sar., 1997, 2005). Takođe, pokazano je da smanjena produkcija testosterona može biti rezultat brzih negenomskih mehanizama delovanja glukokortikoida. Primena sintetskih glukokortikoida dovela je do smanjenja nivoa cAMP u roku od 15 minuta, dok je pad nivoa testosterona uočen posle 30 minuta. Pretpostavlja se da je ovakav brz odgovor zapravo rezultat delovanja membranskog GR (Hu i sar., 2008). Pored toga što inhibiraju sintezu androgena, (Gao i sar. 1996), poznato je i da glukokortikoidi mogu

da dovedu i do apoptoze Leydig-ovih ćelija, čime utiču na stresom-indukovanoj smanjenoj sintezi testosterona (Gao i sar. 2002; Xiao i sar. 2012).

Takođe, kao što je već pomenuto direktan efekat GC-a na periferne časovnike u Leydig-ovim ćelijama je vrlo verovatan. Pretpostavka je da se efekti GC na steroidogenezu delimično ostvaruju i putem regulacije gena časovnika kao i gena koji kodiraju enzime uključene u steroidogenezu. Zbog toga je važno definisati odnose između stres-reaktivnog odgovora Leydig-ovih ćelija, uključujući delovanje GC, i organizacije biosinteze testosterona na vremenskoj skali. Pogotovo što poremećaji tih odnosa, povezani sa poremećajima ritma, mogu imati za posledicu smanjenu reproduktivnu sposobnost jedinke. Studije koje izučavaju efekte poremećaja ritma na reproduktivnu sposobnost jedinke su nepohodne i imaju veliki doprinos ne samo u otkrivanju molekularnih mehanizama funkcionisanja organizma, već mogu imati značaj i u prevenciji mnogih reproduktivnih problema.

3. Ciljevi

Imajući u vidu značaj cirkadijalnog časovnika u funkcionisanju organizma, kao i njegovu ulogu u održavanju reproduktivne sposobnosti, vrlo je bitno utvrditi na koji način mehanizmi časovnika funkcionišu u uslovima poremećene homeostaze. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su osmišljena sa ciljem da se ispita hipoteza o regulatornom uticaju glukokortikoida na cirkadijalnu aktivnost Leydig-ovih ćelija. Sa tim u vezi postavljeni su sledeći ciljevi:

Ispitati efekte glukokortikoida na obrazac ekspresije gena časovnika, gena povezanih sa steroidogenezom, kao i drugih gena od značaja za endokrinu funkciju Leydig-ovih ćelija na modelima:

- akutnog i ponavljalog stresa;
- mužjaka pacova tretiranih sintetskim glukokortikoidima;
- primarne kulture ćelija.

Ispitati posredovanje glukokortikoidnog receptora u promeni cirkadijalnog obrazca genske ekspresije koristeći modele *in vivo* intratestikularne i *ex vivo* receptorne blokade.

Utvrditi korelaciju između cirkadijalne fluktuacije glukokortikoida i glukokortikoidnog receptora u Leydig-ovim ćelijama i transkripcije ispitivanih gena.

Analizirati efekte stresom izazvanog porasta glukokortikoida na transkripciju gena povezanih sa časovnikom i steroidogenezom u zavisnosti od diurnalnog vremena.

Na osnovu dobijenih rezultata i literaturnih podataka, **definisati** mogući mehanizam delovanja glukokortikoida na cirkadijalni časovnik i elemente steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama.

4. Materijal i metode

Ogledi uključeni u izradu ove doktorske disertacije izvedeni su u Laboratoriji za Hronobiologiju i starenje i Laboratoriji za Reproductivnu endokrinologiju i signaling, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Eksperimenti su finansirani kao deo projekta ministarstva (OI 173057) i Civ-CERES, kao i projekata APV (3822 i 2130). Ogledi su odobreni od strane lokalnog Etičkog komiteta Univerziteta u Novom Sadu (broj odobrenja: I-2011-02, III-2011-04, 01-201/3, II-2020-01-02) i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije – Uprava za veterinu (broj rešenja: 323-07-0-00345/2020-05) i izvedeni u skladu sa uputstvom o gajenju, čuvanju i upotrebi laboratorijskih životinja Nacionalnih instituta za zdravlje u USA (*National Institute of Health Guide for the Care i Use of Laboratory Animals*; NIH Publications No. 80 23, revised 1996, 7th edition).

4.1. Hemikalije

Serum Anti-testosteron-11-BSA No. 250 je dobijen ljubaznošću Gordon D. Niswender, Colorado State University, Fort Collins, CO. (1,2,6,73H(N))-testosteron je kupljen od Perkin-Elmer Life Sciences (www.perkinelmer.com). Dekstran T-70 je kupljen od Pharmacia (www.pfizer.com), a aktivni ugljik kupljen je od kompanije Serva (www.serva.de). Hemikalije koje su korišćene za SDS-PAGE elektroforezu, akrilamid/bis-akrilamid, N,N,N',N'-tetrametiletlen-diamin (TEMED), amonijum persulfat i Commassie boja za proteine (CBB) kupljene su od Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com), pufer za pripremu uzoraka za SDS elektroforezu (loading pufer) kupljen od Quality biological inc. (Gaithersburg, MD, SAD) (www.qualitybiological.com). Inhibitor fosfataza kupljen je od Calbiochem (La Jolla, CA, USA) (www.emdmillipore.com). Supstrat za detekciju Western blot, SuperSignal West Pico Chemiluminescent kupljen je od kompanije PIERCE (Rockford, USA) (www.thermofisher.com). Medijum DMEM-F12, medijum 199 koji sadrži Earle so i L-glutamin (M199), goveđi serum albumin (BSA, frakcija V), etilendiamintetra-acetatna kiselina (EDTA), HEPES, fosforna kiselina, perkol, ditiotritol (DTT), kolagenaza (engl. Collagenase, Type IA) iz *Clostridium histolyticum*, rastvor tripan plavog (Trypan Blue 0,4 %), β -glicerofosfat, tergitol (Niaproof 4, tip 4), leupeptin, aprotinin, etidijum-bromid i agaroz kupljeni su od kompanije

Sigma (St. Louise, MO, SAD) (www.sigmaaldrich.com). Kombinacija penicilin/streptomycin je kupljena od Capricorn Scientific (www.capricorn-scientific.com).

Trizol korišćen za izolaciju RNA je kupljen od Sigmee, St Louis, MO (www.sigmaaldrich.com). Komplet za izolaciju ukupne RNK (Rneasy kit) kupljen je od kompanije Qiagen (www.qiagen.com). Komplet za pripremu cDNK (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) kupljen od kompanije Applied Biosystems (www.thermofisher.com). TaqMan Low Density Rat PDE Panel, TaqMan Universal PCR Master Mix i Power SYBR Green PCR Master Mix su kupljeni od Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com), dok su prajmeri za real-time PCR (RQ-PCR) kupljeni su od Integrated DNA Technologies (www.dnatechnologies.com).

4.2. Eksperimentalne životinje

U radu su korišćeni isključivo adultni mužjaci belih pacova soja *Wistar*, starosti 3-4, meseca i telesne težine 250-400 g. Životinje su uzgajane u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, pri standardnim laboratorijskim uslovima kontrolisanog osvetljenja (14h svetlo/10h mrak, pri čemu je svetlo uključivano ujutru u 6h ili 7h) i kontrolisane temperature od 22 ± 2 °C. *Wistar* pacovi su noćne životinje sa periodom aktivnosti tokom noći. Hranjene su standardnom peletiziranom laboratorijskom hranom za pacove (Veterinarski zavod, Subotica). Hrana i voda su bili dostupni *ad libitum*.

4.3. Eksperimentalni modeli

U cilju definisanja uloge glukokortikoida u modulaciji cirkadijalnog časovnika u steroidogenim ćelijama analizirani su rezultati pet *in vivo* i jedanog *ex vivo* eksperimentalnog modela:

- (1) Eksperimentalni model akutnog psihofizičkog stresa primenom imobilizacije (IMO) u različitim vremenskim tačkama u toku 24h;
- (2) Model 10 puta ponovljene IMO u različitim vremenskim tačkama u toku 24h;
- (3) Akutna IMO na početku svetle faze praćena analizom ritmičke steroidogene sposobnosti u satima nakon IMO tretmana;

(4) Model tretmana sintetičkim glukokortikoidom na početku svetle faze i praćenje ritmičke steroidogene sposobnosti u satima nakon IMO tretmana;

(5) *In vivo*, intratestikularna blokada glukokortikoidnog receptora praćena IMO tretmanom.

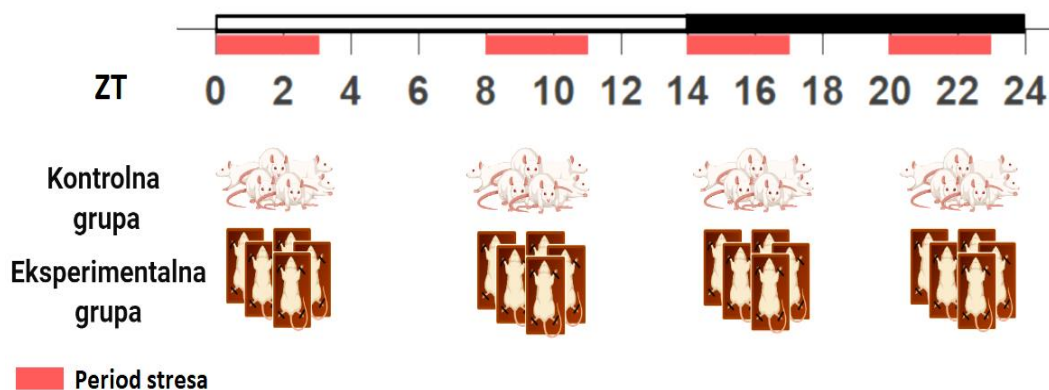
(6) *Ex vivo* tretman primarne kulture Leydig-ovih ćelija sa agonistom (Hydrocortisone) i antagonistom (RU486) glukokortikoidnog receptora i praćenje eksprimiranosti elemenata časovnika u Leydig-ovim ćelijama.

Primenjivana IMO je izvršena kako je prethodno opisano (Kvetňanský i Mikulaj, 1970; Kostic i sar., 1997). Pacovi su se svakodnevno prilagođavali na hvatanje tokom perioda od 3 nedelje pre eksperimenata. Imobilizacija podrazumeva fiksaciju ekstremiteta u ekstenziji za drvenu ploču, pomoću kanapa, pri čemu je životinja dorzalno postavljena i pokreti glavom nisu ograničeni. Pacovi koji su se slobodno kretali predstavljali su kontrolnu grupu u svim eksperimentalnim modelima. Sve aktivnosti tokom tamne faze obavljane su pod crvenim svetlom. Nakon eksperimenata izvršena je eutanazija životinja dekapitacijom. Nakon dekapitacije životinja, sakupljana je krv iz koje je dobijen serum, koji je koristio za merenje nivoa hormona, uzimani su uzorci testisa iz kojih su izolovane Leydig-ove ćelije i uzorci adenohipofiza. Iz uzoraka Leydig-ovih ćelija i adenohipofiza je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti gena pomoću RQ-PCR. Uzorci Leydig-ovih ćelija i adenohipofiza korišćeni su i za analizu nivoa proteina pomoću "Western blot" metode. Za sve *in vivo* eksperimente, pacovi su nasumično podeljeni u kontrolne i eksperimentalne grupe u 3 ili 4 vremenske tačke u toku 24h. Grupe su bile sačinjene od 5 ili 6 životinja. Prethodno dobijeni rezultati israživanja u okviru Laboratorije za hronobiologiju i starenje pokazala su da su ovako formirane grupe pacova dovoljne za izračunavanje parametara cirkadijalnog ritma (Baburski i sar., 2015; 2016; 2019). Veličina uzorka proverena je upotrebom i softvera "G Power Analysis" (<http://core.ecu.edu/psyc/wuenschk/Power.htm>). *Ex vivo* ogled ponavljen je tri puta.

4.3.1. Eksperimentalni model akutnog psihofizičkog stresa primenom IMO u različitim vremenskim tačkama u toku 24h

Radi analiziranja uticaja akutne IMO na cirkadijalnu aktivnost Leydig-ovim ćelijama, pacovi su bili izloženi IMO tokom 3h u različitim periodima tokom 24h (ZT0-3, ZT8-11, ZT14-

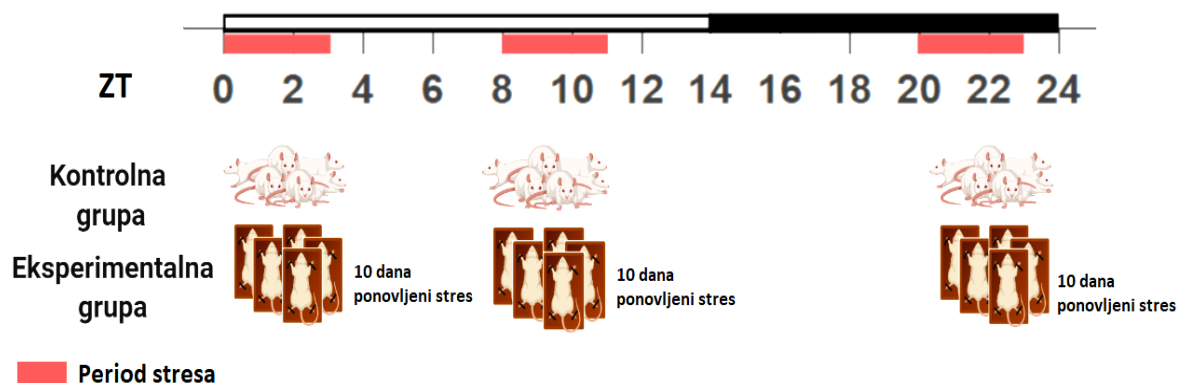
17 i ZT20-23; ZT0 je vreme kada je svetlo uključeno) (Sl. 4.1). Kontrolnu grupu u ovom kao i svim ostalim eksperimentalnim modelima, sačinjavale su životinje koje nisu uznemiravane i mogle su slobodno da se kreću.



Slika 4.1. Model 10 puta ponovljene IMO u različitim vremenskim tačkama u toku 24h. Kreirano pomoću Biorender.com

4.3.2. Eksperimentalni model 10 puta ponovljene IMO u različitim vremenskim tačkama u toku 24h

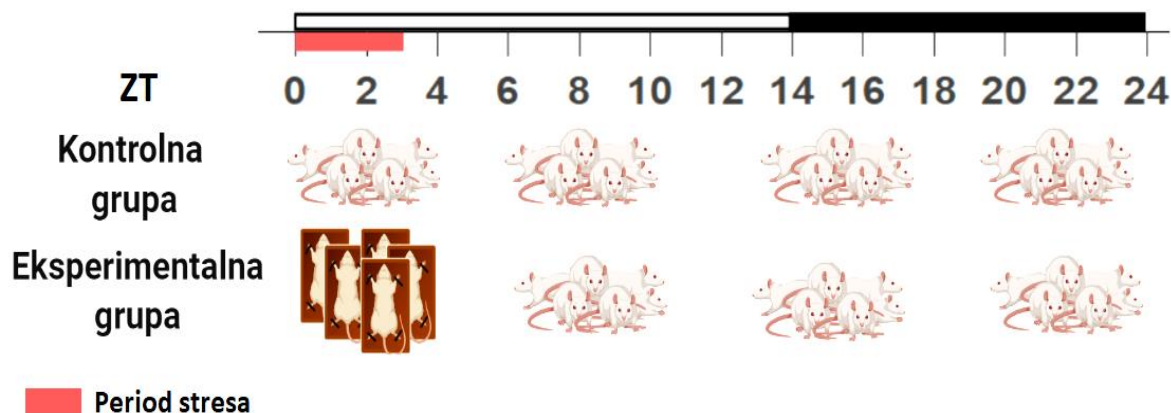
Radi ispitivanja efekata ponovljenog stresa, na cirkadijalnu aktivnost Leydig-ovih ćelija, pacovi su izlagani IMO 3 sata dnevno, tokom 10 uzastopnih dana u različitim periodima dana (ZT0-3, ZT8-11 i ZT20-23; ZT0 je vreme kada svetlo uključeno) (Sl. 4.2).



Slika 4.2. Eksperimentalni model 10 puta ponovljene IMO u različitim vremenskim tačkama u toku 24h. Kreirano pomoću Biorender.com

4.3.3. Eksperimentalni model primene akutne IMO na početku svetle faze praćene analizom ritmićke steroidogene sposobnosti u satima nakon IMO tretmana;

Radi ispitivanja efekta jutarnjeg akutnog stresa na ritmićnu aktivnost Leydig-ovih ćelija, primenjena je IMO u periodu ZT0-3. Ritmićka steroidogena sposobnost praćena je odmah posle, kao i u satima nakon IMO (ZT3, ZT11, ZT17 i ZT23).

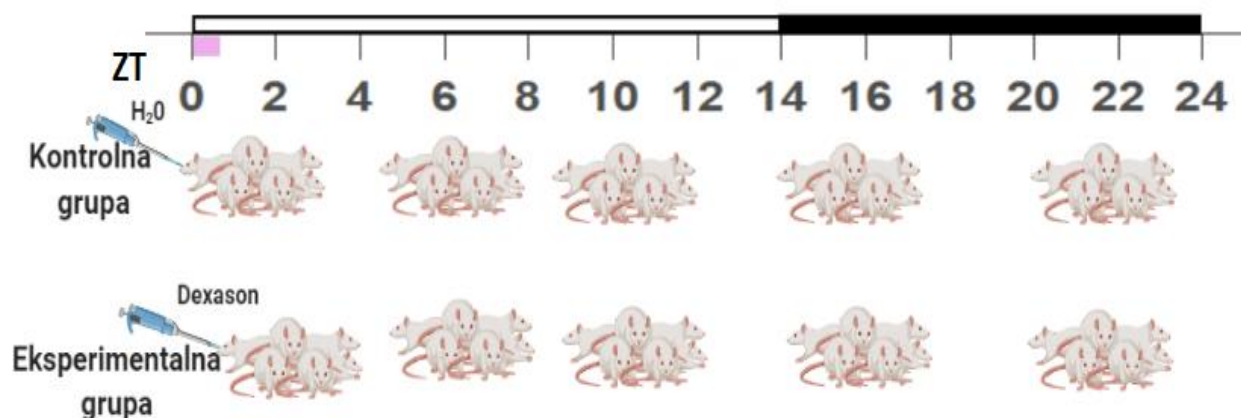


Slika 4.3. Eksperimentalni model primene akutne IMO na početku svetle faze praćena analizom ritmićke steroidogene sposobnosti u satima nakon IMO tretmana; Kreirano pomoću Biorender.com

4.3.4. Ekperimentalni model tretmana sintetićkim glukokortikoidom na početku svetle faze i praćenje ritmićke steroidogene sposobnosti u satima nakon tretmana

Da bi ispitali da li glukokortikoidi imitiraju efekte IMO na cirkadijalnu aktivnost Leydig-ovih ćelija, pacovi su oralno tretirani Dexason-om (Dexason, Galenika, SRB; 0,01 mg / 50 μ L / 100 g BV) u ZT0 i efekti su analizirani nakon tretmana u ZT3, ZT11, ZT17, odnosno ZT23. Kontrolni pacovi su istovremeno oralno dobijali 50 μ L vode. Radi analiziranja uticaja Dexason-a na spontanu lokomotornu aktivnost (deset dana pre i ćetiri dana posle tretmana), pacovi su smećteni u pojedinaćne kaveze sa sistemom toćka za trćanje koji je povezan sa uređajem za detekciju broja obrtaja. Sistem je podećšen da belećži okrete toćka koje je ųivotinja napravila svakih 6 minuta. ųivotinje su u pojedinaćne kaveze sa sistemom toćka za trćanje smećstene deset dana pre tratmana, a njihova aktivnost praćena je do tri dana nakon tretmana. Doza Dexason-a je odrećdena na osnovu priblićznog nivoa glukokortikoida u krvi nakon

stresa, prema rezultatima koju se publikovali Hales i Payne, 1989, Rengarajan i Balasubramanian, 2008, Andric i sar. 2013.



Slika 4.4. Ekperimentalni model tretmana sintetičkim glukokortikoidom na početku svetle faze i praćenje ritmičke steroidogene sposobnosti u satima nakon tretmana. Kreirano pomoću Biorender.com

4.3.5. Eksperimentalni model *In vivo*, intratestikularne blokade glukokortikoidnog receptora praćena IMO tretmanom

Kako bi analizirali značaj glukokortikoidnog receptora u Leydig-ovim ćelijama u promena uzrokovanih usled primene IMO, u testise eksperimentalnih životinja je 12h pre IMO iniciran RU486, antagonist GR/PR, 20 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$). Uzorci krvi i tkiva su sakupljeni neposredno po završetku IMO. Kontrolne životinje su primile 20 μL DMSO/testisa u isto vreme kada i eksperimentalne životinje RU486, kako je ranije opisano (Stojkov, 2012, Andric, 2013).

4.3.6. Eksperimentalni model *ex vivo* tretmana primarne kulture Leydig-ovih ćelija sa agonistom (Hydrocortisone) i antagonistom (Mifepristone, RU486) glukokortikoidnog receptora

Da bi se dobili podaci o direktnom uticaju glukokortikoida na periferni časovnik i steroidogenezu Leydig-ovih ćelija, izvršen je *ex vivo* ogled. Leydig-ove ćelije su izolovane iz testisa odraslih pacova i zasađene u petri ploče (3×10^6 Leydig-ovih ćelija/ 55 mm ili 5×10^6 Leydig-ovih ćelija/90 mm). Nakon perioda odmora, ćelije su sinhronizovane (resetovane) dodatkom inkubacionog medijuma koji sadrži 10% fetalni serum teleta (DMEM/F12 –

10%FBS). Nakon 4h inkubacije u CO₂ inkubatoru pri temperaturi od 34 °C, medijum je zamjenjen sa stimulacionim medijumom. Leydig-ove ćelije su tretirane sa Hydrocortison-om (100 nM), RU486 (1 µM) ili njihovom kombinacijom, tokom 3 sata. Nakon tretmana Leydig-ove ćelije su isprane i uskladištene na -80 °C za izolaciju RNK. Doza Hydrocortison-a korišćena u *ex vivo* eksperimentima odabrane su na osnovu približnog nivoa glukokortikoida u krvi nakon stresa, prema rezultatima koju se publikovali Hales i Payne, 1989, Rengarajan i Balasubramanian, 2008, Andric i sar. 2013.

4.4. Određivanje koncentracije hormona

Određivanje koncentracije androgena (T+DHT) vršeno je radioimunološkom analizom (RIA) (Kostic i sar., 1997). Prilikom određivanja koncentracije testosterona u uzorcima nije vršeno razdvajanje testosterona (T) od DHT. Kako korišćeni anti-testosteron-11-BSA serum No. 250 pokazuje visok stepen unakrsne reakcije sa DHT (100 %), dobijene vrednosti predstavljaju sumu T+DHT. Neophodno je napomenuti da je kod odraslog mužjaka pacova koncentracija T skoro 20 puta veća od koncentracije DHT (Punjabi i sar., 1983). Preciznost RIA metode za testosteron bila je 6 pg/epruveti, a koeficijent varijacije u okviru jedne analize 5-8 %. Za nivo kortikosterona u serumu korišćen je EIA komplet kortikosterona (Caimanchem, Michigan, USA) sa 30 pg/ml kao najniži standard (Stojkov i sar. 2012). Nivo glukoze u serumu procenjen je korišćenjem sistema za merenje glukoze BAIER Contour plus (Baier, Basel, Švajcarska; opseg merenja 0,6-33,3 mmol/l).

4.5. Priprema primarne kulture Leydig-ovih ćelija

Nakon izolovanja testisa iz tela pacova, testisi su dekapulirani, i uklonjen je glavni krvni sud. Testikularni preparati izolovani iz jedne životinje (levi i desni testis) postavljeni su u epruvete zapremine 50 ml, u koje je prethodno dodato 3 ml medijuma M199, obogaćenog sa 20 mM HEPES, 0,25 mg/ml kolagenaze i 1,5 % BSA (M199-1,5% BSA). Tako pripremljen uzorak inkubiran je 15 min u vodenom kupatilu sa opcijom mešanja, pri temperaturi od 34 °C i oscilacijama od 120 ciklusa/minuti. Tokom ove inkubacije, dejstvom kolagenaze, vršena je razgradnja vezivnog tkiva i oslobađanje intersticijalnih ćelija testisa. Reakcija kolagenaze zaustavljena je dodavanjem 40 ml hladnog M199 medijuma koji je

sadržao 0,5 % BSA (M199-0,5% BSA) i stavljanjem epruveta u led. Odvajanje seminifernih tubula od intersticijuma testisa vršeno je filtracijom kroz najlon mrežu (Mesh No.100) u nove epruvete (50 ml) koje su potom centrifugirane 5 min na 160g. Nakon centrifugiranja dobijeni talog resuspendovan je u 4 ml medijuma DMEM/F12 (sa dodatkom penicilina (100 IU/ml) i streptomocina (100 µg/ml)) po testisu. U ovako dobijenoj suspenziji intersticijalnih ćelija, pored Leydig-ovih ćelija (15-18 %), prisutni su i makrofagi, kao najbrojniji (14-20 %), i u manjoj meri ćelije endotela, fibroblasti, peritubularne ćelije, germinativne ćelije, eritrociti, limfociti i ćelije vezivnog tkiva (Niemi i sar., 1986).

Primarna kultura Leydig-ovih ćelija dobijena je prečišćavanjem suspenzije intersticijalnih ćelija pomoću diskontinualnih perkolnih gradijenata. Postupak purifikacije zasnovan je na osnovnim principima gradijentnog centrifugiranja, tokom kojeg se Leydig-ove ćelije pozicioniraju u sloju koji najviše odgovara njihovoj specifičnoj gustini. Kolone na kojima su razdvajane ćelije pripremljene su naslojavanjem po 2 ili 3 ml rastvora perkola različite gustine u plastične epruvete zapremine 12 ml i to počevši od najveće gustine (1,080 g/ml), pa redom po opadajućoj vrednosti gustina, sve do najmanje (1,045 g/ml). Nakon toga, na vrh kolona naneto je po 4 ml ($35-40 \times 10^6$) suspenzije intersticijalnih ćelija. Epruvete sa ćelijama na gradijentima perkola centrifugirane su 28 min/1100g, na sobnoj temperaturi. Izdvajanje Leydig-ovih ćelija uočeno je u slojevima između 1,065/1,080 i 1,045/1,065 perkolnog gradijenta. Ove frakcije sakupljene su i isprane od ostataka perkola sa medijumom M199-0,1% BSA, a zatim centrifugirane 5 min pri brzini od 200g. Nakon centrifugiranja dobijeni talog resuspendovan je u 2,5-3 ml medijuma DMEM/F12 (sa dodatkom penicilina (100 IU/ml) i streptomocina (100 µg/ml)) po testisu.

Ukupan broj živih Leydig-ovih ćelija u suspenziji određen je upotrebom boje tripan plavo. Metoda je zasnovana na činjenici da boja može da prodre u ćelije samo ako je ćelijska membrana oštećena. Shodno tome vijabilne ćelije ostaju neobojene dok se plavo obojene smatraju nevijabilnim. Nakon mešanja 50 µl suspenzije Leydig-ovih ćelija i 50 µl 0,4 % rastvora tripan plavog, ćelije su brojane u hemocitometru. U ovim eksperimentima vijabilnost Leydig-ovih ćelija je prelazila 90%. Proporcija Leydig-ovih ćelija prisutnih u kulturi određena je ispitivanjem aktivnosti HSD3B enzima (Payne i sar., 1980). Pripremljena suspenzija sadržala je 85 – 95 % Leydig-ovih ćelija.

U slučaju *in vivo* eksperimenata, suspenzija Leydig-ovih ćelija dobijena od pojedinačnih životinja razdeljena je u tubice (1,5 ili 2 ml) koje su zatim centrifugirane 7 min/500g. Nakon centrifugiranja medijum je odliven, a talog ćelija je zamrznut i čuvan na -80 °C.

U slučaju *ex vivo* eksperimenata, Leydig-ove ćelije su pulirane i sađene u 90 mm petri ploče, u gustini 5×10^6 ćelija/ploči u 5 ml medijuma ili u 55 mm petri ploče, u gustini 3×10^6 ćelija/ploči u 3 ml medijuma. Korišćen je medijum DMEM/F12 sa dodatkom penicilina (100 IU/ml) i streptomicina (100 µg/ml). Nakon sađenja ćelije su ostavljene 3 h u CO₂ inkubatoru, pri temperaturi od 34 °C, kako bi se oporavile od procesa izolacije i zalepile za dno ploče. Nakon perioda oporavka i sinhronizacije usledili su *ex vivo* tretmani. Po završenom tretmanu ćelije su isprane sa hladnim PBS1x i čuvane na -80 °C do liziranja za analizu eksprimiranja gena RQ-PCR metodom i proteina Western blot metodom.

4.6. Analiza eksprimiranja gena

4.6.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija

Izvor RNK za analizu stepena transkripcije gena bila je primarna kultura Leydig-ovih ćelija i tkivo adenohipofiza. Ukupna RNK izolovana je upotrebom komercijalnih kompleta koji sadrže sve komponente i reagensne neophodne za izolaciju RNK (RNeasy mini kit, Qiagen i RNAqueous®-Micro Total RNA Isolation Kit, Ambion) po uputstvu proizvođača (www.qiagen.com, www.thermofisher.com) ili upotrebom TRIzol Reagent (Sigma-Aldrich) (www.sigmaaldrich.com). Da bi izolovali RNK, organi, suspenzija ćelija ili ćelije zalepljene na petri pločama lizirane su upotrebom pufera za liziranja ili trizola (1ml trizola na 100 mg tkiva ili na 5×10^6 ćelija). Tokom lize, talog ćelija iz ploča je odvajanje upotrebom špatule, ćelije i organi koji su čuvani u tubicama homogenizovani su pomoću homogenizera. Ukoliko je izolacija vršena trizolom, tečna i organska faza su razdvojene dodavanjem 1/5 zapremine hloroforma (Zorka, Šabac) na lizat/homogenat. Kada je dodat hloroform tubice su lagano invertovane kako bi došlo do mešanja faza i inkubirane 5 min na ledu. Nakon centrifugiranja, 5 min/12000g na 4 °C, gornja faza, koja sadrži RNK, je skupljena i precipitirana, dodavanjem 0,5 ml izopropanola (Lach:ner, Neratovice, Češka), 10 min na sobnoj temperaturi. RNK je istaložena centrifugiranjem 15 min/12000g/4 °C i isprana sa 80% i 100% EtOH. Nakon isparavanja alkohola, RNK je rastvorena u 20-30 µl DEPC vode. Koncentracija i čistoća RNK

u uzorcima određene su pomoću aparata Biospec-Nano (Shimadzu, Japan). Koncentracija je dobijena kao ng/ μ l, a čistoća je praćena kroz odnose A260/A280 (apsorbanca260nm/apsorbanca280nm) – ukazuje na kontaminaciju proteinima i A260/A230 (apsorbanca260nm/apsorbanca230nm) – ukazuje na kontaminaciju organskim materijama. Čistoća RNK se na osnovu oba parametra kretala u optimalnom opsegu.

