



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Kristina Pogrmić

**Mehanizmi delovanja atrazina na steroidogenu aktivnost Leydig-
ovih ćelija peripubertalnih pacova**

– doktorska disertacija –

Novi Sad, 2010.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

TD

Monografska dokumentacija

Tip zapisa:

TZ

Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada:

VR

Doktorska disertacija

Autor:

AU

Kristina Pogrmić

Mentor:

MN

Dr Radmila Kovačević, redovni profesor, PMF

Naslov rada:

NR

Mehanizmi delovanja atrazina na steroidogenu aktivnost Leydig-ovih ćelija peripubertalnih pacova

Jezik publikacije:

JP

Srpski (latinica)

Jezik izvoda:

Jl

Srpski/Engleski

Zemlja publikovanja:

ZP

Srbija

Uže geografsko područje:

UGP

Vojvodina

Godina:

GO

2010

Izdavač:

IZ

Autorski reprint

Mesto i adresa: Novi Sad
MA

Fizički opis rada: 7 poglavlja, 130 strana, 244 literaturnih citata,
FO 5 tabela, 27 slika

Naučna oblast: Biohemija
NO

Naučna disciplina: Reproductivna endokrinologija
ND

Predmetna odrednica/
Ključne reči: atrazin, Leydig-ove ćelije, steroidogeneza,
PO ekspresija gena, cAMP

UDK:

Čuva se: U biblioteci Departmana za hemiju, PMF,
ČU Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3,
21000 Novi Sad, Srbija

U biblioteci Departmana za biologiju i ekologiju, PMF,
Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2,
21000 Novi Sad, Srbija

Važna napomena:
VN

Izvod:
IZ

Rezultati prikazani u ovom radu opisuju efekte *in vivo* primene atrazina (2-hloro-4-etilamino-6-izopropilamino-*s*-triazin) na *ex vivo* steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova (tretiranih sa 50 mg/kg i 200 mg/kg telesne mase od 23. do 50. dana starosti). Dobijeni rezultati jasno ukazuju da 28-dnevna *in vivo* primena atrazina snažno inhibira testikularnu steroidogenezu, smanjujući ekspresiju gena za steroidogene enzime i druge regulatorne proteine uključene u kontrolu testikularne steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova. Rezultati *in vivo* primene atrazina pokazuju da atrazin snažno inhibira ekspresiju gena za luteinizirajući hormon receptor (LHR), skevendžer receptor-B1 (SR-B1), steroidogeni faktor-1 (SF-1), steroidogeni akutni regulatorni protein (StAR), translokator protein (TSPO), fosfodiesterazu 4B, 3 β -hidroksisteroid dehidrogenazu (HSD), CYP17A1 i 17 β HSD. Rezultati u okviru ovih istraživanja pokazuju da primena atrazina tokom prepubertalnog perioda razvoja mužjaka pacova dovodi do dozno-zavisnog smanjenja nivoa cAMP i snažne inhibicije androgeneze u prisustvu hCG. Obzirom na blokadu ekspresije LHR, prvog elementa u aktivaciji cAMP-signalnog puta, moglo bi se pretpostaviti da je to uzrok blokade androgeneze kod atrazinom-tretiranih životinja. Takođe, rezultati ukazuju na inhibiciju supstrat-stimulisane

produkcije androgena paralelno sa redukcijom ekspresije steroidogenih enzima CYP17A1 i 17 β HSD. U drugom delu ove doktorske disertacije, ispitivan je efekat direktne *in vitro* primene različitih doza atrazina (1 nM, 1 μ M, 20 μ M, 50 μ M) na ekspresiju i aktivnost steroidogenih enzima u kulturi prečišćenih Leydig-ovih ćelija testisa peripubertalnih pacova, pri čemu je zabeleženo stimulatorno dejstvo pomenutog herbicida. Naime, zabeleženo je povećanje bazalne i hCG-stimulisane produkcije testosterona praćeno povećanim nivoom cAMP u medijumu tretiranih ćelija. Pri ispitivanju ekspresije gena za steroidogene enzime i regulatorne proteine, zabeleženo je povećanje ekspresije gena za SF-1, StAR, CYP17A1 i 17 β HSD u hCG-stimulisanim uslovima. Takođe, povećana je i produkcija testosterona nakon dodavanja progesterona i androstendiona kao supstrata, kod Leydig-ovih ćelija tretiranih sa atrazinom. Da bi pokušali da objasnimo zašto postoje razlike u efektu atrazina u zavisnosti od načina primene, postavili smo jednokratni *in vivo* eksperiment sa atrazinom (tretman sa 50 mg/kg i 200 mg/kg telesne mase, životinje tretirane 50. dana starosti). Rezultati ovih eksperimenata ukazali su na up-regulaciju testikularne steroidogeneze, kao i na povećan nivo cAMP kod životinja tretiranih sa atrazinom. Stoga, nivo cAMP se pojavljuje kao karika koja povezuje sva tri korišćena eksperimentalna pristupa. Međutim, ostaje otvoreno pitanje na koji način atrazin utiče na modulaciju nivoa cAMP i to pitanje predstavlja motiv za dalja istraživanja. Sumarno, dobijeni rezultati ukazuju da 24-časovni tretman atrazinom izaziva povećanje, a prolongirani tretman snažno smanjenje steroidogenog kapaciteta Leydig-ovih ćelija peripubertalnih pacova.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 15. 01. 2009.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

Predsednik: Dr Ksenija Kuhajda, redovni profesor, PMF, Novi Sad

Član: Dr Tatjana Kostić, redovni profesor, PMF, Novi Sad

Član: Dr Gordana Cvijić, redovni profesor, Biološki fakultet, Beograd

Mentor: Dr Radmila Kovačević, redovni profesor, PMF, Novi Sad

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monograph type

DT

Type of record:

Printed text

TR

Contents code:

Ph.D. Thesis

CC

Author:

Kristina Pogrmic

AU

Mentor:

Dr Radmila Kovacevic, Professor, Faculty of Sciences

MN

Title:

The mechanism of atrazine action on steroidogenesis in peripubertal rat Leydig cells

TI

Language of text:

Serbian

LT

Language of abstract:

Serbian/English

LA

Country of publication:

Serbia

CP

Locality of publication:

Vojvodina

LP

Publication year:

2010

PY

Publisher:

Author's reprint

PU

Publ. place:

Novi Sad

PP

Physical description: 7 chapters, 130 pages, 244 references, 5 tables,
PD 27 pictures

Scientific field: Biochemistry
SF

Scientific discipline: Reproductive Endocrinology
SD

Subject/Key words: atrazine, Leydig cells steroidogenesis
SKW gene expression, cAMP

UC:

Holding data: In the Library of the Department of Chemistry,
HD Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Dositeja
Obradovica Sq. 3, 21000 Novi Sad, Serbia negro

In the Library of the Department of Biology and Ecology,
Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Dositeja
Obradovica Sq. 2, 21000 Novi Sad, Serbia

Note:
N

Abstract:
AB

In the present study, we investigated the effects of oral dosing of atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-*s*-triazine) to peripubertal male rats (50 mg/kg and 200 mg/kg body weight daily from postnatal day 23 to 50) on *ex vivo* Leydig cell steroidogenesis. Leydig cells from treated rats were characterised by significant decline in mRNA transcripts of several genes responsible for steroidogenesis: luteinizing hormone receptor (LHR), scavenger receptor-B1, steroidogenic acute regulatory protein (StAR), translocator protein, steroidogenic factor-1 (SF-1), phosphodiesterase 4B, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD), CYP17A1 and 17 β HSD. In the presence of human chorion gonadotropin, the dose-dependent decrease in extra cellular cAMP level and accordingly strong inhibition of androgenesis were obtained. The transcription of LHR gene in Leydig cells of atrazine-treated rats was down-regulated in a dose-dependent manner, which could be the reason for reduction in cAMP level and expression of cAMP-dependent genes. The results also indicated inhibition of substrate-stimulated androgen production in parallel with reduced expression of steroidogenic enzymes CYP17A1 and 17 β HSD. In the second part of this study we examined direct 24 h *in vitro* effect of different doses of atrazine (1 nM, 1 μ M, 20 μ M, 50 μ M) on expression and activity of steroidogenic enzymes in purified Leydig cells obtained from peripubertal rats. Obtained results indicated that 24 h-incubation of peripubertal Leydig cells in the presence of atrazine increased steroidogenic capacity of that cells. Increased basal and hCG-stimulated testosterone production were accompanied by increasing levels of cAMP in the

medium of treated cells. Also, in comparison to controls, gene expression revealed increased expression of SF-1, StAR, CYP17A1 and 17 β -HSD. When Leydig cells were challenged with progesterone and Δ^4 -androstenedione, testosterone production was increased in atrazine challenged Leydig cells. To address these two opposite effects of atrazine we performed 24 h *in vivo* experiment in which peripubertal male rats (on postnatal day 50) were exposed to single atrazine treatment (50 mg/kg- and 200 mg/kg-body weight by gavage), and 24 h later, Leydig cells were isolated and testosterone levels in medium determined in basal and in hCG-stimulated conditions after 2 h-incubation period. Obtained results indicated that single *in vivo* exposure to atrazine was also accompanied 24 h later by up-regulation of Leydig cell androgenesis and increased cAMP level. According to the results obtained in this study, it seems that modulation of cAMP levels appear as a link that connects all three experimental approaches. However, the question of how atrazine affects the modulation of cAMP levels remains open, and present a motive for further research. In conclusion, obtained results indicated that 24 h treatment with atrazine caused an increase, while prolonged treatment strongly reduce steroidogenic capacity of peripubertal Leydig cells.

Accepted by the Scientific Board on: 15. 01. 2009.
ASB

Defended:
DE

Thesis defend board:
DB

President: Dr Ksenija Kuhajda, Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Member: Dr Tatjana Kostić, Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Member: Dr Gordana Cvijić, Professor, Faculty of Biology, Beograd
Advisor: Dr Radmila Kovačević, Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Hvala,

Mojoj Profesorici dr Radmili Kovačević, koja mi je bila mentor, na nesebičnoj podršci, pomoći i poverenju koje je imala u mene, na strpljenju i svemu što me je naučila tokom ovih godina koje smo zajedno proveli.

Profesoricama dr Silvani Andrić i dr Tatjani Kostić, od kojih sam zaista mnogo naučila i koje su mi pomogle u labaratorijskom radu. Profesorici dr Tatjani Kostić na savetima i sugestijama prilikom pisanja ovog rada.

Profesoricama dr Kseniji Kuhajdi i dr Gordani Cvijić na saradnji, poverenju i sugestijama prilikom izrade ovog rada.

Dragoj i uvek smirenoj Marici Jović na pomoći u eksperimentalnom radu.

Mojim dragim koleginicama na nesebičnoj pomoći kako u eksperimentalnom radu tako i na prijateljskoj podršci: Svetlani Fa, mr Sonji Kaišarević, Vanji Dakić, Branki Glišić, Jeleni Hrubik.

Mojim divnim drugarima Mariji Janjić i Nataši Stojkov koje su uvek bile tu da priteknu u pomoć i pruže podršku u pravom trenutku.

Hvala mojoj celoj porodici, roditeljima, sestri, mom suprugu Darku, baki i deki, što su uvek bili uz mene i što su me podržavali.

Kristina

Sadržaj

1. OPŠTI DEO	1
1.1. Supstance sa hormonskom aktivnošću	2
1.1.1. Uticaj pojedinih EDC na proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama	6
1.2. Atrazin	12
1.2.1. Biološki efekti atrazina	14
1.2.2. Metabolizam atrazina	16
1.2.3. Efekti atrazina na endokrini sistem	19
1.3. Testikularna steroidogeneza	27
1.3.1. Steroidogeni enzimi	32
1.3.2. Regulacija steroidogeneze	37
1.3.3. Regulacija ekspresije gena odgovornih za steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama	43
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	51
3. MATERIJAL I METODE	53
3.1. Hemikalije	54
3.2. Eksperimentalne životinje i tretmani	54
3.3. Izolacija intersticijalnih ćelija testisa	55
3.4. Purifikacija Leydig-ovih ćelija	57
3.5. Eksperimentalni dizajn	57
3.6. Određivanje koncentracije hormona radioimunološkom analizom	59
3.7. Određivanje nivoa cAMP-a	60
3.8. MTT test	60
3.9. Izolacija RNK prema "RNAqueous-4PCR" kompletu	61
3.9.1. Određivanje koncentracije totalne RNK	62
3.10. Reverzna transkripcija prema "High-Capacity cDNA Reverse Transcription" protokolu	63
3.11. Relativna kvantifikacija genske ekspresije prema "Power SYBR Green PCR Master Mix" protokolu	64
3.12. Statistička analiza	66

4. REZULTATI	67
4.1. Efekti 28-dnevne oralne primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova.....	68
4.1.1. Nivo hormona u serumu	68
4.1.2. Efekti <i>in vivo</i> primene atrazina na <i>ex vivo</i> bazalnu i hCG-stimulisanu produkciju progesterona, testosterona i cAMP u Leydig-ovim ćelijama	69
4.1.3. Efekat <i>in vivo</i> primene atrazina na <i>ex vivo</i> produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu 22OH-holesterola kao supstrata	71
4.1.4. Efekat <i>in vivo</i> primene atrazina na produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu pregnenolona kao supstrata.....	72
4.1.5. Efekat <i>in vivo</i> primene atrazina na <i>ex vivo</i> produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu progesterona kao supstrata	73
4.1.6. Efekat <i>in vivo</i> primene atrazina na <i>ex vivo</i> produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu androstendiona kao supstrata.....	73
4.1.7. Efekat atrazina na <i>ex vivo</i> konverziju 22OH-holesterola u progesteron i testosteron u Leydig-ovim ćelijama kontrolnih i atrazinom-tretiranih životinja	74
4.1.8. Efekat <i>in vivo</i> primene atrazina na ekspresiju gena odgovornih za proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova.....	75
4.1.9. Efekat <i>in vivo</i> primene atrazina na težinu androgen-zavisnih organa i telesnu masu.....	77
4.2. Efekat <i>in vitro</i> primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova.....	79
4.2.1. Efekat <i>in vitro</i> primene atrazina na bazalnu i hCG-stimulisanu produkciju progesterona, testosterona i cAMP u Leydig-ovim ćelijama	79
4.2.2. Efekat <i>in vitro</i> primene atrazina na ekspresiju gena odgovornih za proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova.....	82
4.2.3. Efekat <i>in vitro</i> primene atrazina na produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu progesterona kao supstrata.....	84
4.2.4. Efekat <i>in vitro</i> primene atrazina na produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu androstendiona kao supstrata	85
4.3. Efekat jednokratne <i>in vivo</i> primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova.....	87

5. DISKUSIJA	89
5.1. Efekat 28-dnevne <i>in vivo</i> primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova.....	90
5.2. Efekat <i>in vitro</i> primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova.....	96
5.3. Efekat jednokratne <i>in vivo</i> primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova.....	100
6. ZAKLJUČCI	103
7. LITERATURA	105

1. OPŠTI DEO

1.1. Supstance sa hormonskom aktivnošću

Ksenobiotici (xeno – strani; bios – živi) su supstance koje organizmi normalno ne proizvode, a u organizam dospevaju udisanjem, ishranom, apsorpcijom preko kože, intravenski (razni anestetici) i sl. Mogu da potiču iz prirodne hrane (alkaloidi, flavoni), ili pak da predstavljaju supstance koje su namerno (lekovi – prirodni i sintetski, aditivi u hrani) ili nenamerno unete u organizam. U ovu poslednju kategoriju ulaze supstance koje je sintetisao čovek za određene potrebe, a koje su u životnu sredinu dospеле nekontrolisano, kao što su pesticidi (herbicidi, insekticidi, fungicidi), poliaromatični ugljovodonici (PAH), polihlorovani bifenili (PCB), polihlorovani dibenzo-p-dioksini (PCDD) i polihlorovani dibenzofurani (PCDF), razne vrste plastike i drugi sintetski polimeri.

Ksenobiotici mogu imati razne efekte na homeostazu biološkog sistema, a posebna pažnja poslednjih decenija poklanja se ksenobioticima koji utiču na endokrini sistem. Obzirom na kompleksnost neuroendokrine kontrole homeosteze organizma, svaka promena jedne od komponenti ovog sistema može imati velike posledice na održavanje homeostaze, osobito ako se radi o organizmu u razvoju (prenatalni, postnatalni i pubertalni period).

Supstance koje remete homeostazu endokrinog sistema organizma označavaju se na engleskom kao “endocrine disrupting chemicals (EDCs)/endocrine disruptors” što bi u slobodnom prevodu moglo da se definiše kao “supstance sa hormonskom aktivnošću/jedinjenja koja remete funkciju endokrinog sistema” (u daljem tekstu EDC). Do danas ne postoji jedinstvena definicija EDC. Ovde će biti navedena definicija Internacionalnog Programa Hemijske Sigurnosti (IPCS) iz 2002. godine koja glasi: "EDC je egzogena supstanca, ili mešavina supstanci, koja remeti funkciju(e) endokrinog sistema te uzročno-posledično izaziva različite efekte na nivou organizma, na njegovo potomstvo ili na (sub)populacije" (Fisher, 2004).

Takođe, ne postoji jedinstvena klasifikacija jedinjenja koja se mogu označiti kao EDC, ili kao potencijalni EDC. Prema Keith (1998) jedinjenja koja bi mogla da se svrstaju u EDC grupišu se u tri osnovne grupe:

1. Farmakološki proizvodi: širok spektar lekova i kozmetičkih preparata koji se danas koriste, ili su nekada korišteni. Npr. prvi registrovani sintetički EDC je dietilstilbestrol (DES),

lek koji je davan trudnicama od 1948-1972. radi prevencije abortusa i prevremenog porođaja. Kasnije je utvrđeno da može da izazove kancer reproduktivnih organa, čak i u drugoj generaciji.

2. Prirodni EDC: supstance iz ove grupe označavaju se i kao fitoestrogeni, jer su prisutni u biljkama i biljnim proizvodima, na primer u soji, jabukama, pšenici itd. Fitoestrogeni mogu da se vežu za estrogene receptore i da deluju kao agonisti tj. da prouzrokuju efekte slične 17β -estradiolu. Konzumiranje biljaka bogatih fitoestrogenima može prouzrokovati poremećaj u reprodukciji kod ljudi i domaćih životinja. Najpoznatiji fitoestrogen je genistein koji pripada flavonoidima.

3. EDC iz životne okoline: ovde se ubrajaju jedinjenja koja su najvećim delom antropogenog porekla i koriste se u različite svrhe ili nastaju kao nusprodukti pri proizvodnji određenih jedinjenja. Tu spadaju i jedinjenja koja nastaju tokom sagorevanja određenih organskih jedinjenja, ili na neki drugi način. To su: insekticidi, herbicidi, nematocidi, fungicidi, industrijske hemikalije (rastvarači, aditivi, jedinjenja za proizvodnju plastike i sl.), metali, PCB, supstance bez komercijalne upotrebe (nastale kao nusprodukti tehnoloških procesa, ili pri nekontrolisanom sagorevanju određenih organskih jedinjenja; tu spadaju dioksini i furani i poliaromatični ugljovodonici).

Supstance sa hormonskom aktivnošću mogu da ostvare svoje dejstvo na mnogobrojne načine. Jedan od načina je vezivanje za intracelularne receptore steroidnih hormona, te ih možemo podeliti na agoniste i antagoniste. U prvu grupu spadaju supstance koje imitiraju efekat prirodnih hormona vezujući se za njihove specifične receptore, dok drugoj grupi pripadaju supstance koje, vezujući se za receptore, blokiraju efekte prirodnih hormona, tj. indukuje se ili inhibira transkripcija pojedinih gena koji su pod kontrolom steroidnih hormona. Postoje jedinjenja koja imaju i agonističko i antagonističko dejstvo. Takođe, pojedina jedinjenja utiču na ekspresiju enzima koji učestvuju u biosintezi hormona a takođe mogu da utiču i na aktivnost enzima (Fisher, 2004; Gore i sar., 2006), kao i na katabolizam steroidnih hormona (Tabb i Blumberg, 2005). Takođe, EDC mogu da interaguju sa proteinskim nosačima u plazmi za steroidne ili hormone štitne žlezde (Danzo, 1997). Svoje efekte EDC mogu ostvariti i modulacijom aktivnosti ko-aktivatora nuklearnih receptora. Nuklearni receptori posle vezivanja liganda pokreću transkripciju vezujući se direktno za DNK u predelu regulatorne sekvence ciljnog gena pri čemu u procesu aktivacije učestvuju i ko-aktivatori i bazalna transkripciona mašinerija. Promene u ekspresiji receptora ili ko-aktivatora mogu dovesti i do

promena u ekspresiji ciljnih gena. Pokazano je kako tretman sa pojedinim ksenobioticima može da menja nivo ko-aktivatora i time menja aktivnost nuklearnog receptora čime se pojačava ili slabi signal koji dolazi od steroidnih hormona i time se narušava funkcionisanje endokrinog sistema (Tabb i Blumberg, 2005). Osim toga, ksenobiotici mogu uticati na degradaciju nuklearnih receptora (Masuyama i Hiramatsu, 2004). Treba naglasiti da postoje i tzv. ne-genomski efekti steroidnih hormona, odnosno modulacija aktivnosti ćelije odvija se vezivanjem steroidnih hormona za citoplazmatične ili membranske regulatorne proteine i aktivacijom MAP kinaza kao i drugih signalnih puteva u ćeliji. Stoga i EDC mogu oponašati ovakva dejstva steroidnih hormona (Gore i sar., 2006).

Dejstvo ksenobiotika na organizam pre svega zavisi od vrste kojoj pripada organizam, njegovog uzrasta i pola. Najveće efekte ksenobiotici, a prevashodno EDC, imaju na mlade organizme bili oni u fetalnom, neonatalnom ili postnatalnom periodu. Potomstvo roditelja, koji su bili izloženi ksenobioticima, takođe može biti afektirano. Fetusi i novorođeni su veoma osetljivi na supstance iz okoline, osobito na EDC sa efektom na reproduktivni sistem. Poznato je da seksualni hormoni u fetalnom i ranom natalnom periodu regulišu diferencijaciju pola. Oni utiču kako na organizaciju i diferencijaciju polnih organa, tako i na organizaciju određenih regiona CNS-a koji će kasnije biti važni regulatori seksualnog ponašanja u adultnom periodu. Bilo kakav poremećaj endokrine homeostaze organizma u ovom periodu može dovesti do nesagledivih posledica (Fisher, 2004).

Efekti na adultne organizme su različiti: smanjenje fertiliteta mužjaka (smanjenje količine i kvaliteta sperme), povećanje incidence raka prostate i testisa, feminizacija mužjaka (Sharpe, 2001), razvitak kancera dojke, poremećaji normalnih reproduktivnih ciklusa (estrusnog i menstrualnog), endometrioza, lažna trudnoća, smanjenje imune otpornosti, hiper- i hipotireodizam, efekti na ponašanje, gojaznost i tumori raznih organa itd (Maffini i sar., 2006; Ma, 2009).

S obzirom na to da je većina EDC lipofilne prirode oni podležu sličnim metaboličkim putevima razgradnje i ekskrecije kao i steroidni hormoni. Metabolizam steroida i EDC se može podeliti u 2 faze. U fazi I, dodavanjem polarne funkcionalne grupe jedinjenje postaje rastvorljivije u vodi, te se tako olakšava renalna i žučna ekskrecija, a redukuje se reapsorpcija u bubrezima. Takođe, smanjuje se i mogućnost lakšeg ulaska ovih supstanci u ćelije i njihovog nagomilavanja u masnom tkivu. Hemijske modifikacije lipofilnog supstrata

(aromatična i alifatična hidroksilacija, oksidativna dealkilacija, N- i S- oksidacija, deaminacija i sl.), odvijaju se uz katalitičko dejstvo enzima iz familije citohrom oksidaza P450 (CYP), kao i uz prisustvo NADPH i flavoproteina (FAD, FMN). U fazi II, novonastale hidrofilne molekule, konjuguju se sa malim hidrofilnim endogenim supstancama kao što su glukuronska kiselina, glutation, glutamin, cistein, glicin itd., uz učešće enzima II faze biotransformacije, kao što su NADPH menadion oksidoreduktaza, aldehid dehidrogenaza, UDP-glukuronil transferaza (UDPGT) i glutation S-transferaza (GST), čime se olakšava ekskrecija iz organizma (Van der Oost i sar., 2003).

Poslednjih godina sve veća pažnja istraživača usmerena je na transportere, koji posreduju u ulasku i izlasku ksenobiotika u tkiva i ćelije u biološkom sistemu. Naime, transporterima - posredovana apsorpcija, sekrecija i reapsorpcija ksenobiotika sve se više prepoznaju kao bitne determinante u biološkoj aktivnosti mnogih ksenobiotika. Transporterima posredovan efluks ksenobiotika na nivou gastrointestinalnog trakta, jetre, bubrega, mozga, testisa, placente i drugih tkiva može biti protektivni mehanizam, kojim se sprečava akumulacija ksenobiotika u ćeliji. Sa druge strane, ksenobiotici mogu dospeti u ćeliju pomoću transportera koji potpomažu njihov ulaz i na taj način ostvariti negativne efekte (revijalni rad Klaasen i Lu, 2008).

