

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandar Z. Baburski

**KARAKTERIZACIJA I PUTEVI SINHRONIZACIJE
PERIFERNOG BIOLOŠKOG ČASOVNIKA I
STEROIDOGENEZE U LAJDIGOVIM ĆELIJAMA
PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandar Z. Baburski

**CHARACTERIZATION AND PATHWAYS OF
SYNCHRONIZATION OF PERIPHERAL
BIOLOGICAL CLOCK AND STEROIDOGENESIS IN
RAT LEYDIG CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTORI:

dr Tatjana Kostić, redovni profesor
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

dr Gordana Matić, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA:

dr Tatjana Kostić, redovni profesor
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

dr Silvana Andrić, redovni profesor
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

dr Gordana Matić, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane.....

SPIŠAK RADOVA U KOJIMA JE PRIKAZAN DEO REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE

1. Baburski AZ, Sokanovic SJ, Janjic MM, Stojkov 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](https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.039).
2. 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](https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.11.002).
3. Baburski AZ, Sokanovic SJ, Andric SA, Kostic TS (2017) Aging has the opposite effect on cAMP and cGMP circadian variations in rat Leydig cells. *J. Comp. Physiol. B* [doi:10.1007/s00360-016-1052-7](https://doi.org/10.1007/s00360-016-1052-7)
4. Baburski AZ, Medar MLJ, Andric SA, Kostic TS (2017) NO-cGMP signaling in testosterone-producing Leydig cells has circadian rhythm slightly synchronized by melatonin. – rad na recenziji

Zahvaljujem se svom mentoru prof. Tatjani Kostić koja je pokrenula hronobiologiju na našem fakultetu i omogućila mi da se upustim u ovu interesantnu oblast; koja je imala poverenja i razumevanja, savetovala me i podržavala tokom ovog puta.

Veliku zahvalnost dugujem prof. Silvani Andrić koja je uvek bila tu kada je trebalo, spremna da pomogne, posavetuje i odgovori na sva moja pitanja.

Puno hvala mojim kolegama i prijateljima, bivšim ili sadašnjim članovima RES-a, Srđi, Maji, Aci, Mari, Nati, Savi, Isidori, Mariji, Dragani, Neveni, Giletu, Sandri, Eleni i Margareti, sa kojima sam delio radne zadatke i koji su bili sjajna podrška tokom ovog puta, a siguran sam da će to i ostati.

Veliko hvala Lecotox grupi, prof. Radmili Kovačević, Nebojši, Bojani, Kristini, Sonji, Svetlani, Branki, Jeleni, Dragani, Zorani, Vanji i Bojani, na kolegijalnom ali i prijateljskom odnosu. Hvala za sve ideje, lake dogovore, savete, šale i osmehe.

Hvala prof. Dragani Obreht i Kseniji Taški-Ajduković kod kojih sam napravio prve laboratorijske korake i stekao prva praktična znanja. Hvala i svim ostalim članovima laboratorije za genetiku.

Hvala prof. Damjani Rozman, prof. Simonu Horvatu i prof. Urs Albrecht kao i članovima njihovih timova za gostoprimstvo i priliku da se usavršavam i učim na njihovim institutima.

Veliko hvala prof. Gordani Matić koja je izvela mnoge molekularne biologe na svoj naučni put, uvek spremna da izađe u susret i pomogne svakom studentu.

Hvala Stanku Stojilkoviću za svu pomoć koju je pružio našoj laboratoriji.

Hvala Marici i Olji na lepoj saradnji, kao i Miri, Deji i Saletu, „ženama”, majstorima, portirima i svima koji su zaposleni na Departmanu za biologiju i ekologiju.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici i svojim prijateljima, korenu koji me ne da vetrovima, ljubavi koja inspiriše. Hvala Bogu za toliku ljubav.

Saša

KARAKTERIZACIJA I PUTEVI SINHRONIZACIJE PERIFERNOG BIOLOŠKOG ČASOVNIKA I STEROIDOGENEZE U LAJDIGOVIM ČELIJAMA PACOVA

SAŽETAK

Biološki časovnik organizuje metabolizam i fiziološke procese u cirkadijalne ritmove. Na nivou ćelije, on se sastoji od grupe gena koji preko negativnih povratnih sprega održavaju ritam sopstvene transkripcije, ali regulišu i ritmičnost transkripcije mnogih drugih gena. Iako je poznato da su određeni geni časovnika neophodni za sintezu testosterona i fertilitet mužjaka, još uvek nema preciznih podataka o cirkadijalnoj fiziologiji testosteron produkujućih Lajdigovih ćelija. Ova studija je dizajnirana da definiše (1) cirkadijalni obrazac endokrine funkcije Lajdigovih ćelija uključujući i ekspimiranje gena perifernog časovnika i (2) upletenost LH-cAMP signalizacije u sinhronizaciju ritma Lajdigovih ćelija korišćenjem in vivo modela poremećene cAMP homeostaze (hipogonadotropni hipogonadizam, starački hipogonadizam, pinealektomija) i in vitro stimulacije Lajdigovih ćelija. Rezultati su pokazali cirkadijalni ritam funkcije Lajdigovih ćelija koji se ogleda u vremenski koordinisanoj oscilatornoj produkciji testosterona i intracelularnog cAMP, cirkadijalnom ekspimiranju regulatora (*Nur77* i *Arr19*), steroidogenih elementa (*Star/StAR*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1*), kao i elementa časovnika (*Bmal1/BMAL1*, *Per1/2/3*, *Cry1/2*, *Rev-erba/b/REV-ERBA*, *Rorb*, *Dec1/2*, *Dbp* i *E4bp4*). Ritam transkripcije osnovnih gena časovnika kao i ključnog elementa steroidogeneze (*Star*) se održava i u primarnoj kulturi ovih ćelija. Redukcija cAMP detektovana u Lajdigovim ćelijama pacova sa hipogonadotropnim hipogonadizmom stimuliše transkripciju većeg broja gena časovnika: *Per2*, *Rorb*, *Rev-erbb*, *Dec1/2*, *E4bp4*, *Ck1e/d*, i inhibiše *Npas2*. Sa druge strane, in vitro stimulacija cAMP-signalizacije povećava transkripciju *Per1*, *Dec1/2*, *Rorb*, *Npas2* i *E4bp4*, i smanjuje transkripciju *Rev-erba*. Starenje, dovodi do opadanja robusnosti cirkadijalne funkcije Lajdigovih ćelija koja se ogleda u smanjenju oscilacija intracelularnog cAMP, smanjenja amplitude ekspimiranja najvažnijih gena časovnika (*Bmal1/BMAL1*, *Per1/2*, *Rev-erba/REV-ERBA*), gena uključenih u

metabolizam holesterola (*Lipe, Soat2, Scarb1*) i steroidogenih gena, (*Star/StAR, Cyp11a1, Cyp17a1, Hsd3b1/2/HSD3B, Hsd17b4*). Ukidanje melatonina, nosioca informacije o svetlosnom režimu, koji svoje dejstvo ostvaruje preko cAMP signalizacije, stimuliše eksprimiranje elemenata časovnika (*Bmal1/BMAL1, Per1/2*) i steroidogeneze (*Star/StAR, Hsd3b/HSD3B*). Ovaj efekat se ostvaruje indirektno preko modulacije GnRH-LH osovine, a ne direktno, preko melatoninskih receptora na Lajdigovim ćelijama. Sumarno posmatrano, dobijeni rezultati sugerišu da je sinhronizacija ritma endokrine funkcije Lajdigovih ćelija ostvarena kompleksnom interakcijom hormona reproduktivne osovine, cAMP signalizacije i cirkadijalnog sistema.

Ključne reči: Lajdigove ćelije, cirkadijalni časovnik, steroidogeneza, testosteron, cAMP, cGMP, starenje, hipogonadizam, melatonin, pacov

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija, Fiziologija

UDK broj: [[612.616.3:616.43-008.6]+577.175.3/.175.7]*+612.67]:[577.171.4:612.616.31](043.3)

CHARACTERIZATION AND PATHWAYS OF SYNCHRONIZATION OF PERIPHERAL BIOLOGICAL CLOCK AND STEROIDOGENESIS IN RAT LEYDIG CELLS

ABSTRACT

Biological clock organizes metabolic and physiological processes in circadian rhythms. At cell level, it consists of group of genes that regulate its own transcription by negative feedback loop, also regulating transcription rhythmicity of other genes. Although, it is known that some clock genes are necessary for testosterone synthesis and male fertility, there is no precise data about circadian physiology of testosterone-producing Leydig cells. This thesis was design to define (1) circadian pattern of endocrine function of Leydig cells, including expression of clock genes, and (2) involvement of LH-cAMP signaling in synchronization of Leydig cells rhythm using in vivo model of disturbed cAMP homeostasis (hypogonadotropic hypogonadism, hypogonadism in aging, pinealectomy) and in vitro Leydig cell stimulation. Results confirmed circadian rhythmicity of Leydig cell function represented by temporal coordination of cyclic testosterone production and intracellular cAMP, circadian expression of regulators (*Nur77*, *Arr19*), steroidogenic (*Star/StAR*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1*) and clock elements (*Bmal1/BMAL1*, *Per1/2/3*, *Cry1/2*, *Rev-erba/b/REV-ERBA*, *Rorb*, *Dec1/2*, *Dbp*, *E4bp4*). Rhythm in transcription of core clock genes as well as key steroidogenic element (*Star*) was preserved in primary Leydig cell culture. Reduction in cAMP, detected in Leydig cells from hypogonadotropic hypogonadal rats, stimulated transcription of some clock genes: *Per2*, *Rorb*, *Rev-erbb*, *Dec1/2*, *E4bp4*, *Ck1e/d*, but inhibited *Npas2*. On the other hand, in vitro stimulation of cAMP signaling increased transcription of *Per1*, *Dec1/2*, *Rorb*, *Npas2* and *E4bp4*, and reduced transcription of *Rev-erba*. Aging dulled robustness of circadian function of Leydig cells, represented by decline in intracellular cAMP oscillations and amplitude of expression of core clock genes (*Bmal1/BMAL1*, *Per1/2*, *Rev-erba/REV-ERBA*), genes involved in cholesterol metabolism (*Lipe*, *Soat2*, *Scarb1*) and steroidogenic genes (*Star/StAR*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1/2/HSD3B*, *Hsd17b4*). Abolishment of melatonin, a main cue that spread information of light regime via cAMP signaling, stimulated expression of

clock (*Bmal1*/BMAL1, *Per1/2*) and steroidogenic (*Star*/StAR, *Hsd3b*/HSD3B) elements. This effect was occurred indirectly, through modulation of GnRH-LH axis, and not directly, through melatonin receptors on Leydig cells. All together, results suggest that synchronization of endocrine function of Leydig cells is achieved by complex interaction that includes reproductive hormone axis, cAMP signaling and circadian system.

Key words: Leydig cells, circadian clock, steroidogenesis, testosterone, cAMP, cGMP, aging, hypogonadism, melatonin, rat

Research area: Biology

Area of special interest: Molecular biology, Physiology

UDC number: [[612.616.3:616.43-008.6]+577.175.3/.175.7]*+612.67]:[577.171.4:612.616.31](043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Cirkadijalni ritmovi i biološki časovnik.....	4
2.1.1. Uvod u hronobiologiju – definisanje osnovnih pojmova.....	4
2.1.2. Organizacija biološkog časovnika kod sisara	6
2.1.2.1. Struktura i funkcija SCN	8
2.1.2.2. Regulacija SCN svetlosnim i nesvetlosnim signalima.....	9
2.1.2.3. Mehanizmi sinhronizacije perifernih časovnika	11
2.1.2.4. Oscilatori nezavisni od SCN.....	14
2.1.3. Molekularni časovnik.....	15
2.1.3.1. Primarna petlja.....	15
2.1.3.2. Sekundarna petlja	18
2.1.3.3. DEC petlja	19
2.1.4. Geni regulisani časovnikom.....	20
2.2. Endokrina funkcija testisa	21
2.2.1. Steroidogeneza u Lajdigovim ćelijama	21
2.2.1.1. Izvori holesterola	22
2.2.1.2. Transport holesterola do unutrašnje mitohondrijalne membrane.....	24
2.2.1.3. Konverzija holesterola u testosteron.....	27
2.2.2. Transport, metabolizam i biološka uloga androgena	29
2.2.3. Regulacija steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama.....	30
2.2.3.1. Signalni putevi uključeni u regulaciju steroidogeneze	32
2.3. Ritmovi endokrine funkcije testisa	36
2.3.1. Pulsevi sekrecije androgena.....	36
2.3.2. Cirkadijalni ritam produkcije androgena.....	37
2.3.3. Sezonski ritmovi.....	39
3. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	42
4. MATERIJAL I METODE	44
4.1. Hemikalije.....	45
4.2. Eksperimentalne životinje	46
4.3. Eksperimentalni modeli.....	47
4.3.1. Eksperimentalni model hipogonadotropnog hipogonadizma	47
4.3.2. Model staračkog (prirodnog) hipogonadizma.....	48
4.3.3. Eksperimentalni model pinealektomisanih životinja.....	49
4.3.4. <i>In vitro</i> model	50
4.4. Određivanje koncentracije hormona.....	50
4.5. Određivanje lipidnog statusa u serumu	51
4.6. Priprema primarne kulture Lajdigovih ćelija	51
4.7. Ekstrakcija steroida iz Lajdigovih ćelija.....	53
4.8. Određivanje koncentracije cikličnih nukleotida u ćelijskom sadržaju.....	54
4.9. Određivanje koncentracije nitrita u ćelijskom medijumu	55
4.10. Analiza eksprimiranja gena	55

4.10.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija.....	55
4.10.2. Relativna kvantifikacija iRNK u PCR analizi.....	56
4.11. Kvantitativna i kvalitativna analiza proteina	60
4.11.1. Određivanje ukupne količine proteina u uzorcima.....	60
4.11.2. SDS-PAGE i Western blot	60
4.12. Statistička analiza i analiza ritma.....	62
5. REZULTATI.....	63
5.1. Karakterizacija cirkadijalnog profila elemenata steroidogeneze i biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama adultnih pacova.....	64
5.1.1. Cirkadijalne fluktuacije hormona u serumu	64
5.1.2. Cirkadijalni fluktuacije nivoa cikličnih nukleotida	65
5.1.3. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena uključenih u steroidogenezu.....	66
5.1.4. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena biološkog časovnika.....	67
5.1.5. Analiza ritma primarne kulture Lajdigovih ćelija pacova.....	69
5.2. Putevi sinhronizacije biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama pacova.....	71
5.2.1. Efekat stimulacije LH-cAMP signalizacije u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija na ekspimiranje gena biološkog časovnika.....	71
5.2.2. Efekat poremećene LH-cAMP signalizacije na obrazac ekspimiranja gena biološkog časovnika i gena povezanih sa steroidogenezom na modelu hipogonadotropnog hipogonadizma	72
5.2.2.1. Cirkadijalni profil produkcije hormona i cAMP.....	72
5.2.2.2. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena uključenih u steroidogenezu	73
5.2.2.3. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena biološkog časovnika.....	75
5.2.3. Efekat poremećene LH-cAMP signalizacije na obrazac ekspimiranja gena biološkog časovnika i gena povezanih sa steroidogenezom na modelu staračkog hipogonadizma	77
5.2.3.1. Cirkadijalni profil endokrine funkcije Lajdigovih ćelija	77
5.2.3.2. Cirkadijalne fluktuacije lipida u serumu i ekspimiranost gena uključenih u metabolizam holesterola	79
5.2.3.3. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena uključenih u steroidogenezu.....	81
5.2.3.4. Cirkadijalni profil cAMP-PRKA signalnog puta.....	84
5.2.3.5. Cirkadijalni profil NO-cGMP-PRKG signalnog puta.....	88
5.2.3.6. Cirkadijalni profil ekspimiranja <i>Pde</i> sa dvojnomo aktivnošću.....	91
5.2.3.7. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena biološkog časovnika.....	93
5.2.3.8. Cirkadijalni profil ekspimiranja <i>Sirt1</i> i <i>Nampt</i> gena	96
5.2.4. Efekat melatonina na steroidogenezu i periferni biološki časovnik u Lajdigovim ćelijama pacova.....	97
5.2.4.1. Cirkadijalni profil produkcije hormona	97
5.2.4.2. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena uključenih u steroidogenezu	100
5.2.4.3. Cirkadijalni profil elemenata odgovornih za održavanje ravnoteže nivoa cAMP.....	104
5.2.4.4. Cirkadijalni profil NO-cGMP-PRKG signalnog puta.....	105
5.2.4.5. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena biološkog časovnika.....	107
5.2.4.6. Direktno efekto melatonina na funkciju Lajdigovih ćelija	109

6. DISKUSIJA	112
6.1. Karakterizacija cirkadijalnog profila elemenata steroidogeneze i biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama pacova	113
6.2. Efekat poremećene LH-cAMP signalizacije na obrazac ekspimiranja gena biološkog časovnika i gena povezanih sa steroidogenezom na modelu hipogonadotropnog hipogonadizma.....	116
6.3. Efekat poremećene LH-cAMP signalizacije na obrazac ekspimiranja gena biološkog časovnika i gena povezanih sa steroidogenezom na modelu staračkog hipogonadizma.....	119
6.4. Efekat melatonina na steroidogenezu i periferni biološki časovnik u Lajdigovim ćelijama pacova.....	128
7. ZAKLJUČCI.....	133
8. LITERATURA.....	136
LISTA SKRAĆENICA	159
BIOGRAFIJA.....	164

1. UVOD

Cirkadijalni ili biološki časovnik ima ulogu u regulaciji velikog broja metaboličkih, fizioloških i bihevioralnih procesa kod skoro svih živih organizama. Ova regulatorna uloga obezbeđuje vremensku usklađenost pomenutih procesa jednog organizma sa spoljašnjom sredinom (odnosno spoljašnjim markerima vremena, kao što je to smenjivanje dana i noći) ali i međusobnu usklađenost, tj. koordinaciju unutrašnjih procesa na vremenskoj skali. Pokazano je da biološki časovnik ima značajnu ulogu i pri regulaciji reprodukcije sisara, ali da može biti povezan i sa određenim patološkim stanjima. Pojedini geni biološkog časovnika su čak neophodni za pravilnu produkciju polnih hormona i fertilitnost (Alvarez i sar., 2008). Ipak, razumevanje odnosa biološkog časovnika i reprodukcije je još uvek skromno, naročito kada je u pitanju muški reproduktivni sistem (Bittman, 2016).

Umnožavanje znanja iz ove oblasti i razjašnjenje regulatorne uloge cirkadijalnog časovnika na produkciju testosterona i reproduktivnu sposobnost muškaraca ne bi imalo samo teorijski značaj već i praktični. Rad noću ili u smenama, „jet-lag“, previše vremena provedenog u zatvorenom prostoru, ali i mnogi drugi trendovi savremenog način života, otežavaju rad našeg cirkadijalnog časovnika. Ovo udaljavanje od načina života na koji smo evolutivno adaptirani, može dovesti do depresije, gojaznosti, metaboličkih i hormonskih poremećaja, ali i uticati na našu reproduktivnu sposobnost (Roenneberg i sar., 2012; Alvarez i sar., 2008). Odgovor na pitanje na koji način biološki časovnik reguliše produkciju testosterona kod muškaraca, ali i kako poremećaj biološkog časovnika utiče na ovaj proces, približio bi nas razumevanju veze ova dva sistema, ali i pomogao razumevanje drugih patoloških stanja reproduktivnog sistema i potencijalno ukazao na terapijske mete.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Cirkadijalni ritmovi i biološki časovnik

2.1.1. Uvod u hronobiologiju – definisanje osnovnih pojmova

Rotacija Zemlje oko svoje ose dovodi do ritmičnog smenjivanja dana i noći, što je u velikoj meri uticalo na živi svet naše planete. Skoro svi organizmi, od bakterije do čoveka, prilagodili su svoje ponašanje i fiziologiju ovom ritmu – smenjivanje aktivne faze i odmora kod životinja, otvaranje i zatvaranje lista kod biljaka, putovanje planktona između površine i dubine okeana itd.

Prvo istraživanje koje je ukazalo na mogućnost da je ovakvo ritmično ponašanje programirano, a ne samo pasivni odgovor na dnevna variranja u količini svetlosti i temperaturi, desilo se 1729 godine od strane jednog francuskog astronoma. Naime, Jean Jacques d'Ortous De Mairan je primetio da biljka Mimosza nastavlja da otvara i zatvara svoje listove u dnevno/noćnom maniru i ako se stavi u konstantan mrak (Roenneberg i Mellow, 2005). Ovaj unutrašnji mehanizam koji organizmu daje osećaj vremena i bez upliva spoljašnjih signala naziva se **biološki časovnik ili cirkadijalni sistem**. Biološki časovnik predstavlja evolutivnu adaptaciju koja omogućava organizmu da predvidi, i da se pripremi za promene u spoljašnjoj sredini koje nastaju kao posledica smenjivanja dana i noći, tj. da uradi „pravu stvar” u pravo vreme. Takođe, ovaj mehanizam obezbeđuje i vremensku organizaciju, kao i međusobnu usklađenost različitih unutrašnjih procesa (Vitaterna i sar., 2001).

Biološki časovnik reguliše veliki broj procesa kao što su ciklus budnog stanja i sna, krvni pritisak, telesna temperatura, nivo hormona u cirkulaciji itd. Ritmovi ovih procesa imaju period približan 24h i nazivaju se **cirkadijalnim ritmovima**¹ (*circa* – otprilike, *dien* – dan). Jedna od najvažnijih karakteristika cirkadijalnih ritmova je to da su oni endogeno generisani², odnosno, kako je to de Mairan uvideo, da se održavaju i u odsustvu spoljašnjih signala koji bi ukazali na doba dana. Ipak, period ovih ritmova nije tačno 24h, već je malo kraći ili malo duži

¹ Termin cirkadijalni (*engl. circadian*) uvodi Franz Halberg 1959. godine

² Za razliku od cirkadijalnih ritmova, dnevni ritmovi (*engl. diurnal rhythms*) ne moraju nužno biti endogeno generisani već je dovoljno da ritam prati dnevna smenjivanja svetlosti i tame. Dnevni ritmovi su dakle širi pojam od cirkadijalnih ritmova.

od 24h (zavisi od vrste, genotipa), što znači da jedinka bez ikakvog kontakta sa ritmovima spoljašnje sredine, posle određenog vremena, ne bi više bila u fazi sa njima. Ovo nas dovodi do sledeće vrlo važne osobine cirkadijalnih ritmova, a to je da preko određenih signala³ moraju biti sinhronizovani sa spoljašnjim ritmovima. Ovi signali, od kojih je najvažniji svetlost, imaju sposobnost „navijanja” biološkog sata i na taj način fino regulišu cirkadijalne ritmove. Ova mogućnost „navijanja” biološkog sata predstavlja značajnu evolutivnu prednost i omogućava fino vremensko podešavanje u odnosu na promene spoljašnjih uslova (na primer odnos dana i noći nije isti tokom cele godine).

Cirkadijalne ritmove karakteriše i izuzetno široka rasprostranjenost – oni se javljaju u ogromnom broju bioloških procesa kao i u skoro svim organizmima. Još jedna osobina cirkadijalnih ritmova je to da su generisani na ćelijskom nivou i da nema suštinskih razlika između ritmova jednoćelijskih organizama, kao što su neke alge, i najsloženijih sisara (Vitaterna i sar., 2001).

Pored cirkadijalnih ritmova postoje i **ultradijalni ritmovi**, sa periodom kraćim od 24h (npr. otkucaji srca), kao i **infradijalni ritmovi** sa periodom dužim od 24h (npr. menstrualni ciklus). U infradijalne ritmove spadaju lunarni, sezonski, godišnji ritmovi itd.

Poddisciplina biologije koja se bavi mehanizmima koji leže u osnovi biološkog časovnika kao i potencijalnim posledicama oštećenja ovog sistema naziva se **Hronobiologija** (*chronos* – vreme).

Pošto cirkadijalni sistem obezbeđuje regulaciju i koordinaciju skoro svih fizioloških i metaboličkih procesa u organizmu, bolje razumevanje ovog dela biologije obezbedilo bi i bolje razumevanje raznih patoloških stanja. Na primer, usled poremećaja rada biološkog časovnika kod radnika čiji rad podrazumeva dnevne i noćne smene (*engl. shift-work*) dolazi do poremećaja ritma u nivou hormona rasta i melatonina, smanjene senzitivnosti na insulin i podizanja nivoa kortizola, što sve ukupno povećava rizik za stvaranje metaboličkog sindroma

³ U literaturi se ovi signali označavaju nemačkim pojmom „**zeitgeber**” (*engl. bukvalni prevod „time-giver”*). Iako je svetlost najjači zeitgeber, rad biološkog časovnika može biti modulisan i socijalnim interakcijama, aktivnošću/vežbanjem, promenom spoljašnje temperatura, vremenskim režimom ishrane itd.

(Albrecht, 2012). Takođe, kod 10-30% ovih radnika razvije se poremećaj spavanja poznat kao SWD (*engl. Shift Work Disorder*) (Schnell i sar., 2014). Još neki od uzroka poremećaja biološkog časovnika su džetleg⁴ (*engl. jet lag*) i „socijalni” džetleg⁵ (*engl. „social” jet lag*).

Znanja na ovom polju obezbedila su i nove strategije u terapiji – **Hronoterapija**. Hronoterapija ima za cilj da uskladi vreme davanja leka sa ritmom bolesti. Na ovaj način postiže se optimizacija terapijskog efekta leka i smanjuju se neželjeni efekti (Ohdo, 2010). Još jedna mogućnost je regulisanje narušenog cirkadijalnog ritma različitih procesa zajtgeberima, za šta je primer primena svetlosne terapije (*engl. light therapy, phototherapy*) kod DSPS (*engl. delayed sleep phase syndrome*), SAD (*engl. seasonal affective disorder*), depresije i drugih bolesti (Golden i sar., 2005).

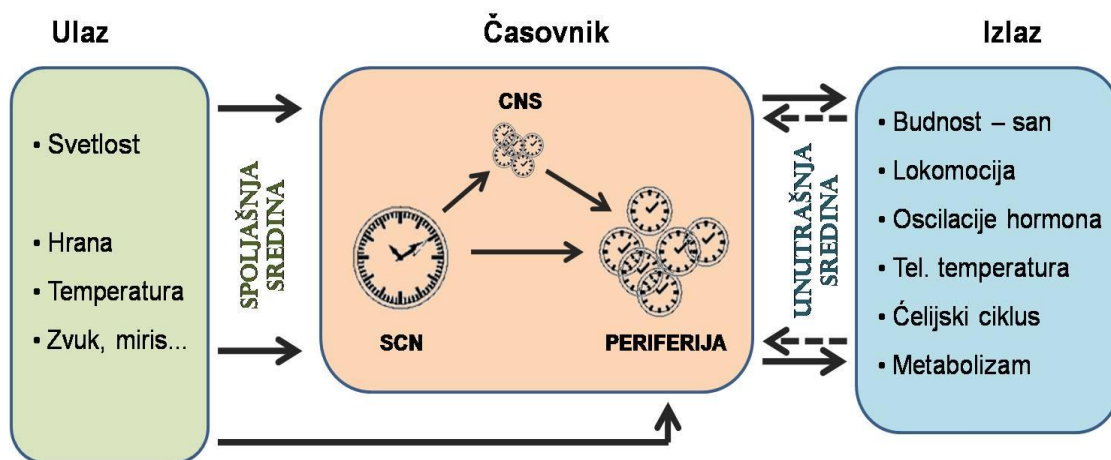
2.1.2. Organizacija biološkog časovnika kod sisara

Kao što je već pomenuto, biološki ili cirkadijalni časovnik je evolutivno konzerviran sistem koji predviđanjem spoljašnjeg ciklusa dana i noći obezbeđuje optimalanu vremensku usklađenost fizioloških procesa. Na slici 2.1 je šematski prikazana organizacija ovog sistema: **Ulaz** (*engl. input*) predstavljaju signali iz spoljašnje i unutrašnje sredine, prvenstveno svetlost, koji imaju ulogu fine regulacije časovnika, **časovnik** (*engl. clock*) prima input signale, obrađuje ih i zatim informaciju šalje do različitih delova organizma koji pokazuju cirkadijalni ritam u svojoj aktivnosti – **izlaz** (*engl. output*) (Albrecht i sar., 2012).

⁴ Džetleg se opisuje kao vremenska neusklađenost endogenog cirkadijalnog sistema sa spoljašnjom sredinom nastala usled dugih putovanja kroz više vremenskih zona (Arendt, 2009). Pokazano je da se cirkadijalni sistem sporo adaptira na novi vremenski raspored – u proseku, potreban je po jedan dan za svaki sat pređene vremenske zone (Schnell et al., 2014). Česti simptomi koji se javljaju ovom prilikom su loš san, opšti umor i umanjenje fizičke i kognitivne sposobnosti, dok hronični džetleg (javlja se kod članova posade u avionima) može ostaviti i dugoročne posledice po zdravlje kao što su kognitivni deficit, povećani rizik za nastanak srčanih oboljenja i kancer (Schnell et al., 2014).

⁵ „Socijalni” džetleg je još jedan primer hroničnog džetlega. Ova kovanica ukazuje na sistemske varijacije u vremenu spavanja između radnih i slobodnih dana, koje se dešavaju svake nedelje tokom našeg radnog veka (ili u adolescenciji tokom školovanja) (za više informacija pogledati Wittmann i sar., 2006). Pokazano je da ova neusklađenost u obrascu spavanja tokom radnih i neradnih dana može povećati rizik za nastanak gojaznosti (Roenneberg i sar., 2012).

Cirkadijalni sistem ili biološki časovnik zapravo se sastoji od velikog broja manjih časovnika. Svaki organ, tkivo, pa skoro i svaka ćelija ima svoj časovnik. Ipak oni nisu svi ravnopravni. **Centralni časovnik** (*engl. Master clock*) se nalazi u Suprachiasmaticnom nukleusu (SCN) i predstavlja onaj deo cirkadijalnog sistema koji prima informacije iz spoljašnje i unutrašnje sredine, obrađuje ih i na osnovu njih usklađuje rad 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. Ovde je važno napomenuti da rad perifernih časovnika ne zavisi u potpunosti od centralnog časovnika. Naime, molekularni časovnik svake ćelije je autonoman i održava ritam bez obzira na spoljašnje signale, čak i u ćelijskoj kulturi. Signali iz SCN su ipak neophodni kako bi sinhronizovali njihov rad – kada se ovi signali ukinu, posle izvesnog vremena aktivnost pojedinačnih ćelija postaje asinhrona, što na nivou organa rezultira gubitkom ritma (Miller i sar., 2007).



Slika 2.1 Organizacija cirkadijalnog sistema, preuzeto uz izmenu iz Albrecht i sar., 2012

Fiziološki ili biohemijski procesi koji se dešavaju u različitim tkivima i organima, i pokazuju cirkadijalni ritam, mogu biti regulisani centralnim časovnikom, perifernim časovnicima ili često na oba načina. Ograni takođe preko svojih produkata mogu učestvovati u međusobnoj koordinaciji. Ovakvi različiti vidovi regulacije daju celom sistemu dodatnu stabilnost. O pojedinačnim delovima cirkadijalnog sistema biće više reči u narednim poglavljima.

2.1.2.1. Struktura i funkcija SCN

SCN je dvojni nukleus koga čini oko 10 000 neurona. Nalazi se u anteriornom delu hipotalamusa, neposredno iznad optičke hijazme i ima ulogu u kontroli/sinhronizaciji cirkadijalnih ritmova.

I pre samog otkrića ovog nukleusa, bili su poznati različiti primeri cirkadijalnih ritmova kod sisara (ciklus budnog stanja i sna, lokomotorna aktivnost, endokrini ritmovi) ali se nije znalo na koji način su oni regulisani. Ranih 1970-ih godina dve nezavisne grupe naučnika, anatomskim praćenjem retino-hipotalamičkog trakta (RHT), otkrile su SCN, region hipotalamusa odgovoran za sve merene ritmove, uključujući aktivnost, san, uzimanje vode itd. (Moore i Eichler, 1972; Stephan i Zucker, 1972). Stephan i Zucker (1972) su pokazali da lezija oba SCN nukleusa dovodi do aritmije, a lezija samo jednog nukleusa do smanjenja amplitude cirkadijalnog ritma uzimanja vode. Nezavisno od njih, Moore i Eichler (1972) pokazuju da lezija oba SCN nukleusa vodi gubitku cirkadijalnog ritma nivoa kortikosterona kod pacova.

Definitivnu potvrdu da je centralni časovnik smešten u SCN doneo je eksperiment u kojem je cirkadijalni ritam u ponašanju, prvobitno izgubljen zbog lezije SCN, vraćen presađivanjem SCN (Lehman i sar., 1987). Dalje, ukoliko se transplantira deo SCN mutantne životinje sa izmenjenim cirkadijalnim periodom (na primer *tau*⁶ mutacija kod hrčka) period ritma u ponašanju koji se uspostavlja uvek odgovara genotipu donora (Ralph i sar., 1990; Sujino i sar., 2003). Ipak, transplantacija SCN ne može da povрати sekreciju hormona što ukazuje da se izlazni signali SCN koji regulišu neuroendokrine ritmove razlikuju od onih koji regulišu lokomotornu aktivnost (Meyer-Bernstein i sar., 1999).

Veliki napredak desio se kada je pokazano da, ne samo delovi SCN, već i njegovi pojedinačni neuroni održavaju stabilnu cirkadijalnu aktivnost u kulturi nedeljama (Welsh i sar., 1995). Ovu cirkadijalnu aktivnost na nivou ćelije, pa time i organa, obezbeđuje **molekularni časovnik** tj. „clock” geni (detaljnije u kasnijem tekstu).

⁶ Tau mutant nosi mutaciju na genu za Kazein kinazu 1ε, serin-treonin kinazu koja je veoma značajna za regulaciju aktivnosti PER i CRY proteina, a time i molekularnog časovnika uopšte (Loudon i sar., 2007)

SCN kao organ pokazuje period aktivnosti ekvivalentan species-specifičnom periodu u lokomotornoj aktivnosti. Nekoliko grupa naučnika pokazale su da je period lokomotorne aktivnosti jednak srednjoj vrednosti perioda svih pojedinačnih neurona izolovanih iz SCN (Liu i sar., 1997). Tako na primer, merenjem perioda električne aktivnosti pojedinačnih SCN neurona izolovanih iz „wildtype” (WT) hrčka dobijen je prosek približan 24h (~24.1h), dok je u slučaju homozigotnog *tau* mutanta on bio oko 20h što odgovara njihovim lokomotornim aktivnostima u konstantnim uslovima (Liu i sar., 1997).

Period cirkadijalne aktivnosti SCN u konstantnim uslovima (na primer u konstantnom mraku) naziva se „**free-running**” i zavisi od genotipa. Kao što je pomenuto on za WT hrčka iznosi 24,1h, a za *tau* mutanta 20h. Sa druge strane, „free-running” period WT miša malo je kraći od 24h. Dok god je takav miš u uslovima 12h dan – 12h noć svetlosni stimulus će uskladiti njegovu lokomotornu aktivnost sa uslovima spoljašnje sredine (miš je primer noćne životinje), međutim, ako ga stavimo u konstantan mrak, njegova aktivnost zavisiće isključivo od „free-running” perioda SCN (Miller i sar., 2007).

Iako su neuroni sa ritmičnim ponašanjem raspoređeni po celom SCN, funkcionalna i anatomsko istraživanja pokazuju da se SCN može podeliti na dva dela, koru i srž (*engl. shell and core*). Na osnovu dosadašnjih istraživanja predložen je jednostavan obrazac po kome srž prima svetlosni signal i integriše ga (dolazi do aktivacije ekspresije gena, npr. *Per1* i *Per2*), a zatim informaciju o faznom resetovanju prenosi na koru, koja je odgovorna za širenje te informacije do drugih delova mozga i periferije (Miller i sar., 2007).

2.1.2.2. Regulacija SCN svetlosnim i nesvetlosnim signalima

Kao što je pomenuto „free-running” period najčešće nije tačno 24h. Da bi biološki ritmovi bili u potpunosti usklađeni sa spoljašnjim, cirkadijalni časovnik prilagođava svoj rad uslovima spoljašnje sredine preko signala (zajtgebera) od kojih je najznačajniji svetlost. Sinhronizacija celokupnog organizma sa spoljašnjim 24h ciklusom predstavlja glavnu ulogu SCN. Ovaj nukleus prima informacije o vremenu dominantno preko tri puta: retino-hipotalamički trakt (RHT), genikulo-

hipotalamički trakt (GHT) i serotonergički (5-hidroksitriptamin, 5HT) put preko dorzalnog rafe nukleusa (DRN) i medijalnog rafe nukleusa (MRN). Svetlosne informacije se prenose RHT a dodatne, ne-svetlosne, informacije preko GHT i RN.

RHT predstavlja primarni put kojim svetlosni stimulus reguliše fazu ritma SCN (Moore i Lenn, 1972). Uticaj svetlosti na cirkadijalni sistem sisara ostvaruje se preko tri fotoreceptorna puta: čepići, štapići i ipRGC (*engl. intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*) (Provencio i sar., 1998; Panda i sar., 2005).

Ganglionske ćelije retine (RGC) su neuronske ćelije koje se nalaze na unutrašnjoj strani retine i primaju signal od klasičnih fotoreceptora, čepića i štapića. Većina ovih ćelija projektuje svoje aksone preko optičkog nerva do delova mozga gde se formiraju vizuelne slike. Sa druge strane, mala populacija RGC eksprimira fotopigment melanopsin, projektuje se na druge regione mozga, uključujući i SCN, i na taj način širi svetlosne ne-vizuelne informacije (Provencio i sar., 2000; Panda i sar., 2005). Ovi neuroni označeni su kao ipRGC i za razliku od drugih RGC reaguju na svetlosni stimulus depolarizacijom nezavisno od čepića i štapića (Berson i sar., 2002; Hattar i sar., 2002). Pokazano je da oba ova puta, vizuelni (preko čepića i štapića) i ne-vizuelni (preko melanopsina) učestvuju u prenošenju svetlosnih signala do SCN. Naime, miševi koji nemaju funkcionalne čepiće i štapiće (Freedman i sar., 1999) kao i miševi kojima nedostaje melanopsin (Lucas i sar., 2003; Ruby i sar., 2002) uspešno odgovaraju na svetlosni stimulus. Jedino miševi sa nedostatkom čepića, štapića i melanopsina potpuno gube mogućnost odgovora na svetlosni stimulus (Hattar i sar., 2003; Panda i sar., 2003).

Nakon svetlosnog stimulusa, ćelije RHT trakta otpuštaju neurotransmitere, primarno glutamat i PACAP (*engl. pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*), koji tu informaciju prenose na SCN. Vezivanjem ovih neurotransmitera za svoje receptore (NMDA i ne-NMDA glutamatski receptori, PAC1 i VPAC2) u određenim neuronima SCN dolazi do promene u nivou Ca^{2+} i cAMP što vodi aktivaciji nekoliko kinaza – Ca^{2+} /kalmodulin kinaza, ERK/MAP kinaza, protein kinaze A. Sve ove kinaze mogu fosforilisati CREB protein koji onda preko CRE sekvence aktivira ekspimiranje brzih ranih gena (*engl. immediate early genes, IEGs*) kao što je *Per1*. Ovo omogućava uspostavljanju nove cirkadijalne faze (Liu i sar., 2007). Potvrda o važnosti *Period* gena za resetovanje časovnika dolazi iz

eksperimenata gde se utišavanjem *Per1* gena inhibira fazno pomeranje časovnika izazvano svetlosnim stimulusom (Hirota i Fukada, 2004).

Pored svetlosti, aktivnost/vežbanje i socijalno ponašanje mogu takođe modifikovati cirkadijalne ritmove zavisne od SCN. Anatomske i farmakološke studije pokazale su da nesvetlosni stimulusi mogu uticati na SCN preko IGI (*engl. intergeniculate islet*) talamusa posredstvom neuropeptida Y (genikulo-hipotalamički trakt) i rafe nukleusa, posredstvom serotonina (rafe-hipotalamički put). Nesvetlosni stimulusi ne samo da direktno utiču na cirkadijalni ritam preko SCN, već mogu i izmeniti dejstvo svetlosnog stimulusa, i obrnuto (Miller i sar., 2007).

2.1.2.3. Mehanizmi sinhronizacije perifernih časovnika

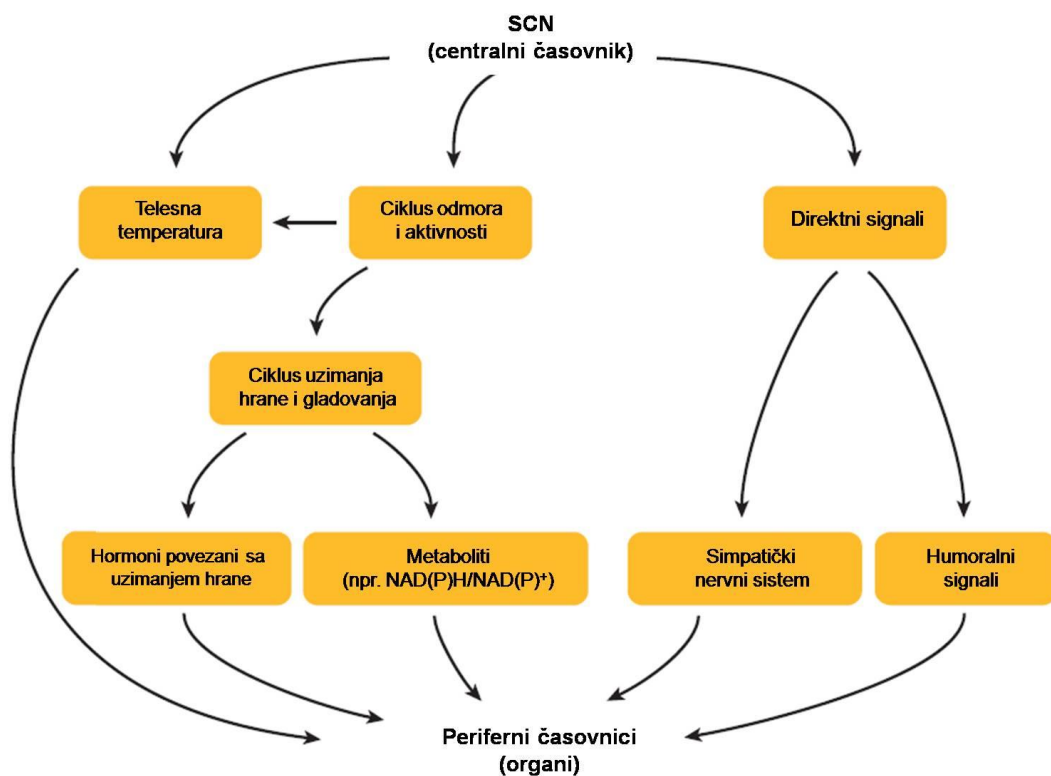
SCN kao glavni oscilator ima ulogu u koordinaciji perifernih oscilatora sa spoljašnjom sredinom⁷. Ove oscilacije se manifestuju kao ritmovi u ponašanju, metabolizmu i fiziologiji. Tipični ritmovi koji se proučavaju kao fazni markeri aktivnosti SCN su lokomotorna aktivnost, telesna temperatura i unos hrane i vode. Svi oni u normalnim uslovima imaju izražene cirkadijalne oscilacije, ali se to gubi odstranjivanjem SCN (Clarke i Coleman, 1986; Stephan i Zucker, 1972; Moore i Eichler, 1972).

SCN svoju regulatornu ulogu ostvaruje direktno, nervnim i humoralnim putem, i indirektno, preko telesne temperature, ritma aktivnosti i ritma uzimanja hrane (Sl. 2.2). Ipak, regulacija pojedinačnog tipa ćelija ili organa je najčešće kompleksna i uključuje više različitih puteva, bilo direktnih ili indirektnih.

⁷ Važnost ovog nukleusa za usklađenost ponašanja organizma sa promenama u spoljašnjoj sredini dobro ilustruje eksperiment u kom su u prirodnom okruženju praćene kontrolne i veverice (*Ammospermophilus leucurus*) kojima je odstranjen SCN. Kontrolne životinje su bile aktivne isključivo tokom dana, dok aktivnost eksperimentalnih životinja nije bila tako jasno vremenski regulisana. Ovo je za posledicu imalo da je čak 60% eksperimentalnih životinja postalo plen predatora naspram 29% kontrolnih životinja (DeCoursey i sar., 1997).

Direktna regulacija

Najveći broj eferentnih puteva iz SCN su projekcije na druge nukleuse hipotalamusa. Mete ovih projekcija se mogu svrstati u tri kategorije: 1) endokrini neuroni, kao što su kortikotropin-oslobađajući hormon (CRH), tireotropin-oslobađajući hormon (TRH) i gonadotropin-oslobađajući hormon (GnRH) neuroni, koji direktno regulišu funkcije hipofize; 2) interneuroni (brojniji od prethodnih, smešteni u medijalnoj preoptičkoj regiji (MPOA), dorzomedijalnom nukleusu hipotalamusa (DMH), paraventrikularnom nukleusu (PVN)...), koji integrišu cirkadijalne i ne-cirkadijalne informacije i regulišu funkcije endokrinih neurona; i 3) neuroni autonomnog nervnog sistema (Kalsbeek i sar., 2006).



Slika 2.2. Putevi regulacije rada perifernih časovnika, preuzeto uz izmenu iz Dibner i sar., 2010

Dobar primer direktne regulacije, ali i kompleksnosti celog sistema su putevi kojima SCN reguliše ritmičnost produkcije glukokortikoida. Naime, SCN neuroni povezani su sa CRH/AVP neuronima (početak hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine, HPA) u medioparvocelularnom delu PVN (mpPVN) (Dickmeis, 2009; Kalsbeek i sar., 2012). SCN neuroni direktno inervišu i subparaventrikularnu (sPVZ) i DMH, koji se onda projektuju na mpPVN (Dickmeis, 2009; Kalsbeek i sar.,

2012). Smatra se da SCN reguliše ritmičnost HPA osovine inhibicijom pošto je kod životinja sa lezijom SCN nivo glukokortikoida konstantno visok (Son i sar., 2011). Ipak, ritmičnost u sekreciji glukokortikoida ne zavisi isključivo od HPA osovine i ostaje očuvana iako je nivo ACTH u cirkulaciji konstantan (Son i sar., 2011). Dodatni vid regulacije SCN obezbeđuje preko autonomnog nervnog sistema. Preautonomni PVN neuroni, koji su u direktnoj vezi sa SCN, dolaze u kontakt sa simpatičkim preganglionskim neuronima u intermediolateralnoj koloni (*engl. intermediolateral column, IML*) kičmene moždine, odakle IML simpatički neuroni inervišu nadbubrežnu žlezdu (Son i sar., 2011). Glukokortikoidi, čija se ritmičnost reguliše ovim putevima, izuzetno su važni za resetovanje tj. sinhronizaciji mnogih perifernih časovnika u organizmu (Dickmeis, 2009; Chung i sar., 2011).

Simpatički deo autonomnog nervnog sistema ima važnu ulogu i u cirkadijanoj regulaciji rada pinealne žlezde (SCN – PVN – IML – pinealna ž.). Pokazano je da su GABAnergički neuroni (na nivou PVN) odgovorni za inhibitorni efekat SCN na sekreciju melatonina u toku dana, dok glutamatergički neuroni stimulušu oslobađanje melatonina tokom noći (Kalsbeek i sar., 2006). Melatonin, kao i glukokortikoidi, dalje ima regulatornu ulogu na cirkadijalnu aktivnost mnogih tkiva (Hirota i Fukada, 2004).

Simpatikus ima značajnu ulogu i u cirkadijalnoj regulaciji jetre, osteoblasta, hematopoetskih stem ćelija itd. (Okamura i sar., 2010), dok parasimpatikus dominantno reguliše gastrointestinalni i respiratorni trakt (Okamura i sar., 2010), kardiovaskularni sistem i oslobađanje insulina iz pankreasa (Kalsbeek i sar., 2006).

Indirektna regulacija

Pored nervnih i humoralnih puteva kojim SCN reguliše rad perifernih časovnika, ritam uzimanja hrane (koji je u zavisnosti od ritma aktivnosti, što opet kontroliše SCN) takođe je značajan zajtgeber za mnoga periferna tkiva, kao što su jetra, pankreas, bubrezi, srce i skeletni mišići (Dibner i sar., 2010). Veliku ulogu u resetovanju perifernih časovnika ima i telesna temperatura, koja je direktno, ali i indirektno, preko aktivnosti, regulisana preko SCN (Dibner i sar., 2010) (Sl. 2.2).

2.1.2.4. Oscilatori nezavisni od SCN

Iako je uloga SCN u održavanju cirkadijalnog ritma nesporna, u novije vreme su sve češće polemike o njegovoj superiornoj poziciji u odnosu na periferne oscilatore. U prilog ovome ide pronalazak časovnika koji ne zavise od SCN, kao što je MASCO (*engl. methamphetamine-sensitive circadian oscillator*). Naime, pokazano je da metamfentamin pokreće ritmove u aktivnosti kod pacova sa lezijom SCN (Honma i sar., 1987) kao i kod *Cry1/Cry2* mutantnih miševa koji su aritmični u konstantnom mraku (Honma i sar., 2008) sugerišući da postoji oscilator nezavisan od SCN i osetljiv na metamfentamin.

Drugi primer predstavlja FEO (*engl. food-entrainable oscillator*). Naime, kada se dostupnost hrane svede na samo nekoliko sati tokom svakog dana, sisari brzo menjaju dnevne ritmove u ponašanju i fiziologiji (npr. lokomotorna aktivnost, telesna temperatura i sekrecija kortikosterona) da bi se uskladili sa dostupnošću hrane. Životinje postaju najaktivnije neposredno pred vreme kad im hrana postaje dostupna i ova aktivnost je označena kao FAA (*engl. food-anticipatory activity*). FAA se javlja i kod životinja sa lezijom SCN, što ukazuje da je FEO još jedan oscilator koji može da radi nezavisno od SCN (detaljnije u Dibner i sar., 2010).

Uticao svetlost na SCN, pa time i na mnoge cirkadijalne ritmove, dobro je poznat. Ipak, izgleda da svetlost preko oscilatora u retini može da resetuje neke periferne oscilatore zaobilazeći SCN. U eksperimentima sa životinjama kod kojih je genetičkim manipulacijama narušena funkcija SCN časovnika svetlost je uspela da pokrene eksprimiranje *Per2* gena u ispitivanim perifernim tkivima (Husse i sar., 2015). Ovo ukazuje da u uslovima svetlo/mrak SCN nije neophodan za resetovanje perifernih oscilatora. Ipak, indukcija eksprimiranja *Per2* desila se mnogo brže nego kod životinja sa funkcionalnim SCN časovnikom što ukazuje da on ima bitnu ulogu u stabilizaciji rada perifernih časovnika. Takođe, uloga SCN u sinhronizaciji izuzetno je važna u odsustvu spoljašnjih signala, kao i u slučaju nelogičnog preplitanja više signala, npr. džetleg (Husse i sar., 2015). Sumarno, veliki broj istraživanja iz hronobiologije upotpunio je ranije mišljenje po kom je postojala jasna hijerarhija na čijem je vrhu bio SCN, a svi ostali oscilatori jasno zavisni od njega. Sada to više liči na mrežu u kojoj mnogo faktora, sa manjim ili većim

uticajem (SCN verovatno najvećim), i uz međusobnu saradnju, uspeva da vremenski koordiniše fiziološke i metaboličke procese međusobno, ali i sa spoljašnjom sredinom.

2.1.3. Molekularni časovnik

Svaka ćelija u organizmu sisara sadrži elemente biološkog časovnika (*engl. clock genes*). Ovi geni putem negativnih povratnih sprega regulišu sopstveno eksprimiranje tako da jedan takav ciklus traje oko 24h. Ritam eksprimiranja ovih gena je endogeno generisan tj. nije pokrenut spoljašnjim faktorima iako oni imaju važnu ulogu u sinhronizaciji rada pojedinačnih ćelija u organu ili organa u organizmu. Molekularni časovnik sisara se sastoji iz primarne petlje koju čine osnovni geni časovnika (*engl. core clock genes, CCG*) i dodatnih, regulatornih petlji, što sve ukupno daje kompleksnu mrežu negativnih povratnih sprega. Dostupnost i aktivnost proteina časovnika regulišu se i na posttranskripcionom i posttranslacionom nivou (detaljno opisano u Harms i sar., 2004; Gallego i Virshup, 2007).

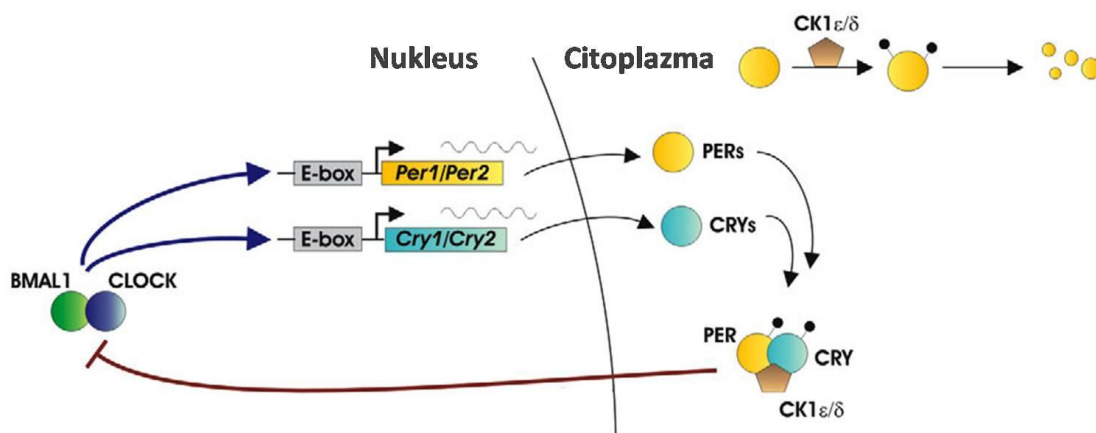
2.1.3.1. Primarna petlja

Primarnu petlju (Sl. 2.3) čini osnovna transkripciono-translaciona negativna povratna sprega odgovorna za održavanje sisarskog cirkadijalnog oscilatora. Glavni pozitivni regulatori ove petlje su CLOCK i BMAL1, članovi bHLH-PAS (*engl. basic helix-loop-helix – Period-Arnt-Sim*) familije transkripcionih faktora. Ovi proteini grade heterodimer i vezuju se za E-box (CACGTG), cis-regulatornu sekvencu prisutnu u promotoru velikog broja ciljnih gena, aktivirajući tako njihovu transkripciju⁸ (Ripperger i sar., 2000; Travnickova-Bendova i sar., 2002; Yoo i sar., 2005). Krucijalna uloga BMAL1 proteina kao pozitivnog regulatora dokazana je i

⁸ CLOCK poseduje i domen sa aktivnošću histon acetiltrasferaze što mu omogućava da svoju regulatornu ulogu obavlja i remodelovanjem hromatina (Doi i sar., 2006). Pored sopstvene HAT aktivnosti CLOCK-BMAL1 dimer gradi komplekse i sa drugim proteinima koji učestvuju u remodelovanju hromatina. Jedan od njih je i JARID1a, histon lizin demetilaza koja pojačava aktivnost CLOCK-BMAL1 dimera, a posebno je značajna za aktivaciju ekspresije *Per* gena (DiTacchio i sar., 2011).

eksperimentalno pošto je cirkadijalna ritmičnost u konstantnom mraku i ritmično ekspimiranje ciljnih gena ukinuto kod *Bmal1* KO životinja (Bunger i sar., 2000). Sa druge strane, iako *Clock*^{Δ19} mutant pokazuje smanjenu transkripciju ciljnih gena (Oishi i sar., 2000), gubitak ovog gena ne vodi gubitku bihevioralnih ritmova u konstantnom mraku (DeBruyne i sar., 2006). Ustanovljeno je da NPAS2, paralog CLOCK proteina, takođe može da gradi dimer sa BMAL1 i aktivira ekspimiranje ciljnih gena, zamenjujući tako funkciju CLOCK proteina. Tek gubitak oba proteina (*Clock*^{-/-}/*Npas2*^{-/-}) vodi aritmiji u ponašanju u konstantnom mraku (DeBruyne i sar., 2007).