U cilju eliminacije zaostale genomske DNK, rađen je tretman sa DNA-azom (DNase I, Amplification Grade; DNA-free™ DNA Removal Kit), prema upustu proizvođača (www.thermofisher.com), nakon čega je procesom reverzne transkripcije 1 μ g prečišćene RNK svakog uzorka prevedeno u cDNK. Reverznom transkripcijom, RNK je prevedena u cDNK koristeći komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription komplet sa RNase inhibitorom (Applied Biosystems, Foster City, USA) prema uputstvu proizvođača (www.thermofisher.com). Dobijena cDNK je upotrebljena je za RQ-PCR analizu.

4.6.2. Relativna kvantifikacija iRNK u PCR analizi

Relativna kvantifikacija (RQ-PCR) eksprimiranja gena je analizirna korišćenem tehnologije SYBR Green. Za detekciju amplikona korišćena je Power SYBR Green boja (www.appliedbiosystems.com). RQ PCR reakcija je izvedena u standardnim uslovima (50°C/2 min., 90°C/ 10 min.; 40 ciklusa, od kojih je svaki bio pri 95°C/15 sekundi, a potom 60 °C/1 min) korišćenjem aparata Eppendorf Master Cyclerep RealPlex 4 (Eppendorf), dok je za obradu podataka korišćen Mastercycler® eprealplex Software (Eppendorf). Za proveru integriteta cDNK i kao endogena kontrola korišćen je *Gapdh*. Uzorci su analizirani u duplikatu ili triplikatu. Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi su dizajnirani korišćenjem programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) i potpunih sekvenci gena dobijenih iz NCBI baze podataka (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sekvence prajmera pokazane su u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi

Gen	Kod prajmera u gen banci	Sekvenca prajmera	
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F:5'-TGCCAAGTATGATGACATCAA-GAAG-3'	R:5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'
<i>Cga</i>	NM_053918.2	F:5'-CAGTGTATGGGCTGTTGCTTCT-3'	R:5'-GGAACCAACATTGTCTTCTT-GGA-3'
<i>Lhb</i>	NM_012858.2	F:5'-TCTTCTGATGCCACCCACTA-3'	R:5'-TATTGGGAGGGATGGTTA-GAACA-3'
<i>Lhr</i>	NM_012978	F:5'-CGGGCTGGAGTCCATTCA-3'	R:5'-TTCTTTGGAGGGCAGTGTTC-3'
<i>Nr3c1</i>	NC_005117.4	F:5'-CGGTTAATCTGCACAGCCTAT-3'	R:5'-AAAATGGGTCGGTGCTTCTA-3'
<i>Star</i>	NM_031558	F:5'-AGCCAGCAGGAGAATGGAGAT-3'	R:5'-CACCTCCAGTCGGAACACCTT-3'
<i>Cyp11a1</i>	NM_017286	F:5'-GGGCAACATGGAGTCAGTTTACA-3'	R:5'-GACCCTCGCAGGAGAAGAGA-3'
<i>Hsd3b1/2</i>	NM_001042619.1	F:5'-GACAGGAGCAGGAGGGTTTGTGG-3'	R:5'-CTCCTTCTAACATTGTCACCTT-GGCCT-3'
<i>Cyp17a1</i>	NM_012753	F:5'-GCCACGGGCGACAGAA-3'	R:5'-GCCTTTGTTGGGAAAAATCG-3'
<i>Hsd17b4</i>	NM_024392	F:5'-CCTTTGGCTTTGCCATGAGA-3'	R:5'-CAATCCATCCTGCTCCAACCT-3'
<i>Clock</i>	NM_021856.1	F:5'-ACAGCCCCACTGTACAATACGA-3'	R:5'-TGCGGCATACTGGATGGAAT-3'
<i>Bmal1</i>	NM_024362.2	F:5'-AAGAGGCGTCGGGACAAAAT-3'	R:5'-TTCCGGGACATCGCATTG-3'
<i>Npas2</i>	NM_001108214.2	F:5'-GGCGCACCCCTGTGTACATTT-3'	R:5'-TCTTTCCCCATTTCTGCAAGTG-3'
<i>Per1</i>	NM_001034125.1	F:5'-CCTGCACACCCAGAAGGAA-3'	R:5'-GAGGTGTCAAGCCCACGAA-3'
<i>Per2</i>	NM_031678.1	F:5'-GGAAGGAGGCCAGACGTA-3'	R:5'-TGGGTCCATTTTCGTTAGAAACA-3'
<i>Cry1</i>	NM_198750.2	F:5'-ACCATCCGCTGCGTGTACAT-3'	R:5'-AGCAAAAATCGCCACCTGTT-3'
<i>Cry2</i>	NM_133405.1	F:5'-TTCCAAGGCTTTTCAAGGA-3'	R:5'-TCCCGTTCTTTCCCAAAGG-3'
<i>Rora</i>	NM_001106834.1	F:5'-GAAGAACCACCGAGAAGATGGA-3'	R:5'-CGTCCGCATAGGGCTCTTAA-3'
<i>Rorb</i>	NM_001270958.1	F:5'-CAGGAACCGTTGCCAACAC-3'	R:5'-GGACATCCTCCCAAACCTCACA-3'
<i>Rev-erba</i>	NC_005109	F:5'-GAGCATCCAGCAGAACATCCA-3'	R:5'-TTGCCATTGATACGGACAATG-3'
<i>Rev-erbb</i>	NC_005114.4	F:5'-GAACGAGAATTGCTCCATCATG-3'	R:5'-CGACATTTCCACGGACAGA-3'

4.7. Kvantitativna i kvalitativna analiza proteina

4.7.1. Određivanje količine ukupnih proteina u uzorcima

Nakon izolacije, Leydig-ove ćelije su lizirane sa 50-100 μ l pufera za liziranje koji je sadržao 20 mM HEPES, 10 mM EDTA, 40 mM β -glicerofosfat, 1 % tergitol, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,5 mM 4-(amino-etil)-benzensulfonil fluorid hidrohlorid, 20 μ g/ml aprotinina, 20 μ g/ml leupeptina i koktel inhibitora fosfataza (0,05 -bromotetramizol oksalat, 10 μ M kantaridin, 10 μ M mikrocistin-LR).

Koncentracija ukupnih proteina određena je kolorimetrijski, Bradfordovom metodom (Bradford, 1976). Izračunavanje koncentracije proteina u uzorku vršeno je na osnovu standardne krive raspona 0,4 – 3 μ g proteina, korišćenjem parametara linearne regresije. Tačke krive formirane su korišćenjem standardnog rastvora BSA koncentracije 0,2 mg/ml. Nakon određivanja koncentracije proteina u uzorcima, vršeno je njihovo ujednačavanje.

4.7.2. SDS-PAGE i Western blot

Nakon ujednačavanja uzoraka prema koncentraciji proteina, proteini su razdvajani jednodimenzionom SDS-PAGE (*engl.* Sodijum Dodecil Sulfat PoliAkrilamid Gel Elektroforeza), u kontinuiranom puferskom sistemu. Pre elektroforeze uzorci su podvrgnuti standardnoj proceduri pripreme uzoraka za SDS-PAGE (kuvanje 5 min pri temperaturi od 100° C). Uzorci su zatim mešani sa rastvorom za lodiranje koja je sadržao boju (SDS Protein Gel Loading Solution, 5x, (Quality Biological)) u odnosu 1:5 i lodirani na 7.5% ili 12% poliakrilamidni gel. Elektroforeza je vršena u Mini – PROTEAN 3 Cell (www.biorad.com) (BIORAD), pri naponu od 100 V i trajanju od oko 2 h.

Po završeno elektroforezi vršen je prenos proteina sa gela na PVDF membranu (*engl.* Polyvinylidene difluorid, Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) metodom mokrog transfera (elektroblotting) po uputstvu proizvođača (Novex, San Diego, CA, USA) (www.invitrogen.com).

Imunodetekcija je vršena različitim monoklonalnim i poliklonalnim antitelima specifičnim za ciljni protein. Detekcija je vršena pomoću supstrata za detekciju Dura ili

Femto (www.thermofisher.com). Reaktivne trake su detektovane aparatom myECL Image (www.thermofisher.com). Detektovanje proteinskih frakcija vršeno je upotrebom proteinskih markera poznatih molekularnih masa u rasponu 10-250 kDa (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, ThermoScientific). Imunoreaktivne trake analizirane su kao dvodimenzionalne slike u programu Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

U Western blot analizi korišćena su sledeća antitela:

Anti-BMAL1; Abcam, (Cambridge, UK, #ab49421, razblaženje 1:800); anti-PER1; Abcam, (Cambridge, UK, #ab3443, razblaženje 1:500); anti-GR; Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA, #MA1-510, razblaženje 1:800 ili 1:1000); anti-ACT; Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany, #sc-8432, razblaženje 1:800 ili 1:500).

4.8. Merenje aktivnosti životinja

Sistem za merenje aktivnosti životinja razvijen je u okviru Laboratorije za hronobiologiju i starenje, DBE, PMF, UNS. Sistem se sastoji od pojedinačnih kaveza sa točkom za trčanje koji je povezan sa uređajem za detekciju broja obrtaja. Sistem je podešen da beleži broj obrtaja točka koje je životinja napravila na svakih 6 minuta i zapisuje ih direktno na SDS karticu, koja omogućava prenos podataka.

Analiza izmerene aktivnosti je vršena pomoću softvera Cosinor.Online (<http://vww.circadian.org/softvar.html>) (Molcan, 2019).

4.9. Statistička analiza i analiza ritma

Rezultati predstavljaju grupne srednje vrednosti \pm SEM vrednosti pet ili više merenja. Parametri ritma (p, MESOR, amplituda i akrofaza) dobijeni su funkcijom `cosinor.lm()` iz paketa „cosinor“ (Sachs, 2015) u R okruženju (R verzija 3.6.3, RStudio verzija 1.3.1093) i/ili korišćenjem softvera Cosinor.Online (<http://vww.circadian.org/softvar.html>) (Molcan, 2019). Statistički značaj ($p < 0,05$) između tretirane grupe i kontrolne grupe u istoj vremenskoj tački analiziran je pomoću Mann-Whitney testa korišćenjem GraphPad programa (<https://www.graphpad.com>). ANOVA analiza između različitih grupa uzoraka izvršena je, takođe, korišćenjem programa GraphPad (<https://www.graphpad.com>).

Multivarijanta analiza glavnih komponenata (PCA) urađena je pomoću funkcije `dudi.pca()` implementirane u paketu „ade4“ (Dray, 2007), na skaliranoj i centriranoj matrici podataka, u R okruženju (R verzija 3.6.3, RStudio verzija 1.3.1093). Odluku o prikazivanju prve dve PC dimenzije smo doneli na osnovu kumulativnih varijacija. U prilog takvoj odluci, izvršena je Hornova paralelna analiza za PCA sa paketom „paran“ (Dinno, 2018), kako bismo prilagodili odluku konačnom pristrasnom uzorku u zadržavanju komponenata. Vizualizacija biplota urađena je pomoću paketa „factoextra“ (Kassambara i Mundt, 2020).

Korelaciona analiza između različitih grupa je izvedena je pomoću `ggscatter()` funkcije iz `ggpubr` paketa (Kassambara, 2020) u R okruženju ili korišćenjem GraphPad programa (<https://www.graphpad.com>).

Prikaz korelacije izvršena je pomoću analize mapa grupisanih slika (*engl.* The Clustered Image Map (CIM)) (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/oneMatrix.do>).

5. Rezultati

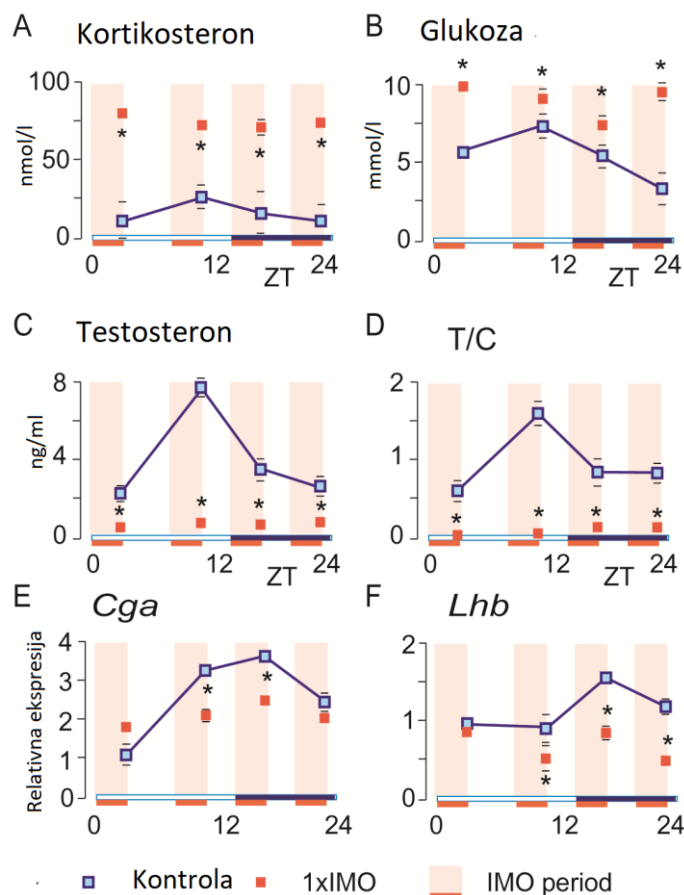
5.1. Ispitivanje efekta jednokratnog stresa, primenjenog u različitim cirkadijalnim vremenima na aktivnost Leydig-ovih ćelija

Veliki broj studija, pokazao je da IMO izaziva porast glukokortikoida u cirkulaciji i smanjuje nivo testosterona (Srivastava i sar. 1993; Orr i sar. 1994; Marić i sar. 1996), međutim efekti IMO u različitim periodima u toku 24h nisu do sada ispitivani. Prvi deo ogleđa izvedenih u okviru ove disertacije, vršen je radi ispitivanja vremenske zavisnosti reakcije na povećan nivo glukokortikoida izazvan stresom, pri čemu su pacovi jednokratno imobilisani u različitim periodima tokom 24 sata, a odgovori su analizirani neposredno nakon IMO.

5.1.1. Ispitivanje efekata jednokratne IMO na nivo hormona, glukoze i eksprimiranost gena adenohipofize

Analizom seruma kontrolnih pacova uočene su cirkadijalne fluktuacije nivoa kortikosterona, glukoze i testosterona (Slika 5.1., A & B & C; parametri ritma u Tabela 5.1.) sa pikom oko ZT11. Akutni IMO tretman (1xIMO) je efikasno povećao nivo kortikosterona i glukoze u svim ispitivanim ZT. Suprotno tome, 1xIMO je smanjio nivo testosterona u serumu u svim ispitivanim ZT. Relativni odnos između testosterona i kortikosterona, normalizovan na vrednosti ZT3 u kontrolnim uzorcima ($T/C, ZT3 = 1$) pokazuje cirkadijalnu varijaciju T/C, koja oslikava fluktuacije testosterona i kortikosterona u krvi (Slika 5.1., D). Najviši zabeleženi T/C bio je u ZT11 ($T/C ZT11 = 1,6$). Međutim, 1xIMO je smanjio T/C približno 38 puta, u zavisnosti od vremena primene IMO. Najniža vrednost T/C zabeležena je u ZT3 ($T/C ZT3 = 0,02$), dok je najviša zabeležena u ZT11 ($T/C ZT11 = 0,03$).

S obzirom da je LH glavni regulator steroidogene aktivnosti Leydig-ovih ćelija, a zbog nemogućnosti direktnog merenja nivoa LH u krvi, analizirali smo obrazac transkripcije hipofiznih gena koji kodiraju LH (*Cga, Lhb*). Rezultati su pokazali izražen ritam u transkripciji *Cga, Lhb* (Slika 5.1., E, F; parametri ritma prikazani su u Tabeli 5.1.). IMO je značajno smanjio *Cga* u ZT11 i ZT17 i *Lhb* u ZT11, ZT17 i ZT23.



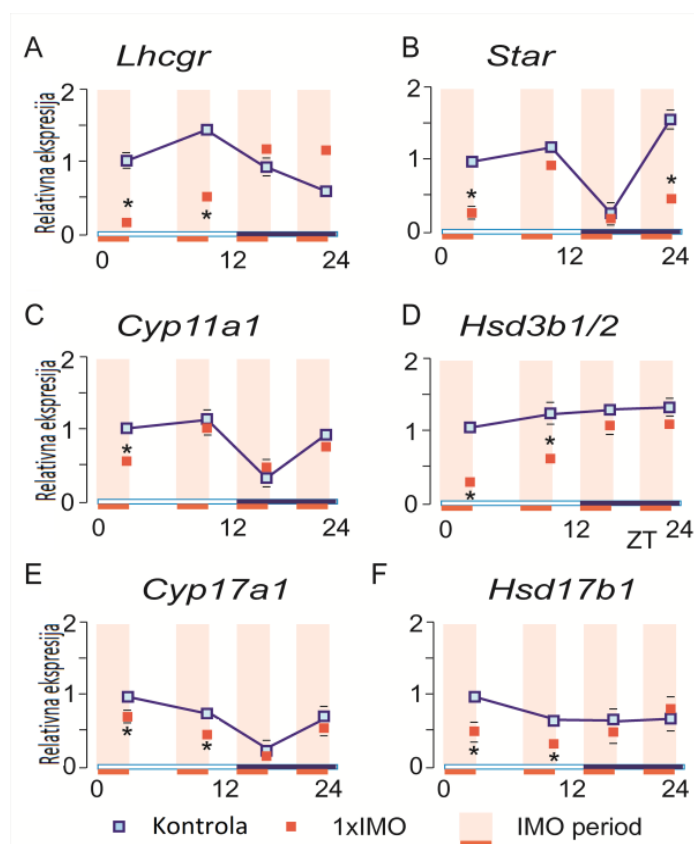
Slika 5.1. Ispitivanje efekata jednokratne IMO na nivo hormona, glukoze i ekspresiranost gena adenohipofize. Pacovi su bili podvrgnuti tročasovnom IMO u četiri različite tačke u toku 24 časa (ZT0-3, ZT8-11, ZT14-17, ZT20-24), i žrtvovani su neposredno nakon IMO sesije. Prikupljena je krv za određivanje nivoa kortikosterona (A), glukoze (B), i nivoa testosterona (C). Iz tkiva adenohipofize je ekstrahovana RNK, nakon RT, pomoću RQ-PCR analizirana je ekspresiranost gena. Tačke predstavljaju srednju vrednosti grupe ± vrednosti SEM (n = 10-12 za A, B, C i n=5-6 za E, F). Podaci su analiziarni upotrebom Cosinor paketa u R studiju. Za parametre ritma pogledajte Tabelu 5.1. * Statistički značaj između kontrolne i IMO grupe za istu vremensku tačku (p <0,05).

Tabela 5.1. Parametri ritma - nivo hormona u krvi i transkripcija gena adenohipofize. Pacovi su žrtvovani u četiri vremenske tačke u toku dana, nakon čega je sakupljena krv radi merenja nivoa hormona (kortiosteron, glukoza, T+DHT). Iz izolovanih adenohipofiza je dobijena RNK i zatim određena relativna ekspresiranost gena. Podaci u tabeli dobijeni su upotrebom Cosinor paketa u R studiju i Cosinor.online softvera.

	Grupa	p	Mezor	Amplituda	Akrofaza
Kortikosteron	Kontrola	0.000200	57.378680	28.342558	9.785509
Glukoza	Kontrola	0.053450	6.991290	0.506288	9.121611
Testosteron	Kontrola	0.000010	4.126340	2.709868	10.392056
Cga	Kontrola	0.009650	1.401060	0.463340	16.012352
Cgb	Kontrola	0.000010	1.103510	0.773881	20.250174

5.1.2. Ispitivanje efekata jednokratne IMO na ekspimiranost gena povezanih sa steroidogenezom

S obzirom da je 1xIMO smanjila nivo testosterona u krvi i izmenila transkripciju gena koji kodiraju LH subjedinice moguće je očekivati izmenjenu steroidogenu aktivnost Leydigovih ćelija. Iz tog razloga analiziran je transkripcioni obrazac gena koji kodira receptor za LH (*Lhcgr*) (Slika 5.2., A; Tabela 5.2.), kao i gena uključenih u proces steroidogeneze u Leydigovim ćelijama (Slika 5.2., B, C, D, E, F; Tabela 5.2.). 1xIMO je značajno smanjila transkripciju *Lhcgr* gena u svetloj fazi, dok u tamnoj fazi nema statistički značajnih efekata. Transkripcija



steroidogenih gena, *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1* pokazala je 24 oscilacije (Table 5.2.). Međutim, IMO je promenila obrazac ritma gena *Star*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1* u vidu smanjene ekspimiranosti na početku svetle faze fazi (Slika 5.2., B, C, E). Rezultati nisu pokazali cirkadijalni oscilatorni obrazac u transkripciji *Hsd3b1/2* i *Hsd17b4*, ali je IMO značajno smanjila ekspimiranost ovih gena u svetloj, odnosno inaktivnoj fazi dana (Slika 5.2., D, F; Tabela 5.2.).

Slika 5.2. Ispitivanje efekata jednokratne IMO na ekspimiranost gena povezanih sa steroidogenezom.

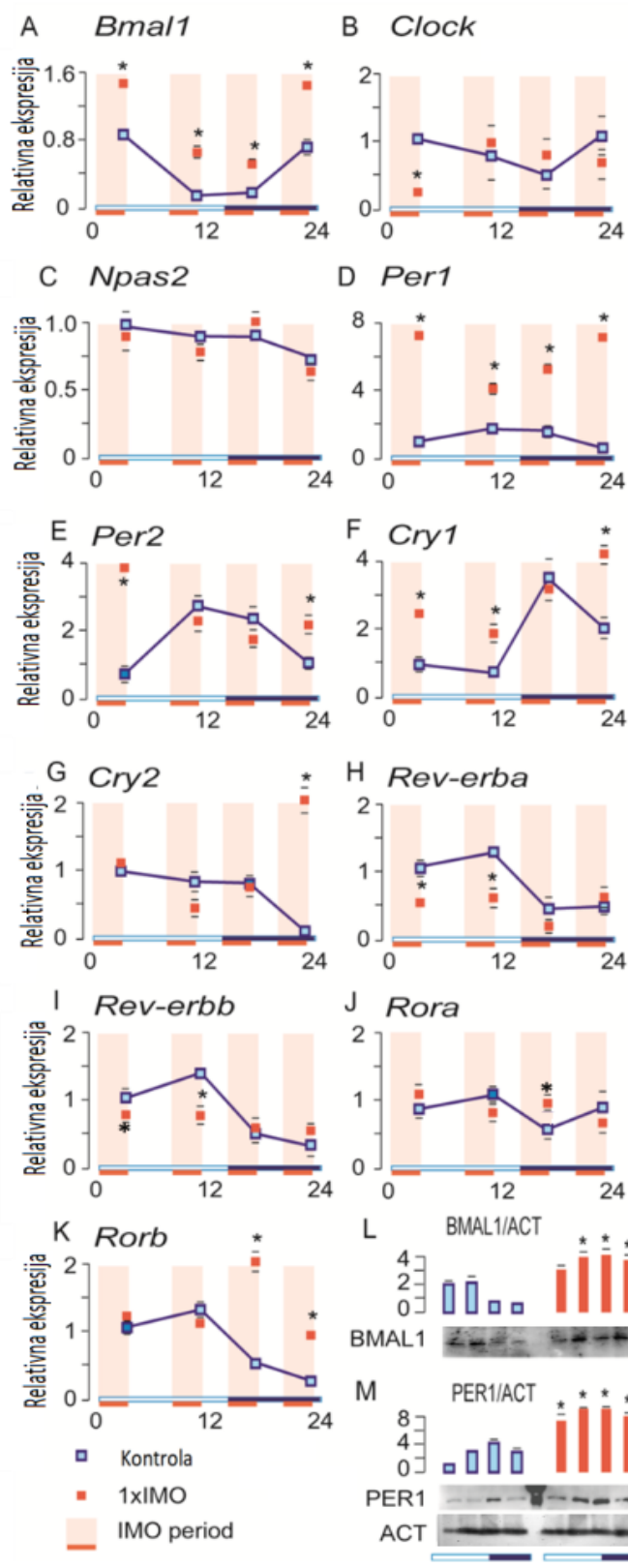
Pacovi su bili podvrgnuti tročasovnom IMO u četiri vremenske tačke tokom 24 časa (ZT0-3, ZT8-11, ZT14-17, ZT20-24) i žrtvovani su neposredno nakon IMO sesije. Nakon žrtvovanja su izolovane Leydig-ove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne ekspimiranosti gena pomoću RQ-PCR. Tačke predstavljaju srednju vrednosti grupe \pm vrednosti SEM (n = 5-6 za A, B, C, D, E, F). Podaci su analiziarni upotrebom Cosinor paketa u R studiju. Za parametre ritma (robustnost, MESOR, amplituda i akrofaza) pogledajte Tabelu 5.2. * Statistički značaj između kontrolne i IMO grupe za istu vremensku tačku (p < 0,05).

Tabela 5.2. Parametri ritma – steroidogeni elementi. Pacovi su žrtvovani u četiri vremenske tačke u toku dana. Nakon žrtvovanja izolovane su Leydig-ove ćelije, dobijena RNK i zatim određena relativna eksprimiranost gena uključenih u steroidogenezu. Podaci u tabeli dobijeni su upotrebom Cosinor paketa u R studiju i Cosinor.online softvera.

	Grupa	p	Mezor	Amplituda	Akrofaza
<i>Lhcgr</i>	Kontrola	0.060400			
<i>Nr3c1</i>	Kontrola	0.000840	1.110080	0.343393	10.355701
<i>Star</i>	Kontrola	0.046960	0.969790	0.364278	4.706899
<i>Cyp11a1</i>	Kontrola	0.000970	0.833230	0.441126	6.441935
<i>Hsd3b1/2</i>	Kontrola	0.143420			
<i>Cyp17a1</i>	Kontrola	0.000210	0.731130	0.354219	6.345965
<i>Hsd17b4</i>	Kontrola	0.060560			

5.1.3. Ispitivanje efekata jednokratne IMO na eksprimiranost gena i proteina časovnika

Većina ispitanih gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama (*Bmal1*, *Per1/2*, *Cry1/2*, *Rev-erba/b*, *Rob*) pokazala je cirkadijalni ritam eksprimiranosti (Slika 5.3., A, D, E, F, G, H, I, K; Tabela 5.3). Suprotno tome, eksprimiranost *Clock*, *Npas2* i *Rora* gena nije pokazala ritmičan obrazac (Slika 5.3., B, C, J; Tabela 5.3.). *Bmal1* dostiže pik na početku, *Per1/2*, *Cry2*, *Rev-erba/b* i *Rorb* na kraju svetle faze, dok *Cry1* pokazuje porast u tamnoj fazi. Generalno, 1xIMO je promenila transkripciju gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama: *Bmal1* je povećan (Slika 5.3., A), a *Clock* (Slika 5.3., B) smanjen odmah nakon jutarnje IMO (ZT3), dok IMO nije značajno uticala na *Npas2* (Slika 5.3., C). Međutim, eksprimiranost negativnih regulatora časovnika je povećana: *Per1* je povećan nakon svakog IMO tretmana bez obzira na vreme (Slika 5.3., D); *Per2* je povećan u ZT3 i ZT23, *Cry1* u ZT3, ZT11 i ZT23, a *Cry2* u ZT 23 (Slike 5.3., E, F, G). Pored toga, IMO je uticala na transkripciju gena u sekundarnoj petlji cirkadijalnog časovnika



smanjenom eksprimiranosti *Rev-erba* i *Rev-erbb* u svetloj, inaktivnoj fazi (slika 5.3., H) i *Rora* i *Rorb* u tamnoj, aktivnoj fazi (Slika 5.3., K). Promenjeni nivoi proteina BMAL1 i PER1 usled IMO potvrđeni su Western blot analizom. Kao što se očekivalo, BMAL1 i PER1 su pokazali cirkadijalni profil u kontrolnim uzorcima sa povećanim nivom BMAL1 u svetloj fazi u odnosu na tamnu fazu, dok je uočen obrnut rezultat za njegov negativni regulator PER1 (Slika 5.3., L, M). IMO je povećala eksprimiranost BMAL1 na kraju svetle faze i u tamnoj fazi dana, dok je eksprimiranost PER1 povećan u svim ispitivanim vremenskim tačkama.

Slika 5.3. Ispitivanje efekata jednokratne IMO na eksprimiranost gena i proteina časovnika. Pacovi su bili podvrgnuti tročasovnom IMO u četiri vremenske tačke tokom 24 časa (ZT0-3, ZT8-11, ZT14-17, ZT20-24) i žrtvovani neposredno nakon IMO sesije. Nakon žrtvovanja su izolovane Leydig-ove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti gena pomoću RQ-PCR. Tačke predstavljaju srednju vrednosti grupe ± vrednosti SEM (n = 5-6 za A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K). Podaci su analiziarni upotrebom Cosinor paketa u R studiju. Za parametre ritma (robustnost, MESOR, amplituda i akrofaza) pogledajte Tabelu 5.3. * Statistički značaj između kontrolne i IMO grupe za istu vremensku tačku (p < 0,05). Nivo proteina BMAL1 (L) i PER1 (M) određen je Western blot-om. Prikazani su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih u odnosu na AKTIN, prikazana je u formi stubića ± SEM.* Statistički značaj između kontrole i IMO grupe u istoj vremenskoj tački (p < 0,05).

Tabela 5.3. Parametri ritma – elementi časovnika. Pacovi su žrtvovani u četiri vremenske tačke u toku dana. Izolovane su Leydig-ove ćelije, dobijena RNK i zatim određena relativna eksprimiranost gena časovnika. Podaci u tabeli analizirani su upotrebom Cosinor paketa u R studiju i Cosinor.online softvera.