OATPs (eng. Organic anion transporting polypeptides) predstavljaju membranske transportere sa 12 transmembranskih domena, koji posreduju u natrijum-nezavisnom preuzimanju amfipatičnih organskih jedinjenja u ćeliju. OATPs transportuju veliki broj supstrata, uključujući žučne kiseline, eikosanoide, steroide, tireoidne hormone i njihove konjugate ali i mnogobrojne ksenobiotike kao što su anjonski oligopeptidi, organske boje, različiti toksini i mnogi lekovi (revijalni rad Hagenbuch i Gui, 2008; revijalni rad Hagenbuch i Meier, 2003). Tokom poslednjih godina, uočeno je da OATPs imaju važnu ulogu u apsorpciji i dispoziciji mnogih ksenobiotika. Osim toga neki od OATPs imaju važnu ulogu i u ekskreciji potencijalno toksičnih supstanci, te su stoga uključeni u procese detoksikacije (Hagenbuch i Meier, 2003). Neki OATPs se selektivno ekspresuju samo u određenom tkivu, kao što je jetra, dok se drugi ekspresuju u različitim organima uključujući i krvno-moždanu barijeru, pluća, srce, bubreg, placentu, testis i druge. Ipak samo nekoliko ovih transportera su detaljno opisani i okarakterisani u literaturi (Hagenbuch i Meier, 2003; revijalni rad Hagenbuch i Gui, 2008).

Što se tiče transporta atrazina u ćeliju još uvek nema dostupnih podataka u literaturi koji bi

ukazali na način ulaska atrazina u ćeliju. Pokazano je da atrazin dovodi do promena na nivou ćelijske membrane eritrocita pacova (Singh i sar., 2008). Kod riba *Danio rerio*, na nivou embriona pokazano je da atrazin veoma brzo ulazi u ćelije (Wiegand i sar., 2000). Takođe, atrazin brzo preuzimaju i bakterijske ćelije (Singh i sar., 2008). Iako ne postoji tačno opisan proces ulaska atrazina u ćeliju u literaturi, novija istraživanja pokazala su da atrazin i njegov metabolit DACT mogu kovalentno da reaguju sa proteinima i da formiraju stabilne protein adukte (Dooley et al., 2006; Dooley et al., 2008), da se vezuju za mesta u mitohondrijalnom elektron-transportnom lancu u mišićnim ćelijama i ćelijama jetre pacova, kao i da ispoljava svoje efekte i na nivou neurona (Filipov i sar., 2007; Hossain i Filipov, 2008; Pinchuk i sar., 2007), što sve ukazuje na to da atrazin ulazi u ćeliju gde dalje ostvaruje svoja dejstva. Još uvek nema dostupnih podataka u literaturi koji bi ukazali na ulogu OATPs u transportu ovog herbicida u ćeliju.

ABC- transporteri (eng. ATP-binding cassette) su prvo otkriveni kao transporteri koji imaju važnu ulogu u izbacivanju lekova koji se koriste u hemoterapiji, te su stoga dobili ime i MDR (eng. multidrug resistance) proteini. Do danas, identifikovani su brojni ABC- transporteri, koji kao ATP zavisni proteini ćelijske membrane transportuju kako endogene tako i egzogene supstance i njihove metabolite iz ćelije. MRP1 (ABCC1) proteini su prvi klonirani ksenobiotik-transportujući proteini. MRP1 se ekspresuje u većini normalnih tkiva, a njegova ekspresija pokazana je i u testisima miševa (Cole i Deeley, 2006; Klaasen i Lu, 2008). Ova grupa transportera uključena je u efluks različitih endogenih i egzogenih glutation konjugata, kao što su derivati masnih kiselina, različitih terapeutika i antineoplastika, karcinogena, pesticida, herbicida i drugih jedinjenja. MRP1 uključen je i u transport atrazin-glutation konjugata (Cole i Deeley, 2006).

1.1.1. Uticaj pojedinih EDC na proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama

U literaturi postoji veliki broj podataka o uticaju pojedinih EDC na steroidogenu aktivnost Leydig-ovih ćelija, među kojima su hemikalije za proizvodnju plastike, razni farmaceutski proizvodi, kao i pesticidi.

Ftalati predstavljaju grupu hemikalija koje se široko primenjuju u proizvodnji plastike u cilju povećanja njene fleksibilnosti. Takođe se koriste pri proizvodnji kozmetike, parfema, medicinske opreme i lekova. Nađeni su u hrani kao što je sir, margarin, čips (koji se pakuju u PVC ambalaži), u PVC igračkama za decu, raznim kućnim uređajima. Tu spadaju: dietilheksilftalat (DEHP), monoetilheksilftalat (MEHP), dimetilftalat (DMP), butilbenzilftalat (BBP), dibutilftalat (DBP), dioktilftalat (DOP), diizononilftalat (DINP). Utvrđeno je kako neki od najviše korišćenih ftalata mogu da ispolje negativne posledice na reproduktivni sistem kako kod pacova tako i kod ljudi. Neki od efekata su smanjen anogenitalni razmak, kriptohidizam i hipospadias, smanjen broj spermatozoida, itd. (revijalni rad Hu i sar., 2009). Tačan mehanizam takvih pojava nije poznat, ali se smatra da je posledica smanjene produkcije testosterona za vreme razvoja u majčinoj utrobi. Za DEHP, DBP, DINP i DIBP je utvrđeno da smanjuju nivo fetalnog testosterona od 17 dana trudnoće do 2 dana posle rođenja. Za DBP je utvrđeno da smanjuje ekspresiju pojedinih gena ključnih za steroidogenezu, tačnije gena uključenih u transport holesterola kao što je: SR-B1 (scavenger receptor B, tip 1), StAR (steroidogeni akutni regulatorni protein) i TSPO (translokator protein), kao i na ekspresiju steroidogenih enzima dezmolaze (CYP11A1, označen i kao P450_{scc} - citohrom P450 enzim što cepa bočni lanac holesterola) i 17 α -hidroksilaze/C17-20 liaze (CYP17A1) (Borch i sar., 2006).

Isto tako, Culty i saradnici (2008) pokazali su da *in utero* izlaganje DEHP dovodi kako do kratkotrajnog tako i do dugotrajnog inhibitornog efekata na produkciju testosterona kod pacova. Naime, kada su ženke pacova hranjene različitim dozama DEHP (234 – 1250 mg/kg) od 14 dana trudnoće pa sve do porođaja, dolazi do povećanja apsolutnog volumena Leydig-ovih ćelija u adultnom testisu. Uprkos povećanju volumena Leydig-ovih ćelija, testosteron u serumu adultnih pacova bio je smanjen kod životinja izloženih svim dozama DEHP. Takođe, nakon *in utero* izlaganja DEHP dolazi do dozno-zavisne redukcije bazalne produkcije testosterona u kulturi testisa izolovanih iz fetusa 20. gestacijskog dana. Međutim, rezultati ovih autora pokazali su da kod adultnih životinja dolazi do značajnog povećanja ekspresije gena za CYP11A1, CYP17A1, StAR, i TSPO što ukazuje na to da se smanjena produkcija testosterona posle rođenja ne može objasniti smanjenjem ekspresije steroidogenih enzima kao što je to uočljivo 20. gestacijskog dana kao i da različiti molekularni mehanizmi mogu biti uključeni u delovanje DEHP na nivou fetalnih i adultnih Leydig-ovih ćelija (Culty i sar., 2008).

Tretman mužjaka pacova sa DEHP tokom pubertalnog perioda, uslovio je signifikantno odlaganje prepucijalne separacije pri dozama DEHP od 300 mg/kg i 900 mg/kg. Takođe, težine adrogen-zavisnih organa redukovane su kod životinja tretiranih sa obe doze DEHP. Uočen je i pad nivoa testosterona u serumu kod tretiranih životinja i povećan nivo luteinizirajućeg hormona (LH), što ukazuje na to da je smanjenje testosterona posledica delovanja DEHP na nivou testisa, a ne na nivou hipotalamo-hipofizne osovine. Isto tako, *ex vivo* produkcija testosterona bila je redukovana kako u bazalnim tako i u hCG-stimulisanim uslovima u vreme puberteta (Noriega i sar., 2009).

Za MEHP je takođe pokazano da ispoljava inhibitorni uticaj na steroidogenezu u primarnoj kulturi nezrelih i adultnih Leydig-ovih ćelija pacova. U oba slučaja 250 μ M MEHP inhibira hCG-stimulisanu produkciju testosterona i smanjuje ekspresiju gena za StAR redukujući transport holesterola u mitohondrije. Takođe, MEHP inhibira 5α -reduktaznu aktivnost u kulturi nezrelih Leydig-ovih ćelija, što donekle objašnjava antiandrogeni efekat DEHP i njegovog primarnog metabolita MEHP u *in vivo* uslovima, i ukazuje na veću osetljivost mladih organizama na delovanje DEHP (Svechnikov i sar., 2008).

Kako su organizmi najčešće izloženi smešama različitih supstanci a ne pojedinačnim, čistim jedinjenjima, za smešu od pet ftalatnih estara (BBP, DBP, DEHP, DiBP, i DOP) pokazano je da inhibira fetalnu produkciju testosterona kod pacova u dozno-zavisnom maniru. Ovi rezultati pokazuju da pojedinačni ftalati koji pokazuju sličan mehanizam dejstva mogu imati kumulativan, dozno-aditivan efekat na fetalnu produkciju testosterona i trudnoću kada se apliciraju u vidu smeše (Howdeshell i sar., 2008).

Grupi EDC supstanci pripada i bisfenol A. Bisfenol A predstavlja ksenoestrogen koji se koristi u proizvodnji polikarbonatne plastike koja se primenjuje u izradi ambalaže za hranu i piće, dok se smole napravljene od bisfenola A koriste za premazivanje konzervi u koje se pakuje hrana. U takvoj hrani je nađena određena količina bisfenola A (Akingbemi i sar., 2004).

Pokazano je da se bisfenol A vezuje za estrogene receptor (ER), što je posledica njegove hemijske strukture koja podseća na strukturu estradiola. ER receptori se ekspresuju i u Leydig-ovim ćelijama tako da se njegov efekat može ostvariti i u tim ćelijama. Leydig-ove ćelije kao i Sertolijeve ekspresuju enzim aromatazu, tako da i to može biti jedno od mesta

delovanja ovog ksenoestrogena (Akingbemi i sar., 2004). Kada su mužjaci pacova od 21. dana do 35. dana starosti tretirani bisfenolom A u koncentraciji koja je u skladu sa njegovom koncentracijom u životnoj sredini, pronađeno je da takav tretman značajno snižava nivo testosterona i LH u serumu, dok je nivo iRNK za ER β bio povećan na nivou adenohipofize. Zaključuje se da smanjena sekrecija LH dovodi do inhibicije biosinteze testosterona. Takođe, takav tretman snižava i nivo estradiola zbog inhibicije aktivnosti aromataze u Leydig-ovim ćelijama. Isto tako, tretman Leydig-ovih ćelija sa bisfenolom A u *in vitro* uslovima dovodi do smanjenja ekspresije gena za CYP17A1, što rezultira smanjenom produkcijom testosterona (Akingbemi i sar., 2004).

S druge strane, u kulturi mišijih mLTC-1 Leydig-ovih ćelija, pokazano je da bisfenol A dovodi do indukcije ekspresije gena za StAR, ali ne i ostalih gena uključenih u steroidogenezu (Takamiya i sar., 2007).

Još jednu grupu hemikalija koja u poslednje vreme dobija sve više na značaju sa aspekta EDC supstanci čine i farmaceutski proizvodi i proizvodi za ličnu higijenu (eng. Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs)). PPCPs predstavljaju raznoliku grupu jedinjenja u koje spadaju lekovi koji se koriste u medicini i veterini, dijetetski suplementi, drugi potrošački proizvodi kao što su parfemi, kozmetički proizvodi, proizvodi koji se koriste za pranje i čišćenje u domaćinstvu, kao i svi „inertni“ sastojci koji su deo ovih proizvoda. Ovoj grupi hemikalija pripada i triklosan koji se kao antimikrobna supstanca dodaje u paste za zube, sapune, šampone i ostale kozmetičke proizvode. Postoje različite studije koje ukazuju da je priroda endokrinih poremećaja nastalih pod dejstvom triklosana, kontraverzna, te da efekti mogu ići od estrogenih, slabih androgenih ili do anti-androgenih. Za triklosan je takođe pokazano da se apsorbuje preko gastrointestinalnog trakta i preko kože, kao i da je njegovo prisustvo pokazano u majčinom mleku (Kumar i sar., 2008). Kumar i saradnici (2008) pokazali su anti-androgeni efekat triklosana na nivou Leydig-ovih ćelija. Naime, ova supstanca smanjuje aktivnost adenilil ciklaze, smanjuje sintezu cAMP, što na kraju rezultira smanjenom produkcijom testosterona u *in vitro* uslovima. Ovi autori pokazali su da triklosan indukuje smanjenje ekspresije i aktivnosti steroidogenih enzima, kao i da smanjuje ekspresiju StAR proteina u dozno-zavisnom maniru. Takođe, Kumar i saradnici (2009) pokazali su anti-androgeni efekat triklosana nakon šezdesetodnevno *in vivo* tretmana, pri čemu je pokazano smanjenje ekspresije i aktivnosti steroidogenih enzima, smanjenje ekspresije StAR proteina, smanjenje nivoa LH, folikulostimulirajućeg hormona (FSH),

holesterola, pregnenolona i testosterona u serumu. Takođe, su zabeležene histopatološke malformacije na nivou testisa i aksesornih polnih organa. S druge strane, Zorrilla i saradnici (2009) su ispitivali efekat triklosana na pubertalni razvoj kod pacova. Naime, kada su mužjaci pacova rase Wistar hranjeni sa različitim dozama triklosana od 23 do 53 dana starosti, nije došlo do odlaganja prepucijalne separacije, kao ni promene mase androgen-zavisnih organa. Što se tiče nivoa testosterona samo je pri dozi triklosana od 200 mg/kg došlo do smanjenja nivoa testosterona u serumu, ali to smanjenje po ovim autorima nije dovoljno izraženo na samom početku puberteta, što dalje uslovljava normalan razvoj reproduktivnog trakta kao i sam pubertet.

Parabeni su grupa alkil estara hidroksibenzoeve kiseline u koje spadaju metil-, etil-, propil-, butil-, izobutil-, izopropil- i benzil-paraben. Parabeni se široko koriste kao konzervansi u kozmetici, u proizvodima za ličnu higijenu, hrani i farmaceutskim proizvodima. Ljudi su parabenima izloženi upotrebom kozmetike i sredstava za ličnu higijenu, međutim još uvek u literaturi ne postoji dovoljno podataka koji ukazuju na moguće negativne posledice ovih supstanci. Za parabene je pokazano da pokazuju slabu estrogenu aktivnost, a za neke predstavnike, kao što je butil-paraben pokazano je da smanjuje nivo testosterona, kao i produkciju spermatozoida kod pacova (Taxvig i sar., 2009). Ako se 21 dan stari Wistar pacovi izlažu 8 nedelja butil-parabenu, koji je dodat u hranu, dolazi do dozno-zavisnog smanjenja koncentracije testosterona kao i mase epididimisa. Takođe, opada i broj spermatozoida koji se skaldište u kaudi epididimisa, kao i dnevna produkcija spermatozoida kod tretiranih u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Oishi, 2001).

U grupu PPCPs spadaju i lekovi. Jedan takav primer je i ketokonazol. Ketokonazol je oralno aktivni antifungalni agens širokog spektra koji se koristi u lečenju kožnih i gljivičnih infekcija. Ketokonazol inhibira enzim citohrom P450-zavisnu 14-demetilazu, koja katališe konverziju lanosterola do ergosterola kod kvasaca i gljiva. Pored svoje antifungalne aktivnosti, ketokonazol takođe inhibira nekoliko citohrom P450 enzima kod sisara i na taj način remeti proces steroidogeneze u testisima, nadbubrežnim žlezdama i placenti. Naročito osetljiv na delovanje ketokonazola je CYP17, ključni enzim na putu testikularne steroidogeneze (Scott i sar., 2009).

Dosadašnja istraživanja ukazuju da mnogi pesticidi mogu da remete funkcije reproduktivnog sistema. Pokazano je da jednokratna oralna primena niske doze organohlornog pesticida

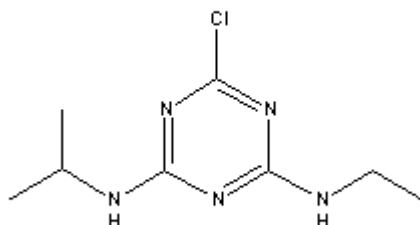
lindana (5 mg/kg/telesne mase) redukuje testikularnu steroidogenezu, smanjujući nivo StAR proteina, kao i aktivnost steroidogenih enzima 3β HSD i 17β HSD, 12 h i 24 h nakon tretmana (Saradha i sar., 2008).

Vinklozolin i iprodion su fungicidi koji se široko koriste na poljoprivrednim područjima i koji pokazuju antiandrogene efekte kod pacova. Kada su mužjaci pacova rase Sprague-Dawley hranjeni sa različitim dozama vinklozolina (0, 10, 30, 60, i 100 mg/kg/dan) samostalno ili u kombinaciji sa iprodionom (50 mg/kg/dan) od 23 do 55-57 dana starosti pokazano je da dolazi do odlaganja prepucijalne separacije, redukcije mase androgen-zavisnih organa i povećanja nivoa testosterona u serumu. Dodatkom iprodiona pojačava se efekat vinklozolina na odlaganje prepucijalne separacije, dok sa druge strane iprodion ima antagonistički efekat na vinklozolin-indukovano povećanje testosterona u serumu pacova (Blystone i sar., 2009).

Još jedan primer pesticida koji remeti reproduktivne funkcije je i atrazin. Atrazin je jedan od često korišćenih pesticida za koga je pokazano da redukuje *in vivo* produkciju testosterona kod juvenilnih pacova (Trentacoste i sar., 2001; Friedmann, 2002), ali će uticaj ovog herbicida na reproduktivne funkcije biti detaljnije opisan u sledećem poglavlju ove doktorske disertacije.

1.2. Atrazin

Atrazin (Slika 1.1.) pripada grupi “triazina”, tačnije hloro-s-triazinskim herbicidima, u koju spadaju i simazin, propazin, terbutilazin i cianazin (Enoch i sar., 2007). Zajednička karakteristika ove grupe pesticida je s-triazinski prsten (U.S. EPA, 2002). Atrazin ($C_8H_{14}ClN_5$) ima molekulsku masu 216, i hemijski naziv *2-hloro-4-etilamino-izopropilamino-s-triazin* (CAS) i *6-hloro-N-etil-N`-izopropil-1,3,5, triazinedil-2-4 diamin* (IUPAC).



Slika 1.1. Strukturna formula atrazina

Atrazin je beli prašak bez mirisa, nije isparljiv, niti reaktivan. Umereno je rastvorljiv u vodi, ali je rastvorljiv u organskim rastvaračima kao što je aceton, hloroform i etil acetat (Gros i Rauschenberger, 2006). Rastvorljivost atrazina u vodi je 30 mg/L na 20°C, u metanolu 18000 mg/L a u hloroformu 52000 mg/L. Može se komercijalno kupiti u obliku granula, praška ili rastvora, ali da bi bio aktivan mora se rastvoriti u vodi. Zbog njegove niske rastvorljivosti u vodi, često mu se dodaju surfaktanti koji povećavaju njegovu solubilnost i olakšavaju njegovo delovanje. Pre upotrebe mora se proceniti efekat surfaktanta na okolinu kao i njegova korisnost kao preferencijalnog izvora ugljenika i energije (Gros i Rauschenberger, 2006).

U zelene delove biljke dospeva preko korenovog sistema, gde zaustavlja proces fotosinteze. Apсорbuju ga sve biljke na tretiranom području, ali se on kod biljaka koje su otporne na ovaj herbicid metaboliše pre nego što ispolji svoj efekat na fotosintezu (Shimabukuro i sar., 1970). U korovskim biljkama, on se vezuje za plastohinon-vezujući protein u fotosistemu II na tilakoidnoj membrani hloroplasta i inhibira transport elektrona (Jursinić i Percy, 1988). Neke korovske biljke su se adaptirale na ovaj herbicid. Otporne biljke mogu razviti različite

mehanizme tolerancije na atrazin, ali su to najčešće mutacije *psbA* gena, koji je odgovoran za ekspresiju D1 proteina u fotosistemu II. Promene u sekvenci D1 proteina uzrokuju promene u konformaciji veznog mesta za atrazin na ovom proteinu, što dovodi do tolerancije na ovaj herbicid. Tolerancija, takođe može biti posledica procesa detoksifikacije. Na primer, kod kineske šećerne trske povećanje aktivnosti glutathion-*S*-transferaze prouzrokuje toleranciju na atrazin (Sulmon i sar., 2004; de Prado i sar., 2000; Cherifi i sar., 2001). Kod atrazin toleratnog kukuruza procesi monooksigenacije atrazina i vezivanja za glutation, dovode do tolerancije (Gros i Rauschenberger, 2006).

Pri upotrebi, deo atrazina ostaje u spoljašnjoj sredini i može da se nađe u zemljištu, vodi i vazduhu. Godišnje se približno 24-30 miliona kilograma atrazina primeni u Sjedinjenim Američkim Državama u poljoprivredne svrhe, na poljima kukuruza, šećerne trske i pšenice, kao i za održavanje travnatih površina, pri čemu je ova količina relativno konstantna tokom prethodnih nekoliko decenija (Barr i sar., 2007). Relativno velike količine atrazina mogu isparavati iz zemljišta u atmosferu, gde se uglavnom nalazi adsorbovan na čestice prašine i na taj način može biti transportovan na velike udaljenosti (U.S. EPA, 2001). Zbog svoje relativne perzistentnost i mobilnosti u životnoj sredini, jedan je od najčešće detektovanih pesticida kako u površinskim tako i u podzemnim vodama (Barr i sar., 2007). Koncentracija atrazina može dostići maksimalne vrednosti od približno 100 µg/L u potocima i rekama poljoprivrednih područja nakon oluje (Murphy i sar., 2006). Međutim, ove maksimalne koncentracije kratko traju, a prosečne koncentracije pri dužem vremenskom periodu retko prelaze 20 µg/L. Povišene koncentracije atrazina se detektuju u proleće i poklapaju se sa periodom razmnožavanja mnogih vrsta vodozemaca koji žive u ribnjacima, vlažnom zemljištu i drugim staništima na koja otiče voda sa poljoprivrednih polja. Zbog toga, vodozemci mogu biti izloženi visokim koncentracijama atrazina tokom perioda ranog razvoja kada je njihov endokrini sistem veoma osetljiv na hemijske stresore (Murphy i sar., 2006). Ljudi su najčešće izloženi dejstvu ovog herbicida preko kontaminirane vode, inhalacijom i apsorpcijom preko kože, i veoma retko preko hrane (U.S. EPA, 2001).

Poluživot atrazina u zemljištu iznosi od nekoliko nedelja do nekoliko meseci. Ostaje dugo prisutan i u površinskim vodama gde vreme polu raspada iznosi više od 200 dana. Polu život atrazina u vazduhu je oko 14 sati. Koncentracija atrazina u spoljašnjoj sredini varira, u zavisnosti od sezone, najveća je u proleće i leto, kada se i upotrebljava ovoj herbicid. Prosečna koncentracija detektovana u vodi iznosi 18.9 ppb, dok je maksimalna koncentracija

u toku sezone apliciranja 61.6 ppb. Koncentracija atrazina u vazduhu takođe varira u zavisnosti od sezone i kreće se od 0.03-0.32 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Prisutnost atrazina u hrani je retka, detektovane koncentracije su vrlo niske i kreću se u rasponu od 0.001 do 0.028 ppm (Toxicological Profile for Atrazine, 2003)

Kao rezultat široke upotrebe, atrazin je jedan od najčešće detektovanih pesticida kako u površinskim, tako i u podzemnim vodama USA (Sass i Colangelo, 2006). Trenutno predstavlja jedan od dva najšire korišćena pesticida u Sjedinjenim Američkim Državama, dok je u periodu između 1985. i 2001. predstavljao najčešće primenjivani pesticid (Barr i sar., 2007). Atrazin se počeo upotrebljavati u Evropi 1958. godine i od tada je bio u širokoj upotrebi za suzbijanje jednogodišnjih travnih i širokolisnih korova na poljima kukuruza, šećerne repe, kao i u zasadima voćaka (Gros i Rauschenberger, 2006). Obzirom da je Evropska Unija propisala uniformne granice od 0.1 ppb za sve pesticide u vodi za piće i podzemnim vodama, zbog nemogućnosti održavanja kontaminacije voda ispod ovog nivoa Evropske regulative zabranjuju upotrebu atrazina od oktobra 2003. godine (Sass i Colangelo, 2006). U našoj zemlji on je takođe u upotrebi, a postoje podaci o prisustvu atrazina u podzemnim vodama na teritoriji Vojvodine (Pucarevic i sar., 2002).