Pozitivni regulatori aktiviraju ekspimiranje velikog broja gena među kojima su i negativni regulatori primarne petlje, *Period* (*Per1*, *Per2*) i *Cryptochrome* (*Cry1*, *Cry2*) geni. PER i CRY proteini formiraju komplekse u citoplazmi koji se sa kašnjenjem od nekoliko sati translociraju u nukleus i inhibiraju transkripciju gena pokrenutih CLOCK/BMAL1. Na ovaj način PER/CRY inhibiraju i sopstvenu transkripciju zatvarajući tako primarnu transkripciono-translacionu negativnu povratnu spregu. Iako precizna organizacija nije do kraja jasna, pokazano je da se ovaj složeni represivni kompleks sastoji od PER, CRY, CK1ε (*engl. Casein kinase 1ε*), BMAL1 i CLOCK proteina (Lee i sar., 2001). Nakon degradacije negativnih elemenata primarne petlje u proteazomima, što se opet dešava sa zaostatkom od nekoliko sati, a regulisano je posttranslacionim modifikacijama, inhibicija se ukida i ciklus počinje ispočetka (Ko i Takahashi, 2006).



Slika 2.3 Primarna petlja molekularnog časovnika, preuzeto uz izmenu iz Ko i Takahashi, 2006

Iako sva tri *Perioda* pokazuju snažnu ritmičnost na nivou iRNK i proteina, *Per3* se ne smatra neophodnim za održavanje cirkadijalnog časovnika i ukidanje ovog gena nema značajne posledice po cirkadijalni fenotip (Shearman i sar., 2000). Sa druge strane, *Per1* i *Per2* su neophodni za normalno funkcionisanje časovnika. Mišiji *Per1* i *Per2* mutanti pokazuju značajno kraći period aktivnosti u konstantnom mraku (*Per1^{Brdm1}* – 23.5h i *Per2^{Brdm1}* – 22.1h, uz smanjenu preciznost i stabilnost), dok KO miševi za oba gena postaju momentalno aritmičnog fenotipa u konstantnom mraku (Ko i Takahashi, 2006). Gubitak *Cry1* gena kod miša skraćuje „free-running“ period (22.51 h) dok je u slučaju gubitka *Cry2* on jasno produžen (24.63 h) (van der Horst i sar., 1999). Dupli mutanti *Cry1^{-/-}/Cry2^{-/-}*, kao i *Per1^{-/-}/Per2^{-/-}*, gube ritmičnost u konstantnom mraku (Ko i Takahashi, 2006).

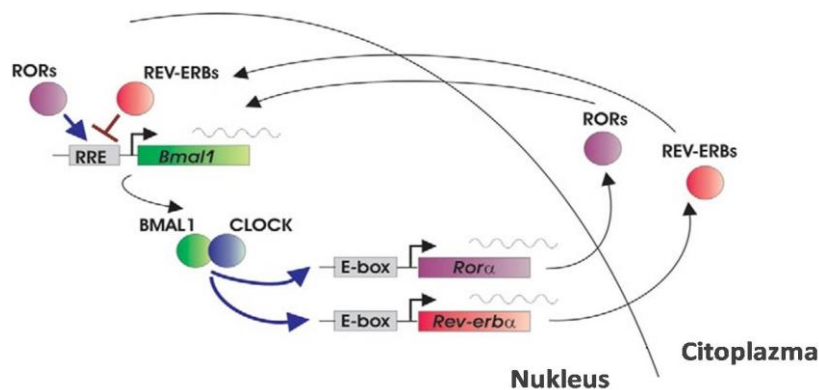
Pored pomenutih, postoji veliki broj drugih gena koji imaju veći ili manji uticaj na osobine molekularnog biološkog časovnika. CK1 ϵ i CK1 δ su izuzetno važni regulatori dužine cirkadijalnog perioda. Naime, CK1 ϵ/δ se vezuju za PER proteine i fosforilišu ih⁹. Ova fosforilacija vodi promeni konformacije PER proteina, maskira se NLS (*engl. nuclear localization signal*) i formiraju se vezna mesta za β TrCP (*engl. β -transducin repeat-containing protein*), što dalje vodi ubikvitinaciji i degradaciji u proteazomima (Gallego i Virshup, 2007).

Vezivanje CRY proteina za ovaj kompleks sprečava degradaciju i omogućava prenos novog kompleksa (CRY/PER/CK1 ϵ/δ) u nukleus gde on blokira transkripciju gena pokrenutu CLOCK/BMAL1 (Knippschild i sar., 2005). Gubitak CK1 ϵ/δ rezultovaće mnogo bržim nakupljanjem PER u citoplazmi (pošto izostaje degradacija), odnosno skraćanjem dužine jednog ciklusa. Kod pomenutog *tau* hrčka (mutiran je gen za CK1 ϵ) free running period je skraćen za oko 4 sata (Loudon i sar., 2007). Kazein kinaze mogu da fosforilišu i druge proteine biološkog časovnika, kao što su to CLOCK i BMAL1, i tako utiču na njihovu aktivnost.

⁹ Pored CK1, u regulaciju biološkog časovnika su uključene i druge kinaze kao što su CK2, GSK3, PRKA, PRKG, MAPK (Gallego i Virshup, 2007).

2.1.3.2. Sekundarna petlja

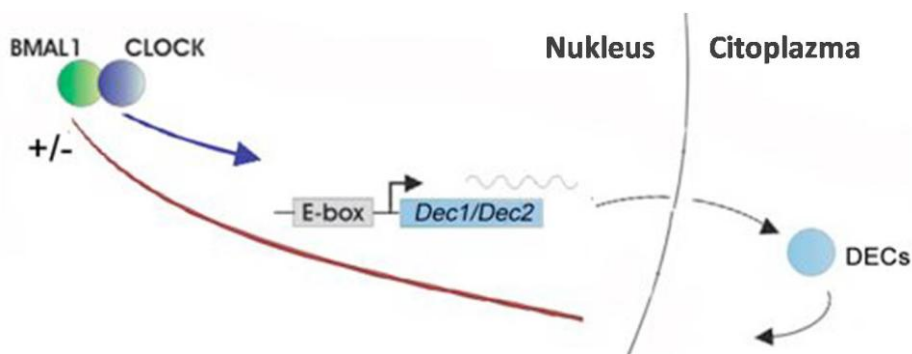
Pored pomenutih proteina, određeni nuklearni receptori takođe imaju važno mesto u održavanju biološkog časovnika ali i cirkadijalnoj regulaciji drugih gena. *Rev-Erb α/β* i *Rora $\alpha/\beta/\gamma$* su nuklearni receptori čija je transkripcija pokrenuta kompleksom CLOCK-BMAL1. REV-ERB α se ritmično nakuplja u nukleusu i utištava eksprimiranje *Clock* i *Bmal1*, ali i mnogih drugih ciljnih gena. Negativna regulacija koju ostvaruje REV-ERB α na transkripciju ovih gena balansira se nuklearnim receptorima ROR (engl. *retinoic acid related orphan receptor*, NR1F) familije koji ostvaruju svoju funkciju kao pozitivni regulatori (Akashi i Takumi, 2005). I REV-ERB i ROR proteini prepoznaju istu DNK motiv sekvencu nazvanu RORE (engl. *retinoic acid related orphan receptor response element*) ali se smatra da imaju različite uloge. Uloga ROR proteina je da održava određeni nivo eksprimiranosti *Bmal1* bez velikog uticaja na cirkadijalni ritam transkripcije. Sa druge strane, REV-ERB proteini su zaduženi za definisanje ritmičnosti eksprimiranja *Bmal1*, ritmičnim utišavanjem transkripcije ovog gena (Ko i Takahashi, 2006). Uzajamna regulacija CLOCK, BMAL1 sa jedne i REV-ERB i ROR proteina sa druge strane naziva se sekundarnom ili pomoćnom petljom (engl. *auxiliary loop*) (Sl. 2.4). Iako je eksprimiranost *Clock* i *Bmal1* gena u SCN i jetri *Rev-Erb α ^{-/-}* miševa konstantno visoka, „free-running“ period kod ovakvih životinja nije značajno promenjen (Preinter i sar., 2002). Iz ovog razloga sekundarna petlja se ne smatra neophodnom, ali svakako dodatno stabilise i koordinise cirkadijalne ritmove *in vivo* i može biti značajna za ritmično eksprimiranje gena regulisanih biološkim časovnikom.



Slika 2.4 Sekundarna petlja molekularnog časovnika, preuzeto uz izmenu iz Ko i Takahashi, 2006

2.1.3.3. DEC petlja

Dec1 i *Dec2* (engl. *Differentiated embryo chondrocyte 1/2*) geni kodiraju proteine koji pripadaju bHLH familiji transkripcionih faktora i ritmično su eksprimirani u SCN i perifernim tkivima (Honma i sar., 2002). Njihova transkripcija je pozitivno regulisana CLOCK/BMAL1 dimerom preko E-box sekvence koju sadrže u svom promotoru. Oba DEC proteina mogu da inhibišu transkripciju pokrenutu CLOCK/BMAL1 dimerom (Sl. 2.5), najverovatine kompeticijom sa ovim proteinima za E-box (Honma i sar., 2002). Pored ovoga, DEC1 i DEC2 mogu svoje efekte da ostvare i preko protein-protein interakcija koje ostvaruju sa transkripcionim faktorima, kao što su HIF-1 α , RXR α , MyoD i STAT (Kato i sar., 2014). Eksperimenti pokazuju da DEC1 ima snažan efekat na transkripciju koju CLOCK/BMAL1 pokreće preko E-box sekvence (5'-CACGTG-3') i tako može da reguliše fazu eksprimiranja gena kao što su *Per1*, *Rev-erba* i *Dbp* (engl. *albumin D-element binding protein*), ali ima slabiji uticaj na gene koji u svom promotoru poseduju E'-box (5'-CACGTT-3'), kao što su *Per2* i *Cry1* (Nakashima i sar., 2008). Pojedinačni mutanti *Dec1*^{-/-} i *Dec2*^{-/-} ne pokazuju značajne promene u ritmu aktivnosti međutim dupli *Dec1/Dec2* KO mutant ima značajno duži period aktivnosti (Rossner i sar., 2008; Nakashima i sar., 2008) što ukazuje da ovi proteini imaju ulogu negativnog regulatora u održavanju rada molekularnog biološkog časovnika. Ipak rad Rossner i saradnika (2008) dopunjuje ovo zapažanje pretpostavkom da i DEC1 i DEC2 zapravo mogu funkcionisati i kao represori i kao ko-aktivatori gena biološkog časovnika u zavisnosti od konteksta (Sl. 2.5). Tačna uloga DEC petlje nije do kraja jasna ali ona svakako ima uticaj na finu vremensku regulaciju eksprimiranja gena i dodatno stabilise biološki časovnik sisara.

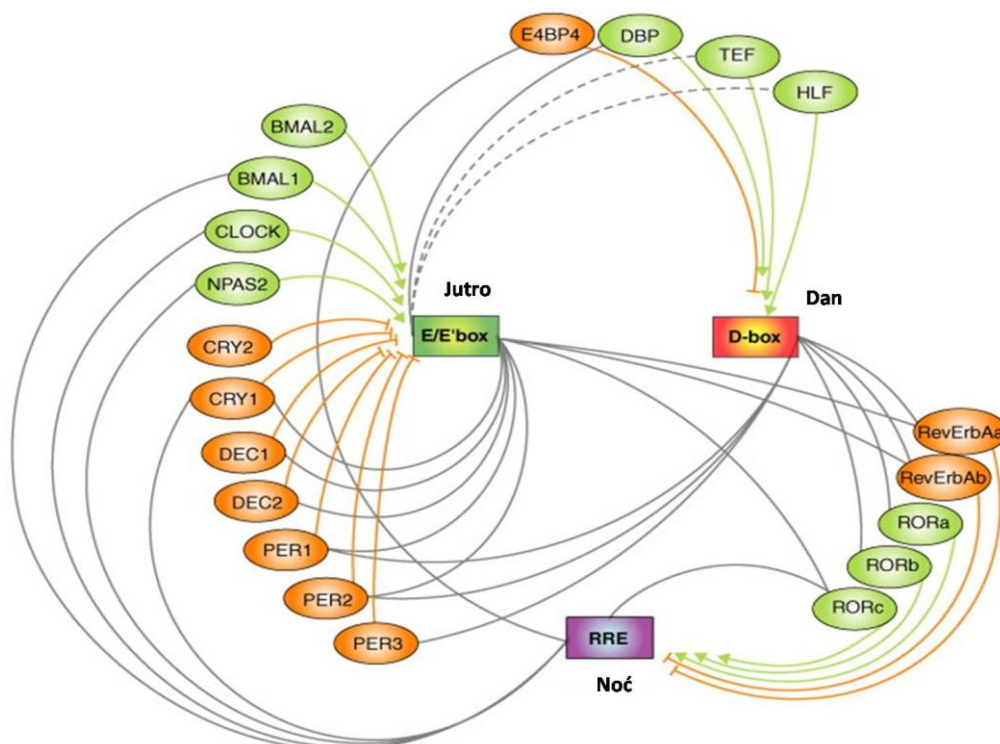


Slika 2.5 Dec petlja molekularnog časovnika, preuzeto uz izmenu iz Ko i Takahashi, 2006.

2.1.4. Geni regulisani časovnikom

Osnovu cirkadijalnih promena u ponašanju, fiziologiji i metabolizmu predstavlja ritmičnost u eksprimiranju gena. Procenjuje se da je ritmično eksprimirano 5-10% svih transkribovanih gena (Miller i sar., 2007). Interesantno, kada se porede ovi geni u različitim tkivima postoje relativno mala preklapanja. Tako je u studiji koju su sproveli Panda i sar. (2002) pokazano da je od 337 ritmičnih transkriptata pronađenih u SCN i 335 u jetri zajedničkih samo 28, a to su bili mahom geni samog časovnika.

Mnogi ciljni geni su direktno regulisani genima časovnika. Primer su geni čija se transkripcija ritmično pokreće BMAL1/CLOCK (BMAL1/NPAS2) kompleksom i ritmično utišava nuklearnim receptorom REV-ERB α . Poređenje transkriptoma jetre i srca WT i *Clock*^{Δ19} miševa pokazalo je značajan pad u amplitudi ritma transkripcije mnogih gena kod *Clock*^{Δ19} miševa (Miller i sar., 2007). Takođe, mikroerej studija na tkivu jetre pokazala je pojačanu transkripciju 76 gena kod *Rev-erba*^{-/-} miševa (Le Martelot i sar., 2009).



Slika 2.6 Pregled transkripcione mreže biološkog časovnika kod sisara. Transkripciono-translaciono eksprimiranje je prikazano sivim, aktivacija zelenim, a represija narandžastim linijama, preuzeto uz izmenu iz Susaki i sar., 2010.

Ritmična eksprimiranost ciljnih gena može biti ostvarena i preko ritmično eksprimiranih transkripcionih faktora kao intermedijerima. Uzimajući u obzir različit udeo gena časovnika u specifičnim ćelijama, specifične regulatorne intermedijere pa i kaskade ovih regulatora dobija se komplikovana struktura čije su prednosti amplifikacija ritmičnog izlaza (*engl. clock output*), tkivno-specifična eksprimiranost ciljnih gena, kao i transkripcija ciljnih gena u različitim fazama dnevnog ciklusa.

Faza cirkadijalne transkripcije gena uključenih u razne ćelijske procese najčešće se ostvaruje preko tri regulatorne sekvence: **E/E'-box** (jutro), **D-box** (dan) i **RRE** (noć) (Sl. 2.6). Transkripcija posredovana preko E-box sekvence, CACGT[G/T], uključuje aktivatore BMAL1/2, 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, aktivatore ROR $\alpha/\beta/\gamma$ i represore Rev-Erb α/β (Susaki i sar., 2010).

2.2. Endokrina funkcija testisa

Testisi predstavljaju organ sa dvojakom funkcijom, egzokrinom – produkcija muških polnih ćelija (spermatozoida) i endokrinom – produkcija muških polnih hormona (androgena). Ovde će biti više reci o endokrinoj funkciji testisa.

2.2.1. Steroidogeneza u Lajdigovim ćelijama

Lajdigove ćelije se nalaze u intersticijumu testisa i predstavljaju glavno mesto produkcije muških polnih hormona – androgena. Ovaj proces se naziva testikularna steroidogeneza. Najdominantniji androgeni su testosteron i dihidrotestosteron (DHT) i imaju brojne uloge u organizmu: promovisanje seksualne diferencijacije fetusa, razvoj i sazrevanje primarnih i sekundarnih karakteristika u pubertetu, regulacija spermatogeneze i reproduktivne funkcije adulta. Pored ovoga androgeni imaju funkciju i u održavanju homeostaze

organizma preko delovanja na veliki broj nereproduktivnih procesa/sistema kao što su imuni, kardiovaskularni i centralni nervni sistem, metabolizam, rast kostiju, povećanje mišićne mase itd. (Payne i Hardy, 2007).

U daljem tekstu biće opisani izvori holesterola, prekursornog molekula za produkciju testosterona, njegov transport do mitohondrija (mesto početka steroidogeneze), kao i sama steroidogeneza u Lajdigovim ćelijama.

2.2.1.1. Izvori holesterola

Postoje četiri potencijalna izvora holesterola za steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama: *de novo* sinteza, egzogeni holesterol iz lipoproteina, skladišteni holesterol estri i holesterol iz plazma membrane.

Sve ćelije imaju sposobnost da *de novo* sintetišu holesterol, a kod steroidogenih ćelija je to još izraženije. Sinteza holesterola dešava se u endoplazmatičnom retikulumu od acetil koenzima A (acetil CoA) i obuhvata veći broj enzimskih reakcija (Payne i Hardy, 2007). Ključan korak u sintezi holesterola je prevođenje HMG-CoA u mevalonat posredstvom enzima HMG-CoA reduktaza (Hampton, 2002). Mnogi regulatorni mehanizmi ostvaruju svoj efekat na sintezu holesterola baš preko nivoa ekspresiranosti i aktivnosti ovog enzima (Hampton, 2002). *De novo* sintetisan holesterol može biti odmah iskorišćen za sintezu hormona (ili neki drugi proces) ili skladišten kao slobodni holesterol u membranama ili kao holesterol estar u lipidnim kapima. Iako je *de novo* sintetisan holesterol odmah dostupan za produkciju steroidnih hormona, količina ovako nastalog holesterola nije dovoljna pa ćelije moraju da obezbeđuju holesterol i iz spoljašnje sredine (Payne i Hardy, 2007).

Jedan od načina unošenja holesterola u ćeliju iz spoljašnje sredine je endocitozom preko LDL (*engl. low-density lipoprotein*) receptora (neselektivni put) (Brown i Goldstein, 1986). Ovaj receptor specifično vezuje apoB 100 (LDL) i apoE lipoproteine, nakon čega ceo kompleks biva obuhvaćen vezikulom i interalizovan postredstvom tirozinskog motiva (NPXY) na citoplazmatskom kraju receptora (Chen i sar., 1990). Posle endocitoze, kompleks lipoprotein (apoB/E) – receptor ulazi u endozomski/lizozomski sistem, gde, usled pada pH u endozomu, dolazi do

odvajanja receptora koji se vraća na površinu ćelije. Komponente lipoproteina se fuzionišu sa lizozomom i degradiraju kiselim lipazama i proteazama. Slobodan holesterol, nastao hidrolizom holesteril estara, ulazi u citoplazmu gde može biti iskorišćen za produkciju steroida (Payne i Hardy, 2007).

Steroidogena tkiva, kao i jetra, snabdevaju se holesterolom i iz lipoproteina velike gustine (HDL) procesom označenim kao put selektivnog unosa holesterola (*engl. "selective" cholesterol uptake pathway*). Ovo je glavni put dopremanja holesterol estara do steroidogenih tkiva kod glodara i čoveka i, za razliku od endocitotskog LDLR puta, HDL-CEs se unose bez pratnje receptora i ne dolazi do degradacije cele HDL partikule. Za unos HDL-CE odgovoran je SR-BI (*engl. Scavenger receptor class B, type-I*) receptor, koji je najčešće visoko eksprimiran u steroidogenim tkivima (Azhar i Reaven, 2002; Azhar i sar., 2003). Holesterol, unet u ćeliju na ovaj način, prevodi se do slobodnog aktivnošću hormon senzitivne lipaze – HSL (*engl. hormon-senzitivne lipase*) (Rone i sar., 2009).

Još jedan izvor holesterola za sintezu steroida u Lajdigovim ćelijama su holesterol estri skladišteni u lipidnim kapima. Bilo da je holesterol sintetisan *de novo* ili da je preuzet iz egzogenih lipoproteina, steroidogene ćelije nastoje da deo holesterola sačuvaju u njenoj esterifikovanoj formi (holesterol estri, CE) u lipidnim kapima kao rezervu koja može biti kasnije upotrebljena za sintezu i održavanje membrana, ali i kao supstrat za sintezu steroidnih hormona pri akutnoj stimulaciji (Payne i Hardy, 2007). Holesterol estri nastaju 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 SR-BI receptora, da bi bio iskorišćen, holesterol mora prvobitno biti preveden do slobodnog aktivnošću HSL enzima (Rone i sar., 2009).

Kod sisara, veliki procenat slobodnog holesterola je lokalizovan u plazma membrani, ipak, u kojoj meri se ovaj holesterol koristi za produkciju testosterona u Lajdigovim ćelijama nije poznato.

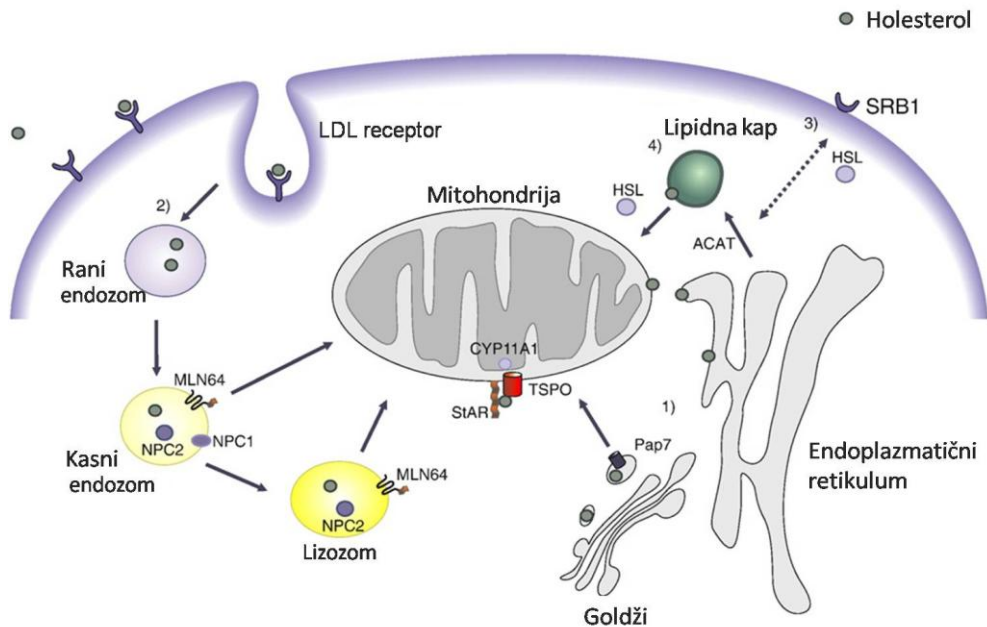
2.2.1.2. Transport holesterola do unutrašnje mitohondrijalne membrane

Da bi steroidogeneza započela holesterol mora biti prenet do unutrašnje mitohondrijalne membrane gde se nalazi enzim CYP11A1 (poznat i kao P450_{sc}, *engl. cytochrome p450 side chain cleavage*), odgovoran za prevođenje holesterola do pregnenolona. Ovaj transfer se može grubo podeliti u dva odvojena, ali jednako važna koraka: (a) mobilizacija intracelularnog holesterola i njegov transport do spoljašnje mitohondrijalne membrane (*engl. outer mitochondrial membrane - OMM*) i (b) translokacija holesterola sa spoljašnje do unutrašnje mitohondrijalne membrane (*engl. inner mitochondrial membrane - IMM*), gde se nalazi enzim CYP11A1.

Tačni mehanizmi kojima se intracelularni holesterol transportuje do mitohondrija nisu do kraja razjašnjeni, ali smatra se da uključuju sledeće puteve (Sl. 2.7): 1) holesterol koji se sintetisao u ER prenosi se do Goldžijevog aparata odakle može biti usmeren ka mitohondrijama posredstvom PAP7 proteina. Pasivna difuzija je još jedan mogući način na koji bi holesterol mogao stići od ER do mitohondrija; 2) holesterol u okviru LDL, nakon vezivanja za LDL receptor, putuje do mitohondrija endozomalnim putem (vezikularni transport). Protein MLN64 (*engl. metastatic lymph node 64*, poznat i kao STARD3, *engl. StAR-related lipid transfer domain protein 3*) pomaže transfer holesterola od kasnog endozoma ili lizozoma do mitohondrija. Proteini NCP1 (*engl. Niemann-Pick disease, type C1*) i NCP2, zajedno sa MLN64, takođe imaju ulogu u transferu holesterola iz lizozoma; 3) transport slobodnog holesterola, dobijenog iz HDL ili iz lipidnih kapi, posredstvom HSL enzima, zahteva prisustvo proteinskih nosača (detaljnije u Rone i sar., 2009; Miller i Bose, 2011; Miller, 2013).

Transport holesterola sa spoljašnje do unutrašnje mitohondrijalne membrane predstavlja jedan od najvažnijih koraka u produkciji testosterona. Ovo je mesto na kom se ukrštaju mnogi regulatorni mehanizmi (Hauet i sar., 2002; Manna i sar., 2007; Tremblay, 2015) i sama dostupnost holesterola CYP11A1 enzimu (pre nego aktivnost samog enzima) predstavlja limitirajući korak (*engl. rate-limiting step*) u produkciji steroidnih hormona. Za prenos holesterola od

spoljašnje mitohondrijalne membrane do CYP11A1 enzima, sa kojim počinje steroidogeneza, zadužena je kompleksna proteinska mašinerija koju čine transduceozom i steroidogeni metabolon (Sl. 2.8) (Rone i sar., 2009; Midzak i sar., 2011, Lssop, 2013).



Slika 2.7. Transport holesterola do mitohondrija. Preuzeto uz izmenu iz Rone i sar., 2009

Kao odgovor na stimulaciju hormonom, kopleks spoljašnje mitohondrijalne membrane, koga čine TSPO (*engl. translocator protein 18 kDa*) i VDAC1 (*engl. voltage-dependent anion channel 1*), regrutuje ACBD3 (*engl. TSPO-associated acyl-coenzyme A binding domain containing 3*; poznat i kao PAP7), što dalje vodi regrutaciji PRKA-R1 α (*engl. protein kinase A regulatory subunit R1 α*). Prisustvo hormona indukuje i StAR protein (*engl. steroidogenic acute regulatory protein*), koji sadrži mitohondrijalnu signalnu sekvencu i nakuplja se na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani. StAR interaguje sa VDAC i biva lokalno fosforilisan od strane PRKA, što vodi njegovoj maksimalnoj aktivnosti. Kompleks gore navedenih proteina nazvan je transduceozom (*engl. transduceosome*) pošto prenosi (*engl. transduce*) cAMP signal direktno do spoljašnje mitohondrijalne membrane. TSPO i VDCA, zajedno sa proteinima unutrašnje membrane, ATAD3 (*engl. ATPase family AAA Domain-containing protein 3*) i CYP11A1, deo su 800 kDa velikog kopleksa koji je nazvan metabolon, a ima za cilj dovođenje holesterola direktno do CYP11A1 gde

steroidogeneza počinje (Lssop i sar., 2013). U ovom delu biće nešto više rečeno o STAR proteinu (detaljnije o ostalim proteinima ovog kompleksa u Rone i sar., 2009; Midzak i sar., 2011; Lssop i sar., 2013).

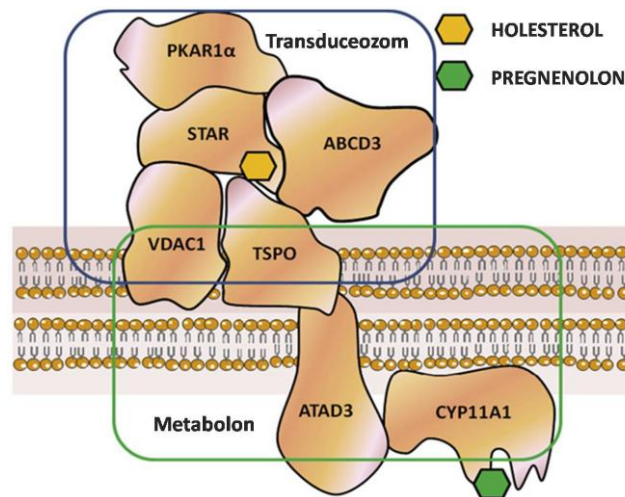


Fig. 2.8. Transduceozom kompleks i steroidogeni metabolon. Preuzeto uz izmenu iz Lssop i sar., 2013

Uloga StAR proteina u produkciji steroidnih hormona je višestruko potvrđena (Stocco i sar., 2005; Papadopulos i sar., 2012; Miller, 2013) iako sam mehanizam još uvek nije jasan. StAR je protein od 37 kDa sa mitohondrijalnom signalnom sekvencom na N-terminalnom kraju. Ova sekvenca se odseca tokom importa u mitohondrije dajući 30 kDa StAR. Iako se 30 kDa forma StAR naziva zreloom samo sečenje dela molekula ne menja aktivnost samog proteina (obe forme su jednako aktivne *in vivo* i *in vitro*) (Miller, 2013). Ono što utiče na aktivnost proteina je zapravo njegova lokalizacija; StAR je aktivan samo ukoliko je lokalizovan u OMM i u okviru transduceozom kompleksa. Ovde se dešavaju i konformacione promene indukovane promenom pH koje omogućavaju prihvatanje i prenos holesterola do IMM (Midzak i sar., 2011). Na aktivnost StAR proteina značajno utiče i fosforilacija na poziciji Ser195 za koju je odgovorna protein kinaza A tip II (sadrži regulatornu subjedinicu A tip II, PRKAR2A). Sa druge strane protein kinaza A tip I ima ulogu u pokretanju transkripcije Star gena (Miller, 2013). Ipak hormonski izazvana aktivnost StAR proteina, nakon njegovog ulaska u OMM, se vremenom smanjuje. Polu život ovog proteina se procenjuje na 4 do 5 sati, a za

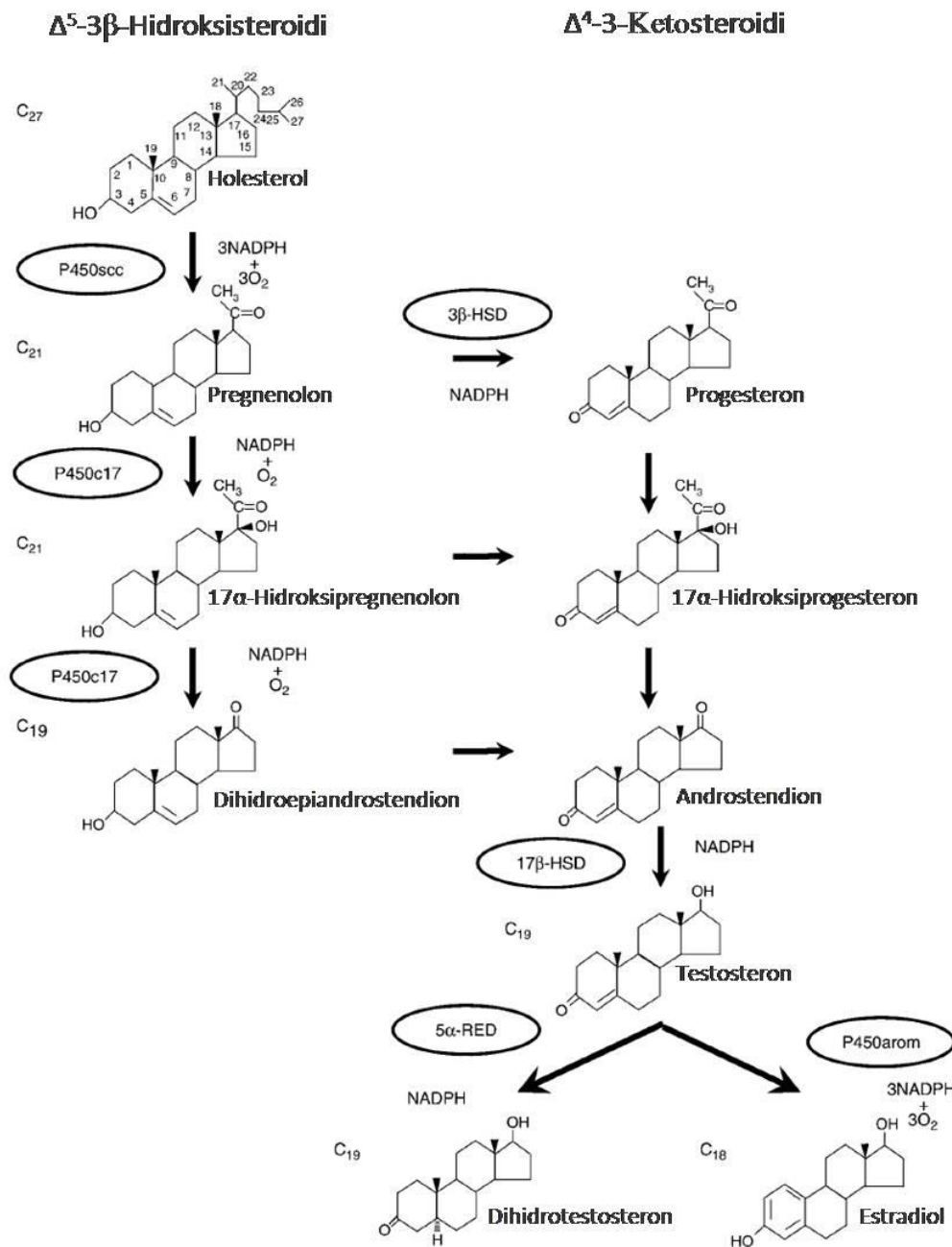
degradaciju, pa time i regulaciju njegove aktivnosti, je zadužena Lon proteaza (Granot i sar., 2003; 2007).

Iako je sinteza steroidnih hormona moguća i bez StAR proteina (primer je placenta gde se Star ne eksprimira), mutacija u ovom genu dovodi do letalne forme kongenitalne adrenalne hiperplazije (CAH) gde je produkcija steroidnih hormona vrlo niska (Papadopulos i sar., 2012). StAR predstavlja i jedno od ključnih mesta regulacije procesa steroidogeneze, što će biti opisano u kasnijem tekstu.

2.2.1.3. Konverzija holesterola u testosteron

Nakon dopremanja holesterola do unutrašnje mitohondrijalne membrane počinje njegova konverzija do testosterona (Sl. 2.9). Ova konverzija odvija se kroz niz hemijskih reakcija i uključuje prisustvo nekoliko enzima koji pripadaju familijama citohrom P450 (CYP11A1, CYP17A1) i hidroksisteroid dehidrogenaza (HSD3B, HSD17B) (Payne i Hales 2004; Payne i Hardy, 2007; Lavoie i King 2009; King i Lavoie, 2012).

Početni korak u biosintezi testosterona od holesterola je konverzija C27 holesterola u C21 steroid – pregnenolon. Ova konverzija se odvija kroz tri oksidacione reakcije gde je za svaku potreban jedan molekul O₂ i jedan molekul NADPH. Prvo dolazi do hidroksilacije holesterola na C22, a zatim i na C20 pri čemu nastaje 20,22R-hidroksiholesterol. U trećoj reakciji dolazi do prekida veze između C22 i C20 i nastanka pregnenolona i izokaproaldedhida. Sve tri reakcije su katalizovane enzimom CYP11A1 koji je smešten na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani. Nastali pregnenolon difunduje kroz mitohondrijalnu membranu do glatkog endoplazmatičnog retikuluma gde dolazi do konverzije C21 steroida u C19 steroid (pregnenolona u dehidroepiandrosteron ili progesterona u androstendion). Ova konverzija je katalisana enzimom CYP17A1 (P450c17, *engl. P450 17 α -hydroxylase C17-C20 lyase*) i dešava se kroz dve reakcije. U prvoj dolazi do 17 α -hidroksilacije C21 steroida, a u drugoj do prekidanja C17-20 veze i nastanka C19 steroida. Za svaku reakciju su potrebni jedan molekul O₂ i jedan molekul NADPH (Payne i Hardy, 2007).



Slika 2.9 Biosinteza steroida u Lajdigovim ćelijama. Preuzeto uz izmenu iz Payne i Hardy, 2007.

3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza (HSD3B) katališe konverziju Δ^5 steroida u Δ^4 steroide (pregnenolona u progesteron, 17 α -hidroksipregnenolona u 17 α -hidroksiprogesteron, dehidroepiandrosterona u androstendion). Reakcija se odvija u dva koraka: prvi je dehidrogenacija Δ^5 3 β -hidroksisteroida uz učešće koenzima NAD pri čemu nastaje Δ^5 3-keto intermedijer i redukovani NADH, a zatim redukovani koenzim, NADH, izaziva izomerizaciju Δ^5 3-keto steroida do Δ^4 3-keto

steroida. 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza (HSD17B) katališe poslednji korak u biosintezi testosterona, tj. konverziju androstendiona (slab androgen) u testosteron (jak androgen) (Payne i Hardy, 2007).

U zavisnosti od redosleda hemijskih reakcija tokom produkcije testosterona, mogu se izdvojiti dva puta. Δ^5 put testikularne steroidogeneze je dominantan kod čoveka i viših primata. Katalitičkim delovanjem CYP17A1 pregnenolon se hidroksiliše u 17-hidroksipregnenolon, a potom se otcepljuje bočni niz i formira se dehidroepiandrosteron (DHEA). Dehidrogenacija DHEA do androstendiola katalizovana je sa HSD17B, a kao produkt dehidrogenacije i izomerizacije androstendiola uz katalitičko delovanje HSD3B formira se testosteron. Sa druge strane, Δ^4 put testikularne steroidogeneze je dominantan kod pacova. U Lajdigovim ćelijama pacova HSD3B katalizuje konverziju pregnenolona u progesteron, a potom CYP17A1 katalizuje konverziju progesterona u Δ^4 -androstendion. Završni korak na putu biosinteze testosterona: konverzija Δ^4 -androstendiona u testosteron katalizovana je dejstvom enzima HSD17B (Payne i Hales 2004; Payne i Hardy, 2007; Lavoie i King, 2009; King i Lavoie, 2012).

2.2.2. Transport, metabolizam i biološka uloga androgena

Lajdigove ćelije ne mogu da skladište testosteron tako da se on nakon sinteze otpušta u cirkulaciju. Kod muškarca, samo 2% testosterona u cirkulaciji se nalazi u slobodnom obliku dok je ostatak vezan za SHBG (*engl. sex hormone binding globulin*), 44% i albumin, 54% (Dunn i sar., 1981). Iako je afinitet albumina za vezivanje testosterona oko 100 puta manji, u poređenju sa SHBG, on je u cirkulaciji prisutan u mnogo većoj koncentraciji tako da je kapacitet vezivanja ova dva proteina približno isti. Disocijacija testosterona od pomenutih nosača dešava se u krvnim kapilarima ciljnog organa. Postoji nekoliko mehanizama koji omogućavaju testosteronu da uđe u ciljnu ćeliju: a) hormon slobodno difunduje kroz ćelijsku membranu, nakon čega se veže za unutarćelijski receptor, b) endocitoza lipofilnog molekula posredstvom receptora. LDL se veže za svoj receptor, biva uvučen i degradiran u lizozomu, nakon čega oslobođen steroidni hormon aktivira određeni metabolički put, c) endocitoza steroida posredstvom receptora. Steroidni hormon

zajedno sa nosačem biva internalizovan posredstvom importer proteina koji se zove megalin (član LDL receptor superfamilije, prisutan na površini ciljnih tkiva za polne hormone). Nakon unutarćelijske degradacije nosača, hormon postaje slobodan d) transport hormona kroz membranu preko receptora koji prepoznaje nosač i zadržava ga van ćelije dok ligand prolazi u ćeliju (Hammes i sar., 2005; Payne i Hardy, 2007; Weinbauer i sar., 2010).

Testosteron svoj efekat ostvaruje vezivanjem za androgen receptor (AR), koji nakon aktivacije putuje u nukleus i reguliše eksprimiranje ciljnih gena. Kod primata, AR nije pronađen samo u mišićima, prostati, seminalnim vezikulama, epididimisu i testisima (organi čija aktivnost zavisi od androgena) već i u skoro svim ostalim tkivima: hipotalamus, hipofiza, bubrezi, srce, pljuvačne žlezde itd., tako da testosteron ostvaruje veliki broj funkcija u raznim delovima organizma.

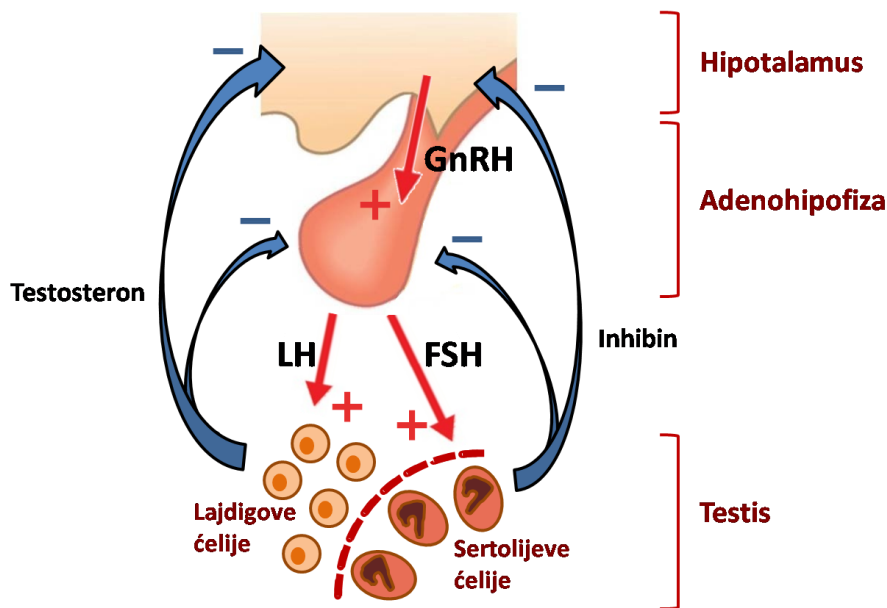
U ciljnim tkivima za androgene (ali i u samom testisu), testosteron može biti preveden u DHT (Sl. 2.9), svoju još potentniju formu (AR ima veći afinitet za DHT). Ovu konverziju katališe enzim 5α -reduktaza. Takođe, testosteron može biti preveden i u estradiol (Sl. 2.9). U ovoj reakciji dolazi do konvertovanja C19 androgena u C18 estrogene (androstendion u estron i testosteron u estradiol) uz učešće CYP19A1 (P450 aromataza) i prisustva tri molekula O_2 i tri molekula NADPH. Ova konverzija naročito je značajna u delovima mozga gde ne postoje receptori za androgene (Payne i Hardy, 2007).

2.2.3. Regulacija steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama

Steroidogeneza u Lajdigovim ćelijama testisa je regulisana koordinisanom aktivnošću nervnih, neuro-endokrinih/endokrinih, parakrinih i autokrinih signalnih mehanizama. Ipak, dominantan način regulacije biosinteze testosterona u Lajdigovim ćelijama predstavlja hipotalamo-hipofizno-testikularna (HPT, *engl. hypothalamo-pituitary-testicular*) osovina (Sl. 2.10).

Funkcionisanje HPT osovine obezbeđuje se toničnom pulsatilnom električnom aktivnošću hipotalamičnih neurona i posledičnom sekrecijom GnRH. Sekrecija GnRH zavisi od aktivacije GPR54 receptora, smeštenog na površini GnRH neurona. Ove receptore aktivira kipeptin, peptid koga eksprimiraju neuroni

smešteni u anteroventral periventralnom nukleusu (AVPV), periventralnom nukleusu, anterodorzalnom preoptičkom nukleusu i arkuatnom nukleusu (ARC). Kao rezultat ove aktivacije i oslobađanja GnRH u portalni krvotok, reguliše se sekrecija oba gonadotropina, luteinizirajućeg (LH) i folikulostimulirajućeg hormona (FSH). Ove hormone u cirkulaciju sekretuju gonadotropne ćelije anteriorne hipofize (adenohipofize), a koji će od njih biti stimulisan zavisi od frekvence oslobađanja GnRH. LH svoju aktivnost ispoljava vezivanjem za LH receptor (LHR, ujedno receptor i za humani horionski gonadotropin, hCG) smešten na membrani Lajdigovih ćelija. Ovo vodi produkciji testosterona koji zajedno sa FSH ima ulogu u regulaciji spermatogeneze preko Sertolijevih ćelija. Testosteron, takođe, preko negativne povratne sprege, reguliše eksprimiranje kispeptina na nivou arkuatnog nukleusa i AVPV, GnRH na nivou hipotalamusa i LH na nivou hipofize (za reference videti Hayes i Crowley, 1998; Yin i Gore, 2006; Payne i Hardy, 2007; Clarke i sar., 2015).



Slika 2.10 Hipotalamo-hipofizno-testikularna osovina

Iako su hormoni HPT osovine glavni regulatori biosinteze testosterona regulacija se ostvaruje i hipotalamo-testikularnim nervnim putem, nezavisnim od hipofize (Selvage i sar., 2004). Ova dva mehanizma dopunjuje i lokalna, autokrina i parakrina, regulacija, koja često zavisi i od HPT osovine. Ćelije u okruženju (makrofazi, peritubularne mioidne ćelije, endotelijalne ćelije, Sertolijeve ćelije,

germinativne ćelije) sekrecijom određenih molekula mogu uticati na funkciju Lajdigovih ćelija. Među ove molekule spadaju faktori rasta (IGF1, TGF- α , TGF- β , EGF, FGF), aktivini i inhibini, citokini (naročito interleukin 1), GnRH, CRF, arginin-vazopresin, oksitocin, angiotenzin II, endoteline i mnogi drugi. Takođe, komunikacija između samih Lajdigovih ćelija je od izuzetnog značaja za njihovo pravilno funkcionisanje (za reference videti rev. radove Saez, 1994; Huhtaniemi i Toppari, 1995; Gnassi i sar., 1997; Huleihel i Lunenfeld, 2004).

Jedan od najznačajnijih lokalnih faktora je svakako azot oksid (NO) koji može biti produkovan od strane makrofaga ili drugih ćelija iz okruženja, ali i samih Lajdigovih ćelija. NO ispoljava dvojne efekte u regulaciji procesa steroidogeneze. Pri višim koncentracijama NO inhibiše steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama direktnom inhibicijom enzima koji u svojoj strukturi sadrže hem (Del Punta i sar., 1996). Manje koncentracije NO stimulišu steroidogenezu aktivacijom cGMP signalnog puta (Valenti i sar., 1999), što vodi aktivaciji protein kinaze G (PRKG) i fosforilaciji StAR proteina (Gambaryan i sar., 2003; Andric i sar., 2007).

2.2.3.1. Signalni putevi uključeni u regulaciju steroidogeneze

Kada se LH veže za svoj receptor, preko G proteina dolazi do aktivacije adenilat ciklaze (ADCY) i produkcije cAMP koji dalje aktivira protein kinazu A (PRKA, PKA) (Smith i Walker, 2015). Vezivanje liganda za LHR vodi i aktivaciji fosfolipaze C (PLC) što preko inozitol 3 fosfata (IP3) aktivira protein kinazu C (PRKC, PKC). Važnu ulogu za prenošenje signala i pokretanje steroidogeneze ima i EGFR, pošto inhibicija EGFR signalnog puta utišava steroidogenezu pokrenutu LH (Jamnongjit i sar., 2005). Pokazano je da produkcija cAMP aktivira EGFR i nizvodnu MAPK kaskadu. U produkciju testosterona uključen je i cGMP-PRKG signalni put za koji se pokazalo da ima dvojakul regulatornu ulogu (Del Punta i sar., 1996; Andric i sar., 2007). Povećanje koncentracije cAMP/cGMP prati i povećanje unutarćelijske koncentracije Ca²⁺ i pokretanje CaMKK (*engl. Ca²⁺/calmodulin kinase kinase*) signalnog puta. Usled pokretanja ovog signalnog puta dolazi do aktivacije kalcijum kalmodulin kinaze I (CAMKI) koja je važna za maksimalan odgovor Lajdigovih ćelija na hormonsku stimulaciju (Tremblay, 2015).

Kao što je pomenuto, aktivacija LHR pokreće veći broj signalnih puteva a kao rezultat toga aktiviraju se mnoge protein kinaze: PRKA, PRKG, PRKC, CAMK, MAPK, ERK itd. Ove protein kinaze mogu dovesti do brzog odgovora, aktivacijom već postojećih steroidogenih elemenata (kao što je fosforilacija StAR proteina) ili preko transkripcionih faktora povećati eksprimiranje gene uključenih u steroidogenezu (među kojima je *Star* jedan od najvažnijih). Ovi transkripcioni faktori se mogu podeliti na one koji su već prisutni u ćeliji i koji se aktiviraju posttranslacionim modifikacijama i one koji se sintetišu *de novo*. Transkripcioni faktori koji su već prisutni u ćeliji su SF1, LRH1, COUP-TFII, GATA4, C/EBPb, SP1, CREB/CREM, cFOS, cJUN, MEF2 (Nishida i sar., 2008; Manna i sar., 2009; Tremblay, 2015). Svi ovi faktori povećavaju eksprimiranje *Star* gena, a time pojačavaju i steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama (Martin i Tremblay, 2010). Za DAX1 i SHP je pokazano da utišavaju eksprimiranje nekoliko steroidogenih gena. Oba ova proteina interaguju sa pozitivnim regulatorima, kao što su SF1, NUR77 i LRH1 sprečavajući njihovu aktivnost (Song i sar., 2004). Slično radi i ARR19, represor koji sprečava interakciju NUR77 i njegovog koaktivatora SRC1 (Qamar i sar., 2010). Pokazano je da u odgovoru na LH/cAMP dolazi do smanjenja eksprimiranja Arr19 gena. Takođe kooperacija između pomenutih transkripcionih faktora značajno utiče na ukupan intenzitet steroidogeneze (Tremblay, 2015).

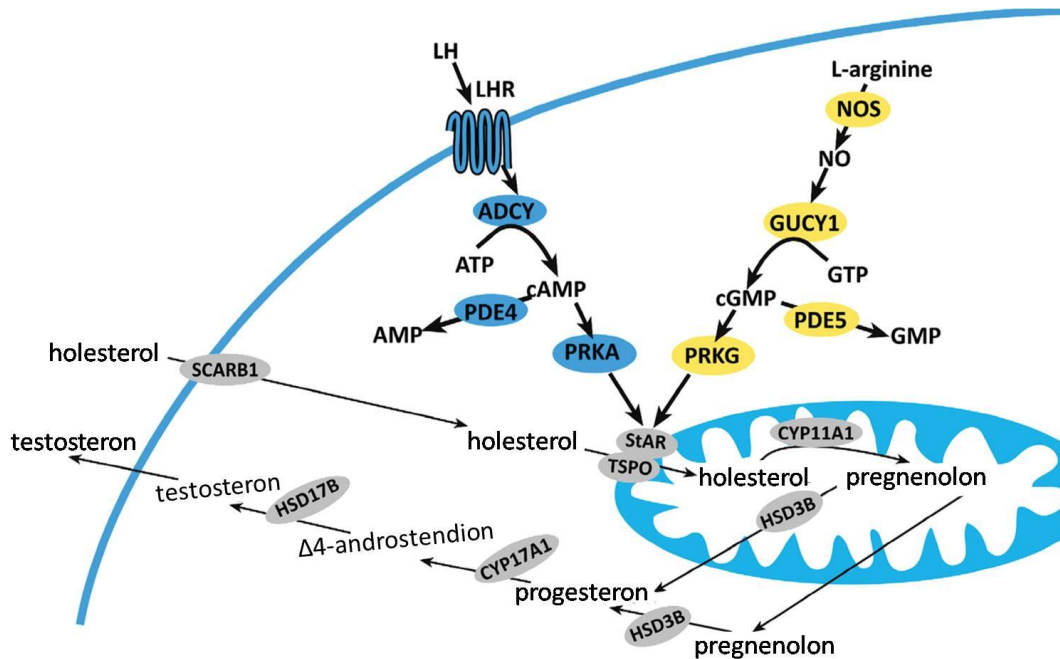
Elementi cAMP-PRKA signalnog puta

cAMP-PRKA signalni put (Sl. 2.11) je jedan od najvažnijih kada je u pitanju aktivacija steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama, a čine ga sledeći elementi:

- enzimi koji katališu konverziju ATP u cAMP – **ADCY** (adenilat ciklaze, AC)
- enzimi koji sprovode signal od cAMP – **PRKA** (protein kinaze A, PKA)
- enzimi koji razgrađuju cAMP i tako prekidaju signalni put – **PDE** (fosfodiesteraze)

Kada se ligandi, koji svoje dejstvo ispoljavaju preko ovog signalnog puta, vežu za svoj receptor, subjediničice G proteina, vezanog za taj receptor, aktiviraju ili inhibiraju adenilat ciklaze, što za posledicu ima promenu u koncentraciji cAMP unutar ćelije. Pored G proteina, na aktivnost ADCY utiču i mnogi drugi faktori,

između ostalih i Ca^{2+} , PRKC i PRKA (Cooper, 2003; Feldman i Gros, 2007). Inhibicija aktivnosti ADCY5 i 6, koja nastaje nakon fosforilacije ovih molekula protein kinazom A, predstavlja vid desenzitivizacije cAMP-PRKA signalnog puta negativnom povratnom spregom (Cooper, 2003). Kod sisara je poznato deset tipova ADCY, devet membranskih (ADCY1-9) i jedna solubilna (ADCY10) (Cooper, 2003; Cooper i Crossthwaite, 2006).



Slika 2.11 cAMP-PRKA i NO-cGMP-PRKG signalni putevi u Lajdigovim ćelijama, elementi cAMP-PRKA signalnog puta – plavo, elementi NO-cGMP-PRKG signalnog puta – žuto, steroidogeni elementi – sivo, Preuzeto uz izmenu iz Stojkov i sar., 2014.

Efektorni molekul ovog signalnog puta je cAMP-zavisna protein kinaza. PRKA je serin/treonin kinaza, koju aktivira cAMP i sastoji se iz dve regulatorne i dve katalitičke subjedinice. Katalitička subjedinica PRKA kodirana je sa dva različita gena pa razlikujemo $C\alpha$ i $C\beta$, dok je regulatorna subjedinica kodirana sa četiri različita gena i razlikujemo $RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$ i $RII\beta$. Na osnovu toga koje izoforme regulatorne subjedinice poseduju, PRKA su grupisane u dve familije: tip I i tip II (Taylor i sar., 2005). Za aktivaciju PRKA holoenzima potrebna su 4 molekula cAMP, dva za svaku regulatornu subjedinicu. Nakon vezivanja cAMP molekula, dolazi do disocijacije katalitičkih subjedinica od regulatornih i one dalje vrše svoju funkciju fosforilacijom serinskih i treoninskih ostataka na specifičnim proteinima.