	Grupa	p	Mezor	Amplituda	Akrofaza
<i>Bmal1</i>	Kontrola	0.000001	0.555830	0.410698	1.929403
<i>Clock</i>	Kontrola	0.084210			
<i>Npas2</i>	Kontrola	0.060330			
<i>Per1</i>	Kontrola	0.000190	1.185050	0.653152	11.291941
<i>Per2</i>	Kontrola	0.000010	1.813790	1.004681	13.281668
<i>Cry1</i>	Kontrola	0.038240	1.548460	1.849090	18.795153
<i>Cry2</i>	Kontrola	0.04978	0.791590	0.394697	9.570540
<i>Rev-erba</i>	Kontrola	0.030980	1.388920	0.478658	12.437302
<i>Rev-erbb</i>	Kontrola	0.001010	0.986990	0.566284	10.429728
<i>Rora</i>	Kontrola	0.094650			
<i>Rorb</i>	Kontrola	0.000150	0.989050	0.263275	10.127894

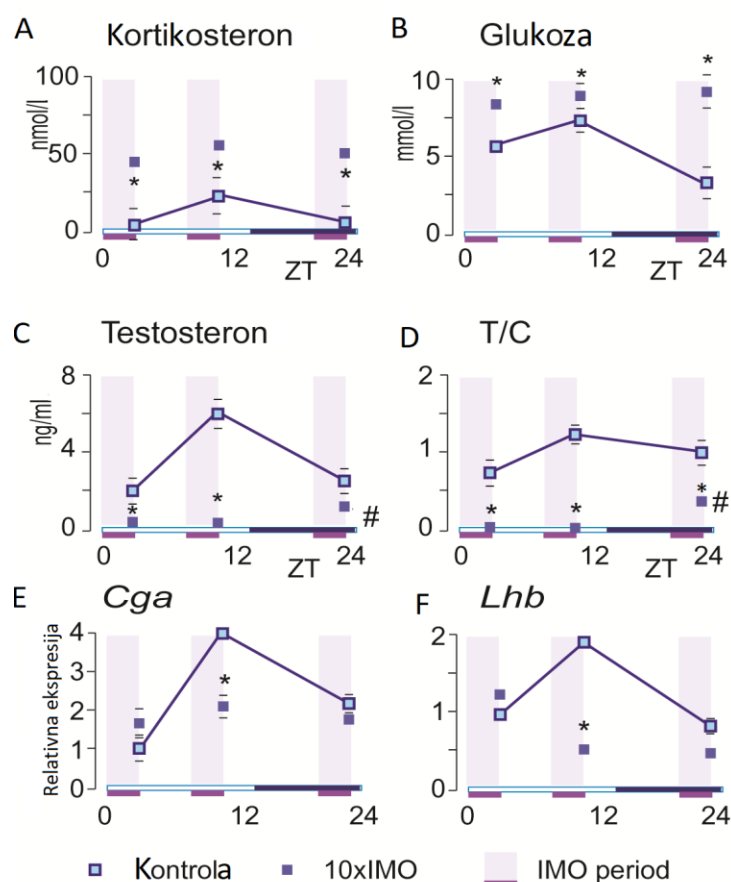
Sumarno posmatrano, dobijeni rezultati sugerišu različitu osetljivost na IMO u zavisnosti od cirkadijalnog vremena. Transkripcija većine gena povezanih sa steroidogenezom je smanjena u IMO uslovima u svetloj/neaktivnoj fazi, a nepromenjena ili povećana u tamnoj/aktivnoj fazi dana. Rezultati takođe ukazuju, da IMO stimuliše eksprimiranost elemenata časovnika koji deluju preko E-box-a (BMAL1 i PER1) u svim ispitivanim vremenima i u svetloj fazi inhibiše transkripciju *Rev-erba/b*, koja deluje preko RORE-box-a, sugerišući mogući efekat na eksprimiranost gena ne samo na sistem časovnika već i van njega.

5.2. Ispitivanje efekta ponavljalog stresa, primenjenog u različitim cirkadijalnim vremenima na aktivnost Leydig-ovih ćelija

S obzirom da IMO u aktivnoj fazi smanjuje nivo testosterona a da pri tome transkripcija steroidogenih gena nije izmenjena pretpostavili smo da se radi o vremenski zavisnom efektu te da je neophodno duže vreme kako bi se uočene razlike u aktivnosti gena ispoljile i na nivou testosterona. Zbog toga smo ispitali efekte deset puta ponavljane IMO (10xIMO) u različitim vremenima tokom 24 sata.

5.2.1. Ispitivanje efekata 10xIMO na nivo na nivo hormona, glukoze i ekspimiranost gena adenohipofize

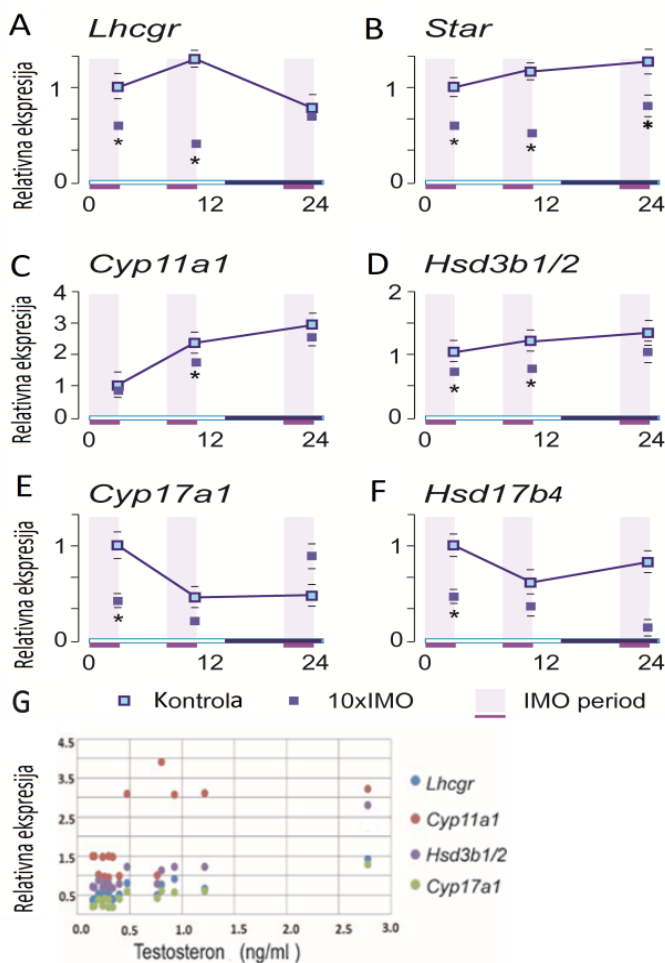
10xIMO je povećala nivo kortikosterona (Slika 5.4.,A) i glukoze (Slika 5.4.,B) u krvi u svim ispitivanim vremenskim tačkama. Međutim, u 10xIMO uslovima zapažen je niži porast kortikosterona u odnosu na 1xIMO u svim analiziranim vremenskim tačkama (Slika 5.1.,A i Slika 5.4., A). Pored toga, 10xIMO u neaktivnoj (svetloj) fazi je smanjio nivo testosterona u krvi (Slika 5.4., C), međutim to smanjenje je bilo značajno manje izraženo u aktivnoj (tamnoj) fazi (Slika 5.4., C). Ovakav rezultat ukazuje na različite stres-reaktivne odgovore Leydig-ovih ćelija u zavisnosti od vremena primene IMO tretmana. Promene nivoa testosterona u krvi odrazile su se i na odnos T/C (Slika 5.4., D); kada je IMO ponovljena u tamnoj, aktivnoj fazi, T/C je bio značajno veći nego u svetloj, neaktivnoj fazi. Takođe, rezultati su pokazali da je 10xIMO smanjio ekspimiranost gena *Cga* u ZT11 i *Lhb* u ZT11 u ćelijama adenohipofize (Slika 5.4., E, F).



Slika 5.4. Ispitivanje efekata 10xIMO na nivo hormona, glukoze i ekspimiranost gena adenohipofize. Pacovi podeljeni u tri grupe bili su podvrgnuti IMO, 3 sata dnevno tokom 10 uzastopnih dana u različitim periodima tokom 24 sata (ZT0-3, ZT8-11 i ZT20-23), nakon žrtvovanja prikupljena je krv za određivanje nivoa kortikosterona (A), glukoze (B), i nivoa testosterona (C). Iz tkiva adenohipofize je ekstrahovana RNK, nakon RT, pomoću RQ-PCR analizirana je ekspimiranost gena. Tačke predstavljaju srednju vrednosti grupe \pm vrednosti SEM ($n = 10-12$ za A, B, C i $n=5-6$ za E, F). * Statistički značaj između kontrolne i IMO grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$). #Statistička značajnost između grupa uključujući sve vremenske tačke procenjene ANOVA testom ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$).

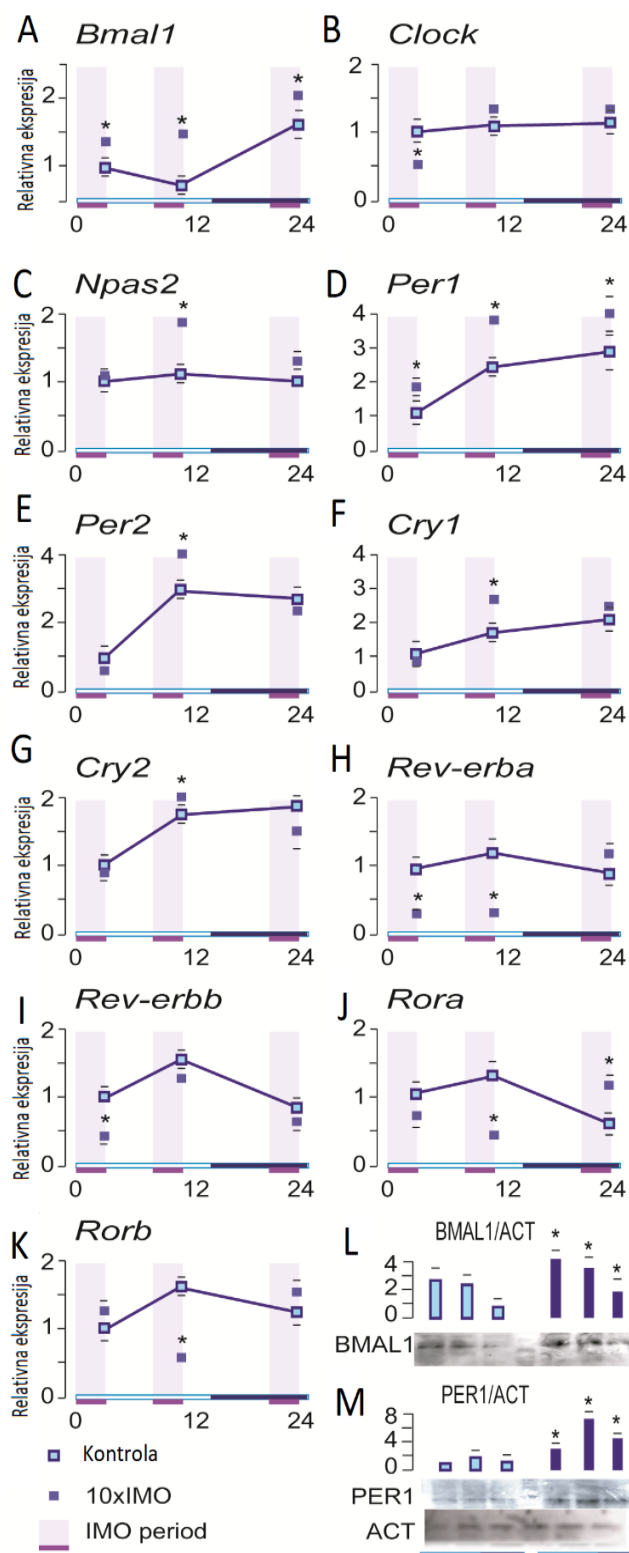
5.2.2. Ispitivanje efekta 10xIMO na ekspimiranost gena uključenih u proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama

Nakon 10xIMO tretmana, uočena je smanjena ekspimiranost *Lhcgr* u neaktivnoj fazi (svetloj) fazi (Slika 5.5, A). Transkripcija steroidogenih gena, *Star*, *Hsd3b1/2*, je takođe smanjena u neaktivnoj (svetloj) fazi (Slika 5.5, B, D). Transkripcija gena, *Cyp11a1* (Slika 5.5., C) značajno je smanjena u ZT11. Transkripcija *Cyp17a1*, *Hsd17b4* smanjena je u ZT3 (Slika 5.5., E, F). Dalje, dobijeni rezultati jasno su pokazali da različiti efekti 10xIMO na transkripciju *Lhcgr*, *Hsd3b1/2*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1* u aktivnoj/neaktivnoj fazi, pozitivno koreliraju sa nivoom testosterona u krvi ($R=0,7-0,85$ za sva četiri gena; Slika 5.5., G). Međutim, takva korelacija nije primećena nakon 1xIMO jer je nivo testosterona opao bez obzira na period dana.



Slika 5.5. Ispitivanje efekta 10xIMO na ekspimiranost gena uključenih u proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama. Pacovi podeljeni u tri grupe bili su podvrgnuti IMO, 3 sata dnevno tokom 10 uzastopnih dana u različitim periodima tokom 24 sata (ZT0-3, ZT8-11 i ZT20-23). Nakon žrtvovanja su izolovane Leydig-ove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne ekspimiranosti gena pomoću RQ-PCR (A, B, C, D, E, F). Tačke podataka su srednje vrednosti grupe \pm vrednosti SEM ($n = 5-6$ za A, B, C, D, E, F). * Statistički značaj između kontrolne i IMO grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$). Odnos ekspimiranosti gena i nivoa testosterone prikazan je na panelu G.

5.2.3. Ispitivanje efekata 10xIMO na ekspimiranost gena i proteina časovnika u Leydig-ovim ćelijama



Nakon 10 puta ponovljenog IMO tretmana ekspimiranost gena glavnih regulatora časovnika u Leydig-ovim ćelijama *Bmal1*/BMAL1 (Slika 5.6., A,L) i *Per1*/PER1 (Slika 5.6., D, M) je bila povećana bez obzira na vreme primene IMO. Ekspimiranost *Rev-erba* je bila smanjena u neaktivnoj fazi (ZT3 i ZT11; Slika 5.6., H), dok je ekspimiranost *Rev-erbb* bila smanjena na početku svetle faze (ZT3) (Slika 5.6., I). Ekspimiranost ostalih analiziranih gena časovnika je takođe bila poremećena: ekspimiranost *Rora* je bila smanjen u ZT11 i povećan u ZT23 (Slika 5.6., J); *Rorb* smanjena u ZT11 (Slika 5.6., K); *Cry1* povećana u ZT11 (Slika 5.6., F); a *Cry2* smanjena u ZT23 (Slika 5.6., G).

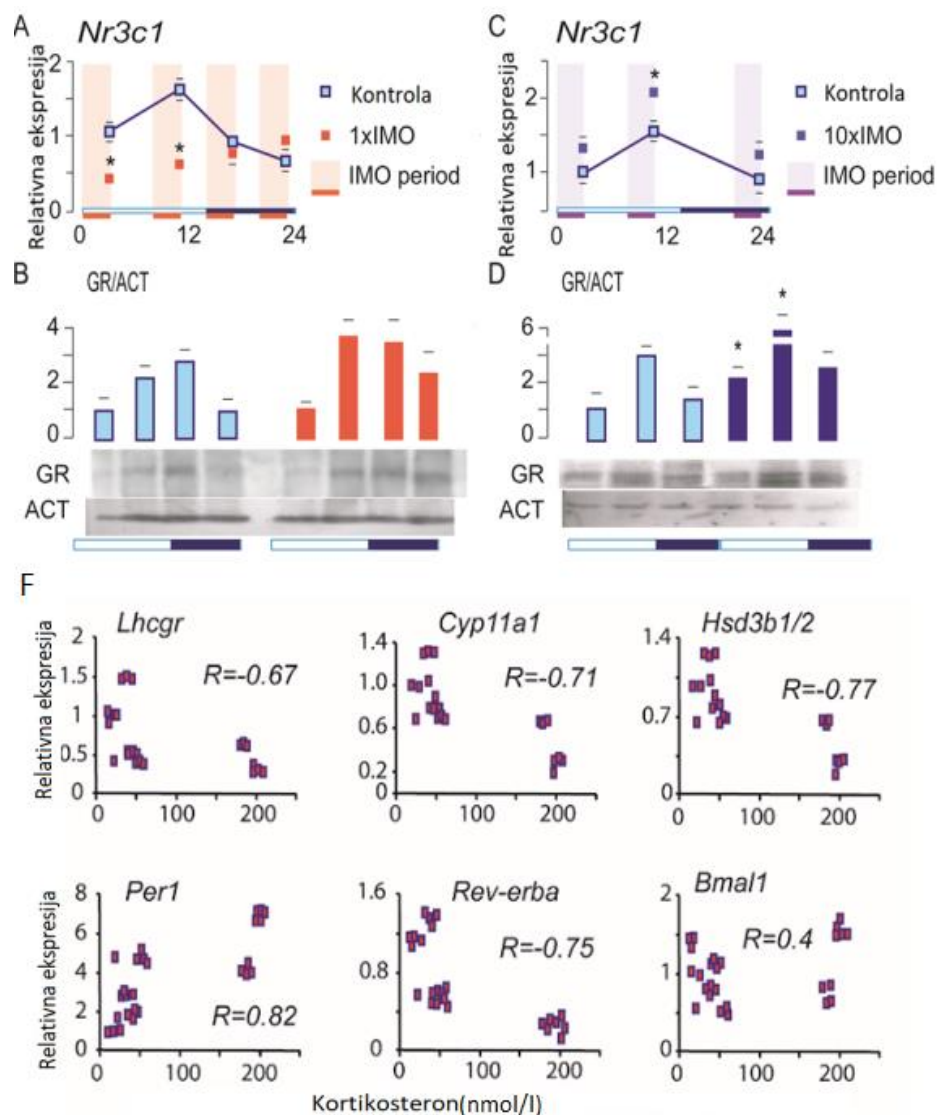
Slika 5.6. Ispitivanje efekata 10xIMO na ekspimiranost gena i proteina časovnika u Leydig-ovim ćelijama. Pacovi podeljeni u tri grupe bili su podvrgnuti IMO, 3 sata dnevno tokom 10 uzastopnih dana u različitim periodima tokom 24 sata (ZT0-3, ZT8-11 i ZT20-23). Nakon žrtvovanja su izolovane Leydig-ove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne ekspimiranosti gena pomoću RQ-PCR. Tačke predstavljaju srednju vrednosti grupe \pm vrednosti SEM ($n = 5-6$ za A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K). * Statistički značaj između kontrolne i IMO grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$). Nivo proteina BMAL1 (L) i PER1 (M) određen je Western blot-om. Prikazane su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih u odnosu na AKTIN, prikazana je u formi stubića \pm SEM.* Statistički značaj između kontrole i IMO grupe u istoj vremenskoj tački ($p < 0,05$).

5.2.4. Efekti 1xIMO i 10xIMO na eksprimiranost *Nr3c1*/GR.

S obzirom da su glukokortikoidi primarni hormonski medijatori stresa sa značajnim regulatornim uticajem na steroidogenezu i preživljavanje Leydig-ovih ćelija (Gao i sar. 2002, Hardy i sar. 2005) kao i da imaju izražen cirkadijalni profil u cirkulaciji bilo je neophodno ispitati vremenski zavisne efekte 1xIMO i 10xIMO na eksprimiranost *Nr3c1*/GR u Leydig-ovim ćelijama.

Kao što je očekivano, u Leydig-ovim ćelijama kontrolnih pacova primećen je ciklični obrazac ekspresije *Nr3c1* i GR u kontrolnim uslovima (Slika 5.7.). Uočeni obrazac ekspresije GR korelira sa fluktuacijom kortikosterona u krvi ($R=0,885$), omogućavajući efikasnu regulaciju ciljnih gena u Leydig-ovim ćelijama. Međutim, 1xIMO u svetloj fazi smanjio je ekspresiju *Nr3c1* (Slika 5.7., A) bez značajnog uticaja na nivo proteina (Slika 5.7., B). Razlika između efekata na ekspresiju gena i proteina verovatno ukazuje na vremenski zavisne procese i vreme neophodno za degradaciju proteina. Sa druge strane 10xIMO, je na kraju inaktivne (svetle) faze, povećala ekspresiju *Nr3c1* i GR na početku i na kraju svetle faze (Slika 5.7., C,D) u Leydig-ovim ćelijama. Ponovo je efekat stresa bio manje izražen u aktivnom periodu.

Pošto je nekoliko gena povezanih sa steroidogenezom i časovnikom, pokazalo različite obrasce ekspresije zavisno od vremena i tipa IMO, izvršena je korelaciona analiza, kako bi procenili moguću povezanost sa povećanim nivoom glukokortikoida u krvi. Rezultati pokazuju da su *Lhcgr*, *Hsd3b1/2*, *Cyp11a1* i *Rev-erba* u negativnoj, dok je *Per1* u pozitivnoj korelaciji sa nivoom kortikosterona u krvi u neaktivnom periodu dana (Slika 5.7., E). Postojanje takve korelacije sugeriše regulatornu ulogu glukokortikoida. Iako je testirana korelacija nivoa kortikosterona i eksprimiranosti drugih gena, uključujući *Bmal1*, nije zapažena statistička značajnost.

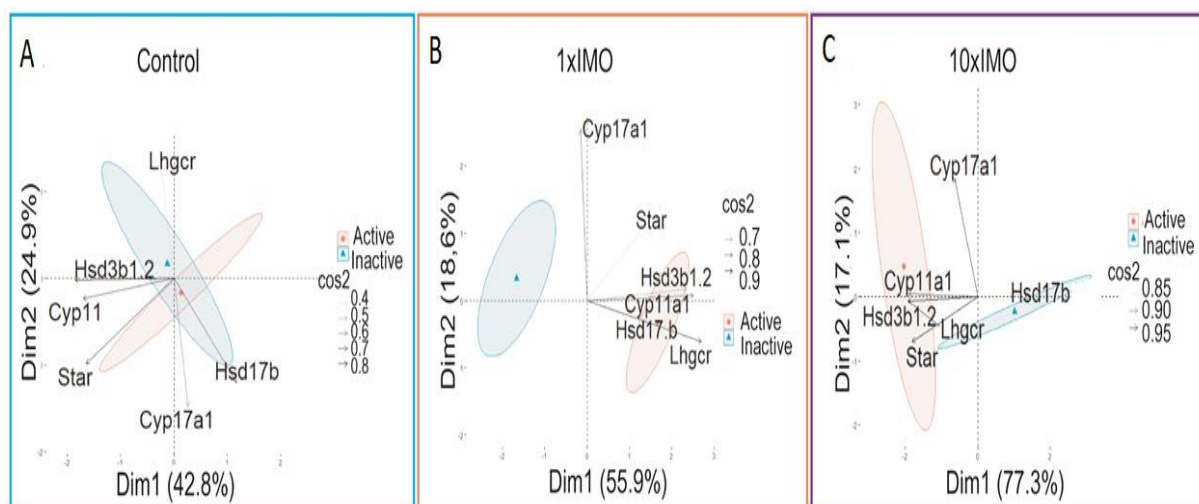


Slika 5.7. Efekti akutne i 10 puta ponovljene IMO na eksprimiranost *Nr3c1* i GR. Pacovi bili su podvrgnuti tročasovnom akutnom IMO stresu u različitim periodima tokom 24 sata (ZT 0-3, ZT8-11, ZT20-23) (A, B) i žrtvovani zajedno sa kontrolnim grupama na kraju tretmana. U drugom eksperimentalnom modelu pacovi su bili podvrgnuti tročasovnom IMO stresu u različitim periodima tokom 24 sata (ZT0-3, ZT8-11 i ZT20-23) tokom deset uzastopnih dana (C, D) i žrtvovani zajedno sa kontrolnim grupama na kraju tretmana. Nakon žrtvovanja su izolovane Leydig-ove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti gena pomoću RQ-PCR (A, C). Tačke predstavljaju srednju vrednost grupe ± vrednosti SEM (n = 5-6 za A, C). Nivo proteina GR (B, D) određen je Western blot-om. Prikazani su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata

denzitometrijskih merenja, normalizovanih u odnosu na AKTIN (ACT), prikazana je u formi stubića ± SEM. Odnos nivoa glukokortikoida i eksprimiranosti gena prikazan je na panelu F. Statistička značajnost između kontrole i IMO grupe u istoj vremenskoj tački ($p < 0,05$).

U cilju jasnijeg tumačenja rezultata izvršena je i multivarijantna analiza osnovnih komponenata (PCA) eksprimiranosti gena uključenih u proces steroidogeneze, kao i gena časovnika (Slika 5.8. i 5.9.). Multivarijantna analiza steroidogenih gena ekspresovanih tokom aktivne i neaktivne faze pokazala je da su kod kontrolne grupe promene minimalne - centroidi grupa aktivne i neaktivne faze su blisko orjentisani u središtu plota (Slika 5.8., A, Tabela 5.4.). Ukupna varijabilnost prve dve komponente iznosi 67.7%. Nasuprot kontrolnoj grupi, primena 1xIMO (Slika 5.8., B; Tabela 5.5.) i 10xIMO (Slika 5.8., C; Tabela 5.6.) je prouzrokovalo značajne promene u eksprimiranju gena povezanih sa steroidogenezom.

Transkripcija *Lhgcr*, *Hsd3b1/2*, *Cyp11a1* i *Hsd17b4* gena je bila značajno veća tokom aktivne faze kod 1xIMO tretmana (Slika 5.8., B; Tabela 5.5.). Slično, tretman 10xIMO je rezultovao značajnim povećanjem eksprimiranja *Lhgcr*, *Hsd3b1/2*, *Cyp11a1* i *Star* tokom aktivne faze (Slika 5.8., B; Tabela 5.6.). Ovakvi profili ukazuju na robusnost promena u eksprimiranju gena povezanih sa steroidogenezom pod različitim IMO tretmanima, što ih može definisati kao marker za stresne uslove.



Slika 5.8. PCA analiza eksprimiranja gena povezanih sa steroidogenezom u Leydig-ovim ćelijama u različitim vremenskim tačkama tokom svetle i tamne faze u kontrolnim uslovima (A) nakon 1xIMO (B) i 10xIMO (C). Dim1 i Dim2 predstavljaju prve dve PC i % zadržane varijacija. cos2 predstavlja kvalitativni prikaz promenljivih.

Tabela 5.4. PCA analiza eksprimiranosti gena povezanih sa steroidogenezom u kontrolnim uslovima. PC1, PC2 i PC3 su koeficijenti linearnih kombinacija inicijalnih varijabli od kojih su izvedene osnovne komponente.

	PC1	PC2	PC3
<i>Lhgcr</i>	-0.07152	0.491352	0.642671
<i>Star</i>	-0.50755	-0.39841	0.235081
<i>Cyp11</i>	-0.52355	-0.09524	-0.20899
<i>Cyp17a1</i>	0.080507	-0.59493	0.623839
<i>Hsd3b1/2</i>	-0.57174	-0.01094	-0.17463
<i>Hsd17b4</i>	0.36029	-0.48653	-0.26146

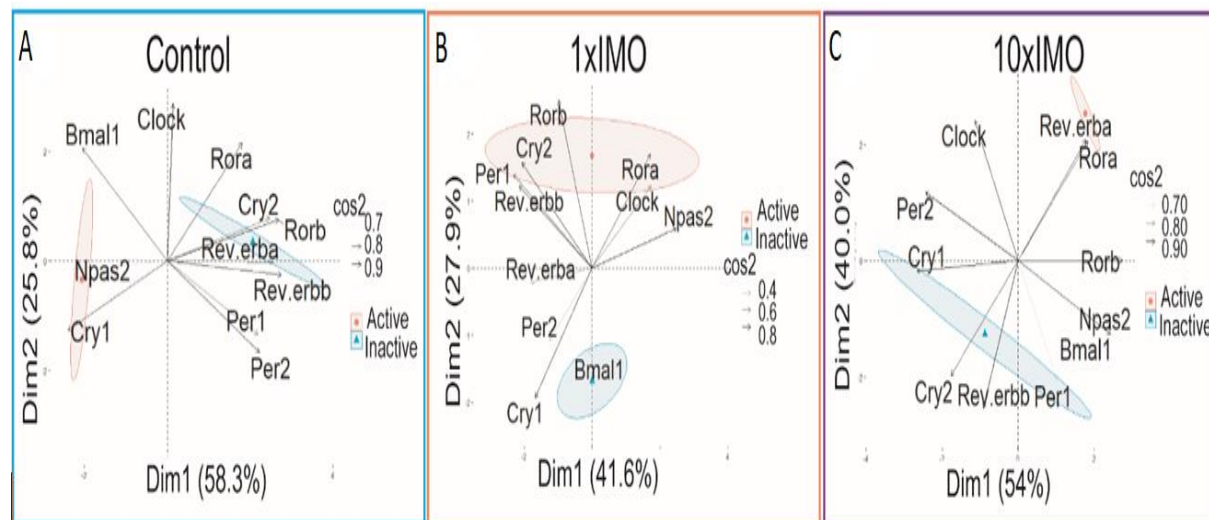
Tabela 5.5. PCA analiza eksprimiranosti gena povezanih sa steroidogenezom u 1xIMO uslovima. PC1, PC2 i PC3 su koeficijenti linearnih kombinacija inicijalnih varijabli od kojih su izvedene osnovne komponente.

	PC1	PC2	PC3
<i>Lhgr</i>	0.52014	-0.20273	-0.15335
<i>Star</i>	0.335387	0.467236	0.572887
<i>Cyp11a1</i>	0.483617	0.024252	0.053696
<i>Cyp17a1</i>	-0.02927	0.84484	-0.47888
<i>Hsd3b1/2</i>	0.451647	0.057046	0.227036
<i>Hsd17b4</i>	0.422188	-0.15164	-0.60377

Tabela 5.6. PCA analiza eksprimiranosti gena povezanih sa steroidogenezom u 10xIMO uslovima. PC1, PC2 i PC3 su koeficijenti linearnih kombinacija inicijalnih varijabli od kojih su izvedene osnovne komponente.

	PC1	PC2	PC3
<i>Lhgr</i>	-0.45234	-0.03261	-0.02542
<i>Star</i>	-0.42712	-0.35302	-0.23301
<i>Hsd3b1/2</i>	-0.45561	-0.03360	-0.03692
<i>Cyp11a1</i>	-0.44820	0.02608	-0.46773
<i>Cyp17a1</i>	-0.15100	0.93174	-0.13782
<i>Hsd17b4</i>	0.42641	-0.06694	-0.84021

Dodatno, PCA je potvrdila da svetla i tamna faza pokazuju različite obrasce eksprimiranosti gena, kako kod kontrolne grupe (Slika 5.9., A, Tabela 5.7.), tako i u uslovima 1xIMO (Slika 5.9., B, Tabela 5.8.) ili 10xIMO (Slika 5.9., C, Tabela 5.9.). U uslovima 1xIMO, izražen klaster aktivnih gena (*Rorb*, *Cry2*, *Rev-erbb*, *Per1*, *Per2*, *Cry2*, *Rora*, *Clock*), suprotstavlja se *Bmal1* i *Cry1* u neaktivnoj fazi i doprinosi razdvajanju faza (Slika 5.9., B, Tabela 5.8.). Zanimljivo je da *Rora* i *Rev-erba* u manjoj meri doprinose razdvajanju faza (Slika 5.9., B, Tabela 5.8.). Pored toga, 10xIMO tretman pokazuje veliku razliku u ekspresiji *Rever-erba* i *Rora* tokom aktivne i *Rev-erbb* i *Cry2*, tokom neaktivne faze (Slika 5.9., C, Tabela 5.9.). Takođe, svetla i tamna faza pokazuju najizrazitiju promenu u svim analiziranim podacima (varijabilnost 94,0%), što implicira da 10xIMO snažno utiče na profile eksprimiranosti gena časovnika (Slika 5.9., C, Tabela 5.9.).