1.2.1. Biološki efekti atrazina

Dejstvo atrazina na organizam pre svega zavisi od vrste kojoj pripada taj organizam, njegovog uzrasta i pola. Najosetljiviji na dejstvo ovog pesticida svakako su mladi organizmi, bili oni u fetalnom, neonatalnom ili postnatalnom periodu. Potomstvo roditelja, koji su bili izloženi atrazinu, takođe može biti afektirano.

Toksične efekte, atrazin ostvaruje prvenstveno na nivou endokrinog i reproduktivnog sistema (revijalni rad Solomon, 2000), ali dokumentovani su i brojni sistemski efekti, kao što su opadanje telesne mase (Trentacoste i sar., 2001; Stoker i sar., 2000), promene na nivou kardiovaskularnog sistema kod pacova (Chan i sar., 2007), štetno dejstvo na DNK srca, jetre i bubrega (Željezić i sar., 2004). Proučavanja efekta tretmana atrazinom tokom pregestacionog, gestacionog i perioda laktacije, pokazala su da ovaj tretman dovodi do post-implantacionih abortusa, smanjenja telesne mase, nepotpune osifikacije, da ima efekat na razvoj nervnog

sistema i da dovodi do poremećaja u razvoju reproduktivnog sistema (Wilhelms i sar., 2006; Rodriguez i sar., 2005; Cummings i sar., 2000).

Atrazin ispoljava nisku akutnu toksičnost kod sisara. Dermalna LD₅₀ (srednja letalna doza koja kod 50% životinja ima letalan efekat) kod zečeva iznosi 7500 mg/kg, a kod pacova je veća od 3000 mg/kg. Oralna LD₅₀ kod pacova ide u rasponu od 1900-3000 mg/kg, dok su vrednosti oralne LD₅₀ kod miševa 1750 mg/kg, a kod zečeva 750 mg/kg. Inhalaciona LD₅₀ kod pacova iznosi 700 mg/m³. Simptomi koji se javljaju kod pacova izloženih letalnoj oralnoj dozi atrazina uključuju početnu ekscitaciju pa potom depresiju disanja, nepostojanje koordinacije motornih funkcija, hronični spazam i hipotermiju. Životinje najčešće umiru nakon 12 h- 24 h. Takođe, dolazi do kardijačne dilatacije, krvarenja na nivou jetre i slezine, plućnih edema, distrofičnih promena na bubrežnim tubulama kao i hemoragije na nivou drugih organa (Gros i Rauschenberger, 2006).

Ispitivanja kancerogenog potencijala atrazina vršeno je u brojnim epidemiološkim studijama. Postoje podaci o uticaju atrazina, ali i kombinacije atrazina i drugih pesticida, na različite tipove kancerogenih promena, najčešće ne-Hoćkin limfoma, kancer dojke, ovarijuma i prostate. Međutim, svega nekoliko epidemioloških studija ukazuje na moguću vezu između izloženosti atrazinu i povećanog rizika od pojave tumora. Mnogo drugih studija nije ovo potvrdilo, tako da za sada nema dovoljno podataka da bi se izveo pouzdan zaključak o uticaju ovog herbicida na pojavu tumora (Triazine Network, 2004). Tako su na primer, regionalna istraživanja populacije žena na području Kentakija pokazala da ne postoji rizik ni za kancer dojke, kao ni za kancer ovarijuma (Hopenhayn-Rich i sar., 2002). *In vitro*, citogenetičke studije na kulturi humanih limfocita, pokazale su da atrazin, kao i simazin i cijanazin nisu genotoksični, te da ne prouzrokuju citogenetička oštećenja (Kligerman i sar., 2000a). *In vivo* studije na nivo mikronukleusa koštane srži kod miševa, su takođe pokazale da atrazin, simazin i cijanazin nisu genotoksični, kao i da nije bilo signifikantnih izmena sestrinskih hromatida i hromozomskih aberacija u kulturi limfocita izolovanih iz slezine tretiranih životinja (Kligerman i sar., 2000b).

Istraživanja na životinjama ukazuju da je pojava kancerogenih promena specifična za vrstu rasu i pol. Pojava tumora mlečnih žlezda uočena je kod pacova soja Sprague-Dawley, ali ne i kod soja Fisher 344. Naime, dugotrajno oralno izlaganje atrazinu (400 ppm, ~ 22.5 mg/kg) ubrzava sazrevanje reproduktivnog sistema kod ove vrste pacova, prouzrokuje hormonski

disbalans na nivou hipotalamo-hipofizne ovarijalne osovine, što rezultira povećanom frekvencom tumora mlečnih žlezda. Takođe, umesto regularnog ovarijalnog ciklusa u ovakvim uslovima dolazi do stalne vaginalne kornifikacije, a pojavljuju se i polifolikularni ovarijumi koji nastavljaju da luče estradiol (Eldridge i sar., 1994, 1999a, 1999b). Ovarijektomisani Sprague-Dawley pacovi koji su dve godine bili izlagani visokim dozama atrazina, nisu razvili ni tumor niti proliferativne lezije na mlečnim žlezdama (Eldridge i sar., 1999b).

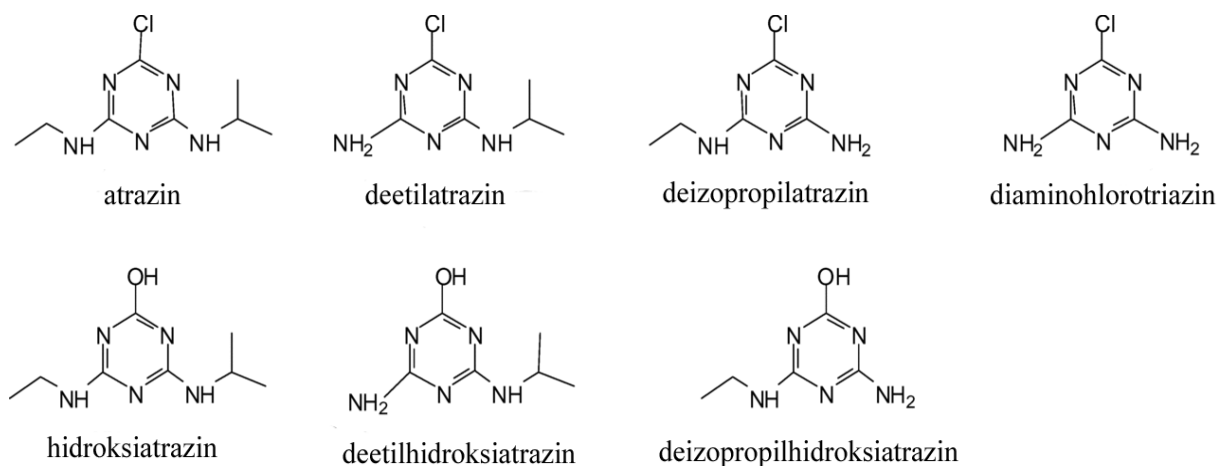
1.2.2. Metabolizam atrazina

Istraživanja sprovedena od strane Agencije za zaštitu životne sredine (Environmental Protection Agency – EPA) ukazuju da osim atrazina, neki produkti njegove degradacije mogu imati biološki efekat. Ova činjenica ukazuje na važnost ispitivanja metabolizma ovog herbicida.

Metabolizam atrazina je prilično kompleksan i rezultuje stvaranjem mnogobrojnih produkata razgradnje. Metabolizam kod riba, ptica, sisara, kao i kod mikroba najčešće podrazumeva *N*-monodealkilaciju i procese hidroksilacije. Najčešći metaboliti atrazina predstavljeni su na slici 1.2. U vodenim sistemima atrazin uglavnom podleže dealkilaciji i formiraju se deetilatriazin (DEA), deizopropilatriazin (DIA) i terminalni produkt dealkilacije diaminohlorotriazin (DACT). U novijim istraživanjima DACT je identifikovan kao primarni metabolit atrazina u plazmi pacova (McMullin i sar., 2003), u urinu i plazmi kod miševa (Ross i Filipov, 2006; Ross i sar., 2008), kao i u urinu kod ljudi (Barr i sar., 2007). Međutim, DACT se ne formira u signifikantnim količinama tokom inkubacije hepatičnih mikrozoama sa atrazinom (Ross i Filipov, 2006) ili u primarnoj kulturi hepatocita pacova (McMullin i sar., 2007). Međutim, poređenjem koncentracija DACT i atrazina sa DEA i DIA u jetri pacova, uočeno je da su prisutne samo umerene koncentracije DEA i DIA, što ukazuje da se ovi metaboliti brzo prevode u DACT u samoj jetri, ili da je DACT već nastao u epitelijalnim ćelijama creva i da se kao takav transportovao do jetre (Ross i sar., 2008). Ross i saradnici (2008) su takođe pokazali da su atrazin i DACT osim u urinu i plazmi kod miševa, pronađeni u visokim koncentracijama u jetri, bubrezima, kao i da je DACT pronađen u visokom nivou u mozgu

24 h nakon jednokratnog oralnog izlaganja miševa atrazinu. Atrazin i DACT detektovani su i u timusu i jetri.

Ranija istraživanja na ljudima identifikovala su atrazin merkapturat (AM) kao primarni metabolit. AM je često dektektovan u urinu farmera koji koriste atrazin, njihovih supruga, a ponekad i u urinu njihove dece, pri čemu se najveća koncentracija detektuje dan nakon primene atrazina. Međutim, nije dovoljno meriti samo ovaj metabolit da bi se tačno odredila kategorija izloženosti. Ukupno je identifikovano ili postulirano 8-12 metabolita atrazina. Drugi hlоро-s-triazini koji se koriste umesto atrazina ili kao njegovi dodaci, kao što su simazin i propazin, metabolišu se na sličan način (za reference pogledati Barr i sar., 2007).



Slika 1.2. Najčešći metaboliti atrazina

Takođe, profil detektovanih metabolita se dramatično razlikuje u zavisnosti od scenarija izloženosti ovom pesticidu. Profesionalna ili akutna izloženost niskim dozama (na primer nakon primene atrazina na travnjacima) podrazumeva da je osoba više izložena direktno atrazinu, a manje produktima njegove degradacije. Međutim, izloženost ovom herbicidu u spoljašnjoj sredini ima drugačije posledice. U ovom slučaju ljudi dolaze u kontakt sa atrazinom putem vode i hrane, što može značiti da produkti dealkilacije i hidrolize predstavljaju njegov najveći udeo. Naime, produkti degradacije atrazina koji zadržavaju hlor imaju biološku aktivnost sličnu samom atrazinu, dok hidroksilovani metaboliti ne zadržavaju biološku aktivnost (Barr i sar., 2007).

Generalno gledano, metaboliti triazinskih herbicida manje su potentni nego parentalne komponente. Dokumentovana je značajna metabolička razlika između sisarskih vrsta, ali je pokazano da je *N*-monodealkilacija i izopropil- ili tercbutil- hidroksilacija praćena sulfoksidacijom, jedan od glavnih puteva metabolizma ovog herbicida. Kod glodara pokazano je različito učešće CYP1A i CYP2B enzima, ali uočena je i uloga CYP2D1 i CYP2E1 enzima. U humanoj populaciji, za CYP1A2 pokazano je da ima glavnu ulogu u hepatičnom metabolizmu atrazina. Naime, pre-indukcija sa 3-metilholantrenom (3-MC) značajno indukuje metabolizam atrazina. Smatra se da kod riba, kod kojih je CYP1A1 glavni hepatični enzim koji se može indukovati sa 3-MC, baš ovaj enzim ima ključnu ulogu u metabolizmu atrazina. Pored toga, studije na nivou ribljih embriona ukazuju na moguću ulogu konjugacije sa glutationom (Van der Berg i sar., 2003).

Buchholz i saradnici (1999) određivali su metabolite atrazina u uzorcima humanog urina nakon dermalnog izlaganja. Merkapturni i dealkilirani metaboliti dominiraju u urinu, dok parentalne komponente nisu detektovane. Za prvu fazu metabolizma *s*-triazinskih derivata najvažniju ulogu ima hepatični CYP1A2 (Lang i sar., 1997), dok je za drugu fazu biotransformacije ovog herbicida pokazana značajna uloga GST kako kod ljudi tako i kod miševa (Abel i sar., 2004).

U jetri pacova, *N*-monodealkilacija i izopropilhidroksilacija hlorotriazina predstavljaju dominantan način biodegradacije (Gojmejac i Kniewald, 1989) katalisane enzimima CYP1A1, CYP2B1 kao i CYP2B2 (Hanioka i sar., 1999).

Metaboliti atrazina su relativno perzistentni u zemljištu/sedimentu, sa prosečnim aerobnim i anaerobnim polu-životom u zemljištu u rasponu od 58-547 dana, dok je polu-život u vodi u aerobnim uslovima 2 puta veći (revijalni rad: Solomon i sar., 2008).

Međutim, atrazin se vrlo brzo eliminiše iz organizma. U organizmu pacova polu-život atrazina je veoma kratak (<1 dan). U plazmi atrazin se može identifikovati već posle 8-10 h nakon izlaganja životinje. Osnovne komponente se iz krvi uklone tokom 8-24 h posle tretmana. Pokazano je da se 93% atrazina izluči putem urina i fecesa u prvih 72 h nakon oralnog apliciranja (Buchholz i sar., 1999; Timchalk i sar., 1990).

1.2.3. Efekti atrazina na endokrini sistem

Potencijalno neželjene posledice dejstva atrazina fokusirane su na reproduktivne funkcije, seksualno sazrevanje i funkciju štitne žlezde. Svoje efekte atrazin ispoljava kako na muški, tako i na ženski reproduktivni sistem.

Najveći broj radova koji se bave ispitivanjem toksičnog efekta oralno unetog atrazina na reproduktivni sistem ženki govori o poremećaju estrusnog ciklusa.

Proučavanjem efekta ovog pesticida na ovarijalne funkcije pacova rase Long-Evans i Sprague-Dawley pokazano je da prolongirano oralno izlaganje atrazinu (21 dan) u dozi od 75 mg/kg telesne mase narušava normalni četvorodnevni estrusni ciklus kod obe rase pacova. Izlaganje većim dozama atrazina prouzrokovalo je produženo trajanje diestrusa kod Long-Evans pacova koji su primali 150 mg/kg atrazina, kao i kod Sprague-Dawley pacova koji su primali 150 mg/kg i 300 mg/kg atrazina. Ove promene praćene su povišenim nivoom progesterona, a smanjenim nivoom estrogena u serumu što ukazuje na uslove pseudotrudnoće (Cooper i sar., 1996). Efekat atrazina na ženski reproduktivni sistem uočen je i kod svinja tretiranih sa niskim dozama ovog herbicida (2 mg/kg, tokom 19 dana estrusnog ciklusa). Tretman je prouzrokovao cistične ovarijalne degeneracije, izostanak narednog estrusnog ciklusa, kao i promene nivoa hormona u serumu, povišen nivo progesterona, a smanjen nivo estradiola (Gojmejac i sar., 1996).

S druge strane, Eldrige i saradnici (1999b) pokazali su da dugotrajno izlaganje atrazinu ubrzava sazrevanje reproduktivnog sistema kod ženki pacova vrste Sprague-Dawley, što dovodi do ranijeg ulaska u estrus i promena na estrogen zavisnim tkivima koje se uočavaju i pri dugotrajnoj izloženosti povišenom nivou estrogena. Ovakav hormonski milje dovodi se i u vezu sa povećanom frekvencom tumora mlečnih žlezda kod ove vrste pacova.

Žene koje žive i rade na farmama, u blizini mesta aplikacije atrazina, mogu biti izložene štetnom dejstvu ovog herbicida. Tako je pokazano da se upotreba atrazina može dovesti u vezu sa produženim ciklusima, izostankom periode i intermenstrualnim krvarenjima kod premenopauzalnih žena (Farr i sar., 2004).

Humana populacija može biti izložena atrazinu preko vode, vazduha, dok se on retko nalazi u hrani. Međutim, pokazano je da se nivo atrazina u gradskoj vodi za piće u Španiji ne može dovesti u vezu sa prevremenim porođajem i niskom težinom novorođenčadi (Villanueva i sar., 2006).

Cooper i saradnici (2000) pokazali su da atrazin ima dramatične efekte na neuroendokrinu kontrolu ovarijalne funkcije kod pacova, kao i da postoje jasne razlike u efektima atrazina u odnosu na vrstu organizama, primenjenu koncentraciju i dužinu izlaganja. Naime, jednokratna primena atrazina u dozi od 300 mg/kg dovodi do smanjenja preovulatornog talasa luteinizirajućeg hormona (LH) i prolaktina kod ovarijektomisanih ženki pacova Long-Evans, ali ne i kod Sprague-Dawley pacova. Oralno apliciranje atrazina tri uzastopna dana blokira estradiolom indukovano oslobađanje LH i prolaktina na dozno zavistan način (50, 100, 200, 300 mg/kg) kod ženki pacova soja Long-Evans, dok je isti tretman bez efekta kod ženki pacova soja Sprague-Dawley. Hronično izlaganje atrazinu u trajanju od 21 dan prouzrokovalo je smanjeno oslobađanje LH i prolaktina, a odgovor je bio srazmeran primenjenoj dozi kod obe vrste ženki pacova. U ovom radu, takođe je pokazano, da je dejstvo atrazina usmereno na hipotalamičnu kontrolu ovih hormona.

U radu McMullin i saradnici (2004) je pokazano da petodnevni tretman ovim herbicidom, kao i tretman diaminohlorotriazinom, osnovnim metabolitom atrazina, blokira estradiol benzoatom/progesteronom-indukovano oslobađanje LH na dozno zavistan način kod ovarijektomisanih ženki Sprague-Dawley pacova. Diaminohlorotriazin, takođe, smanjuje oslobađanje LH iz hipofize kao odgovor na egzogeno primenjen gonadotropni oslobađajući hormon (GnRH) što ukazuje da pored hipotalamične funkcije i funkcija hipofize može biti narušena. Istraživanjem mehanizma dejstva atrazina na hipotalamične funkcije pokazano je da atrazin, ali ne i diaminohlorotriazin, inhibira vezivanje estradiola za estrogene receptore α (ER- α) na dozno zavistan način. Nasuprot tome, *in vivo* studije su pokazale da primena doze atrazina koja supresuje oslobađanje LH, ne menja vezivanje estradiola za ER na nivou hipotalamičnih nukleusa (McMullin i sar., 2004).

Za atrazin i diaminohlorotriazin pokazano je da imaju antiestrogeno dejstvo koje nije posredovano vezivanjem za ER. Naime, ni atrazin ni njegov metabolit ne utiču na bazalnu i 17β -estradiolom indukovanu proliferaciju MCF7-BUS ćelija. Međutim pokazano je da

diaminohlorotriazin inhibira aromataznu aktivnost u ćelijskoj liniji JEG-3 (karcinom humane placente). Takođe je pokazano da atrazin i njegov metabolit indukuju 7-etoksirezorufin-O-deetilaznu aktivnost, te da stimulišu metabolizam estrogena (Oh i sar., 2003). U saglasnosti sa ovim, su i rezultati drugih autora (Connor i sar., 1996) koji su pokazali da atrazin i simazin svoj antiestrogeni/estrogeni efekat ne ostvaruju preko ER. S druge strane, na modelu H295R humanih adrenokortikalnih karcinoma ćelija je pokazano da atrazin indukuje aromataznu aktivnost na dozno-zavisani način i povećava nivo CYP19 iRNK (Fan i sar., 2007a, 2007b; Heneweer i sar., 2004; Sanderson i sar., 2000, 2002, 2003). Pretpostavlja se da mehanizam indukcije aromataze ide preko inhibicije aktivnosti fosfodiesteraze i povećanja cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) (Sanderson i sar., 2000, 2002; Roberge i sar., 2004). Analogni profil indukcije aromataze primećen je i u humanoj ćelijskoj liniji JEG-3 (Sanderson i sar., 2001). Međutim, atrazin nije uticao na indukciju aromataze u MCF-7 ćelijama (ćelijska linija humanog kancera dojke) (Sanderson i sar., 2001), kontinualnoj ćelijskoj liniji RC2 (karcinom Leydig-ovih ćelija) (Heneweer i sar., 2004), kao i u KGN ćelijskoj liniji (tumorske ćelije slične ovarijalnim granulosa ćelijama) (Morinaga i sar., 2004). Fan i saradnici (2007a) su pokazali 54 puta veću ekspresiju SF-1 u atrazin-osetljivim H295R ćelijama, u odnosu na atrazin-nesenzitivnu KGN ćelijsku liniju, kao i indukciju gena za aromatazu preko povećane interakcije SF-1 sa aromataznim promotorom II (ArPII). Isti autori su pokazali da egzogeni SF-1 povećava ekspresiju gena za aromatazu u KGN ćelijskoj liniji.

Ovaj herbicid ima sposobnost da ispoljava estrogenima slične aktivnosti u kancerskim ćelijama (Albanito i sar., 2008). Potencijalan mehanizam ovakvog delovanja mogla bi biti aktivacija GPR30 (G-Protein-coupled-Receptor 30), prvi strukturno okarakterisan estrogeni membranski receptor, koji dalje pozitivno reguliše AC (adenilil ciklazu) i MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) kinaze. GPR30 je ekspresovan u različitim tkivima, u određenim regionima mozga, placenti, jajnicima, testisima, prostati, srčanom mišiću, pankreasu, plućima, skeletnim mišićima, kolonu, vaskularnom epitelu i limfoidnom tkivu. Zbog toga atrazin i njemu slična jedinjenja imaju sposobnost da podražavaju estrogene efekte u raznim tkivima (Thomas i Dong, 2006).

Prenatalno izlaganje atrazinu u koncentraciji od 100 mg/kg telesne mase usporava razvoj mlečne žlezde i odlaže vaginalno otvaranje kod potomstva ženki pacova Long-Evans koje su bile izložene dejstvu ovog pesticida tokom kritičnog perioda trudnoće (Rayner i sar, 2005; Rayner i sar, 2004). Oralno apliciranje atrazina ženka Wistar pacova tokom perioda

laktacije inhibira sisanjem indukovano oslobađanje prolaktina, što rezultira prostatitisom kod potomaka muškog pola (Stoker i sar., 1999). Pokazano je da atrazin pri koncentracijama od 100 mg/kg i 200 mg/kg svoje negativne efekte ispoljava i tokom ranog perioda trudnoće kod različitih sojeva pacova prouzrokujući prekid trudnoće tokom preimplantacionog i postimplantacionog perioda (Narotsky i sar., 2001; Cummings i sar., 2000). Takođe, Rosenberg i saradnici (2008) pokazali su da oralna aplikacija atrazina trudnim ženkama pacova Sprague Dawley ima *in utero* efekte koji se manifestuju na muškom potomstvu u neonatalnom, prepubertalnom kao i u odraslom dobu. Naime, administracija atrazina u dozama od 50-100 mg/kg ostavlja posledice na androgen-zavisne procese kao što je smanjenje anogenitalne distance, odložena prepucijalna separacija, a takođe redukuje nivo intratestikularnog i serumskog testosterona u adultnom dobu (Rosenberg i sar., 2008). Indirektni uticaj atrazina na hipofizno-gonadalnu osovину mladunaca muškog i ženskog pola proučavan je apliciranjem atrazina njihovim majkama za vreme graviditeta ili tokom trudnoće i laktacije. Kod mladunaca oba pola primećeno je sporije sazrevanje ove ose i modifikacija aktivnosti enzima 5 α -reduktaze (Kniewald i sar., 1987).

Pubertet kod sisarskih vrsta je period brzih interaktivnih endokrinoloških i morfoloških promena. Atrazin, kao jedna od supstanci koja remeti funkcije endokrinog sistema, utiče na pubertalni razvoj što je pokazano na modelu laboratorijskih životinja.

Ženke pacova rase Wistar koje su oralno tretirane atrazinom u postnatalnom periodu od 21. do 41. dana, pokazuju signifikantno odlaganje vaginalnog otvaranja pri dozama ovog herbicida od 50 mg/kg, 100 mg/kg i 200 mg/kg. Telesne mase, kao i mase nabubrežne žlezde, bubrega, hipofize, ovarijuma i uterusu redukovane su kod životinja tretiranih sa 200 mg/kg atrazina. Takođe su uočene nepravilnosti u estrusnom ciklusu i produženo trajanje diestrusa kod ženki tretiranih atrazinom u dozama od 100 mg/kg i 200 mg/kg. Promene nivoa tireoidnih i tireostimulirajućeg hormona u serumu nisu uočene, a takođe nije bilo ni histopatoloških ni morfoloških promena na nivou tireoidne žlezde (Laws i sar., 2000).

Slični rezultati pokazani su i u radu Ashby i sar. (2002) gde su ženke pacova rase Wistar i Sprague-Dawley oralno tretirane atrazinom u postnatalnom periodu od 21. do 46. dana starosti. Značajno odlaganje vaginalnog otvaranja pri dozama atrazina od 30 mg/kg i 100 mg/kg uočeno je kod pacova rase Sprague-Dawley, a kod rase Wistar pri dozi od 100 mg/kg.