Na ovaj način se reguliše odvijanje velikog broja ćelijskih procesa, među kojima je i proces steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama, preko aktivacije StAR proteina, ali i pokretanja transkripcije *Star* gena (Lssop i sar., 2013).

Na koncentraciju cAMP, pored ADCY, utiču i PDE, enzimi koji hidrolizuju cAMP i time zaustavljaju ovaj signalni put. Postoji 11 familija PDE (PDE1-11) koje se mogu klasifikovati u tri grupe preme supstratnoj specifičnosti. Tako PDE4, 7 i 8 pripadaju cAMP specifičnim PDE, PDE5, 6 i 9 cGMP specifičnim PDE, dok su PDE1, 2, 3, 10 i 11 dvojno specifične (Bender i Beavo, 2006).

Elementi NO-cGMP-PRKG signalnog puta

NO-cGMP signalni put (Sl. 2.5) reguliše mnoge biološke procese uključujući i steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama (Del Punta i sar., 1996; Andric i sar., 2007). Elementi ovog signalnog puta su:

- enzimi koji generišu NO – **NOS** (azot oksid sintaze)
- enzimi koji funkcionišu kao receptori za NO i katališu konverziju GTP u cGMP – **GUCY1** (guanilil ciklaze, GC)
- enzimi koji sprovode signal od cGMP – **PRKG** (protein kinaze G, PKG)
- enzimi koji razgrađuju cGMP i tako prekidaju signalni put – **PDE**

Azot oksid (NO) je molekul gasa sa poluživotom od svega nekoliko sekundi. Ovaj molekul je prepoznat kao signalni molekul koji učestvuje u regulaciji većeg broja fizioloških procesa. Zbog svoje male molekulske veličine i lipofilne prirode, NO može da difunduje kroz ćelijske membrane i funkcioniše kao intra- i intercelularni glasnik. Endogeni NO nastaje delovanjem enzima, ali postoje i neenzimski izvori NO. Enzimi koji konvertuju L-arginin u L-citrulin, pri čemu nastaje i NO, nazivaju se azot-oksidi sintaze (NOS). Postoje tri različite forme ovog enzima kod sisara: neuralna (nNOS, NOS1), inducibilna (iNOS, NOS2) i endotelijalna (eNOS, NOS3) azot-oksidi sintaza. Identifikovane su kao produkti različitih gena, sa različitom lokalizacijom, regulacijom, katalitičkim svojstvima i osetljivošću na inhibitore. Nastali NO može da se veže za guanilil ciklazu (mada GUCY mogu da aktiviraju i drugi ligandi, Ca²⁺, adeninski nukleotidi i peptidni ligandi), enzim koji katališe konverziju GTP u cGMP. Familiju GUCY čine

membranski-vezane/partikularne izoforme guanilil ciklaze (*engl. membrane-bound GC – mGC, particulate GC – pGC, GUCY2*) i solubilne izoforme guanilil ciklaze (*engl. soluble GC – sGC, GUCY1*).

Nastali cGMP svoje uloge ostvaruje preko cGMP-indukovanih efektornih molekula koje čine cGMP-zavisna protein kinaza i cikličnim nukleotidima-regulisani jonski kanali (CNG). PRKG pripadaju porodici serin/treonin kinaza i prisutne su kod svih eukariota. Sisari imaju dva gena, *Prkg1* i *Prkg2*, koji kodiraju dva tipa PRKG – PRKG1 i PRKG2. Ove kinaze regulišu homeostazu kalcijuma, aktivaciju i adheziju krvnih pločica, kontrakciju glatkih mišića, ekspresiju gena, povratnu spregu na NO signalni put i mnoge druge procese (Francis i sar., 2010). PRKG2 ostvaruje efekat i na steroidogenezu u adrenalnoj žlezdi fosforilacijom StAR proteina na pozicijama Ser55/56 i Ser99 (Gambarayan i sar., 2003). Za uklanjanje cGMP molekula, i zaustavljanje ovog signalnog puta zadužene su cGMP specifične (PDE5, 6 i 9) i dvojno specifične (PDE1, 2, 3, 10, 11) PDE.

2.3. Ritmovi endokrine funkcije testisa

Produkcija androgena u Lajdigovim ćelijama testisa predstavlja primer za sve tri velike grupe ritmova: ultradijalni ritmovi (pulsevi sekrecije androgena), cirkadijalni ritmovi i infradijalni ritmovi (sezonske promene u sekreciji androgena).

2.3.1. Pulsevi sekrecije androgena

Epizodične sekrecije steroidnih hormona u testisu su dobro opisane (Bergendahl i sar., 1996; Bittman, 2016). Uzorkovanje krvi iz gonadalne vene ukazuje na oscilacije u sekreciji androgena sa periodom oko 1h, a ovi pulsevi primećeni su i u jugularnim uzorcima kod ovna i rebus majmuna (Bittman, 2016). Pik testosterona se skoro uvek javlja kratko posle epizode sekrecije LH (Sanford i sar., 1974; Veldhuis i sar., 1987). Kada su merene koncentracije LH i testosterona u cirkulaciji mladih muškaraca u intervalima od po 10 minuta tokom 24 ili 36h uočena je jasna vremenska korelacija po kojoj se pik testosterona javlja 0-45

minuta od pika LH (rast testosterona najčešće počinje posle 20 minuta) (Veldhuis i sar., 1987). Generator ovih pulseva nalazi se u hipotalamusu i preoptičkoj regiji i kontroliše oslobađanje GnRH u hipotalamo-hipofizni portni sistem rezultujući oslobađanjem LH (Bergendahl i sar., 1996). Nakon oslobađanja sledi pad u koncentraciji ovog glikoproteina usled raspada. Imajući ovo u vidu, smatra se da osnova pulsatorne sekrecije androgena pre leži u neuroendokrinnoj regulaciji nego u samom testisu (Bittman, 2016). Oslobađanje hormona HPT osovine u pulsevima izuzetno je važno za fiziološki odgovor. Kao i u slučaju produkcije LH, koja zavisi od pulsatornog obrasca GnRH, odgovor Lajdigovih ćelija na LH se utišava ukoliko je stimulacija konstantna. Smatra se da pulsatorni obrazac LH sprečava desenzitivizaciju i/ili utišavanje signalnih kaskada u Lajdigovim ćelijama pa time i oslobađanje testosterona (Bittman, 2016). Rad ovog pulsatornog generatora može biti poremećen u starenju, stresu, pri izgladnjivanju, metaboličkim ili sistemskim bolestima (Bergendahl i sar., 1996).

2.3.2. Cirkadijalni ritam produkcije androgena

Dnevne oscilacije u produkciji hormona kod sisara su odavno poznate i tu testisi nisu izuzetak. Obično se detektuju 1 – 2 pika u koncentracijskim oscilacijama serumskog testosterona kod laboratorijskih miševa i pacova (Bittman, 2016), međutim literaturni podaci o ovom fenomenu jako variraju, a često su i protivrečni. Tako su, na primer, Keating i Tcholakian (1979) dobili najveći nivo koncentracije testosterona tokom noći, a najmanji u ranim jutarnjim časovima, dok su Thorpe i sar. (2012) dobili suprotan rezultat. Kao dopuna ovome, Waite i sar. (2009) su dobili bimodalan ritam sa jednim dnevnim i jednim noćnim pikom, a Mock i sar. (1978) trimodalan sa pikovima u sredini dana, večernjim časovima i sredini noći. Postoje podaci i da su pikovi testosterona nasumični, tj. da ne prate određeni dnevni ritam ali i u tom slučaju prate oscilacije LH (Kalra i Kalra, 1977). Razlike u samim rezultatima verovatno dolaze kao posledica pulsatorne sekrecije ovog hormona (što ometa merenja u cirkadijanom maniru), ali i različitih animalnih modela, eksperimentalnih uslova, različitih načina uzorkovanja i metoda merenja, velikih individualnih razlika, itd.

Pored razlika koje se uočavaju kod različitih vrsta, na dnevni obrazac sekrecije testosterona utiče i životna dob (amplituda ritma se menja sa starenjem) (Schlatt i sar., 2008; Tenover i Bremner, 1991), fizička aktivnost, način ishrane, stres, metaboličke i sistemske bolesti (Zamuda i sar., 1996; Seidman, 2007; Cano i sar., 2008; Waite i sar., 2009). Takođe, na oscilacije serumskog testosterona može da utiče i ritam vezujućih globulina (Plymate i sar., 1989).

Pitanje da li ovi ritmovi postoje i u konstantnim uslovima nije privuklo veliku pažnju naučnika. Zbog ovoga, i dalje nije ustanovljeno da li je osnova cirkadijalne sekrecije testosterona isključivo vezana za centralni oscilator i ritam LH ili postoji prostor i za, bar modulatornu, ulogu perifernog časovnika u Lajdigovim ćelijama (Bittman, 2016). Generalno, pitanje funkcije časovnika u testisu nije do kraja jasno i ovaj organ se često uzima kao izuzetak od pravila. Naime, za razliku od drugih organa, esprimiranost *Per1* i *Bmal1*, najvažnijih gena časovnika, u testisu nije ritmična (Morse i sar., 2003). Takođe, eksprimiranje *Per1* u germinativnim ćelijama nije promenjeno u *Clock* mutantima, upućujući na to da *Per1* gen nije regulisan CLOCK proteinom (Morse i sar., 2003). Ova, ali i druga istraživanja, koja su obuhvatala veći broj animalnih modela, pokazuju da je eksprimiranje glavnih gena časovnika u testisima pre konstantno nego ritmično (Alvarez i sar., 2003; Bittman i sar., 2003; Fu i sar., 2002; Tong i sar., 2004; Yamamoto i sar., 2004), te da funkcija časovnika u ovom organu odstupa od klasične.

Geni časovnika su izuzetno važni za reproduktivni kapacitet mužjaka. *Bmal1* KO miševi su infertilni, sa značajno ometenim procesom steroidogeneze. Mužjake ovakvih miševa karakteriše veoma nizak nivo testosterona i visok nivo LH, upućujući na defekt u radu Lajdigovih ćelija. Pošto je *Bmal1* ritmično eksprimiran u Lajdigovim ćelijama pretpostavlja se da bi on mogao biti uključen u perifernu regulaciju produkcije testosterona. Eksprimiranje većeg broja steroidogenih gena, između ostalih i gena za StAR, je sniženo kod *Bmal1* KO miša. Određeni *in vitro* eksperimenti na Lajdigovim ćelijama pokazuju i direktnu vezu ova dva proteina, gde BMAL1 pojačava transkripciju *Star* gena (Alvarez i sar., 2008).

Imajući sve ovo u vidu, izgleda da je uloga, ali i sam način rada časovnika, različit za egzokrini i endokrini deo testisa. Stoga, karakterizacija elemenata časovnika u pojedinačnim ćelijskim tipovima i povezivanje ovog sistema sa specifičnom funkcijom tih ćelija bi u mnogome doprinelo boljem razumevanju uloge perifernog časovnika u testisu i razrešenju oskudnih, često i naizgled oprečnih literaturnih podataka.

Pored evidentnog, iako ne do kraja razjašnjenog, uticaja biološkog časovnika na produkciju reproduktivnih hormona izgleda da postoji i obrnuti uticaj. Naime, pokazano je da androgeni utiču na glijalnu i sinaptičku funkciju u ventromedijalnoj srži mišijeg SCN i regulišu indukciju ekspresije *Period* gena i fazno pomeranje u ponašanju pri odgovoru na svetlosni stimulus. Ovi rezultati upućuju na moguće uzajamne interakcije oscilacija u mozgu i gonadama koje tek treba da budu istražene (Bittman, 2016).

2.3.3. Sezonski ritmovi

Jasno izraženi sezonski ritmovi u reprodukciji su prisutni kod mnogih sisara. Između dve sezone parenja, kod mužjaka dolazi do redukcije veličine testisa, smanjene produkcije testosterona, zaustavljanja spermatogeneze i odsustva karakterističnog ponašanja koje se javlja u sezoni parenja (Jimenez i sar., 2015). Mehanizmi koji leže u osnovi ovih promena obuhvaćeni su pojmom **regresija testisa** i izuzetno variraju između različitih vrsta i populacija.

Sezonska regresija testisa često je praćena degeneracijom Lajdigovih ćelija, što uključuje redukciju u veličini većine organela (Goldži aparat slabo razvijen, glatki endoplazmatični retikulum značajno redukovan, smanjen broj lipidnih inkluzija), kao i samih ćelija (Sinha Hikim i sar., 1988; Sinha Hikim i sar., 1993). Na to, da u ovom periodu Lajdigove ćelije gube svoju osnovnu funkciju, upućuju i eksperimenti u kojima je pokazano da primarna kultura ovih ćelija, izolovana iz regresiranih testisa belonogog miša (*Peromyscus leucopus*), slabije odgovara na hCG i dibutiril cAMP (Knotts i Glass, 1988). U Lajdigovim ćelijama otnova uočena je smanjena aktivnost StAR proteina, kao i najvažnijih enzima steroidogeneze, citohrom P450 i C17-20 liaza (u ovom slučaju nije detektovana promena u broju

ćelija) (Price i sar., 2000). Ipak, postoje i izuzeci od ovog modela pa se tako kod konja veličina ćelija, kao i kompozicija citoplazme ne menjaju između dve sezone parenja, ali se smanjuje broj ćelija (sezonsko smanjenje broja ćelija primećeno je i kod drugih vrsta, kamila, hrčak itd.). Najjednostavnije objašnjenje ove promene u broju Lajdigovih ćelija bio bi talas ćelijske smrti tokom regresije testisa i talas proliferacije pred sezonu parenja, međutim nijedan od ovih procesa nije jasno detektovan tokom sezonskih promena kod nekoliko ispitivanih modela (Jimenez i sar., 2015). Hombach-Klonisch i sar. (2004) su predložili model po kom se kod srndaća ukupan broj intersticijalnih ćelija ne menja, ali se Lajdigove ćelije dediferenciraju tokom regresije testisa, a zatim ponovo diferenciraju u aktivnom delu sezone. Dalja istraživanja pokazaće da li ovaj model važi i za još neke životinje sa sezonskom reprodukcijom ili je, kako za sada izgleda, sezonska dinamika Lajdigovih ćelija specifična za vrstu.

Sezonska regresija testisa i pad u produkciji testosterona povezuje se sa smanjenom frekvencom LH pulseva, ali i količinom oslobođenog hormona po puls. Uočeno je da se ove promene u produkciji gonadotropina dešavaju uz pad sekrecije prolaktina (Bittman, 2016). Uticaj prolaktina na produkciju androgena dominantno se ostvaruje preko neuroendokrine osovine, ali interesantno da prisustvo ovog hormona obezbeđuje nizak nivo sekrecije androgena i ukoliko je osovina blokirana (Bittman, 2016). Smanjenje nivoa prolaktina može imati uticaj na sezonsku regresiju testisa i smanjujući osetljivost Lajdigovih ćelija na LH (prisustvo prolaktina povećava odgovor Lajdigovih ćelija na LH) (Purvis i sar., 1979). Iako se prolaktin eksprimira i unutar testisa (Lajdigove ćelije, spermatogonije i spermatide) (Jabbour i Lincoln, 1999; Ishida i sar., 2010) nije poznato da li i ovako nastao prolaktin ima ulogu u sezonskoj reprodukciji (Bittman, 2016).

Pomenute sezonske promene u reproduktivnom sistemu mužjaka omogućavaju da se smanji utrošak energije tokom nepovoljnog perioda (hibernacija podrazumeva nizak nivo testosterona) i da se dolazak potomstva desi u najpovoljnijim uslovima spoljašnje sredine (proleće i leto). Tako su vrste sa dugim periodom gestacije (koze i ovce, oko 5-6 meseci) obično najspremnije za parenje tokom jeseni i zime, dok se parenje glodara, kao primer životinja sa

kratkim periodom gestacije, dešava u proleće i leto (Bittman, 2016). Ovo znači da je odgovor životinja (kod kojih se javlja sezonska reprodukcija) na spoljašnje signale, koji bi upućivali na doba godine, specifičan za vrstu.

Pored pada temperature i oskudice u hrani, ipak najsigurniji ovakav signal je promena dužine dana, tj. fotoperiod (detaljno opisano u Prendergast i sar., 2009). Tako izlaganje Sibirskog i Sirijskog hrčka zimskoj dužini dana dovodi do regresije testisa, dok fotoperiod preko 12,5h vraća funkciju testisa ovih životinja u prvobitno stanje (Bittman, 2016). Kod sisara sa sezonskim ritmovima fotoperiodična regulacija reprodukcije dominantno zavisi od sekrecije melatonina u pinealnoj žlezdi. Pokazano je da je intaktna pinealna žlezda neophodna za inhibiciju seksualnog ponašanja tokom skraćenog fotoperioda (Prendergast i sar., 2009). Sa skraćanjem dana, odnosno produžetkom noći, produžuje se i sekrecija melatonina. Ovaj fiziološki signal ima uticaj na hipotalamus, hipofizu ali i druga tkiva, menjajući strukturu neuroendokrine osovine od koje zavise i sezonske promene u funkciji testisa. Vremenenski kontrolisana administracija melatonina izaziva promene u obrascu sekrecije gonadotropina koje nastaju kao posledica skraćenja fotoperioda (Bittman, 2016). Inhibitorni efekat melatonina pokazan je na HPT osovini (Yilmaz i sar., 2000), ali ne i na samim Lajdigovim ćelijama. Naime, iako postoje receptori za melatonin na membrani Lajdigovih ćelija (Valenti i sar., 1997), izgleda da je efekat ovog hormona na hCG-posredovanu produkciju testosterona farmakološki i izostaje ukoliko su koncentracije fiziološke (Valenti i sar., 2001; Frungieri i sar., 2005).

3. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu oprečne stavove kada je u pitanju organizacija, uloga, pa i samo prisustvo elemenata biološkog časovnika u testisima, kao i skorija otkrića koja govore u prilog velikoj važnosti cirkadijalnog časovnika za pravilnu produkciju testosterona i fertilitet mužjaka, prvi cilj doktorske teze bio je

- Okarakterisati cirkadijalni profil elemenata biološkog časovnika i steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama pacova i ispitati da li se ritmovi održavaju i u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija.

Drugi deo teze je orijentisan na ispitivanje potencijalnog uključivanja signalizacije preko cAMP u sinhronizaciju ritma adultnih Lajdigovih ćelija. Sa tim u vezi postavljena je hipoteza po kojoj signalizacija preko cAMP ima značajnu ulogu za sinhronizaciju ritma ovih ćelija. Kako bi proverili hipotezu zadati su sledeći ciljevi:

- Ispitati efekat poremećene LH-cAMP signalizacije na obrazac eksprimiranja gena biološkog časovnika i gena povezanih sa steroidogenezom na modelima:
 - hipogonadotropnog hipogonadizma,
 - staračkog hipogonadizma i
 - modelu primarne kulture Lajdigovih ćelija.
- Ispitati efekat melatonina, kao nosioca informacije o svetlosnom režimu, a koji svoje dejstvo ostvaruje preko cAMP signalizacije, na sinhronizaciju perifernog biološkog časovnika i steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama koristeći *in vivo* model pinealektomisanih životinja i *in vitro* model primarne kulture.

Na osnovu rezultata dobijenih u doktorskoj tezi postaviće se hipotetički modeli koji bi doprineli boljem razumevanju mehanizma sinhronizacije perifernog biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama.

4. MATERIЈAL I METODE

Svi ogledi su izvedeni u Laboratoriji za Reproductivnu endokrinologiju i signaling, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Svi eksperimenti su kao deo projekta ministarstva OI 173057 odobreni od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu, broj I-2011-02 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 and Use of Laboratory Animals*; NIH Publications No. 80 23, revised 1996, 7th edition).

4.1. Hemikalije

Anti-testosteron-11-BSA serum No. 250 je dobijeno ljubaznošću Gordon D. Niswender, Colorado State University, Fort Collins, CO. Komercijalni RIA komplet za luteinizirajući hormon (LH (Rat) RIA) nabavljen je od kompanije Alpco Diagnostics (www.alpco.com), dok su standardi i specifično antitelo za LH esej nabavljeni od Dr A. F. Parlow (The National Pituitary Agency, Harbor UCLA Medical Center, Torrance, CA). (1,2,6,7³H(N))-testosteron i 125I-LH su kupljeni od Perkin-Elmer Life Sciences (www.perkinelmer.com). Dekstran T-70 je nabavljen od Pharmacia (www.pfizer.com), a aktivni ugalj Norit A od kompanije Serva (www.serva.de).

Melatonin (M5250; Sigma, St Louis, MO) koji je korišćen u *in vitro* eksperimentima je poklon Hane Zemkove, sa Instituta za fiziologiju u Pragu. Humani horionski gonadotropin, hCG, (*engl. hCG-Pregnyl 3000 IU/mg*) nabavljen je od kompanije Organon, Inc (SAD). Diphereline S.R. (triptorelin, 11,25 mg u formi triptorelin pamoata) kupljen je od Beaufor Ipsen Int. (www.ipsen.com). Natrijum tiopenton nabavljen je od kompanije CIRON Drugs & Pharmaceuticals, a melatonin, koji je korišćen u *in vivo* oglelima od Now Foods, Bloomingdale, IL (www.nowfoods.com). GnRH je nabavljen od kompanije Bachem, Torrance, CA (www.bachem.com).

Hemikalije 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), dok je pufer za pripremu uzoraka za SDS elektroforezu (loading pufer) kupljen od Quality biological inc. (Gaithersburg, MD, SAD) (www.qualitybiological.com). Set koktel inhibitora fosfataza kupljena su od Calbiochem (La Jolla, CA, USA) (www.emdmillipore.com).

Supstrat za detekciju Western blot analizom SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate kupljen je od PIERCE (Rockford, USA) (www.thermofisher.com). Medijum 199 koji sadrži Earle so i L-glutamin (M199), medijum DMEM-F12, HEPES, etilendiamintetra-acetatna kiselina (EDTA), fosforna kiselina, perkol, goveđi serum albumin (BSA, frakcija V), kolagenaza (engl. Collagenase, Type IA) iz *Clostridium histolyticum*, rastvor tripan plavog (Trypan Blue 0,4 %), β -glicerofosfat, tergitol (Niaproof 4, tip 4), ditiotritol (DTT), leupeptin, aprotinin, etidijum-bromid i agaroza kupljeni su od Sigma (St. Louise, MO, SAD) (www.sigmaaldrich.com). Kombinacija penicilin/streptomycin je kupljen od Capricorn Scientific (www.capricorn-scientific.com).

cGMP EIA komplet i cAMP EIA komplet su od Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI) (www.caymanchem.com).

TriPure Isolation Reagent je kupljen od Sigma, St Louis, MO (www.sigmaaldrich.com). Komplet za izolaciju ukupne RNK (Rneasy kit) kupljen je od kompanije Qiagen (www.qiagen.com), dok je komplet za pripremu cDNK (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) nabavljen 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) nabavljeni od Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com). Ostale hemikalije su bile analitičke čistoće.

4.2. Eksperimentalne životinje

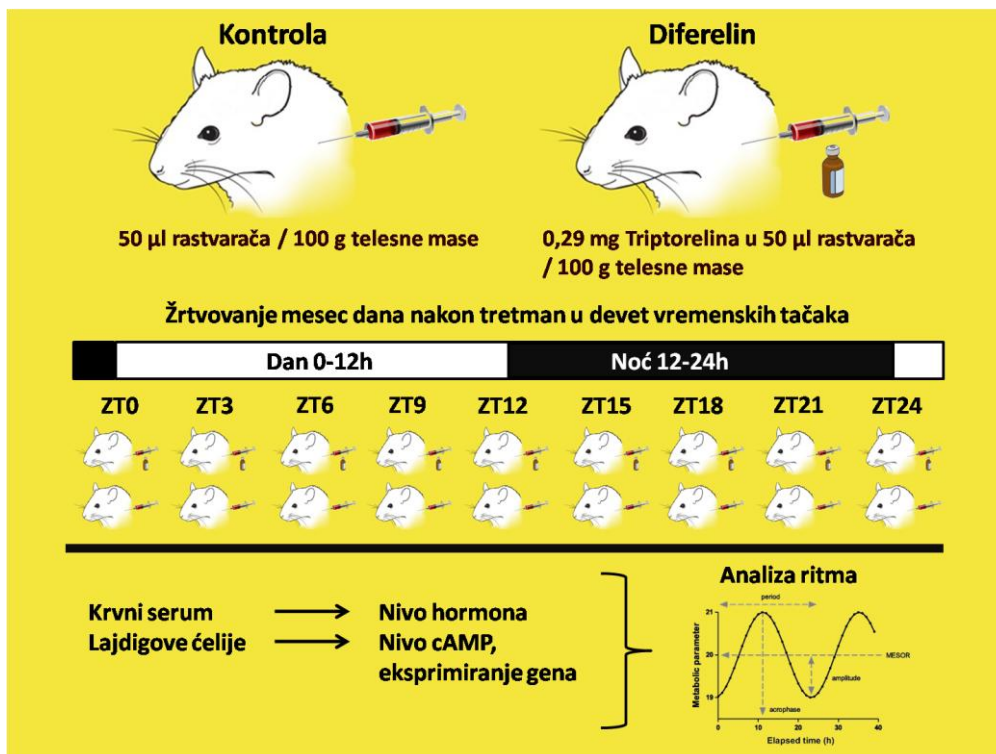
U radu su korišćeni mužjaci belih pacova soja Wistar starosti 3-4, 18 i 24 meseca i telesne težine 250-400 g. Životinje su uzgajane u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu,

pri standardnim laboratorijskim uslovima kontrolisanog osvetljenja (12h svetlo/12h mrak, pri čemu je svetlo uključivano ujutru u 7h) i kontrolisane temperature od 22 ± 2 °C. Hranjene su standardnom paletiziranom laboratorijskom hranom za pacove (Veterinarski zavod, Subotica). Hrana i voda su bili dostupni *ad libitum*.

4.3. Eksperimentalni modeli

4.3.1. Eksperimentalni model hipogonadotropnog hipogonadizma

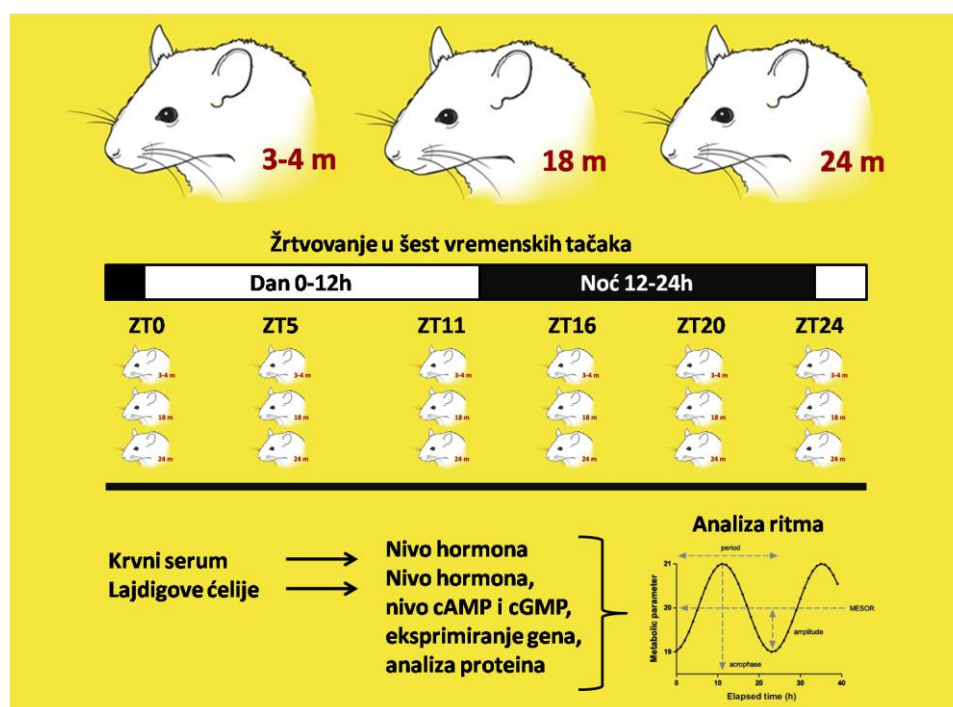
Model hipogonadotropnog hipogonadizma (Sl. 4.1) je jedan od pristupa koji je imao za cilj da ispita efekat poremećene (u ovom slučaju smanjene) LH-cAMP signalizacije na cirkadijalni obrazac eksprimiranja gena biološkog časovnika i gena povezanih sa steroidogenezom. Hipogonadotropni hipogonadizam naziva se još i sekundarnim hipogonadizmom jer hipogonadizam nastaje kao posledica poremećaja u radu HPT osovine (nizak nivo LH), dok je u slučaju primarnog hipogonadizma osovina očuvana (nivo LH nije smanjen) i uzrok fenomena leži na nivou samih gonada.



Slika 4.1 Eksperimentalni model hipogonadotropnog hipogonadizma

Eksperimentalni model sekundarnog hipogonadizma izazvan je intramuskularnim iniciranjem GnRH analoga sa dugotrajnim dejstvom, Triptorelina (aktivna komponenta leka Diferelin, PharmaSwiss, Beograd) adultnm mužjacima pacova. Mužjaci pacova, starosti 3 meseca, podeljeni su u dve grupe: kontrolna (27 životinja) i tretirana diferelinom (18 životinja). Kontrolnoj grupi je intramuskularno injektovana smeša vode i manitola (rastvarač za Diferelin koji je dobijen uz lek), 50 μ l/100 g telesne mase. Eksperimentalnoj grupi životinja je intramuskularno injektovan Diferelin, rastvoren u pomenutom rastvaraču, u dozi od 0,29 mg/50 μ l/100 g telesne mase. Nakon mesec dana od tretmana, koliko je potrebno da životinje postanu hipogonadalne, svaka od grupa podeljena je u novih 9 (3 životinje po grupi za kontrolu i 2 životinje po grupi za Diferelin). Novoformirane grupe u okviru kontrole i Diferelina žrtvovane su u devet vremenskih tačaka u toku 24h (Sl. 4.1). Uspešnost tretmana je verifikovana smanjenjem veličine testisa kao i merenjem testosterona i LH u serumu. Eksperiment je ponovljen tri puta.

4.3.2. Model staračkog (prirodnog) hipogonadizma

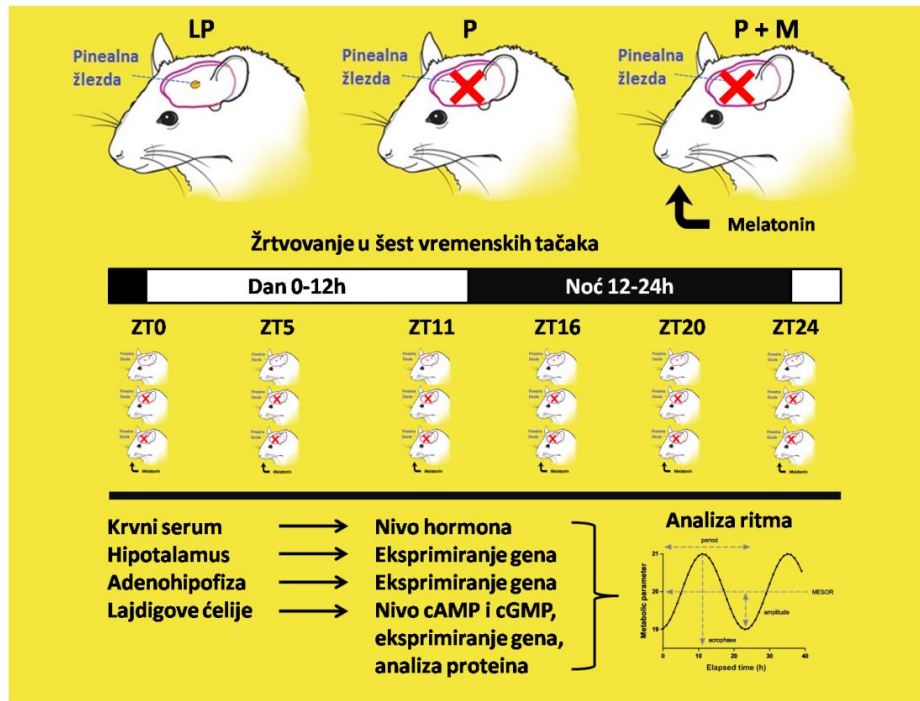


Slika 4.2 Model staračkog (prirodnog) hipogonadizma

Prirodni hipogonadizam nastaje u starenju, kada dolazi do pada nivoa cAMP i produkcije testosterona uprkos nepromenjenom ili blago povišenom nivou LH. Da bi pratili efekat na ovaj način narušene homeostaze cAMP na rad perifernog biološkog časovnika i steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama formirane su tri grupe (Sl. 4.2): adultni mužjaci pacova stari 3-4 meseca i mužjaci starog fenotipa stari 18, odnosno 24 meseca. Svaka od ove tri starosne grupe (3-4m, 18m, 24m) sastojala se od 17-24 životinja i bila je dodatno podeljena u šest grupa koje su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (Sl. 4.2). Životinje kod kojih su uočeni tumori nisu uključene u eksperiment. Eksperiment je ponovljen tri puta.

4.3.3. Eksperimentalni model pinealektomisanih životinja

Eksperimentalni model pinealektomisanih životinja (Sl. 4.3) je korišćen kako bi se ispitao *in vivo* uticaj melatonina, kao nosioca informacije o svetlosnom režimu, a koji svoje dejstvo ostvaruje preko cAMP signalizacije, na periferni biološki časovnik i steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama. Adultni mužjaci pacova podeljeni su u tri grupe od po 24-30 životinja: lažna pinealektomija (LP), pinealektomija (P) i pinealektomija + melatonin (P+M). Svim životinjama je intraperitonealno data anestezija, natrijum tiopental (CIRON Drugs & Pharmaceuticals) 50 mg/kg. Pinealektomija je izvedena po metodi Hoffman and Reiter (1965) uz manje modifikacije. Posle trepanacije lobanje i uklanjanja pinealne žlezde, rana je zašivena i životinje su se oporavljale mesec dana. Pinealektomija je izvršena u dve od tri formirane grupe (P i P+M), dok je u preostaloj grupi izvršena trepanacija lobanje ali nije izvađena pinealna žlezda (lažna pinealektomija, LP) i ova grupa je služila kao kontrola. Grupa P+M je svakodnevno pre gašenja svetla u toku 30 dana, pila melatonin (4 mg/kg; Now Foods, Bloomingdale, IL), Životinje su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (Sl. 4.3). Uspešnost operacije praćena je *post mortem* morfološkom analizom kao i merenjem koncentracije melatonina u cirkulaciji. Eksperiment je ponovljen tri puta.



Slika 4.3 Eksperimentalni model pinealektomisanih životinja

4.3.4. *In vitro* model

Da bi dobili informacije o direktnom efektu LH, GnRH i melatonina na steroidogenezu i elemente perifernog biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama, ove ćelije su izolovane iz adultnih pacova i posađene na petri ploče (3×10^6 ćelija / 55 mm petri ploči). Nakon perioda odmora, ćelije su sinhronizovane (resetovane). Ovaj proces podrazumeva zamenu medijuma sa DMEM/F12 – 10%FBS i inkubaciju u CO₂ inkubatoru u trajanju od 4h pri temperaturi od 34 °C, nakon čega je medijum sa serumom uklonjen (ovaj momenat je označen kao ZT0). Ćelije su zatim stimulisane sa odgovarajućim hormonima. Inkubacija je trajala tri sata i urađena je u predviđenom broju cirkadijalnih vremena. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

4.4. Određivanje koncentracije hormona

Određivanje koncentracije LH i 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. Ipak treba napomenuti da je kod odraslog muškaka 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 %.

Određivanje koncentracije LH u serumu vršeno je korišćenjem komercijalnog kompleta (ALPCO Diagnostic-LH (Rat) RIA), prema uputstvu proizvođača (www.alpco.com). Preciznost analize bila je 1 ng/ml, a koeficijent varijacije u okviru jedne analize 4.2 %. Minimalna detektovana koncentracija iznosila je 0,14 ng/ml.

4.5. Određivanje lipidnog statusa u serumu

Određivanje nivoa ukupnog holesterola, triglicerida, HDL, ne-HDL, LDL i VLDL holesterola u serumu vršeno je upotrebom komercijalnog kompleta (Roche Diagnostic Basel, Switzerland) po uputstvu proizvođača. Merenje je vršeno na analizatoru (Roche COBASIntegra®400 Plus System) (www.cobas.com).

4.6. Priprema primarne kulture Lajdigovih ćelija

Nakon izolacije testisa i uklanjanja kapsule, izolovan je i uklonjen 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 preparat inkubiran je 15 min u „shaker” vodenom kupatilu 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 streptomicina (100 µg/ml)) po testisu. U ovako dobijenoj suspenziji intersticijalnih ćelija, pored Lajdigovih 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; Klinefelter i sar., 1987).

Primarna kultura Lajdigovih ćelija dobijena je prečišćavanjem suspenzije intersticijalnih ćelija pomoću diskontinualnih perkolnih gradijenata. Postupak purifikacije zasnovan je na osnovnim principima gradijentnog centrifugiranja, tokom kojeg se Lajdigove ćelije pozicioniraju u sloju koji najviše odgovara njihovoj specifičnoj gustini. Kolone na kojima su razdvajane ćelije pripremljene su naslojavanjem po 2 ml rastvora perkola različite gustine u plastične epruvete zapremine 12 ml i to počevši od najveće gustine (1,090 g/ml), pa redom po opadajućoj vrednosti gustina, sve do najmanje (1,045 g/ml). Receptura za pripremu rastvora perkola različitih gustina prikazana je u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Sastav perkolnih rastvora različitih specifičnih gustina (navedeni primer odgovara pripremi 10 kolona)

SPECIFIČNA GUSTINA (g/ml)	3%BSA-10xDMEM/F12 (ml)	PERKOL (ml)	DESTILOVANA VODA (ml)
1,045	2	6,031	11,969
1,065	2	9,108	8,892
1,080	2	11,415	6,582
1,090	2	12,954	5,046

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 Lajdigovih 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 streptomicina (100 µg/ml)) po testisu.

Ukupan broj živih Lajdigovih ćelija u suspenziji određen je upotrebom tripan plavog. Princip metode je zasnovan 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 Lajdigovih ćelija i 50 µl 0,4 % rastvora tripan plavog, ćelije su brojane u hemocitometru. U ovim eksperimentima vijabilnost Lajdigovih ćelija je prelazila 90 %. Proporcija Lajdigovih ćelija prisutnih u kulturi određena je ispitivanjem aktivnosti HSD3B enzima (Payne et al., 1980). Pripremljena suspenzija sadržala je 85 – 95 % Lajdigovih ćelija.

U slučaju *in vivo* eksperimenata, suspenzija Lajdigovih 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 *in vitro* eksperimenata, Lajdigove ćelije su pulirane i sađene u 90 mm petri ploče, u gustini 5 x 10⁶ ćelija/ploči u 5 ml medijuma, 55 mm Petri ploče, u gustini 3 x 10⁶ ćelija/ploči u 3 ml medijuma i mikrotitar ploče sa 24 rupice, u gustini 0,5 x 10⁶ ćelija/rupici u 0,5 ml medijuma. Korišćeni medijum bio je M199-0,1%BSA ili DMEM/F12, u oba slučaja sa dodatkom penicilina (100 IU/ml) i streptomocina (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 različiti *in vitro* tretmani, opisani u poglavlju 4.3.4. Po završenom tretmanu medijum je sakupljen i zamrznut na temperaturi od -20 °C da bi se iz njega kasnije odredila koncentracija sekretovanog testosterona, a 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.

4.7. Ekstrakcija steroida iz Lajdigovih ćelija

Da bi ekstrahovali steroide, Lajdigove ćelije u talogu (0,4 – 0,8x10⁶) su lizirane u prisustvu 200 µl 1xPBS rastvora. Proces ekstrakcije izveden je u tri ciklusa mešanja homogenata sa dietil etrom (u odnosu 1:3), zamrzavanja na suvom ledu, a potom odlivanja etarske frakcije u druge epruvete. Etarski ekstrat je uparen

do suvog. Dobijeni suvi ekstrakti su resuspendovani u 150 μ l osnovnog pufera koji se upotrebljava u RIA postupku pri merenju testosterona. Merenje androgena vršeno je RIA metodom kako je to opisano u poglavlju 4.4.

4.8. Određivanje koncentracije cikličnih nukleotida u ćelijskom sadržaju

Koncentracija cikličnih nukleotida određena je pomoću komercijalnih kompleta za merenje nivoa cAMP (cAMP EIA kit, Cayman Chemicals) i cGMP (cGMP EIA kit, Cayman Chemicals) po uputstvima proizvođača (www.caymanchem.com). Ovo je metoda kompetitivne ELISA bazirana na kompeticiji specifičnog cikličnog nukleotida iz uzorka sa cikličnim nukleotidom koji je obeležen enzimom, za ista vezna mesta na specifičnom antitelu.

Nivo cAMP i cGMP meren je u ćelijskom sadržaju. U cilju pripreme uzoraka za određivanje nivoa cikličnih nukleotida, Lajdigove ćelije su lizirane upotrebom 100 % etanola. Nakon evaporacije uzorci su rekonstituisani u EIA puferu, preporučenom od strane proizvođača.

Sastavni deo pripreme uzoraka i standarda bio je postupak acetilacije cikličnih nukleotida na 2'OH grupi, čime se vezivanje antitela povećalo 10 puta. Koncentracija cAMP i cGMP u uzorcima određena je na osnovu standardne inhibicione krive dobijene pomoću standardnog rastvora određenog cikličnog nukleotida, poznate koncentracije. Standardna inhibiciona kriva za merenje nivoa cAMP bila je raspona 0,078 – 10 pmol/ml; dok je za merenje nivoa cGMP njen raspon bio 0,023 – 3 pmol/ml. Tipična IC_{50} vrednost cAMP EIA kit-a bila je 0,46 pmol/ml, a limit detekcije 0,1 pmol/ml (pri 80% B/B₀) za acetilovane uzorke. Vrednost IC_{50} za cGMP EIA kit iznosila je 0,46 pmol/ml, dok je limit detekcije bio 0,1 pmol/ml (pri 80% B/B₀) za acetilovane uzorke.

4.9. Određivanje koncentracije nitrita u ćelijskom medijumu

Koncentracija nitrita (stabilnog metaboličkog produkta azot oksida) u uzorcima određena je Griess metodom (Green i sar., 1982), uz manje modifikacije. Standardna kriva bila je raspona 0,195 - 100 μM , a formirana je upotrebom standardnog rastvora natrijum nitrita (NaNO_2). Tačkama standardne krive i alikvotima uzoraka dodavan je Griess reagens (0,5 % sulfanilamid i 0,05 % naftil-etilendiamin u 2,5 % fosfornoj kiselini) u odnosu 1:1. Nakon inkubacije 10 minuta, na sobnoj temperaturi, u mraku, izmerena je apsorbanca na talasnoj dužini od 546 nm pomoću fotometra Multiskan EX (www.thermoscientific.com).

4.10. Analiza eksprimiranja gena

4.10.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija

Izvor RNK za analizu stepena transkripcije gena bili su hipotalamus, adenohipofiza i primarna kultura Lajdigovih ćelija. Ukupna RNK izolovana je ili upotrebom komercijalnih kompleta koji sadrže sve komponente i reagense 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 trizolom (1ml trizola na 100 mg tkiva ili na 5×10^6 ćelija). Tokom lize petri ploče su grebane špatulom a organi su homogenizovani u tubicama. Tečna i organska faza su razdvojene dodavanjem 1/5 zapremine hloroforma (Zorka, Šabac) na lizat/homogenat. Kada je dodat hloroform tubice su snažno promućkane i inkubirane 5 min na ledu. Nakon centrifuge 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. Kada je alkohol ispario 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 $\text{ng}/\mu\text{l} = \text{apsorbanca}_{260\text{nm}} \times 40$, a čistoća je praćena kroz odnose A_{260}/A_{280} ($\text{apsorbanca}_{260\text{nm}}/\text{apsorbanca}_{280\text{nm}}$) – ukazuje na kontaminaciju proteinima i A_{260}/A_{230} ($\text{apsorbanca}_{260\text{nm}}/\text{apsorbanca}_{230\text{nm}}$) – 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 Dnazom (DNase I, Amplification Grade; DNA-free™ DNA Removal Kit), prema uputstvu proizvođača (www.thermofisher.com), nakon čega je procesom reverzne transkripcije 1 µg 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.

4.10.2. Relativna kvantifikacija iRNK u PCR analizi

Relativna kvantifikacija (RQ-PCR) eksprimiranja gena je analizirna korišćenem dve vrste tehnologija: SYBR Green i TaqMan.

SYBR Green. Za detekciju amplicona korišćena je Power SYBR Green boja i ROX kao internalna referentna boja. Real time PCR reakcija je izvedena u standardnim uslovima (50 °C/2 min, 95 °C/ 10 min; i 40 ciklusa, od kojih je svaki bio pri 95 °C/15 sec, a potom 60 °C/1 min) korišćenjem aparata ABI Prism 7900HT Fast Real-Time (Applied Biosystems) u prisustvu specifičnih prajmera (Tabela 4.2). Za proveru integriteta cDNK i kao endogena kontrola korišćen je *Gapdh*. Kinetika eksprimiranja gena praćena je korišćenjem softvera ABI Prism 7900HT SDS 2.3 u prisustvu 500 nM forward (F) i reverse (R) prajmera, 2,5 µl cDNK produkta reakcije reverzne transkripcije (prethodno razblaženog) i Power SYBR Green PCR Master Mix. Svaki uzorak rađen je u duplikatu, za svaki eksperiment.

TLDA Rat Phosphodiesterase Panel Assay. Ekspresija gena za PDE u Lajdigovim ćelijama eksperimentalnih grupa analizirana je kao relativna kvantifikacija upotrebom TaqMan Low Density Rat Phosphodiesterase Panel Assay i softverima ABI Prism 7900HT SDS i RQ Manager Software. *Gapdh* gen je uzet kao endogena kontrola, kao i za korigovanje odstupanja u sadržaju RNK između uzoraka (30 ng uzorka/ulazu). Svaki uzorak rađen je u duplikatu, za svaki eksperiment.

Tabela 4.2 Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi. Prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) i potpunih sekvenci gena dobijenih iz NCBI baze podataka (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Gen	Kod u banci (GenBank)	Sekvenca prajmera
<i>Adcy3</i>	NM_130779	F:5'-GCATCGAAACCTACCTCATCA-3' R:5'-TGGGCTCCTTGGTCTCA ATAA -3'
<i>Adcy5</i>	NM_022600	F:5'-AACCAGGTGAACGCATGTCA-3' R:5'-CTCTGGGAAGTTGCAGTTGGA-3'
<i>Adcy7</i>	NM_053396	F:5'-TTCCGTGCGTGTAACCCGCT-3' R:5'-GCCTTCTGCCTCCGTCCGTT-3'
<i>Adcy9</i>	NM_001106980	F:5'-TCACCAAGCTGTACGCCCGG-3' R:5'-GGGCTGTCAACACGTCCCGA-3'
<i>Adcy10</i>	NM_021684	F:5'-CCAGGCATCGTGACCTGCGA-3' R:5'-ACTGGTCCGGGATCCGCAAC-3'
<i>Arr19</i>	NM_001013142	F:5'-TGCTGCAATCTTTGTTTCC-3' R:5'-TGTGCCATGATGAAAAAGGT-3'
<i>Bmal1</i>	NM_024362.2	F:5'- AAGAGGCGTCGGGACAAAAT-3' R:5'- TTCCGGGACATCGCATTG-3'
<i>Car2</i>	NM_019291.1	F:5'-AAGAGCAACGGACCAGAGAACT-3' R:5'-TGTCGGTCTCCATTGGCAAT-3'
<i>Cga</i>	NM_053918.2	F:5'-CAGTGTATGGGCTGTTGTTCT-3' R:5'-GGAACCAACATTGTCTTCTTGA-3'
<i>Clock</i>	NM_021856.1	F:5'- ACAGCCCCACTGTACAATACGA-3' R:5'- TGCGGCATACTGGATGGAAT-3'
<i>Creb1</i>	NM_134443.1	F:5'-CCAACCCCGATTTACCAAAT-3' R:5'-CCATTGTTAGCCAGCTGTATTGC-3'
<i>Cry1</i>	NM_198750.2	F:5'-ACCATCCGCTGCGTGATACAT-3' R:5'-AGCAAAAATCGCCACCTGTT-3'
<i>Cry2</i>	NM_133405.1	F:5'-TTCCCAAGGCTTTTCAAGGA-3' R:5'-TCCCGTTCTTTCCCAAAGG-3'
<i>Csnk1d</i>	NM_139060.3	F:5'-GTTCTGTTGCTTGTGACAAA-3' R:5'-GGTTTCAGTCTCGGTGGAT-3'
<i>Csnk1e</i>	NM_031617.1	F:5'-GCTGCGTGTGGGAAACAAGTA-3' R:5'-TGTTGGCACCCAGGTAGATG-3'

Tabela 4.2 Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi (Nastavak 1).

Gen	Kod u banci (GenBank)	Sekvenca prajmera
<i>Cyp11a1</i>	NM_017286	F:5'-GGGCAACATGGAGTCAGTTTACA-3' R:5'-GACCCTCGCAGGAGAAGAGA-3'
<i>Cyp17a1</i>	NM_012753	F:5'-GCCACGGGCGACAGAA-3' R:5'-GCCTTTGTTGGGAAAAATCG-3'
<i>DBP</i>	NM_012543.2	F:5'-TTGCCCTGTCAAGCATTCC-3' R:5'-CCTGGACTTTCCTTGCCTTCT-3'
<i>Dec1</i>	NM_053328.1	F:5'-CCAGGCCCTGAAGCAGATC-3' R:5'-GCAAAGCAGCAGGAGATTTCG-3'
<i>Dec2</i>	NM_053328.1	F:5'-AGCCTGGAGACGCACACAA-3' R:5'-TGTTCAATGGCTGTCCGTTTC-3'
<i>E4BP4</i>	NM_053727.2	F:5'-GTCACAGCCATCCGTTTCGTT-3' R:5'-GTGAACCTGTCAGGAGCCTTTT-3'
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F:5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R:5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'
<i>Gucy1a3</i>	NM_017090.2	F:5'-AACACCGGCTAATAAGGAGGAAA-3' R:5'-ACTCCCCCGTGATCTTGAGA-3'
<i>Gucy1b3</i>	NM_012769.2	F:5'-AGAAGAGGCCTGTACCTGAGTGA-3' R:5'-TTTGTACTCCTCCCGAACTGT-3'
<i>Hmgcr</i>	NM_013134.2	F:5'-GTGCTGAGCAGCGACATCAT-3' R:5'-GCTGACGCAGGTTCTGGAA-3'
<i>Hsd17b4</i>	NM_024392	F:5'-CCTTTGGCTTTGCCATGAGA-3' R:5'-CAATCCATCCTGCTCCAACCT-3'
<i>Hsd3b1/2</i>	NM_001042619.1	F:5'-GACAGGAGCAGGAGGGTTTGTGG-3' R:5'-CTCCTTCTAACATTGTCACCTTGGCCT-3'
<i>Insl3</i>	NM_053680.1	F:5'-CGCAGTGTGGCCACCAA-3' R:5'-CCTGAGCCCTACAATCCTTCAG-3'
<i>Lhb</i>	NM_012858.2	F:5'-TCTTCTGATGCCCACTACTA-3' R:5'-TATTGGGAGGGATGGTTAGAACA-3'
<i>Lhr</i>	NM_012978	F:5'-CGGGCTGGAGTCCATTCA-3' R:5'-TTCTTTGGAGGGCAGTGTTC-3'
<i>Lipe(Hsl)</i>	NM_012859.1	F:5'-CCGAGATGTCACAGTCAATGGA-3' R:5'-AATCCCGGATCGCAGAAA-3'
<i>Mtnr1a</i>	NM_053676.2	F:5'-GGAATACTGAACACGCACAAAGG-3' R:5'-GCTAAGTGTGGGCCCTAAGA-3'
<i>Mtnr1b</i>	NM_001100641.1	F:5'-CTGTCACAGTGCACCTACCA-3' R:5'-GAAGCCAGATGAGGCTGATGTA-3'
<i>Nampt</i>	NM_177928.3	F:5'-CGGCAGAAGCCGAGTTCA-3' R:5'-GCTTGTGTTGGGTGGGTATTG-3'
<i>Nos1</i>	NM_052799.1	F:5'-CCAATGTTCAAAAAACGAGTCT-3' R:5'-TCGGCTGGACTTAGGGCTTT-3'
<i>Nos2</i>	NM_012611.3	F:5'-TGCTAATGCGGAAGGTCATG-3' R:5'-GCTCCGACTTTCCTGTCTCA-3'
<i>Nos3</i>	NM_021838.2	F:5'-CACAAGAGTTACAAAATCCGATTCA-3' R:5'-TCTGTGTTACTGGATTCTTCTTT-3'

Tabela 4.2 Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi (Nastavak 2).

Gen	Kod u banci (GenBank)	Sekvenca prajmera
<i>Npas2</i>	NM_001108214.2	F:5'- GGCGCACCCCTGTGTACATTT-3' R:5'- TCTTTCCCCATTCTGCAAGTG-3'
<i>Nr1d1</i>	NM_001113422.1	F:5'-GAGCATCCAGCAGAACATCCA-3' R:5'-TTGCGATTGATACGGACAATG-3'
<i>Nr1d2</i>	NM_147210.1	F:5'-GAACGAGAATTGCTCCATCATG-3' R:5'-CGACATTCCCACGGACAGA-3'
<i>Nur77</i>	NM_024388	F:5'-GGCATGGTGAAGGAAGTTGT-3' R:5'-GATTGGTAGGGGAGGCATCT-3'
<i>Pbr (Tspo)</i>	NM_012515.2	F:5'-TTGGTGCCCGGCAGAT-3' R:5'-TTGCCACCCCACTGACAAG-3'
<i>Pde4a</i>	NM_013101.3	F:5'-CGGGAGCGTGAATGG-3' R:5'-GATGAAGCCACATGAGACTTC-3'
<i>Pde4b</i>	NM_017031.2	F:5'-AGGCCTGCACAAAACAAA-3' R:5'-CCTTGCATTCTGGCTCCAAA-3'
<i>Pde5a</i>	NM_133584.1	F:5'-GCTGGATGGCTGCAGGAA-3' R:5'-CCCCATTAAGGAGCGTCTTCT-3'
<i>Per1</i>	NM_001034125.1	F:5'- CCTGCACACCCAGAAGGAA-3' R:5'- GAGGTGTCAAGCCACGAA-3'
<i>Per2</i>	NM_031678.1	F:5'- GGAAGGAGGCCAGACGTA-3' R:5'- TGGGTCCATTTTCGTTAGAAACA-3'
<i>Per3</i>	NM_023978.2	F:5'- AAGGTTTCCTCAAGAGCTTGCA-3' R:5'- AGCGGTGTGAGCGTAGAACA-3'
<i>Prkaca</i>	NM_001100922.1	F:5'-TCAGTGAGCCCCACGCCGTT-3' R:5'-TCTCGGGCTTCAGGTCCCGG-3'
<i>Prkacb</i>	NM_001077645	F:5'-GGGTCATGGGGAACACGGCG-3' R:5'-CCAGCATTACTCGGGGGAGGGT-3'
<i>Prkar1a</i>	NM_013181	F:5'-TGTGCTGCAGCGTCGGTCAG-3' R:5'-AGTGGCAGCCCCGAGGACGAT-3'
<i>Prkar2a</i>	NM_019264	F:5'-GCCCCACCTCGTCGACTTCG-3' R:5'-TCCTGCGCGTGAAAGGTCGT-3'
<i>Prkar2b</i>	NM_001030020	F:5'-CCCATGCGCTCCGATTCCGA-3' R:5'-GCACATACCGAGGCACGCCT-3'
<i>Prkg1</i>	NM_001105731.3	F:5'-CCCACGGACACAAGCAATTT-3' R:5'-CCCAGCCTGAGTTGTCATCA-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'-GGACATCCTCCAAACTTCACA-3'
<i>Scarb1</i>	NM_031541.1	F:5'-GAAGGCATCCCCACTTATCG-3' R:5'-CGGACCCGTTGGCAA-3'
<i>Sf1</i>	NM_001191099	F:5'-CCGCGGGCATGGACTA-3' R:5'-TTGTCACCACACACTGGACACA-3'
<i>Sirt1</i>	XM_006223877.1	F:5'-GGCCTCAAAGTACCTGGGATT-3' R:5'-AGATCAAAAAGCTGCTGCTCAGA-3'

Tabela 4.2 Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi (Nastavak 3).