Slika 5.9. PCA analiza eksprimiranosti gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama u različitim vremenskim tačkama tokom svetle i tamne faze u kontrolnim uslovima (A) nakon 1xIMO (B) i 10xIMO (C). Dim1 i Dim2 predstavljaju prve dve PC i % zadržane varijabilnosti. cos2 predstavlja kvalitativni prikaz promenljivih.

Tabela 5.7. PCA analiza eksprimiranosti gena časovnika u kontrolnim uslovima PC1, PC2 i PC3 su koeficijenti linearnih kombinacija inicijalnih varijabli od kojih su izvedene osnovne komponente.

	PC1	PC2	PC3
<i>Clock</i>	-0.25404	0.068451	-0.49355
<i>Npas2</i>	-0.32152	0.206485	0.186631
<i>Bmal1</i>	0.123285	0.313721	-0.56317
<i>Rora</i>	-0.10154	-0.51169	-0.1372
<i>Rorb</i>	-0.44544	-0.06615	-0.13804
<i>Cry1</i>	0.297963	0.188317	0.431501
<i>Cry2</i>	-0.36158	0.360493	-0.05679
<i>Per1</i>	-0.39623	0.214477	0.189347
<i>Per2</i>	-0.35392	0.040101	0.373339
<i>Rev-erba</i>	-0.03673	-0.48991	0.019381
<i>Rev-erbb</i>	-0.3241	-0.36745	0.038873

Tabela 5.8. PCA analiza eksprimiranosti gena časovnika u 1xIMO uslovima. PC1, PC2 i PC3 su koeficijenti linearnih kombinacija inicijalnih varijabli od kojih su izvedene osnovne komponente.

	PC1	PC2	PC3
<i>Clock</i>	0.29394	0.252515	-0.012
<i>Npas2</i>	0.418848	0.12091	-0.16573
<i>Bmal1</i>	-0.01235	-0.26517	0.64281
<i>Rora</i>	0.291554	0.350113	-0.30549
<i>Rorb</i>	-0.16715	0.517165	0.036471
<i>Cry1</i>	-0.28311	-0.39929	-0.19258
<i>Cry2</i>	-0.34858	0.323843	0.132776
<i>Per1</i>	-0.39162	0.287647	0.001399
<i>Per2</i>	-0.21037	-0.22199	-0.58538
<i>Rev-erba</i>	-0.30645	-0.04314	-0.24555
<i>Rev-erbb</i>	-0.36315	0.251142	0.082741

Tabela 5.9. PCA analiza eksprimiranosti gena povezanih sa časovnikom u 10xIMO uslovima. PC1, PC2 i PC3 su koeficijenti linearnih kombinacija inicijalnih varijabli od kojih su izvedene osnovne komponente.

	PC1	PC2	PC3
<i>Clock</i>	-0.17029	0.417045	0.266498
<i>Npas2</i>	0.360635	-0.2167	-0.15463
<i>Bmal1</i>	0.360635	-0.2167	-0.15463
<i>Rora</i>	0.272342	0.353571	-0.06742
<i>Rorb</i>	0.407769	0.001224	-0.04669
<i>Cry1</i>	-0.39712	-0.03046	0.123363
<i>Cry2</i>	-0.26365	-0.34202	-0.0533
<i>Per1</i>	0.151323	-0.35597	0.881661
<i>Per2</i>	-0.36249	0.201738	-0.05567
<i>Rev-erba</i>	0.264825	0.358734	0.175803
<i>Rev-erbb</i>	-0.13708	-0.43948	-0.21223

5.3. Ispitivanje efekta stresa primenjenog na početku neaktivne faze na cirkadijalnu aktivnost Leydig-ovih ćelija

S obzirom da 1xIMO tokom svetle/neaktivne faze smanjuje transkripciju većine gena povezanih sa steroidogenezom, imali smo za cilj da utvrdimo posledice na ritmičku aktivnost Leydig-ovih ćelija u satima nakon IMO. Pacovi su bili podvrgnuti IMO u ZT0-3, a obrazac transkripcije steroidogenih gena i gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama zajedno sa nivoom hormona i glukoze u krvi, praćen je u 4 vremenske tačke u 24 sata nakon IMO.

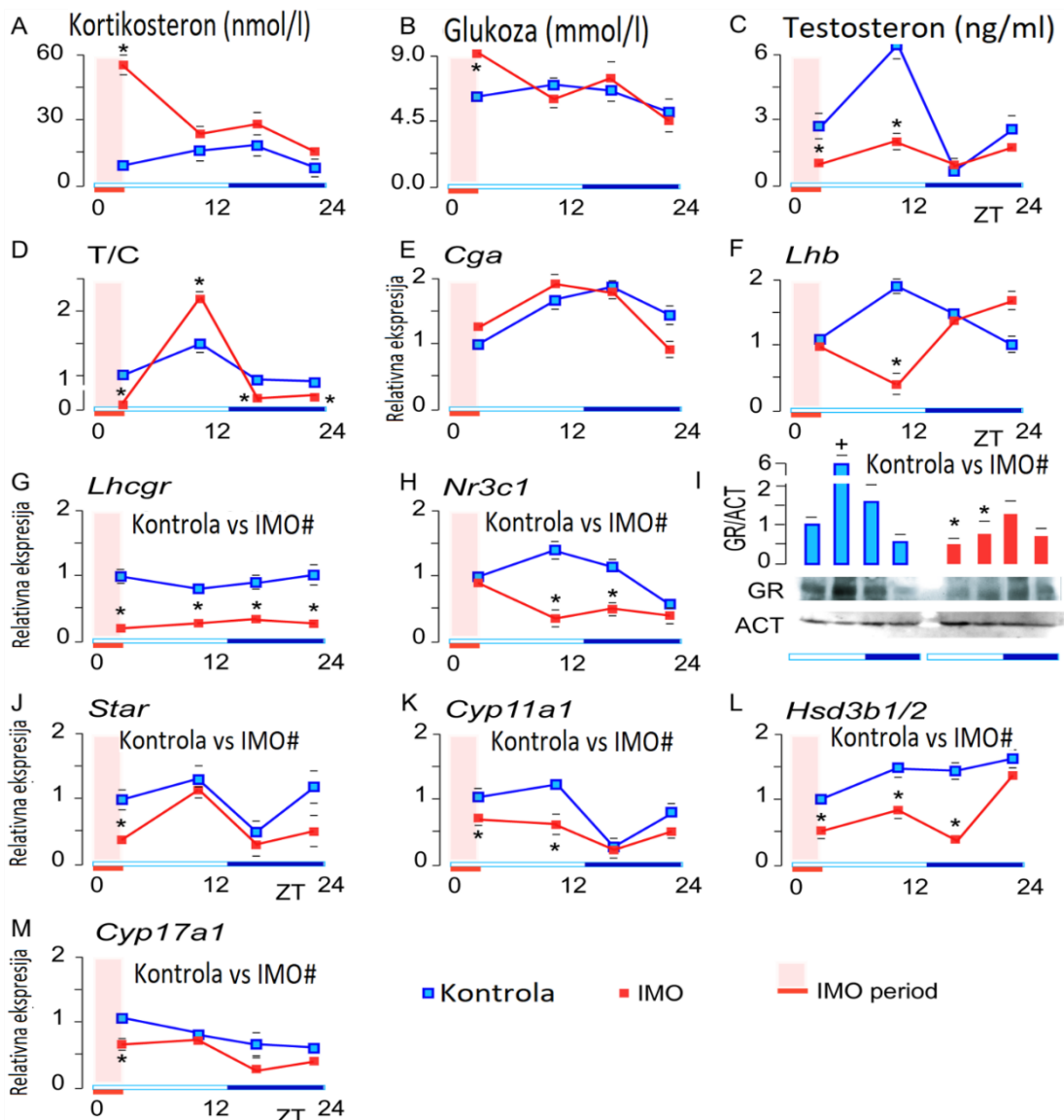
5.3.1. Efekti stresa primenjenog na početku neaktivne faze na cirkadijalni ritam steroidogeneze

Kao što je ranije pokazano u serumu kontrolnih pacova primećene su 24-časovne promene nivoa kortikosterona, glukoze i testosterona (Slika 5.10., A & B & C; Tabela 5.10.) sa pikom oko ZT11 za sve tri praćenje varijable. Jutarnja IMO promenila je profil nivoa kortikosterona, testosterona i glukoze u krvi: mezor i amplituda oscilacija kortikosterona u krvi su povećani, praćeni sličnim promenama u nivou glukoze; nasuprot, amplituda i mezor testosterona su se smanjili. Relativni odnos između testosterona i kortikosterona, izračunat na vrednosti ZT3 u kontrolnim uzorcima ($T/C_{ZT3} = 1$), pokazuje cirkadijalne fluktuacije T/C, u krvi (Slika 5.10., D). Najviši zabeleženi T/C bio je u ZT11 ($T/C_{ZT11} = 1,6$). Međutim, IMO je smanjila T/C približno 38 puta. Dalje, vrednosti T/C u prvih 20 sati posle IMO pokazale su poremećeni oscilatorni obrazac, sa smanjenim vrednostima u ZT3, ZT17 i ZT23, ali i povišenim u ZT11 u odnosu na kontrolne vrednosti.

Jutarnja IMO promenila je profil ekspimiranja gena adenohipofize *Cga* i *Lhb* (Tabela 5.10.) akrofaza *Cga* pomerena je na kraj svetle i početak tamne faze (Slika 5.10., E), dok je ekspimiranost *Lhb* u potpunosti promenila fazu i smanjila mezor i amplitudu (Slika 5.10., F). Ovakve promene ukazuju na moguće smanjenje sinteze LH.

Pored toga, praćena je transkripcija gena koji kodiraju receptore važne za endokrinu aktivnost Leydig-ovih ćelija. *Lhcgr*, koji određuje osetljivost Leydig-ovih ćelija na LH, nije pokazao varijacije tokom 24 sata, ali je IMO značajno smanjila stepen ekspimiranja (Slika 5.10., G).

Nr3c1 koji kodira GR pokazuje diurnalni obrazac ekspimiranja; IMO je smanjio ekspimiranje *Nr3c1* u ZT11 i ZT17 (Slika 5.10., H) i GR u ZT3, ZT11 (Slika 5.10., I). Kao što se i očekivalo (Baburski i sar., 2015), transkripcija glavnih steroidogenih gena, *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, pokazala je 24-oscilacije sa pikom približno u sredini svetle faze (Slika 5.10. J, K, M; Tabla 5.10.), odnosno nekoliko sati pre pika testosterona u serumu. Jutarnji IMO stres je smanjio amplitudu i mezor *Star*, *Cyp11a1* (Slika 5.10. J, K; Tabela 5.10) i smanjio transkripciju *Hsd3b1/2* (Slika 5.10., L; Tabela 5.10.) nekoliko sati nakon tretmana.



Slika 5.10. Efekti stresa primenjenog na početku neaktivne faze na cirkadijalni ritam steroidogeneze. IMO je primenjena u ZT0-ZT3. Životinje su žrtvovane u četiri vremenske tačke tokom 24 sata (ZT3, ZT11, ZT17, ZT23). Krv je sakupljena za određivanje nivoa kortikosterona (A), glukoze (B) i testosterona (C) kao i za određivanje odnosa testosterona/ kortikosterona (T/C) (D). Prikupljene su adenohipofize i izolovane Leydig-ove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne ekspresiranosti gena pomoću RQ-PCR. Analizirana je ekspresiranost hipofiznih gena *Gga* i *Lhb* (E, F) i gena Leydig-ovih ćelija povezanim sa steroidogenezom (G, H, J, K, L, M). Tačke podataka su grupne srednje vrednosti \pm vrednosti SEM ($n = 5-6$). Za parametre ritma pogledajte Tabelu 5.10. Nivo proteina GR (NR3C1, I) određen je Western blot analizom. Prikazani su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih u odnosu AKTIN (ACT), prikazana je u formi stubića \pm SEM. * Statistički značaj između kontrole i IMO grupe u istoj vremenskoj tački ($p < 0,05$). # Statistička značajnost između grupa uključujući sve vremenske tačke procenjene ANOVA testom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Tabela 5.10. Parametri ritma – nivo hormona, nivo eksprimiranosti gena adenohipofize i steroidogenih gena u Leydig-ovim ćelijama. Pacovi su izloženi IMO i žrtvovani u četiri vremenske tačke u toku dana, zajedno sa kontrolnim grupama, nakon čega je sakupljena krv, adenohipofize i izolovane Leydig-ove ćelije, dobijena RNK i zatim određena relativna eksprimiranost gena časovnika. Podaci u tabeli analizirani su upotrebom Cosinor paketa u R studiju i Cosinor.online softvera.

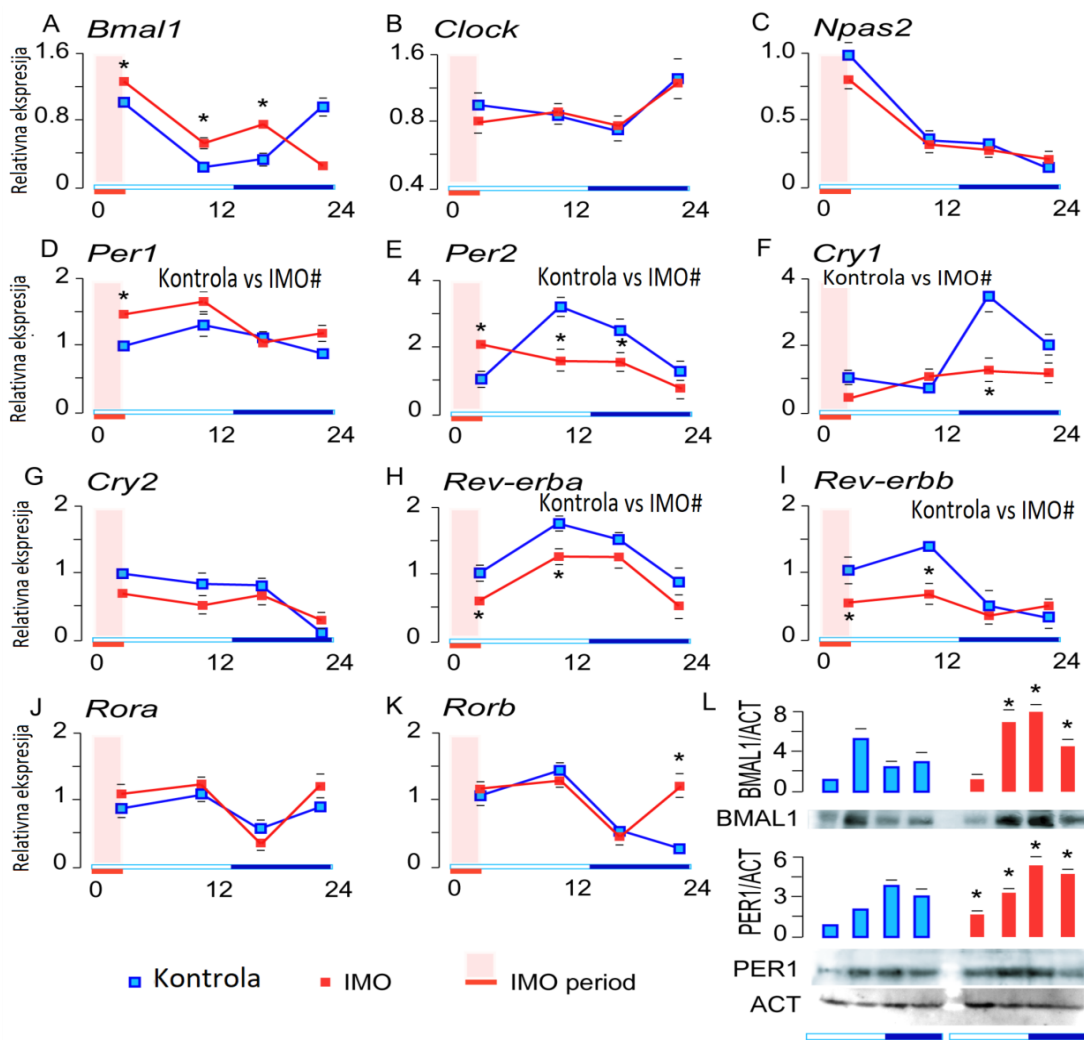
	Grupa	p	Mezor	Amplituda	Akrofaza
Testosteron	Kontrola	0.00005	3.60631	4.1803578	8.1806227
	IMO	0.00001	1.28733	1.7524096	9.6187715
Kortikosteron	Kontrola	0.01153	13.66488	4.7420659	11.320185
	IMO	0.00822	29.23852	13.944749	5.1261335
Glukoza	Kontrola	0.0203	6.94924	0.4233281	11.009876
	IMO	0.0345	7.33399	1.2586623	3.7572086
Cga	Kontrola	0.00044	1.43824	0.4104273	15.946628
	IMO	0.00007	1.51086	0.4265204	12.729509
Lhb	Kontrola	0.00105	0.91858	1.1319663	22.633449
	IMO	0.00142	0.21445	0.0631458	13.799387
Lhcgr	Kontrola	0.06235			
	IMO	0.0045	0.21495	0.0624064	13.761116
Nr3c1	Kontrola	0.02113	1.04798	0.3583503	10.085904
	IMO	0.13639			
Star	Kontrola	0.01417	0.94122	0.3546413	5.4468037
	IMO	0.03139	0.64185	0.3476472	9.9123973
Cyp11a1	Kontrola	0.00098	0.80856	0.4287354	6.5308863
	IMO	0.01914	0.58535	0.2485238	5.678706
Hsd3b1/2	Kontrola	0.07006			
	IMO	0.71436			
Cyp17a1	Kontrola	0.00102	0.72217	0.3168222	6.1360924
	IMO	0.00001	0.58369	0.4262061	6.8433161

5.3.2. Efekti stresa primenjenog na početku neaktivne faze na aktivnost gena časovnika

Budući da je vreme stres događaja ključno za aktivnost steroidogenih gena, bilo je od interesa posmatrati eksprimiranost gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama u satima nakon IMO.

IMO primenjena na početku svetle faze ZT 0-3, je izmenila transkripcioni profil gena časovnika u časovima posle stresne situacije (Tabela 5.11.). Povećani *Bmal1* i *Per1/2*, na kraju IMO sesije uticali su na dnevnu varijaciju, pomeranjem akrofaze (Slika 5.12., A, D; Tabela 5.11.). Povećana transkripcija *Bmal1* i *Per1* je bila praćena porastom BMAL1 i PER1 u prvih 23 sati nakon IMO (Slika 5.11., L). Eksprimiranost *Rev-erba* (Slika 5.11., H) i *Rev-erbb*

(Slika 5.11., I) smanjena je neposredno posle i 7 sati posle IMO a nakon toga se vraća na nivo kontrolnih vrednosti . IMO nije promenila ekspimiranost *Clock*, *Npas2*, kao i *Cry2*, *Rora/Rorb* (Slika 5.11. B, C, G, J, K).



Slika 5.11. Efekti stresa primenjenog na početku neaktivne faza na elemente časovnika. IMO je primenjena u ZT0-ZT3 i životinje su žrtvovane u četiri vremenske tačke tokom 24 sata (ZT3, ZT11, ZT17, ZT24). Leydig-ove ćelije su izolovane, ekstrahovana RNK, korišćena za RT i kasnije RQ-PCR analizu ekspimiranosti gena časovnika (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K). Tačke podataka su srednje vrednosti grupe \pm vrednosti SEM (n = 5-6). Za parametre ritma pogledajte Tabelu 5.11. Nivo proteina PER1 (L) određen je Western blot analizom. Prikazane su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih u odnosu AKTIN, prikazana je u formi stubića \pm SEM.* Statistički značaj između kontrole i IMO grupe u istoj vremenskoj tački (p < 0,05). # Statistička značajnost između grupa uključujući sve vremenske tačke procenjene ANOVA testom (*p < 0,05, **p < 0,01).

Tabel. 5.11. Parametri ritma – nivo hormona, nivo eksprimiranosti gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama. Pacovi su izloženi IMO i žrtvovani u četiri vremenske tačke u toku dana, nakon čega su izolovane Leydig-ove ćelije, dobijena RNK i zatim određena relativna eksprimiranost gena časovnika. Podaci u tabeli analizirani su upotrebom Cosinor paketa u R studiju i Cosinor.online softvera.

	Grupa	p	Mezor	Amplituda	Akrofaza
<i>Clock</i>	Kontrola	0.06444			
	IMO	0.07118			
<i>Npas2</i>	Kontrola	0.1102			
	IMO	0.07771			
<i>Bmal1</i>	Kontrola	0.00001	0.5622	0.411542	2.0579933
	IMO	0.59844			
<i>Per1</i>	Kontrola	0.00055	1.05008	0.126228	10.165059
	IMO	0.00111	1.08827	0.2076466	3.3964622
<i>Per2</i>	Kontrola	0.00001	1.84906	0.9240734	12.829839
	IMO	0.01663	0.6816	0.4649529	7.0664383
<i>Cry1</i>	Kontrola	0.00008	1.50433	1.7003243	18.961253
	IMO	0.92437			
<i>Cry2</i>	Kontrola	0.00964	0.58838	0.4897278	7.3179956
	IMO	0.11225			
<i>Rev-erba</i>	Kontrola	0.00001	1.40987	0.5312084	12.849155
	IMO	0.06735			
<i>Rev-erbb</i>	Kontrola	0.00316	0.90266	0.5531543	8.5574898
	IMO	0.00787	0.44164	0.1914468	5.0329685
<i>Rora</i>	Kontrola	0.10364			
	IMO	0.17989			
<i>Rorb</i>	Kontrola	0.00019	0.79593	0.7591833	8.2051065
	IMO	0.17989			
<i>Rora</i>	Kontrola	0.10364			
	IMO	0.17989			

5.4. Ispitivanje efekata *in vivo* tretmana sintetičkim glukokortikoidom na cirkadijalnu aktivnost Leydig-ovih ćelija

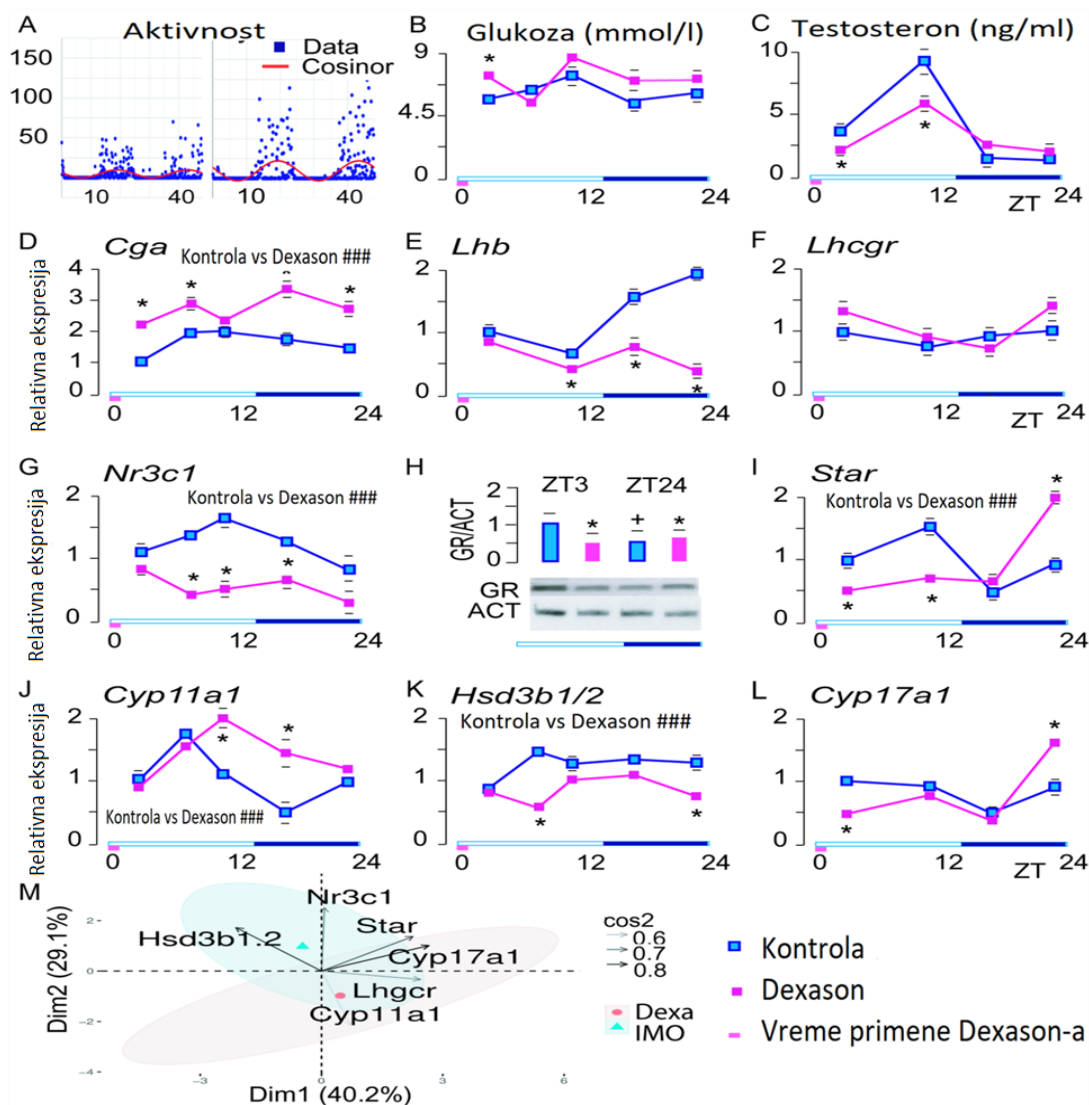
Poznato je da su glukokortikoidi, zajedno sa adrenalinom, primarni hormonski medijatori reakcije Leydig-ovih ćelija na stres (Marić i sar. 1996, Andric i sar., 2013). Da bi se analizirala sličnost delovanja glukokortikoida i IMO na proizvodnju testosterona i časovnik u Leydig-ovim ćelijama, pacovi su tretirani Dexason-om u ZT0, i efekti analizirani nakon tretmana na ZT3, ZT7, ZT11, ZT17, odnosno ZT23.

5.4.1. Efekti tretmana sintetičkim glukokortikoidom na diurnalnu steroidogenu aktivnost Leydig-ovih ćelija

Radi utvrđivanja efikasnost tretmana praćena je aktivnosti pacova 48h pre i 48h nakon primene Dexason-a (Slika 5.12., A) kao i nivoa glukoze u krvi (Slika 5.12., B). Primena Dexason-a povećala je aktivnost pacova oko 2,5 puta u poređenju sa kontrolom ($875,6 \pm 239,1$ vs $2142,3 \pm 573,9$) i poremetila nivo i cirkadijalni ritam testosterona u krvi smanjenjem mesora i amplitude, i odloženom akrofazom (Tabela 5.12.).

Adenohipofizni geni *Cga* (Slika 5.12., D), *Lhb* (Slika 5.12., E) izgubili su cirkadijalni obrazac transkripcije, dok je profil ekspimiranja *Nr3c1* smanjen i izmenjenog ritma (Slika 5.12., G, Tabela 5.12.) praćen smanjenjem GR (Slika 5.12., H; Tabela 5.12.). *Star* (Slika 5.12., I; Tabela 5.12.) i *Cyp17a1* (Slika 5.12., L; Tabela 5.12.) izgubili su cirkadijalni profil ekspimiranja (Slika 5.12., K), dok je ekspimiranje gena *Cyp11a1* pokazalo pomeranje akrofaze (Slika 5.12., J) nakon delovanja glukokortikoida. Pored toga, nivo *Hsd3b1/2* transkripta je bio smanjen u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Slika 5.12., K).

PCA analizom poređen je efekat jutarnjeg IMO i efekat glukokortikoida na transkripciju gena povezanih sa steroidogenezom (Slika 5.12., M). PCA je pokazala delimično preklapanje klastera dva tretmana iako u manjem stepenu postoji tendencija odvajanja kroz PC2 i PC1. Poređenje varijabilnosti podataka o ekspimiranosti steroidogenih gena između IMO i Dexason grupe, analizom varijanse, uzimajući u obzir sve tačke vremena, je potvrdilo da oba eksperimentalna tretmana izazivaju slične odgovore na *Nr3c1*, *Star*, *Hsd3b1/2*, i *Cyp17a1* (Slika 5.12., M).



Slika 5.12. Efekti tretmana sintetičkim glukokortikoidom na diurnalnu steroidogenu aktivnost Leydig-ovih ćelija. Pacovi su tretirani Dekasazonom (0,01 mg / 50 μ L / 100 g BV) u ZT 0. Životinje su žrtvovane u različitim vremenske tačke tokom 24 sata (ZT3, ZT7, ZT11, ZT17, ZT23). Krv je sakupljena za određivanje nivoa kortikosterona (A), glukoze (B) i testosterona (C) kao i za određivanje odnosa testosterona / kortikosterona (T / C) (D). Prikupljene su adenhipofize i izolovane Leydig-ove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti gena pomoću RQ-PCR. Analizirana je eksprimiranost adenhipofiznih gena *Gga* i *Lhb* (E, F) i gena Leydig-ovih ćelija povezanim sa steroidogenezom (G, H, J, K, L, M). Tačke podataka su grupne srednje vrednosti \pm vrednosti SEM (n = 5-6). Za parametre ritma pogledajte Tabelu 5.12. Nivo proteina GR (NR3C1, I) određen je Western blot analizom. Prikazani su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih u odnosu AKTIN, prikazana je u formi stubića \pm SEM.* Statistički značaj između kontrole i eksperimentalne grupe u istoj vremenskoj tački (p < 0,05). PCA analiza eksprimiranosti gena povezanih sa steroidogenezom u Leydig-ovim u različitim vremenskim tačkama tokom svetle i tamne faze u kontrolnim uslovima nakon tretmana (M). Dim1 i Dim2 predstavljaju prve dve PC i % zadržane varijabilnosti. cos2 predstavlja kvalitativni prikaz promenljivih. #Statistička značajnost između grupa uključujući sve vremenske tačke procenjene ANOVA testom (*p < 0,05, **p < 0,01).

Tabela 5.12. Parametri ritma – nivo hormona, nivo eksprimiranja gena adenohipofize i steroidogenih gena u Leydig-ovim ćelijama. Pacovi su tretirani Dexason-om i žrtvovani u četiri vremenske tačke u toku dana, zajedno sa kontrolnim grupama, nakon čega je uzeta krv, adenohipofize i izolovane Leydig-ove ćelije, dobijena RNK i zatim određena relativna eksprimiranost gena časovnika. Podaci u tabeli analizirani su upotrebom Cosinor paketa u R studiju i Cosinor.online softvera.