U radu Trentacoste i saradnici (2001), pokazano je da oralna aplikacija atrazina mužjacima pacova rase Sprague-Dawley u postnatalnom periodu od 22. do 47. dana starosti u dozama od 100 mg/kg i 200 mg/kg značajno smanjuje nivo testosterona u serumu i intersticijalnoj tečnosti. Nivo LH bio je signifikantno smanjen samo pri većoj dozi atrazina. Takođe dolazi do redukcije telesne mase, smanjenja masa semenih vezikula i ventralne prostate. Da bi se utvrdilo da li je promena u nivou testosterona kod ovih životinja u direktnoj vezi sa atrazinom ili smanjenom telesnom masom, jednoj grupi životinja je smanjen unos hrane, tj. sveden na količinu koju su uzimali pacovi tretirani atrazinom. Uočen je pad serumskog testosterona, smanjenje telesne mase i mase androgen-zavisnih tkiva, kao i nizak nivo LH u serumu kod životinja kojima je bio ograničen unos hrane, tako da su ovi autori postavili pitanje da li su negativni efekti rezultat dejstva atrazina ili smanjenja telesne mase (Trentacoste i sar., 2001).

S druge strane, rezultati Friedmann (2002) su pokazali da i akutni, u trajanju od 3 dana, i prolongirani tretman atrazinom, u trajanju od 27 dana, u koncentraciji od 50 mg/kg dovodi do signifikantnog pada nivoa testosterona u serumu i intersticijalnoj tečnosti.

Tretman mužjaka pacova rase Wistar sa atrazinom u postnatalnom periodu od 23. do 53. dana, uslovio je signifikantno odlaganje prepucijalne separacije pri dozama ovog herbicida od 12.5-200 mg/kg. Telesne mase, kao i mase ventralne prostate redukovane su kod životinja tretiranih sa 50 mg/kg i 200 mg/kg atrazina. Takođe je uočen pad intratestikularnog nivoa testosterona 45. dana života, dok kod životinja starih 53 dana taj pad nije bio statistički značajan u poređenju sa kontrolnom grupom. Nivo estradiola i estrona u serumu ukazivao je na dozno-zavisno povećanje, statistički značajno samo kod pacova tretiranih sa najvećom koncentracijom atrazina. Promene nivoa tireostimulirajućeg hormona i tiroksina u serumu nisu uočene, dok je nivo trijodtironina bio značajno veći kod životinja tretiranih sa najvećom dozom ovog herbicida (Stoker i sar., 2000). Stoker i saradnici (2002) pokazali su da i metaboliti atrazina (deetilatriazin, deizopropilatriazin i diaminohlorotriazin) imaju vrlo sličan efekat na pubertalni razvoj mužjaka pacova rase Wistar.

Adultni pacovi rase Fisher 344 tretirani intraperitonealno sa 60 mg/kg i 120 mg/kg atrazina 2 puta nedeljno tokom 60 dana, pokazali su značajan pad telesne mase u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Rezultati ukazuju i na signifikantan pad mase adenohipofize i ventralne prostate kod tretiranih životinja u poređenju sa kontrolom, bez promene u masi testisa i epididimisa (Kniewald i sar., 2000). Tretman mužjaka i ženki pacova rase Fisher 344

sa atrazinom u koncentraciji 120 mg/kg izazvao je značajan pad telesne mase kod oba pola. Signifikantno povećanje relativne mase hipofize i prostate uočeno je kod tretiranih mužjaka, dok se kod ženki narušava normalni estrusni ciklus, i javlja se produžena faza diestrusa (Simić i sar., 1994).

U radu Kniewald i saradnici (2000) je takođe pokazano da tretman mužjaka pacova starih 90 dana sa 60 mg/kg i 120 mg/kg atrazina dva puta nedeljno u trajanju od 60 dana, prouzrokuje povećan broj spermatozoida na nivou testisa, dok se smanjen broj i pokretljivost spermatozoida uočava u epididimisu. Vrednosti su izražene kao broj spermatozoida na 500 Sertolijevih ćelija. Primećeno je da se ovaj odnos tokom tretmana atrazinom povećava, dok kod kontrolne grupe životinja opada kao rezultat normalne migracije spermatozoida iz testisa u epididimis. Povećan broj spermatozoida u testisu kod životinja tretiranih atrazinom posledica je neregularne migracije spermatozoida u epididimis usled morfoloških i strukturnih promena na testikularnom tkivu.

Histološka analiza testikularnog tkiva životinja tretiranih atrazinom u dozi od 60 mg/kg i 120 mg/kg, 60 dana, pokazala je da dolazi do vakuolizacije testikularnih ćelija, promene oblika, kao do i dezorganizacije ćelija i formiranja klastera sa spermatocitima. Leydig-ove ćelije, primarne u produkciji muških polnih hormona, zauzimaju iregularan oblik, dolazi do promena na glatkom endoplazmatskom retikulumu, citoplazma biva ispunjena vakuolama i lizozomima. Sertolijeve ćelije takođe pokazuju degenerativne promene, što utiče na sazrevanje i pokretljivost spermatozoida (Kniewald i sar., 2000).

Ovaj herbicid deluje i na metabolizam testosterona kod pacova. Naime, atrazin primenjen *in vivo* i *in vitro* uzrokuje smanjenje aktivnosti 5α -reduktaze, enzima koji je odgovoran za prevođenje testosterona u njegov aktivni metabolit 5α -dihidrotestosteron na nivou adenohipofize, hipotalamusa i prostate (Kniewald i sar., 1995; Kniewald i sar., 1979; Babić-Gojmejac i sar., 1989). Evidentirano je i da atrazin smanjuje vezivanje 5α -dihidrotestosterona za androgeni receptor, što ostavlja negativne posledice na sva androgen zavisna tkiva (Kniewald i sar., 1995; Kniewald i sar., 1980). Atrazin, takođe redukuje vezivanje 5α -dihidrotestosterona za androgen vezujući protein (ABP) (Danzo, 1997).

Negativni efekti na nivou reproduktivnih funkcija uočeni su kod mužjaka japanske prepelice (*Coturnix coturnix Japonica*) (Wilhelms i sar., 2005).

Atrazin pri veoma niskim koncentracijama može prouzrokovati hermafroditizam i feminizaciju kod vodozemaca u larvalnom periodu (Hayes i sar., 2002, 2003). Kako je pokazano da atrazin indukuje aromatazu u H295R ćelijama (Sanderson i sar., 2000, 2002), i u GST-TS ćelijama (imortalizovana ćelijska linija dobijena iz testisa morske kornjače) (Keller i McClellan-Green, 2004) moguće je da up-regulacija ovog enzima u testisu rezultira povećanom produkcijom estradiola, i efektima demaskulinizacije. Međutim, Hecker i saradnici (2005) su pokazali su da izlaganje adultnih mužjaka žaba (*Xenopus laevis*) atrazinu (1,25 i 250 µg atrazina/l) 36 dana ne menja aktivnost aromataze, kao ni nivo iRNK za ovaj enzim, iako je tretman sa najvećom koncentracijom atrazina rezultirao padom nivoa testosterona u plazmi u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Hecker i sar., 2005). Coady i saradnici (2005) su takođe pokazali da atrazin u koncentracijama između 0,1 µg /l i 25 µg /l ne utiče na mortalitet, rast, razvoj gonada, kao i aktivnost aromataze kod juvenilnih vodozemaca (*Xenopus laevis*).

Atrazin se takođe dovodi u vezu sa sa različitim poremećajima endokrinog sistema koji su pokazani kod američkog aligatora (*Alligator mississippiensis*) na Floridi, na područjima koja su kontaminirana brojnim pesticidima uključujući atrazin, DDT, dikofol i vinklozolin. Mužjaci i ženke aligatora iz kontaminiranog jezera Apopka imaju povišen odnos estradiola i testosterona u plazmi u poređenju sa kontrolnom grupom životinja iz jezera Woodruff, što ukazuje na poremećaj u aktivnosti aromataze. Takođe, ženke aligatora sa kontaminiranog područja imaju abnormalnu morfologiju ovarijuma, kao i povećan broj folikula sa više oocita (poliovularni folikuli) i polinuklearnih oocita. Mužjaci sa ovog područja pokazuju promene u organizaciji testisa i izraženo smanjene spoljašnjih genitalija (za reference videti revijalni rad Sanderson, 2006).

In vitro studije na adrenokortikalnim ćelijama pastrmke pokazale su da atrazin inhibira ACTH stimulanu sekreciju kortizola i da na taj način remeti produkciju hormona nadbubrežne žlezde (Bisson i Hontela, 2002).

Atrazin, osim što remeti funkcije endokrinog sistema, može biti odgovoran za opadanje broja spermatozoida i druge patološke promene muškog reproduktivnog sistema i u humanoj populaciji, što je naročito izraženo na poljoprivrednim područjima, gde se često upotrebljava ovaj, ali i drugi pesticidi (Swan, 2006; Swan i sar., 2003).

1.3. Testikularna steroidogeneza

Testis ima dve funkcije, produkcija androgena i spermatogeneza. Biosinteza androgena primarno se odvija u Leydig-ovim ćelijama intersticijalnog tkiva testisa. Najpotentniji prirodni androgeni su testosteron i 5α -dihidrotestosteron (5α -DHT), ali grupa androgena obuhvata i neke manje potentne kao što su androstendion i dehidroepiandrosteron (DHEA). Proces testikularne steroidogeneze regulisan je pre svega luteinizirajućim hormonom adenohipofize, ali i različitim endokrinim, intratestikularnim parakrinim, autokrinim i intrakrinim faktorima (Huhtaniemi i Toppari, 1995).

Produkcija androgena neophodna je za normalno odvijanje procesa spermatogeneze (revijalni rad O'Donnell i sar., 2001), za održavanje sekundarnih seksualnih karakteristika, funkcionisanje androgen-zavisnih tkiva, promovisanje anaboličkih efekata i regulaciju sekrecije gonadotropina (revijalni rad Hackney, 1996). Steroidi sa androgenom aktivnošću kao što su DHEA i njegov metabolit DHEA-sulfat, kao i androstendion, produkuju se i u *zoni retikularis* adrenalne žlezde (Friedrich, 2001). Određene količine manje potentnih androgena produkuju i ovarijumi, placentarno i fetalno tkivo (revijalni rad Gower i Cooke, 1983). Signifikantne količine androstendiona i testosterona identifikovane su i u koži (Toth i sar., 1997). Takođe je pokazano da se steroidogeni enzimi ekspresuju u mozgu (Stromstedt i Waterman, 1995). U mozgu su u većoj količini pronađeni DHEA i DHEA-sulfat, gde deluju kao parakrini faktori i utiču na seksualno ponašanje, pamćenje, spavanje, a regulišu i sinaptičke funkcije (Ukena i sar., 1999; Zwain i Yen, 1999; Garcia-Ovejero i sar., 2005).

Putevi biosinteze androgena, ali i svih drugih steroida počinju sa holesterolom. Holesterol može biti mobilizovan iz intracelularnih rezervi, ekstracelularnih izvora kao što su lipoproteini, ili dobijen putem *de novo* sinteze od acetata (revijalni rad Hales, 2002). Prvi korak na ovom putu je konverzija holesterola u pregnenolon i izokaproaldehid. Odvija se na unutrašnjoj membrani mitohondrija, uz učešće enzima CYP11A1, i predstavlja reakciju koja limitira proces steroidogeneze. Holesterol predstavlja jedinjenje slabo rastvorljivo u citosolu, pa je za njegov transport potreban odgovarajući proteinski nosač. Pretpostavlja se da je za regulaciju intracelularnog transfera holesterola do mitohondrija potreban protein nosač sterola 2 (SCP – sterol carrier protein 2), molekulske mase 13kDa, pronađen u jetri i u svim

steroidogenim tkivima. Jedan od kandidata za regulatorne proteine je i polipeptid–aktivator steroidogeneze (SAP – steroidogenesis activator polypeptide), molekulske mase 3kDa, prisutan samo u steroidogenim tkivima (Stocco i Clark, 1996; Clark i sar., 1997; Thomson, 1998).

Sve je jasnije da je konstantna dostupnost holesterola neophodna da bi se započela i održala steroidogeneza. Postoje tri potencijalna izvora holesterola. Holesterol može *de novo* da se sintetiše na endoplazmatskom retikulumu, ili da se koristi već formirani holesterol koji dolazi do ćelija u obliku lipoproteina. Steroidogene ćelije mogu da dobijaju holesterol od lipoproteina male gustine (LDL), kao i od lipoproteina velike gustine (HDL). Ćelija se holesterolom može snabdevati i hidrolizom magacioniranih citoplazmatičnih holesteril-estar lipidnih kapljica, a neke kulture ćelija ga mogu dobiti i od plazma membrane. Mnoge studije su pokazale da su glavni izvor holesterola za steroidogenezu u nadbubrežnim žlezdama, ovarijumu i testikularnim Leydig-ovim ćelijama, upravo lipoproteini plazme. Endogena sinteza holesterola preovlađuje kada je prekinuta dostupnost holesterola iz krvi. Intracelularni holesteril estri (CE) se smatraju kratkotrajnim skladištima supstrata, tako da steroidogene ćelije mogu brzo da odgovore na stimulaciju odgovarajućim hormonima. Holesteril estri sadržani u lipoproteinima, mogu biti dostavljeni endocitozom preko receptora, gde se LDL (LDL sa apolipoproteinom-B ili apolipoproteinom-E) vezuje za LDL(B/E) receptor, koji je lokalizovan u klatrinom-obloženim jamicama na površini ćelije. Ipak, veliki deo CE poreklom iz lipoproteina dobija se preko specijalnog puta koji je poznat i kao put selektivnog unosa holesteril estara (eng. selective cholesteryl ester uptake pathway). Hormonima stimulisane steroidogene ćelije se u velikoj meri oslanjaju na ovaj put kako bi zadovoljile svoje potrebe za holesterolom. U ovom putu selektivnog unosa, bitnu ulogu ima membranski protein označen kao SR-B1 (eng. scavenger receptor B, type 1) koji funkcioniše kao HDL receptor i inicira ekstracelularnu fazu selektivnog unosa CE (Azhar i Reaven, 2002, 2007).

Primarna funkcija SR-B1 je da olakša ulazak holesterola u steroidogena tkiva. Osim ekspresije u steroidogenim ćelijama, on se ekspresuje i u drugim ćelijama kao što su: adipociti, makrofagi, ćelije pluća, endotelijalne ćelije, keratinociti, glatka mišićna vlakna i epitelijalne ćelije (Azhar i Reaven, 2002).

Ranijih godina pretpostavljalo se da je jedini limitirajući korak u steroidogenezi aktivnost CYP11A1, kao i adekvatno prisustvo supstrata holesterola. Međutim, kasnije je postalo jasno da je osim aktivnosti ovog enzima, limitirajući korak u biosintezi steroida i transport holesterola sa spoljašnje na unutrašnju membranu mitohondrija do CYP11A1 sistema. Naime, spoljašnja mitohondrijalna membrana ne predstavlja prepreku za prolaz holesterola, međutim prostor između spoljašnje i unutrašnje mitohondrijalne membrane omogućava prolaz samo hidrosolubilnim molekulima te tako formira efektivnu barijeru za lipofilne komponente kao što je holesterol. Upravo je ovde evidentna uloga StAR proteina (engl. Steroidogenic Acute Regulatory proteine), koji vrši translokaciju holesterola do unutrašnje membrane mitohondrija i CYP11A1 (revijalni rad Stocco, 1998; Stocco, 2001). Brojni radovi ukazuju na značaj StAR proteina (revijalni rad Stocco i sar., 2005; Stocco i Clark, 1996, 1997; Reyland i sar., 2000; revijalni rad Christenson i Strauss III, 2001; Schwarzenbach i sar., 2003; Houk i sar., 2004; Clem i sar., 2005). U intramitohondrijalni transport holesterola do CYP11A1 uključen je još jedan protein, koji skreće pažnju istraživača: translokator protein (TSPO) odnosno po staroj nomenklaturi periferni benzodiazepinski receptor (PBR) (Papadopoulos i sar., 2007; revijalni rad Papadopoulos i Brown, 1995; Stocco i Clark, 1996; Boujrad i sar., 2000; revijalni rad Casellas i sar., 2002; Gazouli i sar., 2002). Pokazano je da su StAR i TSPO blisko asocirani u mitohondrijalnoj membrani, da funkcionišu kordinirano i da mogu interagovati u transportu holesterola (Papadopoulos i sar., 2007; Huet i sar., 2005).

Transport holesterola iz intracelularnih depoa u mitohondrije je limitirajući, i hormon senzitivni korak u stimulaciji steroidogeneze. Leydig-ove ćelije proizvode androgene pod kontrolom LH ili humanog horionskog gonadotropina (hCG), ali takođe i kao odgovor na brojne intracelularne faktore. LH/hCG receptor pripada G_s -vezanim receptorima sa sedam transmembranskih domena, čija aktivacija dovodi do stimulacije adenilil ciklaze i do povećanja koncentracije intracelularnog cAMP a zatim i do prateće aktivacije cAMP-zavisne protein kinaze A (PKA) (Stocco i sar., 2005; Papadopoulos i sar., 2007).

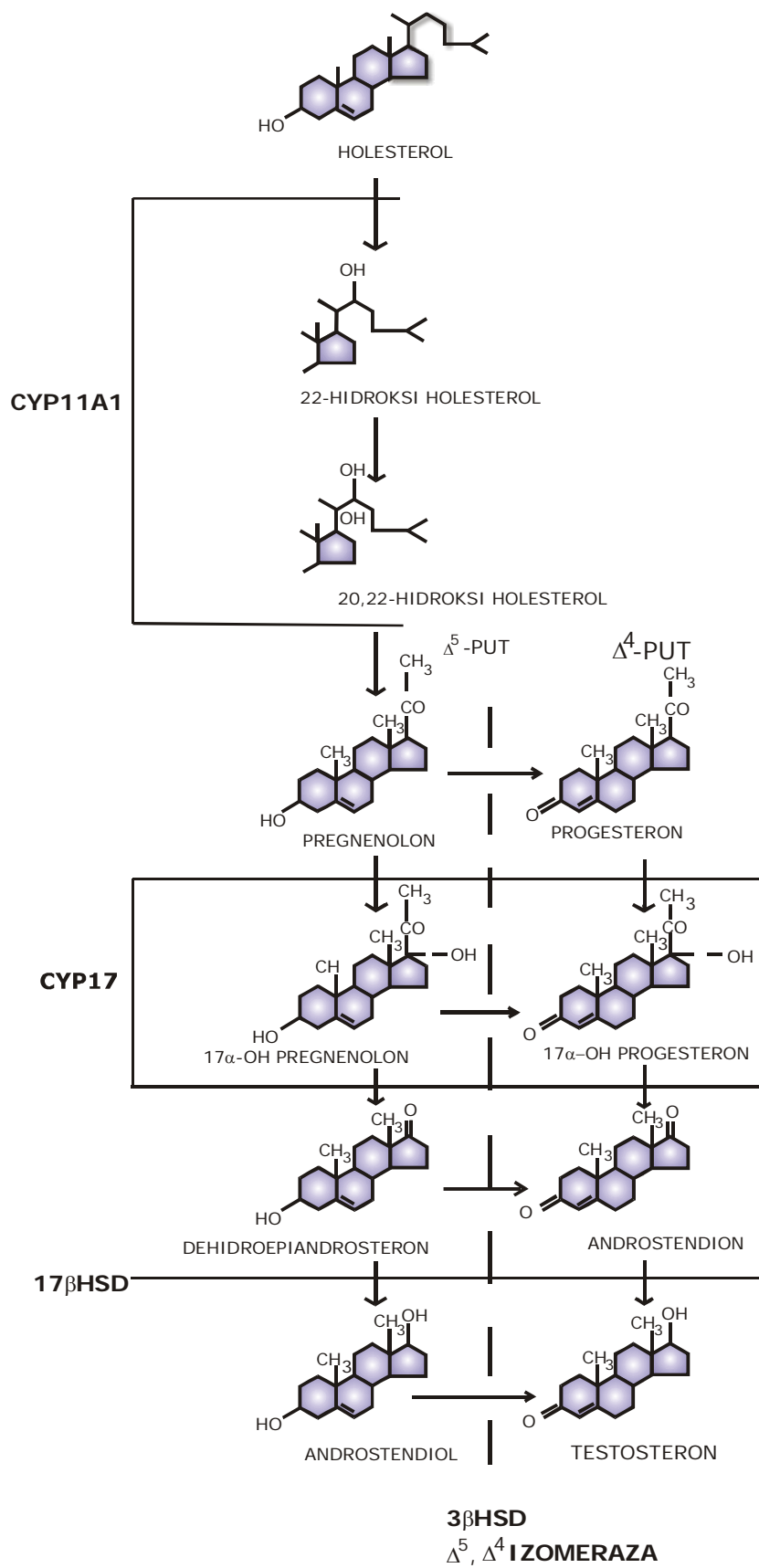
PKA dovodi do fosforilacije brojnih proteina, uključujući i StAR protein. Ova kinaza odgovorna je i za fosforilaciju transkripcionih faktora uključenih u regulaciju transkripcije gena za ovaj protein.

Holesterol transportovan do mitohondrija konvertuje se do pregnenolona delovanjem enzima CYP11A1. Nastali pregnenolon transportuje se u citoplazmu, do glatkog endoplazmatskog retikuluma, gde se steroidogeneza može odvijati kroz dva alternativna puta: $\Delta 4$ (4-en-3-okso-put) i $\Delta 5$ (5-en-3 β -hidroksi put) putem. $\Delta 5$ put podrazumeva korišćenje pregnenolona kao supstrata, prvo od strane enzima CYP17 što rezultira sintezom 17-hidroksipregnenolona, a zatim i dehidroepiandrosterona (Sl. 1.3.). Dehidroepiandrosteron se katalitičkom aktivnošću 3 β HSD prevodi u androstendion. Međutim, ako se pregnenolon prvo konvertuje aktivnošću 3 β HSD u progesteron, a potom aktivnošću CYP17 progesteron prelazi u 17-hidroksiprogesteron, pa u androstendion, takav put nosi naziv $\Delta 4$ put. Androstendion se potom konvertuje u testosteron delovanjem 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaze (17 β HSD) (Sl. 1.3.).

Dominantnost jednog odnosno drugog puta zavisi od kompeticije između CYP17 i 3 β HSD za pregnenolon, kao i relativne efikasnosti hidrosilazne i liazne aktivnosti $\Delta 4$ i $\Delta 5$ puta (revijalni rad Conlley i Bird, 1997). Dominacija jednog ili drugog puta zavisi od životinjske vrste. $\Delta 4$ put prvi put je otkriven i dominantan je u testisima pacova. Kod miša $\Delta 4$ put dominira pre puberteta, ali kod adultnih organizama pored $\Delta 4$ puta i $\Delta 5$ put značajno doprinosi produkciji testosterona (revijalni rad Scott i sar., 2009). $\Delta 5$ put dominantan je u humanim testisima i testisima viših primata (Fluck i sar., 2003).

Testosteron se u Leydig-ovim ćelijama može dalje metabolisati pomoću 5 α -reduktaze do dihidrotestosterona. Ova dva hormona su esencijalna za mušku seksualnu diferencijaciju, ekspresiju muških sekundarnih seksualnih karakteristika i održavanje spermatogeneze.

Androgeni predstavljaju neposredne prekursore za estrogene pa je ceo biosintetički put do formiranja androgena potpuno identičan i za estrogene, uz dodatak krajnje reakcije aromatizacije alifatičnog A prstena u aromatični. Reakciju katalizuje enzim aromataza (P450arom, CYP19A1) koja predstavlja kompleks proteina lokalizovan na membrani glatkog endoplazmatskog retikuluma. U testisima je aromatazna aktivnost registrovana u Leydig-ovim, Sertolijevim i germinativnim ćelijama. Učešće pojedinih ćelija u aromatizaciji androgena varira u zavisnosti od vrste i polne zrelosti (revijalni rad Payne i Hales, 2004).



Slika 1.3. Šema biosinteze androgena u Leydig-ovim ćelijama

1.3.1. Steroidogeni enzimi

Enzimi uključeni u biosintezu androgena mogu se svrstati u dve velike familije: citohrom P450 hem-proteini i hidroksteroid dehidrogenaze (revijalni rad Hanukoglu, 1992).