Gen	Kod u banci (GenBank)	Sekvenca prajmera
<i>Soat1</i>	NM_031118.1	F:5'-CCACCCACTCATCTATTCCTTA-3' R:5'-TTGGTATAAAACCGAGGATTCCA-3'
<i>Soat2</i>	NM_153728.2	F:5'-GGCATCCAGGTCAGCCTATACT-3' R:5'-GTCACCAGCTCCCAAATGTC-3'
<i>Star</i>	NM_031558	F:5'-AGCCAGCAGGAGAATGGAGAT-3' R:5'-CACCTCCAGTCGGAACACCTT-3'

4.11. Kvantitativna i kvalitativna analiza proteina

4.11.1. Određivanje ukupne količine proteina u uzorcima

Nakon izolacije, Lajdigove 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 $MgCl_2$, 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.

4.11.2. SDS-PAGE i Western blot

Pošto su uzorci ujednačeni po koncentraciji proteina, razdvajani su 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 i centrifugiranje 3 min pri brzini od 10000g). 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 8-12%

poliakrilamidni gel. Elektroforeza je vršena u Mini – PROTEAN 3 Cell (www.bio-rad.com) (BIORAD), pri naponu od 100 V i trajanju od oko 2 h.

Po završenoj 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 sa različitim monoklonalnim i poliklonalnim antitelima specifičnim za ciljni protein (Tab. 4.3). Detekcija reaktivnih traka vršena je sa supstratom za reakciju detekcije luminolom (Pierce, Rockford, IL). Reaktivne trake su detektovane aparatom myECL Imager (www.thermofisher.com). Detekcija odgovarajuće proteinske frakcije vršena je na osnovu proteinskih markera poznatih molekulskih masa u rasponu 10-250 kDa (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, ThermoScientific). Imunoreaktivne trake analizirane su kao dvodimenzione slike u programu Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Tabela 4.3 Karakterizacija antitela korišćenih za WB

Ciljni protein	Ime antitela	Proizvođač, kat. br.	Mono- ili poli	Razblaženje
STAR	anti-STAR	From prof. Douglas Stocco	Rabbit polyclonal IgG	1 : 500
HSD3B	anti-HSD3B	From prof. Ian Masson	Rabbit polyclonal IgG	1 : 800
REV-ERBA	Rev-erb α Antibody (H-49)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. #sc-135241	Rabbit polyclonal IgG	1 : 500
BMAL1	anti-ARNTL	Abcam, #ab49421	Rabbit polyclonal IgG	1 : 500
PRKG1	cGKIalpha/beta (H-100) Antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc. #sc-25429	Rabbit polyclonal IgG	1 : 1000
PRKAC	Anti-PKA[C]	BD Transduction Laboratories, 610980	Mouse polyclonal IgG	1 : 1000
GUCY1B3	sGC β 1 subunit Antibody	Cayman, 160897	Rabbit polyclonal IgG	1 : 1000
ACTIN	ACTIN (I-19)	Santa Cruz Biotechnology Inc sc-1616	Goat polyclonal IgG	1 : 500

Anti-kozije, anti-mišije i anti-zečije sekundarno antitelo konjugovana sa peroksidazom rena kupljeno je od Kirkegaard & Pery Labs (Gaithersburg, MD) (www.ktpl.com).

4.12. Statistička analiza i analiza ritma

Analize hormona i cikličnih nukleotida u *in vivo* eksperimentima su rađene individualno i rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM od ukupnog broja životinja iz tri nezavisna eksperimenata. Rezultati analize eksprimiranja gena su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM iz iz tri nezavisna eksperimenta (uzorci u okviru iste grupe istog eksperimenta su pulirani). Rezultati *in vitro* analiza su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta.

Za statističku analizu korišćeni su t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney neparametarski test i Two-way ANOVA, praćena Bonferroni post-testom. Sve analize su izvedene upotrebom softwera Graphpad prism 5.0. Za sve statističke analize kao kriterijumom statističke značajnosti razlika uzeta je granica verovatnoće $p < 0,05$.

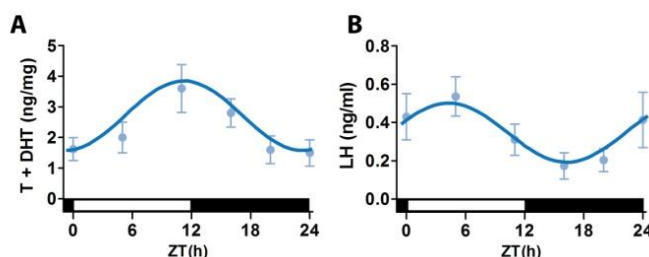
Za analizu ritma, određivanje parametara ritma (Robustness, MESOR, Amplitude, Acrophase) i formiranje krive koja opisuje ritam korišćen je Cosinor program (www.circadian.org/software).

5. REZULTATI

5.1. Karakterizacija cirkadijalnog profila elemenata steroidogeneze i biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama adultnih pacova

5.1.1. Cirkadijalne fluktuacije hormona u serumu

Analizom koncentracije androgena (T+DHT) u serumu adultnih Wistar pacova u više vremenskih tačaka u toku dana utvrđeno je da koncentracija ovih hormona prati cirkadijalni ritam. Kao što je pokazano na slici 5.1A, androgeni dostižu najvišu vrednost pred početak tamne faze (oko ZT11), a najnižu pred početak svetle faze (oko ZT23) (parametri ritma dobijeni kosinor metodom su dati u tabeli 5.1). LH, glavni pokretač produkcije testosterona u Lajdigovim ćelijama, takođe pokazuje cirkadijalna variranja u svojoj koncentraciji u serumu (Sl. 5.1B). Pik ovog hormona dešava se nekoliko sati od početka svetle faze, odnosno oko sedam sati pre pika u koncentraciji testosterona (Tabela 5.1).



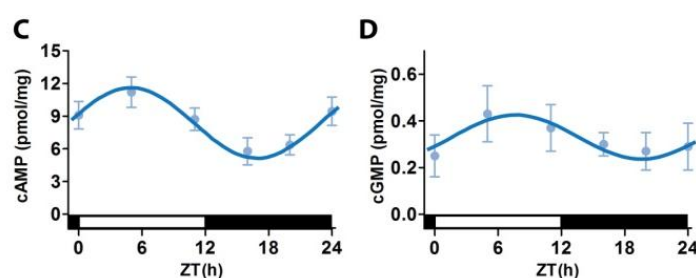
Slika 5.1 Cirkadijalne fluktuacije nivoa hormona u serumu adultnih Wistar pacova. Adultni (3 meseca stari) Wistar pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, gde ZT0 predstavlja momenat paljenja svetla), nakon čega je sakupljen serum radi merenja nivoa testosterona (A) i LH (B). Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva ritma (za parametre ritma Mesor, Amplituda i Akrofaza pogledati tabelu 5.1).

Tabela 5.1 Parametri ritma – hormoni. Adultni Wistar pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana nakon čega je sakupljen serum radi merenja nivoa hormona (T+DHT, LH). Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
Testosteron	3m	0.000777	2.7394	1.1527	169° / 11 h 17 min
LH	3m	0.003149	0.3438	0.1924	68° / 04 h 31 min

5.1.2. Cirkadijalne fluktuacije nivoa cikličnih nukleotida

U prenosu signala od LH receptora do elemenata direktno uključenih u biosintezu testosterona važnu ulogu imaju ciklični nukleotidi, posebno ciklični adenozin monofosfat. Merenja govore u prilog tome da koncentracija cAMP unutar Lajdigovih ćelija pokazuje cirkadijalni obrazac, sa pikom oko ZT5 (Sl. 5.2, parametri ritma su dati u Tabeli 5.2), što je malo posle pika u koncentraciji serumskog LH, a oko šest sati pre pika serumskog testosterona (Sl. 5.1, Tabela 5.1). Modulatorni efekat na produkciju testosterona ima i cGMP. Koncentracija ovog signalnog glasnika u Lajdigovim ćelijama takođe pokazuje cirkadijalni obrazac i najviša je oko ZT8 (Sl. 5.2, Tabela 5.2), tj nekoliko sati pre najviše koncentracije testosterona u serumu.



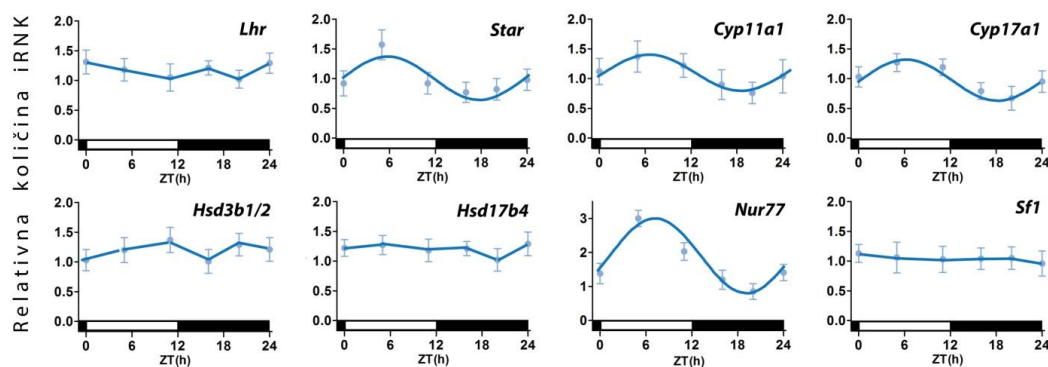
Slika 5.2 Cirkadijalni obrazac koncentracije cikličnih nukleotida u Lajdigovim ćelijama adultnih pacova. Adultni Wistar pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, gde ZT0 predstavlja momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije radi određivanja unutarćelijske koncentracije cikličnih nukleotida, cAMP i cGMP. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva ritma (za parametre ritma Mesor, Amplituda i Akrofaza pogledati tabelu 5.2).

Tabela 5.2 Parametri ritma - ciklični nukleotidi. Adultni Wistar pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije poslužile za određivanje unutarćelijskog nivoa cikličnih nukleotida (cAMP, cGMP). Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	P	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
cAMP	3m	0.000718	8.5089	2.8142	77° / 05 h 06 min
cGMP	3m	0.049372	0.3345	0.0855	120° / 08 h 01 min

5.1.3. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena uključenih u steroidogenezu

Nakon serumske koncentracije hormona i unutarćelijske koncentracije cikličnih nukleotida, ispitano je da li postoje cirkadijalne varijacije i u ekspimiranju gena važnih za steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama. Tako je uočeno da količina iRNK za LH receptor ne pokazuje dnevne oscilacije (Sl. 5.3). Sa druge strane, *Star*, gen koji omogućava da holesterol stigne do steroidogenih enzima, pokazuje oscilacije u svom ekspimiranju sa pikom u sredini svetle faze (Sl. 5.3, Tabela 5.3). Sličan cirkadijalni profil ekspimiranja imaju i steroidogeni enzimi iz familije citohroma P450, *Cyp11a1* i *Cyp17a1* (Sl. 5.3, Tabela 5.3). Nasuprot njima, druga dva enzima uključena u steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama, *Hsd3b1/2* i *Hsd17b*, nisu pokazala cirkadijalne varijacije na nivou iRNK (Sl. 5.3, Tabela 5.3). Analizirani su i najvažniji transkripcioni faktori uključeni u regulaciju steroidogeneze. Jedan od ključnih pozitivnih regulatora, *Sf1*, na nivou iRNK nije pokazao dnevna variranja (Sl. 5.3, Tabela 5.3), ali drugi pozitivan regulator *Nur77* pokazao je snažne cirkadijalne oscilacije na nivou transkripcije sa pikom oko sredine svetle faze (Sl. 5.3, Tabela 5.3). *Dax1* i *Gata4* nisu pokazali dnevna variranja na nivou transkripcije (Tabela 5.3).



Slika 5.3 Cirkadijalni obrazac nivoa ekspimiranja gena za elemente steroidogeneze. Adultni Wistar pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, gde ZT0 predstavlja momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije i upotrebljene za izolaciju RNK. Relativna ekspimiranost gena uključenih u steroidogenezu dobijena je RQ-PCR metodom. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Rezultati su dalje analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva kao i parametri ritma (za parametre ritma Mesor, Amplituda i Akrofaza pogledati tabelu 5.3).

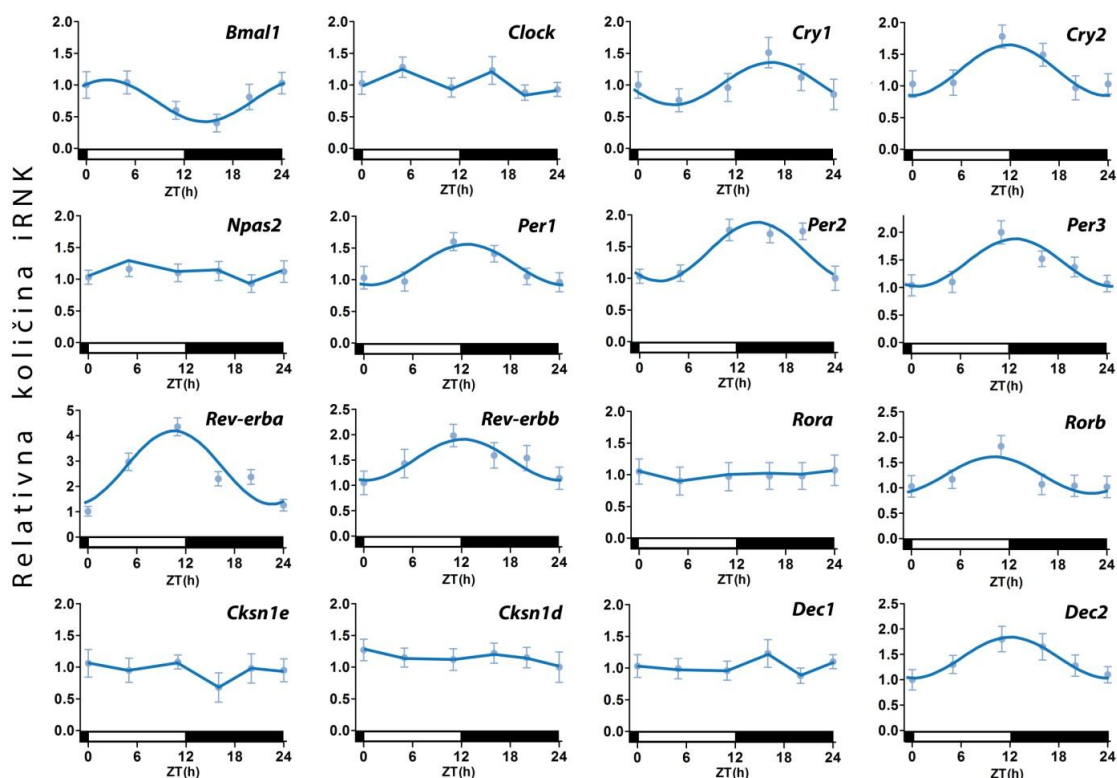
Tabela 5.3 Parametri ritma – steroidogeni elementi. Adultni Wistar pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije koje su poslužile za izolaciju RNK i određivanje relativne eksprimiranosti gena uključenih u steroidogenezu. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Lhr</i>	3m	0.504705			
<i>Star</i>	3m	0.006462	1.0184	0.3608	84° / 05 h 38 min
<i>Cyp11a1</i>	3m	0.044136	1.1037	0.3056	86° / 05 h 45 min
<i>Cyp17a1</i>	3m	0.002132	0.9805	0.3874	93° / 06 h 11 min
<i>Hsd3b1/2</i>	3m	0.734735			
<i>Hsd17b4</i>	3m	0.383615			
<i>Nur77</i>	3m	0.000030	1.7846	1.0483	104° / 06 h 55 min
<i>Sf1</i>	3m	0.992938			
<i>Dax1</i>	3m	0.562156			
<i>Gata4</i>	3m	0.628872			

5.1.4. Cirkadijalni profil eksprimiranja gena biološkog časovnika

Iako postoje podaci da je ispravno funkcionisanje molekularnog biološkog časovnika važno za fertilitet i normalnu produkciju testosterona (Alvarez i sar., 2008), cirkadijalne fluktuacije i uloga pojedinačnih gena biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama još uvek nije pokazana. Kao osnovu za ovakva istraživanja pokušali smo da definišemo cirkadijalni obrazac transkripcije gena biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama. Jedan od najvažnijih gena biološkog časovnika, *Bmal1*, pokazao je dnevna variranja u transkripciji, gde se pik javio 2-3 sata nakon početka svetle faze (Sl. 5.4, Tabela 5.4). Druga dva člana bHLH-PAS familije transkripcionih faktora, *Clock* i *Npas2*, nisu pokazali ritmičnost na nivou iRNK (Sl. 5.4, Tabela 5.4). Svi *Period* geni su pokazali dnevne oscilacije u transkripciji i to tako da se prvo javlja pik u transkripciji *Per1* i *Per3* gena početkom tamne faze, a zatim, dva sata kasnije i pik *Per2* gena (Sl. 5.4, Tabela 5.4). Druga dva elementa primarne negativne povratne petlje, *Cry* geni, takođe su pokazali ritam, gde prvo dolazi do pika *Cry2*, na prelazu iz svetle u tamnu fazu, a sredinom tamne faze i do pika *Cry1* gena (Sl. 5.4, Tabela 5.4). Kada su u pitanju negativni regulatori, pripadnici sekundarne petlje, *Rev-erba* i *Rev-erbb*, najveći stepen transkripcije desio se blizu ili na samom prelazu iz svetle u tamnu fazu (Sl. 5.4, Tabela 5.4). Ovde

treba napomenuti da je *Rev-erba* detektovan kao gen sa najvećom amplitudom u transkripciji od svih ispitivanih gena biološkog časovnika (Sl. 5.4, Tabela 5.4). Analizirajući pozitivne regulatore sekundarne petlje, samo je *Rorb* pokazao ritmičnost u transkripciji sa pikom oko ZT10 (Sl. 5.4, Tabela 5.4). Od članova *Dec* petlje, kod *Dec2* su zabeležene cirkadijane oscilacije u transkripciji sa pikom oko ZT12 (Sl. 5.4, Tabela 5.4) dok je transkripcija *Dec1* bila konstantna poredeći različite vremenske tačke u toku dana (Sl. 5.4, Tabela 5.4). Kazein kinaze (*Cksn1e*, *Cksn1d*), enzimi izuzetno vazni za definisanje dužine perioda cirkadijalnih ritmova, nisu pokazivale dnevne oscilacije na nivou iRNK u Lajdigovim ćelijama Wistar pacova (Sl. 5.4, Tabela 5.4).



Slika 5.4 Cirkadijalni obrazac ekspimiranja gena biološkog časovnika. Adultni (3 meseca stari) Wistar pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, gde ZT0 predstavlja momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije i upotrebljene za izolaciju RNK. Relativna ekspimiranost gena analizirana je RQ-PCR metodom. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva kao i parametri ritma (za parametre ritma kao što su Mesor, Amplituda i Akrofaza pogledati tabelu 5.4).

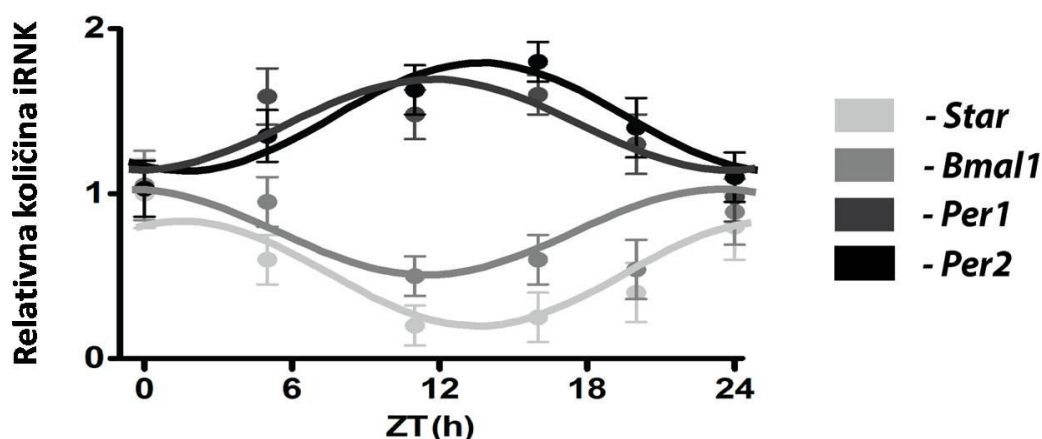
Tabela 5.4 Parametri ritma – elementi biološkog časovnika. Adultni Wistar pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije koje su poslužile za izolaciju RNK i određivanje relativne ekspimiranosti gena biološkog časovnika. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	P	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Clock</i>	3m	0.521318			
<i>Bmal1</i>	3m	0.006229	0.7687	0.3275	36° / 02 h 24 min
<i>Npas2</i>	3m	0.505430			
<i>Per1</i>	3m	0.001842	1.2306	0.3149	192° / 12 h 46 min
<i>Per2</i>	3m	0.000248	1.4357	0.4609	221° / 14 h 42 min
<i>Per3</i>	3m	0.001204	1.4332	0.4261	190° / 12 h 42 min
<i>Cry1</i>	3m	0.014517	1.0337	0.3334	249° / 16 h 36 min
<i>Cry2</i>	3m	0.001907	1.3358	0.4242	177° / 11 h 48 min
<i>Rev-erba</i>	3m	0.000056	2.7084	1.4235	158° / 10 h 32 min
<i>Rev-erbb</i>	3m	0.009687	1.5373	0.3934	182° / 12 h 09 min
<i>Rora</i>	3m	0.842665			
<i>Rorb</i>	3m	0.013688	1.2719	0.3478	151° / 10 h 06 min
<i>Cksn1e</i>	3m	0.551096			
<i>Cksn1d</i>	3m	0.925905			
<i>Dec1</i>	3m	0.520331			
<i>Dec2</i>	3m	0.000017	1.3405	0.4946	181° / 12 h 02 min

5.1.5. Analiza ritma primarne kulture Lajdigovih ćelija pacova

Nakon *in vivo* analize cirkadijalnih oscilacija u transkripciji gena uključenih u steroidogenezu, kao i gena biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama Wistar pacova, nametnulo se pitanje da li se ti ritmovi održavaju i u primarnoj kulturi ovih ćelija. Da bi ovo ispitali uspostavljena je primarna kultura Lajdigovih ćelija i nakon sinhronizacije (što je označeno sa ZT0) ćelije su sakupljane u različitim vremenskim tačkama. U analizi je korišćen *Star*, kao ključan gen za regulaciju steroidogeneze (Stocco i sar., 2005). Ovaj gen je pokazao oscilacije u transkripciji i u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija sa pikom oko ZT1 (Sl. 5.5, Tabela 5.5). Analizirani su i najvažniji geni biološkog časovnika, *Bmal1*, *Per1* i *Per2* (Ko i Takahashi, 2006). Cirkadijalni profil ekspimiranja *Bmal1* gena bio je sličan profilu *Star* gena, tj. najjača transkripcija oba gena desila se oko momenta sinhronizacije, a onda je postepeno padala da bi se nakon 24h vratila na početni nivo (Sl. 5.5, Tabela 5.5). Kada su u pitanju *Period* geni, oni su takođe zadržali ritmičnost u primarnoj

kulturi Lajdigovih ćelija, pokazujući najveću količinu iRNK oko ZT12-ZT13 (Sl. 5.5, Tabela 5.5). Iako sa malim razlikama u akrofazi, *Bmal1* i *Star* geni pokazuju sličan transkripcioni profil gde su ova dva gena u obrnutoj fazi u poređenju sa *Period* genima (Sl. 5.5, Tabela 5.5). Ovakav odnos cirkadijalne transkripcije analiziranih gena vrlo je sličan onom koji je dobijen *in vivo* pristupom. Iz ovoga proizilazi zaključak da je ritmična transkripcija ispitivanih gena očuvana i u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija bar u prvih 24h nakon izolacije.



Slika 5.5 Cirkadijalni obrazac nivoa eksprimiranosti gena u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija. Lajdigove ćelije su izolovane iz adultnih Wistar pacova i zalepljene na 55mm petri ploče (3×10^6 ćelija po ploči). Nakon perioda oporavka i sinhronizacije (ZT0), ćelije su skupljane u različitim vremenskim tačkama i iskorišćene za izolaciju RNK. Relativna eksprimiranost *Star*, *Bmal1*, *Per1* i *Per2* gena praćena je RQ-PCR metodom. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva kao i parametri ritma (za parametre ritma Mesor, Amplituda i Akrofaza pogledati tabelu 5.5).

Tabela 5.5 Parametri ritma eksprimiranosti gena u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija. Nakon sinhronizacije primarne kulture Lajdigovih ćelija dobijenih od adultnih Wistar pacova, iz ćelija je izolovana RNK i određena relativna eksprimiranost *Star*, *Bmal1*, *Per1* i *Per2* gena. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Star</i>	3m	0.040073	0.6868	0.2675	20° / 01 h 20 min
<i>Bmal1</i>	3m	0.004805	0.4164	0.3311	346° / 23 h 05 min
<i>Per1</i>	3m	0.035064	1.3984	0.2851	171° / 11 h 23 min
<i>Per2</i>	3m	0.008538	1.4375	0.3566	201° / 13 h 25 min

5.2. Putevi sinhronizacije biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama pacova

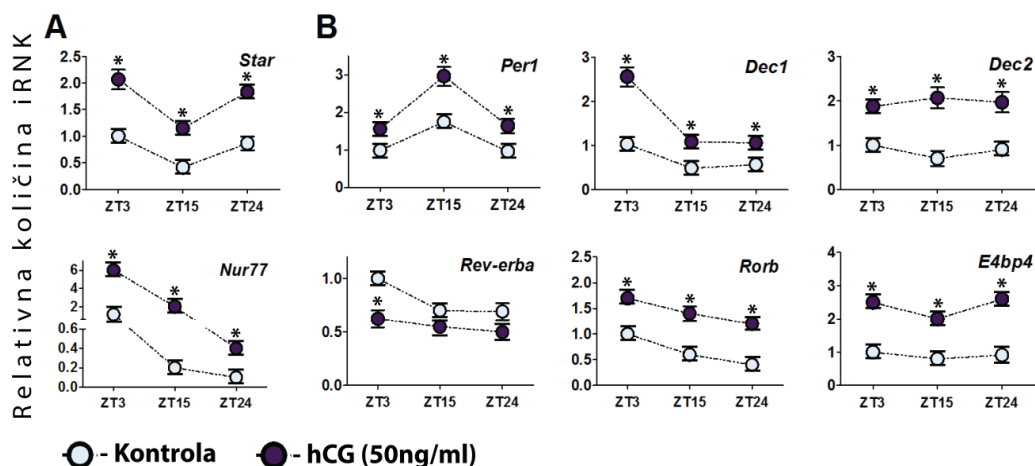
Drugi deo teze je orijentisan na ispitivanje potencijalnog uključivanja signalizacije preko cAMP u sinhronizaciju ritma adultnih Lajdigovih ćelija. Sa tim u vezi postavljena je hipoteza po kojoj signalizacija preko ovog cikličnog nukleotida ima značajnu ulogu za sinhronizaciju ritma ovih ćelija. Hipotezu smo proverili na modelima sa poremećenom homeostazom androgena: hipogonadotropnog hipogonadizma, staračkog hipogonadizma, pinealektomisanih životinja; kao i na kulturi izolovanih Lajdigovih ćelija.

5.2.1. Efekat stimulacije LH-cAMP signalizacije u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija na eksprimiranje gena biološkog časovnika

Da bi ispitali direktan efekat aktivacije LH-cAMP signalnog puta na transkripciju gena biološkog časovnika, primarna kultura Lajdigovih ćelija je u određenim vremenskim tačkama (ZT0-3, ZT12-15, ZT21-24) stimulirana sa hCG, analogom luteinizirajućeg hormona.

Praćenjem transkripcije *Star* i *Per1* gena (Sl. 5.6A,B) potvrđeni su rezultati prikazani u figuri 5.5, a koji govore o cirkadijalnom eksprimiranju ovih gena u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija. Sa druge strane, pokazano je da transkripcija *Nur77* gena u kulturi gubi ritmičnost i tokom vremena konstantno opada (Sl. 5.6A).

Tretman sa hCG ipak podiže transkripciju ovog gena, kao i *Star* gena, u sve tri vremenske tačke, što ukazuje na uspešnost samog tretmana (Stocco i sar., 2005; Tremblay, 2015) (Sl. 5.6A). Kada su u pitanju geni biološkog časovnika, hCG je podigao eksprimiranost *Per1*, *Dec1*, *Dec2*, *Rorb* i *E4bp4* gena (Sl. 5.6B). Jedini gen kod koga je uočen obrnut efekat, tj. snižena transkripcija, je *Rev-erba*. Iako je statistička značajnost detektovana samo u prvom vremenu, ovakav trend je bio prisutan u sve tri vremenske tačke (Sl. 5.6B). Pored pomenutih ispitani su i drugi geni biološkog časovnika, kao što su: *Clock*, *Npas2*, *Bmal1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rora*, *Rev-erbb*, *Cksn1e*, *Cksn1d* i *Dbp*. Ipak, stimulacija sa hCG nije imala značajan efekat na transkripciju ovih gena (rezultati nisu prikazani).



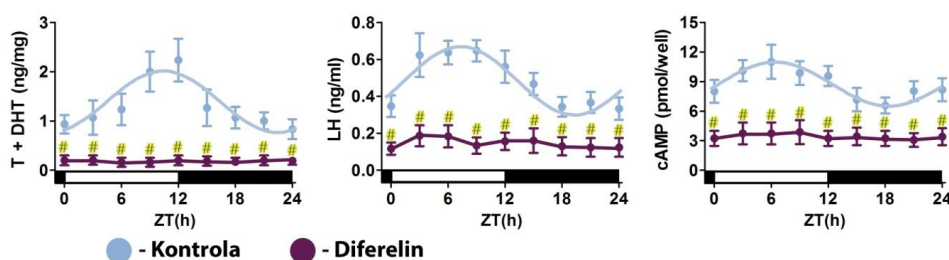
Slika 5.6 *In vitro* efekat hCG na eksprimiranje gena biološkog časovnika u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija. Primarna kultura Lajdigovih ćelija (3×10^6 ćelija / 55mm petri ploči) je uspostavljena od adultnih životinja. Kultura je inkubirana sa ili bez hCG (50 ng/mL), 3h u tri vremenske tačke, ZT0-ZT3, ZT12-ZT15 i ZT21-ZT24. Nakon inkubacije ćelije su lizirane, izolovana je RNK i RQ-PCR metodom praćena transkripcija *Star* i *Nur77* gena (A), kao i gena biološkog časovnika (B). Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. * Statistička značajnost između eksperimentalne i kontrolne grupe ($p < 0,05$).

5.2.2. Efekat poremećene LH-cAMP signalizacije na obrazac eksprimiranja gena biološkog časovnika i gena povezanih sa steroidogenezom na modelu hipogonadotropnog hipogonadizma

Model hipogonadotropnog hipogonadizma je jedan od pristupa koji ima za cilj da ispita efekat snižene LH-cAMP signalizacije u sinhronizaciji biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama. Eksperimentalni model je dobijen upotrebom GnRH agoniste (opisano u poglavlju 4.3.1). Uspešnost tretmana je verifikovana smanjenjem veličine testisa, kao i merenjem testosterona i LH u serumu.

5.2.2.1. Cirkadijalni profil produkcije hormona i cAMP

Kao što je bilo očekivano, aplikacija diferelina je značajno spustila nivo i ukinula cirkadijalne fluktuacije LH u serumu (Sl. 5.7, Tabela 5.6). Isti efekat je zabeležen i kada je praćena serumska koncentracija testosterona, ali i koncentracija cAMP u Lajdigovim ćelijama dobijenim od eksperimentalnih životinja (Sl. 5.7).



Slika 5.7 Cirkadijalni obrazac nivoa hormona u serumu i cAMP u Lajdigovim ćelijama. Pacovi C (kontrola) i D (diferelin) grupe su žrtvovani u devet vremenskih tačaka u toku dana (TZ0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18, ZT21, ZT24, ZT0 - momenat paljenja svetla), nakon čega je sakupljen serum radi merenja nivoa hormona (T+DHT, LH), a Lajdigove ćelije su izolovane i u njima je određena koncentracija cAMP. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva, kao i parametri ritma (tabela 5.6). # Statistička značajnost između D i C grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

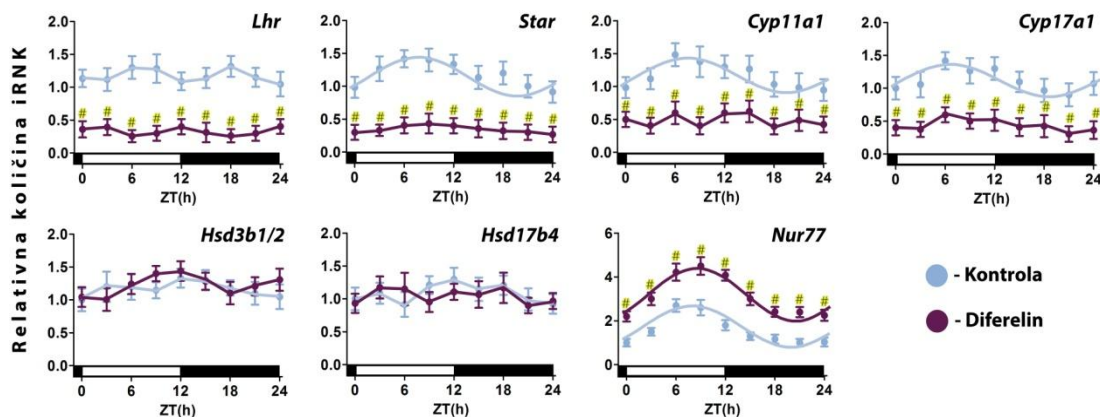
Tabela 5.6 Parametri ritma – Testosteron, LH, cAMP Pacovi C (kontrola) i D (diferelin) grupe su žrtvovani u devet vremenskih tačaka u toku dana nakon čega je sakupljen serum radi merenja nivoa hormona (T+DHT, LH), a Lajdigove ćelije su izolovane i u njima je određena koncentracija cAMP. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
T+DHT	C	0.001815	1.3519	0.564	161° / 10 h 44 min
	D	0.750332			
LH	C	0.000256	0.4905	0.1762	121° / 8 h 09 min
	D	0.120789			
cAMP	C	0.004307	8.749	1.9701	98° / 6 h 32 min
	D	0.492315			

5.2.2.2. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena uključenih u steroidogenezu

Smanjen nivo hormona i cAMP u hipogonadalnoj grupi, prate i promene u transkripciji mnogih gena uključenih u steroidogenezu: ekspimiranje LH receptora bilo je značajno niže u svim posmatranim vremenskim tačkama (Sl. 5.8); ekspimiranje *Star*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1* gena je bilo sniženo i bez značajnih cirkadijalnih fluktuacija (Sl. 5.8, Tabela 5.7). Kod enzima iz familije hidroksisteroid dehidrogenaza, *Hsd3b1/2* i *Hsd17b4*, nisu zabeležene nikakve promene (Sl. 5.8, Tabela 5.7). Transkripcija pozitivnog regulatora steroidogeneze, *Nur77*, bila je značajno viša, poredeći eksperimentalnu grupu sa kontrolnom, ali je cirkadijalni

ritam ipak sačuvan (Sl. 5.8, Tabela 5.7). Na eksprimiranje *Creb1*, *Sf1*, *Gata4* i *Dax1*, poremećaj HPT osovine u ovom modelu nije imao značajnog uticaja (rezultati nisu prikazani).



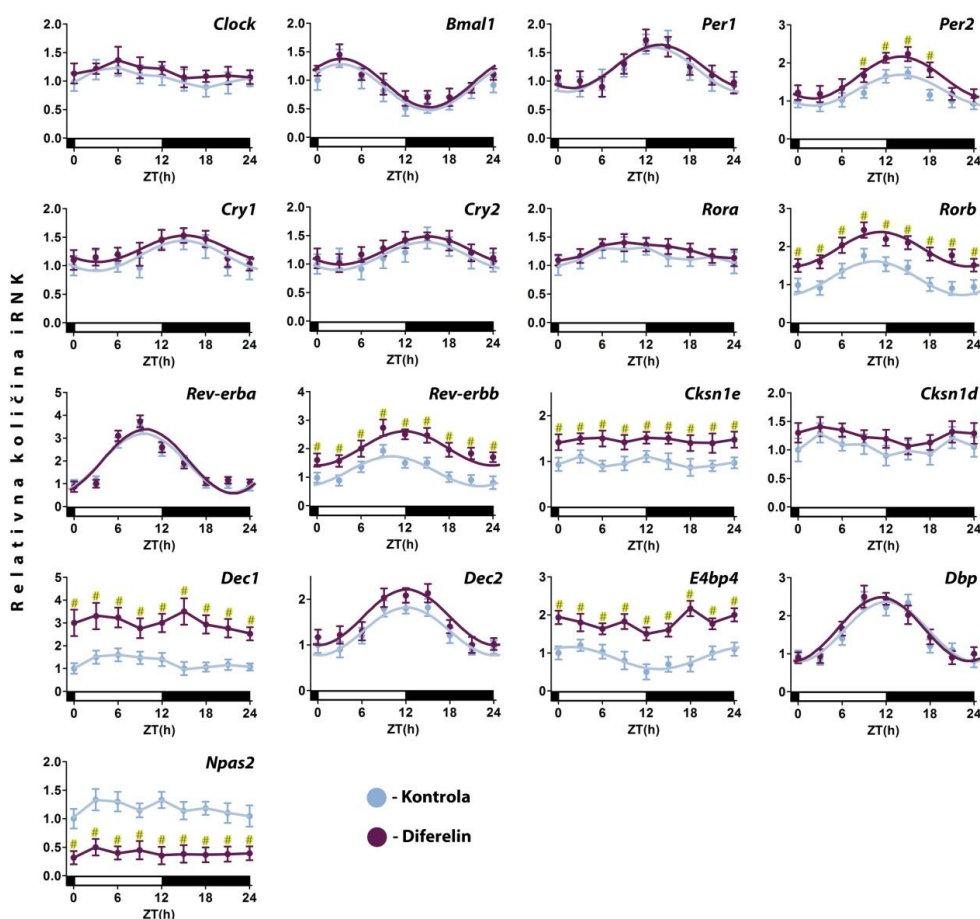
Slika 5.8 Cirkadijalni obrazac ekspresiranosti gena uključenih u steroidogenezu. Pacovi C (kontrola) i D (diferelin) grupe su žrtvovani u devet vremenskih tačaka u toku dana (ZT0 - momentat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne ekspresiranosti gena uključenih u steroidogenezu. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva, kao i parametri ritma (tabela 5.7). # Statistička značajnost između D i C grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Tabela 5.7 Parametri ritma – geni uključeni u steroidogenezu. Pacovi C (kontrola) i D (diferelin) grupe su žrtvovani u devet vremenskih tačaka u toku dana. Iz izolovanih Lajdigovih ćelija je dobijena RNK i zatim određena relativna ekspresiranost gena uključenih u steroidogenezu. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period je fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Lhr</i>	C	0.723015			
	D	0.698715			
<i>Star</i>	C	0.003771	1.1644	0.3167	115° / 7 h 40 min
	D	0.103465			
<i>Cyp11a1</i>	C	0.042681	1.1965	0.2623	119° / 7 h 57 min
	D	0.423354			
<i>Cyp17a1</i>	C	0.047758	1.0564	0.3002	108° / 7 h 16 min
	D	0.723966			
<i>Hsd3b1/2</i>	C	0.231551			
	D	0.088213			
<i>Hsd17b4</i>	C	0.195344			
	D	0.655331			
<i>Nur77</i>	C	0.000012	1.6198	0.8470	124° / 8 h 16 min
	D	0.000002	3.2146	1.1923	136° / 9 h 05 min

5.2.2.3. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena biološkog časovnika

Glavna informacija koju smo želeli da dobijemo ovim eksperimentalnim pristupom je kako će poremećaj HPT osovine uticati na elemente molekularnog časovnika u Lajdigovim ćelijama. Hipogonadotropni hipogonadizam izazvan diferelinom nije imao uticaj na transkripciju *Clock* i *Bmal1* gena (Sl. 5.9). Međutim, ekspimiranje trećeg člana bHLH-PAS familije i funkcionalnog analoga *Clock* genu, *Npas2*, je bilo značajno smanjeno (Sl. 5.9). Transkripcija *Per2* gena bila je viša u eksperimentalnoj grupi, mada je cirkadijalni ritam ostao očuvan (Sl. 5.9, Tabela 5.8). U slučaju *Per1* gena nisu detektovane nikakve promene. Ekspimiranost druga dva negativna elementa primarne petlje, *Cry1* i *Cry2*, nije bila promenjena (Sl. 5.9).



Slika 5.9 Cirkadijalni obrazac ekspimiranosti gena biološkog časovnika. C Pacovi C (kontrola) i D (diferelin) grupe su žrtvovani u devet vremenskih tačaka u toku dana nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. RNK je poslužila za analizu relativne ekspimiranosti gena biološkog časovnika. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva, kao i parametri ritma (Tabela 5.8) # Statistička značajnost između D i C grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$)

Tabela 5.8 Parametri ritma – geni biološkog časovnika. Pacovi C (kontrola) i D (diferelin) grupe su žrtvovani u devet vremenskih tačaka u toku dana. Iz izolovanih Lajdigovih ćelija je dobijena RNK i zatim određena relativna eksprimiranost gena biološkog časovnika. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period je fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Clock</i>	C	0.169009			
	D	0.272477			
<i>Bmal1</i>	C	0.000494	0.8257	0.3395	48° / 3 h 10 min
	D	0.000120	0.9420	0.3326	47° / 3 h 09 min
<i>Npas2</i>	C	0.373489			
	D	0.783265			
<i>Per1</i>	C	0.000316	1.2140	0.3655	203° / 13 h 32 min
	D	0.000868	1.2452	0.3368	208° / 13 h 52 min
<i>Per2</i>	C	0.000333	1.3134	0.3566	214° / 14 h 12 min
	D	0.000028	1.5977	0.5434	209° / 13 h 55 min
<i>Cry1</i>	C	0.039331	1.1751	0.2755	227° / 15 h 08 min
	D	0.045190	1.2235	0.2644	232° / 15 h 28 min
<i>Cry2</i>	C	0.037848	1.1056	0.2531	225° / 15 h 01 min
	D	0.020584	1.1654	0.2835	227° / 15 h 07 min
<i>Rora</i>	C	0.181459			
	D	0.281330			
<i>Rorb</i>	C	0.000294	1.243	0.3968	159° / 10 h 35 min
	D	0.000196	1.923	0.4007	167° / 11 h 07 min
<i>Rev-erba</i>	C	0.000001	1.8727	1.2371	142° / 9 h 29 min
	D	0.000002	1.9464	1.295	142° / 9 h 28 min
<i>Rev-erbb</i>	C	0.000168	1.2548	0.4563	159° / 10 h 37 min
	D	0.000252	2.0975	0.5141	179° / 11 h 55 min
<i>Dec1</i>	C	0,055906			
	D	0.801450			
<i>Dec2</i>	C	0.000017	1.3405	0.4946	181° / 12 h 02 min
	D	0.000019	1.6083	0.5922	177° / 11 h 49 min
<i>Csnk1e</i>	C	0.725353			
	D	0.879869			
<i>Csnk1d</i>	C	0.606068			
	D	0.137690			
<i>Dbp</i>	C	0.000003	1.5628	0.802	179° / 11 h 55 min
	D	0.000001	1.6238	0.8269	170° / 11 h 19 min
<i>E4bp4</i>	C	0.005990	0.8656	0.2807	29° / 1 h 55 min
	D	0.145765			

Od pozitivnih elemenata sekundarne petlje, ekspresiranost gena *Rora* nije bila promenjena, dok je u slučaju *Rorb* ona bila povišena zadržavajući cirkadijalnu ritmičnost (Sl. 5.8, Tabela 5.8). Od negativnih elemenata sekundarne petlje, ekspresiranost *Rev-erba* nije bila promenjena dok je pojačana ekspresiranost uočena kod gena *Rev-erbb*, bez uticaja na dnevnu ritmičnost (Sl. 5.8, Tabela 5.8). Zabeležen je porast transkripcije obe ispitivane kazein kinaze, stim da je efekat bio jači u slučaju *Cksn1e* (Sl. 5.8). Transkripcija *Dec1* gena, još jednog od elementa molekularnog časovnika, bila je značajno povišena, mada konstantna u toku dana (Sl. 5.8, Tabela 5.8). Sa druge strane, cirkadijalni obrazac transkripcije *Dec2* gena nije bio promenjen (Sl. 5.8, Tabela 5.8). Pored pomenutih, ispitana su još dva gena koja su odgovorna za pravilno funkcionisanje molekularnog časovnika, ali i za širenje informacije o ritmu na druge gene preko vezivanja za D-box u njihovim promotorima. Transkripcija *Dbp* gena (pozitivan regulator) nije bila promenjena, ali je tretman diferelinom značajno podigao transkripciju *E4bp4* gena (negativan regulator) u svim ispitivanim vremenskim tačkama (Sl. 5.8, Tabela 5.8).

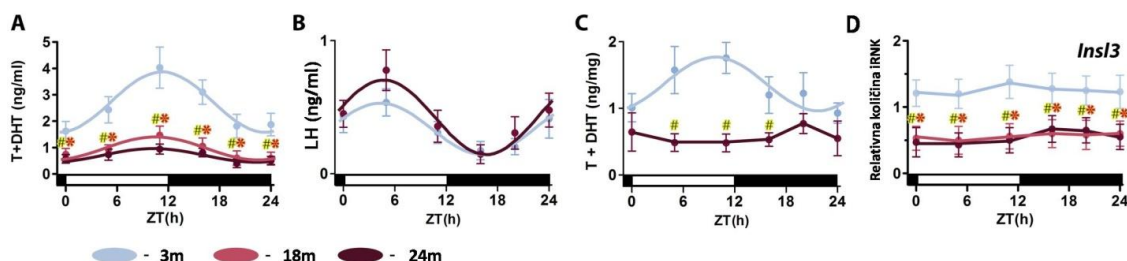
5.2.3. Efekat poremećene LH-cAMP signalizacije na obrazac ekspresiranja gena biološkog časovnika i gena povezanih sa steroidogenezom na modelu staračkog hipogonadizma

Tokom starenja pacova i ljudi nastaje primarni hipogonadizam i hipofunkcija Lajdigovih ćelija praćena smanjenom produkcijom testosterona u prisustvu nepromenjenog ili povišenog nivoa LH ali smanjenim intracelularnim nivoom cAMP (Tajar i sar., 2010; Sokanovic i sar., 2014). Da bi pratili efekat poremećene cAMP signalizacije koji se javlja u ovom modelu na rad perifernog biološkog časovnika i steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama korišćene su tri starosne grupe pacova, 18 i 24 meseca (18m i 24m) i kontrola, životinje stare 3-4 meseca (3m).

5.2.3.1. Cirkadijalni profil endokrine funkcije Lajdigovih ćelija

Da bi okarakterisali funkcionalnost Lajdigovih ćelija kod pacova starog fenotipa praćen je cirkadijalni profil koncentracije serumskog testosterona i LH.

Koncentracija serumskog testosterona značajno je bila niža u obe eksperimentalne grupe, 18m i 24m, u poređenju sa adultima, ali je ipak dnevna ritmičnost ostala očuvana (Sl. 5.10A, Tabela 5.9). Nivo serumskog LH nije bio promenjen kod životinja starih 24 meseca (Sl. 5.10B, Tabela 5.9).



Slika 5.10 Cirkadijalni ritam endokrine funkcije Lajdigovih ćelija. Tri uzrasne grupe pacova (3m, 18m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana. Iz seruma je izmeren nivo testosterona (A) i LH (B). Iz izolovanih Lajdigovih ćelija su estrahovani steroidi i meren je testosteron (C), a dobijena je RNK je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti *Insl3* gena (D). Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva i parametri ritma (Tabela 5.9). * Statistička značajnost između 3m i 18m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$). # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Tabela 5.9 Parametri ritma – Testosteron (serumski, S), LH, testosteron (iz ćelija, Lć), *Insl3*. 3m, 18m i 24m pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana nakon čega je sakupljen serum radi merenja nivoa hormona (testosteron S, LH), a Lajdigove ćelije su izolovane i u njima je određena koncentracija testosterona (testosteron Lć) i relativna eksprimiranost *Insl3* gena. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
Testosteron S	3m	0.000777	2.7394	1.1527	169° / 11 h 17 min
	18m	0.009664	0.9920	0.4118	160° / 10 h 39 min
	24m	0.021770	0.7138	0.2426	154° / 10 h 18 min
LH	3m	0.003149	0.3438	0.1924	68° / 04 h 31 min
	24m	0.005284	0.4221	0.2811	71° / 04 h 44 min
Testosteron Lć	3m	0.022200	1.3725	0.3943	144° / 09 h 37 min
	24m	0.339343			
<i>Insl3</i>	3m	0.653172			
	18m	0.881565			
	24m	0.357853			

Takođe, u Lajdigovim ćelijama izolovanim iz životinja starih 24m, sadržaj testosterona je bio značajno smanjen i bez izraženog rima (Sl. 5.10C, Tabela 5.9). Ekspimiranje *Inls3* gena, još jednog parametra funkcionalnosti Lajdigovih ćelija, bilo je značajno niže u starenju (Sl. 5.10D). U ovom slučaju nisu detektovana dnevna variranja ni kod adultnih ni kod životinja starog fenotipa (Tabela 5.9).

5.2.3.2. Cirkadijalne fluktuacije lipida u serumu i ekspimiranost gena uključenih u metabolizam holesterola

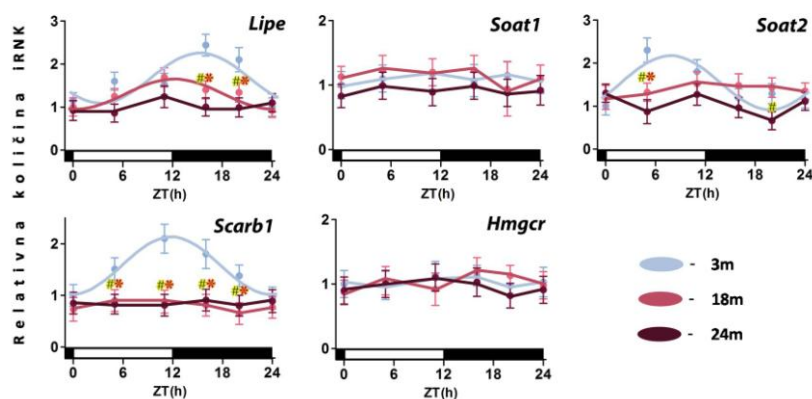
S obzirom da produkcija testosterona jednim delom zavisi i od preuzimanja holesterola iz cirkulacije analiziran je cirkadijalni ritam lipidnih parametara u serumu mladih i starih pacova. Rezultati su pokazali da je koncentracija VLDL i triglicerida vrlo stabilna tokom starenja (Tabela 5.10). Sa druge strane, starenje je imalo obrnut efekat na HDL i LDL u serumu: koncentracija HDL holesterola je značajno smanjena kod životinja starih 24 meseca, dok je LDL holesterol bio povišen u obe grupe starih životinja, 18m i 24m (Tabela 5.10). Od analiziranih parametara samo je LDL holesterol pokazao cirkadijalne oscilacije (sa pikom oko ZT3) i ova ritmičnost je sačuvana i u starenju (Tabela 5.10).

Uticaj starenja je praćen i na cirkadijalni obrazac transkripcije gena uključenih u metabolizam holesterola u Lajdigovim ćelijama pacova. Gen koji kodira hormon senzitivnu lipazu (*Lipe*), enzim koji konvertuje holesterol estre iz lipidnih kapi u slobodan holesterol, pokazao je cirkadijalni ritam u svojoj transkripciji u 3m i 18m grupi, ali je on izgubljen kod životinja starih 24 meseca (Sl. 5.11, Tabela 5.11). Nivo transkripcije ovog gena bio je snižen u starenju (Sl. 5.11). Praćeno je ekspimiranje i sterol O-acetiltransferaza 1 i 2 (*Soat1*, *Soat2*) enzima sa funkcijom suprotnom funkciji hormon senzitivne lipaze (HSL). Transkripcija *Soat2* gena je bila ritmična kod adulta ali je u starenju ritam izgubljen (Sl. 5.11, Tabela 5.11). Transkripcija *Soat1* gena nije bila ritmična niti je starenje dovelo do uočljivih promena (Sl. 5.11, Tabela 5.11). Transkripcija gena koji kodira HDL receptor, *Scarb1*, pokazuje cirkadijalni ritam koji se gubi u starenju uz pad nivoa transkripcije (Sl. 5.11, Tabela 5.11). Najvažniji gen *de novo* sinteze holesterola, *Hmgcr*, nije bio promenjen starenjem životinja (Sl. 5.11, Tabela 5.11).

Tabela 5.10 Lipidni status u serumu. 3m, 18m i 24m stari pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0 - moment paljenja svetla), nakon čega je sakupljen serum radi određivanja cirkadijalnog obrasca parametara lipidnog statusa.