	Grupa	p	Mezor	Amplituda	Akrofaza
Testosteron	Kontrola	0.00625	5.67032	4.6721575	8.7713487
	Dexason	0.03068	4.57087	3.219243	11.484403
Kortikosteron	Kontrola	0.0511	6.61976	0.6027399	10.115898
	Dexason	0.58483			
Glukoza	Kontrola	0.00048	1.60802	0.5042201	15.475012
	Dexason	0.12564			
Cgb	Kontrola	0.00001	1.119	0.7393228	20.298525
	Dexason	0.07037			
Lhcgr	Kontrola	0.21749			
	Dexason	0.00346	1.00908	0.4730914	1.2793017
Nr3c1	Kontrola	0.00507	1.04056	0.3408214	10.296485
	Dexason	0.00209	0.58854	0.2332029	23.99514
Star	Kontrola	0.00088	0.80443	0.4267648	4.3464192
	Dexason	0.08000			
Cyp11a1	Kontrola	0.00029	0.97573	0.7669874	6.7839664
	Dexason	0.02231	0.52026	1.5203069	8.6639747
Hsd3b1/2	Kontrola	0.79087			
	Dexason	0.19254			
Cyp17a1	Kontrola	0.00032	0.69118	0.26562911	5.23021767
	Dexason	0.44320			

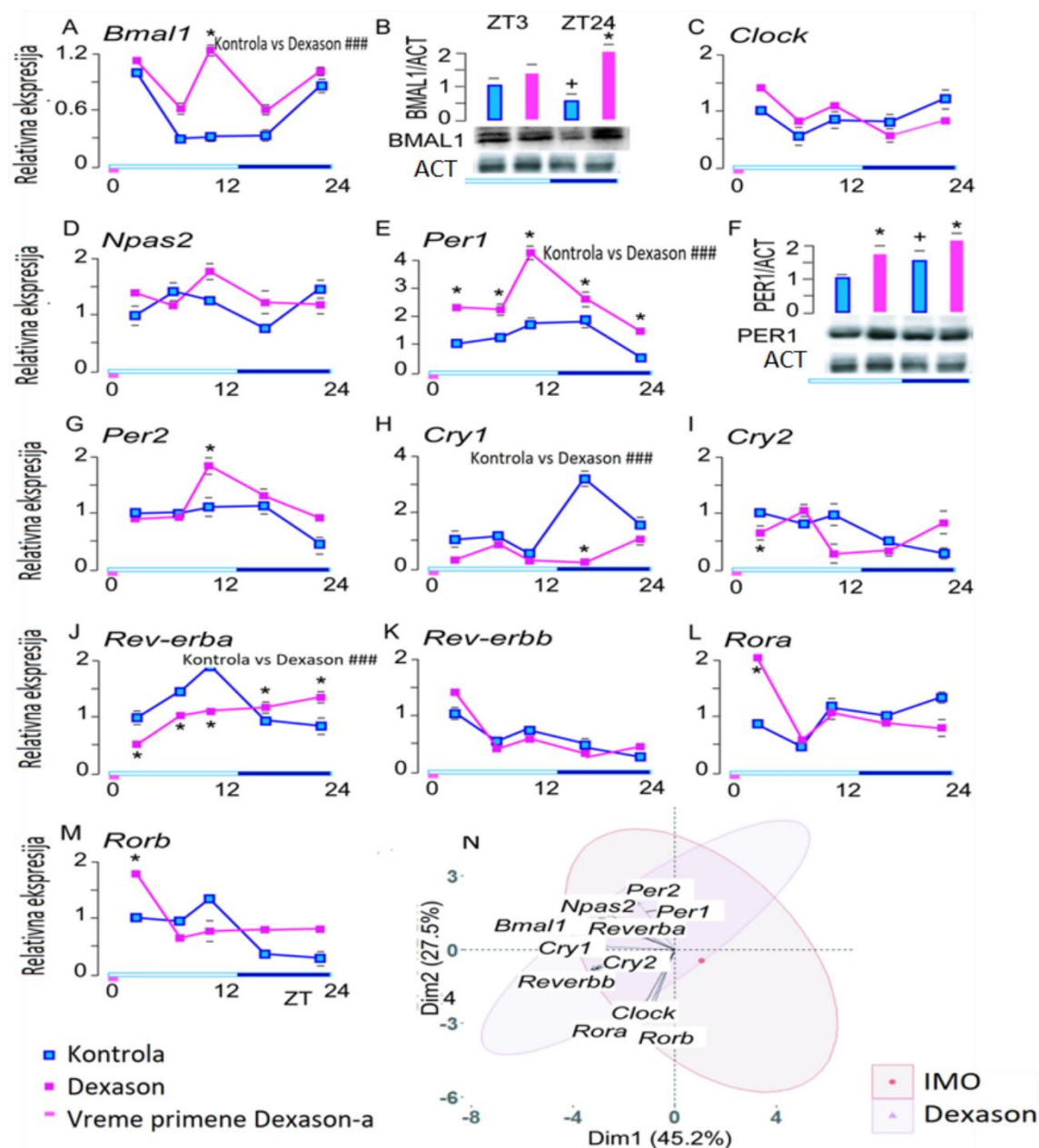
Tabela 5.13. PCA analiza eksprimiranosti gena povezanih sa steroidogenezom (A). PC1, PC2 i PC3 su koeficijenti linearnih kombinacija inicijalnih varijabli od kojih su izvedene osnovne komponente.

	PC1	PC2	PC3
Lhr	0,508755	-0,081731	0,5480501
Nr3c1	0,0157462	0,6112645	0,0935814
Star	0,4700491	0,3345628	-0,3880836
Cyp11a1	0,1480319	-0,520251	-0,6075064
Cyp17a1	0,5523088	-0,520251	-0,6075064
Hsd3b1/2	-0,439334	0,419872	-0,3166908

5.4.2. Efekti tretmana sintetičkim glukokortikoidom na diurnalni ritam eksprimiranosti gena časovnika

Dexason je promenio 24-časovni obrazac eksprimiranosti gena časovnika; nivo eksprimiranosti *Bmal1* (Slika 5.13., A) i *Per1* (Slika 5.13., E) je povećan dok je transkripcioni profil *Cry1* (Slika 5.13., H) i *Rev-erba* (Slika 5.13., J) izgubio karakterističan oscilatorni oblik; nivo eksprimiranosti *Rora/b* se povećao u ZT3 (Slika 5.13., L, M).

Tretman Dexason-om povećao je BMAL1 (Slika 5.13., B) i PER1 (Slika 5.13., E) i u svetloj i u tamnoj fazi dana. Poređenje efekata IMO i glukokortikoida na gene časovnika pomoću PCA analize nije pokazalo značajne razlike između eksperimentalnih grupa (Slika 5.13., N) i sugeriše slične efekte tretmana IMO i glukokortikoida. Dalje, upoređivanje efekata IMO i Dexason-a pokazuju sličan odgovor na *Bmal1*, *Per1/2*, *Cry1/2* i delimično *Rev-erba/b*. Ovakvi rezultati favorizuju glukokortikoide kao moguće posrednike uticaja stresa na časovnik u Leydig-ovim ćelijama.



Slika 5.13. Efekti tretmana sintetičkim glukokortikoidom na početku svetle faze i praćenje ekspimiranosti gena časovnika u satima nakon tretmana. Pacovi su tretirani Dekasazonom (0,01 mg / 50 μ L / 100 g BV) u ZT 0. Životinje su žrtvovane u različitim vremenskim tačkama tokom 24 sata (ZT3, ZT7, ZT11, ZT17, ZT23). Izolovane su Leydig-ove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne ekspimiranosti gena pomoću RQ-PCR (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K). Tačke podataka su srednje vrednosti grupe \pm vrednosti SEM (n = 5-6). Za parametre ritma pogledajte Tabelu 5.14. Nivo proteina PER1 (L) određen je Western blot analizom. Prikazani su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih u odnosu AKTIN, prikazana je u formi stubića \pm SEM.* Statistički značaj između kontrole i IMO grupe u istoj vremenskoj tački (p < 0,05). PCA analiza ekspimiranosti gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama u različitim vremenskim tačkama tokom svetle i tamne faze u kontrolnim uslovima nakon tretmana (M). Dim1 i Dim2 predstavljaju prve dve PC i % zadržane varijabilnosti. cos2 predstavlja kvalitativni prikaz promenljivih.). #Statistička značajnost između grupa uključujući sve vremenske tačke procenjene ANOVA testom (*p < 0,05, **p < 0,01)

Tabela 5.14. Parametri ritma – nivo hormona, nivo eksprimiranosti gena adenohipofize i steroidogenih gena u Leydig-ovim ćelijama. Pacovi su tretirani Dexason-om i žrtvovani u različitim vremenske tačke u toku dana, zajedno sa kontrolnim grupama, nakon čega je sakupljana krv, adenohipofize i izolovane Leydig-ove ćelije, dobijena RNK i zatim određena relativna eksprimiranost gena časovnika. Podaci u tabeli analizirani su upotrebom Cosinor paketa u R studiju i Cosinor.online softvera.

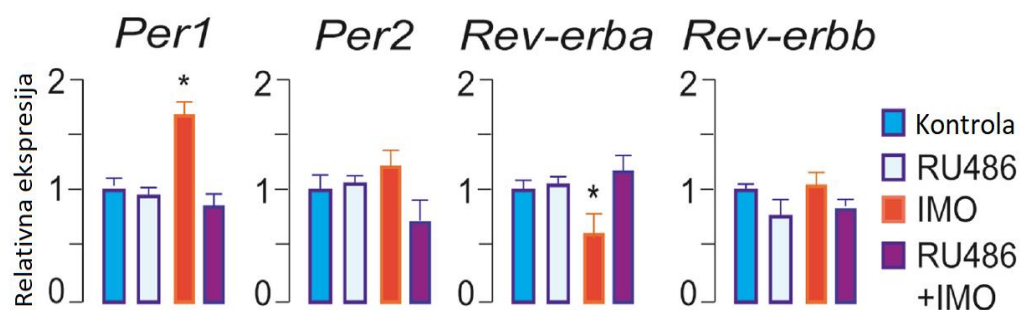
	Grupa	p	Mezor	Amplituda	Akrofaza
<i>Clock</i>	Kontrola	0.06323			
	Dexason	0.16075			
<i>Npas2</i>	Kontrola	0.18158			
	Dexason	0.11476			
<i>Bmal1</i>	Kontrola	0.00025	0.48001	0.3796809	1.0492495
	Dexason	0.27252			
<i>Per1</i>	Kontrola	0.000005	1.13693	0.6113995	11.930876
	Dexason	0.00036	2.30138	1.7954289	11.039418
<i>Per2</i>	Kontrola	0.00001	1.49404	1.0548774	12.987189
	Dexason	0.00114	1.02513	0.6183078	11.195279
<i>Cry1</i>	Kontrola	0.00611	0.55788	0.3755118	7.737497
	Dexason	0.00001	0.68104	0.8150411	2.9757146
<i>Cry2</i>	Kontrola	0.00045	0.59009	0.4652883	7.6908623
	Dexason	0.00209	0.63058	0.7013847	3.4727214
<i>Rev-erba</i>	Kontrola	0.00018	1.15089	0.7177235	9.8880797
	Dexason	0.05782			
<i>Rev-erbb</i>	Kontrola	0.05499	0.5896	0.2245077	6.4892875
	Dexason	0.01441	0.55904	0.3401786	2.5993333
<i>Rora</i>	Kontrola	0.14384			
	Dexason	0.10279			
<i>Rorb</i>	Kontrola	0.00006	0.73528	0.6315859	8.715996
	Dexason	0.34246	0.85715	0.2277633	2.3275668

Tabela 5.15. PCA analiza eksprimiranosti gena povezanih sa steroidogenezom (A). PC1, PC2 i PC3 su koeficijenti linearnih kombinacija inicijalnih varijabli od kojih su izvedene osnovne komponente.

	PC1	PC2	PC3
<i>Bmal1</i>	0.2004751	-0.5178304	-0.0300659
<i>Clock</i>	0.3648618	0.2875162	-0.0703636
<i>Cry1</i>	0.3968004	-0.2201994	0.2467994
<i>Cry2</i>	0.0626045	-0.3778225	0.4120895
<i>Per1</i>	0.1170197	-0.1376288	-0.6189648
<i>Per2</i>	0.0830438	-0.2475601	-0.5734792
<i>Rev.erba</i>	-0.378528	-0.1062341	0.0500589
<i>Rev.erbb</i>	0.4311853	-0.1560899	0.1929795
<i>Rora</i>	0.3979485	0.2617866	-0.0423765
<i>Rorb</i>	0.3806719	0.3059318	-0.0227586
<i>Npas2</i>	0.1106687	-0.4241987	-0.0967513

5.5. Ispitivanje efekata *in vivo*/intratestikularne blokade glukokortikoidnog receptora u uslovima stresa

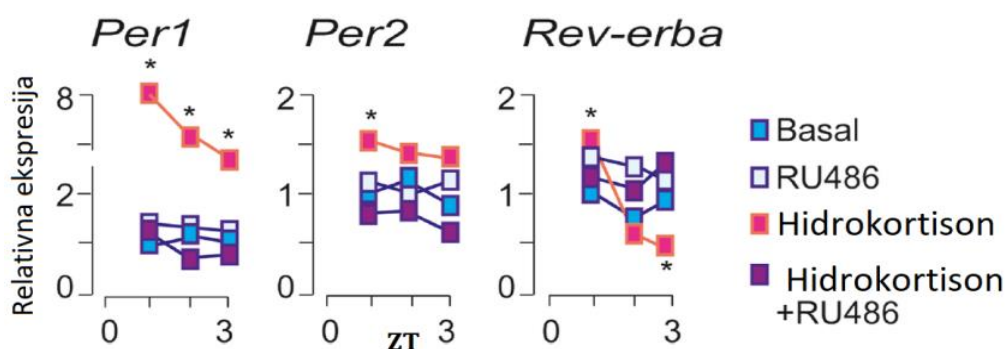
S obzirom da je PCA pokazala sličnu varijabilnost transkripcije gena u IMO- i Dexason-uslovima, može se pretpostaviti da glukokortikoidi značajno doprinose efektima stresa na Leydigove ćelije. Da bi procenili mogući doprinos glukokortikoida u promenama časovnika u Leydig-ovim ćelijama izazvanim IMO, 12h pre IMO u testise pacova je iniciran blokator GR, RU486. Ovakav tretman je sprečio promene u *Per1*, i *Rev-erba* (Slika 5.14.) u Leydigovim ćelijama sugerišući da su promene eksprimiranja gena povezane sa GR aktivacijom. S obzirom da je RU486 efikasno sprečio promene genske ekspresije u ćelijama poreklom od pacova koji su izlagani IMO bez efekta na transkripciju gena u ćelijama kontrolnih životinja, pretpostavljamo da je delovanje antagoniste dominantno usmereno na GR, a ne i na progesteronski receptor.



Slika 5.14. Intratestikularna blokada GR sprečava promene *Per1* i *Rev-erba* u Leydigovim ćelijama IMO pacova. RU486 (20 µg u 20 µl/testisu) ili DMSO (20 µl/testis) je injektiran intratestikularno, 12h pre IMO tretmana; na kraju IMO tretmana životinje su žrtvovane, izolovane su Leydig-ove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti gena pomoću RQ-PCR. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti grupe ± SEM vrednosti (n = 5-6).

5.6. Ispitivanje efekata *ex vivo* blokade glukokortikoidnog receptora u Leydig-ovim ćelijama

Radi procene direktnog efekta glukokortikoida na časovnik u Leydig-ovim ćelijama, primarna kultura Leydig-ovih ćelija je tretirana sa Hydrocortison-om (agonista GR) i RU486 (antagonista GR). Kao što se i očekivalo, tretman Hydrocortison-om je povećao transkripciju *Per1*, *Per2* i smanjio transkripciju *Rev-erba*. RU486 je umanjio povećanje mRNA transkripta izazvanog Hydrocortison-om za *Per1*, *Per2*, *Rev-erba* (Slika 5.15.), potvrđujući direktan efekat GR-signalizacije na časovnik u Leydig-ovim ćelijama.



Slika 5.15. Ex vivo blokada glukokortikoidnog receptora u Leydig-ovim ćelijama. Leydig-ove ćelije su izolovane iz testisa odraslih pacova i zasadene u Petri posude (3×10^6 Leydig-ovih ćelija / posude). Posle 6 sati odmora u 10% FBS-DMEM / F12, ćelijski medij je promenjen sa svežim DMEM / F12 i ta vremenska tačka je navedena u ZT0. Leydig-ove ćelije su stimulisane sa Hydrocortison-om (100 nM) ili u kombinaciji sa RU486 (1 mM) na ZT0, ZT10, ZT20. Posle 4h stimulacije, Leydig-ove ćelije su isprane i čuvane na -80° . Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti gena pomoću RQ-PCR. Tačke podataka su grupne vrednosti \pm SEM vrednosti tri nezavisna eksperimenta. * Statistički značaj između kontrolne i eksperimentalne grupe ($p < 0,05$).

6. Diskusija

6.1. Stres-reaktivni odgovor Leydig-ovih ćelija u zavisnosti od vremena dešavanja stresogene situacije

Kao što je ranije pomenuto, stresori aktiviraju simpatičko-adreno medularnu osovину (SAM) i hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalnu (HPA) osovину u organizmu, usled čega dolazi do povećanja nivoa adrenalina i glukokortikoida u krvi. Organizam se priprema za stanje "borbe ili bega" i aktiviraju se brojni fiziološki procesi značajni za prilagođavanje i preživljavanje (Rivier i Rivest, 1991; Dhabhar, 2000). Međutim stres inhibiše procese koji u datom momentu ne poboljšavaju sposobnost prilagođavanja i preživljavanja. Pokazano je da stres može inhibisati funkcionisanje hipotalamo-hipofizno-gonadalne (HPG) osovine i time menjati koncentraciju polnih hormona u krvi. S obzirom da je reproduktivna sposobnost najvažnija odlika vrste u evolutivnom pogledu, organizmi su razvili različite adaptivne mehanizme koji omogućuju uspešnu reprodukciju čak i u uslovima stresa (Rivier i Rivest, 1991; Dhabhar, 2000; Yaribeygi, 2017). Uloga časovnika u Leydig-ovim ćelijama i njegov značaj u održavanju reproduktivne sposobnosti već su pokazani (Alvarez i sar., 2008, Baburski i sar., 2016, 2015). Rezultati ove disertacije ukazuju i na moguću vezu glukokortikoidne komponente odgovora na stres i časovnika u Leydig-ovim ćelijama na održavanje reproduktivne sposobnosti.

Poznato je da akutni psiho-fizički stres može uticati na reproduktivnu sposobnost, dovodeći do smanjenog nivoa testosteroe u krvi kod adultnih pacova, putem smanjenja aktivnosti steroidogenih enzima CYP17 i HSD3B (Marić i sar., 1996) ali i smanjenjem njihove ekspresiranosti (Andrić i sar., 2013). Uloga glavnih gena časovnika, *Bmal1*, *Rev-erba* u održavanju reproduktivne sposobnosti muškaraca pokazana je ranije (Alvarez i sar., 2008; Hodžić i sar., 2013; Liang i sar., 2013). Poznato je i da u Leydig-ovim ćelijama, geni odgovorni za proizvodnju testosteroe (*Star*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1*) zajedno sa najvažnijim genima časovnika (*Bmal1*, *Per1/2*, *Cry1/2*, *Rev-erba/b*, *Rora/b*, *Dec1/2*) imaju ritmičnu ekspresiranost (Baburski i sar., 2016, 2015).

Međutim, ranija istraživanja vršena na različitim eksperimentalnim modelima i ćelijskim linijama, bila su fokusirana na praćenje gena časovnika u uslovima stresa na početku svetle faze (Kostić i sar., 1997; Andrić i sar., 2012; Kinoshita i sar., 2012; Landgraf

i sar., 2014). Iz tog razloga bilo je neophodno ispitati uticaj stresa i glukokortikoida u različitim periodima tokom 24h. Istraživanja u okviru ove disertacije su osmišljena da prate odgovor organizma na stres i povećan nivo glukokortikoida na početku i kraju svetle i tamne faze dana radi analiziranja cirkadijalnih varijacija u zavisnosti od vremena.

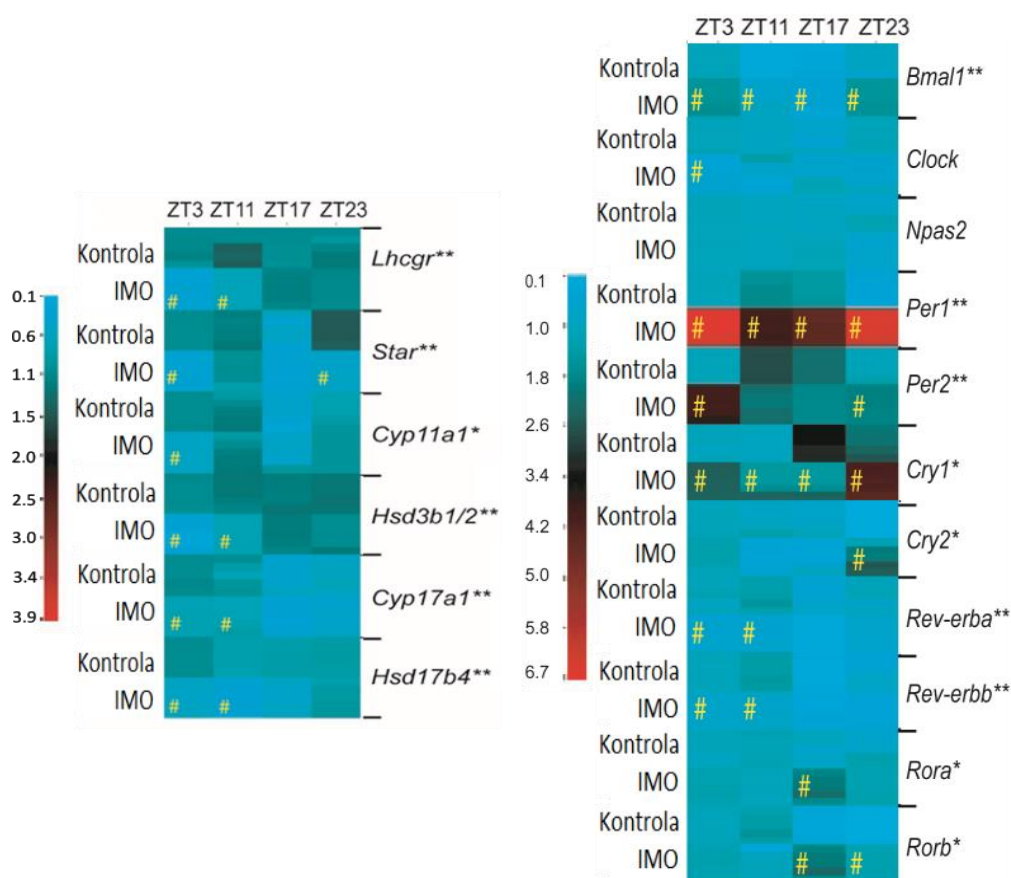
Rezultati pokazani u studiji primenjene akutne imobilizacije (1xIMO) u različitim vremenskim tačkama u toku dana sugerišu da cirkadijalno vreme predstavlja važan element u određivanju reakcije na stres.

Dobijeni rezultati pokazali su da akutni stres bez obzira na period dana, smanjuje nivo testosterona u krvi i povećava nivo glukokortikoida. Ovakvi rezultati mogu se pripisati efektima glukokortikoida na različite delove reproduktivne osovine. Takođe, primećena je smanjena ekspresija ključnih gena povezanih sa steroidogenezom (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1/2*) tokom svetle (inaktivne) faze (Slika 6.1.).

1xIMO je pokazala različite efekte na ekspresiju glavnih gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama. Stres bez obzira na vreme dešavanja stimulše *Per1/PER1* i *Bmal1/BMAL1* što otvara diskusiju o mogućem direktnom delovanju glukokortikoida na časovni u Leydig-ovim ćelijama. Primećen je porast u ekspresiji gena *Per1* u svim analiziranim vremenskim tačkama, kao i *Per2* na početku svetle i na kraju tamne faze. Slični rezultati pokazani su i na drugim organima (Tahara i sar., 2015; Yamamoto i sar., 2005). Ekspresija gena negativnih regulatora *Rev-erba* i *Rev-erbb* bila je smanjena tokom svetle faze (Slika 6.1.).

Takođe, stres u neaktivnoj fazi (svetloj) inhibiše *Lhcgr*, *Hsd3b1/2*, *Hsd17b4* ali takva inhibicija izostaje ukoliko se stres desi u aktivnoj (tamnoj) fazi. Ovakvi rezultati podržavaju hipotezu o važnosti cirkadijalnog sistema u oblikovanju stres-reaktivnog odgovora Leydig-ovih ćelija. Drugim rečima, geni časovnika direktno (preko E-, ROR- ili D-boksa) mogu da regulišu aktivnost ciljnih pa i steroidogenih gena ali i indirektno delovanjem na CCG koji onda kao transkripcioni faktori regulišu transkripciju drugih gena važnih za endokrinu funkciju.

Tumačenje dobijenih rezultata je vrlo izazovno, jer je eksprimiranost gena u Leydigovim ćelijama višestruko-regulisani proces koji uključuje nekoliko signalnih puteva usmerenih na hormone, pre svega na kortikosteron, LH ali i mnoge druge. Ovi hormoni imaju ritmičnu sekreciju i na ritam njihove sekrecije takođe može uticati stres. Pored toga, sistem cirkadijalnog časovnika deluje u interakciji sa mnogim različitim signalima dajući integrisani izlaz tokom 24-časovnog ciklusa, regulišući i druge ciklične aktivnosti u ćeliji (Al-Kaf, 2018). Meerlo i Daan su 1998 došli do rezultata koji pokazuju da akutni stres ne remeti centralni oscilator u SCN (Meerlo i Daan, 1998), a ovakva istraživanja dodatno ukazuju na složenost procesa koji se odvijaju u “borbi” između težnje stresa da poremeti homeostazu i časovnika koji tu homeostazu želi da očuva.



Slika 6.1. Uticaj akutne IMO na eksprimiranost gena povezanih sa steroidogenezom i gena časovnika.

Mape grupisanih slika pokazuju efekte 1xIMO na transkripciju gena. Crvena polja predstavljaju visoku stimulaciju dok svetlo plava polja predstavljaju inhibiciju transkripcije gena. Zvezdice označavaju razliku između kontrolnih i IMO grupa u svim vremenskim tačkama, analizirane dvofaktorskom ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Žuta # označava razliku između kontrole i IMO na specifičnom ZT analiziranom Mann-Whitney testom na nivou $p < 0,05$ ($n = 5$).

6.2. Odgovor Leydig-ovih ćelija na ponavljane stresne situacije u zavisnosti od cirkadijalnog vremena dešavanja stresa

Poznato je da ponovljena izloženost stresoru bilo kakve prirode, može dovesti do trajno povišenog nivoa glukokortikoida kod ljudi (Kerr i sar., 1991; Bartolomucci i sar., 2005). Ovako produžen povišen nivo GC u plazmi može imati štetne efekte na zdravlje i može doprineti razvoju i nastanku mnogih psiho-somatskih poremećaja (Agorastos i sar., 2020).

Istraživanja su pokazala da više puta ponovljeni stres dovodi do izmenjenog ritma spavanja, telesne temperature, lokomotorne aktivnosti i lučenja hormona (Moreau i sar., 1995; Gorka i sar., 1996; Dubovicky i sar., 2007). Ovi poremećaji ritma predstavljaju neravnotežu između normalno precizno orkestriranih fizioloških procesa i procesa ponašanja i pretpostavljaju da pojedinac postaje podložan razvoju fizioloških i psiholoških problema (Knutsson, 2003).

Ranije je pokazano da je za razliku od perifernih časovnika, centralni časovnik prilično neosetljiv na GC, jer u SCN-u nije uočena eksprimiranost gena za MR, ni GR (Balsalobre i sar., 2000). Jiang i sar. 2011, su pokazali smanjenje amplitude oscilacija *Per2* u SCN pacova nakon četiri nedelje stresa. Takođe, ista primena stresa smanjila je eksprimiranost CLOCK-a i BMAL1 proteina u SCN-u (Jiang i sar., 2011). Slično tome Kinoshita i sar., 2012 pokazali su da ponovljeni stres tokom sedam dana smanjuje eksprimiranost PER2 proteina u SCN kod miševa. Zajedno, ove studije pružaju dokaze da su određeni stresori sposobni da poremete osnovne komponente časovnika u SCN-u.

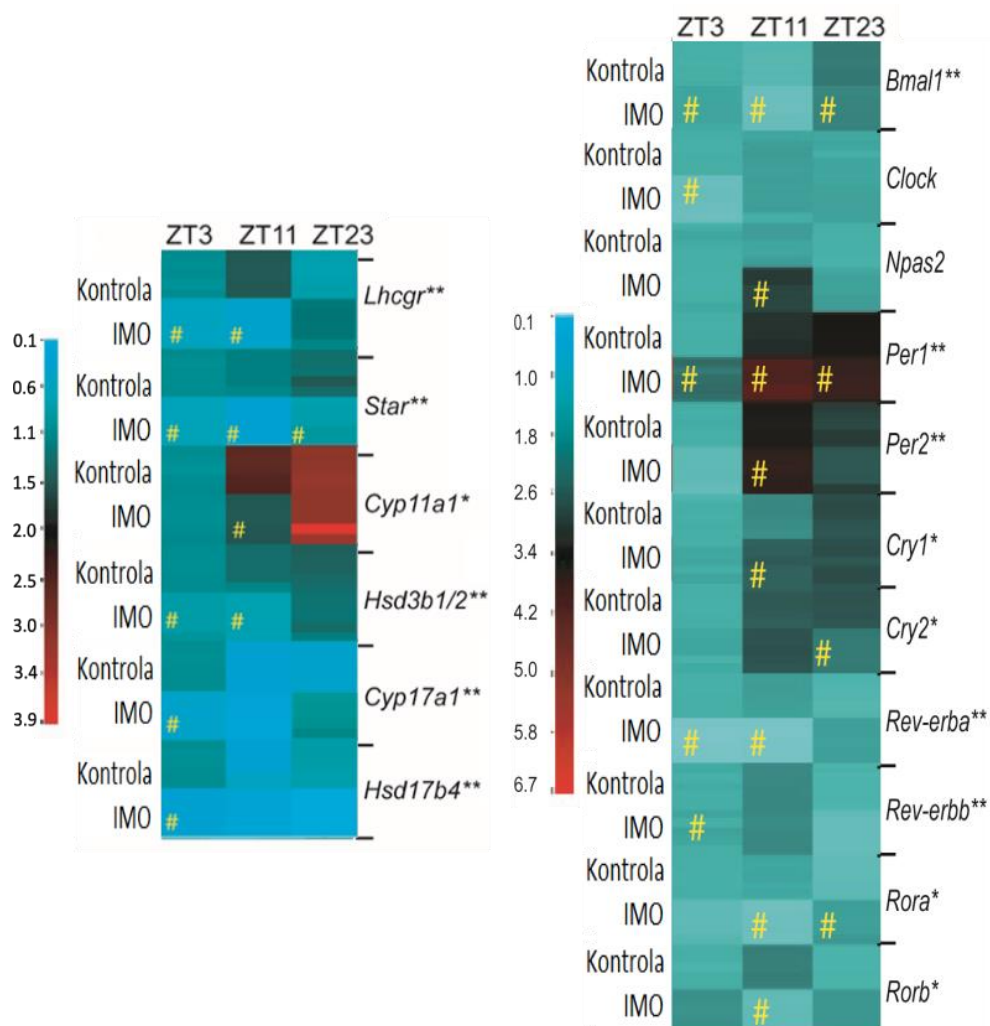
Uticaj ponovljenog stresa na funkcionisanje perifernih cirkadijalnih časovnika, je vrlo aktuelna tema. Nažalost, u savremenom društvu ponovljeni stres često je rezultat stila života koji podrazumeva nedovoljno prostora za odmor i spavanje što doprinosi razvoju različitih poremećaju u organizmu. Uticaji ponovljenog stresa na poremećaj reproduktivne sposobnosti žena je veoma aktuelna i vrlo izučavana tema (Chatterjee, 2009). Međutim, ono što je vrlo zanimljiva i nedovoljno razjašnjena tema je uticaj ponovljenog stresa na regulaciju časovnika u reproduktivnim organima i ženskog i muškog pola.