Citohrom P450 enzimi u odgovarajućoj nomenklaturi označeni su kao CYP, praćeni arapskim brojem koji označava priradnost familiji, slovom koje označava podfamiliju i arapskim brojem koji označava individualni protein, npr. CYP11A1 (revijalni rad Nelson i sar., 1993, 1996). CYP enzimi koji su uključeni u biosintezu androgena, ali i ostalih steroidnih hormona su membranski vezani proteini asocirani sa membranama mitohondrija, kao što je CYP11A1, ili membranama endoplazmatskog retikuluma (mikrozomalni), kao što je CYP17. Tokom biosinteze steroidnih hormona katališu reakcije hidroksilacije i cepanja steroidnih supstrata. Funkcionišu kao monooksigenaze koristeći nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) kao donor elektrona za redukciju molekuskog kiseonika. Jedan atom kiseonika se putem ovog sistema introdukuje u supstrat, kao hidroksilna grupa, dok se drugi atom kiseonika redukuje do vode. Elektroni se od NADPH transportuju do supstrata preko dva različita transferna sistema. Mitohondrijalni transfer se odvija preko adrenodoksin reduktaze (feredoksin reduktaze) i adrenodoksina (feredoksina) koji pripada familiji hem-tiolat proteina sa nehemskim gvožđem. Mikrozomalni elektronski transfer uključuje samo jedan protein, citohrom P450 oksidoreduktazu, protein koji sadrži dva flavina. Elektroni se transportuju od NADPH do flavinadenin dinukleotida, što je praćeno sekvencijalnim transferom do flavinmononukleotida, P450 enzima i supstrata (revijalni rad Halkier, 1996; revijalni rad Payne i Hales, 2004).

Hidroksteroid dehidrogenaze, 3β HSD i 17β HSD, pripadaju istoj filogenetskoj familiji proteina poznatoj kao superfamilija kratkih lanaca alkohol dehidrogenaza reduktaza. Uključene su u redukcije i oksidacije steroidnih hormona. Za svoju aktivnost zahtevaju $NAD^+/NADP^+$ kao akceptore elektrona i njihove redukovane forme kao donore redukujućih ekvivalenata. Jedna od osnovnih razlika između P450 enzima i hidroksteroid dehidrogenaza je u tome što je svaki od P450 enzima produkt jednog gena, dok postoji nekoliko izoformi 3β HSD, kao i 17β HSD, koji su produkti različitih gena. Broj izoformi varira kod različitih vrsta, razlikuju se u tkivnoj distribuciji, katalitičkoj aktivnosti, specifičnosti prema

supstratima i kofaktorima, kao i u subcelularnij lokalizaciji (revijalni rad Payne i Hales, 2004).

CYP11A1 (EC1.14.15.67.) je enzim molekulske mase 56 kDa, čiji su sinonimi P450_{scc} (enzim koji cepa bočni lanac holesterola), holesterol dezmolaza, holesterol 20-22 dezmolaza. CYP11A1 produkt je jednog gena. cDNK klon prvi put je izolovan 1984. iz goveđeg adrenalnog korteksa (Moragashi i sar., 1984). Gen je dužine 20 kilo baza, dok se peptid sastoji od 521 aminokiseline. Aminokiselinska sekvenca proteina pokazuje visok stepen homologije između vrsta (71%) (Moragashi i sar., 1987). Hem vezujući region zajednički je svim P450 enzimima i lociran je na C-terminalnom kraju. Specifični region od ~ 20 aminokiselina lociran je na N-terminalnom kraju i predstavlja specifično supstrat vezujuće mesto. Istraživanja na prečišćenim i rekombinantnim proteinima pokazala su da jedan protein katališe sve tri reakcije, na jednom aktivnom centru (revijalni rad Payne i Hales, 2004).

Lokalizacija i ekspresija ovog enzima pokazana je u Leydig-ovim ćelijama testisa (Payne i Youngblood, 1995; Weng i sar., 2005), u adrenalnom korteksu (Ishimura i Fujita, 1997), placenti (Arensburg i sar., 1999), bubregu (Dalla Valle i sar., 2004), ovarijumu (Bao i Garverick, 1998), kao i centralnom i perifernom nervnom sistemu (Compagnone i sar., 1995).

CYP11A1 katališe prvi i u biosintezi svih steroidnih hormona prisutan korak, konverziju holesterola do pregnenolona. Reakcija se odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija, u tri sukcesivna koraka, zahteva tri molekula kiseonika i tri molekula NADPH (Huang i Miller, 2001; revijalni rad Miller, 1995). Prvo dolazi do hidroksilacije holesterola u položaju C22, potom sledi hidroksilacija na poziciji C20. Nastaje 20,22R-hidroksi-holesterol, koji se cepa između C22 i C20, formirajući C21 steroid pregnenolon i izokaproaldehid. Pregnenolon se transportuje u citoplazmu, do glatkog endoplazmatskog retikuluma, gde se dalje nastavlja proces steroidogeneze.

3 β HSD (EC 1.1.1.51. i EC 5.3.3.1.) je protein molekulske mase 42kDa čiji su sinonimi 3 β HSD/ Δ 5- Δ 4 izomeraza, 3 β -hidroksi- Δ 5-steroid dehidrogenaza i 3 β -hidroksi-5-en steroid dehidrogenaza. Pokazano je da postoje različite izoforme ovog enzima koje se ekspresuju u različitim tkivima, kako steroidogenim (Suzuki i sar., 2000; Pelletier i sar., 2001; Weng i sar., 2005) tako i nesteroidogenim (Abd-Elaziz i sar., 2005; Provost i Tremblay, 2005), kod ljudi

(Rheume i sar., 1991), pacova (Simard i sar., 1991; Simard i sar., 1993) i miša (Clarke i sar., 1993; Abbaszade i sar., 1995; Abbaszade i sar., 1997). Veliki broj izoformi pokazuje visok stepen homologije u aminokiselinskim sekvencama, ali se mogu svrstati u dve različite funkcionalne grupe. Jednoj grupi pripadaju izoenzimi koji funkcionišu kao klasične dehidrogenaze/izomeraze koje učestvuju u biosintezi aktivnih steroidnih hormona. U drugu grupu se mogu svrstati one koje imaju aktivnost 3-ketosteroid reduktaze i učestvuju u inaktivaciji steroidnih hormona (Abbaszade i sar., 1995).

Kod miševa je identifikovano šest izoformi 3 β HSD, od kojih se 3 β HSD I ekspresuje u testisima, ovarijumu i nadbubrežnoj žlezdi, 3 β HSD VI se ekspresuje u placenti, koži i testisu. Obe izoforme uključene su u biosintezu steroidnih hormona (Baker i sar., 1999). 3 β HSD tip II i tip III dominantne su u jetri, a identifikovane su i u placenti (Peng i sar., 2002), dok je 3 β HSD tip IV karakteristična za bubrege (Payne i sar., 1997). Za 3 β HSD I i 3 β HSD VI je pokazano da mogu ispoljiti aktivnost sličnu 17 β HSD (Mason i sar., 2004).

Kod ljudi identifikovane su dve različite izoforme 3 β HSD I i 3 β HSD II, kodirane su sa dva različita gena ali obe funkcionišu kao dehidrogenaze/izomeraze. 3 β -HSD I pronađena je u placenti i perifernim tkivima, dok je 3 β HSD II karakteristična za gonade i adrenalnu žlezdu (Thomas i sar., 2002, 2003; Rheume i sar., 1991). Takođe je pokazano da 3 β HSD I preferira DHEA kao supstrat u odnosu na 3 β HSD I I (Thomas i sar., 2004).

Četiri forme 3 β HSD pronađene su kod pacova: tip I i tip II u gonadama, nadbubrežnim žlezdama, bubregu i masnom tkivu (Simard i sar., 1991, 1993), tip III specifičan je za jetru mužjaka (Zhao i sar., 1990), dok je tip IV specifičan za placentu i kožu (Simard i sar., 1993).

3 β HSD predstavljaju membranski vezane forme, pronađene na mitohondrijalnim i mikrozomalnim membranama, kao i u intermembranskom prostoru (Cherradi i sar., 1997; Pelletier i sar., 2001). Ovaj enzim katalizuje konverziju Δ 5-3 β -hidroksisteroida, pregnenolona, 17 α -hidroksipregnenolona i DHEA u Δ 4-3-ketosteroide, progesteron, 17 α -hidroksiprogesteron i androstendion. Aktivnost ovog enzima neophodna je za produkciju androgena u testisu, progestina i estrogena u ovarijumu i kortikosteroida u nadbubrežnoj žlezdi. U konverziju Δ 5-3 β -hidroksisteroida u Δ 4-3-ketosteroide uključene su dve sekvencijalne reakcije. Prva reakcija je dehidrogenacija 3 β -hidroksi grupe, za koju je

neophodan koenzim NAD^+ i pri kojoj nastaje Δ^5 -3-keto intermedijer i redukovani NADH. Redukovani koenzim (NADPH) potom aktivira izomerizaciju Δ^5 -3-ketosteroida i nastaje Δ^4 -3-ketosteroid. Ova reakcija katalizovana je jednim dimernim proteinom bez otpuštanja intermedijera ili koenzima (Thomas i sar., 2003).

CYP17 (EC 1.14.99.9) je enzim molekulske mase 57kDa, lokalizovan na membrani endoplazmatskog retikuluma, čiji su sinonimi P450c17, 17α -hidroksilaza/17-20 liaza i P450 17α -hidroksilaza/c17-20 liaza. CYP17 je jedan enzim koji katališe dve različite aktivnosti: 17α -hidroksilaciju C21 steroida, pregnenolona (Δ^5 put) ili progesterona (Δ^4 put), što je praćeno 17,20 liaznom aktivnošću i cepanjem C17-20 veze. Tada nastaju C19 steroidi, 17α -hidroksipregnenolon se konvertuje u dehidroepiandrosteron, a 17α -hidroksiprogesteron u androstendion (Swart i sar., 2003). Pokazano je da postoji samo jedan gen, kod miša i pacova koji kodira samo jednu formu CYP17A1. Iako ovaj enzim kod različitih vrsta katališe i hidroksilaznu i liaznu reakciju, postoje razlike od vrste do vrste, koje se odnose na preferiranje jednog (17α -hidroksipregnenolona- Δ^5 put) ili drugog supstrata (17α -hidroksiprogesteron- Δ^4 put) za liaznu aktivnost (Payne i Hales, 2004).

Na modulaciju 17,20 liazne aktivnosti utiču mnogi faktori, uključujući P450 oksidoreduktazu, akscesorni protein-citohrom b5 (cytb5), kao i fosforilacija serin treonin ostataka. CYP17 enzimatski je inaktivan dok ne formira kompleks sa flavoproteinom NADPH-citohrom P450 oksidoreduktazom, koja potom prenosi elektrone sa NADPH do CYP17 enzima (Ehmer i sar., 2000). Drugi faktor specifičan za 17,20 liaznu aktivnost je fosforilacija serinskih i treoninskih ostataka proteina. Međutim, precizni mehanizam ove postranslacione modifikacije aktivnosti CYP17 nije u potpunosti razjašnjen (Zhang i sar., 1995; Miller i sar., 1997). Dodatno, na 17,20 liaznu aktivnost može uticati i cytb5, za koga je pokazano da je ko-lokalizovan sa CYP17 u Leydig-ovim ćelijama fetalnog testisa (Dharia i sar., 2004). Naime, cytb5 funkcioniše kao elektron transportni protein, pri čemu CYP17 jedan elektron dobija od NADPH, preko NADPH citohrom P450 reduktaze, dok drugi elektron može da dobije preko NADH-citohrom b5 reduktaze i cytb5 (Lee-Robichaud i sar., 1997).

CYP17 se ekspresuje u svim klasičnim steroidogenim tkivima. U testisu svih vrsta ekspresuje se isključivo u Leydig-ovim ćelijama (Zhang i sar., 1996; Pelletier i sar., 2001). U ovarijumu,

ekspresija je ograničena na teka ćelije, koje predstavljaju mesto produkcije androgena (Garmey i sar., 2000; Watson i sar., 2004; Wang i Ge, 2004). U nadbubrežnoj žlezdi CYP17 ekspresuje se u *zoni reticularis* i *zoni fasciculati* (Endoh i sar., 1996), ali se ne ekspresuje kod vrsta koje ne sintetišu kortizol, kao što su pacov i miš (Perkins i Payne, 1988; Pelletier i sar., 2001). Distribucija CYP17 proučavana je i kod fetalnog, humanog nadbubrega i detektovana u tranzicionoj i fetalnoj, ali ne i u definitivnoj zoni adrenalnog korteksa (Narasaka i sar., 2005). Imunoheмиjski je pokazana i ekspresija ovog enzima u fetalnim testisima pacova (Majdić i sar., 1998). Osim steroidogenih tkiva CYP17 se ekspresuje i u jetri pacova (Vianello i sar., 1997), gastrointestinalnom traktu, bubrezima (Dalla Valle i sar., 2002) i mozgu (Stromstedt i Waterman, 1995; Matsunaga i sar., 2001).

17 β HSD (EC 1.1.1.64.) je enzim koji katališe krajnji korak u biosintezi aktivnih gonadalnih steroidnih hormona, i za razliku od drugih steroidogenih enzima nije uključen u biosintezu adrenalnih steroida. 17 β HSD konvertuje inaktivne 17-ketosteroide u njihove aktivne 17-hidroksi forme. Do danas je opisano 11 različitih formi enzima koje se razlikuju u tkivnoj distribuciji, katalitičkim osobinama, specifičnosti prema substratu, subcelularnoj lokalizaciji i mehanizmu regulacije. Obeležavane su hronološki, kako su identifikovane (revijalni rad Adamski i Jakov, 2001). Prisutne su kod mnogih mikroorganizama, beskičmenjaka i kičmenjaka. Različite izoenzimske forme 17 β -hidroksi steroid dehidrogenaze kodirane su različitim ne-homologim genima, imaju različitu aminokiselinsku sekvencu i mogu se svrstati u dve proteinske superfamilije: 1) dehidrogenaze/reduktaze kratkih lanaca i 2) aldo-ketoreduktaze (revijalni rad Mindich i sar., 2004). Aldo-ketoreduktaznoj familiji pripada samo 17 β HSD tip 5 koja se ekspresuje u jetri, adrenalnoj žlezdi, prostati (Dufort i sar., 1999; Penning i sar., 2001) i mozgu (Steckelbroeck i sar., 2001). 17 β HSD mogu katalizovati oksidaciju ili redukciju supstrata. Neke izoforme preferiraju redukciju androgena, neke redukciju estrogena a neke oksidaciju androgena i estrogena. Redukcione reakcije važne su u biosintezi aktivnih gonadalnih steroida, dok oksidativne reakcije smanjuju aktivnost seksualnih steroida, konvertujući ih u manje aktivne forme (Baker, 2001). Mogu egzistirati kao membranski vezane (mikrozomalne) i kao solubilne forme (Payne i Hales, 2004). Od mnogih različitih izoenzima, samo tri učestvuju u biosintezi aktivnih steroidnih hormona u gonadama: 1, 3 i 7.

17 β HSD tip 1, naziva se i estradiol dehidrogenaza, katališe NADPH-zavisnu redukciju estrona u mnogo potentniji estradiol (Brown i sar., 2003), ekspresuje se u ovarijumu (granuloza ćelije), placenti, mlečnoj žlezdi (Peltoketo i sar., 1999). Ekspresija je pokazana u humanim ovarijalnim tumorima, kao i za tip 2 i tip 5 (Speirs i sar., 1998; Blomquist i sar., 2002) i koštanim ćelijama (Feix i sar., 2001). 17 β HSD tip 7 membranski je vezan reduktivni enzim koji se predominantno ekspresuje u ovarijumu (korpus luteum), ali i u uterusu, placenti, mlečnoj žlezdi, jetri, buburegu i testisu (Krushe i sar., 2001; Torn i sar., 2003). 17 β HSD tip 3, karakteristična je za adultne humane testise i testise miša. Uglavnom je lokalizovana u Leydig-ovim ćelijama, gde katališe transformaciju DHEA u androstendion i androstendiona, kao manje potentnog androgena, u mnogo potentniji androgen testosteron. Preferira NADPH kao kofaktor, a primarna aktivnost je reduktivna (Sha i sar., 1996; Baker i sar., 1997).

17 β HSD tip 2 katališe oksidativnu transformaciju testosterona u androstendion i estradiola u estron (Luu-The i sar., 1995; revijalni rad Vihko i sar., 2001). Osnovna funkcija 17 β HSD tip 4 je metabolizam masnih kiselina (Breitling i sar., 2001), dok tip 6 i tip 9 17 β HSD učestvuju u metabolizmu retinoida, ali i androgena i estrogena (Napoli, 2001). Humana 17 β HSD tip 10 je multifunkcionalni mitohondrijalni enzim koji efektivno katališe oksidativnu inaktivaciju C17 androgena i estrogena (Nordling i sar., 2001). 17 β HSD tip 11 pronađena je u plućima, gde pokazuje visoku aktivnost sa androstendiolom kao supstratom (Brereton i sar., 2001). U mozgu je pokazana ekspresija 17 β HSD tip 4,5,7,8,10,11 (Steckelbroeck i sar., 2003).

1.3.2. Regulacija steroidogeneze

Proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama stoji pod kontrolom hipotalamo-hipofizno-gonadalne osovine. Testosteron, kao krajnji produkt steroidogeneze, deluje preko dugačke negativne povratne sprege na nivou hipotalamusa i adenohipofize, regulišući na taj način sopstvenu produkciju (Schulz i sar., 2001). Sekretijom hipotalamusnog hormona GnRH stimuliše se sekrecija gonadotropnih hormona adenohipofize (luteinizirajućeg i folikulostimulirajućeg hormona) koji svoje funkcije ostvaruju na nivou testisa. Biosinteza testosterona u Leydig-ovim ćelijama primarno je pod kontrolom LH iz adenohipofize ili

humanog horionskog gonadotropina (hCG), koji pokazuje i akutne i trofične efekte na nivou produkcije testosterona (Payne i Youngblood, 1995). Akutno dejstvo, LH/hCG ostvaruje vezujući se za specifične receptore na plazma membrani Leydig-ovih ćelija, koji pripadaju G_s-vezanim receptorima, inicirajući kaskadu događaja koji uključuju: aktivaciju adenilil ciklaze, povećanje produkcije cAMP, aktivaciju cAMP-zavisne PKA, koja fosforilacijom odgovarajućih proteina pokreće mobilizaciju i uključivanje holesterola u tok steroidogeneze (Stocco i sar, 2005; revijalni rad Payne i Hales, 2004; revijalni rad Hales, 2002). Za akutni odgovor je takođe potrebna brza i hormonima-stimulisana sinteza StAR proteina, koji je uključen u transfer holesterola sa spoljašnje na unutrašnju membranu mitohondrija (Stocco i sar., 2005). Hronični odgovor podrazumeva povećanje ekspresije gena, i to u prvom redu gena za steroidogene enzime, koja je takođe regulisana preko aktivacije LH receptora i uključjenja cAMP-zavisnog signalnog puta (Chen i sar., 2007; Stocco i sar, 2005; Payne i Youngblood 1995; Huhtaniemi i Toppari, 1995; Zirkin i sar., 1997; Hu i sar., 2001).

Dokazano je da ekspresija StAR proteina indukuje steroidogenezu bez hormonske stimulacije. StAR je najviše prisutan u steroidogenim tkivima, gde se može naći u dve forme: kao kratkoživeći citoplazmatski prekursor od 37 kDa koji sadrži N-terminalnu mitohondrijalnu sekvencu kao i više izoelektričnih formi od 30 kDa koje nastaju gubitkom ove sekvence i predstavljaju „zrele“ forme ovog proteina. Citosolni prekursor StAR proteina od 37 kDa se preseca na kontaktnim mestima u mitohondrijalnoj membrani i formira „zrelu“ formu StAR proteina od 30 kDa. Produkcija steroida u gonadnim i adrenalnim ćelijama zahteva kako *de novo* sintezu tako i PKA-zavisnu fosforilaciju StAR-37 proteina. Novo sintetisani StAR je funkcionalan i igra kritičnu ulogu u transferu holesterola sa spoljašnje na unutrašnju mitohondrijalnu membranu (Stocco i sar., 2005; Papadopoulos i sar., 2007). Još uvek se postavljaju mnoga pitanja koja se tiču mehanizama koji dozvoljavaju da, preko cAMP-zavisne protein kinaze (PKA), minimalni nivo cAMP izazove maksimalnu stimulaciju transportovanja holesterola, a onda i steroideogenezu i sve to za nekoliko minuta. Takođe, fosforilacija StAR-a igra bitnu ulogu prilikom njegove aktivacije. Iako prema nekim podacima StAR iRNK i ekspresija proteina koreliraju sa maksimalnim steroidogenim kapacitetom ćelija, drugi podaci o ovim ćelijama ukazuju da se početak hormonski indukovano formiranja steroida događa u vreme kada nema merljivih promena u nivoima StAR iRNK i proteina. U više odvojenih istraživanja pokazano je da StAR ne ulazi u mitohondrije, kako bi ostvario svoju funkciju u steroidogenezi, tako ostaje kao jedina mogućnost da StAR svoju funkciju ostvaruje

aktivacijom mitohondrijalnog receptora ili nekog drugog transportnog mehanizma (Papadopoulos i sar., 2007).

Pokazano je da je pored StAR proteina, u transportu holesterola do unutrašnje mitohondrijalne membrane uključen i TSPO. Ključna uloga ovog proteina je pokazana u eksperimentima gde je njegova ekspresija bila supresovana. Rezultat je bio smanjenje hormonom-indukovanog transporta holesterola u mitohondrije kao i sinteza steroida, pa čak i u prisustvu StAR-a. Novija istraživanja pokazala su da TSPO od 18 kDa, može funkcionisati kao kanal/transporter za holesterol. TSPO je čest u steroidogenim tkivima i pokazano je da TSPO ligandi indukuju TSPO-posredovanu translokaciju holesterola sa spoljašnje na unutrašnju stranu membrane i samu steroidogenezu. Krucijalna uloga TSPO u ovom procesu je demonstrirana u eksperimentu u kome smanjena ekspresija ovog proteina rezultuje u smanjenom hormonski indukovanom transportu holesterola u mitohondrije i sintezi steroida, čak i u prisustvu hormonski indukovano StAR proteina. PKA-inhibitori blokiraju promene u distribuciji TSPO, kao i sintezu steroida koje se javljaju nakon tretmana Leydig-ovih ćelija hCG-om, što ukazuje da je element koji reguliše aktivnost TSPO kontrolisan cAMP-om (Papadopoulos i sar., 2007).

Hipotetički se pretpostavlja sledeći redosled događaja pri transportu holesterola do unutrašnje mitohondrijalne membrane. Nakon stimulacije odgovarajućim adenohipofiznim hormonom u steroidogenim ćelijama dolazi do reorganizacije topografije TSPO molekule, formiranja TSPO polimera, i povećanja afiniteta TSPO vezujućeg mesta što je praćeno sintezom StAR-a od 37 kDa, kao i njegovog transporta do mitohondrija. Istovremeno se PAP7 (TSPO-udruženi protein) veže za TSPO u mitohondrijama i regrutuje PKA do ovih organela, čime omogućava povoljne uslove za fosforilaciju specifičnih supstrata, među kojima je i StAR. Sve je ovo omogućeno multivalentnim „scaffold“ sistemom, koji postoji na spoljašnjoj strani mitohondrijalne membrane. Dakle, StAR i TSPO funkcionalno interaguju da olakšaju transport holesterola i predstavljaju deo većeg mitohondrijalnog multimernog kompleksa proteina čija je uloga da olakša hormon-indukovani transfer holesterola u mitohondrije (Papadopoulos i sar., 2007).

Takođe, jasno je da je konstantna dostupnost holesterola neophodna da bi se započela i održala steroidogenezu. Primarna funkcija SR-B1 je da olakša ulazak holesterola u steroidogena tkiva, koji je potreban za produkciju steroidnih hormona. Pokazano je da su

LH/hCG, cAMP analozi i induktori intracelularnog-cAMP uključeni u regulaciju aktivnosti i ekspresije SR-B1 (Azhar i Reaven, 2002). Aktivacija PKA dovodi i do fosforilacije proteina kao što su holesteril ester hidrolaze kao i fosforilacije transkripcionih faktora među kojima je steroidogeni faktor 1 (SF-1), GATA-4 i CRE-vezujući protein (CREB) koji se vezuje za cis-aktivnu DNK regulatornu sekvencu koja ima funkciju elementa koji odgovara na cAMP (engl. cyclic AMP-response element – CRE) i CRE-modulatorni protein (CREM) koji učestvuju u aktivaciji gena uključenih u steroidogenezu, uključujući i StAR. Mnoge studije su pokazale važnost PKA u održavanju normalnog i stalnog nivoa StAR proteina, kao i to da je sposobnost posttranslacione modifikacije PKA takođe bitna za regulaciju steroidogeneze (Stocco i sar., 2005).

Intracelularna koncentracija cAMP je regulisana aktivnošću adenilil ciklaze (AC) i nivoom degradacione aktivnosti ciklične nukleotid fosfodiesteraze (PDE) (revijalni rad Conti, 2000). U testisima pacova, cAMP-specifična PDE4 je najprisutnija od svih PDE. Četiri gena označena kao PDE4A, B, C i D kodiraju ovaj enzim. Takođe, ovi geni podležu splajsovanju što rezultira u još većem broju različitih izoformi enzima PDE4 (Farooqui i sar., 2001).