Grupa		HOLEST. (mmol/l)	HDL hol. (mmol/l)	ne-HDL (mmol/l)	TRIGLIC. (mmol/l)	LDL hol. (mmol/l)	VLDL hol. (mmol/l)
3m	ZT0	0.84 ± 0.17	0.47 ± 0.08	0.37 ± 0.06	0.58 ± 0.11	0.11 ± 0.02	0.26 ± 0.05
	ZT5	0.87 ± 0.15	0.42 ± 0.07	0.45 ± 0.08	0.59 ± 0.11	0.18 ± 0.03	0.27 ± 0.05
	ZT11	0.83 ± 0.18	0.46 ± 0.09	0.37 ± 0.06	0.70 ± 0.14	0.05 ± 0.01	0.32 ± 0.06
	ZT16	0.70 ± 0.10	0.44 ± 0.08	0.27 ± 0.05*	0.53 ± 0.10	0.03 ± 0.01*	0.24 ± 0.05
	ZT20	0.77 ± 0.15	0.50 ± 0.11	0.27 ± 0.04*	0.76 ± 0.12	0.04 ± 0.01	0.35 ± 0.08
	ZT24	0.87 ± 0.17	0.45 ± 0.08	0.42 ± 0.08	0.82 ± 0.15	0.09 ± 0.01	0.37 ± 0.08
18m	ZT0	0.86 ± 0.16	0.41 ± 0.07	0.46 ± 0.08	0.52 ± 0.09	0.22 ± 0.04#	0.24 ± 0.05
	ZT5	0.91 ± 0.20	0.46 ± 0.08	0.45 ± 0.08	0.39 ± 0.08	0.27 ± 0.05#	0.18 ± 0.04
	ZT11	0.81 ± 0.15	0.41 ± 0.07	0.40 ± 0.09	0.45 ± 0.08	0.20 ± 0.05#	0.20 ± 0.05
	ZT16	0.81 ± 0.17	0.48 ± 0.08	0.33 ± 0.01*	0.55 ± 0.11	0.08 ± 0.02#*	0.25 ± 0.06
	ZT20	0.94 ± 0.18	0.54 ± 0.09	0.40 ± 0.07	0.59 ± 0.13	0.13 ± 0.04#	0.27 ± 0.06
	ZT24	1.01 ± 0.18	0.55 ± 0.10	0.45 ± 0.08	0.53 ± 0.15	0.21 ± 0.05#	0.24 ± 0.05
24m	ZT0	1.05 ± 0.19	0.21 ± 0.07#	0.73 ± 0.13#	0.66 ± 0.10	0.43 ± 0.08#	0.30 ± 0.06
	ZT5	0.94 ± 0.16	0.22 ± 0.06#	0.72 ± 0.10#	0.70 ± 0.14	0.40 ± 0.07#	0.32 ± 0.07
	ZT11	0.81 ± 0.15	0.14 ± 0.03#	0.66 ± 0.09#	0.61 ± 0.12	0.38 ± 0.07#	0.28 ± 0.05
	ZT16	0.62 ± 0.16	0.14 ± 0.04#	0.46 ± 0.08#*	0.41 ± 0.11*	0.28 ± 0.05#*	0.19 ± 0.04*
	ZT20	0.81 ± 0.14	0.19 ± 0.05#	0.61 ± 0.09#	0.52 ± 0.11	0.37 ± 0.08#	0.24 ± 0.05
	ZT24	0.82 ± 0.15	0.14 ± 0.03#	0.68 ± 0.08#	0.66 ± 0.13	0.40 ± 0.09#	0.30 ± 0.05

* statistička značajnost u odnosu na ZT0 ($p < 0,05$), # statistička značajnost u odnosu na istu vremensku tačku 3m grupe



Slika 5.11 Cirkadijalni obrazac nivoa ekspresiranosti gena uključenih u metabolizam holesterola. Tri uzrasne grupe Wistar pacova (3m, 18m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana, nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne ekspresiranosti *Lipe*, *Soat1*, *Soat2*, *Scarb1* i *Hmgcr* gena. Tačke predstavljaju srednju vrednost ± SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva i parametri ritma (Tabela 5.11). * Stat. značajnost između 3m i 18m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$). # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

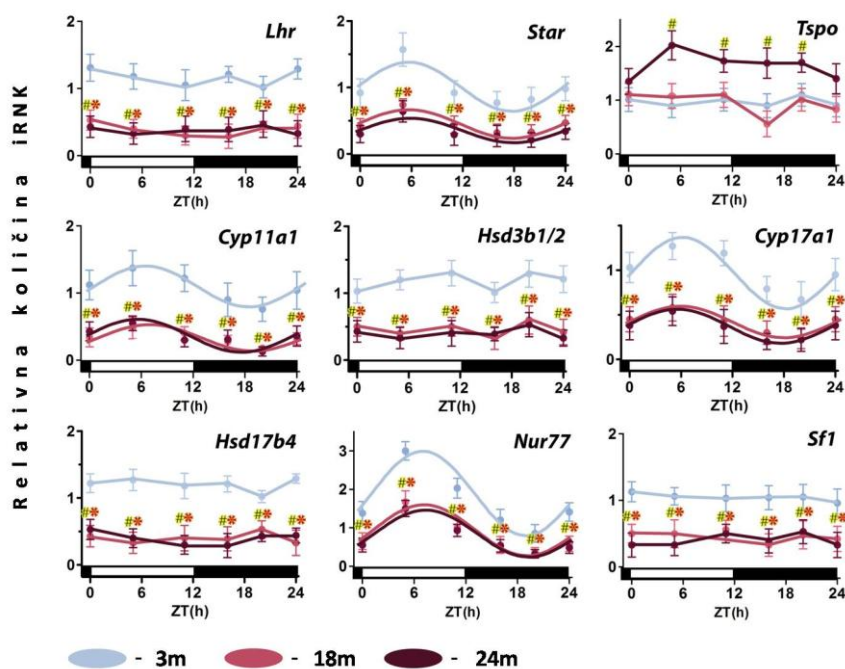
Tabela 5.11 Parametri ritma – geni uključeni u metabolizam holesterola. 3m, 18m i 24m stari pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana. Iz izolovanih Lajdigovih ćelija je dobijena RNK i zatim određena relativna eksprimiranost gena uključenih u metabolizam holesterola. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Lipe (Hsl)</i>	3m	0.007279	1.3355	0.3285	184° / 12 h 14 min
	18m	0.006372	1.6765	0.5809	232° / 15 h 27 min
	24m	0.689812			
<i>Soat1</i>	3m	0.905442			
	18m	0.654985			
	24m	0.935548			
<i>Soat2</i>	3m	0.001574	1.5436	0.6338	117° / 7 h 47 min
	18m	0.512130			
	24m	0.821208			
<i>Scarb1</i>	3m	0.000410	1.5783	0.5543	178° / 11 h 51 min
	18m	0.526127			
	24m	0.987613			
<i>Hmgcr</i>	3m	0.682877			
	18m	0.583815			
	24m	0.593169			

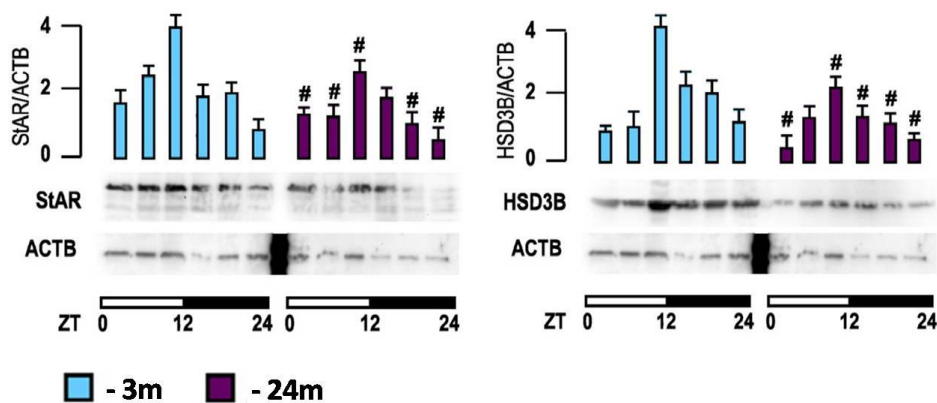
5.2.3.3. Cirkadijalni profil eksprimiranja gena uključenih u steroidogenezu

Kao što je bilo očekivano starenje je imalo značajan efekat na nivo eksprimiranja gena uključenih u steroidogenezu. Transkripcija LH receptora bila je spuštena u starenju u svim vremenskim tačkama (Sl. 5.12). Isto se desilo i sa genom koji kodira StAR iako je cirkadijalni ritam transkripcije ostao očuvan (Sl. 5.12, Tabela 5.12). Suprotno ovome transkripcija *Tspo* gena je bila povišena u 24m grupi, dok između 18m i 3m grupe nije bilo razlika (Sl. 5.12). Transkripcija steroidogenih enzima, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1/2* i *Hsd17b4*, bila je niža u starenju, ne gubeći cirkadijalan obrazac registrovan kod 3m grupe (Sl. 5.12, Tabela 5.12).

Starenje je smanjilo transkripciju dva važna pozitivna regulatora steroidogeneze, *Sf1* i *Nur77* (Sl. 5.12). Transkripcija *Nur77* pokazuje cirkadijalni profil u sve tri ispitivane starosne grupe ali je starenje smanjilo amplitudu oscilacija (S. 5.12, Tabela 5.12).



Slika 5.12 Cirkadijalni obrazac nivoa eksprimiranosti gena uključenih u steroidogenezu. Tri uzrasne grupe Wistar pacova (3m, 18m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0 - momenat paljenja svetla). Iz Lajdigovih ćelija je izolovana RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti gena uključenih u steroidogenezu. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom (Tabela 5.12). * Statistička značajnost između 3m i 18m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$). # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).



Slika 5.13 Cirkadijalni obrazac nivoa StAR i HSD3B proteina. Dve uzrasne grupe Wistar pacova (3m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 - momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Nivo proteina je određen Wester blot analizom i prikazani su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih na AKTIN, prikazana je u formi stubića \pm SEM. Parametri ritma su dati u Tabeli 5.12. # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

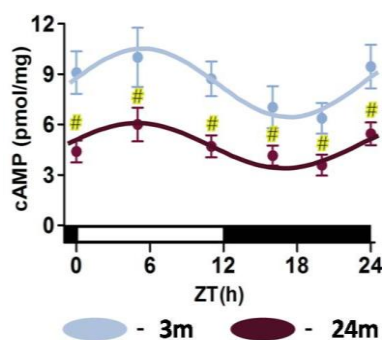
Smanjenje eksprimiranosti *Star* i *Hsd3b1/2* gena na nivou transkripcije, potvrđeno je i na nivou proteina (Sl. 5.13). Za razliku od *Star* gena gde je ritmičnost uočena na oba nivoa (iRNK i protein), ritmičnost *Hsd3b1/2* gena je zabeležena samo na nivou proteina (Sl. 5.13, Tabela 5.12).

Tabela 5.12 Parametri ritma – geni uključeni u steroidogenezu. 3m, 18m i 24m stari pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana. Izolovane Lajdigove ćelije su korišćene kao izvor RNK i proteina, a zatim je određena relativna eksprimiranost gena uključenih u steroidogenezu. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Lhr</i>	3m	0.504705			
	18m	0.288860			
	24m	0.825805			
<i>Star</i>	3m	0.006462	1.0184	0.3608	84° / 05 h 38 min
	18m	0.006148	0.4657	0.2001	85° / 05 h 42 min
	24m	0.046504	0.3534	0.1803	86° / 05 h 45 min
<i>StAR</i>	3m	0.000185	2.4479	1.1717	153° / 10 h 13 min
	24m	0.000111	1.6746	0.8676	179° / 11 h 54 min
<i>Pbr (Tspo)</i>	3m	0.354016			
	18m	0.331681			
	24m	0.281861			
<i>Cyp11a1</i>	3m	0.044136	1.1037	0.3056	86° / 05 h 45 min
	18m	0.033451	0.3514	0.1395	99° / 06 h 34 min
	24m	0.039379	0.3535	0.1626	80° / 05 h 20 min
<i>Cyp17a1</i>	3m	0.002132	0.9805	0.3874	93° / 06 h 11 min
	18m	0.036726	0.4192	0.1713	85° / 05 h 38 min
	24m	0.043825	0.3581	0.1774	81° / 05 h 23 min
<i>Hsd3b1/2</i>	3m	0.734735			
	18m	0.901620			
	24m	0.671215			
<i>HSD3B</i>	3m	0.000406	2.1375	1.2705	188° / 12 h 30 min
	24m	0.000220	1.3919	0.6882	169° / 11 h 14 min
<i>Hsd17b4</i>	3m	0.383615			
	18m	0.671215			
	24m	0.288860			
<i>Nur77</i>	3m	0.000030	1.7846	1.0483	104° / 06 h 55 min
	18m	0.000280	0.8848	0.6341	104° / 06 h 57 min
	24m	0.000119	0.8033	0.5728	108° / 07 h 12 min
<i>Sf1</i>	3m	0.992938			
	18m	0.761299			
	24m	0.595367			

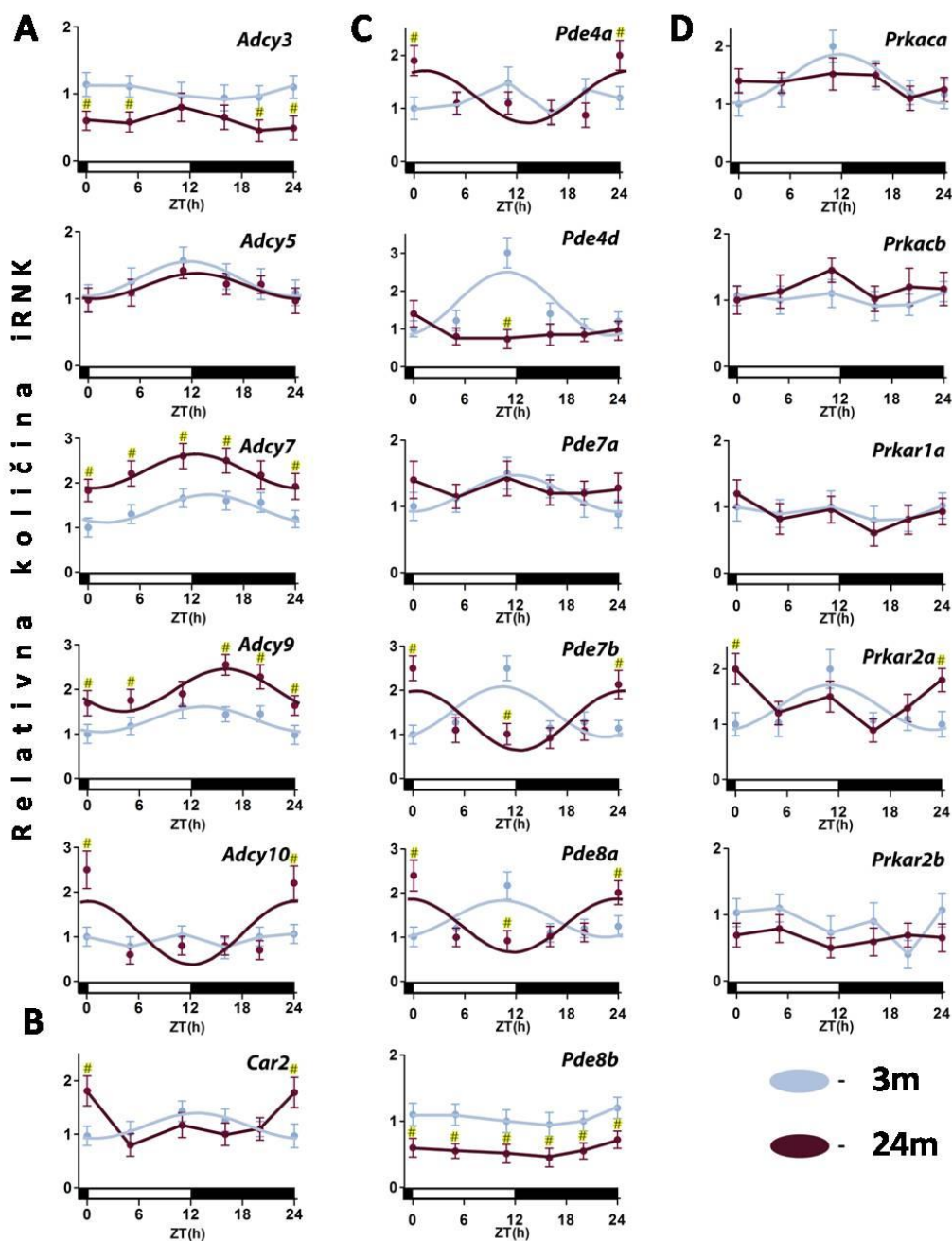
5.2.3.4. Cirkadijalni profil cAMP-PRKA signalnog puta

Ciklični adenozin monofosfat je jedan od najvažnijih regulatornih elemenata u Lajdigovim ćelijama pa je ispitano kako starenje utiče na cirkadijalni profil signalnog puta koji uključuje cAMP. Koncentracija samog cAMP značajno je niža u Lajdigovim ćelijama životinja starih 24 meseca u poređenju sa adultima (Sl. 5.14). Ipak, ritmičnost u unutarćelijskoj koncentraciji ovog molekula nije izostala u starenju (Sl. 5.14, Tabela 5.13).



Slika 5.14 Cirkadijalni profil cAMP u Lajdigovim ćelijama pacova. Dve uzrasne grupe pacova (3m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0 - momenat paljenja svetla). Lajdigove ćelije su poslužile za određivanje unutarćelijske koncentracije cAMP. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Rezultati su analizirani kosinor metodom (Tabela 5.13). # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$)

Starenje je imalo značajan uticaj na eksprimiranost transkriptata za većinu ADCY. Tako je transkripcija *Adcy3* bila značajno niža kod životinja starih 24 meseca bez cirkadijalnog ritma u obe starosne kategorije (Sl. 5.15A, Tabela 5.13). *Adcy7* i *Adcy9* su pokazale cirkadijalnu ritmičnost u transkripciji koja se održala i u starenju uprkos ukupnom padu (Sl. 5.15A, Tabela 5.13). Na *Adcy3* starenje nije imalo efekta, dok je ritam transkripcije *Adcy10* drastično promenjen (Sl. 5.15A, Tabela 5.13). Pošto solubilna ADCY10 ima osobine metaboličkog senzora koji se aktivira bikarbonatima, meren je nivo iRNK i karboanhidraze 2 (*Car2*). Rezultati su pokazali cirkadijalni obrazac eksprimiranja *Car2*, sa pikom oko početka tamne faze (Sl. 5.15B, Tabela 5.13). Slično *Adcy10*, starenje je povećalo eksprimiranje ovog gena u ZT0/24, značajno menjajući osobine ritma (Sl. 5.15B, Tabela 5.13).

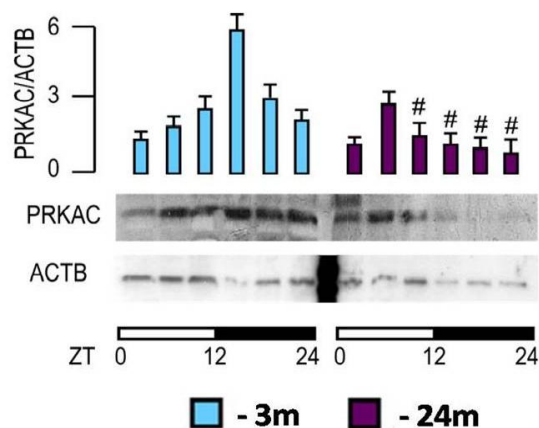


Slika 5.15 Cirkadijalni obrazac nivoa eksprimiranosti elemenata cAMP-PRKA signalnog puta.

Dve uzrasne grupe Wistar pacova (3m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 - momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti gena: *Adcy* (A), *Car2* (B), *Prka* (D). Eksprimiranost *Pde* je analizirana upotrebom TLDA rat PDE panela (C). Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva ritma (za parametre ritma pogledati tabelu 5.13). # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Tabela 5.13 Parametri ritma – cAMP-PRKA signalni put. Izolovane Lajdigove ćelije su poslužile za određivanje cAMP nivoa i za izolaciju RNK i proteina, nakon čega je određena relativna eksprimiranost gena cAMP-PRKA signalni puta. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
cAMP	3m	0.019865	8.5315	1.9500	79° / 05 h 17 min
	24m	0.028452	4.6760	1.2847	72° / 04 h 48 min
Adcy3	3m	0.517536			
	24m	0.235676			
Adcy5	3m	0.041045	1.2969	0.2428	174° / 11 h 36 min
	24m	0.045369	1.1885	0.1966	189° / 12 h 37 min
Adcy7	3m	0.018882	1.4321	0.3014	206° / 13 h 42 min
	24m	0.019414	2.2817	0.3747	185° / 12 h 19 min
Adcy9	3m	0.025248	1.3411	0.2837	201° / 13 h 24 min
	24m	0.011663	1.9679	0.4663	239° / 13 h 56 min
Adcy10	3m	0.817765			
	24m	0.016529	1.1083	0.7430	2° / 00 h 06 min
Car2	3m	0.039154	1.1697	0.2245	189° / 12 h 35 min
	24m	0.092940			
Prkaca	3m	0.007120	1.4367	0.4186	176° / 11 h 45 min
	24m	0.569541			
Prkacb	3m	0.683841			
	24m	0.513086			
PRKAC	3m	0.000206	2.7709	1.9533	233° / 15 h 33 min
	24m	0.018493	1.5519	0.7645	104° / 06 h 54 min
Prkar1a	3m	0.684674			
	24m	0.377463			
Prkar2a	3m	0.027036	1.2906	0.3950	163° / 10 h 51 min
	24m	0.077001			
Prkar2b	3m	0.171533			
	24m	0.767439			
Pde4a	3m	0.592133			
	24m	0.016998	1.2109	0.4910	18° / 01 h 13 min
Pde4d	3m	0.001368	1.6712	0.8266	161° / 10 h 43 min
	24m	0.220448			
Pde7a	3m	0.027491	1.2018	0.2748	176° / 11 h 44 min
	24m	0.980991			
Pde7b	3m	0.004485	1.5208	0.5713	158° / 10 h 30 min
	24m	0.006578	1.3248	0.6701	9° / 00 h 35 min
Pde8a	3m	0.026508	1.4178	0.4165	154° / 10 h 18 min
	24m	0.007607	1.2748	0.6239	0° / 00 h 02 min
Pde8b	3m	0.652861			
	24m	0.548938			

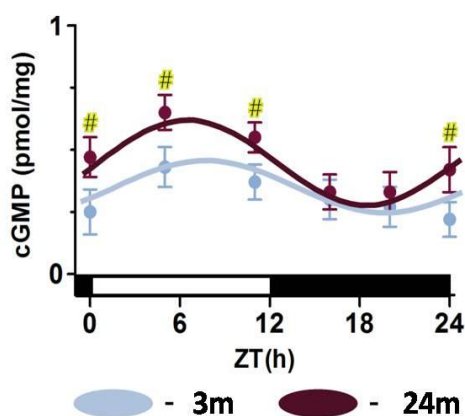


Slika 5.16 Cirkadijalni obrazac nivoa PRKAC proteina. Dve uzrasne grupe Wistar pacova (3m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 - momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Nivo PRKAC proteina je određen Wester blot analizom i prikazani su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih na AKTIN, prikazana je u formi stubića \pm SEM. Parametri ritma su dati u Tabeli 13. # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Analizirane su i PDE specifične za cAMP, komponente odgovorne za terminaciju cAMP-PRKA signalnog puta. Ekspimiranje *Pde4a* nije bilo ritmično kod adulta, ali povećanjem nivoa iRNK u ZT0/24 u starenju detektovan je ritam (Sl. 5.15C, Tabela 5.13). Sa druge strane, ekspimiranje *Pde4d* i *Pde7a* je bilo ritmično kod adultnih životinja, ali je ritam izgubljen u starenju (Sl. 5.15C, Tabela 5.13). Poput predhodnih, *Pde7b* i *Pde8a* takođe pokazuju ritam u svojoj transkripciji (pik krajem svetle faze), ali je starenje ovde potpuno obrnulo fazu ritma (Sl. 5.15C, Tabela 5.13). U slučaju *Pde8b*, transkripcija je bila značajno niža u svim vremenskim tačkama u 24m grupi, bez ritama u obe grupe (Sl. 5.15C, Tabela 5.13). Dalje su analizirane subjedinice efektornog molekula ovog signalnog puta – PRKA. Ekspimiranost *Prkaca* i *Prkar2a* gena je bila ritmična kod adulta, ali je ritam u starenju izgubljen (Sl. 5.15D, Tabela 5.13). Kod ostale tri ispitane subjedinice protein kinaze A, *Prkacb*, *Prkar1a* i *Prkar2b*, nije detektovan ritam u transkripciji, kao ni bilo kakve promene uzrokovane starenjem (Sl. 5.15D, Tabela 5.13). Ipak ritam je uočen analizirajući koncentraciju katalitičkih subjedinica PRKA proteina (Sl. 5.16, Tabela 5.13) sa pikom u ZT16. Starenje je dovelo do pada koncentracije ovog proteina u većini ispitivanih tačaka (Sl. 5.16).

5.2.3.5. Cirkadijalni profil NO-cGMP-PRKG signalnog puta

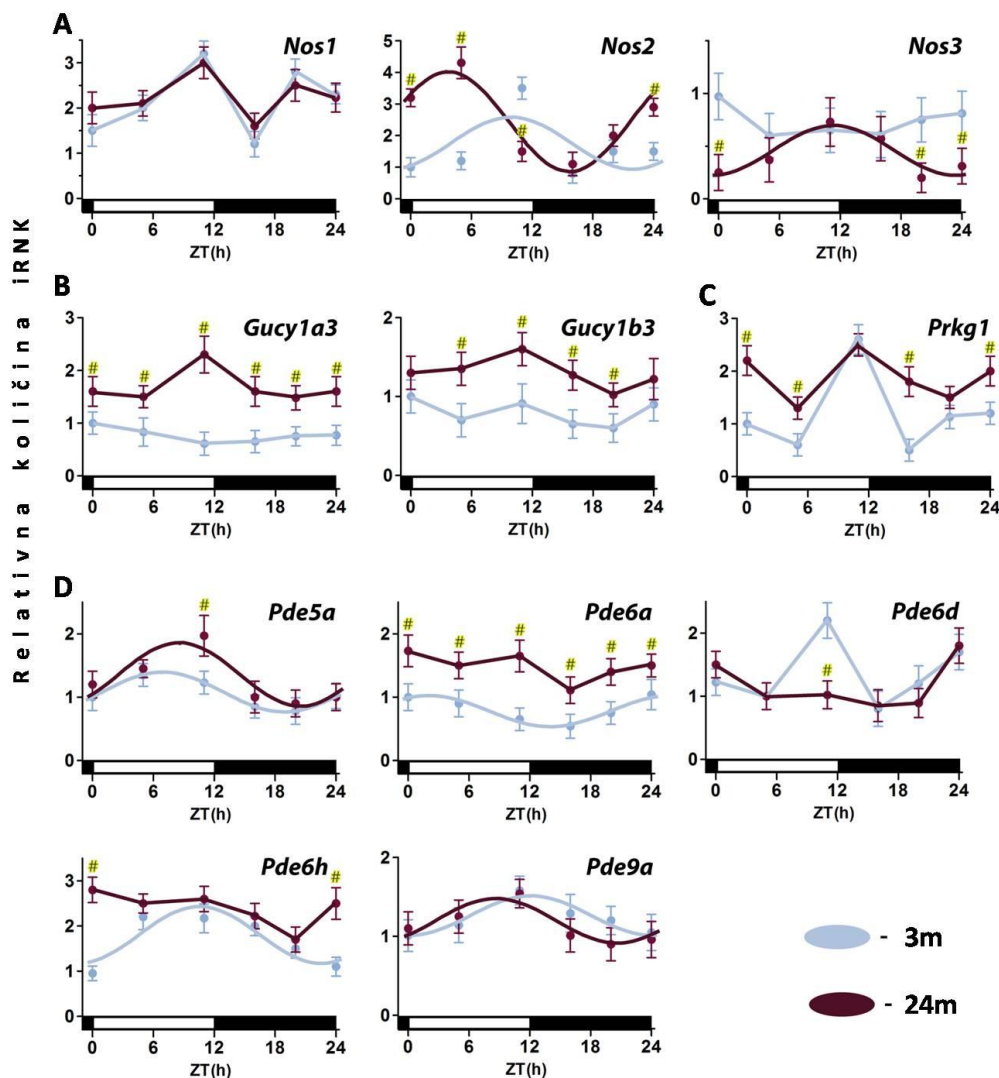
S obzirom da NO-cGMP signalni put ima modulatornu ulogu u regulaciji produkcije testosterona (Del Punta i sar., 1996; Valenti i sar., 1999) analiziran je cirkadijalni profil eksprimiranja elemenata ovog puta u Lajdigovim ćelijama poreklom od 3m i 24m pacova. Za razliku od cAMP, unutarćelijski nivo cGMP je u starenju bio povišen (Sl. 5.17). Cirkadijalni ritam cGMP je ostao očuvan u starenju, sa blago povećanom amplitudom (Sl. 5.17, Tabela 5.14). Dalje je praćena eksprimiranost azot-oksida sintaza u Lajdigovim ćelijama. U slučaju *Nos1*, nisu primećene nikakve promene poredeći pacove stare 24 meseca sa adultnim (Sl. 5.18A, Tabela 5.14). Kada je reć o *Nos2*, pik transkripcije je pomeren u starenju sa ZT10 na ZT3,5 uz znaćajne razlike u kolićini iRNK izmeću grupa u nekoliko vremenskih taćaka (Sl. 5.18A, Tabela 5.14). Eksprimiranje *Nos3* gena, bilo je niže u starenju u ZT0-24 i ZT20 (Sl. 5.18A).



Slika 5.17 Cirkadijalni profil cGMP u Lajdigovim ćelijama pacova. 3m i 24m stari pacovi su žrtvovani u šest vremenskih taćaka u toku dana (ZT0 - momenat paljenja svetla). Lajdigove ćelije su poslužile za odrećivanje unutarćelijske koncentracije cGMP. Taćke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom (Tabela 5.19). # Statistićka znaćajnost izmeću 3m i 24m grupe za istu vremensku taćku ($p < 0,05$).

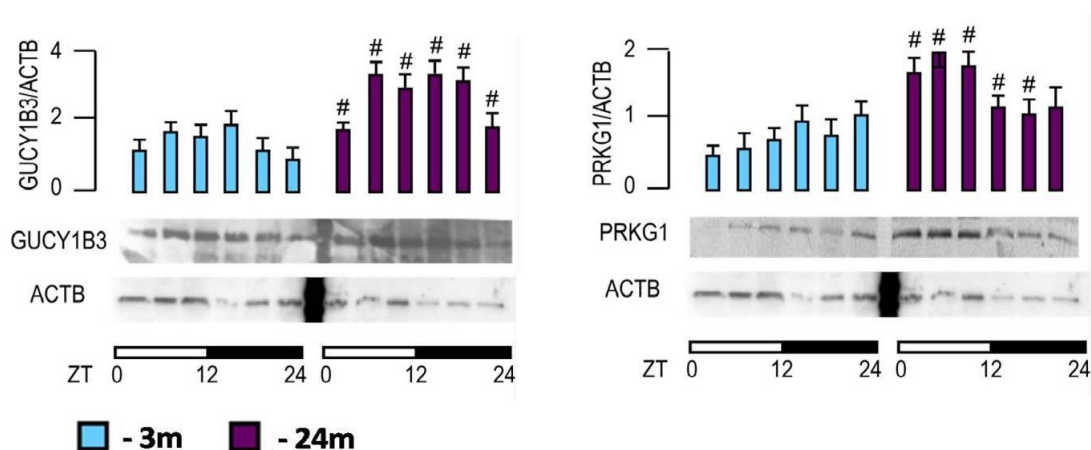
Dalje je analizirana eksprimiranost gena koji kodiraju subjedinice solubilne guanilat ciklaze, enzima koji produkuje cGMP nakon aktivacije sa NO. Transkripcija obe guanilat ciklaze, *Gucy1a3* i *Gucy1b3*, bila je znaćajno povišena kod životinja starih 24 meseca u svim vremenskim taćkama (Sl. 5.18B). Ovaj porast je detektovan i na nivou GUCY1B3 proteina (Sl. 5.19). Blage dnevne oscilacije su zabelećene u obe grupe na nivou proteina, ali ne i na nivou iRNK (Tabela 5.14). Efektorni molekul ovog signalnog puta je PRKG1. Iako ne statistićki znaćajne, transkripcija *Prkg1* je ipak ispoljila odećene varijacije u toku dana (Sl. 5.18C).

Starenje je imalo efekat na ovaj gen podižući njegovu transkripciju (Sl. 5.18C) ali i nivo PRKG1 proteina u više vremenskih tačaka (Sl. 5.19).



Slika 5.18 Cirkadijalni obrazac nivoa eksprimiranosti elemenata NO-cGMP-PRKG signalnog puta. Dve uzrasne grupe Wistar pacova (3m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 - momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti gena: *Nos1-3* (A), *Gucy1a3* i *Gucy1b3* (B), *Prkg1* (C). Eksprimiranost *Pde* je analizirana upotrebom TLDA rat PDE panela (D). Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva ritma (za parametre ritma pogledati tabelu 5.14). # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Eksprimiranje *Pde* specifičnih za cGMP, terminatora ovog signalnog puta, takođe je bilo promenjeno u starenju. Ispitani su i elementi koji uklanjaju cGMP zaustavljajući na taj način efekte ovih signalnog puta. Rezultati su pokazali da starenje dovodi do izvesnih promena u eksprimiranosti cGMP specifičnih *Pde*. Tako je transkripcija *Pde5a* gena bila blago povišena kod životinja starih 24 meseca u poređenju sa kontrolom, uz promenu faze ritma od približno 2 sata (Sl. 5.18D, Tabela 5.14). Starenje je još više uticalo na transkripciju *Pde6a*, koja je bila povišena u svim ispitivanim vremenskim tačkama (Sl. 5.18D). Kada je u pitanju *Pde6d*, transkripcija između grupa je bila promenjena samo u jednoj vremenskoj tački, ZT11 (Sl. 5. 18D). Usled pojačane transkripcije u ZT0/24, *Pde6h* gubi cirkadijalni ritam koji je bio prisutan kod adulta (Sl. 5.18D, Tabela 5.14). Starenje nije imalo značajan efekat na cirkadijalni obrazac transkripcije *Pde9a* gena (Sl. 5.18D, Tabela 5.14).



Slika 5.19 Cirkadijalni obrazac nivoa GUCY1B3 i PRKG1 proteina. Dve uzrasne grupe Wistar pacova (3m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 - momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Nivo GUCY1B3 i PRKG1 proteina je određen Wester blot analizom i prikazani su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih na AKTIN, prikazana je u formi stubića \pm SEM. Parametri ritma su dati u Tabeli 5.14. # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

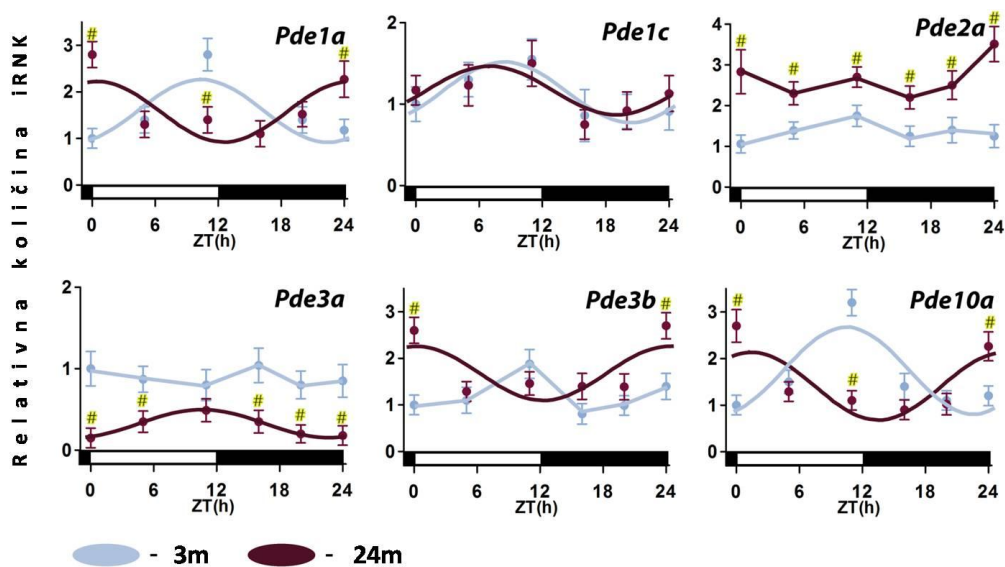
Tabela 5.14 Parametri ritma – NO-cGMP-PRKG signalni put. Nakon izolacije, Lajdigove ćelije su poslužile za određivanje unutarćelijske koncentracije cGMP, kao i za izolaciju RNK i proteina, nakon čega je određena relativna eksprimiranost gena uključenih u održavanje homeostaze cGMP i širenje signala. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
cGMP	3m	0.049372	0.3345	0.0855	120° / 08 h 01 min
	24m	0.048853	0.4541	0.1703	99° / 06 h 34 min
Nos1	3m	0.571107			
	24m	0.519279			
Nos2	3m	0.034251	1.7707	0.8155	152° / 10 h 06 min
	24m	0.000017	2.4374	1.4769	52° / 03 h 29 min
Nos3	3m	0.579878			
	24m	0.038719	0.4596	0.2383	169° / 11 h 17 min
Gucy1a3	3m	0.295531			
	24m	0.130353			
Gucy1b3	3m	0.662714			
	24m	0.124320			
GUCY1B3	3m	0.010788	1.5277	0.4565	162° / 10 h 47 min
	24m	0.030370	2.8657	0.6398	180° / 11 h 59 min
Prkg1	3m	0.180258			
	24m	0.713110			
PRKG1	3m	0.318834			
	24m	0.004120	1.5634	0.4988	105° / 07 h 00 min
Pde5a	3m	0.011790	1.0787	0.3124	103° / 06 h 52 min
	24m	0.003289	1.3542	0.4981	130° / 08 h 40 min
Pde6a	3m	0.037938	0.7788	0.2450	30° / 02 h 01 min
	24m	0.257719			
Pde6d	3m	0.534506			
	24m	0.050821			
Pde6h	3m	0.001112	1.7980	0.6276	159° / 10 h 35 min
	24m	0.126398			
Pde9a	3m	0.044300	1.2637	0.2442	180° / 12 h 00 min
	24m	0.036441	1.1969	0.2864	129° / 08 h 34 min

5.2.3.6. Cirkadijalni profil eksprimiranja *Pde* sa dvojnomo aktivnošću

PDE sa dvojnomo aktivnošću (učestvuju u uklanjanju oba ciklična nukleotida, cAMP i cGMP) su od velikog značaja za funkciju Lajdigovih (Tsai i Beavo, 2011). Ispitivanjem ove grupe *Pde* u starenju uočeni su sledeći rezultati: cirkadijalni ritam transkripcije *Pde1a* gena bio je u antifazi kod životinja starih 24 meseca u odnosu na adulte – pik u grupi 3m bio je na kraju svetle faze, dok je u grupi 24m bio

pomeren na kraj tamne faze (Sl. 5.20, Tabela 5.15). U slučaju transkripcije *Pde1c*, nisu primećene promene u obrazcu cirkadijalnog ritma (Sl. 5.20, Tabela 5.15). Ekspimiranje *Pde2a* nije bilo ritmično, ali je bilo značajno povišeno u svim vremenskim tačkama u 24m grupi (Sl. 5.20, Tabela 5.15). Sasvim suprotan efekat starenje je imalo na transkripciju *Pde3a* gena, ono je bilo značajno niže u skoro svim vremenskim tačkama kod životinja starih 24 meseca (Sl. 5.20, Tabela 5.15). Transkripcija *Pde3b* gena nije bila ritmična kod adulta, međutim starenje je povisilo transkripciju ovog gena u ZT0/24 uspostavljajući ritam sa pikom u toj vremenskoj tački (Sl. 5.20, Tabela 5.15). Slično *Pde1a* genu, cirkadijalni ritam transkripcije *Pde10a* potpuno je obrnuo fazu – akrofaza ritma 3m grupe bila je krajem svetle faze, dok je u 24m grupi ona pomerena na kraj tamne faze (Sl. 5.20, Tabela 5.15). Promena u nivou transkripcije *Pde10a* desila se u ZT0/24 i ZT11 poredeći 24m i 3m grupu (Sl. 5.20).



Slika 5.20 Cirkadijalni obrazac nivoa ekspimiranosti *Pde* sa dvojnoum aktivnošću. 3m i 24m stari pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0 - momenat paljenja svetla). Iz Lajdigovih ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne ekspimiranosti *Pde*, upotrebom TLDA rat PDE panela. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva ritma (za parametre ritma pogledati tabelu 5.15). # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

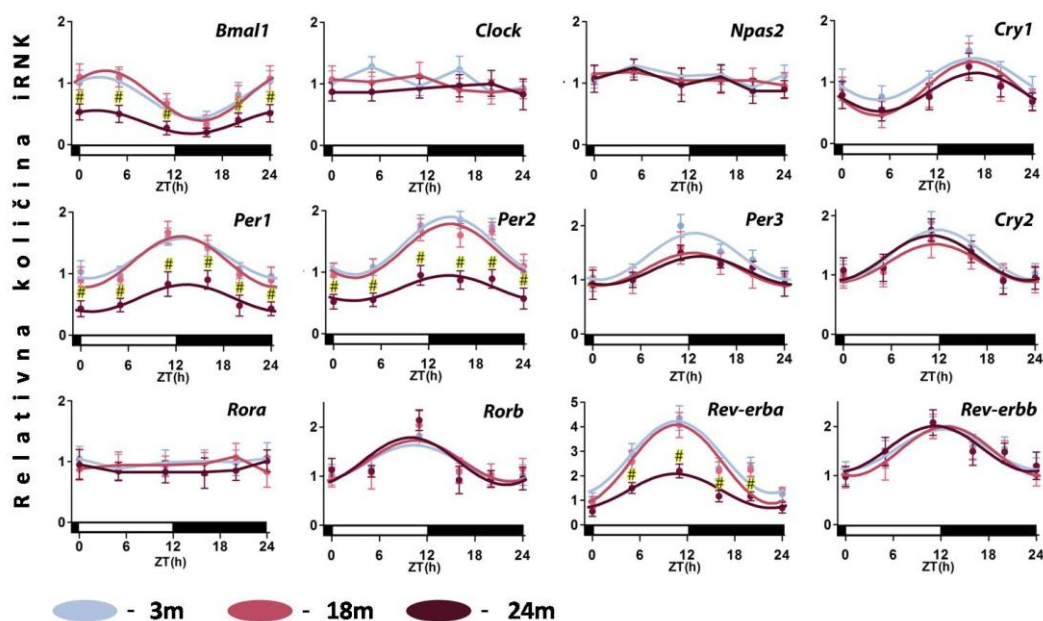
Tabela 5.15 Parametri ritma – *Pde* sa dvojnomo aktivnošću. 3m i 24m stari pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana. Nakon izolacije, Lajdigove ćelije su poslužile za dobijanje RNK, nakon čega je određena relativna eksprimiranost *Pde* sa dualnom aktivnošću. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Pde1a</i>	3m	0.007321	1.6365	0.6757	154° / 10 h 16 min
	24m	0.015770	1.6014	0.6288	6° / 00 h 24 min
<i>Pde1c</i>	3m	0.017982	1.1566	0.3512	126° / 08 h 23 min
	24m	0.049306	1.1566	0.2943	104° / 06 h 55 min
<i>Pde2a</i>	3m	0.060942			
	24m	0.135553			
<i>Pde3a</i>	3m	0.142022			
	24m	0.046957	0.3252	0.1684	157° / 10 h 29 min
<i>Pde3b</i>	3m	0.142022			
	24m	0.024459	1.6822	0.5850	3° / 00 h 11 min
<i>Pde10a</i>	3m	0.000333	1.7832	0.9379	154° / 10 h 17 min
	24m	0.004915	1.4140	0.7414	19° / 01 h 14 min

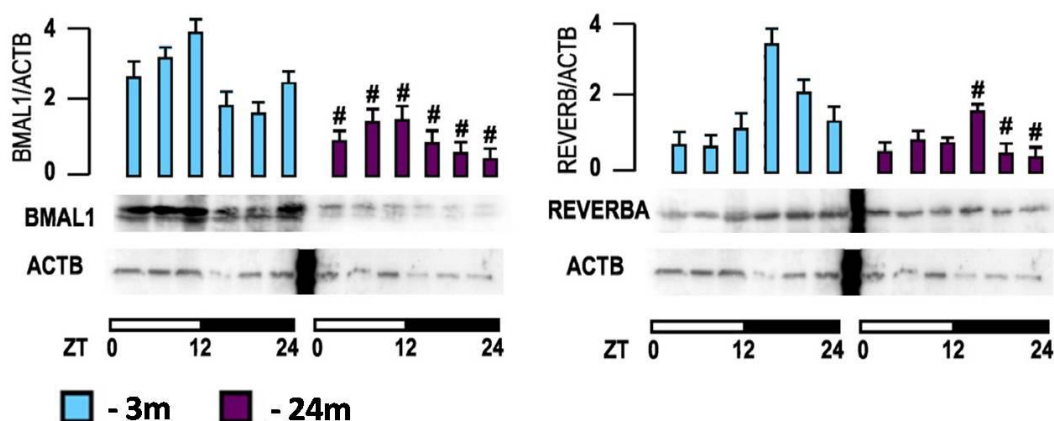
5.2.3.7. Cirkadijalni profil eksprimiranja gena biološkog časovnika

Uz eksperimentalni model sekundarnog (hipogonadotropnog) hipogonadizma, eksprimiranost elemenata biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama je ispitana i u modelu primarnog (staračkog) hipogonadizma. Cirkadijalni obrazac transkripcije većine ispitanih gena nije bio promenjen u starenju (Sl. 5.21, Tabela 5.16). Ipak primećen je značajan pad u transkripciji *Bmal1*, *Per1*, *Per2* i *Rev-erba* gena kod životinja starih 24 meseca u poređenju sa adultima (Sl. 5.21). U sva četiri pomenuta slučaja zadržan je cirkadijalni ritam transkripcije (Sl. 5.21, Tabela 5.16). U grupi životinja starih 18 meseci nisu primećene promene ni u jednom ispitanom genu (Sl. 5.21, Tabela 5.16).

Dodatna analiza je urađena i na proteinskom nivou za BMAL1 i REV-ERBA. Nivo BMAL1 proteina bio je značajno niži kod životinja starih 24 meseca u poređenju sa 3m grupom, ali je zadržan cirkadijalni profil (Sl. 5.22, Tabela 5.16). Nivo REV-ERBA proteina je bio snižen u toku noći (Sl. 5.22). I u ovom slučaju cirkadijalni ritam nije izgubljen (Sl. 5.22, Tabela 5.16).



Slika 5.21 Cirkadijalni obrazac nivoa eksprimiranosti gena biološkog časovnika. Tri uzrasne grupe Wistar pacova (3m, 18m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0 - momentat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti gena biološkog časovnika. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva ritma (Tabela 5.16). # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).



Slika 5.22 Uticaj starenja na cirkadijalni obrazac nivoa BMAL1 i REV-RBA proteina. Dve uzrasne grupe Wistar pacova (3m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 - momentat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Nivo proteina je određen Wester blot analizom i prikazani su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih na AKTIN, prikazana je u formi stubića \pm SEM. Parametri ritma su dati u Tabeli 16. # Statistička značajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Tabela 5.16 Parametri ritma - geni biološkog časovnika. 3m, 18m i 24m stari pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana. Izolovanjem Lajdigovih ćelija je dobijena RNK i proteini, a zatim je određena relativna ekspimiranost gena biološkog časovnika. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

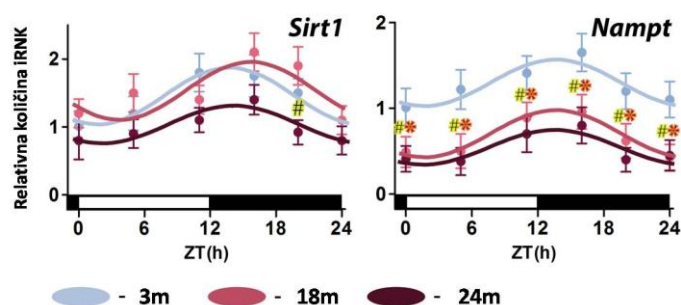
	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Clock</i>	3m	0.521318			
	18m	0.580916			
	24m	0.628625			
<i>Bmal1</i>	3m	0.006229	0.7687	0.3275	36° / 02 h 24 min
	18m	0.001029	0.7982	0.3987	45° / 03 h 02 min
	24m	0.021560	0.3752	0.1734	31° / 02 h 05 min
<i>BMAL1</i>	3m	0.000564	2.7866	0.9987	115° / 07 h 39 min
	24m	0.001299	1.1438	0.5485	127° / 08 h 26 min
<i>Npas2</i>	3m	0.505430			
	18m	0.994324			
	24m	0.932116			
<i>Per1</i>	3m	0.001842	1.2306	0.3149	192° / 12 h 46 min
	18m	0.001229	1.2094	0.4024	191° / 12 h 43 min
	24m	0.013044	0.5669	0.1710	198° / 13 h 10 min
<i>Per2</i>	3m	0.000248	1.4357	0.4609	221° / 14 h 42 min
	18m	0.001551	1.3803	0.4192	223° / 14 h 52 min
	24m	0.009697	0.7532	0.2358	218° / 14 h 33 min
<i>Per3</i>	3m	0.001204	1.4332	0.4261	190° / 12 h 42 min
	18m	0.033411	1.2115	0.2959	188° / 12 h 31 min
	24m	0.014666	1.1754	0.2569	203° / 13 h 31 min
<i>Cry1</i>	3m	0.014517	1.0337	0.3334	249° / 16 h 36 min
	18m	0.009502	0.8620	0.3764	253° / 16 h 53 min
	24m	0.008541	0.8231	0.3105	251° / 16 h 46 min
<i>Cry2</i>	3m	0.001907	1.3358	0.4242	177° / 11 h 48 min
	18m	0.021326	1.2015	0.3205	173° / 11 h 30 min
	24m	0.004941	1.2854	0.3779	167° / 11 h 09 min
<i>Rev-erba</i>	3m	0.000056	2.7084	1.4235	158° / 10 h 32 min
	18m	0.000266	2.5277	1.2546	162° / 10 h 47 min
	24m	0.000285	1.3779	0.7064	157° / 10 h 27 min
<i>REV-ERBA</i>	3m	0.000148	1.5131	1.3560	245° / 16 h 20 min
	24m	0.025055	0.8995	0.4492	213° / 14 h 11 min
<i>Rev-erbb</i>	3m	0.009687	1.5373	0.3934	182° / 12 h 09 min
	18m	0.005280	1.4527	0.4410	187° / 12 h 28 min
	24m	0.010156	1.5490	0.4204	169° / 11 h 17 min
<i>Rora</i>	3m	0.842665			
	18m	0.775573			
	24m	0.673498			

Tabela 5.16 Parametri ritma – geni biološkog časovnika (nastavak).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Rorb</i>	3m	0.013688	1.2719	0.3478	151° / 10 h 06 min
	18m	0.026796	1.3226	0.4122	158° / 10 h 31 min
	24m	0.010731	1.3041	0.4761	146° / 09 h 45 min
<i>Ck1e</i>	3m	0.551096			
	18m	0.403547			
	24m	0.232944			
<i>Ck1d</i>	3m	0.925905			
	18m	0.563417			
	24m	0.864920			

5.2.3.8. Cirkadijalni profil ekspimiranja *Sirt1* i *Nampt* gena

Eksprimiranje *Sirt1* gena u Lajdigovim ćelijama starih životinja je praćeno jer se ovaj gen smatra glavnom vezom između metabolizma, mreže gena cirkadijalnog časovnika i starenja. Kako je aktivnost SIRT1 zavisna od NAD⁺, praćena je i transkripcija *Nampt*, gena koji kodira nikotinamid fosforiboziltransferazu, enzim ključan u putu stvaranja NAD⁺. Oba ispitana gena pokazala su cirkadijalni ritam u svojoj transkripciji sa akrofazom početkom tamne faze, oko ZT14 (Sl. 5.23, Tabela 5.17). Starenje nije značajno uticalo na osobine ritma ova dva gena, iako je detektovano smanjenje ukupnog nivoa transkripcije (*Sirt1* u grupi 24m i *Nampt* u grupama 18m i 24m) (Sl. 5.23, Tabela 5.17).



Slika 5.23 Cirkadijalni obrazac nivoa ekspimiranosti *Sirt1* i *Nampt* gena. Tri uzrasne grupe Wistar pacova (3m, 18m i 24m) su žrtvovane u šest vremenskih taćaka u toku dana (ZT0 - momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslućila za analizu relativne ekspimiranosti *Sirt1* i *Nampt* gena. Taćke predstavljaju srednju vrednost ± SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva ritma (Tabela 5.17). * Statistićka znaćajnost između 3m i 18m grupe za istu vremensku taćku ($p < 0,05$). # Statistićka znaćajnost između 3m i 24m grupe za istu vremensku taćku ($p < 0,05$).

Tabela 5.17 Parametri ritma – *Sirt1* i *Nampt*. 3m, 18m i 24m stari pacovi su žrtvovani u šest vremenskih tačaka u toku dana. Iz izolovanih Lajdigovih ćelija je dobijena RNK i zatim određena relativna eksprimiranost *Sirt1* i *Nampt* gena. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Sirt1</i>	3m	0.004894	1.4603	0.4223	205° / 13 h 41 min
	18m	0.025491	1.5515	0.4103	238° / 15 h 50 min
	24m	0.048654	1.0353	0.2774	209° / 13 h 56 min
<i>Nampt</i>	3m	0.047067	1.3097	0.2664	204° / 13 h 34 min
	18m	0.012777	0.6916	0.2761	205° / 13 h 41 min
	24m	0.062756	0.5557	0.1995	205° / 13 h 38 min

5.2.4. Efekat melatonina na steroidogenezu i biološki časovnik u Lajdigovim ćelijama pacova

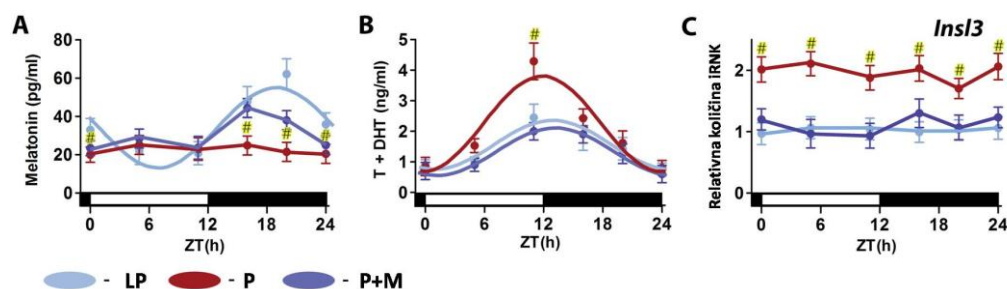
Da bi ispitali efekat melatonina, kao nosioca informacije o svetlosnom režimu, a koji svoje dejstvo ostvaruje preko cAMP signalizacije, na sinhronizaciju biološkog časovnika i steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama korišćen je model model pinealektomisanih životinja (opisano u poglavlju 4.3.3). U analizama su korišćene tri grupe: pinealektomisane životinje (P), životinje kod kojih je urađena lažna pinealektomija (LP, kontrolna grupa) i pinealektomisane životinje koje su pile melatonin (P+M).

5.2.4.1. Cirkadijalni profil produkcije hormona

Da bi ispitali uspešnost pinealektomije, određen je nivo melatonina u serumu (Sl. 5.24A). Kod kontrolne grupe (LP) zabeležena su dnevna variranja u serumskoj koncentraciji melatonina sa najvišom koncentracijom tokom noći (Sl. 5.24A, Tabela 5.18). P grupa je pokazala odsustvo noćnog porasta melatonina što je ukazivalo na uspešnost pinealektomije. Supstitucija melatoninom (P+M) je uspela delimično da uspostavi pređašnji obrazac (Sl. 5.24A).