Noviji rezultati pokazali su da deset puta ponovljeni IMO smanjuje broj spermatozoida i značajno smanjuje funkcionalnost spermatozoida kod adultnih pacova (Starovlah i sar., 2020). U skladu sa ovim tvrdnjama su i rezultati istraživanja u okviru ove

disertacije, u kojima je smanjen nivo testosterona u neaktivnoj (svetloj) fazi. Međutim, zapaženo je da je efekat ponovljenog stresa na nivo testosterona u krvi najmanje bio izražen u tamnoj (aktivnoj) fazi dana. Pretpostavka je da je ovakav odgovor povezan sa cirkadijalnom organizacijom glukokortikoidne signalizacije u Leydig-ovim ćelijama. Naime, ekspimiranje GR u Leydig-ovim ćelijama ima cirkadijalan obrazac a ponavljani stres, stimuliše nivo GR u tamnoj fazi dana. Takođe, detektovan je cirkadijalni obrazac steroidogenih gena (Baburski i sar., 2019) što u mnogome komplikuje analizu efekata stresa. Dalje, pokazan je smanjen nivo ekspimiranosti gena (*Lhcgr*, *Star*, *Hsd3b1/2*, *Cyp17*, *Hsd17b4*) uključenih u steroidogenezu u neaktivnoj (svetloj) fazi dok u aktivnoj (tamnoj) fazi ovakve promene uglavnom izostaju. Izrazito različit efekat ponavljalog stresa na steroidogene gene se svakako može povezati sa steroidogenim kapacitetom Leydig-ovih ćelija i nivoom testosterona u krvi koji je značajno viši ukoliko se stres dešava u aktivnoj fazi dana. Korelaciona analiza je pokazala da je stepen ekspimiranosti gena *Lhcgr*, *Hsd3b1/2*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1* u aktivnoj i neaktivnoj fazi u uslovima ponavljalog stresa u pozitivnom odnosu sa nivoom testosterona u cirkulaciji.

Primećene su i promene u ekspresiji gena časovnika što je vrlo verovatno direktan i indirektan uticaj GC na ekspimiranost gena putem vezivanja GR za GRE ili je ova regulacija organizovana na neki drugi način. Kako god, jasan je uticaj ponovljenog stresa na organizaciju perifernog časovnika u Leydig-ovim ćelijama kao i na gene uključene u proces steroidogeneze.

Ekspimiranje gena časovnika *Per1* i *Bmal1* povećano je u svim ispitivanim vremenskim tačkama što je bilo i očekivano, obzirom na moguću regulaciju ovih elemenata časovnika glukokortikoidima. Zanimljivo je da, za razliku od akutne IMO, 10 puta ponovljena IMO ostvaruje najviše statistički značajnih efekata na gene steroidogeneze i časovnika u ZT11 (Slika 6.2.).



Slika 6.2. Uticaj deset puta ponovljene IMO na eksprimiranost gena povezanih sa steroidogenezom i gena časovnika. Mape grupisanih slika pokazuju efekte 1xIMO na transkripciju gena. Crvena polja predstavljaju visoku stimulaciju dok svetlo plava polja predstavljaju inhibiciju transkripcije gena. Zvezdice označavaju razliku između kontrolnih i IMO grupa u svim vremenskim tačkama, analizirane dvofaktorska ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Žuta # označava razliku između kontrole i IMO na specifičnom ZT analiziranom Mann-Whitney testom na nivou $p < 0,05$ ($n = 5$).

6.2.1. Poređenje odgovora nakon jednokratne i ponavljane IMO

Rezultati eksperimenata akutne i ponovljene IMO, ukazuju na različite efekte ova dva tipa stresa u različitim cirkadijalnim vremenima. Primećeni su inhibitorni IMO efekti na transkripciju *Lhcgr* u neaktivnom (svetlom), ali ne i u aktivnom periodu. Ovaj efekat ne zavisi od vrste primenjenog stresa. S obzirom da je signalizacija LH-receptora ključna za transkripciju steroidogenih gena i aktivaciju steroidogeneze (Dufau, 1988; Zirkin and Papadopoulos, 2018), smanjena eksprimiranost *Lhcgr* u neaktivnom periodu mogla bi da napravi razliku u odnosu na IMO primenjenu u aktivnom periodu. Takođe, IMO smanjuje transkripciju gena adenohipofize koji kodiraju LH pođedinice, *Cga* na kraju neaktivnog perioda i na početku aktivnog perioda kao i *Lhb* na kraju neaktivnog i tokom aktivnog perioda. Pretpostavka je da promene oba gena verovatno imaju posledice na nivo sekrecije LH i stimulaciju Leydig-ovih ćelija.

IMO utiče na organizaciju časovnika u Leydig-ovim ćelijama. 1xIMO i 10xIMO u oba primenjena oblika potencira eksprimiranost *Bmal1*/BMAL1 i *Per1/2*/PER1 i smanjuje eksprimiranost *Rev-erba*, što sugeriše da stresni stimuli mogu da remete časovnik u Leydig-ovim ćelijama. Dalje, BMAL1 se ciklično eksprimira u Leydig-ovim ćelijama pacova (Baburski i sar., 2019, 2015) i miša (Chen i sar., 2017), stimulišući eksprimiranost StAR (Alvarez i sar., 2008) čime doprinosi cikličnoj eksprimiranost ovog proteina. S obzirom da i akutni i ponovljeni IMO u tamnoj fazi stimulišu BMAL1, evidentno je da ovo može uticati na smanjene efekte stresa na steroidogenezu tokom noći.

Pored toga, prisustvo E-boxa kontrolisanog časovnikom kao i RORE sekvence u promoterima *Star*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1* (Chen i sar., 2017), ali i u promoterima steroidogenih regulatora kao što je *Nur77*, ukazuje da BMAL1, PER i REV-ERB u Leydig-ovim ćelijama mogu da regulišu eksprimiranost ovih gena i omogućće promene u njihovom intracelularnom nivou što implicira da mogu uticati na ritam steroidogeneze. Opširnije studije su neophodne da bi se potvrdila ova hipoteza.

Sistem časovnika je u interakciji sa mnogo različitih signalnih puteva unutar ćelija, što mu omoguććava da proizvede integrisane izlazne informacije tokom ciklusa od 24 sata.

Poznato je da je ritmičko lučenje kortikosterona važan vremenski signal za koordinaciju perifernog časovnika (Koch i sar., 2017). Kortikosteron deluje kao periferni sinhronizator časovnika regulacijom eksprimiranosti gena kroz aktivaciju posredovanu GR (Balsalobre i sar., 2000). Utvrđeno je da geni *Per1* i *Per2* sadrže elemente koji reaguju na glukokortikoide. Takođe, utvrđeno je da su *Rev-erba* i *Rora* negativno regulisani glukokortikoidima (Torra i sar., 2000).

Naši rezultati su pokazali da je dnevni obrazac eksprimiranosti *Nr3c1/GR* u Leydig-ovim ćelijama izmenjen usled IMO tretmana. Dakle, dobijeni rezultati sugerišu na mogući stresom posredovani efekat na cirkadijalnu dinamiku signalizacije kortikosteronom i elementa perifernog časovnika u Leydig-ovim ćelijama.

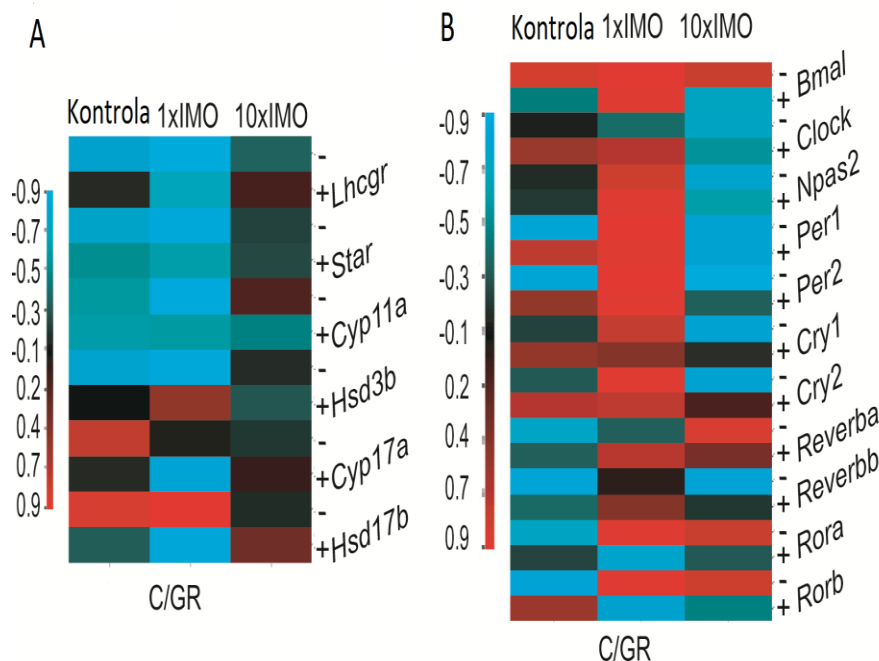
Radi jasnije analize dobijenih rezultata, dodatno je izvršena i korelaciona analiza kako bi procenili moguću povezanost dobijenih efekata sa GR-signalizacijom. Izvršena korelaciona analiza je predstavljena putem mapa grupisanih slika (*engl.* The Clustered Image Map (CIM)). Preciznije, podaci korišćeni za mapu grupisanih slika (Slika 6.3., A, B) predstavljaju korelaciju između GR-signalizacije (predstavljenog kao odnos kortikosterona u krvi/GR u Leydig-ovim ćelijama) i nivoa transkripcije gena povezanih sa steroidogenezom (Slika 6.3., A) i gena časovnika (Slika 6.3., B) u Leydig-ovim ćelijama. Mapa predstavlja odnos GR-signalizacije i ove dve grupe gena u svetloj/neaktivnoj (-) i tamnoj/aktivnoj (+) fazi dana u kontrolnim, akutnim IMO (1xIMO) ili 10xIMO uslovima.

U neaktivnoj fazi dana u kontrolnoj i akutnoj IMO grupi, analiza je pokazala negativnu korelaciju između C/GR i *Lhcgr*, *Star*, *Cyp11a1* i *Hsd3b* (Slika 6.3., A); pozitivna korelacija u neaktivnoj fazi kontrolne grupe primećena je između C/GR i *Cyp17a* i *Hsd17b* (Slika 6.3., A). Geni časovnika, kao što su *Bmal1*, *Npas2*, *Per1,2*, *Cry1,2* i *Rora, b* pozitivno koreliraju sa C/GR u uslovima kada se 1xIMO dešava u neaktivnoj fazi, dok su *Rev-erba* i *Rev-erbb* negativno korelisani (Slika 6.3., B). Takođe, u neaktivnoj fazi u uslovima 10xIMO negativna korelacija je primećena sa *Clock*, *Npas2*, *Per1,2*, *Cry1,2*, *Rev-erba, b* i *Rora, b*, gena (Slika 6.3., B).

Izvedena korelaciona analiza sugerisala je pozitivnu vezu između GR signalizacije (C/GR) i transkripcione aktivnosti gena *Bmal1*, *Per1,2*, *Cry1,2* i *Rora, b* i negativnu sa *Lhcgr*, *Star*, *Cyp11a1* i *Hsd3b1/2* povezanim sa steroidogenezom kada je 1xIMO primenjena u neaktivnoj fazi dana. Međutim, kada je IMO primenjena u neaktivnom periodu, negativna

veza sa *Clock*, *Npas2*, *Per1,2*, *Cry1,2*, *Rev-erba,b* i *Rora,b*, sugerisala je nešto drugačiju regulaciju. Pored toga, dnevni obrazac ekspresiranosti *Nr3c1/GR* u Leydig-ovim ćelijama je promenjen, smanjen u neaktivnoj fazi usled 1xIMO i povećan u 10xIMO, što doprinosi uočavanju različitih efekata. Međutim, IMO može uticati na mnoge druge signalne puteve koji su regulisani hormonima kao što su LH, PRL i adrenalin, koji su uključeni u višestruko kordinisane procese kao što je ekspresiranost gena i regulacija ritma perifernih časovnika.

Ukratko, rezultati pokazuju različitu osetljivost na stres u zavisnosti od vremena stresnog događaja. Oba tipa stresa (1xIMO i 10xIMO) potenciraju ekspresiranost elemenata časovnika koji deluju preko E-boxa (BMAL1 i PER1) bez obzira na fazu dana i inhibiraju elemente koji vrše svoju aktivnost preko RORE-boxa (*Rev-erba/b*), što sugeriše mogući uticaj na ekspresiranost gena ne samo na časovnik već i van njega.



Slika 6.3. Prikaz vrednosti dobijenih korelacionom analizom. Korelaciona analiza je izvršena između GR-signalizacije (predstavljene kao odnos kortikosteron/GR u krvi) i transkripcije gena povezanih sa steroidogenezom (A) ili gena časovnika (B) tokom neaktivne (-) i aktivne (+) faze dana u različitim eksperimentalnim uslovima. Nijanse crvena boje predstavljaju gene pozitivno povezane sa GR-signalizacijom. Nijanse plave boje odgovaraju genima koji su negativno povezani sa GR-signalizacijom.

Dobijeni rezultati su ukazali na postojanje veze između akutnog i ponovljenog stresa, glukokortikoidne komponente odgovora na stres i koordinisanog delovanja cirkadijalnog časovnika u regulaciji steroidogene aktivnosti, a samim tim i u oblikovanju muške reproduktivne fiziologije, naglašavajući značaj ritmičke aktivnosti Leydig-ovih ćelija u očuvanju normalnog funkcionisanja muškog reproduktivnog sistema.

6.3. Odgovor Leydig-ovih ćelija na porast nivoa glukokortikoida izazvanog stresom na početku svetle (neaktivne) faze

S obzirom da je akutna IMO primenjena na početku svetle faze pokazala efekat na eksprimiranost najvećeg broja gena uključenih u proces steroidogeneze i gena časovnika, imali smo za cilj da uočimo posledice jutarnjeg stresa na ritmičku aktivnosti Leydig-ovih ćelija u periodu nakon primene IMO.

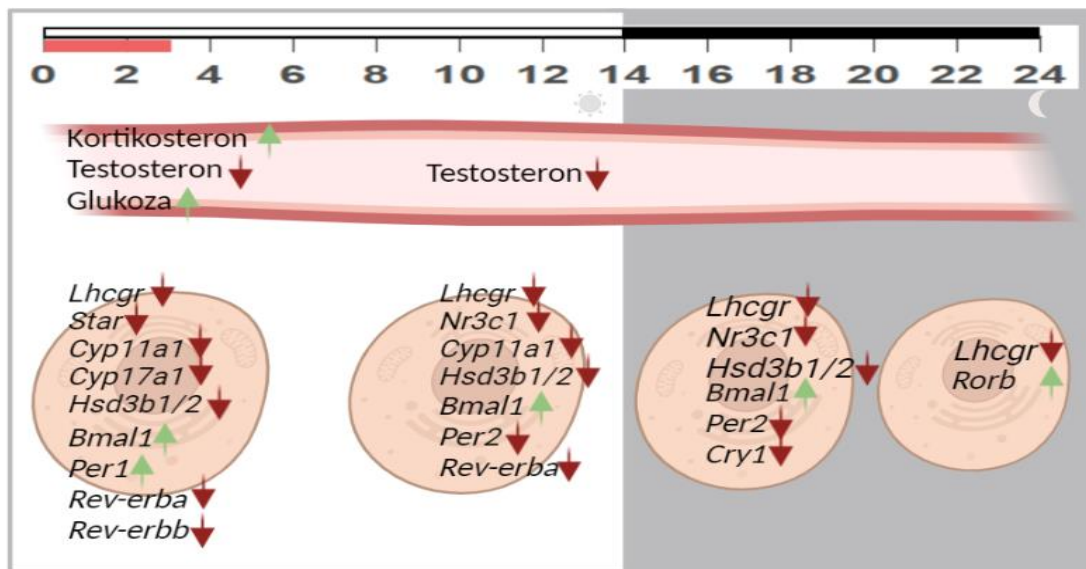
Primećeno je da je nakon primenjenog jutarnjeg IMO stresa, eksprimiranost *Lhcgr* ostala smanjena tokom čitavih 24 sata. Budući da je signalizacija LH receptora presudna za transkripciju steroidogenih gena i aktivaciju steroidogeneze (Dufau, 1988; Zirkin i Papadopoulos, 2018), ovakav efekat jutarnjeg stresa pokazao je promene i u sekreciji testosterona, odnosno sekrecija je bila smanjenja ali samo u neaktivnoj fazi dana. Takođe, IMO smanjuje transkripciju gena adenohipofize, *Cga* tokom neaktivne faze što će verovatno imati posledice na količinu pulsirajuće sekrecije LH i izmenjenu stimulaciju Leydig-ovih ćelija.

IMO je smanjila eksprimiranje *Nr3c1* u ZT11 i ZT17 (Slika 5.10., H) i GR u ZT3, ZT11 i ZT17 (Slika 5.10., I). Jutarnji IMO je smanjio amplitudu i mesor *Star*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1* gena i smanjio transkripciju *Hsd3b1/2* nekoliko sati nakon tretmana, međutim njihovo eksprimiranje ne pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na kontrole 20h nakon tretmana.

IMO primenjen na početku svetle faze uticao je na transkripciju gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama. Povećano je eksprimiranje *Bmal1* i *Per1* neposredno nakon IMO. Dok je eksprimiranost *Rev-erba*, i *Rev-erbb* kao i *Cry1* pokazala smanjen profil transkripcije. IMO

nije značajno uticao na eksprimiranost *Clock*, *Npas2*, kao i *Cry2*, *Rora* /*Rorb* ali je izmenio eksprimiranost proteina BMAL1 i PER1 u Leydig-ovim ćelijama.

Dobijeni rezultati ukazuju da se u satima nakon IMO tretmana smanjenjem koncentracije glukokortikoida u krvi, smanjuje i efekat promena na steroidogeni kapacitet i časovnik u Leydig-ovim ćelijama što predstavlja vrlo značajan rezultat i ukazuje na moguće pravce daljih istraživanja mehanizama odgovora na stres.



Slika 6.4. Uticaj jutarnjeg IMO na eksprimiranost gena časovnika. Zelene strelice predstavljaju stimulatorno, a crvene inhibitorno dejstvo. Statistički značaj između kontrolne i eksperimentalne grupe ($p < 0,05$). Kreirano pomoću Biorender.com.

6.4. Odgovor Leydig-ovih ćelija na tretman glukokortikoidima na početku svetle (neaktivne) faze

Kako bi potvrdili da li su efekti IMO primenjene na početku svetle faze na steroidogenu aktivnost i gene časovnika u Leydig-ovim ćelijama rezultat delovanja glukokortikoidne komponente odgovora na stres, izveden je ogled akutne oralne primene sintetičkih glukokortikoida na početku svetle faze, upotrebom leka Dexasona. Lek Dexason sadrži aktivnu supstancu Deksametazon, i pripada grupi kortikosteroidih lekova. Ranije su utvrđena mnoga pozitivna dejstva ovog leka na fiziološke procese kod ljudi i životinja (Olevsky, 1975).

Novija istraživanja su pokazala da Deksametazon, analog glukokortikoidnog hormona, indukuje eksprimiranost gena cirkadijalnog časovnika u fibroblastima pacova i prolazno menja fazu eksprimiranosti gena cirkadijanog časovnika *in vivo* (Balsalobre i sar., 2000). Dosadašnji rezultati pokazuju da tretman Deksametazonom u trajanju od 2 sata utiče na eksprimiranost gena povezanih sa cirkadijanskim časovnikom u zrelih granulosa ćelijama pacova (Chu i sar., 2012). Stoga je zaključeno da je lek Dexason vrlo povoljan za ispitivanje regulacije cirkadijalnog ritma.

Poznato je da na nivou transkripcije, glukokortikoidi sinhronizuju periferne oscilatore, utičući na eksprimiranost gena časovnika kao odgovor na niz promena (Balsalobre i sar., 2000). U Leydig-ovim ćelijama, glukokortikoidi oslobođeni kao odgovor na stres povećali su i ukinuli ritmičku transkripciju *Bmal1*, *Cry1/2* i *Rev-erba* i povećali *Per1*. Takođe, kosinor analiza je pokazala fazno pomeranje *Per1*, i nakon IMO tretmana i nakon tretmana glukokortikoidima.

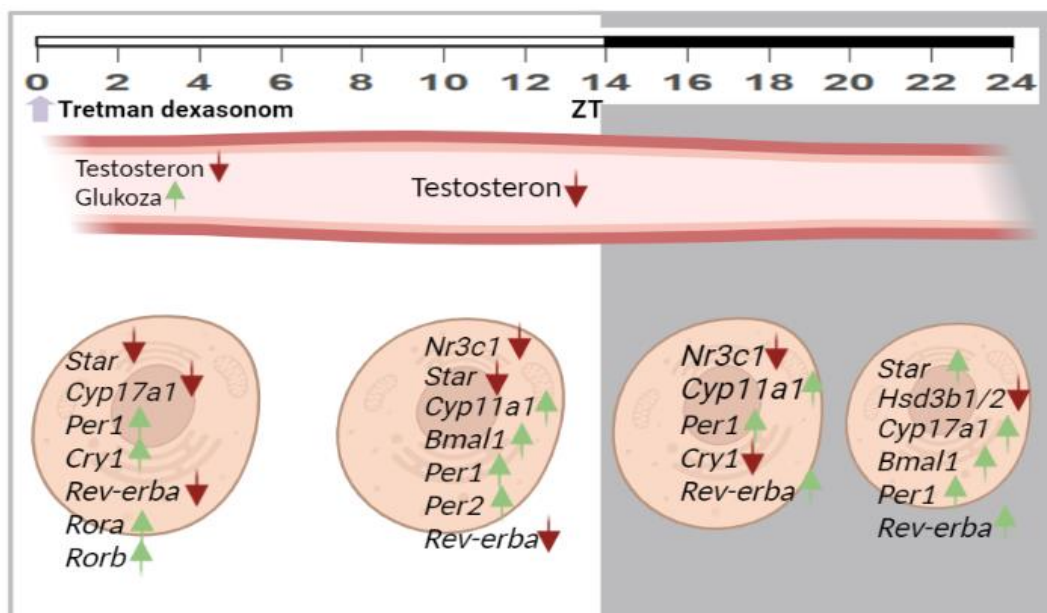
Jutarnji *in vivo* tretman Dexason-om izazvao je sličan odgovor kao i IMO tretman eksprimiranje gena časovnika. PC analiza pokazala je odsustvo značajnih razlika između IMO i tretmana glukokortikoidima na eksprimiranost gena časovnika u Leydig-ovim ćelijama (Slika 5.15). Slične promene u transkripciji gena časovnika sugerišu da IMO deluje na gene časovnika povećavanjem glukokortikoida u krvi. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u drugim perifernim časovnicima (Chrousos, 2009; Kino i Chrousos, 2011).

Pokazano je da GR utiče na eksprimiranost gena *Per1* (So i sar., 2009). Pored toga, GR takođe reguliše eksprimiranost *Rev-erba* (Torra i sar., 2000; Oster i sar., 2017). Rezultati ukazuju da su glukokortikoidi i GR važni u oblikovanju ritma časovnika, ali nisu jedini elementi koji učestvuju u modulaciji ritma Leydig-ovih ćelija.

PC analiza je takođe pokazala i slične efekte IMO tretmana i glukokortikoida na eksprimiranost *Nr3c1*, *Cyp11a1* i *Hsd3b1/2* u Leydig-ovim ćelijama. Međutim, rezultati se delimično razlikuju u relativnoj eksprimiranost gena *Lhcgr*, *Star* i *Cyp17a1*, što verovatno ukazuje na učešće drugih hormona koji se aktiviraju kao deo odgovora na stres.

Pokazano je da je tretman Dexason-om povećao voljnu aktivnost pacova tokom 48 sati nakon tretmana, ošto može biti rezultat dugotrajnog efekata koji je verovatno posredovan genomskim efektima GR.

U svakom slučaju dobijeni rezultati potvrdili su da, glukokortikoidi definitivno oblikuju ritam mnogih telesnih funkcija, uključujući i produkcije androgena ali i voljnu aktivnost kod pacova.



Slika 6.5. Uticaj oralnog tretmana sintetičkim glukokortikoidima na eksprimiranost gena časovnika. Zelene strelice predstavljaju stimulatorno, a crvene inhibitorno dejstvo. Statistički značaj između kontrolne i eksperimentalne grupe ($p < 0,05$). Kreirano pomoću Biorender.com.

6.5. *In vivo/ex vivo* blokada glukokortikoidnog receptora

Radi procene mogućeg efekta glukokortikoida na ciljane elemente časovnika u Leydig-ovim ćelijama koju su pokazali odgovor u ranije praćenim eksperimentalnim modelima, izvršena je analiza rezultata koji su dobijeni *in vivo* i *ex vivo* ogleđima blokada GR.

Ru486 ili mifepristone je sintetičko steroidno jedinjenje koje se koristi kao lek. On je antagonist GR kao i progesteronskog receptora. *In vivo* blokada GR intratesikularnom injekcijom RU486 sprečila je IMO-indukovane promene u eksprimiranosti *Per1* i *Rev-erbe* u Leydig-ovim ćelijama, sugerišući da je ovo dejstvo povezano sa aktivacijom GR. Budući da RU486 sprečava promene u eksprimiranosti gena u ćelijama eksperimentalne grupe životinja, a nema efekte na ćelije kontrolne grupe životinja pretpostavili smo da je efekat pretežno usmeren na GR.

Kao što je *in vivo* ogleđima pokazano, povećan nivo glukokortikoida, značajno utiče na časovnik u Leydig-ovim ćelijama kao i proizvodnju testosterona, a samim tim i reproduktivni proces. Stres uzrokuje fazne pomake ili gubitak oscilacija u transkripciji gena časovnika, naročito na početku svetle faze, ali je uticao i na periferni časovnik u Leydig-ovim ćelijama na početku aktivnog perioda (Medar i sar., 2021, Sciarra i sar., 2020; Starovlah i sar., 2020).

Ex vivo tretman potvrdio je rezultate dobijene u *in vivo* studijama. Hydrocortison je povećao transkripciju *Per1*, *Per2* i smanjio transkripciju *Rev-erba*. RU486 je umanjio povećanje mRNA transkripta izazvanog Hydrocortison-om za *Per1*, *Per2* *Rev-erba* (Slika 5.15.). Ovakav rezultat dodatno podržava hipotezu o direktnom delovanja GR na gene časovnika u Leydig-ovim ćelijama. Gen *Per1* je primer gena časovnika koji osim E-box-a ima i GRE elemente u njegovoj regulatornoj sekvenci. Vezivanje GR-a za sekvencu *Per2* takođe su pokazani (So i sar., 2009). Poznato je i da *Rev-erba* i *Rora* geni sadrže funkcionalno negativni GRE element (Torra i sar., 2000). Ovakvi rezultati odbacuju moguće efekte RU486 preko progesteronskog receptora (PR), obzirom da je poznato da je RU486, PR antagonista.

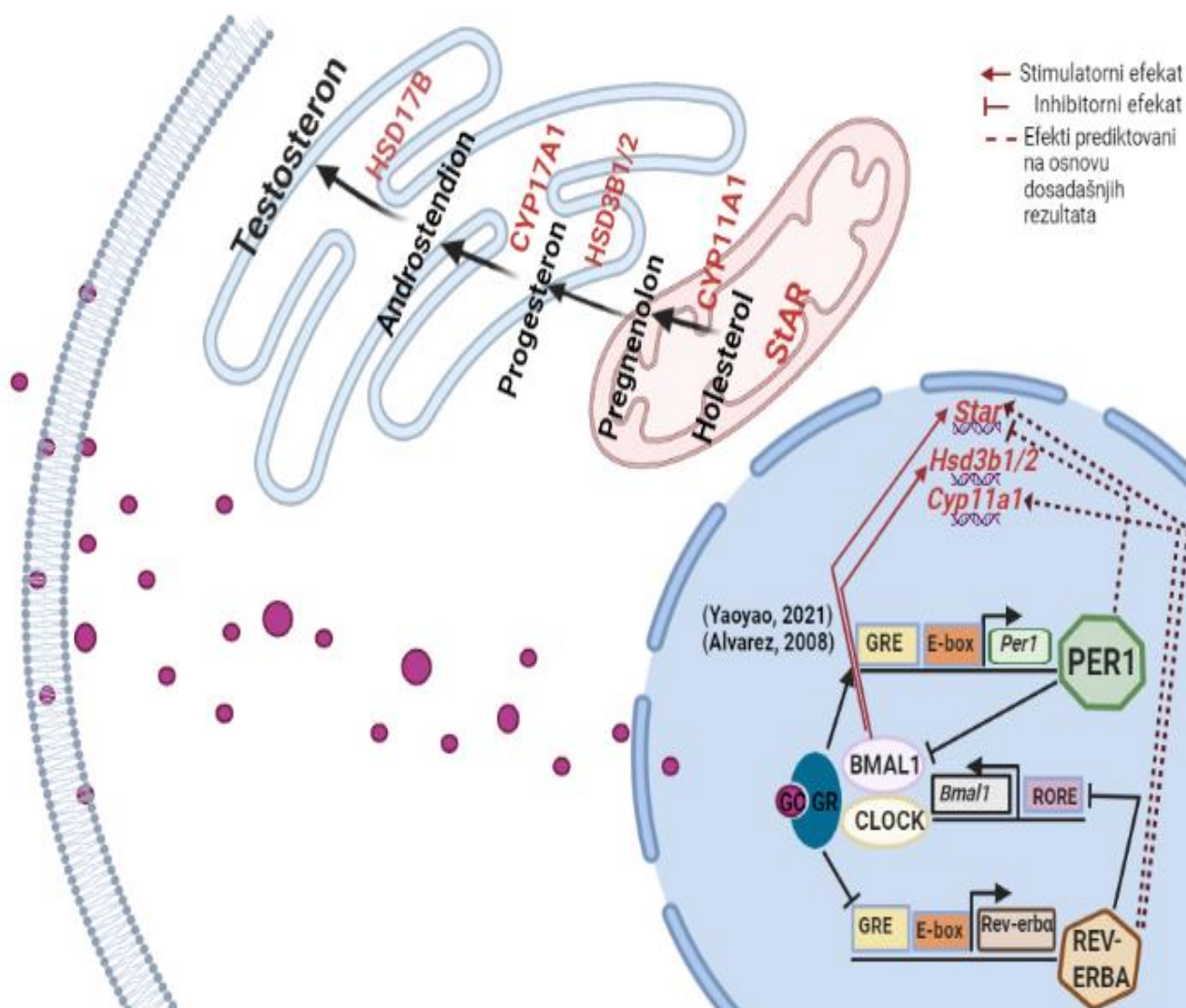
Interesantno je da određeni rezultati sugerišu da proteini časovnika i GR direktno fizički međusobno deluju. Takođe, moguće je neki geni časovnika verovatno mogu da acetiliraju GR i na taj način inhibiraju njegovu aktivnost, verovatno smanjenjem njegove sposobnosti da se veže za DNK (Nader i sar., 2009).