Jasno je da je cAMP najvažniji sekundarni glasnik za steroidogenezu stimulisanu trofnim hormonima. Iako je cAMP/PKA signalni put bez sumnje primarni put regulacije steroidogeneze, ipak su mnoge studije ukazale da su i drugi intracelularni signalni putevi uključeni u ovaj proces (Manna i sar., 2006, 2007). Treba ipak napomenuti da je cAMP-nezavisna indukcija steroidogeneze manja u poređenju sa cAMP/ PKA odgovorom (Stocco i sar., 2005).

Jedan od primera cAMP-nezavisnog puta je i cGMP signalni put, pri čemu povećanje cGMP stimuliše steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama. cGMP se generiše membranski vezanom guanilil ciklazom (mGC) i NO-zavisnom solubilnom guanilil ciklazom (sGC) i deluje kao intracelularni glasnik modulišući funkciju efektor direktno ili preko cGMP-zavisne protein kinaze (PKG). Osim toga modulacija androgene produkcije posredstvom NO je bifazična, stimulatorna pri malim koncentracijama a inhibitorna pri velikim koncentracijama (Andrić i sar., 2007). StAR protein ima važnu ulogu u cGMP-indukovanoj steroidogenezi, jer aktivacija NO/cGMP signalnog puta dovodi do fosforilacije ovog proteina protein kinazom G. Takođe

je pokazano da je i sGC operativna u Leydig-ovim ćelijama i da rezultujuće povećanje nivoa cGMP takođe stimuliše bazalnu steroidogenezu (Andrić i sar., 2007).

Vezivanje trofnih hormona za specifične receptore rezultira u prvom redu aktivacijom cAMP/PKA puta, ali može da dovede i do aktivacije fosfolipaze C (PLC) i povećanja intracelularnog nivoa fosfatidilinozitoltrifosfata i diacilglicerola, što ima za posledicu povećanje intracelularnog nivoa kalcijuma i aktivacije protein kinaze C (PKC), što opet otvara mogućnost uplitanja još jednog mehanizma transdukcije u procesu regulacije steroidogeneze (Stocco i sar., 2005; Manna i sar., 1999; Wurthner i sar., 1995). Međutim, aktivacija PKC puta rezultira povećanjem transkripcije i translacije StAR proteina, ali ne rezultira u njegovoj fosforilaciji. Kako je poznato da je mehanizam fosforilacije StAR proteina neophodan za proces transfera holesterola, a samim tim i za steroidogenezu, može se zaključiti da je PKC put uključen u proces ekspresije StAR gena, ali da je bez PKA i fosforilacije StAR-a, sinteza steroida nemoguća (Stocco i sar., 2005).

Važnu ulogu u kontroli biosinteze StAR i transporta holesterola u mitohondrije imaju i ekstracelularnim signalima regulisane kinaze (ERK) koje se aktiviraju po vezivanju LH (Martinelle i sar., 2004). Naime, pokazano je da je aktivacija PKA i PKC signalinga u MA-10 kulturi Leydigovih ćelija miša prouzrokuje fosforilaciju ERK1/2 te da je i ERK1/2-signalna kaskada uključena u regulaciju StAR ekspresije i sinteze steroida (Manna i sar., 2007).

Važnu ulogu u regulaciji steroidogeneze ima i signaling preko receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR). Vezivanje LH za svoje receptore vodi aktivaciji EGFR, aktivaciji mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK) što vodi fosforilaciji StAR proteina i daljoj sintezi steroida. EGFR/ MAPK put aktivan je i neophodan samo u ranoj fazi LH-stimulisane steroidogeneze i to u prvih 30 – 60 minuta (Evaul i Hammes, 2008).

Steroidogeneza u Leydig-ovim ćelijama može biti modulirana cirkulišućim i/ili lokalno produkovanim hormonima, faktorima rasta i citokinima (Morales i sar., 2003). Produkti Sertolijevih ćelija, makrofaga, peritubularnih mioidnih ćelija, mogu modulirati proces steroidogeneze. Mnoge studije su pokazale da se inflamatorni citokini, kao što je interleukin-1 (IL-1), faktor tumorske nekroze α (TNF- α), kao i neinflamatorni citokini kao što je transformišući faktor rasta β (TGF- β) proizvode u ćelijama seminiferog epitela. Takođe je pokazano da Sertolijeve ćelije kao i Leydig-ove ćelije proizvode aktivin koji je član TGF- β

proteinske familije. Ovi citokini uključeni su u kontrolu spermatogeneze, ali takođe imaju direktan, uglavnom inhibitorni efekat na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama (revijalni rad Borstein i sar., 2004; revijalni rad Hedger, 1997). Takođe je pokazano da IL-1 i IL-2 supresuju hCG stimulisanu produkciju testosterona (Calkins i sar., 1988; Guo i sar., 1990). Kod adultnih pacova pokazano je da intratestikularni tretman sa TNF- α dovodi do redukcije ekspresije StAR i biosinteze testosterona u nestimulisanim ili hCG tretiranim intaktnim ili hipofizektomiranim životinjama (Morales i sar., 2003). U Leydig-ovim i Sertolijevim ćelijama identifikovan je leukemija inhibitorni faktor (LIF), koji deluje kao autokrini/parakrini faktor. LIF redukuje LH/hCG stimulisanu produkciju citokina, nivo StAR iRNK i produkciju testosterona, redukujući dostupnost i transfer holesterola do mitohondrija (revijalni rad Borstein i sar., 2004). Intimna fizička asocijacija Leydig-ovih ćelija i makrofaga ukazuje da testikularni intersticijalni makrofagi i Leydig-ove ćelije funkcionišu povezano. Uloga makrofaga u testisu veoma je kompleksna i uključuje i stimulatorne i inhibitorne faktore koji deluju na nivou Leydig-ovih ćelija (Lukyanenko i sar., 1998). Makrofagi sekretuju faktore kao što su IL-1 i TGF- β koji imaju stimulatorno dejstvo na proliferaciju nezrelih Leydig-ovih ćelija ali pokazuju i stimulatorni efekat na nivou steroidogeneze. Normalan razvoj i fiziologija Leydig-ovih ćelija zavisi od prisutnosti makrofaga koji u neinflamatornim stanjima stvaraju odgovarajuće mikro-okruženje i na taj način učestvuju u normalnom funkcionisanju Leydig-ovih ćelija. Međutim tokom inflamatornih stanja lokalna produkcija citokina, reaktivnih kiseoničnih metabolita i prostaglandina ima inhibitorno dejstvo na steroidogene enzime i produkciju androgena (revijalni rad Hedger, 1997; revijalni rad Hales, 2002). Nedavno je pokazano da testikularni intersticijalni makrofagi mogu da produkuju i sekretuju 25-hidroksiholesterol, kao važan parakrini faktor koji pokazuje direktne stimulatorne efekte na steroidogenu funkciju Leydig-ovih ćelija (Stocco i sar., 2005; Lukyanenko i sar., 2002). Brojni endogeno produkovani faktori u Leydig-ovim ćelijama mogu autokrinim regulatornim mehanizmima modulirati proces steroidogeneze. Sami androgeni produkovani od strane Leydig-ovih ćelija pokazuju inhibitorno dejstvo u regulaciji sopstvene produkcije. Kao autokrini/parakrini faktor deluje i insulinu-sličan faktor rasta I (revijalni rad Haider, 2004). Pokazano je da se faktor rasta poreklom iz trombocita može specifično vezati za receptore na površini Leydig-ovih ćelija i tako ostvariti ulogu u kontroli testikularne funkcije. Leydig-ove ćelije produkuju i vaskularni endotelijalni faktor rasta (Annand i sar., 2003), epidermalni faktor rasta (EGF) za koga je pokazano da indukuje regulatornu kaskadu asociranu sa sintezom steroida i ekspresiju StAR proteina u Leydig-ovim

ćelijama miša (Manna i sar., 2002). Tretman Leydig-ovih ćelija sa TGF α ili sa EGF rezultira u signifikantnom povećanju produkcije androgena u nezrelim Leydig-ovim ćelijama pacova. Povećanje produkcije androgena kao odgovor na TGF α asocirano je sa povećanjem nivoa iRNA za StAR protein, enzim P450scc ali ne i 3 β HSD i P450c17 (Millena i sar., 2004).

1.3.3. Regulacija ekspresije gena odgovornih za steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama

Za diferencijaciju, kao i funkciju Leydig-ovih ćelija neophodno je dobro usaglašeno dejstvo različitih endokrinih, parakrinih/autokrinih faktora i hormona, kao i brojnih signalnih molekula. Kao odgovor na ove signale ekspresuju se mnogobrojni geni odgovorni za steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama (Tremblay, 2007). Najvažniji transkripcioni faktori uključeni u procese regulacije ekspresije steroidogenih gena su:

SF-1 - Steroidogeni faktor-1 (SF-1) (Ad4BP ili NR5A1) je orfanski nuklearni receptor, odnosno transkripcioni faktor, koji ima važnu ulogu ne samo u regulaciji ekspresije mnogih cAMP-regulisanih gena odgovornih za steroidogenezu već takođe i u razvoju endokrinog sistema i u seksualnoj diferencijaciji (Payne, 2007; Payne i Hales, 2004; Urs i sar., 2007).

Sposobnost ovog receptora da poveća ekspresiju ciljnih gena može biti regulisana post-translacionim modifikacijama, subnuklearnom lokalizacijom i protein-protein interakcijama. Takođe, za maksimalnu aktivnost ovog receptora kod pacova i miševa potrebna je interakcija fosfatidilinozitol fosfata sa njegovim ligand-vezujućim domenom (Urs i sar., 2007).

C/EBP - CCAAT/vezujući protein pojačivač (eng. CCAAT/enhancer binding protein) predstavlja familiju transkripcionih faktora koji sadrže motiv leucinskog cibzara u svojoj strukturi. Imaju veoma važnu ulogu u diferencijaciji i funkcionisanju mnogobrojnih tipova ćelija. Od šest članova ove familije transkripcionih faktora, C/EBP- β je najdominantniji u Leydig-ovim ćelijama i njegova ekspresija povećava se nakon stimulacije Leydig-ovih ćelija sa LH (Tremblay, 2007).

GATA familija obuhvata šest transkripcionih faktora koji se ekspresuju u različitim tkivima gde imaju važnu ulogu u diferencijaciji ćelija, organogenezi i steroidogenezi (Tremblay, 2007). GATA-4, GATA-6 i testis specifičan GATA-1 koji su detektovani u gonadama (revijalni rad Manna i sar., 2003). Od svih GATA transkripcionih faktora samo je GATA-4 pronađen kako u fetalnim tako i u postnatalnim Leydig-ovim ćelijama, gde je pokazano da aktivira nekoliko gena uključenih u steroidogenezu, uključujući StAR, 3 β HSD II, CYP17 i CYP19 (Tremblay, 2007).

Sp1 je član familije transkripcionih faktora sa strukturom cinkovih prstiju koji se vezuju za GC- ili GT-bogate sekvence. Sp1 i Sp3 važni su za ekspresiju SR-B1, TSPO, LHR i vaskularnog endotelijalnog faktora rasta u Leydig-ovim ćelijama (Tremblay, 2007).

CREB familija obuhvata **CREB** i **CREM** proteine za koje je pokazano da indukuju ekspresiju StAR gena nakon stimulacije Leydig-ovih ćelija trofnim hormonima (Tremblay, 2007).

AP-1 (Jun i Fos) su članovi familije bZip transkripcionih faktora. Tek pre nekoliko godina pokazano je da promotor StAR gena u Leydig-ovim ćelijama sadrži funkcionalno AP-1 vezno mesto (Tremblay, 2007; Manna i sar., 2004).

DAX-1 je orfanski nuklearni receptor (eng. dosage-sensitive-sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X-chromosome), koji ima važnu ulogu u diferencijaciji, razvoju i funkcionisanju gonada i nadbubrežnih žlezda (revijalni rad Manna i sar., 2003).

YY1 (eng. yin yang 1) predstavlja multifunkcionalni transkripcioni faktor, koji može da deluje i kao aktivator i kao represor transkripcije sterol odgovornih gena. Za YY1 pokazano je da inhibira SREBP-posredovanu transkripciju gena (revijalni rad Manna i sar., 2003).

Regulacija transkripcije gena za StAR

S obzirom da je StAR protein uključen u transport holesterola iz intracelularnih depoa u mitohondrije i da je to limitirajući i hormon senzitivni korak u stimulaciji steroidogeneze, mehanizam njegove regulacije je od izuzetne važnosti. Ekspresija gena za StAR akutno je regulisana trofnim hormonima preko cAMP-signalnog puta u steroidogenim ćelijama, što

vodi povećanju nivoa StAR iRNK u okviru 30 minuta i dostiže maksimalan nivo nakon 6 h stimulacije. Akutna i hronična stimulacija ekspresija gena za StAR može uključivati odvojene mehanizme i različite transkripcione faktore koji se mogu vezivati za promotor StAR gena, a takođe je pokazano da se transkripcioni regulatorni mehanizmi razlikuju između vrsta (revijalni rad Manna i sar., 2003).

Transkripcioni faktori koji utiču na ekspresiju gena za StAR mogu se prema svom delovanju podeliti na one koji stimulišu i one koji inhibišu ekspresiju gena za StAR (Stocco i sar., 2001; revijalni rad Manna i sar., 2003). Transkripcioni faktori koji stimulišu ekspresiju gena za StAR su: SF-1, C/EBP, GATA-4, SREBP, Sp1, CREB i AhR dok DAX-1 i YY1 inhibišu ekspresiju gena za StAR.

U okviru StAR promotora identifikovano je do sada šest vezujućih mesta za SF-1 u zavisnosti od vrste, što ukazuje na njegovu ključnu ulogu u regulaciji gena za StAR. Kod pacova je identifikovano pet mesta za vezivanje SF-1 u okviru gena za StAR, dok kod miša i čoveka postoji još jedno dodatno mesto (Stocco i sar., 2001). Pokazano je i da je SF-1 esencijalni faktor pri akutnoj aktivaciji humanog StAR promotora. Takođe, pokazano je da je SF-1 neophodan, ali ne i dovoljan faktor za kompletni odgovor steroidogenih ćelija na cAMP (revijalni rad Manna i sar., 2003). Proksimalni region StAR promotora sadrži vezno mesto za C/EBP. Dva člana ove familije: C/EBP α i C/EBP β ekspresuju se u steroidogenim ćelijama, među kojima su i Leydig-ove ćelije i granulosa ćelije ovarijuma (revijalni rad Manna i sar., 2003). C/EBP α i C/EBP β predstavljaju ciljne mete za fosforilaciju dejstvom PKA. Za aktivaciju promotora za StAR putem SF-1 neophodno je prisustvo funkcionalnog C/EBP vezujućeg mesta u promotoru, zbog čega se nameće zaključak da SF-1 i C/EBP najverovatnije formiraju kompleks tokom aktivacije StAR promotora (Stocco i sar., 2001). C/EBP takođe fizički interaguje sa transkripcionim faktorom GATA-4 što dovodi do aktivacije StAR promotora (Tremblay, 2007). GATA-4 je pored C/EBP β , jedan od prvih identifikovanih transkripcionih faktora, koji je uključen u aktivaciju StAR promotora i koji ima važnu ulogu u ekspresiji gena za StAR (Stocco i sar., 2001). SREBP (eng. steroid regulatory element binding protein) je jedan od mnogobrojnih transkripcionih faktora koji su uključeni u aktivaciju StAR promotora (Stocco i sar., 2001). SREBP proteini regulišu zalihe, preuzimanje i metabolizam holesterola. Za maksimalan odgovor zahtevaju interakciju sa Sp1 i/ili nuklearnim faktorom Y (NF-Y) (revijalni rad Manna i sar., 2003). Sp1 i Sp3 interaguje sa

velikim brojem transkripcijskih faktora, koji mogu učestvovati u regulaciji StAR gena u Leydig-ovim ćelijama (Tremblay, 2007; Stocco i sar., 2001). Takođe, poznato je da StAR promotor može biti regulisan pomoću CREB. Međutim, kako CRE sekvenca za koju se vezuje CREB nije nađena u okviru promotora gena za StAR, pokazano je da CREB svoju ulogu u aktivaciji StAR promotora ostvaruje najverovatnije vezivanjem za neko drugo alternativno mesto u okviru StAR promotora miša (revijalni rad Manna i sar., 2003; Stocco i sar., 2001). AP-1 transkripcijski faktori se vezuju za elemente u okviru StAR promotora. I za Jun i za Fos pokazano je da utiču na bazalnu transkripciju gena za StAR u različitom opsegu, kao i da oba učestvuju u represiji cAMP-posredovanog odgovora (revijalni rad Manna i sar., 2003).

Arihidrokarbonski receptor (AhR) jedan je od elemenata za koje je pokazano, da može biti uključen u ekspresiju StAR gena. Naime, pokazano je da transfekcija Y-I adrenalnih ćelija sa AhR i njegovim vezujućim partnerom, arihidrokarbon-nuklearnim translokatorom, rezultira povećanjem aktivnosti StAR promotora kada se doda odgovarajući ligand za AhR (Sugawara i sar., 1995). Kako je AhR veoma važan receptor za ksenobiotike, među kojima su dioksini, postoje dokazi o uplitanju ovih ksenobiotika u regulaciju ekspresije gena za StAR, upravo preko AhR receptora. Do danas je poznato da organofosfatni insekticidi (dimetoat i lindan), herbicid roundup, kao i fungicidi (ekonazol i mikonazol) inhibišu steroidogenezu u MA-10 Leydig-ovim ćelijama, upravo preko redukcije ekspresije StAR proteina, od kojih neki utiču i na inhibiciju transkripcije samog StAR gena. Međutim, regulatorni elementi u promotoru StAR gena uključeni u ovu inhibiciju nisu još uvek identifikovani (Stocco i sar., 2001).

Jedan od do sada poznatih negativnih regulatora StAR promotora je DAX-1, koji ima važnu ulogu u diferencijaciji gonada i nadbubrežnih žlezda, u njihovom razvoju i funkciji (revijalni rad Manna i sar., 2003). DAX-1 blokira ekspresiju StAR gena, najverovatnije, vezivanjem za strukturu ukosnice na 5' kraju promotora za StAR (Stocco i sar., 2001). DAX-1 takođe inhibira ekspresiju gena za steroidogene enzime uključujući P450_{scc}, 3βHSD, CYP17 i CYP19. Pokazano je da svoje inhibitorno dejstvo DAX-1 ostvaruje preko interakcije sa SF-1 i represije SF-1 *trans*-aktivacije, ali i direktnim vezivanjem za SF-1 i inhibicije SF-1-posredovane transkripcije gena za StAR (revijalni rad Manna i sar., 2003).

Za YY1 je pokazano da može da deluje indirektno, preko inhibicije SREBP-posredovane ekspresije gena za StAR (revijalni rad Manna i sar., 2003).

Regulacija transkripcije gena za SR-B1

U steroidnim tkivima, primarni regulator ekspresije SR-B1 gena jesu tkivno specifični trofni hormoni i cAMP, kao sekundarni glasnik, te je stoga SR-B1 ekspresija up-regulisana preko LH/hCG, FSH, gonadotropina iz seruma ždrebne kobile (PMSG, engleski: pregnant mare serum gonadotropin), ACTH, angiotenzina II, insulina, cAMP analogima i intracelularnim cAMP-indukujućim agensima. Ekspresija SR-B1 u steroidogenim ćelijama u *in vitro* i u *in vivo* uslovima regulisana je i nivoom holesterola preko mehanizma povratne sprege (Azhar i Reaven, 2002).

Faktori koji utiču na ekspresiju gena za SR-B1 i koji se vezuju za SR-B1 promotor su: SF-1, SREBP, Sp1, DAX-1 i YY1. Humani SR-B1 promotor sadrži jedno vezno mesto za SF-1, za koji se vezuje SF-1 i aktivira gene u kulturi Y-1 adrenokortikalnih ćelija. Takođe, SR-B1 promotor sadrži vezno mesto za SREBP-1a što ukazuje da i drugi transkripcioni faktori mogu učestvovati u regulaciji ekspresije humanog SR-B1 gena. SREBP predstavlja ključni regulator u transkripciji gena uključenih u metabolizam holesterola i masnih kiselina. Međutim, SREBP zahteva prisustvo drugih transkripcionih faktora, kao što je Sp-1, kako bi se postigla maksimalna aktivacija transkripcije gena za SR-B1. Sp1 članovi familije transkripcionih faktora (Sp-1 i Sp-3) su takođe esencijalni za efikasnu transkripciju SR-B1 gena kod pacova. SR-B1 promotor kod pacova sadrži vezno mesto za Sp-1 i Sp-3. Pokazano je da overekspresija Sp-1 i Sp-3 u mišijim MA-10 Leydig-ovim ćelijama rezultira povećanom aktivnošću promotora SR-B1 gena. DAX-1 je još jedan transkripcioni faktor koji je uključen u regulaciju promotora SR-B1 gena kod pacova. Međutim, za razliku od SF-1, Sp-1/ Sp-3 i SREBP, DAX-1 negativno reguliše transkripciju gena za SR-B1. Pokazano je da DAX-1 interferira sa dejstvom transkripcionih faktora (SF-1, Sp-3 i SREBP) koji stimulišu prepisivanje gena za SR-B1, i na taj način vrši represiju transkripcije. YY1 predstavlja transkripcioni faktor koji kao i DAX-1 negativno reguliše transkripciju gena za SR-B1, ali posredstvom drugog mehanizma. Naime, u ne-stimulisanim uslovima YY1 se vezuje direktno za SR-B1 promotor i inhibira njegovu funkciju. Takođe, YY1 vrši represiju SREBP-1a-posredovane stimulacije aktivnosti SR-B1 promotora, direktno interagujući sa SREBP-1a i sprečavajući ga na taj način da se veže za sterol regulatorne elemente (SRE) (Azhar i Reaven, 2002).

Regulacija transkripcije P450 enzima

Hronična stimulacija Leydig-ovih ćelija sa LH je neophodna za održavanje optimalne ekspresije gena za P450 steroidogene enzime. LH preko G-protein-vezanih receptora aktivira AC, povećava cAMP i dovodi do povećane sinteze iRNK za P450 steroidogene enzime, odnosno sinteze odgovarajućih enzima. Iako se transkripcija gena za steroidogene enzime nastavlja nakon aktivacije PKA, SF-1 nije direktno fosforilisan ovom kinazom. Međutim, pokazano je da PKA povećava polu-život SF-1. Takođe je ustanovljeno da je aktivnost fosfataze potrebna za SF-1 zavisnu transkripciju nekoliko gena za steroidogene enzime i da cAMP indukuje defosforilaciju SF-1 (Urs i sar., 2007).

Payne i Youngblood (1995) su ispitivali brzinu *de novo* sinteze P450_{scc} i P450_{c17} enzima u mišijim Leydig-ovim ćelijama u kulturi. U odsustvu cAMP sinteza P450_{c17} prestaje, dok P450_{scc} ima visok bazalni nivo sinteze. Apsolutni zahtev cAMP za sintezu P450_{c17} je demonstriran odstranjivanjem cAMP iz medijuma, što je izazvalo 50 % smanjenu brzinu *de novo* sinteze 24 h nakon odstranjivanja cAMP i kompletno odsustvo sinteze nakon 48 h. Nakon ponovnog dodavanja cAMP u medijum *de novo* sinteza P450_{c17} je kompletno vraćena. Celokupan tretman je imao vrlo mali efekat na brzinu sinteze P450_{scc}.

Transkripcija humanog CYP11A1 gena u nadbubrežnoj žlezdi, u odgovoru na ACTH/cAMP stimulaciju zahteva vezivanje SF-1 za dva vezujuća mesta, u okviru promotora ovog gena. Takođe, pokazano je da c-Jun potpomaže SF-1 zavisnu transkripciju humanog CYP11A1 promotora. Novootkriveni "zinc finger" protein, TreP-132, identifikovan je kao važan pozitivni regulator ekspresije humanog CYP11A1 gena (Sewer i Waterman, 2003).

Transkripcioni faktor Sp1, takođe je uključen u cAMP-zavisnu aktivaciju gena za CYP11A1 u nadbubrežnoj žlezdi čoveka, govečeta i svinje (Sewer i Waterman, 2003). Prema drugim autorima ovaj transkripcioni faktor uključen je i u regulaciju ekspresije gena za steroidogene enzime među kojima su: CYP17 u ovarijumu govečeta, kao i CYP21B kod ljudi (Stocco i sar., 2001). Familija ovih faktora sposobna je da dovede do aktivacije ili represije procesa transkripcije (Sewer i Waterman, 2003). Takođe, postoje rezultati koji ukazuju na to da postoje ćelijski-specifični transkripcioni faktori koji regulišu transkripciju u Leydig-ovim

ćelijama, a razlikuju se od faktora koji su neophodni za ekspresiju u adrenalnim ćelijama (revijalni rad Payne i Hales, 2004).

Transkripcioni faktor CREB koji fosforiliše PKA, uključen je u aktivaciju Cyp19A1 gena. Istraživanja pokazuju da cAMP deluje preko CRE/CREB sistema na promotoru Cyp19A1 gena u granulosa ćelijama i R2C transformisanim Leydig-ovim ćelijama kod pacova, kao i na PII promotoru Cyp19A1 gena u humanim granulosa ćelijama. Iako povećanje cAMP u ćeliji povećava ekspresiju gena za sve steroidogene P450 enzime, pretpostavlja se da su za kontrolu ekspresije gena koji kodiraju CYP11A1 i CYP17A1 odgovorni drugi transkripcioni faktori (Payne, 2007).