Kao glavni pokazatelj funkcionalnosti Lajdigovih ćelija izmeren je testosteron u serumu. Rezultati pokazuju da je cirkadijalni obrazac koncentracije ovog hormona zadržan u sve tri grupe, ali da je pinealektomija povećala produkciju ovog hormona i pojačala amplitudu ritma (Sl. 5.24B, Tabela 5.18). Supstitucija

melatoninom je uspostavila kontrolni nivo testosterona (Sl. 5.24B, Tabela 5.18). Kao još jedan pokazatelj funkcionalnosti Lajdigovih ćelija analizirano je eksprimiranje *Insl3* gena. Ovaj gen nema izraženi cirkadijalni obrazac transkripcije u ispitivanim grupama. Pinealektomija je dovela do značajnog pojačanja eksprimiranosti *Insl3* gena u svim ispitivanim tačkama, dok je aplikacija melatonina vratila ovaj parametar na kontrolni nivo (Sl. 5.24C).

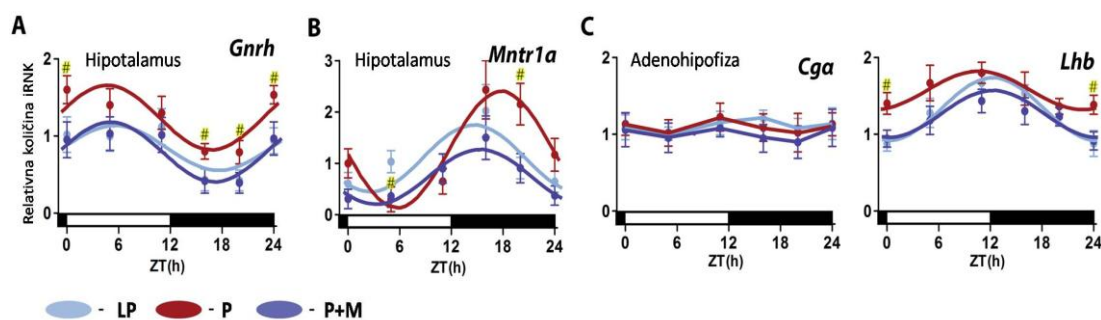


Slika 5.24 Cirkadijalni ritam endokrine funkcije Lajdigovih ćelija. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 - moment paljenja svetla), nakon čega je sakupljen serum radi merenja nivoa melatonina (A) i testosterona (B). Iz izolovanih Lajdigovih ćelija dobijena je RNK koja je poslužila za analizu relativne eksprimiranosti *Insl3* gena (C). Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva ritma (za parametre ritma pogledati tabelu 5.18). # Statistička značajnost između P i LP grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Tabela 5.18 Parametri ritma – Melatonin, testosteron, *Insl3*. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana nakon čega je sakupljen serum radi merenja nivoa hormona (melatonin, T+DHT), a Lajdigove ćelije su izolovane i u njima je određena relativna eksprimiranost *Insl3* gena. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
Melatonin	LP	0.000071	33.9858	20.9563	283° / 18 h 53 min
	P	0.558851	-	-	-
	P+M	-	-	-	-
Testosteron	LP	0.000611	1.5638	0.7912	194° / 12 h 56 min
	P	0.000013	2.2608	1.5497	177° / 11 h 46 min
	P+M	0.000148	1.3573	0.7546	201° / 13 h 23 min
<i>Insl3</i>	LP	0.973470	-	-	-
	P	0.679424	-	-	-
	P+M	0.293787	-	-	-

Da bi ispitali eventualne promene koje pinealektomija izaziva na produkciju glavnih hormona HPT osovine, GnRH u hipotalamusu i LH u adenohipofizi, praćena je relativna transkripcija gena koji eksprimiraju GnRH i subjedinice LH, kao i eksprimiranje *Mntr1a* i *Mntr1b*. Rezultati su pokazali da transkripcija *Gnrh* gena u hipotalamusu podleže cirkadijalnom ritmu sa pikom oko ZT5, kao i da je značajno povećana u pinealektomiji (Sl. 5.25A, Tabela 5.19). Određene karakteristike ritma, kao što je amplituda, bile su promenjene i kada je praćena transkripcija melatoninskog receptora, *Mntr1a*, na nivou hipotalamusa (Sl. 5.25B, Tabela 5.19). Transkripcija *Mntr1b* se nije mogla jasno detektovati na nivou hipotalamusa (rezultati nisu prikazani).



Slika 5.25 Cirkadijalni obrazac nivoa eksprimiranosti gena *Gnrh*, *Mntr1a*, *Cga* i *Lhb*. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 – momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovani hipotalamus i adenohipofiza. Ovi organi su poslužili kao izvor RNK i određivanje relativne eksprimiranosti *Gnrh* i *Mntr1a* (hipotalamus), kao i *Cga* i *Lhb* (adenohipofiza). Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva i parametri ritma (pogledati tabelu Tabela 5.19). # Statistička značajnost između P i LP grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Na nivou adenohipofize je praćena transkripcija dve subjedinice LH, *Cga* i *Lhb*. Prva subjedinica, *Cga*, zajednička je za nekoliko hormona adenohipofize (LH, FSH, TSH, CG) i nije pokazala dnevna variranja u svojoj transkripciji, niti bilo kakve promene poredeći eksperimentalne grupe (Sl. 5.25C). Sa druge strane, subjedinica specifična za luteinizirajući hormon, *Lhb*, pokazuje cirkadijalne oscilacije u transkripciji sa pikom na početku tamne faze (Sl. 5.25B, Tabela 5.19). Ovde je uočen i porast u eksprimiranju ovog gena na kraju tamne, odnosno na početku

svetle faze (Sl. 5.25C). Sve detektovane promene u P grupi su bile poništene tretmanom sa melatoninom. Ekspimiranje *Mntr1a* nije bilo ritmično u adenohipofizi i bez promena između ispitivanih grupa, dok transkripciju *Mntr1b* nije bilo moguće pouzdano detektovati ni na nivou ovog organa (rezultati nisu prikazani). Na nivou Lajdigovih ćelija nisu detektovane značajne količine transkripata ni jednog od dva melatoninska receptora, *Mntr1a* i *Mntr1b* (rezultati nisu prikazani).

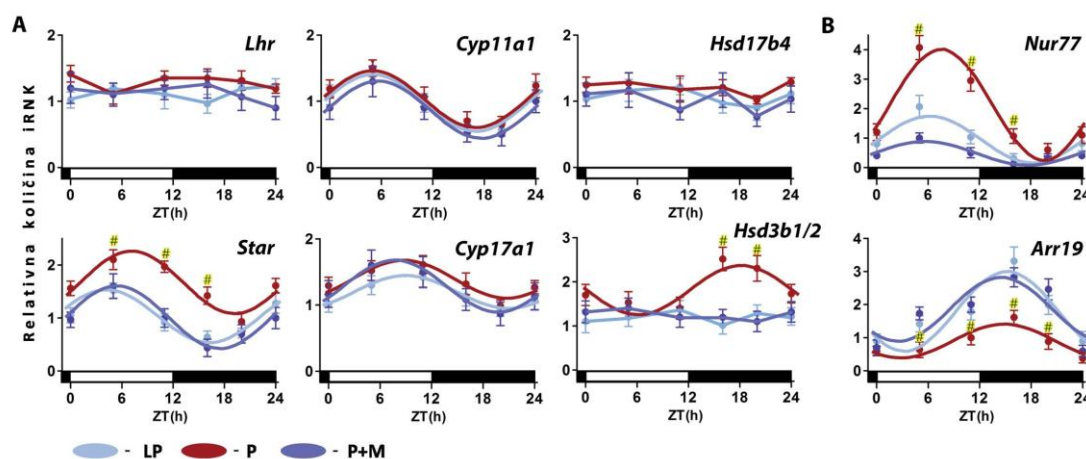
Tabela 5.19 Parametri ritma – *Gnrh*, *Mntr1a*, *Cga*, *Lhb*. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana. Iz hipotalamusa i adenohipofize je izolovana RNK, nakon čega je određena relativna ekspimiranost *Gnrh* i *Mntr1a* (hipotalamus) i *Cga* i *Lhb* (adenohipofiza) gena. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Gnrh</i>	LP	0.035562	0.8396	0.2900	82° / 05 h 28 min
	P	0.006189	1.2551	0.4167	69° / 04 h 37 min
	P+M	0.003650	0.7937	0.3805	79° / 05 h 14 min
<i>Mntr1a</i>	LP	0.014686	1.1034	0.6450	218° / 14 h 34 min
	P	0.000062	1.2275	1.2275	267° / 17 h 49 min
	P+M	0.002335	0.7360	0.5213	227° / 15 h 08 min
<i>Cga</i>	LP	0.653241			
	P	0.703376			
	P+M	0.541328			
<i>Lhb</i>	LP	0.000069	1.3297	0.3968	184° / 12 h 16 min
	P	0.013050	1.5856	0.2397	147° / 09 h 50 min
	P+M	0.006299	1.2699	0.2962	184° / 12 h 14 min

5.2.4.2. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena uključenih u steroidogenezu

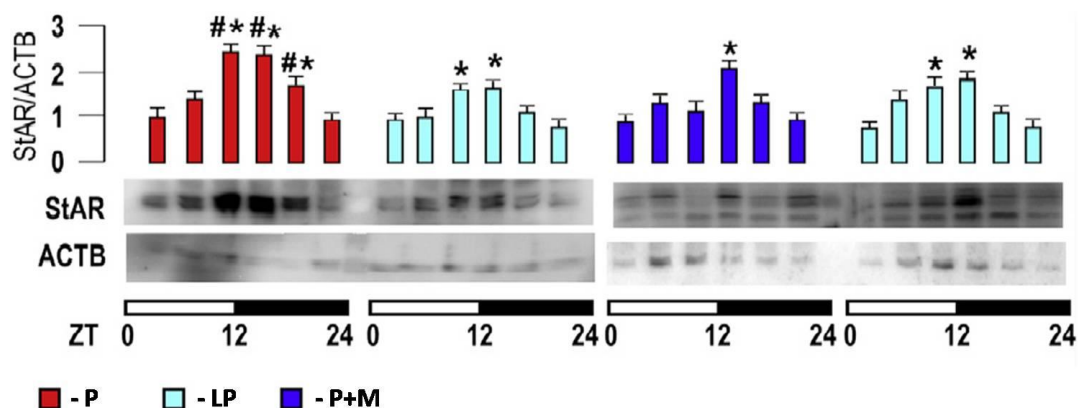
Pinealektomija nije imala uticaj na ekspimiranje LH receptora u Lajdigovim ćelijama (Sl. 5.26A). Sa druge strane, transkripcija *Star* gena, jednog od glavnih regulatora steroidogeneze, bila je značajno povećana u P grupi u tri vremenske tačke, iako to nije imalo veliki uticaj na akrofazu ritma (Sl. 5.26A, Tabela 5.20). Kada su u pitanju enzimi iz citohrom P450 familije, *Cyp11a1* i *Cyp17a1*, nisu primećene promene u osobinama ritma njihove transkripcije (Sl.

5.26A, Tabela 5.20). Ekspimiranje enzima *Hsd17b4* nije bilo ritmično, niti je uočena bilo kakva razlika između poređenih grupa. Transkripcija drugog enzima iz iste familije, *Hsd3b1/2*, bila je povišena u toku tamne faze (ZT16 i ZT20) u pinealektomiji, odajući utisak cirkadijalne ritmičnosti koja nije zabeležena u kontrolnoj grupi (Sl. 5.26A, Tabela 5.20). Dodatno, ispitano je ekspimiranje i određenih transkripcionih faktora za koje se zna da imaju regulatornu ulogu u procesu steroidogeneze. Tako je transkripcija pozitivnog regulatora, *Nur77*, bila pojačana u P grupi u tri vremenske tačke (ZT5, ZT11, ZT16) značajno povećavajući amplitudu cirkadijalnog talasa (Sl. 5.26B, Tabela 5.20). Transkripcija *Arr19*, negativnog regulatora steroidogeneze, bila je značajno niža u četiri vremenske tačke, smanjujući na taj način amplitudu cirkadijalnog talasa (Sl. 5.26B, Tabela 5.20). Ostali ispitivani transkripcioni faktori (*Sf1*, *Creb1* i *Dax1*) nisu pokazali ritmičnost u transkripciji niti razlike među grupama (Tabela 5.20).



Slika 5.26 Cirkadijalni obrazac nivoa ekspimiranosti gena uključenih u steroidogenezu. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 - momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Iz ćelija je dobijena RNK koja je poslužila za analizu relativne ekspimiranosti gena uključenih u steroidogenezu. Tačke predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva i parametri ritma (Tabela 5.20). # Statistička značajnost između P i LP grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Nakon uočenih promena na transkripcionom nivou *Star* gena poredeći P i LP grupu, praćen je nivo i ovog proteina. Kao i na nivou iRNK, StAR protein pokazuje ritmične oscilacije u svojoj koncentraciji, dostižući najviše vrednosti na početku tamne faze (Sl. 5.27, Tabela 5.20) kada i serumska koncentracija testosterona dostiže svoj maksimum (Sl. 5.24B, Tabela 5.18). Takođe, uočen je porast u nivou StAR proteina poredeći P grupu sa kontrolnom u tri vremenske tačke ZT11, ZT16 i ZT20 doprinoseći povećanju amplitude cirkadijanog talasa (Tabela 5.20). Pored amplitude, blago je pomerena i akrofaza ritma količine StAR proteina u Lajdigovim ćelijama izolovanim iz P grupe (Tabela 5.20). Detektovane promene u P grupi bile su poništene aplikacijom melatonina (P+M grupa).



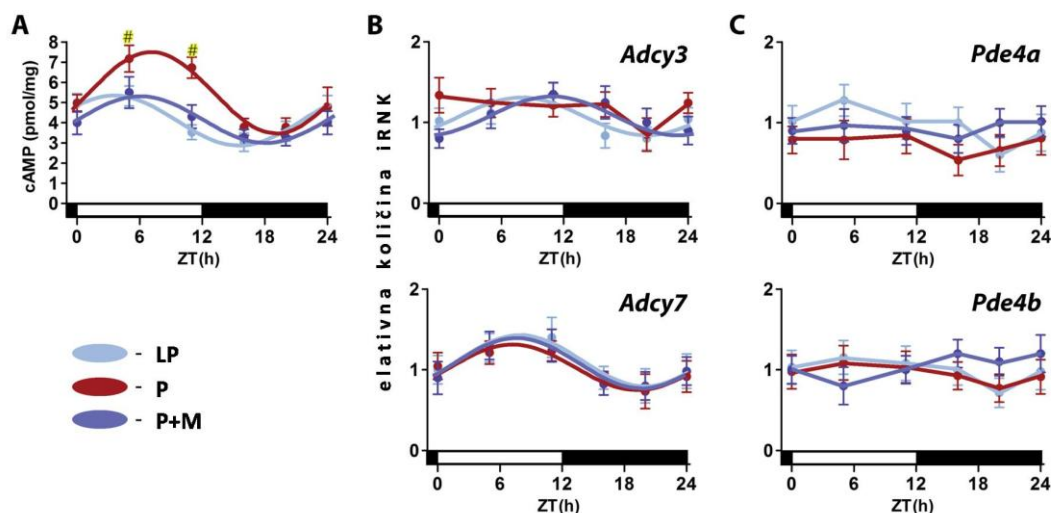
Slika 5.27 Cirkadijalni obrazac nivoa StAR proteina. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, gde ZT0 predstavlja momenat paljenja svetla), nakon čega su izolovane Lajdigove ćelije. Nivo proteina je određen Wester blot analizom i prikazani su reprezentativni blotovi. Srednja vrednost rezultata denzitometrijskih merenja, normalizovanih na AKTIN, prikazana je u formi stubića \pm SEM. Parametri ritma su dati u Tabeli 5.20. * Statistička značajnost između različitih vremenskih tačaka i ZT0 ($p < 0,05$); # Statistička značajnost između P i LP grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Tabela 5.20 Parametri ritma - geni uključeni u steroidogenezu. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana. Iz izolovanih Lajdigovih ćelija određen je nivo StAR proteina, a iz dobijene RNK je određena relativna ekspimiranost gena uključenih u steroidogenezu. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
Lhr	LP	0.183794			
	P	0,052642			
	P+M	0.656012			
Star	LP	0.000046	1.0316	0.4574	67° / 04 h 27 min
	P	0.000034	1.6812	0.5677	108° / 07 h 11 min
	P+M	0.000539	0.9777	0.5325	81° / 05 h 25 min
StAR	LP	0.000659	1.6212	0.5265	182° / 12 h 09 min
	P	0.000025	1.9827	1.0305	203° / 13 h 27 min
	P+M	0.002531	1.5844	0.6288	192° / 12 h 46 min
Cyp11a1	LP	0.000057	1.0059	0.4604	75° / 05 h 01 min
	P	0.000025	1.0956	0.4812	75° / 04 h 59 min
	P+M	0.001729	0.8743	0.4257	81° / 05 h 25 min
Cyp17a1	LP	0.004692	1.1997	0.2419	134° / 08 h 55 min
	P	0.001294	1.3878	0.2854	124° / 08 h 16 min
	P+M	0.008107	1.2865	0.3871	112° / 07 h 28 min
Hsd3b1/2	LP	0.734735			
	P	0.001931	1.8146	0.5652	271° / 18 h 02 min
	P+M	0.540647			
Hsd17b4	LP	0.078491			
	P	0.351560			
	P+M	0.791969			
Nur77	LP	0.000254	1.0022	0.7993	90° / 06 h 01 min
	P	0.000003	2.1315	1.8756	112° / 07 h 29 min
	P+M	0.001162	0.4849	0.3878	88° / 05 h 52 min
Arr19	LP	0.000197	1.830	1.2111	229° / 15 h 16 min
	P	0.000915	0.9073	0.512	220° / 14 h 41 min
	P+M	0.001454	1.8390	0.9750	217° / 14 h 26 min
Sf1	LP	0.516913			
	P	0.748757			
	P+M	0.423311			
Creb1	LP	0.509774			
	P	0.618160			
	P+M	0.391002			
Dax1	LP	0.547583			
	P	0.645757			
	P+M	0.343611			

5.2.4.3. Cirkadijalni profil elemenata odgovornih za održavanje ravnoteže nivoa cAMP

Eliminacija pinealne žlezde dovela je do porasta unutarćelijske koncentracije cAMP u dve vremenske tačke, ZT5 i ZT11 (Sl. 5.28A). Ova promena dovela je do porasta amplitude u cirkadijalnom talasu koji opisuje nivo ovog signalnog glasnika, kao i do pomeranja faze za nekoliko sati (Sl. 5.28A, Tabela 5.21). Kada su analizirani elementi koji produkuju cAMP, *Adcy3* i *Adcy7*, nije uočena promene u nivou transkripcije između grupa, iako je u slučaju *Adcy3*, pinealektomija delimično promenila opšti cirkadijalni obrazac (Sl. 5.28B, Tabela 5.21). Transkripcija *Pde4a* i *Pde4b*, zaduženih za uklanjanje cAMP, nije pokazala cirkadijalna variranja, kao ni količinske promene u bilo kojoj vremenskoj tački između eksperimentalnih grupa (Sl. 5.28C, Tabela 5.21). Detektovane promene u P grupi, kada je u pitanju unutarćelijska koncentracija cAMP i transkripcija *Adcy3* u Lajdigovim ćelijama, bile su poništene aplikacijom melatonina (P+M grupa).



Slika 5.28 Homeostaza cAMP. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 - momenat paljenja svetla). Nakon izolacije, Lajdigove ćelije su poslužile za određivanje unutarćelijske koncentracije cAMP (A), kao i za izolaciju RNK, nakon čega je određena relativna eksprimiranost *Adcy3*, *Adcy7*, *Pde4a* i *Pde4b* gena (B). Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva, kao i parametri ritma (Tabela 5.21). # Statistička značajnost između P i LP grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

Tabela 5.21 Parametri ritma – homeostaza cAMP. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana. Nakon izolacije, Lajdigove ćelije su poslužile za određivanje unutarćelijske koncentracije cAMP, kao i za izolaciju RNK, nakon čega je određena relativna eksprimiranost *Adcy3,7*, *Pde4a* i *b* gena. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
cAMP	LP	0.000041	4.1176	1.2274	52° / 03 h 28 min
	P	0.000027	5.4965	2.0387	106° / 07 h 05 min
	P+M	0.003546	4.1595	1.1515	92° / 06 h 06 min
Adcy3	LP	0.013516	1.0635	0.2386	114° / 07 h 35 min
	P	0.362044			
	P+M	0.031434	1.122	0.2557	177° / 11 h 47 min
Adcy7	LP	0.008063	1.1154	0.3136	119° / 07 h 56 min
	P	0.005769	1.0354	0.2805	108° / 07 h 11 min
	P+M	0.012462	1.0707	0.3142	113° / 07 h 34 min
Pde4a	LP	0,054898			
	P	0.368238			
	P+M	0.787025			
Pde4b	LP	0.164106			
	P	0.264562			
	P+M	0.163396			

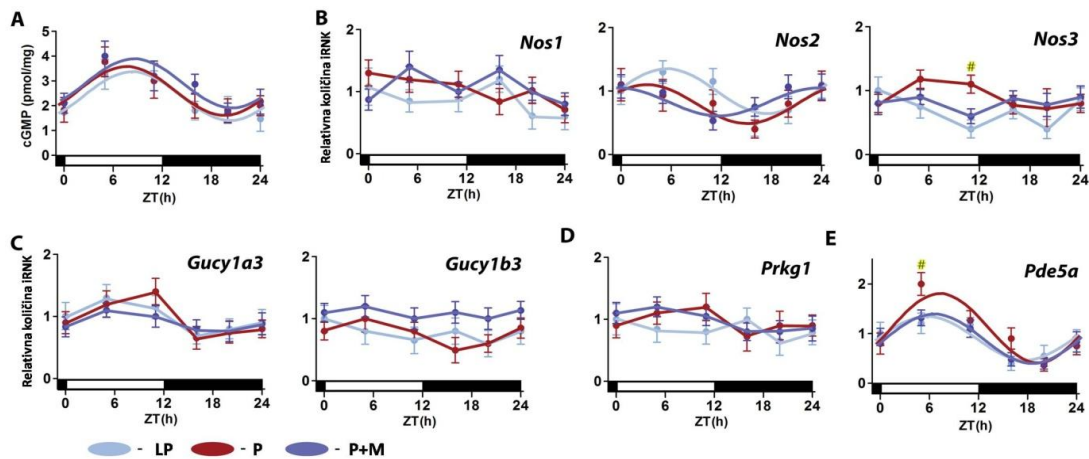
5.2.4.4. Cirkadijalni profil NO-cGMP-PRKG signalnog puta

Pinealektomija nije uticala na cirkadijalni profil unutarćelijske koncentracije cGMP (Sl. 5.29A, Tabela 5.22). Transkripcija gena koji produkciju NO, *Nos1* i *Nos3*, nije pokazala dnevnu ritmičnost, ali je uočeno povećanje transkripcije *Nos3* gena u svetloj fazi (Sl. 5.29B, Tabela 5.22). Eksprimiranje *Nos2* gena podleže dnevnom variranju, ali bez značajnih promena između P i LP grupe (Sl. 5.29B, Tabela 5.22). Analizom eksprimiranja gena zaduženih za produkciju cGMP, *Gucy1a3* i *Gucy1b3*, nisu utvrđene dnevne oscilacije, ali ni bilo kakve promene između eksperimentalnih grupa (Sl. 5.29C, Tabela 5.22). Dalje, pinealektomija nije imala značajan efekat ni na transkripciju glavnog efektornog molekula cGMP signalnog puta, PRKG, niti je količina iRNK ovog gena u bilo kojoj grupi imala dnevne oscilacije (Sl. 5.29D, Tabela 5.22). cGMP specifična fosfodiesteraza, PDE5a, pokazala je cirkadijalni ritam u svojoj transkripciji sa pikom oko ZT6.

Pinealektomija je blago povećala amplitudu ovog ritma, dok je aplikacija melatonina poništila taj efekat (Sl. 5.29E, Tabela 5.22).

Tabela 5.22 Parametri ritma - NO-cGMP-PRKG signalni put. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana. Nakon izolacije, Lajdigove ćelije su poslužile za određivanje unutarćelijske koncentracije cGMP, kao i za izolaciju RNK, nakon čega je određena relativna eksprimiranost gena uključenih u održavanje homeostaze cGMP i širenje signala. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period 24h).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
cGMP	LP	0.000501	2.3712	0.9509	124° / 08 h 17 min
	P	0.000234	2.5758	1.0648	114° / 07 h 36 min
	P+M	0.000519	2.8869	1.0298	125° / 08 h 19 min
Nos1	LP	0.991262			
	P	0.599183			
	P+M	0.702030			
Nos2	LP	0.001821	1.0449	0.4727	92° / 06 h 06 min
	P	0.031849	0.8218	0.2962	41° / 02 h 44 min
	P+M	0.029094	0.8522	0.2681	355° / 23 h 40 min
Nos3	LP	0.504123			
	P	0.319417			
	P+M	0.635438			
Gucy1a3	P+M	0.401996			
	LP	0.214090			
	P	0.583125			
Gucy1b3	P+M	0.617626			
	LP	0.319145			
	P	0.752817			
Prkg1	P+M	0.937991			
	LP	0.517696			
	P	0.782653			
Pde5a	P+M	0.001385	0.8942	0.4333	87° / 05 h 46 min
	P	0.000251	1.1267	0.7378	110° / 07 h 19 min
	P+M	0.000576	0.8955	0.5014	95° / 06 h 19 min



Slika 5.29 Cirkadijalni obrazac elemenata NO-cGMP signalnog puta. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0 - moment paljenja svetla). Nakon izolacije, iz Lajdigovih ćelija je određena unutarćelijska koncentracija cGMP i izolovana RNK, nakon čega je određena relativna ekspimiranost gena NO-cGMP-PRKG signalnog puta. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva i parametri ritma (Tabela 5.22). # Statistička značajnost između P i LP grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

5.2.4.5. Cirkadijalni profil ekspimiranja gena biološkog časovnika

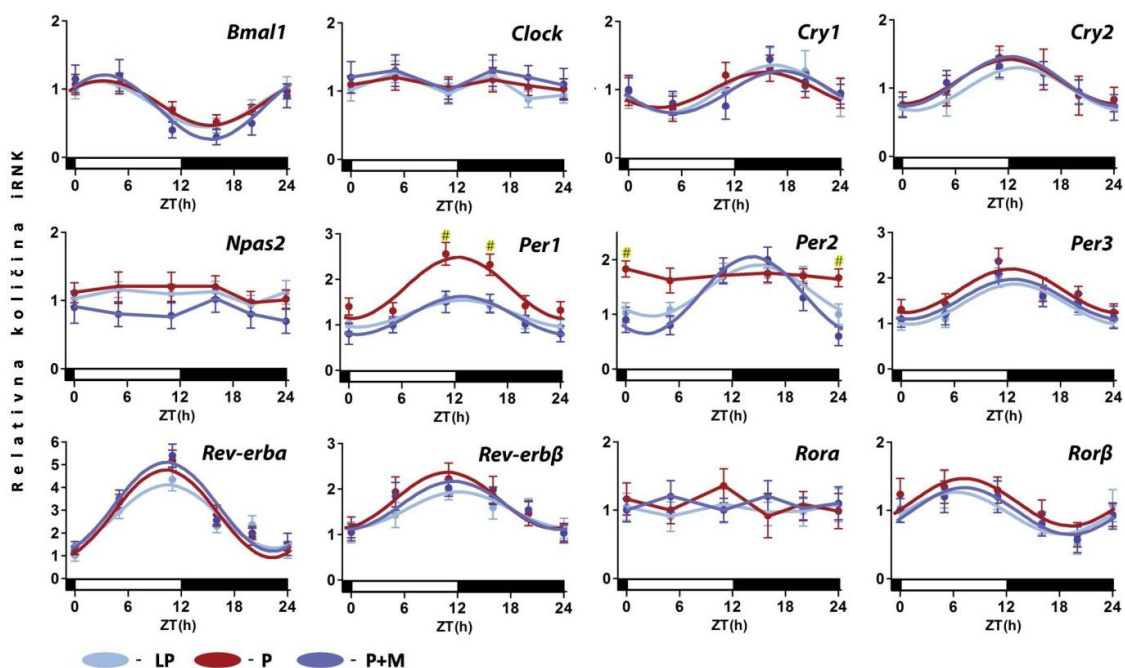
Pinealektomija nije imala značajan efekat na većinu ispitivanih gena biološkog časovnika (Sl. 5.30, Tabela 5.23). Ipak povećana je transkripcija *Per1* gena u dve vremenske tačke, ZT11 i ZT16, što je dovelo i do porasta amplitude cirkadijalnog talasa, dok je *Per2* izgubio ritmičnost u P grupi zbog pojačanog ekspimiranja ovog gena u ZT0/24 (Sl. 5.30, Tabela 5.23). Aplikacija melatonina poništila je ove efekte (Sl. 5.30).

Tabela 5.23 Parametri ritma – geni biološkog časovnika. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana. Iz izolovanih Lajdigovih ćelija je dobijena RNK i zatim određena relativna ekspimiranost gena biološkog časovnika. Parametri ritma su dobijeni obradom rezultata kosinor metodom (period fiksiran na 24h).

	Grupa	P	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Clock</i>	LP	0.521318			
	P	0.919754			
	P+M	0.953363			
<i>Bmal1</i>	LP	0.000225	0.7899	0.3134	42° / 02 h 48 min
	P	0.000262	0.8157	0.3047	50° / 03 h 21 min
	P+M	0.000656	0.7015	0.4990	48° / 03 h 12 min

Tabela 5.23 Parametri ritma LP, P i P+M pacova – geni biološkog časovnika (nastavak).

	Grupa	p	Mesor	Amplituda	Akrofaza (ZT)
<i>Npas2</i>	LP	0.505430			
	P	0.112295			
	P+M	0.783132			
<i>Per1</i>	LP	0.001842	1.2306	0.3149	192° / 12 h 46 min
	P	0.000346	1.8806	0.5799	185° / 12 h 19 min
	P+M	0.007441	1.1723	0.3887	192° / 12 h 48 min
<i>Per2</i>	LP	0.000248	1.4357	0.4609	221° / 14 h 42 min
	P	0.807689			
	P+M	0.000190	1.3308	0.7095	212° / 14 h 09 min
<i>Per3</i>	LP	0.001204	1.4332	0.4261	190° / 12 h 42 min
	P	0.000483	1.9878	0.4803	169° / 11 h 14 min
	P+M	0.012913	1.5182	0.4411	189° / 12 h 35 min
<i>Cry1</i>	LP	0.013319	1.0401	0.3501	256° / 17 h 02 min
	P	0.031476	1.0559	0.2559	232° / 15 h 30 min
	P+M	0.028081	0.9851	0.2981	268° / 17 h 53 min
<i>Cry2</i>	LP	0.010413	1.0326	0.2902	198° / 13 h 11 min
	P	0.012772	1.0988	0.3344	181° / 12 h 03 min
	P+M	0.009283	1.0926	0.3473	181° / 12 h 04 min
<i>Rev-erba</i>	LP	0.000056	2.7084	1.4235	158° / 10 h 32 min
	P	0.000005	3.3830	2.3886	154° / 10 h 17 min
	P+M	0.000014	3.1028	1.8553	153° / 10 h 11 min
<i>Rev-erbb</i>	LP	0.009687	1.5373	0.3934	182° / 12 h 09 min
	P	0.001514	1.7679	0.5930	166° / 11 h 03 min
	P+M	0.004287	1.6669	0.4963	170° / 11 h 21 min
<i>Rora</i>	LP	0.982303			
	P	0.731257			
	P+M	0.971888			
<i>Rorb</i>	LP	0.003774	1.0408	0.3937	100° / 06 h 40 min
	P	0.010288	1.1161	0.3417	106° / 07 h 04 min
	P+M	0.023214	0.9946	0.3294	107° / 07 h 08 min
<i>Dec1</i>	LP	0.028081	0.9851	0.2981	268° / 17 h 53 min
	P	0.029526	0.7566	0.2664	313° / 20 h 52 min
	P+M	0.007920	0.8672	0.3984	283° / 18 h 52 min
<i>Dec2</i>	LP	0.018674	0.8463	0.2476	32° / 02 h 07 min
	P	0.006273	0.7141	0.2845	15° / 00 h 59 min
	P+M	0.047639	0.7551	0.2706	19° / 01 h 16 min
<i>Dbp</i>	LP	0.000168	1.9411	0.8477	187° / 12 h 28 min
	P	0.000128	2.0183	0.8993	182° / 12 h 08 min
	P+M	0.000215	1.9694	0.9844	176° / 11 h 43 min
<i>E4bp4</i>	LP	0.000744	0.9696	0.3930	68° / 04 h 30 min
	P	0.000047	1.0022	0.5379	83° / 05 h 31 min
	P+M	0.015316	0.9283	0.3427	78° / 05 h 13 min

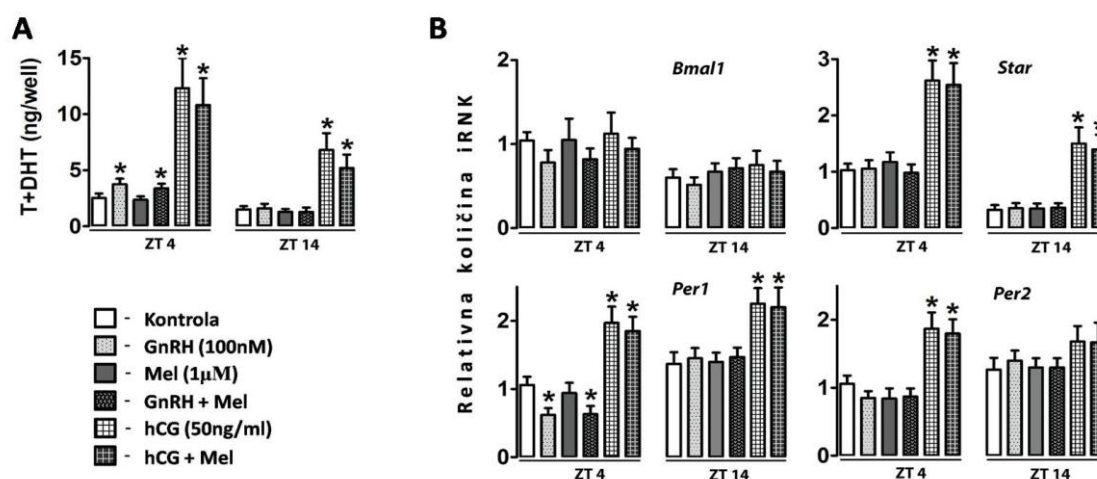


Slika 5.30 Cirkadijalni obrazac nivoa eksprimiranosti gena biološkog časovnika. Tri grupe adultnih Wistar pacova (LP, P, P+M) su žrtvovane u šest vremenskih tačaka u toku dana (ZT0, ZT5, ZT11, ZT16, ZT20, ZT24, ZT0 - moment paljenja svetla). Izolovane su Lajdigove ćelije iz kojih je dobijena RNK za analizu relativne eksprimiranosti gena biološkog časovnika. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati su analizirani kosinor metodom čime je dobijena kriva, kao i parametri ritma (tabela 5.23). # Statistička značajnost između P i LP grupe za istu vremensku tačku ($p < 0,05$).

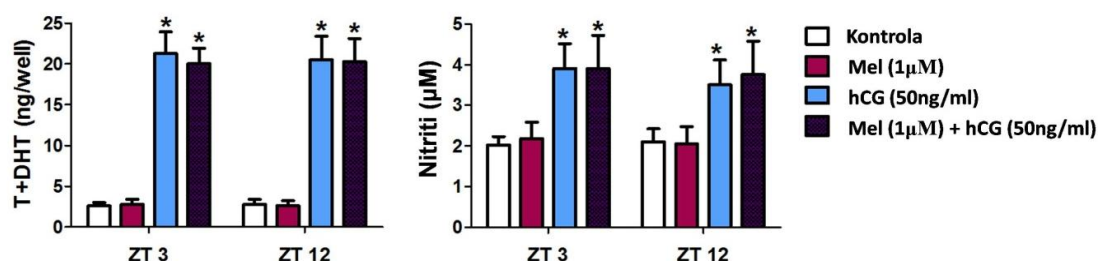
5.2.4.6. Direktna efekta melatonina na funkciju Lajdigovih ćelija

Da bi ispitali direktna efekta melatonina na steroidogenezu i eksprimiranost elemenata biološkog časovnika, formirana je primarna kultura Lajdigovih ćelija koja je zatim tretirana melatoninom u prisustvu ili odsustvu hormona GnRH i hCG (opisano u poglavlju 4.3.4).

Tretman melatoninom nije imao značajan efekat na produkciju testosterona u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija u obe vremenske tačke (Sl. 5.31A). Melatonin takođe nije značajno uticao ni na porast u produkciji testosterona izazvan GnRH u ZT4, kao ni porast izazvan hCG stimulacijom koja je bila prisutna u obe vremenske tačke (Sl. 5.31A).



Slika 5.31 Direktni efekat melatonina na primarnu kulturu Lajdigovih ćelija. Da bi dobili informaciju o direktnom uticaju melatonina na periferni biološki časovnik i steroidogenezu, formirana je primarna kultura Lajdigovih ćelija (3×10^6 Lć/ 55mm petri ploči) dobijena od adultnih životinja. Kultura je inkubirana sa ili bez melatonina ($1 \mu\text{M}$) u prisustvu ili odsustvu GnRH (100 nM) i hCG (50 ng/mL), 3h u dve vremenske tačke, ZT1-ZT4 i ZT11-ZT14. Nakon inkubacije medijum je sakupljen radi merenja koncentracije T+DHT (A), a ćelije su lizirane, izolovana je RNK i RQ-PCR metodom praćena transkripcija *Bmal1*, *Per1*, *Per2* i *Star* gena (B). Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. * Statistička značajnost između eksperimentalne i kontrolne grupe ($p < 0,05$).



Slika 5.32 In vitro efekat melatonina na produkciju nitrita u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija. Primarna kultura Lajdigovih ćelija (3×10^6 ćelija / 55mm petri ploči), dobijena od adultnih životinja, inkubirana je sa ili bez melatonina ($1 \mu\text{M}$) u prisustvu ili odsustvu hCG (50 ng/mL), 3h u dve vremenske tačke, ZT0-ZT3 i ZT9-ZT12. Nakon inkubacije medijum je sakupljen radi merenja koncentracije T+DHT i nitrita. Tačke predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. * Statistička značajnost između eksperimentalnih grupa i kontrole ($p < 0,05$).

Analizom relativne eksprimiranosti gena u primarnoj ćeliskoj kulturi, uočeno je da melatonin nije imao uticaj na *Bmal1* (Sl. 5.31B). Direktni efekat melatonina je izostao i kada su u pitanju drugi geni biološkog časovnika, kao što su *Per1* i *Per2*, ili *Star*, kao predstavnici gena uključenih u steroidogenezu, bilo da se radi o bazalnim uslovima ili ćelijama stimulisanim sa GnRH i hCG (Sl. 5.31B).

Kao dopuna *in vivo* analizi NO-cGMP-PRKG signalnog puta u Lajdigovim ćelijama u eksperimentalnom modelu pinealektomisanih životinja, praćena je produkcija nitrita (stabilnog metaboličkog produkta azot oksida) u primarnoj kulturi ovih ćelija dobijenoj od adultnih pacova, stimulisanom sa melatoninom u prisustvu ili odsustvu hCG hormona. Stimulacija je trajala 3h i urađena je u dve vremenske tačke ZT0-ZT3 i ZT9-ZT12. Kao potvrda uspešnosti hCG tretmana merena je koncentracija testosterona u ćelijskom medijumu, gde je hCG jasno podigao koncentraciju T+DHT (Sl. 5.32). Melatonin ipak nije imao značajan efekat na produkciju nitrita od strane Lajdigovih ćelija bilo da se radi o bazalnim uslovima ili o ćelijama stimulisanim sa hCG (Sl. 5.32).

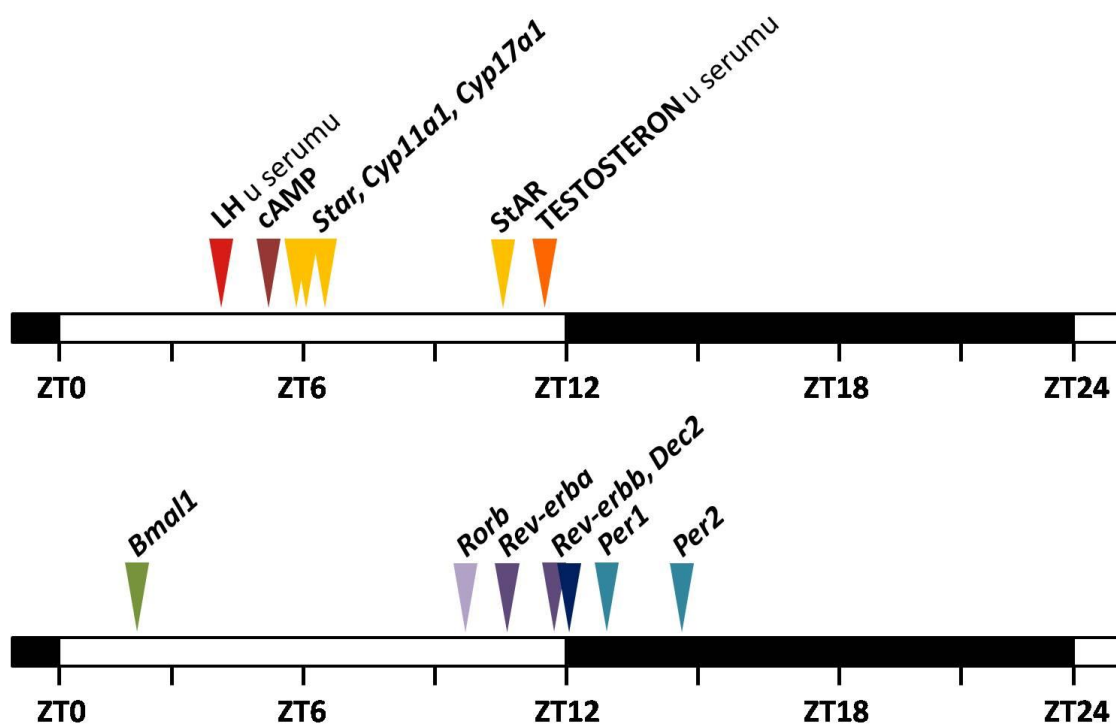
6. DISKUSIJA

6.1. Karakterizacija cirkadijalnog profila elemenata steroidogeneze i biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama pacova

Cirkadijalni sistem učestvuje u regulaciji i vremenskoj organizaciji mnogih procesa u organizmu. Ova regulatorna uloga se ostvaruje preko SCN i gena časovnika prisutnih u skoro svim tipovima ćelija, što kao rezultat ima stvaranje lokalnog osećaja vremena sa kojim ćelije usklađuju svoju funkciju. Uticaj cirkadijalnog sistema na reprodukciju ženki relativno dobro je opisan (Brown-Grant i Raisman, 1977; Mosko i Moore, 1979; Kennaway i sar., 2003; Dolatshad i sar., 2006; Karman i Tischkau, 2006; Boden i sar., 2010; Liu i sar., 2014), međutim slična ispitivanja na muškom reproduktivnom sistemu dovodila su često i do oprečnih mišljenja (Morse i sar., 2003; Alvarez i sar., 2003; Alvarez i sar., 2008). Jedan od razloga je verovatno činjenica da funkcija, pa i samo prisustvo elemenata časovnika, zavisi od tipa ćelije u testisu te je ovo dovelo do različitih rezultata ukoliko je analiziran ceo organ ili funkcija pojedinačnog ćelijskog tipa. Imajući to u vidu, prvi cilj ove teze bio je da se ispita prisutnost i okarakteriše cirkadijalni obrazac eksprimiranja steroidogenih, kao i elemenata časovnika u Lajdigovim ćelijama Wistar pacova. Postavljanje ovog cilja bilo je ohrabreno činjenicom da ovakvi podaci nisu poznati u literaturi, ali i da se zna da poremećaj cirkadijalnog sistema ima efekat na produkciju testosterona i fertilitnost mužjaka (Alvarez i sar., 2008). Sumirani rezultati cirkadijalne organizacije elemenata uključenih u steroidogenezu i održavanje biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama su predstavljeni na slici 6.1.

Odavno je poznato da koncentracija testosterona u cirkulaciji podleže cirkadijalnom ritmu, ali isto tako i da osobine tog ritma, kao što su vreme i broj pikova, u velikoj meri zavise od animalnog modela, korišćene metode, eksperimentalnih uslova itd. (Mock i sar., 1978; Keating i Tcholakian, 1979; Chacon i sar., 2004; Waite i sar., 2009; Thorpe i sar., 2012). Rezultat koji smo dobili (cirkadijalan ritam testosterona u serumu sa pikom oko ZT11) se ipak uklapa u opštu sliku prihvaćenu i verifikovanu od strane naučne javnosti, sa napomenom da je precizno merenje izuzetno teško postići zbog velikih individualnih variranja, ali i

činjenice da je testosteron produkovan u pulsevima (zbog pulsatorne sekrecije LH), tako da se radi o više različitih ritmova u zavisnosti od vremenske skale posmatranja. Cirkadijane varijacije su uočene i u unutarćelijskoj koncentraciji cAMP, prenosnika signala od LH receptora, kao i u eksprimiranju *Star*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1* gena. Sumarno: LH dostiže svoj pik četiri sata nakon početka svetle faze (dan), ubrzo zatim dolazi do povećanja unutarćelijske koncentracije cAMP i podizanja nivoa transkripcije glavnih steroidogenih elemenata. StAR protein dostiže svoju maksimalnu koncentraciju pred kraj svetle faze, nakon čega testosteron dostiže svoj pik, pred sam početak tamne faze (noć) (Sl. 6.1). Pošto su pacovi noćne životinje, testosteron je onda najviši pred početak aktivne faze. Ovaj hormon je najviši pred početak aktivne faze i kod čoveka, što je u tom slučaju jutro.



Slika 6.1 Karakterizacija cirkadijalnog ritma steroidogenih i elemenata perifernog biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama pacova. Oznake predstavljaju akrofaze (pikove) cirkadijalnog ritma naznačenih elemenata.

Naši rezultati ukazuju da se u Lajdigovim ćelijama pacova eksprimiraju svi najvažniji geni biološkog časovnika. Ritmično eksprimiranje je zabeleženo kod *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba*, *Rev-erbb*, *Rorb*, *Dec2*, *E4bp4* i *Dbp*, a konstantno kod *Clock*, *Npas2*, *Rora*, *Dec1*, *Cksn1e* i *Cksn1d* gena. Vreme pika

transkripcije nekih od ritmično eksprimiranih gena je prikazano na slici 6.1. Cirkadijalan obrazac transkripcije gena časovnika, kakav je ovde opisan, vrlo je sličan sa onim detektovanim u drugim perifernim tkivima (Ko i Takahashi, 2006), upućujući na zaključak da je način na koji ovi geni održavaju cirkadijalnu transkripciju (primarna i sekundarna petlja) verovatno isti ili sličan. Ritmično eksprimiranje ovih gena u tetsisu je bilo detektovano i ranije (Zylka i sar., 1998), ali postoje i studije koje ukazuju da u ovom tkivu ritam nije prisutan (Alvarez i sar., 2003, Morse i sar., 2003). Analizirajući muški reproduktivni sistem, ritmično eksprimiranje gena časovnika pronađeno je u epididimisu i prostati, ali ne i u seminalnim vezikulama (Bebas i sar., 2009). U slučaju Lajdigovih ćelija, detektovana je ritmična eksprimiranost *Bmal1* gena kod miša (Alvarez i sar., 2008).

Još jedan doprinos teze je informacija da se ritmovi u transkripciji najvažnijih gena časovnika (*Bmal1*, *Per1* i *Per2*) održavaju i u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija pacova najmanje 24 časa. Ista osobina je detektovana i kada je u pitanju *Star*, jedan od ključnih gena uključenih u steroidogenezu. Sa druge strane, ritam *Nur77*, jednog od regulatora steroidogene mašinerije, izostaje u kulturi (njegova transkripcija vremenom konstantno opada). Iz ovoga se izvodi zaključak da se primarna kultura Lajdigovih ćelija može koristiti za hronobiološke tipove eksperimenata, bar u prvih 24h, ali treba da budemo svesni i određenih nedostataka ovakvog pristupa. U svakom slučaju, činjenica da je eksprimiranje *Star* gena ritmično i u kulturi ukazuje da Lajdigove ćelije poseduju svoj časovnik koji može da reguliše steroidogenezu u odsustvu spoljašnjih faktora.

Nakon detekcije elemenata časovnika u Lajdigovim ćelijama, nametnulo se pitanje puteva kojima je ovaj časovnik regulisan (time se bavi drugi deo teze), ali i uloge ovih gena u regulaciji steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama. Do sada je pokazano da centralni časovnik u SCN preko Kiss neurona reguliše hipotalamo-hipofizno-gonadalnu (HPG) osovinu oba pola, a time i produkciju polnih hormona (Palm i sar., 1999; Smarr i sar., 2012). Pravilna steroidogeneza je narušena kod *Bmal1*^{-/-} miševa, gde se detektuje smanjena sekrecija progesterona kod ženki (Ratajczak i sar., 2009) i testosterona kod mužjaka (Alvarez i sar., 2008). Da bi značajan efekat na steroidogenezu mogli imati i geni perifernih časovnika pokazuju

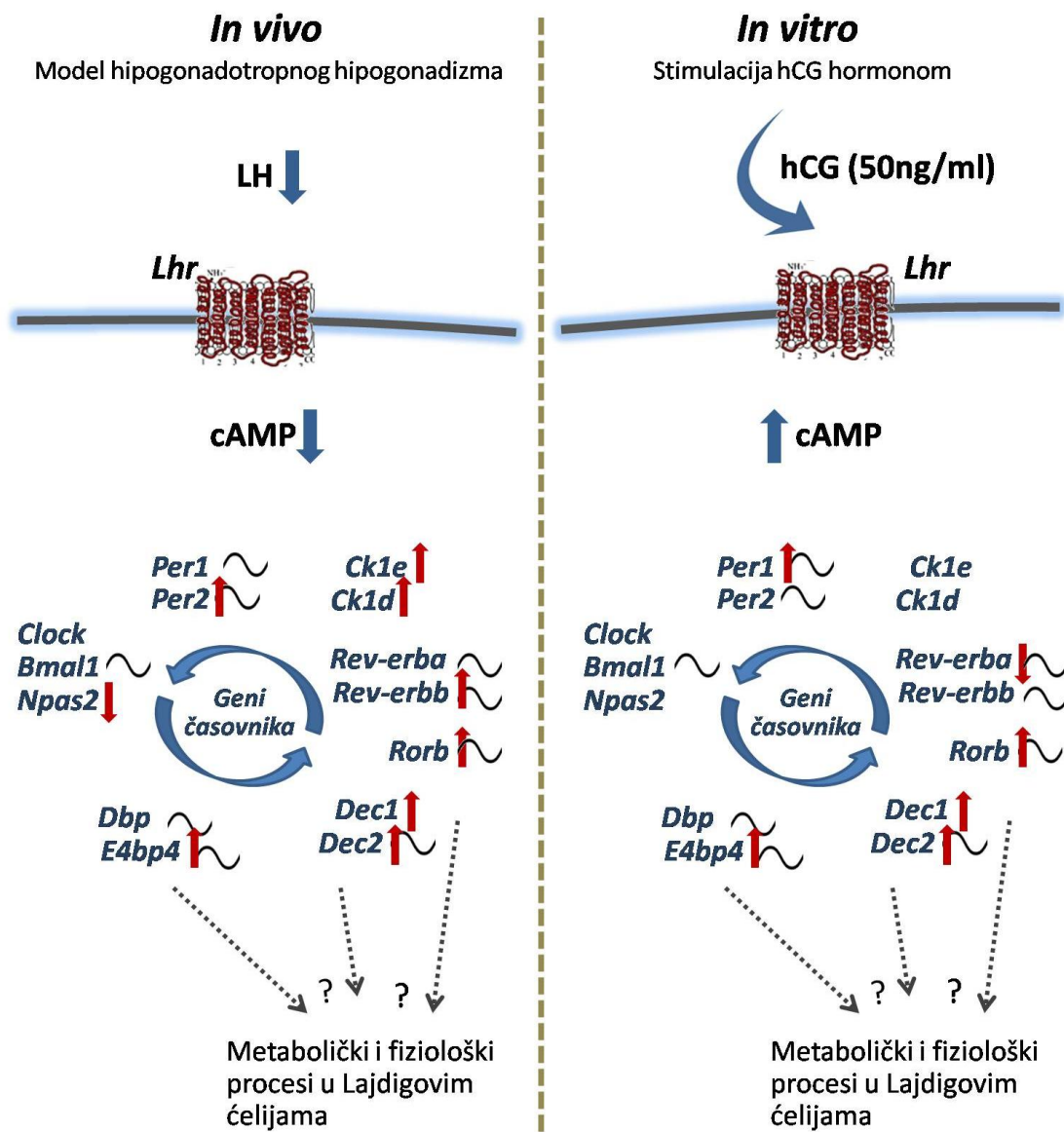
eksperimenti sa ćelija-specifičnom delecijom *Bmal1* gena (Cre rekombinaza je vezana za *Sf1*) gde opet dolazi do poremećaja u sintezi progesterona (Liu i sar., 2014). Do sada, BMAL1 je povezan sa eksprimiranjem *Star* gena u nekoliko tipova steroidogenih ćelija: ovarijum (Boden i sar., 2010), žuto telo (Ratajczak i sar., 2009), adrenalna žlezda (Son i sar., 2008) i MA-10 linija Lajdigovih ćelija (Alvarez i sar., 2008). Analiza sprovedena na MA-10 liniji Lajdigovih ćelija pokazuje da BMAL1 protein pojačava eksprimiranost *Star* gena što se, bar po fazama ritmova ovih gena, uklapa u rezultate koje smo mi dobili – pik u transkripciji *Bmal1* predhodi pik u *Star* gena (Sl. 6.1).

Eksperimenti na granulosa ćelijama su pokazali da, pored BMAL1 (Nakao i sar., 2007), na eksprimiranje *Star* gena može da utiče još jedan element časovnika, REV-ERB α (Chen i sar., 2012). Imajući sve ovo u vidu, jedan od narednih ciljeva bio bi ispitivanje potencijalne regulatorne uloge detektovanih gena časovnika na gene uključene u steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama pacova. Takođe, dodatne analize o cirkadijalnom profilu proteina i aktivnosti proteina proučavanih gena, značajno bi upotpunile prikazane rezultate, ali i olakšale put ka uočavanju potencijalnih regulatornih mehanizama.

6.2. Efekat poremećene LH-cAMP signalizacije na obrazac eksprimiranja gena biološkog časovnika i gena povezanih sa steroidogenezom na modelu hipogonadotropnog hipogonadizma

Podaci dobijeni karakterizacijom cirkadijalnog profila eksprimiranja steroidogenih elemenata, kao i elemenata biološkog časovnika, upućuju na ritmičnu funkciju Lajdigovih ćelija pacova. Ipak, način sinhronizacije (regulacija koja vremenski usklađuje procese u organizmu sa spoljašnjom sredinom, ali i međusobno) ovog perifernog časovnika nije jasan, te smo želeli da ispitamo efekat LH-cAMP signalnog puta na elemente časovnika, kroz model hipogonadotropnog hipogonadizma. LH je izuzetno značajan za Lajdigove ćelije kao glavni pokretač produkcije testosterona, pa je opravdana pretpostavka da bi on mogao biti jedan od mehanizama pomoću kojih dolazi do resetovanja časovnika u ovom tipu ćelija.