Trenutno se vrlo malo zna o subćelijskoj dinamici ili preciznoj vremenskoj korelaciji interakcija časovnik – GR. U svakom slučaju, rezultati ukazuju da interakcija glukokortikoida i cirkadijalnog časovnika uključuje regulaciju kako na nivou gena, tako i na nivou proteina i u Leydig-ovim ćelijama što definitivno utiče na steroidogeni kapacitet i funkcionisanje muškog reproduktivnog sistema.

7. Zaključci

Rezultati i diskusija ove doktorske disertacije, doveli su do sledećih opštih zaključaka:

- Rezultati dobijeni kroz različite eksperimentalne modele (*in/ex vivo*) u okviru doktorske disertacije ukazuju na glukokortikoidnu signalizaciju kao važnu komponentu oblikovanja ritma časovnika i steroidogene aktivnosti Leydig-ovih ćelija;
- Glukokortikoidi, kao medijatori odgovora na stres, ili egzogeno primenjeni, resetuju cirkadijalni časovnik u Leydig-ovim ćelijama stimulišući eksprimiranje *Bmal1/BMAL1* i *Per1/PER1* nezavisno od cirkadijalnog vremena ali i inhibišući transkripciju *Rev-erba* u neaktivnoj fazi dana;
- Takođe, izlaganje povećanim nivoima glukokortikoida bilo izazvano stresom ili egzogenom primenom, značajno ometa proizvodnju testosterona: Leydig-ove ćelije različito reaguju na porast glukokortikoida izazvan stresnom situacijom u zavisnosti od cirkadijalnog vremena dešavanja stresogene situacije; transkripcija gena ključnih za biosintezu testosterona (*Lhcgr*, *Star*, *Hsd3b1/2*, i *Hsd17b4*) je inhibisana u neaktivnoj fazi, a nepromenjena ukoliko se stresogena situacija desi u aktivnoj fazi dana. Ovakva izmenjena aktivnost steroidogenih gena se odražava na nivo testosterona u cirkulaciji te je u uslovima ponavljane stresne situacije u aktivnoj fazi pad testosterona značajno manji u odnosu na stres u neaktivnoj fazi dana;
- Dobijeni rezultati i diskusija literaturnih podataka je ukazala na koordinisano delovanje glukokortikoidne signalizacije i cirkadijalnog sistema u regulaciji sinteze testosterona i oblikovanju muške reproduktivne fiziologije. Na slici 7.1 predstavljen je mogući mehanizam ove koordinisane aktivnosti.



Slika 7.1. Predlog mehanizma delovanja glukokortikoida na elemente cirkadijalnog časovnika i steroidogene mašinerije u Leydig-ovim ćelijama. Kreirano pomoću Biorender.com.

8. Literatura

- Agorastos A, Nicolaidis NC, Bozikas VP, Chrousos GP, Pervanidou P. 2020. Multilevel Interactions of Stress and Circadian System: Implications for Traumatic Stress. *Front Psychiatry* **0**. doi:10.3389/fpsy.2019.01003
- Aguilar-Roblero R, Morin LP, Moore RY. 1994. Morphological Correlates of Circadian Rhythm Restoration Induced by Transplantation of the Suprachiasmatic Nucleus in Hamsters. *Exp Neurol* **130**:250–260. doi:10.1006/exnr.1994.1203
- Ahmed A, Schmidt C, Brunner T. 2019. Extra-Adrenal Glucocorticoid Synthesis in the Intestinal Mucosa: Between Immune Homeostasis and Immune Escape. *Front Immunol* **0**. doi:10.3389/fimmu.2019.01438
- Albrecht U, Zheng B, Larkin D, Sun ZS, Lee CC. 2001. mPer1 and mPer2 Are Essential for Normal Resetting of the Circadian Clock. *J Biol Rhythms* **16**:100–104. doi:10.1177/074873001129001791
- Albrecht U. 2010. Circadian clocks in mood-related behaviors. *Ann Med* **42**:241–251. doi:10.3109/07853891003677432
- Albrecht U. 2012. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* **74**:246–260. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.006
- Al-kaf AG. 2018. Introductory Chapter: The Newest Research in Corticosteroids. Corticosteroids. doi:10.5772/intechopen.74634
- Alvarez JD, Sehgal A. 2002. Finer clock control. *Nature* **419**:798–799. doi:10.1038/419798a
- Alvarez JD, Chen D, Storer E, Sehgal A. 2003. Non-cyclic and Developmental Stage-Specific Expression of Circadian Clock Proteins During Murine Spermatogenesis1. *Biol Reprod* **69**:81–91. doi:10.1095/biolreprod.102.011833
- Alvarez JD, Hansen A, Ord T, Bebas P, Chappell PE, Giebultowicz JM, Williams C, Moss S, Sehgal A. 2008. The Circadian Clock Protein BMAL1 Is Necessary for Fertility and Proper Testosterone Production in Mice. *J Biol Rhythms* **23**:26–36. doi:10.1177/0748730407311254
- Andric SA, Kojic Z, Bjelic MM, Mihajlovic AI, Baburski AZ, Sokanovic SJ, Janjic MM, Stojkov NJ, Stojilkovic SS, Kostic TS. 2013. The opposite roles of glucocorticoid and α 1-adrenergic receptors in stress triggered apoptosis of rat Leydig cells. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **304**:E51–E59. doi:10.1152/ajpendo.00443.2012
- Andric SA, Kostic TS. 2019. Regulation of Leydig cell steroidogenesis: intriguing network of signaling pathways and mitochondrial signalosome. *Curr Opin Endocr Metab Res, Male Reproductive Endocrinology* **6**:7–20. doi:10.1016/j.coemr.2019.03.001

- Armario A, Castellanos JM, Balasch J. 1984. Effect of Acute and Chronic Psychogenic Stress on Corticoadrenal and Pituitary-Thyroid Hormones in Male Rats. *Horm Res Paediatr* **20**:241–245. doi:10.1159/000180003
- Armario A, Vallès A, Dal-Zotto S, Márquez C, Belda X. 2004. A Single Exposure to Severe Stressors Causes Long-term Desensitisation of the Physiological Response to the Homotypic Stressor. *Stress* **7**:157–172. doi:10.1080/10253890400010721
- Aschoff J. 1960. Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **25**:11–28. doi:10.1101/SQB.1960.025.01.004
- Aschoff J. 1963. Comparative Physiology: Diurnal Rhythms. *Annu Rev Physiol* **25**:581–600. doi:10.1146/annurev.ph.25.030163.003053
- Aschoff J. 1965. Circadian Rhythms In Man. *Science* **148**:1427–1432. doi:10.1126/science.148.3676.1427
- Azhar S, Reaven E. 2007. Regulation of Leydig Cell Cholesterol Metabolism In: Payne AH, Hardy MP, editors. *The Leydig Cell in Health and Disease, Contemporary Endocrinology*. Totowa, NJ: Humana Press. pp. 135–148. doi:10.1007/978-1-59745-453-7_8
- Baburski AZ, Sokanovic SJ, Janjic MM, Stojkov-Mimic NJ, Bjelic MM, Andric SA, Kostic TS. 2015. Melatonin replacement restores the circadian behavior in adult rat Leydig cells after pinealectomy. *Mol Cell Endocrinol* **413**:26–35. doi:10.1016/j.mce.2015.05.039
- Baburski AZ, Sokanovic SJ, Bjelic MM, Radovic SM, Andric SA, Kostic TS. 2016. Circadian rhythm of the Leydig cells endocrine function is attenuated during aging. *Exp Gerontol* **73**:5–13. doi:10.1016/j.exger.2015.11.002
- Baburski AZ, Andric SA, Kostic TS. 2019. Luteinizing hormone signaling is involved in synchronization of Leydig cell's clock and is crucial for rhythm robustness of testosterone production†. *Biol Reprod* **100**:1406–1415. doi:10.1093/biolre/ioz020
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U. 2000. Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science* **289**:2344–2347. doi:10.1126/science.289.5488.2344
- Barclay JL, Tsang AH, Oster H. 2012. Chapter 10 - Interaction of central and peripheral clocks in physiological regulation. *Progress in Brain Research, The Neurobiology of Circadian Timing. Elsevier*. 163–181. doi:10.1016/B978-0-444-59427-3.00030-7
- Barrett KE, Boitano S, Barman SM. 2010. *Ganong's Review of Medical Physiology* (23rd Edition). New York, USA: McGraw-Hill Professional Publishing.

- Barsoum IB, Bingham NC, Parker KL, Jorgensen JS, Yao HH-C. 2009. Activation of the Hedgehog pathway in the mouse fetal ovary leads to ectopic appearance of fetal Leydig cells and female pseudohermaphroditism. *Dev Biol* **329**:96–103. doi:10.1016/j.ydbio.2009.02.025
- Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Panerai AE, Sgoifo A, Dantzer R, Parmigiani S. 2005. Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. *Neurosci Biobehav Rev*, Individual differences in behavior and physiology; causes and consequences **29**:67–81. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.06.009
- Belcher KS, Brett WJ. 1973. Relationship between a metabolic rhythm and emergence rhythm in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* **19**:277–286. doi:10.1016/0022-1910(73)90104-2
- Bergendahl M, Evans W, Veldhuis J. 1996. Current concepts on ultradian rhythms of luteinizing hormone secretion in the human. *Hum Reprod Update* **2**:507–518. doi:10.1093/humupd/2.6.507
- Bittman EL. 2016. Timing in the Testis. *J Biol Rhythms* **31**:12–36. doi:10.1177/0748730415618297
- Bozek K, Relógio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A, Herzog H. 2009. Regulation of Clock-Controlled Genes in Mammals. *PLoS ONE* **4**:e4882. doi:10.1371/journal.pone.0004882
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB. 2009. The Effect of Diurnal Variation on Clinical Measurement of Serum Testosterone and Other Sex Hormone Levels in Men. *J Clin Endocrinol Metab* **94**:907–913. doi:10.1210/jc.2008-1902
- Briski KP, Sylvester PW. 1991. Effect of naltrexone on stress-induced bioactive prolactin release in aging male rats. *Neurobiol Aging* **12**:145–149. doi:10.1016/0197-4580(91)90053-M
- Brown M, Goldstein J. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**:34–47. doi:10.1126/science.3513311
- Buckingham JC. 2006. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* **147**:S258–S268. doi:10.1038/sj.bjp.0706456

- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA. 2000. Mop3 Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals. *Cell* **103**:1009–1017. doi:10.1016/S0092-8674(00)00205-1
- Buttgereit F, Scheffold A. 2002. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids, Rapid Responses to Steroid Hormones* **67**:529–534. doi:10.1016/S0039-128X(01)00171-4
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annual review of physiology*, **67**:259–284. doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816
- Cannon WB. 1929. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* **9**:399–431. doi:10.1152/physrev.1929.9.3.399
- Cardinali DP, Brown GM, Pandi-Perumal SR. 2021. Chronotherapy. *Handb. Clin. Neuro.* **179**: 357-370. doi: 10.1016/B978-0-12-819975-6.00023-6
- Catt KJ, Dufau ML, Tsuruhara T. 1972. Radioligand-Receptor Assay of Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* **34**:123–132. doi:10.1210/jcem-34-1-123
- Croennandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the Stress Response. *Annu Rev Physiol* **67**:259–284. doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816
- Chatterjee AC and R. 2009. How stress affects female reproduction. *Biomedical Research* **20(2)**:79-83
- Chen H, Gao L, Xiong Y, Yang D, Li C, Wang A, Jin Y. 2017. Circadian clock and steroidogenic-related gene expression profiles in mouse Leydig cells following Dexamethasone stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* **483**:294–300. doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.149
- Cheng L, Chai Y, Zhao G, Wen G, Han P. 2018. Glucocorticoid receptor β isoform exhibits a disproportionate increase over the α isoform in the lungs of a polytrauma rat model. *Int J Clin Exp Pathol* **11(6)**: 3046–3051.
- Cheng S, Liang X, Wang Y, Jiang Z, Liu Y, Hou W, Li S, Zhang J, Wang Z. 2016. The circadian Clock gene regulates acrosin activity of sperm through serine protease inhibitor A3K. *Exp Biol Med* **241**:205–215. doi:10.1177/1535370215597199
- Cheon S, Park N, Cho S, Kim K. 2013. Glucocorticoid-mediated Period2 induction delays the phase of circadian rhythm. *Nucleic Acids Res* **41**:6161–6174. doi:10.1093/nar/gkt307
- Christensen AK, Fawcett DW. 1966. The fine structure of testicular interstitial cells in mice. *Am J Anat* **118**:551–571. doi:10.1002/aja.1001180214

- Christensen K, Peacock K. 1980. Increase in Leydig Cell Number in Testes of Adult Rats Treated Chronically with an Excess of Human Chorionic Gonadotropin. *Biology of Reproduction* **22(2)**: 383–391. doi:10.1093/biolreprod/22.2.383
- Christensen AK. 2007. A History of Leydig Cell Research In: Payne AH, Hardy MP, editors. *The Leydig Cell in Health and Disease, Contemporary Endocrinology*. Totowa, NJ: Humana Press. pp. 3–30. doi:10.1007/978-1-59745-453-7_1
- Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. 1998. Interactions between the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Female Reproductive System: Clinical Implications. *Ann Intern Med* **129**:229–240. doi:10.7326/0003-4819-129-3-199808010-00012
- Chrousos GP. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* **5**:374–381. doi:10.1038/nrendo.2009.106
- Chu G, Misawa I, Chen H, Yamauchi N, Shigeyoshi Y, Hashimoto S, Hattori M. 2012. Contribution of FSH and triiodothyronine to the development of circadian clocks during granulosa cell maturation. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **302**:E645–E653. doi:10.1152/ajpendo.00470.2011
- Cohen PE, Nishimura K, Zhu L, Pollard JW. 1999. Macrophages: important accessory cells for reproductive function. *J Leukoc Biol* **66**:765–772. doi:10.1002/jlb.66.5.765
- Cornelissen G. 2014. Cosinor-based rhythmometry. *Theor Biol Med Model* **11**:16. doi:10.1186/1742-4682-11-16
- Cox K, Takahashi J. 2019. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *JME* **63**: 93-102 doi:101530/JME-19-0153
- Daniel E, Newell-Price JDC. 2015. THERAPY OF ENDOCRINE DISEASE: Steroidogenesis enzyme inhibitors in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* **172**:R263–R280. doi:10.1530/EJE-14-1014
- DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. 2007. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci* **10**:543–545. doi:10.1038/nn1884
- Deng N, Kohn TP, Lipshultz LI, Pastuszak AW. 2018. The Relationship Between Shift Work and Men's Health. *Sex Med Rev* **6**:446–456. doi:10.1016/j.sxmr.2017.11.009
- Dhabhar FS. 2000. Acute Stress Enhances While Chronic Stress Suppresses Skin Immunity: The Role of Stress Hormones and Leukocyte Trafficking. *Ann N Y Acad Sci* **917**:876–893. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb05454.x

- Dibner C, Schibler U, Albrecht U. 2010. The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annu Rev Physiol* **72**:517–549. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135821
- Dickmeis T, Lahiri K, Nica G, Vallone D, Santoriello C, Neumann CJ, Hammerschmidt M, Foulkes NS. 2007. Glucocorticoids Play a Key Role in Circadian Cell Cycle Rhythms. *PLoS Biol* **5**:e78. doi:10.1371/journal.pbio.0050078
- Dickmeis T, Weger BD, Weger M. 2013. The circadian clock and glucocorticoids – Interactions across many time scales. *Mol Cell Endocrinol, Glucocorticoids* **380**:2–15. doi:10.1016/j.mce.2013.05.012
- Dinno A. 2018. Package PARAN. R studio
- Dolatshad H, Campbell EA, Hara LO, Maywood ES, Hastings M, Johnson HM. 2006. Developmental and reproductive performance in circadian mutant mice. *Human Reproduction*, **21**:68–79. doi:10.1093/humrep/dei313
- Doerr P, Pirke KM, Kockott G, Dittmar F. 1976. Further studies on sex hormones in male homosexuals. *Arch Gen Psychiatry* **33**:611–614. doi:10.1001/archpsyc.1976.01770050063010
- Dray D. 2007. Package Ade4. R studio
- Du J, McEwen B, Manji HK. 2009. Glucocorticoid receptors modulate mitochondrial function. *Commun Integr Biol* **2**:350–352. doi:10.4161/cib.2.4.8554
- DuBois DC, Sukumaran S, Jusko W; Almon R. 2012. Evidence for a glucocorticoid receptor beta splice variant in the rat and its physiological regulation in liver. *Steroids* **78(2)**, 312–320. doi:10.1016/j.steroids.2012.11.014
- Dubovicky M, Paton S, Morris M, Mach M, Lucot JB. 2007. Effects of combined exposure to pyridostigmine bromide and shaker stress on acoustic startle response, pre-pulse inhibition and open field behavior in mice. *J Appl Toxicol* **27**:276–283. doi:10.1002/jat.1210
- Dufau ML, Catt KJ, Tsuruhara T. 1971. Gonadotrophin stimulation of testosterone production by the rat testis in vitro. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* **252**:574–579. doi:10.1016/0304-4165(71)90161-9
- Dufau ML, Charreau EH, Catt KJ. 1973. Characteristics of a Soluble Gonadotropin Receptor from the Rat Testis. *J Biol Chem* **248**:6973–6982. doi:10.1016/S0021-9258(19)43348-6
- Dufau ML. 1988. Endocrine Regulation and Communicating Functions of the Leydig Cell. *Annu Rev Physiol* **50**:483–508. doi:10.1146/annurev.ph.50.030188.002411

- Dupont É, Labrie F, Luu-The V, Pelletier G. 1993. Ontogeny of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ — $\Delta 4$ isomerase (3β -HSD) in rat testis as studied by immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)* **187**:583–589. doi:10.1007/BF00214437
- Earnest DJ, Liang F-Q, Ratcliff M, Cassone VM. 1999. Immortal Time: Circadian Clock Properties of Rat Suprachiasmatic Cell Lines. *Science* **283**:693–695. doi:10.1126/science.283.5402.693
- Fan J, Li X, Issop L, Culty M, Papadopoulos V. 2016. ACBD2/ECI2-Mediated Peroxisome-Mitochondria Interactions in Leydig Cell Steroid Biosynthesis. *Mol Endocrinol* **30**:763–782. doi:10.1210/me.2016-1008
- Feldman JF, Hoyle MN. 1973. Isolation of Circadian Clock Mutants of *Neurospora Crassa*. *Genetics* **75**:605–613.
- Fevold HR, Lorence MC, McCarthy JL, Trant JM, Kagimoto M, Waterman MR, Mason JI. 1989. Rat P45017 α from Testis: Characterization of a Full-Length cDNA Encoding a Unique Steroid Hydroxylase Capable of Catalyzing Both $\Delta 4$ - and $\Delta 5$ -Steroid-17,20-Lyase Reactions. *Mol Endocrinol* **3**:968–975. doi:10.1210/mend-3-6-968
- Fink F. 2017. Stress: Concepts, Definition and History. *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology* 1:9. doi:10.1016/b978-0-12-809324-5.02208-2
- Folkard S, Minors DS, Waterhouse JM. 1984. Is there more than one circadian clock in humans? Evidence from fractional desynchronization studies. *J Physiol* **357**:341–356. doi:10.1113/jphysiol.1984.sp015503
- Foster RG, Provencio I, Hudson D, Fiske S, De Grip W, Menaker M. 1991. Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol A* **169**:39–50. doi:10.1007/BF00198171
- Fukuhara C, Tosini G. 2008. Analysis of daily and circadian gene expression in the rat pineal gland. *Neurosci Res* **60**:192–198. doi:10.1016/j.neures.2007.10.011
- Gallagher TF, Koch FC. 1929. The testicular hormone. *J Biol Chem* **84**:495–500. doi:10.1016/S0021-9258(18)77008-7
- Gamble KL, Berry R, Frank SJ, Young ME. 2014. Circadian clock control of endocrine factors. *Nat Rev Endocrinol* **10**:466–475. doi:10.1038/nrendo.2014.78
- Gao, H. B. 1996. Suppression of endogenous corticosterone levels in vivo increases the steroidogenic capacity of purified rat Leydig cells in vitro. *Endocrinology*, **137**: 1714–1718. doi:10.1210/en.137.5.1714

- Gao, Hui-Bao; Tong, Ming-Han; Hu, Yan-Qiang; Guo, Qing-Su; Ge, Renshan; Hardy, Matthew P. 2002. *Glucocorticoid Induces Apoptosis in Rat Leydig Cells. Endocrinology*, **143**: 130–138. doi:10.1210/endo.143.1.8604
- Ge R-S, Hardy DO, Catterall JF, Hardy MP. 1997. Developmental Changes in Glucocorticoid Receptor and 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Oxidative and Reductive Activities in Rat Leydig Cells*. *Endocrinology* **138**:5089–5095. doi:10.1210/endo.138.12.5614
- Ge R-S, Dong Q, Niu E, Sottas CM, Hardy DO, Catterall JF, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP. 2005. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 in Rat Leydig Cells: Its Role in Blunting Glucocorticoid Action at Physiological Levels of Substrate. *Endocrinology* **146**:2657–2664. doi:10.1210/en.2005-0046
- Gjerstad JK, Lightman SL, Spiga F. 2018. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress* **21**:403–416. doi:10.1080/10253890.2018.1470238
- Goldstein DS. 2003. Catecholamines and stress. *Endocr Regul* **37(2)**:69-80
- Gorka Z, Moryl E, Papp M. 1996. Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **54**:229–234. doi:10.1016/0091-3057(95)02173-6
- Gudmundsson A, Carnes M. 1997. Pulsatile adrenocorticotrophic hormone: An overview. *Biol Psychiatry* **41**:342–365. doi:10.1016/S0006-3223(96)00005-4
- Güldner F-H. 1983. Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Exp Brain Res* **50**:373–376. doi:10.1007/BF00239203
- Güldner FH. 1985. Structure and Neural Connections of the Suprachiasmatic Nucleus In: Redfern PH, Campbell IC, Davies JA, Martin KF, editors. *Circadian Rhythms in the Central Nervous System, Satellite Symposia of the IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology*. London: Palgrave Macmillan UK. pp. 29–44. doi:10.1007/978-1-349-07837-0_3
- Halberg F. 1987. Perspectives of chronobiologic engineering. *Chronobiotechnology and Chronobiological Engineering, NATO ASI* 1–46. doi:10.1007/978-94-009-3547-1_1
- Habert R, Brignaschi P. 1991. Developmental Changes in in Vitro Testosterone Production by Dispersed Leydig Cells During Fetal Life in Rats. *Arch Androl* **27**:65–71. doi:10.3109/01485019108987654
- Payne AH, Downing JR, Wong KL. 1980. Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells. *Endocrinology* **106**:1424–1429.

- Hales Db, Payne Ah. 1989. Glucocorticoid-Mediated Repression of P450scc mRNA and de Novo Synthesis in Cultured Leydig Cells*. *Endocrinology* **124**:2099–2104. doi:10.1210/endo-124-5-2099
- Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai W, Sottas C. 2005. Stress hormone and male reproductive function. *Cell and Tissue Research*, **322(1)**: 147–153. doi:10.1007/s00441-005-0006-2
- Hermida RC, Ayala DE, Calvo C, Portaluppi F, Smolensky MH. 2007. Chronotherapy of hypertension: Administration-time-dependent effects of treatment on the circadian pattern of blood pressure. *Adv Drug Deliv Rev* **59**:923–939. doi:10.1016/j.addr.2006.09.021
- Hodžić A, Ristanović M, Zorn B, Tulić C, Maver A, Novaković I, Peterlin B. 2013. Genetic Variation in Circadian Rhythm Genes CLOCK and ARNTL as Risk Factor for Male Infertility. *PLOS ONE* **8**:e59220. doi:10.1371/journal.pone.0059220
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. 1985. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**: 635-64. doi: doi:10.1038/318635a0
- Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma K. 2002. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* **419**:841–844. doi:10.1038/nature01123
- Hu G-X, Lian Q-Q, Lin H, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP, Ge R-S. 2008. Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids, Rapid Responses to Steroid Hormones* **73**:1018–1024. doi:10.1016/j.steroids.2007.12.020
- Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto G, Okamura H. 2005. Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* **2**:297-307. doi: 10.1016/j.cmet.2005.09.009
- Ja R, Lp S, Sm R, U S. 2000. CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev*.
- Jiang W-G, Li S-X, Zhou S-J, Sun Y, Shi J, Lu L. 2011. Chronic unpredictable stress induces a reversible change of PER2 rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* **1399**:25–32. doi:10.1016/j.brainres.2011.05.001
- Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, De Vries GJ, Reppert SM. 1999. A Molecular Mechanism Regulating Rhythmic Output from the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Cell* **96**:57–68. doi:10.1016/S0092-8674(00)80959-9

- Jones JR, Simon T, Lones L, Herzog DE. 2018. SCN VIP Neurons Are Essential for Normal Light-Mediated Resetting of the Circadian System. *J Neurosci.* 38(37):7986-7995. doi:10.1523/JNEUROSCI.1322-18.2018.
- Johnson RF, Moore RY, Morin LP. 1989. Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster. *Brain Res Bull* 22:411–422. doi:10.1016/0361-9230(89)90068-3
- Kalsbeek A, Scheer FA, Perreau-Lenz S, La Fleur SE, Yi C-X, Fliers E, Buijs RM. 2011. Circadian disruption and SCN control of energy metabolism. *FEBS Lett, Circadian Rhythms* **585**:1412–1426. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.021
- Kassambara. 2020. Package ggpubr.R studio
- Kassambara, Mundt. 2020. Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses.
- Kato Y, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M. 2014. Chapter Ten - DEC1/STRA13/SHARP2 and DEC2/SHARP1 Coordinate Physiological Processes, Including Circadian Rhythms in Response to Environmental Stimuli. *Developmental Biology Academic Press.* 339–372. doi:10.1016/B978-0-12-405943-6.00010-5
- Keating RJ, Tcholakian RK. 1979. In vivo patterns of circulating steroids in adult male rats. I. Variations in testosterone during 24- and 48-hour standard and reverse light/dark cycles. *Endocrinology* **104**:184–188. doi:10.1210/endo-104-1-184
- Kerr JB, Knell CM. 1988. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* **103**:535–544. doi:10.1242/dev.103.3.535
- Kerr DS, Campbell LW, Applegate MD, Brodish A, Landfield PW. 1991. Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *J Neurosci* **11**:1316–1324. doi:10.1523/JNEUROSCI.11-05-01316.1991
- Kino T, Manoli I, Kelkar S, Wang Y, Su YA, Chrousos GP. 2009. Glucocorticoid receptor (GR) β has intrinsic, GR α -independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* **381**:671–675. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.110
- Kino T, Su YA, Chrousos GP. 2009b. Human glucocorticoid receptor isoform beta: Recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 2009, 66, 3435–3448
- Kino T, Chrousos GP. 2011. Circadian CLOCK-Mediated Regulation of Target-Tissue Sensitivity to Glucocorticoids: Implications for Cardiometabolic Diseases. *Pediatr Adrenal Dis* **20**:116–126. doi:10.1159/000321232

- Kinoshita C, Miyazaki K, Ishida N. 2012. Chronic stress affects PERIOD2 expression through glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation in the central clock. *NeuroReport* **23**:98–102. doi:10.1097/WNR.0b013e32834e7ec2
- Knutsson A. 2003. Health disorders of shift workers. *Occup Med* **53**:103–108. doi:10.1093/occmed/kqg048
- Ko CH, Takahashi JS. 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* **15**:R271–R277. doi:10.1093/hmg/ddl207
- Koch BCP, Nagtegaal JE, Kerkhof GA, ter Wee PM. 2009. Circadian sleep–wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* **5**:407–416. doi:10.1038/nrneph.2009.88
- Koch CE, Leinweber B, Drenberg BC, Blaum C, Oster H. 2017. Interaction between circadian rhythms and stress. *Neurobiol Stress, SI:Stressors in animals* **6**:57–67. doi:10.1016/j.ynstr.2016.09.001
- Kondratov RV, Shamanna RK, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Antoch MP. 2006. Dual role of the CLOCK/BMAL1 circadian complex in transcriptional regulation. *FASEB J* **20**:530–532. doi:https://doi.org/10.1096/fj.05-5321fje
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flügge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk G, Wöhr M, Fuchs E. 2011. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* **35**:1291–1301. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.02.003
- Koresh O, Kozlovsky N, Kaplan Z, Zohar J, Matar MA, Cohen H. 2012. The long-term abnormalities in circadian expression of Period 1 and Period 2 genes in response to stress is normalized by agomelatine administered immediately after exposure. *Eur Neuropsychopharmacol* **22**:205–221. doi:10.1016/j.euroneuro.2011.07.012
- Kostic T, Andric S, Kovacevic R, Maric D. 1997. The effect of opioid antagonists on testicular response to acute stress in adult rats. *Steroids* **62**: 702-708
- Kraft M, Martin RJ. 1995. Chronobiology and chronotherapy in medicine. *Dis Mon* **41**:506–575. doi:10.1016/S0011-5029(95)90036-5
- Kriegsfeld LJ, Silver R. 2006. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Horm Behav* **49**:557–574. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.12.011
- Kvetňanský R, Mikulaj L. 1970. Adrenal and Urinary Catecholamines in Rats During Adaptation to Repeated Immobilization Stress. *Endocrinology* **87**:738–743. doi:10.1210/endo-87-4-738

- Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, Barish GD, Uhlenhaut NH, Jonker JW, Downes M, Evans RM. 2011. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature* **480**:552–556. doi:10.1038/nature10700
- Landgraf D, McCarthy MJ, Welsh DK. 2014. Circadian Clock and Stress Interactions in the Molecular Biology of Psychiatric Disorders. *Curr Psychiatry Rep* **16**:483. doi:10.1007/s11920-014-0483-7
- Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. 2001. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* **107**:855–867. doi:10.1016/s0092-8674(01)00610-9
- LeSauter J, Lehman MN, Silver R. 1996. Restoration of Circadian Rhythmicity by Transplants of SCN “Micropunches.” *J Biol Rhythms* **11**:163–171. doi:10.1177/074873049601100208
- Lévi F. 2001. Circadian chronotherapy for human cancers. *Lancet Oncol* **2**:307–315. doi:10.1016/S1470-2045(00)00326-0
- Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA. 2007. Human Glucocorticoid Receptor β Binds RU-486 and Is Transcriptionally Active. *Mol Cell Biol* **27**:2266–2282. doi:10.1128/MCB.01439-06
- Li C, Xiao S, Hao J, Liao X, Li G. 2018. Cry1 deficiency leads to testicular dysfunction and altered expression of genes involved in cell communication, chromatin reorganization, spermatogenesis, and immune response in mouse testis. *Mol Repr and Devel*, **85(4)**: 325–335. doi:10.1002/mrd.2296
- Liang X, Cheng S, Jiang X, He X, Wang Y, Jiang Z, Hou W, Li S, Liu Y, Wang Z. 2013. The Noncircadian Function of the Circadian Clock Gene in the Regulation of Male Fertility. *J Biol Rhythms* **28**:208–217. doi:10.1177/0748730413486873
- Lightman SL. 2008. The Neuroendocrinology of Stress: A Never Ending Story. *J Neuroendocrinol* **20**:880–884. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01711.x
- Lu NZ, Cidlowski JA. 2005. Translational Regulatory Mechanisms Generate N-Terminal Glucocorticoid Receptor Isoforms with Unique Transcriptional Target Genes. *Mol Cell* **18**:331–342. doi:10.1016/j.molcel.2005.03.025
- Manenschijn L, Schaap L, van Schoor NM, van der Pas S, Peeters GMEE, Lips P, Koper JW, van Rossum EFC. 2013. High Long-Term Cortisol Levels, Measured in Scalp Hair, Are Associated With a History of Cardiovascular Disease. *J Clin Endocrinol Metab* **98**:2078–2083. doi:10.1210/jc.2012-3663

- Marić D, Kostić T, Kovačević R. 1996. Effects of acute and chronic immobilization stress on rat Leydig cell steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **58**:351–355. doi:10.1016/0960-0760(96)00044-1
- Mazzocchi G, Paziienza V, Vinciguerra M. 2012. Clock Genes and Clock-Controlled Genes in the Regulation of Metabolic Rhythms. *Chronobiol Int* **29**:227–251. doi:10.3109/07420528.2012.658127
- McEwen BS. 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance11Published on the World Wide Web on 22 November 2000. *Brain Res, Towards 2010, A brain Odyssey, The 3rd Brain Research Interactive* **886**:172–189. doi:10.1016/S0006-8993(00)02950-4
- Means AR, Fakunding JL, Huckins C, Tindall DJ, Vitale R. 1976. Follicle-Stimulating Hormone, the Sertoli Cell, and Spermatogenesis11. Boston: *Academic Press*. 477–522. doi:10.1016/B978-0-12-571132-6.50027-0
- Medar ML, Andric SA, Kostic TS. 2021. Stress-induced glucocorticoids alter the Leydig cells' timing and steroidogenesis-related systems. *Mol Cell Endocrinol* **538**:111469. doi:10.1016/j.mce.2021.111469
- Meerlo P, Daan S. 1998. Aggressive and Sexual Social Stimuli Do not Phase Shift the Circadian Temperature Rhythm in Rats. *Chronobiol Int* **15**:231–240. doi:10.3109/07420529808998686
- Menaker M, Takahashi JS, Eskin A. 1978. The Physiology of Circadian Pacemakers. *Annu Rev Physiol* **40**:501–526. doi:10.1146/annurev.ph.40.030178.002441
- Meyer-Bernstein EL, Morin LP. 1999. Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience* **92**:267–279. doi:10.1016/S0306-4522(98)00733-7
- Midzak AS, Chen H, Papadopoulos V, Zirkin BR. 2009. Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. *Mol Cell Endocrinol*. **299**:23-31. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.07.016>
- Millar AJ. 1999. Biological clocks in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **141**:175–197. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00349.x>
- Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS. 2004. Circadian Clock Mutation Disrupts Estrous Cyclicity and Maintenance of Pregnancy. *Curr Biol* **14**:1367–1373. doi:10.1016/j.cub.2004.07.055

- Miller BH, McDearmon EL, Panda S, Hayes KR, Zhang J, Andrews JL, Antoch MP, Walker JR, Esser KA, Hogenesch JB, Takahashi JS. 2007. Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci* **104**:3342–3347. doi:10.1073/pnas.0611724104
- Miller WL. 2008. Steroidogenic Enzymes. *Disord Hum Adrenal Cortex* **13**:1–18. doi:10.1159/000134751
- Mock EJ, Frankel AI. 1978. A shifting circannual rhythm in serum testosterone concentration in male laboratory rats. *Biol Reprod* **19**:927–930. doi:10.1095/biolreprod19.4.927
- Molcan L. 2019. Time distributed data analysis by Cosinor.Online application. *bioRxiv* 805960. doi:10.1101/805960
- Moon HJ, Lee SH, Lee HS, Lee K-J, Kim JJ. 2015. The association between shift work and depression in hotel workers. *Ann Occup Environ Med* **27**:29. doi:10.1186/s40557-015-0081-0
- Moore RY, Eichler VB. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* **42**:201–206. doi:10.1016/0006-8993(72)90054-6
- Moore RY, Lenn NJ. 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* **146**:1–14. doi:10.1002/cne.901460102
- Moreau JL, Scherschlicht R, Jenck F, Martin JR. 1995. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression: Sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol* **6**:682–687. doi:10.1097/00008877-199511000-00003
- Mori H, Christensen AK. 1980. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol* **84**:340–354. doi:10.1083/jcb.84.2.340
- Nader N, Chrousos GP, Kino T. 2009. Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *FASEB J* **23**:1572–1583. doi:10.1096/fj.08-117697
- Nader N, Chrousos GP, Kino T. 2010. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol Metab TEM* **21**:277–286. doi:10.1016/j.tem.2009.12.011
- Nakashima A, Kawamoto T, Honda KK, Ueshima T, Noshiro M, Iwata T, Fujimoto K, Kubo H, Honma S, Yorioka N, Kohno N, Kato Y. 2008. DEC1 Modulates the Circadian Phase of Clock Gene Expression. *Mol Cell Biol* **28**:4080–4092. doi:10.1128/MCB.02168-07

- Nicolaidis NC, Charmandari E, Kino T, Chrousos GP. 2017. Stress-Related and Circadian Secretion and Target Tissue Actions of Glucocorticoids: Impact on Health. *Front Endocrinol* **0**. doi:10.3389/fendo.2017.00070
- Niemi M, Sharpe RM, Brown WR. 1986. Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tissue Res* **243**:337–344. doi:10.1007/BF00251049
- Noti M, Sidler D, Brunner T. 2009. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestinal epithelium: more than a drop in the ocean? *Semin Immunopathol* **31**:237–248. doi:10.1007/s00281-009-0159-2
- Nygren L-G, Olson L. 1977. A new major projection from locus coeruleus: The main source of noradrenergic nerve terminals in the ventral and dorsal columns of the spinal cord. *Brain Res* **132**:85–93. doi:10.1016/0006-8993(77)90707-7
- Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. 1996. The Human Glucocorticoid Receptor β Isoform: Expression, Biochemical Properties, And Putative Function (*). *J Biol Chem* **271**:9550–9559. doi:10.1074/jbc.271.16.9550
- Olevsky JM. 1975. Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. *J Clin Invest.* **56(6)**:1499–1508. <https://doi.org/10.1172/JCI108231>.
- Ohdo S. 2010. Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. *Adv Drug Deliv Rev* **62**:859–875. doi:10.1016/j.addr.2010.01.006
- Orr TE, Taylor MF, Bhattacharyya AK, Collins DC, Mann DR. 1994. Acute immobilization stress disrupts testicular steroidogenesis in adult male rats by inhibiting the activities of 17 α -hydroxylase and 17,20-lyase without affecting the binding of LH/hCG receptors. *J Androl* **15**:302–308.
- Oster H, Challet E, Ott V, Arvat E, de Kloet ER, Dijk D-J, Lightman S, Vgontzas A, Van Cauter E. 2017. The Functional and Clinical Significance of the 24-Hour Rhythm of Circulating Glucocorticoids. *Endocr Rev* **38**:3–45. doi:10.1210/er.2015-1080
- Pacák K, Palkovits M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* **22**:502–548. doi:10.1210/edrv.22.4.0436
- Pan X, Taylor MJ, Cohen E, Hanna N, Mota S. 2020. Circadian Clock, Time-Restricted Feeding and Reproduction. *Int J Mol Sci* **21**:831. doi:10.3390/ijms21030831

- Panettieri A, Schaafsm DA, Amrani Y, Koziol-White C, Ostrom R, Omar T. 2019. *Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View. Trends in Pharmacological Sciences*. doi:10.1016/j.tips.2018.11.002
- Payne AH, Hales DB. 1989. Glucocorticoid-Mediated Repression of P450_{scc} mRNA and *de Novo* Synthesis in Cultured Leydig Cells. *Endocr.* **124**: 2099–2104. <https://doi.org/10.1210/endo-124-5-2099>
- Payne AH. 1990. Hormonal Regulation of Cytochrome P450 Enzymes, Cholesterol Side-Chain Cleavage and 17 α -Hydroxylase/C17 – 20 Lyase in Leydig Cells1. *Biol Reprod* **42**:399–404. doi:10.1095/biolreprod42.3.399
- Payne AH, Youngblood GL. 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol. Reprod.* **52**:217-225.
- Payne AH, Hales DB. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* **25**:947–970. doi:10.1210/er.2003-0030
- Payne AH, Hardy MP. 2007. *The Leydig Cell in Health and Disease*. Springer Science & Business Media.
- Psarra A-MG, Sekeris CE. 2011. Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1813**:1814–1821. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.05.014
- Punjabi U, Deslypere JP, Verdonck L, Vermeulen A. 1983. Androgen and precursor levels in serum and testes of adult rats under basal conditions and after hCG stimulation. *J Steroid Biochem* **19**:1481–1490. doi:10.1016/0022-4731(83)91124-X
- Raison CL, Miller AH. 2003. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry* **160**:1554–1565. doi:10.1176/appi.ajp.160.9.1554
- Ramos-Ramírez P, Tliba O. 2021. Glucocorticoid Receptor β (GR β): Beyond Its Dominant-Negative Function. *Int. J Mol Sci* **22(7)** 3649. doi:10.3390/ijms22073649
- Rengarajan S, Balasubramanian K. 2008. Corticosterone Induces Steroidogenic Lesion in Cultured Adult Rat Leydig Cells by Reducing the Expression of StAR Protein and Steroidogenic Enzymes. *J of Cellular Biochemistry* **103**:1472–1487. DOI 10.1002/jcb.21533
- Roufayel R, Kadry S. 2020. Mikro RNAs Crucial Regulators of Stress. *MicroRNA* **9**: 93-100. doi: <https://doi.org/10.2174/2211536608666190625120127>

- Reppert SM, Weaver DR. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**:935–941. doi:10.1038/nature00965
- Reul Jmhm, Kloet Erd. 1985. Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation. *Endocrinology* **117**:2505–2511. doi:10.1210/endo-117-6-2505
- Richards J, Cheng K-Y, All S, Skopis G, Jeffers L, Jeanette Lynch I, Wingo CS, Gumz ML. 2013. A role for the circadian clock protein Per1 in the regulation of aldosterone levels and renal Na⁺ retention. *Am J Physiol-Ren Physiol* **305**:F1697–F1704. doi:10.1152/ajprenal.00472.2013
- Richter CP. 1922. A Behavioristic Study of the Activity of the Rat. *Comp Psychol Monogr* **1**, 2:56–56.
- Rivier C, Rivest S. 1991. Effect of Stress on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis: Peripheral and Central Mechanisms1. *Biol Reprod* **45**:523–532. doi:10.1095/biolreprod45.4.523
- Roenneberg T, Wirz-Justice A, Mellow M. 2003. Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. *J Biol Rhythms* **18**:80–90. doi:10.1177/0748730402239679
- Roenneberg T, Mellow M. 2005. Circadian clocks - the fall and rise of physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:965–971. doi:10.1038/nrm1766
- Roenneberg T, Kumar CJ, Mellow M. 2007. The human circadian clock entrains to sun time. *Curr Biol* **17**:R44–R45. doi:10.1016/j.cub.2006.12.011
- Roenneberg T. 2015. Having Trouble Typing? What on Earth Is Chronotype? *J Biol Rhythms* **30**:487–491. doi:10.1177/0748730415603835
- Rosenfeld P, Van Eekelen JAM, Levine S, De Kloet ER. 1988. Ontogeny of the Type 2 glucocorticoid receptor in discrete rat brain regions: an immunocytochemical study. *Dev Brain Res* **42**:119–127. doi:10.1016/0165-3806(88)90207-6
- Sachs M. 2015. Package Cosinor.
- Saez JM. 1994. Leydig Cells: Endocrine, Paracrine, and Autocrine Regulation. *Endocr Rev* **15**:574–626. doi:10.1210/edrv-15-5-574
- Sanford Lm, Palmer Wm, Howland Be. 2011. Influence Of Sexual Activity On Serum Levels Of Lh And Testosterone In The RAM. *Can J Anim Sci*. doi:10.4141/cjas74-070

- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions*. *Endocr Rev* **21**:55–89. doi:10.1210/edrv.21.1.0389
- Sati L. 2020. Chronodisruption: effects on reproduction, transgenerational health of offspring and epigenome. *Reproduction* **160**:R79–R94. doi:10.1530/REP-20-0298
- Scheschowitsch K, Leite JA, Assreuy J. 2017. New Insights in Glucocorticoid Receptor Signaling-More Than Just a Ligand-Binding Receptor. *Front Endocrinol* **8**:16. doi:10.3389/fendo.2017.00016
- Schibler U, Sassone-Corsi P. 2002. A Web of Circadian Pacemakers. *Cell* **111**:919–922. doi:10.1016/S0092-8674(02)01225-4
- Schibler U. 2017. Interaction Between Central and Peripheral Clocks in Mammals In: Kumar V, editor. *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour*. New Delhi: Springer India. pp. 337–363. doi:10.1007/978-81-322-3688-7_16
- Sciarra F, Franceschini E, Campolo F, Gianfrilli D, Pallotti F, Paoli D, Isidori AM, Venneri MA. 2020. Disruption of Circadian Rhythms: A Crucial Factor in the Etiology of Infertility. *Int J Mol Sci* **21**:3943. doi:10.3390/ijms21113943
- Sellix MT. 2015. Circadian Clock Function in the Mammalian Ovary. *J Biol Rhythms* **30**:7–19. doi:10.1177/0748730414554222
- Selye H. 1952. Annual Report on Stress. *AJN Am J Nurs* **52**:240.
- Selye H. 1976. The stress concept. *Can Med Assoc J* **115**:718.
- Sen A, Hoffmann HM. 2020. Role of core circadian clock genes in hormone release and target tissue sensitivity in the reproductive axis. *Mol Cell Endocrinol* **501**:110655. doi:10.1016/j.mce.2019.110655
- So AY-L, Bernal TU, Pillsbury ML, Yamamoto KR, Feldman BJ. 2009. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci* **106**:17582–17587. doi:10.1073/pnas.0909733106
- Solberg LC, Horton TH, Turek FW. 1999. Circadian rhythms and depression: effects of exercise in an animal model. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* **276**:R152–R161. doi:10.1152/ajpregu.1999.276.1.R152
- Srivastava RK, Taylor MF, Mann DR. 1993. Effect of Immobilization Stress on Plasma Luteinizing Hormone, Testosterone, and Corticosterone Concentrations and on 3 -

Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in the Testes of Adult Rats. *Experimental Biology and Medicine*, **204**(2), 231–235. doi:10.3181/00379727-204-43658

Starovlah IM, Radovic Pletikosic SM, Kostic TS, Andric SA. 2020. Reduced spermatozoa functionality during stress is the consequence of adrenergic-mediated disturbance of mitochondrial dynamics markers. *Sci Rep* **10**:16813. doi:10.1038/s41598-020-73630-y

Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Harbich D, Alam S, Holsboer F, Müller MB, Schmidt MV. 2008. Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: Implications for stress-related disorders. *Horm Behav* **53**:386–394. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.11.001

Sterling P, Eyer J. 1998. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: *Handbook of Life Stress, Cognition, and Health* (Fisher S & Reason J eds). John Wiley & Sons, New York. 629–649.

Stojkov NJ, Janjic MM, Bjelic MM, Mihajlovic AI, Kostic TS, Andric SA. 2012a. Repeated immobilization stress disturbed steroidogenic machinery and stimulated the expression of cAMP signaling elements and adrenergic receptors in Leydig cells. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **302**:E1239–E1251. doi:10.1152/ajpendo.00554.2011

Stojkov NJ. 2012b. Adaptivni odgovor u u uslovima imobilizacionog stresa - molekularni mehanizmi u Leydig-ovim ćelijama. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine.

Stratmann M, Schibler U. 2006. Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J Biol Rhythms* **21**:494–506. doi:10.1177/0748730406293889

Strehl C, Gaber T, Löwenberg M, Hommes DW, Verhaar AP, Schellmann S, Hahne M, Fangradt M, Wagegg M, Hoff P, Scheffold A, Spies CM, Burmester G-R, Buttgerit F. 2011. Origin and functional activity of the membrane-bound glucocorticoid receptor. *Arthritis Rheum* **63**:3779–3788. doi:10.1002/art.30637

Swaab DF, Fliers E, Partiman TS. 1985. The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. *Brain Res* **342**:37–44. doi:10.1016/0006-8993(85)91350-2

Tahara Y, Shiraishi T, Kikuchi Y, Haraguchi A, Kuriki D, Sasaki H, Motohashi H, Sakai T, Shibata S. 2015. Entrainment of the mouse circadian clock by sub-acute physical and psychological stress. *Sci Rep* **5**:11417. doi:10.1038/srep11417

Takahashi K, Yamada T, Tsukita S, Kaneko K, Shirai Y, Munakata Y, Ishigaki Y, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Sawada S, Oka Y, Katagiri H. 2013. Chronic mild stress alters circadian

- expressions of molecular clock genes in the liver. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **304**:E301–E309. doi:10.1152/ajpendo.00388.2012
- Takahashi J. 2017. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Gen* **18**: 164–179. doi: 10.1038/nrg.2016.150
- Tang H, Brennan J, Karl J, Hamada Y, Raetzman L, Capel B. 2008. Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis. *Development* **135**:3745–3753. doi:10.1242/dev.024786
- Thorpe JB, Rajabi N, Decatanzaro D. 2012. Circadian rhythm and response to an acute stressor of urinary corticosterone, testosterone, and creatinine in adult male mice. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab* **44**:429–435. doi:10.1055/s-0032-1306307
- Timmermans S, Souffriau J, Libert C. 2019. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Front Immunol* **0**. doi:10.3389/fimmu.2019.01545
- Tonsfeldt KJ, Chappell PE. 2012. Clocks on top: The role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. *Mol Cell Endocrinol, The role of circadian clock in endocrinology* **349**:3–12. doi:10.1016/j.mce.2011.07.003
- Torra IP, Tsibulsky V, Delaunay F, Saladin R, Laudet V, Fruchart J-C, Kosykh V, Staels B. 2000. Circadian and Glucocorticoid Regulation of Rev-erb α Expression in Liver*. *Endocrinology* **141**:3799–3806. doi:10.1210/endo.141.10.7708
- Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ. 2012. Review: gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect. *Gen Comp Endocrinol* **177**: 305–314.
- Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, Iino M, Hashimoto S. 2005. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* **37**:187–192. doi:10.1038/ng1504
- Ukai H, Ueda HR. 2010. Systems Biology of Mammalian Circadian Clocks. *Annu Rev Physiol* **72**:579–603. doi:10.1146/annurev-physiol-073109-130051
- Ulrich-Lai Y, Herman J.P. 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* **10**: 397-409. DOI: 10.1038/nrn2647
- Van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. 1999. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **398**:627–630. doi:10.1038/19323

- Van der Pompe G, Antoni MH, Heijnen CJ. 1996. Elevated basal cortisol levels and attenuated acth and cortisol responses to a behavioral challenge in women with metastatic breast cancer. *Psychoneuroendocrinology* **21**:361–374. doi:10.1016/0306-4530(96)00009-1
- Vandevyver S, Dejager L, Libert C. 2014. Comprehensive Overview of the Structure and Regulation of the Glucocorticoid Receptor. *Endocr Rev* **35**:671–693. doi:10.1210/er.2014-1010
- Veldhuis Jd, King Jc, Urban Rj, Rogol Ad, Evans Ws, Kolp La, Johnson Ml. 1987. Operating Characteristics of the Male Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis: Pulsatile Release of Testosterone and Follicle-Stimulating Hormone and Their Temporal Coupling with Luteinizing Hormone*. *J Clin Endocrinol Metab* **65**:929–941. doi:10.1210/jcem-65-5-929
- Vettorazzi S, Nalbantoglu D, Gebhardt JCM & Tuckermann J. 2021. A guide to changing paradigms of glucocorticoid receptor function—a model system for genome regulation and physiology. *The FEBS Journal*. doi:10.1111/febs.16100
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS. 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**:719–725. doi:10.1126/science.8171325
- Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. 2001. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Research & Health*. **25(2)**, 85–93.
- Waite EJ, McKenna M, Kershaw Y, Walker JJ, Cho K, Piggins HD, Lightman SL. 2012. Ultradian corticosterone secretion is maintained in the absence of circadian cues. *Eur J Neurosci* **36**:3142–3150. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08213.x
- Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. 2010. Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Proc R Soc B Biol Sci* **277**:1627–1633. doi:10.1098/rspb.2009.2148
- Walker JJ, Spiga F, Waite E, Zhao Z, Kershaw Y, Terry JR, Lightman SL. 2012. The Origin of Glucocorticoid Hormone Oscillations. *PLOS Biol* **10**:e1001341. doi:10.1371/journal.pbio.1001341
- Walker JJ, Spiga F, Gupta R, Zhao Z, Lightman SL, Terry JR. 2015. Rapid intra-adrenal feedback regulation of glucocorticoid synthesis. *J R Soc Interface* **12**:20140875. doi:10.1098/rsif.2014.0875
- Walker WH, Walton JC, DeVries AC, Nelson RJ. 2020. Circadian rhythm disruption and mental health. *Transl Psychiatry* **10**:1–13. doi:10.1038/s41398-020-0694-0

- Wang X, Walsh LP, Reinhart AJ, Stocco DM. 2000. The Role of Arachidonic Acid in Steroidogenesis and Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Gene and Protein Expression *. *J Biol Chem* **275**:20204–20209. doi:10.1074/jbc.M0031132001990
- Watts AG, Tanimura S, Sanchez-Watts G. 2004. Corticotropin-Releasing Hormone and Arginine Vasopressin Gene Transcription in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of Unstressed Rats: Daily Rhythms and Their Interactions with Corticosterone. *Endocrinology* **145**:529–540. doi:10.1210/en.2003-0394
- Wayne Hou J, Collins Dc, Schleicher Rl. 1990. Sources of Cholesterol for Testosterone Biosynthesis in Murine Leydig Cells*. *Endocrinology* **127**:2047–2055. doi:10.1210/endo-127-5-2047
- Wu T, Fu Z. 2017. Time-dependent glucocorticoid administration differently affects peripheral circadian rhythm in rats. *Acta Biochim Biophys Sin* **49**:1122–1128. doi:10.1093/abbs/gmx115
- Xiao Y-C, Huang Y-D, Hardy DO, Li X-K, Ge R-S. 2010. Glucocorticoid suppresses steroidogenesis in rat progenitor Leydig cells. *J Androl* **31**:365–371. doi:10.2164/jandrol.109.009019
- Xiao Y, Zhao L, Li W, Wang X, Ma T, Yang L, Chen, H. 2021. Circadian clock gene BMAL1 controls testosterone production by regulating steroidogenesis-related gene transcription in goat Leydig cells. *J of Cell Phys*, **23**: 6706–6725. doi:10.1002/jcp.30334
- Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamine T, Takumi T. 2004. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol Biol* **5**:18. doi:10.1186/1471-2199-5-18
- Yamamoto T, Nakahata Y, Tanaka M, Yoshida M, Soma H, Shinohara K, Yasuda A, Mamine T, Takumi T. 2005. Acute Physical Stress Elevates Mouse Period1 mRNA Expression in Mouse Peripheral Tissues via a Glucocorticoid-responsive Element *. *J Biol Chem* **280**:42036–42043. doi:10.1074/jbc.M509600200
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. 2000. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science* **288**:682–685. doi:10.1126/science.288.5466.682
- Yao HH-C, Whoriskey W, Capel B. 2002. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* **16**:1433–1440. doi:10.1101/gad.981202
- Yaribeygi H, Panahi Y, Sahraei H, Johnston TP and Sahebkar A. 2017. The impact of stress on body function: A review. *EXCLI J* **16**: 1057–1072. doi: 10.17179/excli2017-480

Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC, Bradley A. 1999. The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* **400**:169–173. doi:10.1038/22118

Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A, Lee CC. 2001. Nonredundant Roles of the mPer1 and mPer2 Genes in the Mammalian Circadian Clock. *Cell* **105**:683–694. doi:10.1016/S0092-8674(01)00380-4

Zirkin BR, Papadopoulos V. 2018. Leydig cells: formation, function, and regulation†. *Biol Reprod* **99**:101–111. doi:10.1093/biolre/iyoy059

Biografija



Marija Medar rođena je 13.8.1990.g. u Kikindi. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Srpskoj Crnji. Prirodno-matematički fakultet, (PMF) Univerziteta u Novom Sadu (UNS), smer Diplomirani biolog (modul molekularni biolog), upisala je 2009.g., a završila 2013.g. sa prosečnom ocenom 9.46. Master studije upisuje na istom fakultetu, na smeru master biolog (modul molekularni biolog) i završava 2014.g. sa prosečnom ocenom 9,81. Iste godine upisuje Doktorske akademske studije takođe PMF, UNS. Ispite predviđene programom doktorskih studija položila je sa prosečnom ocenom 9,83. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je u Laboratoriji za hronobiologiju i starenje i Laboratoriji za Reproductivnu endokrinologiju i signaling, pod mentorstvom prof. dr Tatjane Kostić, a u okviru projekta „Molekularni mehanizmi i putevi signalne transdukcije uključeni u regulaciju steroidogeneze i adaptaciju Leydig-ovih ćelija na poremećenu homeostazu“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Pored toga, Marija je bila uključena u realizaciju 3 projekta finansirana od strane Autonomne pokrajine Vojvodine, jednog međunarodnog projekta Srpske Akademije Nauka Umetnosti i Akademije Nauka Češke u okviru kog je bila na kratkom studijskom boravku u Laboratoriji za ćelijsku i molekularnu neuroendokrinologiju u Pragu. Kao stipendista Erasmus+ fondacije učestvovala je na letnjem kursu “Stres i kognicija”, na Radboud Universitetu, u Holandiji. Marija je bila učesnik Internacionalne škole hronobiologije koju organizuje Društvo za israživanje bioloških ritmova. Dobitnica je nagrade za najbolju prezentaciju na konferenciji “Biološki časovnik: Mehanizmi i primena” koju organizuje Američko društvo za Eksperimentalnu biologiju i medicinu. Kao prvi autor objavila je 2 rada u časopisima međunarodnog značaja kategorije M21, 7 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja (M34) i 3 saopštenja na skupovima nacionalnog značaja (M64). U koautorstvu je objavila 5 radova kategorije M21 (jedan M21a), 1 rad kategorije M52, 5 saopštenja na skupovima kategorije M34 i 2 saopštenja na skupovima kategorije M64. Marija je zaposlena kao asistent na Katedri za Fiziologiju životinja i uključena je u realizaciju praktične nastave na više različitih kurseva.

Novi Sad, April 2022.g.

Marija Medar

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Улога глукокортикоида у циркадијалној синхронизацији ендокрине функције Leydig-ових ћелија
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Департман за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду б) в)
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
“Молекуларни механизми и путеви сигналне трансдукције укључени у регулацију стероидогенезе и адаптацију Leydig-ових ћелија на поремећену хомеостазу“ (руководилац: проф. др Татјана Костић), ОИ173057 и No. 451-03-9/2021-14/ 200125. “Да ли су репродуктивни хормони веза између стреса, метаболичког синдрома и старења“ (руководилац: проф. др Силвана Андрић), Покрајински секретаријат за образовање, науку и технолошки развој Аутономне покрајине Војводине (2018-2021) АПВ2856 „Да ли начин живота може узроковати смањење мушке фертилности?“ (руководилац: проф. др Татјана Костић), Покрајински секретаријат за образовање, науку и технолошки развој Аутономне покрајине Војводине (2021-2024) АПВ2708
1. Опис података
У оквиру ове докторске дисертације праћен је утицај стреса, посредован глукокортикоидима, у циркадијалној синхронизацији ендокриних функција Leydig-ових ћелија одраслих пацова кроз различите <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i> експерименталне моделе. Експериментални модели обухватили су примену стреса имобилизације (ИМО), у различитим циркадијалним временима, и различитом броју понављања, као и третман примене синтетичких глукокортикоида. Прецизније, ове студије су дизајниране да испитају (1) да ли је ефекат глукокортикоида на образац експресије гена часовника, гена повезаних са стероидогенезом, као и других гена од значаја за

ендокрину функцију Leydig-ових ћелија, временски зависан, као и (2) да ли је зависан од типа стресног догађаја (акутни и поновљени стрес).

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип *In vivo, ex vivo*
- б) корелационо истраживање, навести тип
- ц) анализа текста, навести тип
- д) остало, навести шта

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

 Процедуре за детекцију нивоа експримираности гена и протеина, процедуре за детекцију нивоа хормона, процедура за детекцију активности животиња

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

- а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података?
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан статистичком анализом добијених података, као и поређењем добијених података са литературним подацима из релевантних извора, док су анализе рађене у складу са опште прихваћеним лабораторијским протоколима и процедурама.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је извршена поређењем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у _ Докторска дисертација ће бити депонована у Репозиторијуму докторских дисертација у Универзитету у Новом Саду (CRIS) и Заједничком порталу свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији (NARDUS) ___

3.1.2. URL адреса _ <https://cris.uns.ac.rs/index.jsf> и <https://nardus.mpn.gov.rs/> _____

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности

(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

Огледи су одобрени од стране локалног Етичког комитета Универзитета у Новом Саду (број одобрења: И-2011-02, ИИИ-2011-04, 01-201/3, ИИ-2020-01-02) и Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије – Управа за ветерину (број решења: 323-07-0-00345/2020-05).

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима: _____

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

_Марија Медар, marija.medar@dbe.uns.ac.rs_____

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

_Марија Медар, marija.medar@dbe.uns.ac.rs_____

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

_Марија Медар, marija.medar@dbe.uns.ac.rs_____