Takođe, transkripcioni faktor GATA-4 u Leydig-ovim ćelijama, aktivira ekspresiju CYP17A1 i CYP19, dok transkripcioni faktor DAX-1 inhibira ekspresiju gena za CYP11A1, CYP17A1 i CYP19 (Tremblay, 2007).

Regulacija transkripcije hidrosisteroid dehidrogenaza

3 β HSD. Ispitivanja vezana za regulaciju transkripcije gena za 3 β HSD koja su vršena na Leydig-ovim ćelijama miša su pokazala visoku konstitutivnu ekspresiju ovog gena. Leydig-ove ćelije miša sintetišu dve različite izoforme 3 β HSD: 3 β HSD I i 3 β HSD VI. Ispitivanja uloge LH/hCG u regulaciji ekspresije gena za dve navedene izoforme pokazala su da je ekspresija gena za 3 β HSD I nezavisna od LH stimulacije, dok je ekspresija gena za 3 β HSD VI visoko zavisna od LH/hCG stimulacije. Za maksimalnu ekspresiju gena za 3 β HSD II u humanim Leydig-ovim ćelijama je neophodna interakcija SF-1 sa drugim transkripcionim faktorima (GATA 4 i GATA 6). Za bazalnu i LH/hCG indukovanu ekspresiju gena za ovaj enzim značajan je nuklearni orfanski receptor Nur 77. Ekspresiju Nur 77 indukuje LH/hCG u testisu i pretpostavlja se da predstavlja važan medijator dejstva LH na nivou steroidogeneze (Payne, 2007). Takođe, transkripcioni faktor GATA-4 u Leydig-ovim ćelijama, aktivira ekspresiju 3 β HSD, dok transkripcioni faktor DAX-1 inhibira ekspresiju gena za 3 β HSD (Tremblay, 2007).

17 β HSD. Tri funkcionalna regulatorna elementa su opisana u okviru humanog gena za ovaj enzim, i to su: element koji odgovara na dejstvo retinoične kiseline, element koji kompetitivno odgovara na dejstvo AP-1, Sp1 i Sp3 (koji imaju ulogu transkripcionih pojačivača) i GATA element koji ima funkciju represora transkripcije. Delecije u regionu elementa koji odgovara na dejstvo retinoične kiseline, dovode do nemogućnosti da se adekvatno odgovori na dejstvo retinoične kiseline, što kao rezultat ima povećanu 17 β HSDI ekspresiju u većem broju različitih ćelija (revijalni rad Payne Payne i Hales, 2004).

Sp1 učestvuje u aktivaciji velikog broja promotora, a pokazano je da kompetituje sa Sp3, za vezivanje za istu sekvencu, pa na taj način ima mogućnost da spreči delovanje Sp3 faktora. AP-2 transkripcioni faktor aktivira se različitim signalnim putevima, među kojima su i put preko PKA, kao i PKC. Interakcija između Sp1, Sp3 i AP-2 uključena je u kontrolu tkivno- i ćelijski- specifične transkripcije hHSD17B1 gena. Delecije u GATA vezujućem regionu hHSD17B1 gena dovode do povećanja u nivou transkripcije ovog gena, što je dokaz da GATA transkripcioni faktori (GATA-2 i GATA-3) funkcionišu kao represori transkripcije ovog gena (revijalni rad Payne Payne i Hales, 2004).

Ekspresija 17 β HSD III je proučavana na normalnim miševima i miševima kojima nedostaju cirkulišući gonadotropini ili funkcionalni androgeni receptor. Utvrđeno je da je tokom neonatalnog razvoja ekspresija gena za 17 β HSD III nezavisna od stimulacije gonadotropinima ali postaje zavisna tokom puberteta (Payne, 2007).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je da se ispita efekat atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova u *in vivo* (oralni tretman od 23-eg do 51-og dana života) i *in vitro* (24 h tretman) uslovima, da se utvrdi da li atrazin deluje na određene elemente cAMP-zavisnog signalnog puta, kao i na ekspresiju gena koji kodiraju steroidogene enzime i regulatorne proteine uključene u kontrolu steroidogeneze.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Hemikalije

Atrazin čistoće 98%, korišćen u *in vitro* eksperimentima, nabavljen je od Supelco (USA). Tehnički atrazin (98% čistoće) korišćen u *in vivo* eksperimentima, poklon je Prof. dr Sanje Lazić, Institut za zaštitu bilja, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. Hemikalije za izolaciju ukupne RNK ("RNAqueous-4PCR" komplet), nabavljene su od Applied Biosystems/Ambion (Austin, USA), za sintezu cDNK ("High-Capacity cDNA Reverse Transcription" komplet sa RNase inhibitorom) i za PCR reakciju ("Power SYBR Green PCR Master Mix") nabavljene su od Applied Biosystems (Foster City, USA), dok su prajmeri za Real Time PCR nabavljeni od Integrated DNA Technologies, USA. cAMP EIA kit nabavljen je od Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). RIA kit za LH (pacovski) nabavljen je od ALPCO Diagnostic (Salem, NH, USA). Antitestosteron-11-BSA serum No.250 i antiprogesteron-11-BSA serum No. 337 dobijeni su od dr G. D. Niswender, (Colorado State University, Fort Collins, CO, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12, medijum 199 (M199), goveđi serum albumin (fraction V), kolagenaza (tip I), H-89 dihydrochloride hydrate (H89), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), tripan plavo (Tripan Blue 0,4%), progesteron i testosteron nabavljeni su od Sigma Chemical Company (St. Louis, Steinheim, Germany). Horiogonadotropni hormon (hCG; Pregnyl 3000 IU/mg) nabavljen je od Organon (West Orange, NJ, USA). [1, 2, 6, ³H(N)]-progesteron i [1, 2, 6, ³H(N)]-testosteron nabavljen je od New England Nuclear (Brisel, Belgija). Aktivni ugalj - Norit A nabavljen je od Serva (Heidelberg, Nemačka). Ostale hemikalije su bile analitičke čistoće.

3.2. Eksperimentalne životinje i tretmani

U eksperimentalnom radu su korišćeni mužjaci belih pacova rase Wistar (od 23 do 51 dana starosti). Životinje su uzgajane u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. U laboratoriji su održavani standardni uslovi kontrolisanog osvetljenja (14 h svetlo/10 h mrak), pri temperaturi od 22±2°C. Hranjene su standardnom paletiziranom hranom za pacove (Veterinarski Zavod, Subotica), a vodu su uzimale po potrebi.

Dvadesetosmodnevni oralni tretman. Prilikom ovog tretmana životinje eksperimentalne grupe su hranjene *by gavage (po)* svakodnevno tokom 28 dana (od 23 do 50 dana starosti) atrazinom rastvorenim u maslinovom ulju, u dozama od 50 mg/kg telesne mase i 200 mg/kg telesne mase. Kontrolne grupe životinja su primale svakodnevno odgovarajuću količinu maslinovog ulja. Aplikacija je vršena u periodu od 8:30 h do 9:00 h svakog dana. Životinje su žrtvovane dekapitacijom pri starosti od 51 dan, 24 h nakon poslednje aplikacije atrazina. Ove dve relativno visoke doze atrazina odabrane su na osnovu literaturnih podataka u kojima je pokazan inhibitorni uticaj atrazina na produkciju testosterona kod peripubertalnih mužjaka pacova (Friedmann, 2002; Stoker i sar., 2000; Trentacoste i sar., 2001). Cilj ovog rada bio je da se dalje istraže mogući mehanizmi delovanja atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama.

Jednokratni oralni tretman. Životinje su takođe bile tretirane *by gavage*, jednokratno (50 dana starosti), istim dozama atrazina (50 mg/kg telesne mase i 200 mg/kg telesne mase). Kontrolne grupe životinja su primale odgovarajuću količinu maslinovog ulja. Aplikacija je vršena u periodu od 8:30 h do 9:00 h. Životinje su su žrtvovane dekapitacijom pri starosti od 51 dan, 24 h nakon tretmana.

Dvadesetčetvoročasovni *in vitro* tretman. U *in vitro* eksperimentima korišćene su životinje starosti 51 dan, koje su žrtvovane dekapitacijom.

Svi eksperimenti su odobreni od strane Lokalnog etičkog komiteta za zaštitu životinja koje se koriste za eksperimentalne svrhe na Univerzitetu u Novom Sadu i izvođeni su prema proceduri Nacionalnog instituta za zdravlje USA, uputstvo za zaštitu i korišćenje laboratorijskih životinja (NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals).

3.3. Izolacija intersticijalnih ćelija testisa

Izolacija i purifikacija Leydig-ovih ćelija rađena je prema metodi Leckie i sar., (1998) uz određene modifikacije. Naime, nakon žrtvovanja, testisi su izdvojeni, dekapulirani i stavljeni u plastične epruvete (50 ml, 2 testisa/epruveti), u kojima se nalazilo 1.5 ml rastvora

kolagenaze/testisu u DMEM/F12, obogaćenom sa 1.5% BSA koji je sadržavao 100000 IU/l penicilina i 100 mg/l streptomocina (1.2 mg kolagenaze/ml DMEM/F12-BSA, pH 7.4). Epruvete su dobro zatvorene i inkubirane 15 minuta/34°C u "shaker" vodenom kupatilu pri oscilacijama od 120 ciklusa u minuti. Nakon toga, reakcija je prekinuta dodavanjem (20 ml/epruveti) hladnog DMEM/F12-0.5%BSA. Da bi se omogućilo taloženje seminiferne tubula, epruvete su ostavljene 5 minuta na 4°C. Odvajanje frakcije seminiferne tubula izvršeno je filtriranjem kroz najlon mrežicu (mesh br. 100) u dve graduisane plastične epruvete. Centrifugiranjem filtrata 5 min/160 x g na sobnoj temperaturi, dobijen je talog intersticijalnih ćelija (IC) koji sadrži oko 20% Leydig-ovih ćelija, ali i ostale ćelije, kao što su makrofagi, ćelije endotela, germinativne ćelije, eritrociti i nešto leukocita. U cilju uklanjanja kolagenaze, talog je ispran sa 10 ml DMEM/F12-0.5% BSA (po epruveti), uz centrifugiranje 5 min/160 x g na sobnoj temperaturi. Po završetku centrifugiranja, talog je resuspendovan u određenoj zapremini DMEM/F12-0.1%BSA (5 ml/testisu) i vršeno je određivanje broja vijabilnih IC.

Za određivanje ukupnog broja i broja vijabilnih IC korišćeno je bojenje sa 0.4% rastvorom tripan plavog (tzv. Dye Exclusion Test - DET; *Sigma*), a broj živih ćelija je određivan njihovim brojanjem u hemocitometru. Metoda se zasniva na principu da žive ćelije ne apsorbuju boju, dok se jedro mrtvih ćelija boji plavo, jer tripan plavo prodire kroz oštećenu ćelijsku membranu. Postupak je sledeći: pripremljena suspenzija IC se dobro promeša Pasterovom pipetom i doda se 0.05 ml ove suspenzije u epruvetu koja sadrži 0.05 ml tripan plavog. Posle nekoliko minuta se na oba polja hemocitometra nanese po kap obojene suspenzije i vrši se brojanje u ugaonim kvadratima, pri uvećanju 100x. Broje se žive ćelije, sa neoštećenom membranom, koje se za razliku od mrtvih, raspadnutih ćelija i ćelija sa oštećenom membranom, ne boje plavo. Svaki od ovih kvadrata podeljen je na 16 jednakih površina (kvadrata). Broje se ćelije u unutrašnjosti kvadrata i one koje dotiču gornju i levu (ili donju i desnu) središnju liniju kvadrata. Površina na kojoj se broje ćelije je 1 mm², a visina komore je 0.1 mm. Prosečan broj ćelija po kvadratu množi se sa odgovarajućim razblaženjem, i sa 10⁴ da bi se odredio broj izolovanih ćelija po ml.

broj ćelija/ml = prosečan br. ćelija po kvadratu x faktor razblaženja (2) x 10⁴

3.4. Purifikacija Leydig-ovih ćelija

Purifikacija je proces izdvajanja Leydig-ovih ćelija (LC) od ostalih tipova ćelija iz grube suspenzije IC. Postupak purifikacije ukratko izgleda ovako: u plastične epruvete od 12 ml se naslojava po 2 ml sterilnih rastvora perkola različitih gustina. Priprema rastvora perkola različitih gustina prikazana je u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Sastav perkolnih rastvora različite gustine

SPECIFIČNE GUSTINE	3%BSA-10xDMEM/F12 (ml)	PERKOL	DESTILOVANA H ₂ O (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	12,945	5,046

Rastvori su naslojavani počevši od rastvora najveće vrednosti gustine (1,090) do rastvora najmanje vrednosti gustine (1,045). Potom se na vrh kolone nanosi 4 ml (oko 30×10^6 ćelija) suspenzije intersticijalnih ćelija i kolone se centrifugiraju 28-30 min na $500 \times g$ na sobnoj temperaturi. LC će se izdvojiti samo u određenom sloju perkolnog gradijenta, tj. na granici gustine između 1,065 i 1,080. Frakcija LC se sakuplja, epruvete se dopunjavaju do 50 ml sa DMEM/F12-0,1% BSA i ponovo se vrši centrifugiranje u trajanju od 5 min, pri brzini od $160 \times g$ na sobnoj temperaturi. Dobijeni talog se resuspenduje do 5 ml sa DMEM/F12. Potom se vrši određivanje broja vijabilnih ćelija, po istom principu kao i IC. Ovako pripremljena suspenzija sadrži 95%-98% LC.

3.5. Eksperimentalni dizajn

Dvadesetosmodnevni oralni tretman. Nakon žrtvovanja životinja, purifikovane Leydig-ove ćelije dobijene su od 4-8 životinja po grupi. Leydig-ove ćelije iz svake grupe, pulirane su, i

sađene na mikrotitar ploče sa 96 radnih površina (engleski-well, u daljem tekstu vel), tako da vel sadrži 50000 LC u 0.2 ml DMEM/F12. 3h posle sađenja Leydig-ovih ćelija, odliven je medijum a ćelije su stimulisane različitim koncentracijama hCG ili sa različitim steroidnim supstratima: 22OH-holesterolom, pregnenolonom, progesteronom, ili androstendionom u 0.2 ml M199-0.1%BSA/velu. Leydig-ove ćelije su potom inkubirane u CO₂ inkubatoru, gde je obezbeđena atmosfera 95%O₂ i 5%CO₂ u trajanju od 2 h pri temperaturi od 34°C. Nakon 2 h uzorci su pokupljeni i čuvani na temperaturi od -20°C do momenta određivanja količine progesterona i testosterona radioimunološkom analizom (RIA). Dodatno, u svakom eksperimentu Leydig-ove ćelije sađene su na petri ploče (d=55mm), 2.5 x 10⁶ LC/2 ml DMEM/F12/ploči i stimulisane sa 10 ng/ml hCG u trajanju od 2 h, u kojima je pored određivanja nivoa hormona i cAMP-a u medijumu, vršena i izolacija ukupne RNK. Nakon završetka 2 h-perioda, deo medijuma je zamrznut na suvom ledu i čuvan na temperaturi od -70°C do momenta određivanja količine cAMP enzimimunološkom analizom (EIA), a ostatak medijuma je zamrznut na -20°C do određivanja nivoa testosterona i progesterona radioimunološkom metodom. Nakon tretmana ploče su isprane hladnim PBS-om (Phosphate Buffered Saline) i momentalno zamrznute na suvom ledu (-78.5 °C), nakon čega su čuvane na -70°C u specijalnom zamrzivaču do postupka izolacije RNK. U *in vivo* eksperimentima u kojima su Leydig-ove ćelije stimulisane sa različitim koncentracijama 22OH-holesterola (1 i 50µM) u trajanju od 2 h, ćelije su sađene po 1 x 10⁶ LC/2 ml DMEM/F12/petri ploči, dijametra 55mm. Nakon završetka 2 h-perioda, uzorci medijuma su zamrznuti na -20°C do momenta određivanja nivoa progesterona i testosterona radioimunološkom analizom.

Dvadesetčetvoročasovni *in vitro* tretman. Za potrebe 24 h *in vitro* eksperimenta Leydig-ove ćelije (1 x 10⁶ LC/2 ml DMEM/F12) su sađene na petri ploče (d=55 mm) i nakon lepljenja, tretirane različitim koncentracijama atrazina (1 nM, 1 µM, 20 µM, 50 µM) koji je bio rastvoren u 2 ml medijuma DMEM/F12 sa dodatkom 0.1 % BSA. Ćelije su inkubirane u CO₂ inkubatoru, gde je obezbeđena atmosfera 95%O₂ i 5%CO₂ u trajanju od 24 h pri temperaturi od 34°C. Nakon 24-časovnog tretmana atrazinom odliven je medijum sa ćelija, i zamenjen svežim (2 ml medijuma M199-1%BSA) koji je sadržavao različite koncentracije hCG (0.125 ng/ml, 0.25 ng/ml, 0.5 ng/ml i 10 ng/ml) ili steroidnih supstrata: progesterona (0.25 µM, 0.5 µM i 10 µM) ili androstediona (0.25 µM, 0,5 µM i 10 µM) i odgovarajuće koncentracije atrazina, u trajanju od 2 h. U slučaju eksperimenta sa H89 (inhibitorom protein kinaze A (PKA)) Leydig-ove ćelije tretirane su sa atrazinom u koncentraciji 20 µM u trajanju od 24 h, a nakon toga 2 h sa 20 µM atrazina ili 10 µM H89 ili u njihovoj kombinaciji u prisustvu 10

ng/ml hCG. Nakon 2 h uzorci su čuvani na -20°C do momenta određivanja nivoa progesterona i testosterona radioimunološkom analizom, odnosno deo medijuma je odmah po vađenju ploča iz inkubatora odvojen, zamrznut u suvom ledu i čuvan na -70°C do momenta određivanja nivoa cAMP enzimimunološkom analizom. U svakom eksperimentu, deo ćelija je sađen u koncentraciji od 2.5×10^6 LC/2 ml DMEM/F12/petri ploči i tretiran različitim koncentracijama atrazina ($1 \mu\text{M}$ i $20 \mu\text{M}$) rastvorenim u istom medijumu. Tretman je trajao 24 h pri istim uslovima inkubacije, nakon čega je medijum odliven i zamenjen svežim koji je sadržavao 10 ng/ml hCG-a i odgovarajuće koncentracije atrazina. Stimulacija sa hCG-om je trajala 2 h. Nakon celokupnog tretmana medijum je odliven a ploče su isprane hladnim PBS-om i momentalno zamrznute na suvom ledu ($-78,5^{\circ}\text{C}$), nakon čega su čuvane na -70°C u zamrzivaču do postupka izolacije RNK.

Jednodnevni oralni tretman. Nakon žrtvovanja životinja, purifikovane Leydig-ove ćelije dobijene su od 4-5 životinja po grupi. Leydig-ove ćelije iz svake grupe, pulirane su i sađene na petri ploče (d=55mm) u koncentraciji 2.5×10^6 LC/2 ml DMEM/F12/ploči. 3 h posle sađenja Leydig-ovih ćelija, odliven je medijum i zamenjen svežim u pločama u kojima je praćena bazalna produkcija testosterona, dok je drugi deo ćelija stimulisan sa 10 ng/ml hCG. Leydig-ove ćelije inkubirane su potom u CO_2 inkubatoru, gde je obezbeđena atmosfera $95\%\text{O}_2$ i $5\%\text{CO}_2$ u trajanju od 2 h pri temperaturi od 34°C . Nakon 2 h, deo medijuma je zamrznut u suvom ledu i čuvan na temperaturi od -70°C do momenta određivanja količine cAMP enzimimunološkom analizom, a ostatak medijuma je zamrznut na -20°C do određivanja nivoa testosterona radioimunološkom metodom. Nakon tretmana ploče su isprane hladnim PBS-om i momentalno zamrznute na suvom ledu (-78.5°C), nakon čega su čuvane na -70°C u specijalnom zamrzivaču do postupka izolacije RNK.

3.6. Određivanje koncentracije hormona radioimunološkom analizom

Koncentracije progesterona i testosterona u uzorcima su određivane radioimunološkom analizom. U cilju određivanja nepoznate koncentracije antigena, pravi se standardna inhibiciona kriva, korišćenjem standardnih rastvora testosterona i progesterona poznatih koncentracija (0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.125, 0.00625 ng/0.1ml) od osnovnog

standardnog rastvora koncentracije 100 ng/ml. Radioaktivnost obeleženog antigena podešavana je na 4500 otkucaja/min/0.1ml. Kako u uzorcima nije vršeno odvajanje testosterona (T) od dihidrotestosterona (DHT), a obzirom na veliku "cross" reaktivnost antitestosteron-11-BSA seruma sa DHT, vrednosti za koncentraciju testosterona predstavljaju sumu T+DHT. Antitestosteron-11-BSA No.250 i antiprogesteron-11-BSA serum No.337 su razblaženi, tako da maksimalno vezivanje obeleženog antigena u odsustvu neobeleženog bude oko 30-40%. Odvajanje liganda (slobodnog od vezanog) vršeno je suspenzijom aktivnog uglja, dok je radioaktivnost merena uz dodatak scintilacione tečnosti u β -scintilacionom brojaču LSC sistem Wallac 1400. Svi uzorci u okviru jednog eksperimenta mereni su u duplikatu u jednoj analizi. Preciznost RIA za testosteron je 6 pg/epruveti, koeficijent varijacije u okviru jedne analize je 5.8%, a koeficijent varijacije između analiza je 7.5%. U slučaju RIA za progesteron, preciznost metode je takođe 6 pg/epruveti, interesejski koeficijent je 10.7%. Nivo LH u serumu je određivan pomoću RIA kita, prema uputstvu proizvođača. Uzorci iz svih eksperimenata urađeni su u jednoj analizi, pri čemu je limit detekcije ovog kita prema uputstvu proizvođača iznosio 0.14 ng/ml.

3.7. Određivanje nivoa cAMP-a

Količina cAMP sekretovanog u medijum, koja stoji u korelaciji sa količinom cAMP u ćeliji, određena je EIA analizom, po uputstvima proizvođača. Metoda se bazira na kompeticiji između neobeleženog i acetilholinesterazom (AChE) obeleženog cAMP za ograničen broj veznih mesta na antitelu. Aktivnost AChE u kompleksu: AChE obeleženi cAMP-antitelo određuje se na osnovu količine nastalog žuto obojenog produkta. Kvantifikacija indikatorske reakcije izvršena je fotometrijski, na talasnoj dužini 412 nm. Prema podacima proizvođača datih u uputstvu, IC_{50} (50% B/Bo) vrednost je 0.5 pmol/ml, a limit detekcije 0.1 pmol/ml (na 80% B/Bo) za acetilovane uzorke. U našim eksperimentima IC_{50} vrednost bila je 0.3 pmol/ml, a limit detekcije 0.08 pmol/ml (na 80% B/Bo), što je u saglasnosti sa podacima proizvođača.

3.8. MTT test

MTT test predstavlja *in vitro* esej za merenje ćelijske proliferacije, ćelijske vijabilnosti, odnosno citotoksičnosti ispitivanih uzoraka. MTT je tetrazolijumska so rastvorljiva u vodi,

koja se konvertuje u nerastvorljivi ljubičasti formazan cepanjem tetrazolijumskog prstena od strane dehidrogenaze u mitohondrijama. Ćelijske membrane ne propuštaju formazan pa se on akumulira u zdravim ćelijama. Ćelije se liziraju, a kristali formazana se rastvaraju u rastvaraču. Purifikovane Leydig-ove ćelije sađene su na 96-vel mikrotitar ploče, tako da vel sadrži 50000 LC u 0.2 ml DMEM/F12. 3 h posle sađenja Leydig-ovih ćelija, medijum je odliven, a ćelije su tretirane različitim koncentracijama atrazina (1 nM, 1 μ M, 20 μ M, 50 μ M) u trajanju od 24 h pri temperaturi od 34°C, u CO₂ inkubatoru gde je obezbeđena atmosfera 95%O₂ i 5%CO₂. Nakon 24-časovnog tretmana atrazinom odliven je medijum sa ćelija, i zamenjen sa 0.1ml DMEM/F12 koji je sadržao 50 μ g MTT po velu. Nakon 3 h inkubacije u CO₂ inkubatoru pri temperaturi od 37°C, odliven je rastvor MTT sa ćelija i dodato je 0.1 ml 0.04M HCl u izopropanolu po velu, kako bi se rastvorili nastali kristali formazana. Nakon inkubacije od 10 minuta, na sobnoj temperaturi, apsorbanca se meri fotometrijski na dve talasne dužine: A₁=540 nm i A₂=690 nm. Konačna apsorbanca se računa kao A=A₁-A₂. Na osnovu dobijenih rezultata, citotoksičnost ispitivanje supstance se računa prema formuli: $CI=(1-A_t/A_k)*100$, gde je A_t apsorbanca uzoraka tretiranih sa atrazinom, a A_k apsorbanca kontrolnih uzoraka.