Ovu pretpostavku podržava činjenica da je cAMP već poznat kao važna signalna komponenta pri resetovanju časovnika u SCN (O'Neill i Reddy, 2012). Takođe, efekat LH na eksprimiranje pojedinih gena časovnika već je pokazan na primeru granuloza ćelija (He i sar., 2007).



Slika 6.2 Efekat LH/cAMP signalnog puta na eksprimiranje gena perifernog biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama. Plave strelice označavaju eksperimentalno dobijene uslove (spušten nivo LH npr.); crvene strelice ukazuju na porast ili smanjenje nivoa transkripcije; crni talas ukazuje na prisutnost ritma u transkripciji.

Blokada HPT osovine u ovom eksperimentalnom pristupu dovela je do pojačane transkripcije *Per2*, *Rorb*, *Rev-erbb*, *Dec1*, *Dec2*, *E4bp4*, *Ck1e*, *Ck1d* i snižene

transkripcije *Npas2* (Sl. 6.2). Iako *Bmal1* i *Clock* geni nisu afektovani, značajna je promena transkripcije *Npas2*, gena koji kodira NPAS2, funkcionalni analog CLOCK proteinu (Landgraf i sar., 2016). Pošto NPAS2, takođe, gradi dimer sa BMAL1, promena u njegovoj količini bi mogla da utiče i na aktivnost BMAL1 proteina. U određenim tkivima NPAS2 može čak i potpuno da nadoknadi gubitak CLOCK proteina (Kennaway i sar., 2006; Landgraf i sar., 2016). Ipak, za sada se ne zna tačna uloga ovog proteina u Lajdigovim ćelijama, kao ni odnos u kom BMAL1 interaguje sa jednim, odnosno drugim proteinom. *In vitro* aktivacija LH receptora Lajdigovih ćelija nije dovela do promene transkripcije *Npas2*, što znači da uočeni efekat primećen *in vivo* verovatno nije direktan odgovor na promenu u nivou LH. Oba pristupa dovela su do promene transkripcije jednog od *Period* gena, koji su poznati kao geni preko kojih se dešava resetovanje časovnika u SCN (Kandalepas i sar., 2016), što ukazuje na ulogu LH u resetovanju časovnika u Lajdigovim ćelijama. U prilog ovome ide i činjenica da resetovanje časovnika u SCN podrazumeva i promenu nivoa cAMP, a to je ono što se dešava i nakon aktivacije LH receptora. U hipogonadotropnom hipogonadizmu, kao i u direktnoj stimulaciji Lajdigovih ćelija sa hCG, došlo je do promene u transkripciji nekoliko gena važnih za održavanje časovnika (porast kod *Rorb*, *Dec1*, *Dec2* i pad kod *Rev-erba*) (Sl. 6.2), ali koji kao transkripcioni faktori mogu regulisati i mnoge druge procese u ćeliji. REV-ERB α , kao i BMAL1 može biti direktno uključen u regulaciju steroidogeneze (Chen i sar., 2012) i na taj način obezbediti još jedan put kojim LH reguliše ovaj proces. DEC1/2 takođe učestvuju u resetovanju SCN kao i PER, ali preko protein-pretein interakcija mogu da utiču i na aktivnost mnogih transkripcionih faktora kao što su HIF-1 α , RXR α , MyoD i STAT (Kato i sar., 2014). Na ovaj način proteini časovnika postaju posrednici između aktivacije LH receptora i povišenog nivoa cAMP sa jedne, i mnogih metaboličkih procesa u Lajdigovim ćelijama, sa druge strane. Još jedan gen časovnika koji može preneti informaciju na druge procese je *E4bp4*. Ovaj protein kao negativan regulator kontroliše eksprimiranje gena koji u svom promotoru sadrže D-box (Mitsui i sar., 2001). Pošto je njegova transkripcija pojačana pri *in vitro* stimulaciji sa hCG, a njegov par, pozitivan regulator, *Dbp*, nije promenjen, može se pretpostaviti da LH ima negativan uticaj na transkripciju gena koji sadrže D-box. Ipak, transkripcija ovog gena bila je povišena i u hipogonadizmu,

tj. uslovima hronično niskog nivoa LH. Da bi se malo bolje razumela uloga časovnika u odgovoru Lajdigovih ćelija na LH potrebno je nastaviti sa istraživanjima – po dobijenim rezultatima izvesno je da ona postoji.

Uloga gonadotropnih hormona kao sinhronizatora perifernih oscilatora bolje je istražena u ženskom reproduktivnom sistemu (Sellix i Menaker, 2010). Poznato da su gonadotropni hormoni ne samo sinhronizatori časovnika u granuloza ćelijama već i njegovi pokretači (ekspimiranje gena časovnika je konstantno u nezrelim granuloza ćelijama, dok maturacijom ovih ćelija ono postaje ritmično) (He i sar., 2007; Sellix, 2015). Pokazano je da i FSH i LH indukuju ekspimiranje *Per1* i *Per2* u kulturi nezrelih i zrelih granuloza ćelija, i to najverovatnije preko cAMP (He i sar., 2007). Talas LH je uzrokovao značajne promene na ekspimiranje *Bmal1*, *Per2* i *Cry1* i u granuloza ćelijama kokoške (Tischkau i sar., 2011). Tretman hCG hormonom kod pacova sa odstranjenom hipofizom je takođe doveo do pojačane transkripcije *Bmal1* i *Per2* gena na nivou ovarijuma (Karman i Tischkau, 2006), još jednom potvrđujući ulogu LH u resetovanju perifernih časovnika reproduktivnog sistema.

Iako rezultati ove teze, ali i paralele koje se mogu povući sa ženskim reproduktivnim sistemom, ukazuju na ulogu LH/cAMP u sinhronizaciji perifernog časovnika u Lajdigovim ćelijama, tačan način na koji ovaj signalni put to ostvaruje, kao i posledice ovako dobijene promene u transkripciji gena časovnika na metaboličke i fiziološke procese u ovim ćelijama ostaju još uvek nejasne i traže dodatna istraživanja. Sumarni rezultati ovog dela istraživanja su prikazani na slici 6.2.

6.3. Efekat poremećene LH-cAMP signalizacije na obrazac ekspimiranja gena biološkog časovnika i gena povezanih sa steroidogenezom na modelu staračkog hipogonadizma

Poznato je da u starenju funkcija Lajdigovih ćelija opada i kod pacova i kod čoveka, što vodi smanjenju produkcije testosterona. Ovo je posledica smanjenog cAMP odgovora na gonadotropine (Lin i sar., 1983; Chen i sar., 2002; Sokanovic i sar., 2014), otežan transport holesterola, izazvan smanjenom transkripcijom *Star*

gena (Culty i sar., 2002; Sokanovic i sar., 2014), i smanjenom transkripcijom i aktivacijom steroidogenih enzima CYP11A, HSD3B, CYP17A i HSD17B (Luo i sar., 1996; 2005; Sokanovic i sar., 2014). Prvi znaci poremećaja steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija kod pacova se obično javljaju oko dvanaestog meseca života; funkcija progresivno opada do otprilike petnaestog meseca, od petnaestog do dvadesetčetvrtog se održava na niskom nivou (Sokanovic i sar., 2014). Iako je smanjenje funkcije Lajdigovih ćelija izazvano starenjem dobro poznato, promene nisu praćene kroz prizmu cirkadijalnih ritmova. Naš cilj je bio da opišemo cirkadijalne promene u eksprimiranju gena uključenih u steroidogenezu, kao i gena biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama u starenju kao modelu prirodnog, primarnog hipogonadizma.

Starenje je promenilo cirkadijalnu organizaciju opisanu kod adulta (Sl. 6.3) spuštanjem: ritmične sekrecije testosterona, fluktuacija unutarćelijske koncentracije cAMP, jačine ritma u eksprimiranju glavnih elemenata steroidogeneze *Star*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1*, kao i važnog stimulatora steroidogeneze, *Nur77*. Ove promene je pratila i redukcija aritmične transkripcije *Lhr*, *Hsd3b1/2*, *Hsd17b4* i najvažnijeg transkripcionog faktora uključenog u steroidogenezu, *Sf1* (Lavoie i King, 2009; Sokanovic i sar., 2014). Iako *Creb1* gen nije pokazao ritam, kao ni bilo kakve promene u transkripciji poredeći starosne grupe, vrlo je verovatno da je aktivnost proteina pod cirkadijalnom kontrolom preko fosforilacije (Gau i sar., 2002), pogotovo što je detektovan cirkadijalni ritam u koncentraciji cAMP. Uzimajući u obzir sve rezultate, cirkadijalna organizacija steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama nije značajno promenjena iako je starenje redukovalo amplitudu i mesor ritma transkripcije gena uključenih u transformaciju holesterola u testosteron.

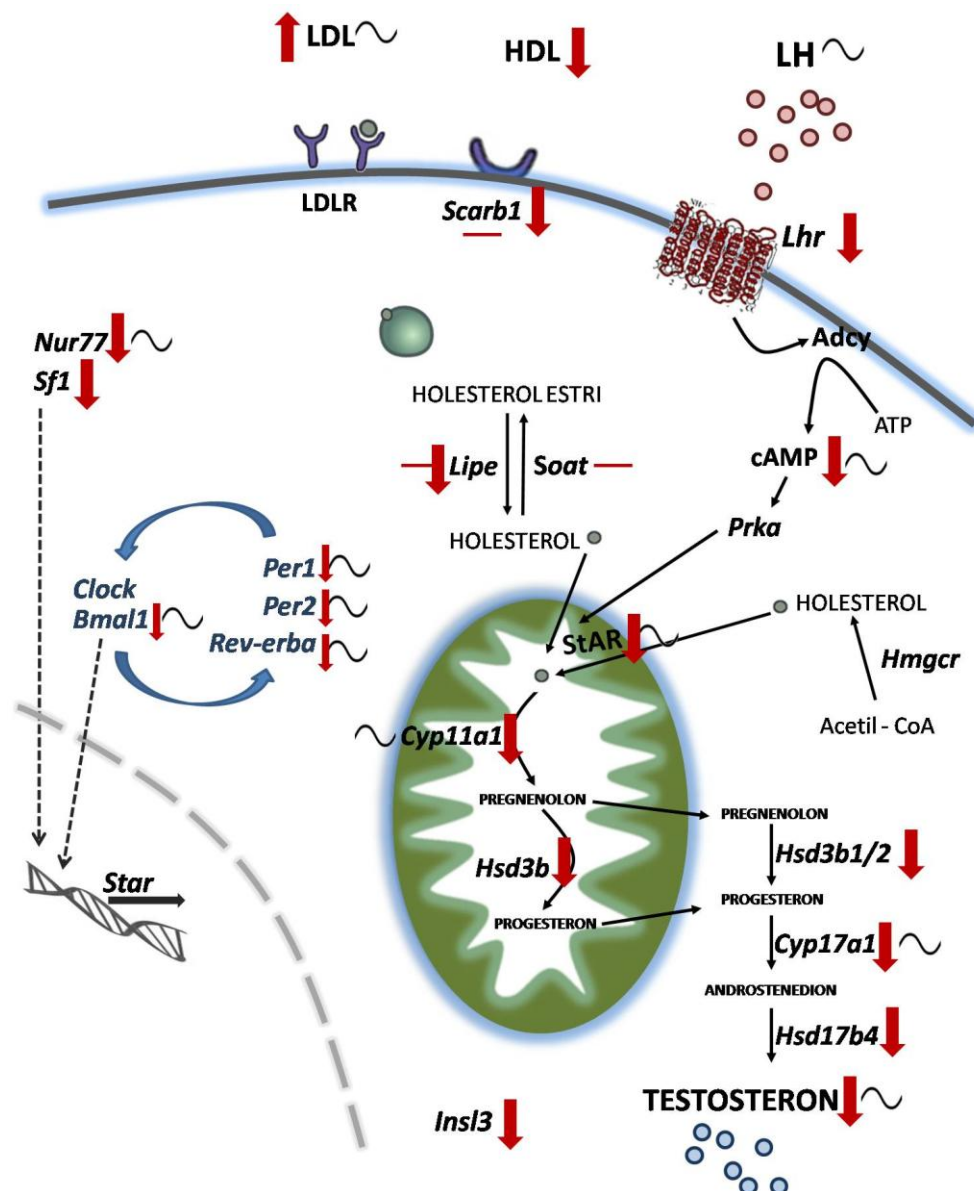
Sledeće pitanje bilo je da li je starenje povezano i sa metabolizmom holesterola u drugim organima, što bi onda ograničavalo dostupnost holesterola u cirkulaciji Lajdigovim ćelijama i/ili sa izmenjenom mobilizacijom i unošenjem holesterola u Lajdigove ćelije. U pokušaju da odgovorimo na ovo pitanje pratili smo: 1) nivo transkripata ključnih proteina uključenih u metabolizam holesterola u Lajdigovim ćelijama i 2) lipidni status u serumu adultnih i starih životinja u toku 24h. Rezultati su pokazali gubitak cirkadijalnog ritma eksprimiranja *Lipe* (gen koji

kodira HSL) u Lajdigovim ćelijama poreklom od životinja starih 24 meseca u poređenju sa kontrolnom grupom, ukazujući da je oslobađanje slobodnog holesterola iz lipidnih kapi afektovano. Starenje je takođe dovelo do ukidanja ritma i značajnog pada u transkripciji *Soat2* (gen koji kodira protein odgovoran za formiranje holesterol estara i VLDL) i *Scarb1* (gen koji kodira HDL receptor), ukazujući da je i metabolizam holesterola, kao i njegov unos značajno otežan u Lajdigovim ćelijama starih životinja. Za razliku od steroidogenih ćelija ljudi, koje uglavnom koriste LDL iz cirkulacije, unoseći ga endocitozom zajedno sa receptorom, steroidogene ćelije glodara dominantno vezuju HDL preko SCARB1, multifunkcionalnog receptora koji obezbeđuje selektivni unos holesterol estara (Rone i sar., 2009; Miller i Bose, 2011). SCARB1 nije značajan samo za homeostazu HDL holesterola i potencijalan razvoj ateroskleroze (Lorbek i sar., 2015), već i dužinu zivota eritrocita (Meurs i sar., 2005). Prema tome, pored poremećaja homeostaze HDL holesterola, smanjena transkripcija *Scarb1* gena bi mogla uticati i na dužinu života Lajdigovih ćelija. Sa druge strane, analiza statusa lipida u serumu pokazala je da starenje izaziva obrnut efekat na koncentraciju HDL i LDL – HDL je značajno snižen u serumu životinja starih 24 meseca, dok je LDL značajno povišen u serumu životinja starih i 18 i 24 meseca. Ovo je u saglasnosti sa studijom gde je izmeren značajan porast LDL u serumu kod pacova starih 22 meseca (Helmy, 2012).

Pored produkcije testosterona, starenje je spustilo i transkripciju *Insl3*, još jednog markera funkcionalnosti Lajdigovih ćelija. Iako je poznato da su testosteron i INSL3 pozitivno regulisani luteinizirajućim hormonom, pad LH u starenju nije zabeležen, kao ni promena parametara ritma njegove koncentracije u serumu. Fenomen da LH u starenju ne pada kod pacova, već je poznat u literaturi (Midzak i sar., 2009; Sokanovic i sar., 2014).

Pošto postoje podaci da geni časovnika mogu uticati na transkripciju *Star* gena (Alvarez i sar., 2008; Son i sar., 2008), a time i na steroidogenezu, postavilo se pitanje da li bi poremećaj u cirkadijalnoj organizaciji ovih gena mogao doprineti padu steroidogeneze u starenju. Da bi se približili odgovoru na ovo pitanje, ispitan je uticaj starenja na cirkadijalni ritam eksprimiranja gena časovnika u Lajdigovim ćelijama životinja starih 18 i 24 meseca. Naši rezultati pokazuju da je transkripcija

Bmal1, *Per1*, *Per2* i *Rev-Erba* nešto niža kod životinja starih 24 meseca u poređenju sa adultima, ali ne i kod životinja starih 18 meseci. Ovakvi rezultati se slažu sa literaturnim podacima po kojima su promene u eksprimiranju glavnih gena časovnika u perifernim tkivima u starenju ili vrlo male ili izostaju (Bonaconsa i sar., 2014). Iz ovih rezultata proizilazi da je sistem gena časovnika u starenju ipak dosta stabilniji od sistema koji podržava steroidogenezu (smanjena funkcionalnost steroidogenih elemenata se uočava mnogo ranije), te da geni časovnika verovatno nemaju značajan udeo u padu steroidogeneze tokom starenja.



Slika 6.3 Cirkadijalni obrazac funkcije Lajdigovih ćelija u starenju. Crvenim strelicama su prikazani efekti starenja; crni talas ukazuje na ritam u transkripciji; crvena horizontalna linija ukazuje na gubitak ritma u starenju

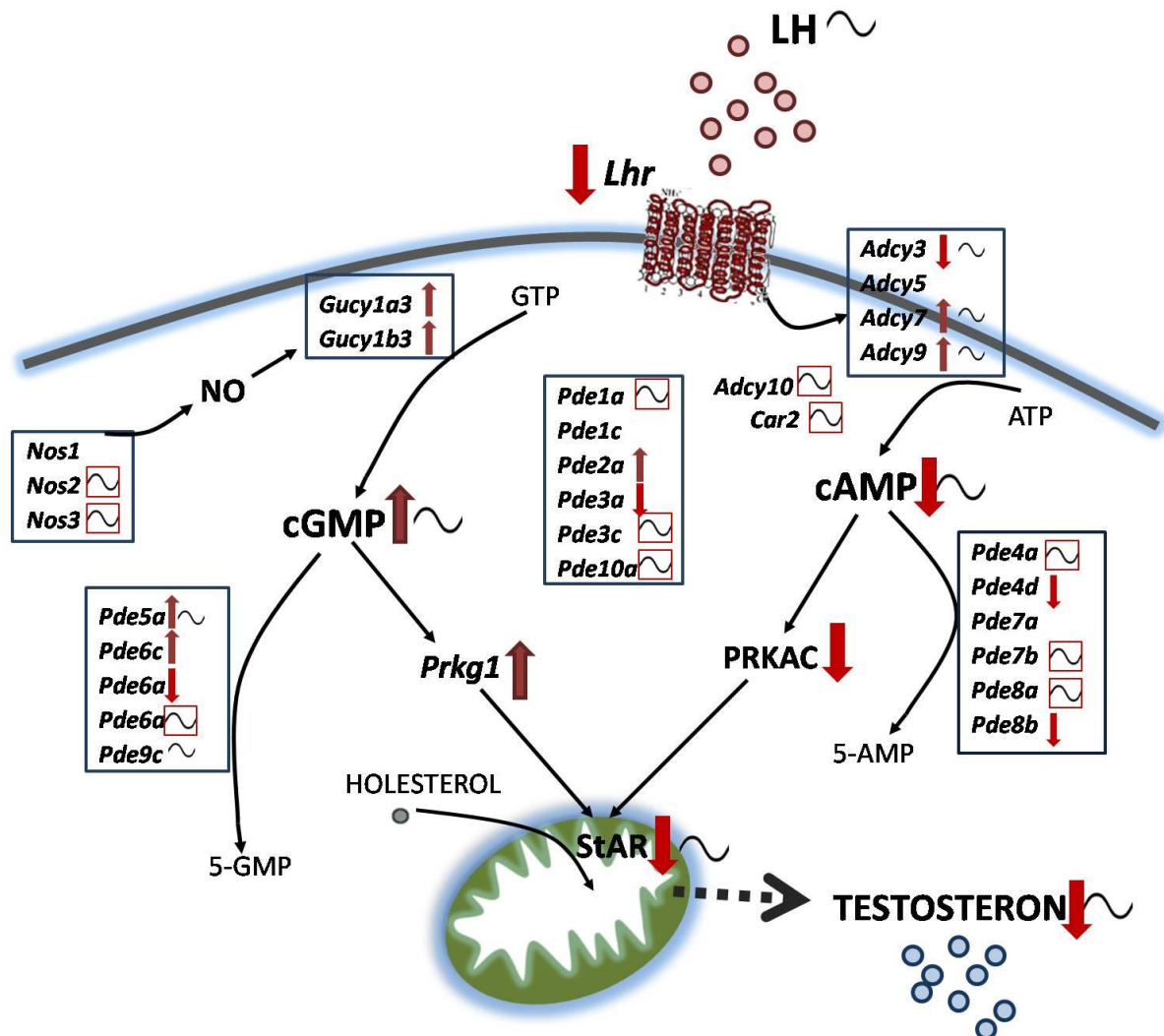
Uočen pad u eksprimiranju osnovnih gena časovnika bi ipak mogao imati određene posledice po procese regulisane tim genima u podmaklom starenju. Tako je, na primer, BMAL1 važan za regulaciju oksidativnog stresa i odgovora na DNK oštećenja, a deficijencija ovog proteina vodi ubrzanom starenju uzrokovanom stresom *in vivo* (Khapre i sar., 2011). DNK vezujuća aktivnost BMAL1 značajno zavisi od deacetilacije koju vrši SIRT1 (Nakahata i sar., 2008), protein uključen u ćelijski metabolizam koji koristi NAD⁺ kao koenzim. Transkripcija *Nampt*, gena koji kodira najvažniji enzim u putu stvaranja NAD⁺, je cirkadijalna, što govori o cirkadijalnoj produkciji unutarćelijskog NAD⁺ (Nakahata i sar., 2009; Ramsey i sar., 2009). Ovde onda dolazi do formiranja male povratne sprege u kojoj BMAL1-CLOCK kontrolišu sopstvenu aktivnost diktirajući oscilacije nivoa NAD⁺, odnosno regrutaciju SIRT1 proteina (Nakahata i sar., 2009; Ramsey i sar., 2009). U Lajdigovim ćelijama starih pacova eksprimiranost elemenata ove sprege *Bmal1*, *Sirt1* i *Nampt* je spuštena, što ukazuje na smanjen odnos NAD⁺/NADH kofaktora. Sa druge strane, poznato je da smanjen odnos NAD⁺/NADH može uticati na eksprimiranje i aktivnost steroidogenih enzima, pogotovo HSD3B (Ohba i sar., 1981).

cAMP signalni put predstavlja glavni put prenosa signala u Lajdigovim ćelijama i, iako je poznato da dolazi do pada u nivou ovog cikličnog nukleotida u starenju, uticaj starenja na cirkadijalni obrazac elemenata ovog signalnog puta nikad nije analiziran. Amplituda i trajanje signala koji prenosi LH-cAMP-PRKA put regulisan je prostorno-vremenskom distribucijom i sinhronizovanom aktivnošću hormonskog receptora, ADCY, PDE i PRKA (Tasken i Aandahl, 2004). Pošto je starenje povezano sa smanjenim odgovorom cAMP na stimulaciju gonadotropinima (Lin i sar., 1983; Chen i sar., 2002; Sokanovic i sar., 2014) i smanjenjem eksprimiranja *Lhr*/LHR, moguće je da ima uticaj i na vremensku organizaciju ovog procesa. I zaista, starenje je promenilo cirkadijalan obrazac transkripcije gena koji kodiraju ADCY vezane za membranu (smanjena je amplituda *Adcy3*, a povećana kod *Adcy7* i *Adcy9*) i ukinulo ritam eksprimiranja *Prkac* i *Prkar2a*. Ipak, usled oslabljene veze LHR sa ADCY-PRKA sistemom u Lajdigovim ćelijama starih životinja, ukupan rezultat bio je oslabljen cAMP odgovor (Chen i sar., 2002, 2004).

Sa druge strane, starenje je dovelo do pojačane transkripcije *Adcy10* na kraju tamnog perioda, kada nivo serumskog testosterona dostiže svoj minimum. ADCY10 protein je senzitivna na bikarbonate i funkcioniše kao metabolički senzor koji povezuje metaboličke procese sa cAMP signalizacijom (Chang i Oude-Elferink, 2014). Iako je lokalizovana u citosolnim kompartmentima, ADCY10 značajno doprinosi održanju cAMP pulsa u Lajdigovim ćelijama, naročito u starenju (Sokanovic i sar., 2014). Poznato je da u starenju dolazi do pada ćelijskog metabolizma, koji prate poremećaj pH i povećana produkcija ROS (*engl. reactive oxygen species*) (Chen i sar., 2009; Beattie i sar., 2013), tj. uslova u kojima je steroidogeneza narušena. Imajući u vidu da ADCY10 reguliše pH homeostazu i predstavlja vezu između cAMP signalizacije i mnogih metaboličkih procesa (Chang i Oude-Elferink, 2014) ADCY10 može imati značajnu ulogu i u disfunkciji metabolizma u Lajdigovim ćelijama do koje dolazi u starenju. Starenje dovodi i do sličnog transkripcionog obrasca *Car2*, enzima koji katališe reverzibilnu hidrataciju ugljen dioksida i uključen je u regulaciju pH homeostaze (Pan i sar., 2006). Moguće je pretpostaviti da neki metabolički faktor, promenjen u starenju, izaziva promene u eksprimiranju i *Car2* i *Adcy10* i na taj način koordinisano reguliše mnoge metaboličke procese, uključujući tu ćelijski ciklus, metabolizam glukoze i lipida, kao i transkripciju gena preko cAMP signalne kaskade.

Izuzetno veliki uticaj na efekte koje ostvaruje cAMP ima aktivnost, nivo i lokalizacija *Pde*, enzima koji hidrolizacijom konvertuju cAMP u 5-AMP (Conti i Beavo, 2007). Specifičnost i intenzitet cAMP odgovora su visoko zavisni od prostorno-vremenske organizacije PDE u ćeliji (Wong i Scott, 2004). Najznačajnije PDE za regulaciju steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama su PDE4, PDE8A i PDE8B (Shimizu-Albergine i sar., 2012). Starenje je značajno uticalo na njihovu transkripciju: podiglo *Pde4a*, spustilo i ukinulo ritam *Pde4d*, kompletno obrnulo cirkadijalni ritam *Pde8a* i spustilo *Pde8b*. Ovako narušena cirkadijalna transkripcija *Pde* afektuje cAMP pul, ali i druge metaboličke procese koji imaju značajan uticaj na vreme i obim sekrecije testosterona koji se dešava kao rezultat LH stimulacije (Golkowski i sar., 2016). Dodatno, cAMP/PRKA put je uključen u resetovanje časovnika u odsustvu svetla tokom svetle faze dana (Hannibal i sar., 1997; Gillette i sar., 2002). Aplikacija cAMP analoga *in vitro* izaziva značajno pomeranje faze

tokom subjektivnog dana (*engl. subjective day*), ali ne i tokom subjektivne noći (*engl. subjective night*) (Prosser i sar., 1989).



Slika 6.4 Cirkadijalni obrazac elemenata cAMP-PRKA i NO-cGMP-PRKG signalnih puteva u Lajdigovim ćelijama starih životinja. Crvenim strelicama su prikazani efekti starenja; crni talas ukazuje na ritam u transkripciji; crni talas u crvenom okviru ukazuje na ritam detektovan u starenju, a koji nije detektovan kod kontrole.

Za razliku od cAMP, starenje je povećalo amplitudu cirkadijalnog ritma koncentracije cGMP u Lajdigovim ćelijama. Ovo je podržano i pojačanom transkripcijom *Nos2*, *Gucy1a3* i *Gucy1b3* gena. Starenje je dovelo i do pojačane transkripcije cGMP specifičnih *Pde* *Pde5a*, *Pde6a* i *Pde6h*, ipak ukupan efekat procesa sinteze i degradacije je porast dnevnih oscilacija u nivou cGMP. Ovakav rezultat se slaže sa ranije dobijenim gde je u starenju zabeležen porast

koncentracije NO i cGMP u Lajdigovim ćelijama (Sokanovic i sar., 2013). Poznat je dvojan efekat NO na steroidogenezu, stimulatoran posredovan cGMP molekulom i inhibitoran, nezavisan od cGMP (Valenti i sar., 1999; Sokanovic i sar., 2013). Delovanje NO u testisima starih životinja nije limitirano samo na Lajdigove ćelije već je odgovorno i za pojačanu apoptozu germinativnih ćelija kod Braon Norveškog pacova (*engl. Brown-Norway rats*) (Hikim i sar., 2005). Dodatno, na cGMP signalni put u Lajdigovim ćelijama, pa posredno i na produkciju testosterona, može uticati i NO proizveden u intersticijalnim makrofagama (Pomerantz i Pitelka, 1998).

Mnogi efekti NO ostvaruju se preko cGMP, koji može širiti signal preko većeg broja unutarćelijskih receptora, a među njima i preko familije serin/treonin kinaza, PRKG. Naši rezultati pokazuju da u Lajdigovim ćelijama starih životinja dolazi do pojačanog eksprimiranja *Prkg1*/PRKG1. Iako transkripcija *Prkg1* nije bila ritmična to ne znači da nema ritma u aktivnosti PRKG1, učestvujući tako u cikličnoj regulaciji aktivnosti StAR proteina i produkciji steroidnih hormona (Gambaryan i sar., 2003; Andric i sar., 2007). Postoje podaci koji upućuju da su NO i cGMP uključeni u modulaciju cirkadijalnih ritmova (Tischkau i sar., 2003). cGMP signalni put moduliše rad časovnika u SCN, indukujući fazno pomeranje tokom rane subjektivne noći (Prosser i sar., 1989) ili odlaže fazu časovnika do kraja noćne faze i direktno moduliše eksprimiranje gena časovnika pokrenuto svetlosnim signalom (Tischau i sar., 2003; Plano i sar., 2012). Obe protein kinaze G (PRKG1 i PRKG2) su uključene u regulaciju, a PRKG2 i u resetovanje časovnika (Oster i sar., 2003; Feil i sar., 2009).

Posebno mesto u regulaciji dinamike cAMP/cGMP signalnih puteva pripada *Pde* sa dvojnomo specifičnošću. Od pomenutih, Lajdigove ćelije eksprimiraju *Pde1a*, *Pde1c*, *Pde2a*, *Pde3a*, *Pde3b* i *Pde10a*. *Pde1a* i *Pde10a* su pokazale obrnut ritam transkripcije kod starih u poređenju sa adultnim pacovima. Aktivnost enzima, nivo proteina i nivo iRNK PDE1A1 su selektivno pozitivno regulisani u modelu pacova tolerantnih na nitrite (Berk i Yan, 2001). Pošto je NO produkcija u starenju povišena (Sokanovic i sar., 2013), možemo pretpostaviti da je to razlog promenjenog obrasca transkripcije *Pde1a*. Starenje je pojačalo eksprimiranje i *Pde2a*, gena koji kodira enzim koji u prisustvu cGMP hidrolizuje cAMP (negativna

interakcija dva signalna puta). Na ovaj način povećanje cGMP aktivira PDE2 što vodi hidrolizi cAMP (Azevedo i sar., 2014) i smanjenju produkcije testosterona. Starenje je spustilo transkripciju *Pde3a* u Lajdigovim ćelijama što opet komplikuje regulaciju nivoa cikličnih nukleotida pošto cGMP može inhibirati PDE3 a time i hidrolizu cAMP (Baevo, 1995). Za razliku od PDE3, PDE10 bi mogla imati suprotan efekat *in vivo* (Bender i sar., 2006). Starenje je potpuno obrnulo fazu ritma transkripcije *Pde10a* u Lajdigovim ćelijama što utiče na finu kontrolu ritma u nivou cikličnih nukleotida.

Konačno, dobijeni rezultati pokazuju da starenje ima obrnuti uticaj na cirkadijalne varijacije cAMP i cGMP u Lajdigovim ćelijama pacova (Sl. 6.4). Regulacija dnevnih oscilacija u nivou cAMP je verovatno rezultat izmenjenog cirkadijalnog obrasca transkripcije cAMP specifičnih PDE koje, uz smanjenu osetljivost ćelija na stimulaciju luteinizirajućim hormonom, doprinose smanjenju dnevnih varijacija u produkciji testosterona. Starenje je takođe pojačalo eksprimiranje gena odgovornih za produkciju (*Nos2*, *Gucy1a3* i *Gucy1b3*) i degradaciju cGMP (*Pde5a*, *Pde6a* i *Pde6h*) ali je ukupan efekat ipak pojačanje cirkadijalnih oscilacija cGMP u Lajdigovim ćelijama starih pacova. Na osnovu ovoga verujemo da starenje potencira negativnu komunikaciju između cAMP i cGMP signalnih puteva preko PDE sa dvojnou aktivnošću (pojačana transkripcija *Pde2a* i smanjena transkripcija *Pde3a*) što vodi smanjenju nivoa cAMP u Lajdigovim ćelijama.

Oba signalna puta mogu da regulišu produkciju testosterona, ali i da modulišu rad molekularnog časovnika u ćeliji, tako da sa te strane predstavljaju pogodnu metu za dizajn terapijskih strategija kod cirkadijalnih poremećaja u reprodukciji kod ljudi. Starenje slabi regulaciju cAMP i cGMP dinamike, ali potrebna su dalja istraživanja da bi se bolje razumeli metabolički, fiziološki i patofiziološki procesi povezani sa cirkadijalnim časovnikom i starenjem.

6.4. Efekat melatonina na steroidogenezu i periferni biološki časovnik u Lajdigovim ćelijama pacova

Sledeći cilj teze bio je da se ispita da li je melatonin uključen u sinhronizaciju časovnika u Lajdigovim ćelijam. Naime, sekrecija melatonina ima cirkadijalni ritam (pik sekrecije je u toku noći), tako da je ovaj hormon pogodan za prenos informacije o vremenu i ova njegova uloga je poznata u mnogim tkivima (Armstrong i sar., 1986; Cassone i sar., 1993; Nakamura i sar., 1997; Brivio i sar., 2010).

Rezultati naše studije podržavaju ulogu melatonina u oblikovanju cirkadijalnih ritmova u Lajdigovim ćelijama pošto je ukidanje melatonina pinealektomijom dovelo do promena glavnih markera funkcionalnosti ovih ćelija – povišen je pik sekrecije testosterona i unutarćelijske koncentracije cAMP, kao i transkripcije *Insl3* gena. Pinealektomija je uticala i na eksprimiranje transkripcionih faktora, regulatora steroidogeneze, *Nur77* i *Arr19*, pojačala transkripciju *Star* gena, ali uticala i na transkripciju *Per1* i *Per2*, gene časovnika preko čije aktivnosti se najčaćše obavlja sinhronizacija različitih tipova ćelija (Albrecht i sar., 2001; Challet i sar., 2003; Mendoza i sar., 2007). Aplikacija melatonina pinealektomisanim životinjama poništala je uočene efekte potvrđujući da je za njih zaista odgovoran melatonin.

Ovakav efekat na cirkadijalan ritam funkcije Lajdigovih ćelija melatonin može da ostvari indirektno, uticajem na SCN (Shibata i sar., 1989; Lu i Cassone, 1993a; 1993b), ili HPT osovinu (Reiter, 1991; Vanecek, 1999) ili direktno uticajem na same Lajdigove ćelije (Valenti i sar., 1997; Yilmaz i sar., 2000). Ovi efekti melatonina se ostvaruju preko aktivacije receptora MNTR1A/B povezanog sa Gi/o proteinom, što vodi inhibiciji produkcije cAMP (Reppert i sar., 1994; 1995; Valenti i sar., 1997).

Rezultati naših *in vitro* studija nisu podržali direktan efekat melatonina na funkciju Lajdigovih ćelija ni u bazalnim, ni u stimulisanim uslovima. Iako je značajna količina transkripta *Mntr1a* detektovana u Lajdigovim ćelijama kod prepubertalnih životinja, kod adultnih životinja to nije bio slučaj, bilo da se radi o

Mntr1a ili o *Mntr1b* (rezultati nisu prikazani). Ovo može biti povezano sa činjenicom da eksprimiranost melatoninskih receptora trpi značajne promene tokom razvića i da je njihova rasprostranjenost znatno smanjena kod adultnih životinja (Davis, 1997).

Sa druge strane, eksprimiranje *Mntr1a* je detektovano na nivou hipotalamusa, čiji je ritam pinealektomija pojačala, upućujući da bi hipotalamus mogao biti posrednik uočenih promena na Lajdigovim ćelijama. Melatonin inhibiše sintezu i sekreciju GnRH (Roy i sar., 2001) što su potvrdili i naši rezultati. Takođe, povećana GnRH sekrecija je povezana sa manjim nivoom MNTR1A u gonadotropnim ćelijama hipofize (Bae i sar., 2014) dodatno upućujući na hipotalamus kao glavno mesto dejstva melatonina u HPG osovini mužjaka. Iako je pinealektomija pojačala sintezu GnRH i LH, ritmičnost u oba slučaja je zadržana, što znači da melatonin ima regulatornu ali ne i presudnu ulogu na održanje cirkadijalnog ritma ovih hormona.

Pošto su fluktuacije u koncentraciji cAMP i produkciji testosterona dominantno zavisne od aktivnosti HPG osovine, onda je za očekivati da će i promene koje je izazvala pinealektomija na nivo GnRH/LH uticati na cAMP signalni put u Lajdigovim ćelijama. Povećanje nivoa cAMP u pinealektomiji dalje je moglo uticati i na steroidogene i na gene biološkog časovnika. Poznato je da je i malo povećanje cAMP dovoljno za maksimalno pojačan transport holesterola u mitohondrije posredstvom StAR proteina i sintezu steroida (Stocco i sar., 2005). Transkripcija *Star* gena direktno je regulisana CRE/CREB sistemom (Payne i Youngblood, 1995), SF1, NUR77 i članovima GATA familije, modulisana represorima kao što su DAX1 (Lavoie i King, 2009; King i Lavoie, 2012) i ARR19 (Qamar i sar., 2009, 2010), ali i proteinima časovnika kao što su CLOCK-BMAL1 (Son i sar., 2008). Iako nije uočena promena u eksprimiranju *Sf1*, *Gata4* i *Dax1*, pinealektomija je dovela do podizanja nivoa *Nur77* transkripta (pozitivan regulator), kao i do snižavanja *Arr19* transkripta (negativan regulator) što je doprinelo stimulaciji transkripcije *Star* gena.

U Lajdigovim ćelijama pinealektomisanih životinja došlo je do pojačane transkripcije još jednog gena važnog za steroidogezu, *Hsd3b1/2*. Ovaj rast desio se noću, kada bi melatonin trebao biti aktivan, dok je aplikacija melatonina dovela

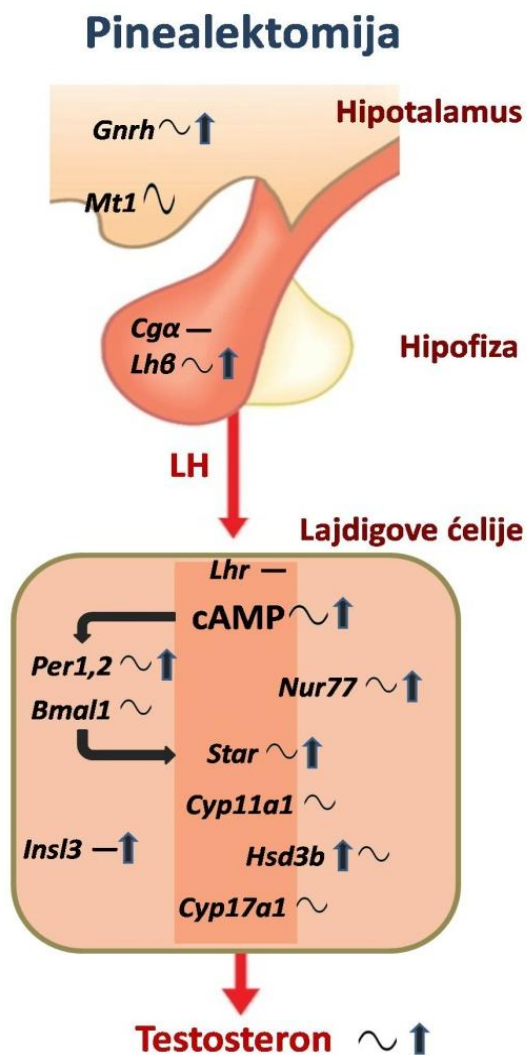
Hsd3b1/2 na kontrolnu vrednost potvrđujući još jednom negativan efekat melatonina na steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama. U ovom momentu, teško je objasniti ovu promenu u transkripciji *Hsd3b1/2*. Pošto NUR77 aktivira *Hsd3b1/2* promotor, vezujući se za NBRE (*engl. nuclear binding response element*) pri stimulaciji cAMP (Martin i Tremblay, 2005; Udhane i sar., 2013) možemo pretpostaviti da je možda ovaj put odgovoran za pojačanu transkripciju *Hsd3b1/2* u određenim vremenskim tačkama kod pinealektomisanih životinja.

Rezultati i kroz ovaj model sugerišu uticaj cAMP na regulaciju gena časovnika. Pošto u adultnim Lajdigovim ćelijama cAMP zavisna signalizacija oscilira u cirkadijalnom maniru i pinealektomija menja nivo cAMP, to bi onda za posledicu moglo imati i promenu u cirkadijalnoj organizaciji glavnih gena časovnika. Poznato je da cAMP može akutno da indukuje *Per1* transkripciju preko CRE/CREB (Travnickova-Bendova i sar., 2002; Doi i sar., 2011). Ovo je u saglasnosti sa uočenim povećanjem *Per* transkripcije u Lajdigovim ćelijama nakon pinealektomije. Stimulatorni efekat cAMP na *Per* transkripciju potvrđuju i naše *in vitro* studije. Pošto PER proteini spuštaju transkripciju izazvanu CLOCK-BMAL1 dimerom, a ovaj dimer može da pojača transkripciju *Star* gena, očekivalo bi se da će rast *Per* transkripcije u pinealektomiji imati negativan efekat na transkripciju *Star* gena. Ako je ovo tačno, promene koje bi rast nivoa PER proteina imao na transkripciju *Star* gena ipak nisu značajne u fiziološkom kontekstu, jer je ukupan efekat pinealektomije na transkripciju *Star* gena bio pozitivan.

Da bi kompletnije razumeli uticaj odsustva melatonina na endokrinu funkciju Lajdigovih ćelija, treba istaći i povišeno eksprimiranje INSL3, još jednog hormona koji proizvode ove ćelije. Za razliku od testosterona, INSL3 nije akutno regulisan reproduktivnom osovinošću i njegova produkcija je konstantna i odražava broj Lajdigovih ćelija i status njihove diferencijacije (Ivell i sar., 2013). Iz ovog ugla posmatrano, porast transkripcije *Insl3* u pinealektomiji može biti interesantan sa aspekta diferencijacije Lajdigovih ćelija i razvoja testisa, posebno ako se zna da melatonin značajno inhibira razvoj testisa (Edmonds, 2013).

Uzimajući sve navedeno u obzir, rezultati ukazuju da je cirkadijalni ritam endokrine funkcije Lajdigovih ćelija regulisan na više načina, uključujući tu i melatonin, koji svoje dejstvo ostvaruje posredno preko GnRH/LH osovine. Takođe,

cAMP signalni put je uočen kao ključan element preko kog melatonin ostvaruje svoju modulatornu ulogu na 24h oscilacije u endokrinoj funkciji Lajdigovih ćelija. Pored uticaja na funkcionalnost, koji se najviše ogleda kroz produkciju testosterona, melatonin utiče i na diferencijaciju Lajdigovih ćelija, na šta ukazuje promena u markeru ovog procesa, *Insl3* (sumaran efekat pinealektomije na funkciju Lajdigovih ćelija prikazan je na slici 6.5).



Slika 6.5 Efekat pinealektomije na cirkadijalni ritam endokrine funkcije Lajdigovih ćelija. Plavim strelicama prikazani su efekti pinealektomije; crni talas ukazuje na prisustvo ritmičnosti.

Nakon cAMP, ispitan je potencijalni efekat melatonina i na NO-cGMP signalni put. Rezultati podržavaju cirkadijalnu ritmičnost ovog signalnog puta: cirkadijalni obrazac transkripcije *Nos2* i *Pde5a*, kao i ritam sinteze samog cGMP. Eventualni uticaj melatonina na cirkadijalni obrazac ovog signalnog puta mogao bi se odraziti i na cirkadijalni ritam endokrine funkcije Lajdigovih ćelija. Ova pretpostavka se temelji na činjenici da NO-cGMP signaling ima kapacitet da moduliše steroidogenezu: u visokim koncentracijama NO direktno utištava funkciju Lajdigovih ćelija preko inhibicije steroidogenih enzima koji sadrže hem, CYP11A1 and CYP17A1 (Del Punta i sar., 1996; Drewett i sar., 2002); u malim koncentracijama NO stimuliše steroidogenezu aktivacijom GUCY1-cGMP-PRKG1 signalnog puta (Valenti i sar., 1999; Andric i sar., 2007; 2010a; 2010b) i posredno fosforilacijom StAR

proteina (Gambaryan i sar., 2003; Andric i sar., 2007).

Postoje literaturni podaci i o efektu melatonina na NO-cGMP signalni put. Većina podataka govori o inhibitornom efektu melatonin: inhibitorni efekat na koncentraciju NO (Valero i sar., 2006; Silva i sar., 2007), eksprimiranost NO sintaza (Chang i sar., 2008) ili njihovu aktivnost (Saenz i sar., 2002; Esposito i sar., 2008). Takođe, pronađeno je da melatonin redukuje aktivnost guanilat ciklaza i koncentraciju cGMP (Tamura i sar., 2006), transkripciju *Gucy* (Stumpf i sar., 2009), kao i da pojačava aktivnost cGMP specifičnih *Pde* (Shukla i sar., 2012) u više sisarskih vrsta, tkiva i ćelijskih linija.

Naši rezultati su pokazali da je pinealektomija imala stimulatorni efekat na transkripcioni obrazac *Nos3* i *Pde5a* u Lajdigovim ćelijama, ali je ritam unutarćelijske koncentracije cGMP ostao nepromenjen. Ovo navodi na zaključak da su promene na *Nos3* i *Pde5a* poništile jedna drugu, tako da je ukupan efekat na cGMP izostao. To bi značilo da se uticaj pinealektomije na cirkadijalnu funkciju Lajdigovih ćelija ostvaruje dominantno preko reproduktivne osovine i cAMP, bez značajnog učešća NO-cGMP signalnog puta. Pošto su određene promene na elementima NO-cGMP signalnog puta ipak zabeležene, potrebana su dodatna ispitivanja kako bi se bolje razumela veza pinealne žlezde, cGMP signalizacije i cirkadijalnog ritma produkcije testosterona.

Mnoge studije govore da melatonin i njegovi metabolički derivati imaju izraženu sposobnost da sakupljaju slobodne radikale (Reiter i sar., 2001). Ovi metaboliti su potentni antioksidansi za ROS i RNS (*engl. reactive nitrogen species*). Mehanizam kojim melatonin sa svojim derivatima štiti ćeliju od slobodnih radikala i oksidativnog stresa uključuje direktno vezivanje slobodnih radikala i njihovih produkata, pokretanje transkripcije antioksidativnih enzima, redukciju aktivnosti pro-oksidativnih enzima i održavanje homeostaze mitohondrija (Acuña-Castroviejo i sar., 2001). Ipak, mi u našim *ex vivo* eksperimentima nismo detektovali promene u nivou nitrita (stabilan metabolički produkt NO) u Lajdigovim ćelijama izazvane melatoninom, bilo u bazalnim ili hCG stimulisanim uslovima.

7. ZAKLJUČCI

- Funkcija Lajdigovih ćelija pacova podleže cirkadijalnom ritmu: LH dostiže svoj pik četiri sata nakon početka svetle faze, ubrzo zatim dolazi do povećanja unutarćelijske koncentracije cAMP i podizanja nivoa transkripcije glavnih steroidogenih elemenata (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*). StAR protein dostiže svoju maksimalnu koncentraciju pred kraj svetle faze, nakon čega testosteron dostiže svoj pik, pred sam početak tamne faze.
- U Lajdigovim ćelijama pacova se eksprimiraju svi ispitani geni biološkog časovnika i definisane su karakteristike cirkadijalnog ritma njihove transkripcije. Ritmično eksprimiranje je zabeleženo kod *Bmal1* (pik oko ZT2), *Per1* (pik oko ZT13), *Per2* (pik oko ZT15), *Per3* (pik oko ZT13), *Cry1* (pik oko ZT17), *Cry2* (pik oko ZT12), *Rev-erba* (pik oko ZT11), *Rev-erbb* (pik oko ZT12), *Rorb* (pik oko ZT10), *Dec2* (pik oko ZT12), a konstantno kod *Clock*, *Npas2*, *Rora*, *Dec1*, *Cksn1e* i *Cksn1d* gena.
- Ritmična transkripcija *Bmal1*, *Per1*, *Per2* i *Star* gena se održava i u primarnoj kulturi Lajdigovih u prvih 24h.

Potvrđena je hipoteza o uključenosti cAMP u sinhronizaciju ritma Lajdigovih ćelija.

- *In vitro* aktivacija LH receptora je pojačala transkripciju *Per1*, *Dec1*, *Dec2*, *Rorb*, *Npas2* i *E4bp4*, a spustila transkripciju *Rev-erba*. *In vivo* blokada HPT osovine je pojačala transkripciju većeg broja gena časovnika u Lajdigovim ćelijama: *Per2*, *Rorb*, *Rev-erbb*, *Dec1*, *Dec2*, *E4bp4*, *Ck1e*, *Ck1d*, i smanjila transkripciju *Npas2*. Ovi podaci jasno upućuju na ulogu LH, pa i cAMP, u sinhronizaciji časovnika u Lajdigovim ćelijama pacova.
- Starenje menja cirkadijalnu organizaciju steroidogenih elemenata opisanu kod adulta. Promene uključuju sniženu transkripciju gena uključenih u metabolizam holesterola (*Lipe*, *Soat2*, *Scarb1*), pad transkripcije gena za *Lhr*, *Star*, steroidogene enzime (*Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1/2*, *Hsd17b4*), transkripcione faktore (*Sf1*, *Nur77*), a kao posledica ovoga dolazi do pada

nivoa serumskog testosterona. Starenje smanjuje transkripciju i *Insl3*, još jednog važnog produkta Lajdigovih ćelija.

- Starenje ima obrnuti uticaj na cirkadijalne varijacije cAMP i cGMP signalnih puteva u Lajdigovim ćelijama pacova – dolazi do pada u nivou unutarćelijske koncentracije cAMP, uz pad PRKAC (katalitičke subjedinice efektnog proteina ovog signalnog puta) i do porasta koncentracije cGMP uz porast *Prkg1* transkripcije.
- Starenje ima negativan uticaj na transkripciju najvažnijih gena časovnika (*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Rev-erba*) u Lajdigovim ćelijama. Ipak, sistem časovnika se pokazao mnogo stabilnijim od elemenata steroidogeneze u starenju (disfunkcija steroidogeneze se dešava mnogo ranije) tako da on najverovatnije nema značajan doprinos u poremećaju produkcije testosterona u Lajdigovim ćelijama u starenju.
- Melatonin ima modulatoran efekat na cirkadijalni ritam funkcije Lajdigovih ćelija. Negativan efekat na produkciju testosterona melatonin ostvaruje najverovatnije preko GnRH-LH osovine (i cAMP, kao unutarćelijskog glasnika), a ne direktno, preko svojih receptora na samim Lajdigovim ćelijama. Nedostatak melatonina uticao je i na povećanje transkripcije *Insl3*, još jednog markera funkcionalnosti Lajdigovih ćelija.
- Posredno, melatonin je i potencijalni sinhronizator perifernog biološkog časovnika u Lajdigovim ćelijama preko regulacije transkripcije *Per* gena.
- Pinealektomija je pojačala amplitudu ritma u transkripciji *Pde5a*, ipak promena u cirkadijalnom obrascu koncentracije cGMP u Lajdigovim ćelijama nije zabeležena, kao ni u transkripciji efektnog molekula ovog signalnog puta – *Prkg1*.

8. LITERATURA

- Abbaszade IG, Arensburg J, Park CH, Kasa-Vubu JZ, Orly J, Payne AH (1997) Isolation of a new mouse 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoform, 3beta-HSD VI, expressed during early pregnancy. *Endocrinology* 138:1392-1399.
- Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ (2001) Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res.* 30(2):65-74.
- Akashi M, Takumi T (2005) The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12(5):441-448.
- Albrecht U (2012) Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74(2):246-260.
- 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(2):100-104.
- Alvarez JD, Chen D, Storer E, Sehgal A (2003) Non-cyclic and developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 69(1):81-91.
- 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(1):26-36.
- Alvarez JD, Sehgal A (2005) The thymus is similar to the testis in its pattern of circadian clock gene expression. *J. Biol. Rhythms* 20(2):111-121.
- Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS (2007) Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293:E1399-E1408.
- Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS (2010a) Sildenafil treatment in vivo stimulates Leydig cell steroidogenesis via the cAMP/cGMP signaling pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299(4):E544-50.
- Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS (2010b) Testosterone-induced modulation of nitric oxide-cGMP signaling pathway and androgenesis in the rat Leydig cells. *Biol. Reprod.* 83(3):434-442.
- Anholt RR, De Souza EB, Oster-Granite ML, Snyder SH (1985) Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233:517-526.
- Arendt J (2009) Managing jet lag: Some of the problems and possible new solutions. *Sleep Medicine Reviews* 13:249-256.

- Armstrong SM, Cassone VM, Chesworth MJ, Redman JR, Short RV (1986) Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J. Neural Transm. Suppl.* 21:375-394.
- Azevedo MF, Faucz FR, Bimpaki E, Horvath A, Levy I, de Alexandre RB, Ahmad F, Manganiello V, Stratakis CA (2014) Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). *Endocr. Rev.* 35(2):195-233.
- Azhar S, Leers-Sucheta S, Reaven E (2003) Cholesterol uptake in adrenal and gonadal tissues: the SR-BI and “selective” pathway connection. *Front. Biosci.* 8:S998-S1029.
- Azhar S, Reaven E (2002) Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 195(1-2):1-26.
- Bae SE, Wright IK, Wyse C, Samson-Desvignes N, Le Blanc P, Laroche S, Hazlerigg DG, Johnston JD (2014) Regulation of pituitary MT1 melatonin receptor expression by gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and early growth response factor-1 (Egr-1): in vivo and in vitro studies. *PLoS One* 9(3):e90056.
- Beattie MC, Chen H, Fan J, Papadopoulos V, Miller P, Zirkin BR (2013) Aging and luteinizing hormone effects on reactive oxygen species production and DNA damage in rat Leydig cells. *Biol. Reprod.* 88(4):100.
- Beavo JA (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* 75:725-748.
- Bebas P, Goodall CP, Majewska M, Neumann A, Giebultowicz JM, Chappell PE (2009) Circadian clock and output genes are rhythmically expressed in extratesticular ducts and accessory organs of mice. *Faseb J.* 23:523-533.
- Bender AT, Beavo JA (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol. Rev.* 58(3):488-520.
- Bergendahl M, Evans WS, Veldhuis JD (1996) Current concepts on ultradian rhythms of luteinizing hormone secretion in the human. *Hum. Reprod. Update* 2(6):507-518.
- Berk BC i Yan C (2001) Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. *Circulation* 104:2338-2343.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295:1070-1073.
- Bertolucci C, Cavallari N, Colognesi I, Agguzi J, Chen Z, Caruso P, Foa A, Tosini G, Bernardi F, Pinotti M (2008) Evidence for Overlapping Role of CLOCK and NPAS2 Transcription Factors in Liver Circadian Oscillators. *Molecular and Cellular Biology* 28(9):3070-3075.
- Bittman EL (2016) Timing in the Testis. *J. Biol. Rhythms* 31(1):12-36.

- Bittman EL, Doherty L, Huang L, and Paroskie A (2003) Period gene expression in mouse endocrine tissues. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285(3):R561-569
- Boden MJ, Varcoe TJ, Voultzios A, Kennaway DJ (2010) Reproductive biology of female *Bmal1* null mice. *Reproduction* 139(6):1077-1090.
- Bonaconsa M, Malpeli G, Montaruli A, Carandente F, Grassi-Zucconi G, Bentivoglio M (2014) Differential modulation of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and heart of aged mice. *Exp. Gerontol.* 55:70-79.
- Bozek K, Relogio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A, Herzog H (2009) Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS One* 4(3):e4882.
- 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.
- Brivio F, Fumagalli L, Fumagalli G, Pescia S, Brivio R, Di Fede G, Rovelli F, Lissoni P (2010) Synchronization of cortisol circadian rhythm by the pineal hormone melatonin in untreatable metastatic solid tumor patients and its possible prognostic significance on tumor progression. *In Vivo* 24(2):239-241.
- Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.
- Brown-Grant K, Raisman G (1977) Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 198:279-296.
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenen 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.
- Cano P, Jimenez-Ortega V, Larrad A, Reyes Toso CF, Cardinali DP, Esquifino AI (2008) Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine.* 33(2):118-125.
- Cassone VM, Warren WS, Brooks DS, Lu J (1993) Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 8 Suppl:S73-81.
- Chacon F, Cano P, Jimenez V, Cardinali DP, Marcos A, Esquifino AI (2004) 24-hour changes in circulating prolactin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone in young male rats subjected to calorie restriction. *Chronobiol. Int.* 21(3):393-404.
- Challet E, Caldelas I, Graff C, Pevet P (2003) Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol. Chem.* 384(5):711-719.

- Chang HM, Huang YL, Lan CT, Wu UI, Hu ME, Youn SC (2008) Melatonin preserves superoxide dismutase activity in hypoglossal motoneurons of adult rats following peripheral nerve injury. *J. Pineal Res.* 44(2):172-180.
- Chang JC, Oude-Elferink RP (2014) Role of the bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase in pH sensing and metabolic regulation. *Front. Physiol.* 10:5:42.
- Chappell PE, White RS, Mellon PL (2003) Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *J. Neurosci.* 23:11202-11213.
- Chen H, Chu G, Zhao L, Yamauchi N, Shigeyoshi Y, Hashimoto S, Hattori MA (2012) Rev-erb α regulates circadian rhythms and StAR expression in rat granulosa cells as identified by the agonist GSK4112. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420(2):374-379.
- Chen H, Ge RS, Zirkin BR (2009) Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306(1-2):9-16.
- Chen H, Hardy MP, Zirkin BR (2002) Age-related decreases in Leydig cell testosterone production are not restored by exposure to LH in vitro. *Endocrinology* 143(5):1637-1642.
- Chen H, Liu J, Luo L, Zirkin BR (2004) Dibutyrylcyclicadenosinemonophosphate restores the ability of aged Leydig cells to produce testosterone at the high levels characteristic of young cells. *Endocrinology* 145(10):4441-4446.
- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol. Chem.* 265:3116-3123.
- Chung S, Son GH, Kim K (2011) Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta.* 1812(5):581-591.
- Clarke H, Dhillon WS, Jayasena CN (2015) Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrinol. Metab. (Seoul).* 30(2):124-141.
- Clarke JD, Coleman GJ (1986) Persistent meal-associated rhythms in SCN-lesioned rats. *Physiol. Behav.* 36:105-113.
- Conti M, Beavo J (2007) Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 76:481-511.
- Cooper DM (2003) Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem. J.* 375:517-529.
- Cooper DM, Crossthwaite AJ (2006) Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends Pharmacol. Sci.* 27(8):426-431.

- Culty M, Luo L, Yao ZX, Chen H, Papadopoulos V, Zirkin BR (2002) Cholesterol transport, peripheral benzodiazepine receptor, and steroidogenesis in aging Leydig cells. *J. Androl.* 23(3):439-447.
- Davis FC (1997) Melatonin: role in development. *J. Biol. Rhythms* 12:498-508.
- DeBruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM (2006) A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron.* 50(3):465-477.
- DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM (2007) CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat. Neurosci.* 10(5):543-545.
- DeCoursey PJ, Krulas JR, Mele G, Holley DC (1997) Circadian performance of suprachiasmatic nuclei (SCN)-lesioned antelope ground squirrels in a desert enclosure. *Physiol. Behav.* 62:1099-1108.
- Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP (1996) Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 137(12):5337-5343.
- 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.
- Dickmeis T (2009) Glucocorticoids and the circadian clock. *J. Endocrinol.* 200(1):3-22.
- DiTacchio L, Le HD, Vollmers C, Hatori M, Witcher M, Secombe J, Panda S (2011) Histone lysine demethylase JARID1a activates CLOCK-BMAL1 and influences the circadian clock. *Science.* 333(6051):1881-1885.
- Doi M, Hirayama J, Sassone-Corsi P (2006) Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* 125(3):497-508.
- Doi M, Ishida A, Miyake A, Sato M, Komatsu R, Yamazaki F, Kimura I, Tsuchiya S, Kori H, Seo K, Yamaguchi Y, Matsuo M, Fustin JM, Tanaka R, Santo Y, Yamada H, Takahashi Y, Araki M, Nakao K, Aizawa S, Kobayashi M, Obrietan K, Tsujimoto G, Okamura H (2011) Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Commun.* 2:327.
- Dolatshad H, Campbell EA, O'Hara L, Maywood ES, Hastings MH, Johnson MH (2006) Developmental and reproductive performance in circadian mutant mice. *Hum. Reprod.* 21:68-79.
- Drewett JG, Adams-Hays RL, Ho BY, Hegge DJ (2002) Nitric oxide potently inhibits the rate-limiting enzymatic step in steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 194(1-2):39-50.

- Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D (1981) Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53(1):58-68.
- Edmonds KE (2013) Melatonin, But not auxin, affects postnatal reproductive development in the marsh rice rat (*Oryzomys palustris*). *Zoolog. Sci.* 30(6):439-445.
- Esposito E, Iacono A, Muia C (2008) Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J. Pineal Res.* 44:78-87.
- Feil R, Höfner SM, Weindl K, Wurst W, Langmesser S, Gerling A, Feil S, Albrecht U (2009) cGMP-dependent protein kinase I, the circadian clock, sleep and learning. *Commun. Integr. Biol.* 2(4):298-301.
- Feldman RD, Gros R (2007) New insights into the regulation of cAMP synthesis beyond GPCR/G protein activation: implications in cardiovascular regulation. *Life Sci.* 81(4):267-271.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD (2010) cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacol. Rev.* 62(3):525-563.
- Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz, M, Munoz M, David-Gray Z, Foster R (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284:502-504.
- Fu Z, Inaba M, Noguchi T, Kato H (2002) Molecular cloning and circadian regulation of cryptochrome genes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) *J. Biol. Rhythms* 17(1):14-27.
- Gallego M, Virshup DM (2007) Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8(2):139-148.
- Gambarayan S, Butt E, Marcus K, Glazova M, Palmethofer A, Guillon G, Smolenski A (2003) cGMP-dependent protein kinase type II regulates basal level of aldosterone production by zona glomerulosa cells without increasing expression of the Steroidogenic Acute Regulatory protein gene. *J. Biol. Chem.* 278(32):29640-29648.
- Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Le Minh N, Gass P, Schmid W, Schibler U, Korf HW, Schütz G (2002) Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34(2):245-253.
- Gillette MU, Mitchell JW (2002) Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.* 309:99-107.
- Gnessi L, Fabbri A, Spera G (1997) Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr. Rev.* 18:541-609.

- Golden RN, Gaynes BN, Ekstrom RD, Hamer RM, Jacobsen FM, Suppes T, Wisner KL, Nemeroff CB (2005) The efficacy of light therapy in the treatment of mood disorders: a review and meta-analysis of the evidence. *Am. J. Psychiatry* 162(4):656-662.
- Golkowski M, Shimizu-Albergine M, Suh HW, Beavo JA, Ong SE (2016) Studying mechanisms of cAMP and cyclic nucleotide phosphodiesterase signaling in Leydig cell function with phosphoproteomics. *Cell Signal*. 28(7):764-778.
- Granot Z, Geiss-Friedlander R, Melamed-Book N, Eimerl S, Timberg R, Weiss AM, Hales KH, Hales DB, Stocco DM, Orly J (2003) Proteolysis of normal and mutated steroidogenic acute regulatory proteins in the mitochondria: the fate of unwanted proteins. *Mol. Endocrinol.* 17(12):2461-2476.
- Granot Z, Kobilier O, Melamed-Book N, Eimerl S, Bahat A, Lu B, Braun S, Maurizi MR, Suzuki CK, Oppenheim AB, Orly J (2007) Turnover of mitochondrial steroidogenic acute regulatory (StAR) protein by Lon protease: the unexpected effect of proteasome inhibitors. *Mol. Endocrinol.* 21(9):2164-2177.
- Hales DB (2002) Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J. Reprod. Immuno.* 57:3-18.
- Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, Metzger J, Schweigert FJ, Luppia PB, Nykjaer A, Willnow TE (2005) Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 122:751-762.
- Hampton RY (2002) Proteolysis and sterol regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:345-378.
- Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU, Mikkelsen JD (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J. Neurosci.* 17:2637-2644.
- Harms E, Kivimäe S, Young MW, Saez L (2004) Posttranscriptional and posttranslational regulation of clock genes. *J. Biol. Rhythms.* 19(5):361-373.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295:1065-1070.
- Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG, Yau KW (2003) Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424:76-81.
- Hauet T, Liu J, Li H, Gazouli M, Culty M, Papadopoulos V (2002) PBR, StAR, and PKA: partners in cholesterol transport in steroidogenic cells. *Endocr. Res.* 28(4):395-401.

- Hayes FJ, Crowley WF Jr (1998) Gonadotropin pulsations across development. *Horm. Res.* 49(3-4):163-168.
- He PJ, Hirata M, Yamauchi N, Hashimoto S, Hattori MA (2007) Gonadotropic regulation of circadian clockwork in rat granulosa cells. *Mol. Cell. Biochem.* 302(1-2):111-118.
- Helmy MM (2012) Potential hepato-protective effect of α -tocopherol or simvastatin in aged rats. *Pharmacol. Rep.* 64(3):698-705.
- Heywood LH (1980) Testosterone Levels in the Male Laboratory Rat: Variation under Experimental Conditions. *International Journal of Andrology* 3(5):519-529.
- Hikim AP, Vera Y, Vernet D, Castanares M, Diaz-Romero M, Ferrini M, Swerdloff RS, Gonzalez-Cadavid NF, Wang C (2005) Involvement of nitric oxide-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in germ cell apoptosis in male Brown-Norway rats. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 60(6):702-708.
- Hirota T, Fukada Y (2004) Resetting Mechanism of Central and Peripheral Circadian Clock in Mammals. *Zoological Science* 21:359-368.
- Honma K, Honma S, Hiroshige T (1987) Activity rhythms in the circadian domain appear in suprachiasmatic nuclei lesioned rats given methamphetamine. *Physiol. Behav.* 40(6):767-774.
- 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(6909):841-844.
- Honma S, Yasuda T, Yasui A, van der Horst GT, Honma K (2008) Circadian behavioral rhythms in *Cry1/Cry2* double-deficient mice induced by methamphetamine. *J. Biol. Rhythms* 23:91-94.
- Huhtaniemi I, Toppari J (1995) Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 377:33-54.
- Huleihel M, Lunenfeld E (2004) Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J. Androl.* 6(3):259-268.
- Husse J, Eichele G, Oster H (2015) Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock: alternate routes of entrainment optimize the alignment of the body's circadian clock network with external time. *Bioessays* 37(10):1119-1128.
- Inouye ST, Kawamura H (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5962-5966.
- Ishida M, Yoshida M, Fukuta S, Uemura K, Iijima M, Horiguchi K, Harigaya T (2010) Analysis of prolactin gene expression and cleaved prolactin variants in the mouse testis and spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 56(6):567-574.

- Ivell R, Wade JD, Anand-Ivell R (2013) INSL3 as a biomarker of Leydig cell functionality. *Biol. Reprod.* 88(6):147.
- Jabbour HN, Lincoln GA (1999) Prolactin receptor expression in the testis of the ram: localisation, functional activation and the influence of gonadotrophins. *Mol. Cell Endocrinol.* 148(1-2):151-161.
- Jamnongjit M, Gill A, Hammes SR (2005) Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:16257–16262.
- Jimenez R, Burgos M, Barrionuevo FJ (2015) Circannual Testis Changes in Seasonally Breeding Mammals. *Sex Dev.* 9(4):205-215.
- Kalra PS, Kalra SP (1977) Circadian periodicities of serum androgens, progesterone, gonadotropins and luteinizing hormone-releasing hormone in male rats: the effects of hypothalamic deafferentation, castration and adrenalectomy. *Endocrinology* 101(6):1821-1827.
- Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur SE, Scheer FA, Perreau-Lenz S, Ruiter M, Kreier F, Cailotto C, Buijs RM. (2006) SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J. Biol. Rhythms* 21(6):458-469.
- Kalsbeek A, van der Spek R, Lei J, Endert E, Buijs RM, Fliers E (2012) Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol. Cell Endocrinol.* 349(1):20-29.
- Kandalepas PC, Mitchell JW, Gillette MU (2016) Melatonin Signal Transduction Pathways Require E-Box-Mediated Transcription of Per1 and Per2 to Reset the SCN Clock at Dusk. *PLoS One.* 11(6):e0157824.
- Karman BN, Tischkau SA (2006) Circadian clock gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 75(4):624-632.
- Kato Y, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M (2014) DEC1/STRA13/SHARP2 and DEC2/SHARP1 coordinate physiological processes, including circadian rhythms in response to environmental stimuli. *Curr. Top Dev. Biol.* 110:339-372.
- 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(1):184-188.
- Kennaway DJ, Owens JA, Voultsios A, Varcoe TJ (2006) Functional central rhythmicity and light entrainment, but not liver and muscle rhythmicity, are Clock independent. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291(4):R1172-1180.
- Kennaway DJ, Varcoe TJ, Mau VJ (2003) Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Mol. Hum. Reprod.* 9:503-507.

- Khapre RV, Kondratova AA, Susova O, Kondratov RV (2011) Circadian clock protein BMAL1 regulates cellular senescence in vivo. *Cell Cycle* 10(23):4162-4169.
- Kiessling S, Eichele G, Oster H. (2010) Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. *J. Clin. Invest.* 120(7):2600-2609.
- King SR, Lavoie HA (2012) Gonadal Transactivation of STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Front. Biosci.* 17:824-846.
- Kino T, Chrousos GP (2011) Circadian CLOCK-mediated regulation of target-tissue sensitivity to glucocorticoids: implications for cardiometabolic diseases. *Endocr. Dev.* 20:116-126.
- Klinefelter GR, Hall PF, Ewing LL (1987) Effect of luteinizing hormone deprivation in situ on steroidogenesis of rat Leydig cells purified by multistep procedure. *Biol. Reprod.* 36:769-783.
- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Hubera N, Lfhlerc J, Stftera M (2005) The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes *Cellular Signalling* 17:675-689.
- Knotts LK, Glass JD (1988) Effects of photoperiod, beta-endorphin, and naloxone on in vitro secretion of testosterone in white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) testes. *Biol. Reprod.* 39(1):205-212.
- Ko CH, Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 2:R271-277.
- Kostic T, Andric S, Kovacevic R, Maric D (1997) The effect of opioid antagonists in local regulation of testicular response to acute stress in adult rats. *Steroids* 62(11):703-708.
- Kowalska E, Brown SA (2007) Peripheral clocks: keeping up with the master clock. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72:301-305.
- Lacapere JJ, Papadopoulos V (2003) Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68:569-585.
- 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(7378):552-556.
- Landgraf D, Wang LL, Diemer T, Welsh DK (2016) NPAS2 Compensates for Loss of CLOCK in Peripheral Circadian Oscillators. *PLoS Genet.* 12(2):e1005882.
- Lavoie HA, King SR (2009) Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp. Biol. Med.* 234:880-907.

- Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, Sasso GL, Moschetta A, Schibler U (2009) REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol.* 7:e1000181.
- Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:855-867.
- Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M, Bittman EL (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J. Neurosci.* 7:1626-1638.
- Lin T, Vinson NE, Muroso EP, Osterman J, Nankin HR (1983) The aging Leydig cell. VIII. Protein kinase activity. *J. Androl.* 4(5):324-330.
- Liu AC, Lewis WG, Kay SA (2007) Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nat. Chem. Biol.* 3:630-639.
- Liu C, Weaver DR, Strogatz SH, Reppert SM (1997) Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91: 855-860.
- Liu Y, Johnson BP, Shen AL, Wallisser JA, Krentz KJ, Moran SM, Sullivan R, Glover E, Parlow AF, Drinkwater NR, Schuler LA, Bradfield CA (2014) Loss of BMAL1 in ovarian steroidogenic cells results in implantation failure in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111(39):14295-14300.
- Lorbek G, Perše M, Jeruc J, Juvan P, Gutierrez-Mariscal FM, Lewinska M, Gebhardt R, Keber R, Horvat S, Björkhem I, Rozman D (2015) Lessons from hepatocyte-specific Cyp51 knockout mice: impaired cholesterol synthesis leads to oval cell-driven liver injury. *Sci. Rep.* 5:8777.
- Loudon AS, Meng QJ, Maywood ES, Bechtold DA, Boot-Handford RP, Hastings MH (2007) The biology of the circadian Ck1epsilon tau mutation in mice and Syrian hamsters: a tale of two species. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.* 72:261-271.
- Lu J, Cassone VM (1993a) Daily melatonin administration synchronizes circadian patterns of brain metabolism and behavior in pinealectomized house sparrows, *Passer domesticus*. *J. Comp. Physiol.* 173(6):775-782.
- Lu J, Cassone VM (1993b) Pineal regulation of circadian rhythms of 2-deoxy[14C] glucose uptake and 2[125I]iodomelatonin binding in the visual system of the house sparrow, *Passer domesticus*. *J. Comp. Physiol.* 173(6):765-774.
- Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, Yau KW (2003) Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299:245-247.

- Luo L, Chen H, Zirkin BR (1996) Are Leydig cell steroidogenic enzymes differentially regulated with aging? *J. Androl.* 17(5):509-515.
- Luo L, Chen H, Zirkin BR (2005) Temporal relationships among testosterone production, steroidogenic acute regulatory protein (StAR), and P450 side-chain cleavage enzyme (P450scc) during Leydig cell aging. *J. Androl.* 26(1):25-31.
- Manna PR, Dyson MT, Stocco DM (2009) Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol. Hum. Reprod.* 15(6):321-333.
- Manna PR, Jo Y, Stocco DM (2007) Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling. *J. Endocrinol.* 193(1):53-63.
- Martin LJ, Tremblay JJ (2005) The human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase type 2 promoter is a novel target for the immediate early orphan nuclear receptor Nur77 in steroidogenic cells. *Endocrinology* 146(2):861-869.
- Martin LJ, Tremblay JJ (2010) Nuclear receptors in Leydig cell gene expression and function. *Biol. Reprod.* 83(1):3-14.
- Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V (2010) Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids* 75:467-476.
- Mendoza J, Revel FG, Pevet P, Challet E (2007) Shedding light on circadian clock resetting by dark exposure: differential effects between diurnal and nocturnal rodents. *Eur. J. Neurosci.* 25(10):3080-3090.
- Meurs I, Hoekstra M, van Wanrooij EJ, Hildebrand RB, Kuiper J, Kuipers F, Hardeman MR, Van Berkel TJ, Van Eck M (2005) HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. *Exp. Hematol.* 33(11):1309-1319.
- Meyer-Bernstein EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN, Bittman EL (1999) Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 140:207-218.
- Midzak A, Rone M, Aghazadeh Y, Culty M, Papadopoulos V (2011) Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria. *Mol. Cell Endocrinol.* 336:70-79.
- Midzak AS, Chen H, Papadopoulos V, Zirkin BR (2009) Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 299(1):23-31.
- Miller BH, McDearmon EL, Takahashi JS (2007) The Mammalian Circadian System: from Genes to Behavior. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, pp 801-834.

- Miller WL (2013) Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol. Cell Endocrinol.* 379(1-2):62-73.
- Miller WL, Bose HS (2011) Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J. Lipid Res.* 52:2111-2135.
- Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H (2001) Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev.* 15(8):995-1006.
- Mock EJ, Norton HW, Frankel AI (1978) Daily rhythmicity of serum testosterone concentration in the male laboratory rat. *Endocrinology* 103(4):1111-1121.
- Moor BC, Younglai EV (1975) Variations in peripheral levels of LH and testosterone in adult male rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 42(2):259-266.
- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42:201-206.
- Moore RY, Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol* 146: 1-14.
- Morse D, Cermakian N, Brancorsini S, Parvinen M, Sassone-Corsi P (2003) No circadian rhythms in testis: *Period1* expression is clock independent and developmentally regulated in the mouse. *Mol. Endocrinol.* 17(1):141-151.
- Mosko SS, Moore RY (1979) Neonatal suprachiasmatic nucleus lesions: effects on the development of circadian rhythms in the rat. *Brain Res.* 164:17-38.
- Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, Guarente LP, Sassone-Corsi P (2008) The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134(2):329-340.
- Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P (2009) Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 324(5927):654-657.
- Nakamura K, Hashimoto S, Honma S, Honma K (1997) Daily melatonin intake resets circadian rhythms of a sighted man with non-24-hour sleep-wake syndrome who lacks the nocturnal melatonin rise. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 51(3):121-127.
- Nakao N, Yasuo S, Nishimura A, Yamamura T, Watanabe T, Anraku T, Okano T, Fukada Y, Sharp PJ, Ebihara S, Yoshimura T (2007) Circadian clock gene regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in preovulatory ovarian follicles. *Endocrinology* 148:3031-3038.
- 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(12):4080-4092.

- Niemi M, Sharpe RM, Brown WRA (1986) Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell and Tissue Research* 243:337–344.
- Nishida H, Miyagawa S, Vieux-Rochas M, Morini M, Ogino Y, Suzuki K, Nakagata N, Choi HS, Levi G, Yamada G (2008) Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression through the interaction between *Dlx* and *GATA-4* for testicular steroidogenesis. *Endocrinology* 149(5):2090-2097.
- Ohba H, Inano H, Tamaoki B (1981) Contribution of microsomal cytochrome b₅ electron transport system coupled with delta 5–3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase to androgen synthesis from progesterone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103(4):1273–1280.
- Ohdo S (2010) Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62(9-10):859-875.
- Okamura H, Doi M, Fustin JM, Yamaguchi Y, Matsuo M (2010) Mammalian circadian clock system: Molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62(9-10):876-884.
- O'Neill JS, Reddy AB (2012) The essential role of cAMP/Ca²⁺ signalling in mammalian circadian timekeeping. *Biochem. Soc. Trans.* 40(1):44-50.
- Oster H, Werner C, Magnone MC, Mayser H, Feil R, Seeliger MW, Hofmann F, Albrecht U (2003) cGMP-Dependent Protein Kinase II Modulates *mPer1* and *mPer2* Gene Induction and Influences Phase Shifts of the Circadian Clock. *Curr. Biol.* 13:725–733.
- Palm IF, Van Der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A (1999) Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 93:659-666.
- Pan P, Leppilampi M, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Parkkila S (2006) Carbonic anhydrase gene expression in CA II-deficient (*Car2*^{-/-}) and CA IX-deficient (*Car9*^{-/-}) mice. *J. Physiol.* 571(Pt 2):319-327.
- Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109:307–320.
- Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, Jegla T (2005) Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 307:600-604.
- Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN, Hogenesch JB (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301:525-527.
- Payne AH, Downing JR, Wong KL (1980) Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells. *Endocrinology* 106:1424–1429.

- Payne AH, Hardy MP (2007) *The Leydig Cell in Health and Disease*, Humana Press Inc. Part III. Steroidogenesis, 135-226.
- Payne AH, Youngblood GL (1995) Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol. Reprod.* 52(2):217-225.
- Pedersen RC, Brownie AC (1987) Steroidogenesis-activator polypeptide isolated from a rat Leydig cell tumor. *Science* 236:188-190.
- Plano SA, Agostino PV, de la Iglesia HO, Golombek DA (2012) cGMP-phosphodiesterase inhibition enhances photic responses and synchronization of the biological circadian clock in rodents. *PLoS One* 7(5):e37121.
- Plymate SR, Tenover JS, Bremner WJ (1989) Circadian variation in testosterone, sex hormone-binding globulin, and calculated non-sex hormone-binding globulin bound testosterone in healthy young and elderly men. *J Androl.* 10(5):366-371.
- Pomerantz DK, Pitelka V (1998) Nitric oxide is a mediator of the inhibitory effect of activated macrophages on production of androgen by the Leydig cell of the mouse. *Endocrinology* 139(3):922-931.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251-260.
- Prendergast BJ, Nelson RJ, Zucker I (2009) Mammalian Seasonal Rhythms: Behavior and Neuroendocrine Substrates. In: Donald W. Pfaff, Arthur P. Arnold, Anne M. Etgen, Susan E. Fahrbach, Robert T. Rubin, editors. *Hormones, Brain and Behavior*, 2nd edition 1:507-538.
- Price CA, Cooke GM, Sanford LM (2000) Influence of season and low-level oestradiol immunoneutralization on episodic LH and testosterone secretion and testicular steroidogenic enzymes and steroidogenic acute regulatory protein in the adult ram. *J. Reprod. Fertil.* 118(2):251-262.
- Prosser RA, McArthur AJ, Gillette MU (1989) cGMP induces phase shifts of a mammalian circadian pacemaker at night, in antiphase to cAMP effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6812-6815.
- Provencio I, Cooper HM, Foster RG (1998) Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: implications for circadian photoentrainment. *J. Comp. Neurol.* 395:417-439.
- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD (2000) A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* 20:600-605.
- Purvis K, Clausen OP, Olsen A, Haug E, Hansson V (1979) Prolactin and Leydig cell responsiveness to LH/hCG in the rat. *Arch. Androl.* 3(3):219-230.

- Qamar I, Gong EY, Kim Y, Song CH, Lee HJ, Chun SY, Lee K (2010) Anti-steroidogenic Factor ARR19 Inhibits Testicular Steroidogenesis through the Suppression of Nur77 Transactivation. *J. Biol. Chem.* 285(29): 22360–22369.
- Qamar I, Park E, Gong EY, Lee HJ, Lee K (2009) ARR19 (androgen receptor corepressor of 19 kDa), an antisteroidogenic factor, is regulated by GATA-1 in testicular Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 284(27):18021-18032.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-978.
- Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, Abrassart D, Kobayashi Y, Marcheva B, Hong HK, Chong JL, Buhr ED, Lee C, Takahashi JS, Imai S, Bass J (2009) Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science* 324(5927):651–654.
- Ratajczak CK, Boehle KL, Muglia LJ (2009) Impaired steroidogenesis and implantation failure in *Bmal1*^{-/-} mice. *Endocrinology* 150(4):1879-1885.
- Reiter RJ (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12:151-180.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM (2009) Melatonin and reproduction revisited. *Biol. Reprod.* 81(3):445-456.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W (2001) Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem. Biophys.* 34:237-256.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(19):8734-8738.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13(5):1177-1185.
- Ripperger JA, Shearman LP, Reppert SM, Schibler U (2000) CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev* 14:679-689.
- Roenneberg T, Allebrandt KV, Meroow M, Vetter C (2012) Social jetlag and obesity. *Curr. Biol.* 22(10):939-943.
- Roenneberg T, Meroow M (2005) Circadian clocks - the fall and rise of physiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(12):965-971.
- Rone MB, Fan J, Papadopoulos V (2009) Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791(7):646-658.

- Rossner MJ, Oster H, Wichert SP, Reinecke L, Wehr MC, Reinecke J, Eichele G, Taneja R, Nave KA (2008) Disturbed clockwork resetting in Sharp-1 and Sharp-2 single and double mutant mice. *PLoS One* 3:e2762.
- Roy D, Angelini NL, Fujieda H, Brown GM, Belsham DD (2001) Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology* 142(11):4711-4720.
- Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, O'Hara BF (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298:2211-2213.
- Saenz DA, Turjanski AG, Sacca GB (2002) Physiological concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the Syrian hamster retina. *J. Pineal Res.* 33:31-36.
- Saez JM (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr. Rev.* 15:574-626.
- Schlatt S, Pohl CR, Ehmcke J, Ramaswamy S (2008) Age-related changes in diurnal rhythms and levels of gonadotropins, testosterone, and inhibin B in male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Biol. Reprod.* 79(1):93-99.
- Schnell A, Albrecht U, Sandrelli F (2014) Rhythm and mood: relationships between the circadian clock and mood-related behavior. *Behav. Neurosci.* 128(3):326-343.
- Schroeder F, Atshaves BP, McIntosh AL, Gallegos AM, Storey SM, Parr RD, Jefferson JR, Ball JM, Kier AB (2007) Sterol carrier protein-2: new roles in regulating lipid rafts and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1771:700-718.
- Seidman SN (2007) Androgens and the aging male. *Psychopharmacol. Bull.* 40(4):205-218.
- Sellix MT (2015) Circadian clock function in the mammalian ovary. *J. Biol. Rhythms* 30(1):7-19.
- Sellix MT, Menaker M (2010) Circadian clocks in the ovary. *Trends. Endocrinol. Metab.* 21(10):628-636.
- Selvage DJ, Lee SY, Parsons LH, Seo DO, Rivier CL (2004) A hypothalamic-testicular neural pathway is influenced by brain catecholamines, but not testicular blood flow. *Endocrinology* 145(4):1750-1759.
- Selvaraj V, Stocco DM, Tu LN (2015) Minireview: translocator protein (TSPO) and steroidogenesis: a reappraisal. *Mol. Endocrinol.* 29(4):490-501.
- Shearman LP, Jin X, Lee C, Reppert SM, Weaver DR (2000) Targeted disruption of the *mPer3* gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol. Cell. Biol.* 20:6269-6275.
- Shibata S, Cassone VM, Moore RY (1989) Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci. Lett.* 97(1-2):140-144.

- Shimizu-Albergine M, Tsai LC, Patrucco E, Beavo JA (2012) cAMP-Specific Phosphodiesterases 8A and 8B, Essential Regulators of Leydig Cell Steroidogenesis. *Mol. Pharmacol.* 81:556–566.
- Shukla P, Sun C, O'Rourke ST (2012) Melatonin inhibits nitric oxide signaling by increasing PDE5 phosphorylation in coronary arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303:H1418–H1425.
- Silva CL, Tamura EK, Macedo SM, Cecon E, Bueno-Alves L, Farsky SH, Ferreira ZS, Markus RP (2007) Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 151(2):195-205.
- Sinha Hikim AP, Bartke A, Russell LD (1988) Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biol. Reprod.* 39(5):1225-1237.
- Sinha Hikim AP, Chandrashekar V, Bartke A, Russell LD (1993) Sentinels of Leydig cell structural and functional changes in golden hamsters in early testicular regression and recrudescence. *Int. J. Androl.* 16(5):324-342.
- Smarr BL, Morris E, de la Iglesia HO (2012) The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of Kiss1 and the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 153(6):2839-2850.
- Smith LB, Walker WH, Hormone signaling in the testis, in: Plant TM, Zeleznik AJ (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 4th ed., Academic Press, San Diego, 2015, pp. 637–690.
- Sokanovic SJ, Baburski AZ, Janjic MM, Stojkov NJ, Bjelic MM, Lalosevic D, Andric SA, Stojilkovic SS, Kostic TS (2013) The opposing roles of nitric oxide and cGMP in the age-associated decline in rat testicular steroidogenesis. *Endocrinology* 154(10):3914-3924.
- Sokanovic SJ, Janjic MM, Stojkov NJ, Baburski AZ, Bjelic MM, Andric SA, Kostic TS (2014) Age related changes of cAMP and MAPK signaling in Leydig cells of Wistar rats. *Exp. Gerontol.* 58:19–29.
- Son GH, Chung S, Choe HK, Kim HD, Baik SM, Lee H, Lee HW, Choi S, Sun W, Kim H, Cho S, Lee KH, Kim K (2008) Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(52):20970-20975.
- Son GH, Chung S, Kim K (2011) The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system. *Front Neuroendocrinol.* 32(4):451-465.
- Song KH, Park YY, Park KC, Hong CY, Park JH, Shong M, Lee K, Choi HS (2004) The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation, *Mol. Endocrinol.* 18:1929–1940.

- Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1583-1586.
- Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR (2005) Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol. Endocrinol.* 19(11):2647-2659.
- Stojkov NJ, Baburski AZ, Bjelic MM, Sokanovic SJ, Mihajlovic AI, Drljaca DM, Janjic MM, Kostic TS, Andric SA (2014) In vivo blockade of α 1-adrenergic receptors mitigates stress-disturbed cAMP and cGMP signaling in Leydig cells. *Mol. Hum. Reprod.* 20(1):77-88.
- Stumpf I, Bazwinsky I, Peschke E (2009) Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells. *J. Pineal Res.* 46:140-147.
- Sujino M, Masumoto KH, Yamaguchi S, van der Horst GT, Okamura H, Inouye ST (2003) Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr. Biol.* 13:664-668.
- Susaki EA, Stelling J, Ueda HR (2010) Challenges in synthetically designing mammalian circadian clocks. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21(4):556-565.
- Tajar A, Forti G, O'Neill TW, Lee DM, Silman AJ, Finn JD, Bartfai G, Boonen S, Casanueva FF, Giwercman A, Han TS, Kula K, Labrie F, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Vanderschueren D, Huhtaniemi IT, Wu FC, EMAS Group (2010) Characteristics of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: evidence from the European Male Ageing Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95(4):1810-1818.
- Tamura EK, Silva CL, Markus RP (2006) Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J. Pineal Res.* 41:267-274.
- Tasken K, Aandahl EM (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol. Rev.* 84(1):137-167.
- Taylor SS, Kim C, Vigil D, Haste NM, Yang J, Wu J, Anand GS (2005) Dynamics of signaling by PKA. *Biochim. Biophys. Acta* 1754:25-37.
- Tcholakian RK, Keating RJ (1978) In vivo patterns of circulating steroids in adult male rats. IV. Evidence for rapid oscillations in testosterone in normal and totally parenterally nourished animals. *Steroids* 32(2):269-278.
- Teboul D, Beaufile S, Taveau JC, Iatmanen-Harbi S, Renault A, Venien-Bryan C, Vie V, Lacapere JJ (2012) Mouse TSPO in a lipid environment interacting with a functionalized monolayer. *Biochim. Biophys. Acta* 1818:2791-2800.
- Tenover JS, Bremner WJ (1991) Circadian rhythm of serum immunoreactive inhibin in young and elderly men. *J Gerontol.* 46(5):M181-184.

- 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.* 44(6):429-435.
- Tischkau SA, Howell RE, Hickok JR, Krager SL, Bahr JM (2011) The luteinizing hormone surge regulates circadian clock gene expression in the chicken ovary. *Chronobiol. Int.* 28(1):10-20.
- Tischkau SA, Weber ET, Abbott SM, Mitchell JW, Gillette MU (2003) Circadian clock-controlled regulation of cGMP-protein kinase G in the nocturnal domain. *J. Neurosci.* 23(20):7543-7550.
- Tong Y, Guo H, Brewer JM, Lee H, Lehman MN, Bittman EL (2004) Expression of *haPer1* and *haBmal1* in Syrian hamsters: heterogeneity of transcripts and oscillations in the periphery. *J. Biol. Rhythms* 19(2):113-125.
- Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P (2002) Bimodal regulation of *mPeriod* promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:7728-7733.
- Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P (2002) Bimodal regulation of *mPeriod* promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(11):7728-7733.
- Tremblay JJ (2015) Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids* 103:3-10.
- Tsai LCL, Beavo JA (2011) The roles of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in steroidogenesis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11(6): 670–675.
- Udhane S, Kempna P, Hofer G, Mullis PE, Flück CE (2013) Differential regulation of human 3 β hydroxysteroid dehydrogenase type 2 for steroid hormone biosynthesis by starvation and cyclic AMP stimulation: studies in the human adrenal NCI-H295R cell model. *PLoS One* 8(7):e68691.
- Valenti S, Cuttica C.M, Fazzuoli L, Giordano G, Giusti M (1999) Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified rat Leydig cells cultured in vitro. *Int. J. Androl.* 22:336-341.
- Valenti, S., Giusti, M., Guido, R., Giordano G (1997) Melatonin receptors are present in adult rat Leydig cells and are coupled through a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Eur. J. Endocrinol.* 136(6):633-639.
- Valero M, Espine LM, Mosquera J (2006) Melatonin decreases nitric oxide production, inducible nitric oxide synthase expression and lipid peroxidation induced by Venezuelan encephalitis equine virus in neuroblastoma cell cultures. *Neurochem. Res.* 31:925–932.

- 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(6728):627-630.
- Vanecek J (1999) Inhibitory effect of melatonin on GnRH-induced LH release. *Rev. Reprod.* 4(2):67-72.
- 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(5):929-941.
- Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW (2001) Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res. Health.* 25(2):85-93.
- Waite E, Kershaw Y, Spiga F, Lightman SL (2009) A glucocorticoid sensitive biphasic rhythm of testosterone secretion. *J. Neuroendocrinol.* 21(9):737-741.
- Weems PW, Goodman RL, Lehman MN (2015) Neural mechanisms controlling seasonal reproduction: principles derived from the sheep model and its comparison with hamsters. *Front. Neuroendocrinol.* 37:43-51.
- Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E (2010) Physiology of Testicular Function, chapter in book: *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*, Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Eds.), Springer
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14: 697-706.
- Wittmann M, Dinich J, Merrow M, Roenneberg T (2006) Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol. Int.* 23(1-2):497-509.
- Wong W, Scott JD (2004) AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5(12):959-970.
- 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.
- Yilmaz B, Kutlu S, Mogulkoç R, Canpolat S, Sandal S, Tarakçi B, Kelestimur H (2000) Melatonin inhibits testosterone secretion by acting at hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the rat. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 21(4):301-306.
- Yin W, Gore AC (2006) Neuroendocrine control of reproductive aging: roles of GnRH neurons. *Reproduction* 131(3):403-414.
- Yoo SH, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song EJ, Chang S, Yoo OJ, Yamazaki S, Lee C, Takahashi JS (2005) A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:2608-2613.

Zmuda JM, Thompson PD, Winters SJ (1996) Exercise increases serum testosterone and sex hormone-binding globulin levels in older men. *Metabolism* 45(8):935-939.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20:1103-1110.

LISTA SKRAĆENICA

5HT	5-hidroksitriptamin, serotonin
ACTB	β-aktin
ACTH	adrenokortikotropni hormon (<i>engl. adrenocorticotropic hormone</i>)
ADCY/AC	adenilat ciklaza (adenilil ciklaza), (<i>engl. adenyl cyclase</i>)
APS	amonijum persulfat (<i>engl. ammonium peroxidesulfate</i>)
AR	androgeni receptor / nuklearni receptor subfamilije 3, grupe C, član 4, /NR3C4
ARC	arkuatni nukleus (<i>engl. arcuate nucleus</i>)
ARR19	androgenog receptora korepresor-19 kDa (<i>engl. androgen receptor corepressor of 19 kDa</i>)
ATAD3	(<i>engl. ATPase family AAA Domain-containing protein 3</i>)
AVP	arginin vazopresin (<i>engl. arginine vasopressin</i>)
AVPV	anteroventral periventral nukleus (<i>engl. anteroventral periventricular nucleus</i>)
bHLH-PAS	(<i>engl. basic helix-loop-helix – Period-Arnt-Sim</i>)
BMAL1	(<i>engl. brain-muscle Arnt-like protein 1</i>)
BSA	(<i>engl. bovine serum albumin</i>)
C/EBPb	(<i>engl. CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>)
CAH	kongenitalna adrenalna hiperplazija
CAMK	kalcijum kalmodulin kinaza (<i>engl. Ca²⁺/calmodulin kinase</i>)
CaMKK	kalcijum kalmodulin kinaze kinaza (<i>engl. Ca²⁺/calmodulin kinase kinase</i>)
cAMP	ciklični adenozin monofosfat (<i>engl. cyclic adenosine monophosphate</i>)
CAR2	(<i>engl. Carbonic Anhydrase 2</i>)
CCG	geni kontrolisani genima časovnika (<i>engl. core clock genes</i>)
cDNA	(<i>engl. complementary DNA</i>)
CEs	holesterol estri (<i>engl. cholesterol esters</i>)
CGA	(<i>engl. glycoprotein hormones, alpha polypeptide</i>)
cGMP	ciklični guanozin monofosfat (<i>engl. cyclic guanosine monophosphate</i>)
CSNK/ CK	kazein kinaza (<i>engl. casein kinase</i>)
CLOCK	(<i>engl. circadian locomotor output cycles kaput</i>)
CNG	cikličnim nukleotidima-regulisani jonski kanali (<i>engl. cyclic nucleotide-gated ion channel</i>)
COUP-TFII	(<i>engl. nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2, NR2F2</i>)
CRE	(<i>engl. cAMP response element</i>)
CREB	CRE vezujući protein (<i>engl. CRE binding protein</i>)
CREM	(<i>engl. CAMP Responsive Element Modulator</i>)
CRH	kortikotropin oslobađajući hormon, CRF (<i>engl. Corticotropin-releasing hormone</i>)
CRY1/2	(<i>engl. cryptochrome 1/2</i>)
CYP11A1	citohrom P450, familija 11, subfamilija A, polipeptid 1; ranije poznat kao P450scc (<i>engl. cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme</i>)
CYP17A1	citohrom P450, familija 17, subfamilija A, polipeptid 1; ranije poznat kao P450c17 (<i>engl. cytochrome P450 17α-hydroxylase/17,20 lyase enzyme</i>)
CYP19A1	citohrom P450, familija 19, subfamilija A, polipeptid 1; (P450arom)
DAX1	nuklearni receptor subfamilije 0, grupe B, član 1 (<i>engl. dosage-sensitive sex reversal adrenalhypoplasia critical region on chromosome, X gene</i>)

DBP	(<i>engl. albumin D-element binding protein</i>)
DEC1/2	(<i>engl. differentiated embryo chondrocyte 1/2</i>)
DEPC	(<i>engl. diethylpyrocarbonate</i>)
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHT	dihidrotestosteron
DMEM	(<i>engl. Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMN	dorzomedijalni nukleus hipotalamusa (<i>engl. dorsomedial nucleus of the hypothalamus</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid (<i>engl. dimethylsulfoxide</i>)
dNTP	(<i>engl. 2'-desoxynucleotide-5'-triphosphate</i>)
DRN	dorzalni rafa nukleus (<i>engl. dorsal rapha nuclei</i>)
DSPS	(<i>engl. Delayed sleep phase syndrome</i>)
DTT	ditiotritol (<i>engl. dithiothreitol</i>)
E4BP4	(<i>engl. Nuclear factor, interleukin 3 regulated, NFIL3</i>)
EDTA	(<i>engl. ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
EGF	Epidermalni faktor rasta (<i>engl. Epidermal growth factor</i>)
EIA	enzim imuno analiza (<i>engl. enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ER	endoplazmatski retikulum
ERK	kinaza regulisana ekstraćelijskim signalima (<i>engl. Extracellular signal-regulated kinases</i>)
EtBr	etidijum bromid
EtHO	etanol
F	(<i>engl. forward</i>)
FAA	(<i>engl. food-anticipatory activity</i>)
FBS	(<i>engl. fetal bovine serum</i>)
FEO	(<i>engl. food-entrainable oscillator</i>)
FGF	Fibroblasni faktor rasta (<i>engl. Fibroblast growth factor</i>)
FSH	Folikulostimulirajući hormon (<i>engl. follicle stimulating hormone</i>)
GAPDH	Glicerinaldehid3fosfat dehidrogenaza (<i>engl. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GATA4	(<i>engl. GATA Binding Protein 4</i>)
GHT	Genikulo-hipotalamički trakt (<i>engl. Geniculo-hypothalamic tract</i>)
GnRH	Gonadotropin oslobađajući hormon (<i>engl. Gonadotropin-releasing hormone</i>)
GPCR	familija receptora čija je funkcija vezana za G proteine (<i>engl. G protein-coupled receptor</i>)
GPR54	receptor za KISS1 peptid
GSK3	Glikogen sintaze kinaza 3 (<i>engl. Glycogen synthase kinase 3</i>)
GUCY	guanilat ciklaza (guanilil ciklaza) (<i>engl. Guanylate cyclase</i>)
GUCY1	citosolna tj. solubilna forma GUCY (sGC, <i>engl. </i>)
GUCY2	membranska tj. partikularna forma GUCY (mGC, <i>engl. membrane-bound GC / pGC, engl. particulate GC</i>).
HAT	histon acetil transferaza
hCG	humani horionski gonadotropin (<i>engl. human chorionic gonadotropine</i>)
HDL	lipoproteini velike gustine (<i>engl. high-density lipoprotein</i>)
HEPES	(<i>engl. 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>)
HIF-1 α	(<i>engl. hypoxia inducible factor 1 alpha subunit</i>)
HLF	(<i>engl. human hepatic leukemia factor</i>)

HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A (<i>engl. 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA</i>)
HMGCR	(<i>engl. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase</i>)
HPA	Hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina (<i>engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>)
HPG	Hipotalamo -hipofizno-gonadalna osovina (<i>engl. hypothalamo-pituitary-gonadal axis</i>)
HPT	Hipotalamo-hipofizno-testikularna osovina (<i>engl. hypothalamo-pituitary-testicular axis</i>)
HSD17B	Hidroksisteroid dehidrogenaza 17b (<i>engl. 17β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>)
HSD3B	Hidroksisteroid dehidrogenaza 3b (<i>engl. 3β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>)
HSL/LIPE	Hormon senzitivna lipaza (<i>engl. hormon-senzitive lipase</i>)
IEGs	rani geni (<i>engl. immediate early genes</i>)
IGF1	Insulinu sličan faktor rasta 1 (<i>engl. Insulin-Like Growth Factor-1</i>)
IGI	(<i>engl. intergeniculate islet</i>)
IML	intermediolateralna kolona (<i>engl. intermediolateral column</i>)
IMM	unutrašnja membrana mitohondrija (<i>engl. inner mitochondrial membrane</i>)
INSL3	insulinu sličan protein 3 (<i>engl. insulin-like protein 3</i>)
IP3	Inozitol 3 fosfat (<i>engl. inositol trisphosphate</i>)
ipRGC	fotosenzitivne ganglionske ćelije retine (<i>engl. intrinsically photosensitive retinal ganglion cells</i>)
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
JARID1a	lizin specifična demetilaza 5A (<i>engl. Lysine-specific demethylase 5A</i>)
kb	kilo baza
KO	(<i>engl. knockout</i>)
LDL	Lipoproteini male gustine (<i>engl. low-density lipoprotein</i>)
LH	luteinizujući hormon (<i>engl. luteinising hormone</i>)
LHB	(<i>engl. luteinizing hormone beta polypeptide</i>)
LHR	luteinizujućeg hormona receptor (LH/hCG receptor) (<i>engl. luteinising hormone receptor</i>)
LRH1	(<i>engl. Liver receptor homolog-1</i>)
M	molar (mol/l)
M199	Medijum 199
MAPK	kinaza aktivirana mitogenima (<i>engl. Mitogen-activated protein kinase</i>)
MASCO	(<i>engl. methamphetamine-sensitive circadian oscillator</i>)
MPOA	medijalna preoptička regija hipotalamusa
MEF2	(<i>engl. myocyte enhancer factor-2</i>)
MLN64	(<i>engl. metastatic lymph node 64, STARD3</i>)
MNTR1	(<i>engl. melatonin receptor 1</i>)
mPOA	medijalna preoptička regia (<i>engl. medial preoptic area</i>)
mpPVN	medioparvocelularni deo paraventrikularnog nukleusa (<i>engl. medioparvocellular paraventricular nucleus</i>)
MRN	medijalni rafa nukleus (<i>engl. medial raphe nuclei</i>)
MyoD	(<i>engl. myogenic differentiation</i>)
NAD	Nikotinamid adenin
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NAMPT	(<i>engl. Nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>)
NCP1/2	(<i>engl. Niemann-Pick disease, type C1/2</i>)

NLS	nukleus lokalizirajući signal (<i>engl. nuclear localization signal</i>)
NMDA	N-metil D-aspartat (<i>engl. N-methyl-D-aspartate</i>)
NO	azot oksid (<i>engl. nitric oxide</i>)
NOS	azot oksid sintaza (<i>engl. nitric oxide synthase</i>)
NOS1	azot oksid sintaza 1 poznata i kao neuralna forma NOS (nNOS)
NOS2	azot oksid sintaza 2 poznata i kao inducibilna forma NOS (iNOS)
NOS3	azot oksid sintaza 3 poznata i kao endotelijalna forma NOS (eNOS)
NPAS2	(<i>engl. neuronal PAS domain protein 2</i>)
nt	(<i>engl. nucleotide</i>)
NUR77	nuklearni receptor 4A1 (<i>engl. nuclear receptor 4A1, NR4A1</i>)
OD	(<i>engl. optical density</i>)
OMM	spoljašnja membrana mitohondrija (<i>engl. outer mitochondrial membrane</i>)
PAC1	(<i>engl. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 1 receptor, ADCYAP1R1</i>)
PACAP	(<i>engl. pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i>)
PAGE	(<i>engl. polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAP7	(<i>engl. TSPO-associated acyl-coenzyme A binding domain containing 3, ACBD3</i>)
PBS	(<i>engl. phosphate buffered saline</i>)
PCR	(<i>engl. polymerase chain reaction</i>)
PDE	fosfodiesteraza (<i>engl. phosphodiesterase</i>)
PER	(<i>engl. Period</i>)
PKC	Protein kinaza C (<i>engl. protein kinase C</i>)
PLC	fosfolipaza C (<i>engl. fosfolipaze C</i>)
PRKA/PKA	Protein kinaza A (cAMP zavisna protein kinaza) (<i>engl. protein kinase A</i>)
<i>Prkaca</i>	gen za alfa kataličku subjedinicu PRKA (<i>engl. PRKA catalytic subunit alpha</i>)
<i>Prkacb</i>	gen za beta kataličku subjedinicu PRKA (<i>engl. PRKA catalytic subunit beta</i>)
<i>Prkar1a</i>	gen za regulatornu 1-alfa subjedinicu PRKA (<i>engl. PRKA type I-alpha regulatory subunit</i>)
<i>Prkar2a</i>	gen za regulatornu 2-alfa subjedinicu PRKA (<i>engl. PRKA type II-alpha regulatory subunit</i>)
<i>Prkar2b</i>	gen za regulatornu 2-beta subjedinicu PRKA (<i>engl. PRKA type II-beta regulatory subunit</i>)
PRKG/PKG	Protein kinaza G (cGMP zavisna protein kinaza) (<i>engl. protein kinase G</i>)
PVN	paraventrikularni nukleus (<i>engl. paraventricular nucleus</i>)
REV-ERBa/b	(<i>engl. nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1, NR1D1</i>)
RGC	ganglionske ćelije retine (<i>engl. retinal ganglion cells</i>)
RHT	Retino-hipotalamički trakt (<i>engl. Retinohypothalamic tract</i>)
RIA	radio-imuno analiza
RN	Rafa nukleus (<i>engl. rapha nuclei</i>)
RNK	ribonukleinska kiselina
ROR	(<i>engl. retinoic acid related orphan receptor</i>)
RORE	(<i>engl. ROR response element</i>)
RQ-PCR	(<i>engl. Real-time polymerase chain reaction</i>)
RT	(<i>engl. reverse transcription</i>)
R	(<i>engl. reverse</i>)
RXR α	(<i>engl. Retinoid X receptor alpha</i>)
SAD	(<i>engl. Seasonal affective disorder</i>)

SCARB1	HDL receptor (<i>engl. scavenger receptor class B, member 1</i>), SR-BI
SCN	Suprashijsmatični nukleus (<i>engl. Suprachiasmatic nucleus</i>)
SD	(<i>engl. standard deviation</i>)
SDS	(<i>engl. sodium dodecyl sulphate</i>)
SEM	(<i>engl. standard error of the mean</i>)
SF1	steroidogeni faktor 1 / nuklearni receptor subfamije 5, grupe A, član 1 (NR5A1)
SHBG	(<i>engl. sex hormone binding globulin</i>)
SHP	(<i>engl. small heterodimer partner</i>)
SIRT1	(<i>engl. sirtuin 1</i>)
SOAT1/2	(<i>engl. Sterol O-acyltransferase, 1/2</i>)
SP1	(<i>engl. Transcription factor specificity protein 1</i>)
sPVZ	subparaventrikularna zona (<i>engl. subparaventricular zone</i>)
SRC1	(<i>engl. nuclear receptor coactivator 1, NCOA1</i>)
StAR	steroidogeni akutni regulatorni protein (<i>engl. steroidogenic acute regulatory protein</i>)
STAT	(<i>engl. signal transducer and activator of transcription</i>)
SWD	(<i>engl. Shift work disorder</i>)
T	testosteron
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	(<i>engl. TRIS buffered saline</i>)
TBS-T	TBS-Tween
TEF	(<i>engl. thyrotroph embryonic factor</i>)
TEMED	tetrametiletilendiamin
TGF	Transformišući faktor rasta (<i>engl. Transforming growth factor</i>)
TRH	Tireotropin oslobađajući hormon (<i>engl. Thyrotropin-releasing hormone</i>)
TRIS	(<i>engl. tris-(hydroxymehtyl)-aminomethane</i>)
TSPO	translokatorni protein, poznat i kao periferni benzodiazepinski receptor (PBR)
U	unit (U = $\mu\text{mol}/\text{min}$)
VDAC1/2	(<i>engl. voltage-dependent anion channel 1/2</i>)
VLDL	lipoproteini vrlo male gustine (<i>engl. very low-density lipoprotein</i>)
WB	Western blot
WT	(<i>engl. wild-type</i>)
ZT	(zeitgeber time)
βTrCP	(<i>engl. β-transducin repeat-containing protein</i>)

BIOGRAFIJA

Aleksandar Baburki je rođen 14. 04. 1986. godine u Rumi gde je završio osnovnu i srednju školu. Prirodno-matematički fakultet, Univerziteta u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog-molekularni biolog, upisuje 2005. a završava 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,42. Diplomski rad pod naslovom: „*Efekat alelne varijabilnosti Glu-B1 na parametre kvaliteta hlebne pšenice*“ uradio je pod mentorstvom prof. dr Dragane Obreht. Master studije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog – master, molekularni biolog završava 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,75. Eksperimentalni deo master rada pod naslovom „*Procena DNK polimorfizma sorti lucerke RAPD markerima*“ uradio je pod mentorstvom prof. dr Dragane Obreht i dr Ksenije Taški-Ajduković. Za vreme studija bio je stipendista Fonda za mlade talente Republike Srbije.

Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Molekularna biologija eukariota upisao je 2010. godine. Od 2011. godine zaposlen je u Laboratoriji za Reproductivnu endokrinologiju i signaling, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Zvanje istraživač-saradnik stiče 2013. godine.

Eksperimentalni deo doktorske teze uradio je u Laboratoriji za Reproductivnu endokrinologiju i signaling, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu 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.

Aleksandar Baburski je do sada objavio 12 radova u časopisima međunarodnog značaja (3 kao prvi autor) i veći broj saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Александар З. Бабурски _____

број уписа _____ М3012/2010 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Карактеризација и путеви синхронизације периферног биолошког часовника и стероидогенезе у Лајдиговим ћелијама пацова”.

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Александар З. Бабурски _____

Број уписа _____ М3012/2010 _____

Студијски програм _____ Молекуларна биологија _____

Наслов рада _____ Карактеризација и путеви синхронизације периферног
биолошког часовника и стероидогенезе у Лајдиговим ћелијама пацова _____

Ментор _____ проф. др Татјана Костић и проф. др Гордана Матић _____

Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација и путеви синхронизације периферног биолошког часовника и стероидогенезе у Лајдиговим ћелијама пацова

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Цреативе Цоммонс) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.