3.9. Izolacija RNK prema “RNAqueous-4PCR” kompletu

Metod koji se koristi zasniva se na razaranju ćelija u rastvoru koji sadrži guanidin tiocijanat, snažan haotropni agens koji lizira ćelijske membrane i brzo inaktivira ćelijske ribonukleaze. Lizat uzorka se zatim pomeša sa rastvorom etanola (koji obezbeđuje uslove za selektivno vezivanje RNK za silica-gel filter) i prenese na silica-gel filter, koji selektivno i kvantitativno vezuje iRNK i veću ribozomalnu RNK. Veoma male RNK kao što je tRNK i 5S ribozomalna RNK nisu kvantitativno vezane. Filter se zatim ispira kako bi se otklonila rezidualna DNK, proteini i ostali kontaminanti. RNK se eluira sa filtera pomoću vode oslobođene nukleaza (“nuclease-free water”), koja sadrži tragove EDTA čime je omogućeno heliranje teških metala. Nakon eluiranja sa filtera, RNK se tretira ultra čistom Dnazom 1 kako bi se uklonili tragovi DNK. Prinos RNK varira u zavisnosti od tipa i količine uzorka.

Protokol

1. U petri ploču sa 2.5×10^6 Leydig-ovih ćelija dodato je 350 μ l tzv. rastvora za liziranje;
2. Lizirane ćelije su sakupljene sa ploče pomoću špatule. Na lizat je dodato 350 μ l etanola;
3. Lizat etanol/smeša je propuštena kroz filter centrifugiranjem na 12000 rpm;
4. Filter je najpre ispran sa 700 μ l rastvora za ispiranje # 1;
5. A zatim sa 2 x 500 μ l rastvora za ispiranje # 2/3;
6. RNK je eluirana sa filtera sa 60 μ l prethodno zagrejanog rastvora za eluiranje (u dva koraka, najpre sa 40 a zatim sa 20 μ l rastvora za eluiranje);
7. Tragovi DNK otklonjeni su DNaza tretmanom.

3.9.1. Određivanje koncentracije totalne RNK

Koncentracija ukupne RNK određena je pomoću Evolution 100 spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific), merenjem apsorbance na 260nm. Očitana vrednost se smatra validnom, ukoliko je apsorbance veća od 0.15. Smatra se da 1 jedinica apsorbance na 260 nm odgovara količini RNK od 40 μ g/ml ($A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g RNK/ml}$). Pre merenja RNK je razblažena 10 puta.

Pored merenja apsorbance na 260 nm, meri se i apsorbance na 280 nm, a odnos između ove dve vrednosti značajan je za određivanje čistoće izolovane RNK. Uzorak izolovane RNK je visoke čistoće ukoliko je odnos A_{260}/A_{280} 1.9-2.1.

Nakon izmerene apsorbance koncentracija totalne RNK se određuje pomoću sledeće formule:

$$\text{RNK } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times R \times F$$

A_{260} - apsorbance uzorka na 260 nm

R – razblaženje

F – 40; (1 OD (Optical Density)

odgovara vrednosti 40 μ g RNK/ml)

Prosečan prinos ukupne RNK izolovane iz 2.5×10^6 Leydig-ovih ćelija iznosio je 5.9 μg , pri čemu se odnos A_{260}/A_{280} kretao između 1.9-2.0.

3.10. Reverzna transkripcija prema "High-Capacity cDNA Reverse Transcription" protokolu

High-Capacity cDNA Reverse Transcription komplet sadrži sve komponente neophodne za reverznu transkripciju totalne RNK u cDNK u reakciji volumena 20 μl . Komplet zahteva da se uvek koristi do 2 μg totalne RNK po reakciji, a da je volumen jedne reakcije 20 μl .

Protokol

2x Master mix pripremiti na ledu prema Tabeli 3.2:

Tabela 3.2. Sastav master mix-a

Komponente	Volumen/reakciji (μl)
10x RT pufer	2
25x dNTP Mix (100mM)	0.8
10 RT Random prajmeri	2
MultiScribe Reverzna transkriptaza	1
RNase inhibitor	1
Nuklease-free voda	3.2
_____	—
Volumen po reakciji	10

1. Pipetirati po 10 μl 2x RT master mixa (po reakciji) u zasebne tubice;
2. Dodati 10 μl RNK uzorka koji sadrži do 2 μg RNK i izmešati;
3. Kratko centrifugirati;
4. Programirati Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler prema protokolu iz Tabele 3.3:
5. Podesiti na aparatu volumen reakcije 20 μl ;
6. Postaviti uzorke i pokrenuti prethodno pripremljeni program.

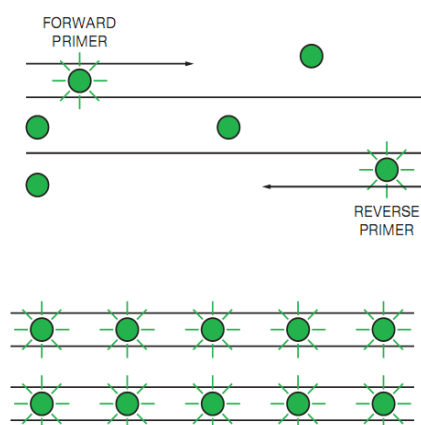
Tabela 3.3. Protokol rada Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler

	Korak 1	Korak 2	Korak 3	Korak 4
Temperatura°C	25	37	85	4
Vreme	10 min	120 min	5 sec	neograničeno

U ovim eksperimentima je u 20 µl reakcione smeše dodavano najčešće od 0,9 µg do 1,9 µg RNK. Dobijena cDNK čuvana je u zamrzivaču na -20 °C.

3.11. Relativna kvantifikacija genske ekspresije prema "Power SYBR Green PCR Master Mix" protokolu

"Power SYBR Green PCR Master Mix" predstavlja pre-miks komponenti (izuzev prajmera, matrice i vode) nepohodan za izvođenje QPCR (kvantitativne analize lančane reakcije polimeraze, Quantitative-Polymerase Chain Reaction). Komplet koristi SYBR Green I boju koja se vezuje za dvolančanu DNK obezbeđujući fluorescentni signal koji odražava količinu dvolančanog DNK produkta koji nastaje tokom PCR (Sl.3.1.).



Slika 3.1. Vezivanje SYBR Green I boje za dvolančanu DNK

"Power SYBR Green PCR Master Mix" komplet omogućava veoma senzitivnu kvantifikaciju nukleinskih kiselina, detektujući čak i veoma mali broj kopija ciljnog gena (1-10) u veoma

širokom opsegu koncentracija matrice. Na ovaj način se meri stepen ekspresije ciljnog gena i vrši poređenje sa ekspresijom tog gena u kontrolnom uzorku.

Pri ispitivanju relativne kvantifikacije genske ekspresije neophodno je definisati endogenu kontrolu. Endogenu kontrolu predstavlja gen koji u svim setovima eksperimentalnih uzoraka ima konzistentan nivo genske ekspresije. Na ovaj način omogućena je normalizacija relativne kvantifikacije, tj. eliminiše se varijabilnost u inicijalnoj koncentraciji i kvalitetu totalne RNK i u efikasnosti konverzije prilikom reakcije reverzne transkripcije. U ovim eksperimentima kao endogena kontrola korišćen je β -aktin koji spada u „housekeeping“ gene. Za endogenu kontrolu i ciljne gene dizajnirani su specifični prajmeri korišćenjem Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) softvera, a sekvenca gena preuzeta je sa NCBI Entrez Nucleotide Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez).

Protokol

1. U 2 x koncentrovan SYBR Green master mix dodati vodu i prajmere (sense i anti-sense u finalnoj koncentraciji 200 nM) pri čemu se SYBR Green master mix dva puta razblaži.
2. U 96 well Optical Reaction Plate ispipetirati 5 μ l odgovarajućeg uzorka cDNK i 20 μ l prethodno napravljene smeše koju čine SYBR Green master mix, voda i prajmeri. Finalna količina cDNK u reakciji izražena preko početne količine RNK iznosila je 100 ng.
3. 96 well Optical Reaction Plate prekriti adhezivnim filmom (ABI PRISM Optical Adhesive Cover).

PCR reakcija je rađena na Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR sistemu, prema odgovarajućem protokolu napravljenom u SDS (Sequence Detection System) programu pri čemu se jedan ciklus sastoji od sledećih koraka prikazanih u Tabeli 3.4:

Tabela 3.4. Protokol rada Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR sistema

	Korak 1	Korak 2	Korak 3	Korak 4
Temperatura°C	50	95	95	60
Vreme	2 min	10 min	15 sec	1 min

Koracima 1 i 2 započinje PCR reakcija, a koraci 3 i 4 se ponavljaju 40 puta.

Na kraju reakcije, u SDS programu, dobijaju se podaci o amplifikaciji ispitivanih gena u funkciji broja ciklusa. Ovi podaci obrađuju se programskim paketom SDS RQ Manager. Pri obradi podataka prag (threshold), tj. nivo ΔR_n zadat je automatski, a korišćen je za izračunavanje C_t vrednosti pomoću pomenutog SDS RQ Manager softvera.

Relativna kvantifikacija genske ekspresije vršena je komparativnom C_t metodom. Ova metoda podrazumeva normalizaciju ekspresije ciljnog gena sa endogenom kontrolom, kako za kontrolu tako i za uzorak:

$$\Delta C_t = (C_{t,\text{ciljni gen}} - C_{t,\beta\text{-aktin}})$$

Zatim se vrši normalizacija tretiranog sa kontrolnim uzorkom:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ tretman}} - \Delta C_{t \text{ kontrola}}$$

Koeficijent relativne ekspresije (R) ciljnog gena je izračunat na osnovu sledeće jednačine:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

3.12. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička analiza izvršena je analizom varijanse (ANOVA), korišćenjem Duncan's multiple-range post hoc parametarskog testa. Za statističku obradu podataka korišćen je programski paket „Statistika 8”.

¹⁾ ΔR_n predstavlja razliku između R_n (odnos između intenziteta fluorescencije reporterske boje i fluorescencije passive reference) i jačine signala, tj. fluorescencije u početnim ciklusima PCR reakcije kada je promena tog signala minimalna. Presecanje pragovne linije sa dijagramom amplifikacije definiše C_t vrednost, odnosno broj ciklusa amplifikacije koji je potreban da uzorak dostigne zadanu vrednost fluorescencije.

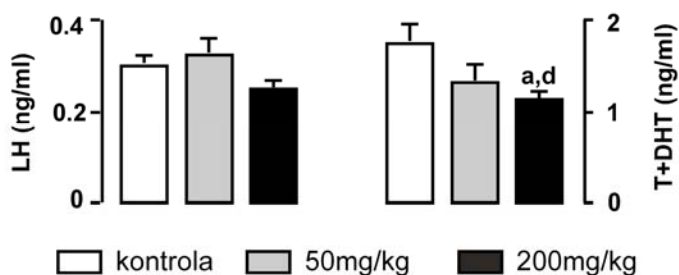
4. REZULTATI

4.1. Efekti 28-dnevne oralne primene atrazina na steroidogenezu u Leydigovim ćelijama peripubertalnih pacova

U cilju ispitivanja *in vivo* efekta atrazina na testikularnu steroidogenezu, mužjaci pacova tretirani su *po* od 23. do 50. dana starosti, atrazinom u dozi od 50 mg/kg i 200 mg/kg telesne mase.

4.1.1. Nivo hormona u serumu

24 h nakon poslednje *po*-administracije atrazina, određivan je nivo androgena (T+DHT) kao i LH u serumu. Kod životinja tretiranih sa većom dozom atrazina registrovano je signifikantno smanjenje nivoa androgena (Slika 4.1).



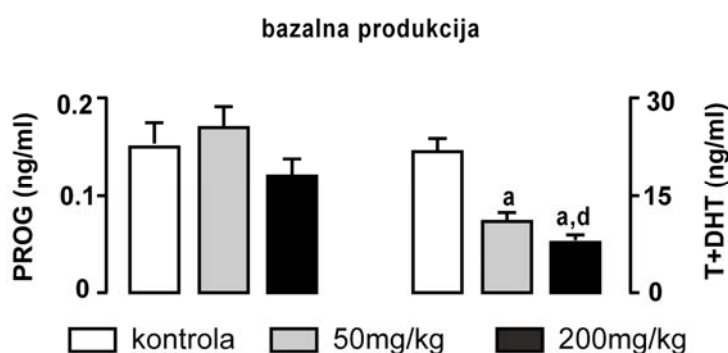
Slika 4.1. Efekat *po*-administracije atrazina na nivo androgena i LH u serumu.

Eksperimentalne životinje su tretirane atrazinom tokom 28 dana, a žrtvovane su 24 h nakon poslednjeg *po*-tretmana. Nivo androgena i LH je određen sa RIA. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 26 replikata dobijenih iz 4 nezavisna eksperimenta, a u svakom eksperimentu serum je dobijen od 5-8 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p<0.001$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p<0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

Takođe, rezultati prikazani na slici 4.1 pokazuju da nakon 28-dnevnog oralnog tretmana ne dolazi do statistički značajne promene nivoa LH u serumu, ali ukazuju na tendenciju redukcije nivoa LH kod životinja tretiranih sa većom dozom atrazina.

4.1.2. Efekti *in vivo* primene atrazina na *ex vivo* bazalnu i hCG-stimulisanu produkciju progesterona, testosterona i cAMP u Leydig-ovim ćelijama

U cilju ispitivanja mogućeg *in vivo* uticaja atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama, praćena je *ex vivo* produkcija progesterona, testosterona i cAMP u bazalnim i hCG-stimulisanim uslovima.

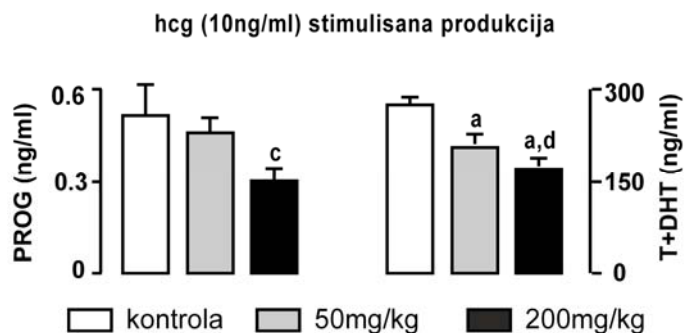


Slika 4.2. Efekat atrazina na *ex vivo* bazalnu produkciju testosterona i progesterona u Leydig-ovim ćelijama.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane u medijumu u 50-mm petri pločama (2.5×10^6 LC/ploči) u trajanju od 2 h. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 12-24 replikata dobijenih iz 4 nezavisna eksperimenta (3-8 replikata po eksperimentu), a u svakom eksperimentu LC su dobijene od 4-5 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

Dobijeni rezultati pokazuju da je *in vivo* primena atrazina u trajanju od 28 dana prouzrokovala dozno zavisno smanjenje produkcije T+DHT u Leydig-ovim ćelijama u odnosu na kontrolu, dok je produkcija progesterona ostala nepromenjena u bazalnim uslovima (Sl. 4.2).

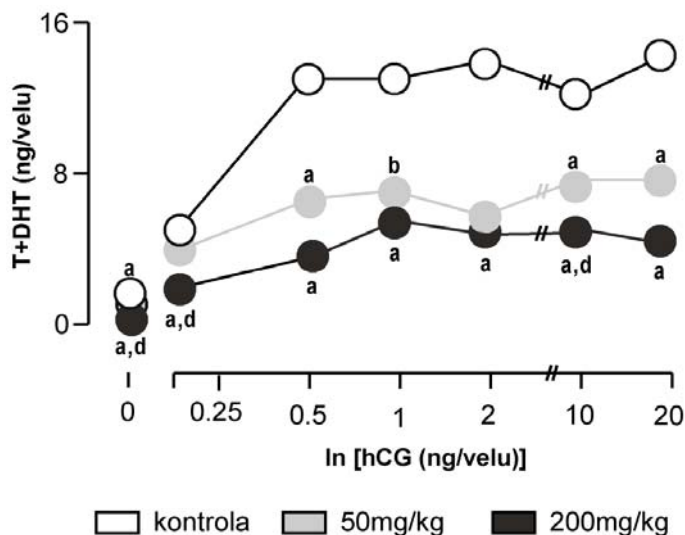
Rezultati pokazuju da je *in vivo* primena atrazina u trajanju od 28 dana prouzrokovala dozno zavisno smanjenje produkcije T+DHT u Leydig-ovim ćelijama u odnosu na kontrolu i u hCG-stimulisanim uslovima (Sl. 4.3). Sa druge strane, kod hCG-stimulisanu produkcije progesterona postoji tendencija dozno-zavisne inhibicije, koja postaje signifikantna u Leydig-ovim ćelijama izolovanim iz životinja tretiranih sa većom dozom atrazina (Sl. 4.3).



Slika 4.3. Efekat atrazina na hCG-stimulisanu produkciju testosterona i progesterona u Leydig-ovim ćelijama u *ex vivo* uslovima.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane u 50-mm petri pločama (2.5×10^6 LC/ploči) u prisustvu 10ng/ml hCG u trajanju od 2 h. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 12-24 replikata dobijenih iz 4 nezavisna eksperimenta (3-8 replikata po eksperimentu), a u svakom eksperimentu LC su dobijene od 4 - 5 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$, c= $p < 0.05$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

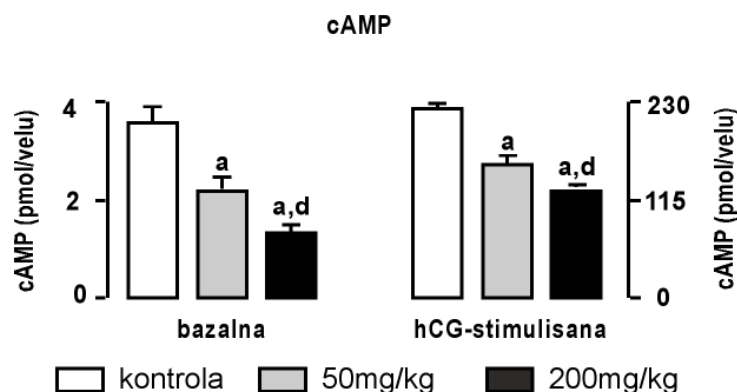
U prisustvu različitih koncentracija hCG došlo je do očekivanog dozno-zavisnog povećanja produkcije androgena u Leydig-ovim ćelijama izolovanim i iz kontrolnih i iz atrazinom tretiranih životinja. Međutim, rezultati pokazuju da je *in vivo* primena atrazina prouzrokovala dozno-zavisno smanjenje produkcije T+DHT u Leydig-ovim ćelijama izolovanim iz atrazinom tretiranih životinja u odnosu na kontrolne vrednosti (Sl. 4.4).



Slika 4.4. Efekat *po*-administracije atrazina na produkciju testosterona u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu različitih koncentracija hCG.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane u mikrotitar pločama (50000 LC/velu) u prisustvu različitih koncentracija hCG, tokom 2 h. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 24 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta, a u svakom eksperimentu, LC su dobijene od 5-8 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$, b= $p < 0.01$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

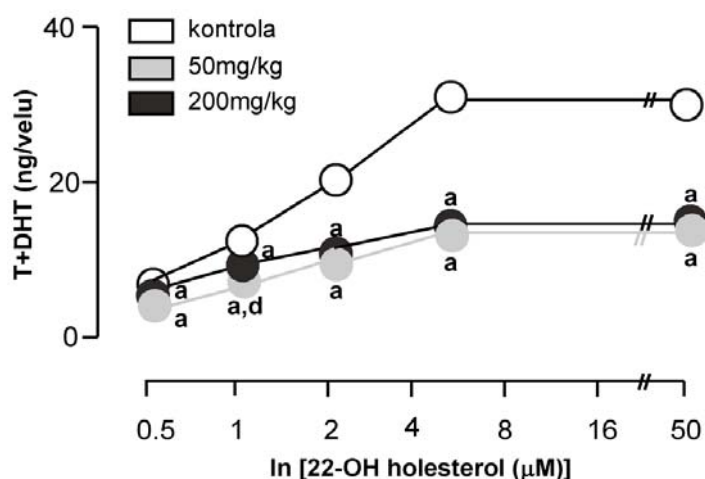
Paralelno sa inhibicijom produkcije androgena u Leydig-ovim ćelijama izolovanim iz atrazinom-tretiranih životinja, došlo je i do dozno-zavisnog smanjenja ekstracelularnog nivoa cAMP, kako u bazalnim, tako i u hCG stimulisanim uslovima (Sl. 4.5).



Slika 4.5. Efekat *po*-administracije atrazina na *ex vivo* bazalnu i hCG-stimulisanu akumulaciju cAMP u medijumu Leydig-ovih ćelija.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane u 50-mm petri pločama (2.5×10^6 LC/ploči) sa i bez prisustva 10ng/ml hCG, u trajanju od 2 h. Nivo cAMP je određen ELISA metodom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 24 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta, a u svakom eksperimentu LC su dobijene od 4-5 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

4.1.3. Efekat *in vivo* primene atrazina na *ex vivo* produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu 22OH-holesterola kao supstrata



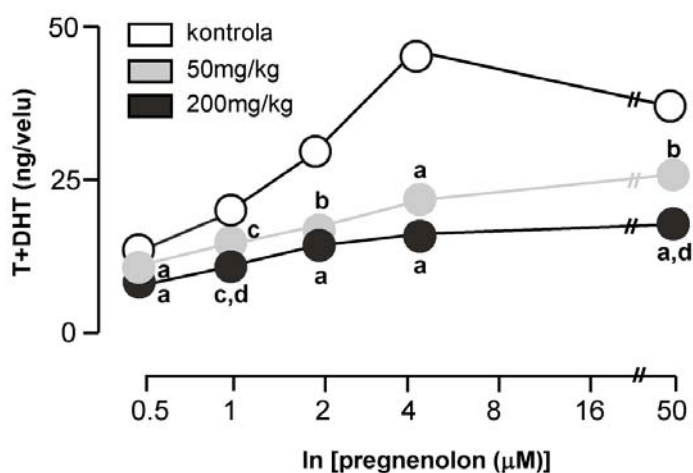
Slika 4.6. Efekat *po*-administracije atrazina na produkciju testosterona u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu 22-OH holesterola kao supstrata.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane u mikrotitar pločama (50000 LC/ploči) u prisustvu različitih koncentracija 22-OH holesterola kao supstrata, tokom 2 h. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 24 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta, a u svakom eksperimentu LC su dobijene od 5-8 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa

U prisustvu 22OH-holesterola kao supstrata, došlo je do očekivanog dozno-zavisnog povećanja produkcije T+DHT od strane Leydig-ovih ćelija izolovanih iz kontrolnih i atrazinom-tretiranih životinja. Međutim, ovo povećanje u funkciji doze 22OH-holesterola, bilo je statistički značajno manje kod Leydig-ovih ćelija izolovanih iz atrazinom-tretiranih životinja (Sl. 4.6).

4.1.4. Efekat *in vivo* primene atrazina na produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu pregnenolona kao supstrata

U prisustvu pregnenolona kao supstrata došlo je do očekivanog dozno-zavisnog povećanja produkcije T+DHT u Leydig-ovim ćelijama izolovanim i iz kontrolnih i iz atrazinom-tretiranih životinja. Odgovor Leydig-ovih ćelija životinja tretiranih atrazinom bio je manji u odnosu na kontrolne vrednosti u dozno-zavisnom maniru (Sl. 4.7). Statistički značajno smanjenje produkcije T+DHT bilo je posebno izraženo u prisustvu većih koncentracija pregnenolona (Sl. 4.7).

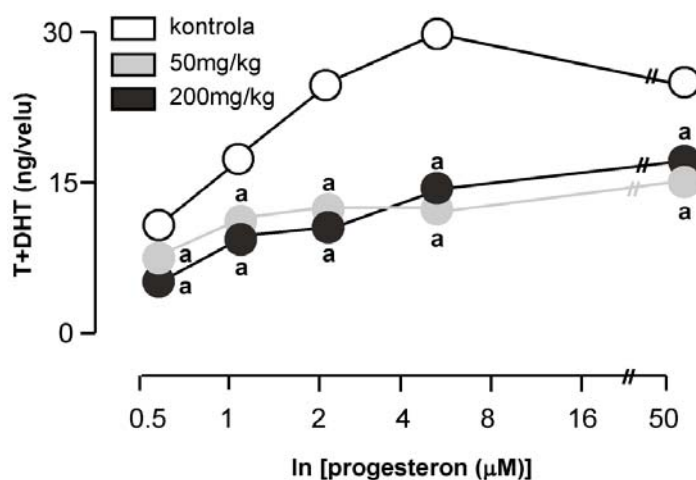


Slika 4.7. Efekat *po*-administracije atrazina na produkciju testosterona u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu pregnenolona kao supstrata.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane u mikrotitar pločama (50000 LC/ploči) u prisustvu različitih koncentracija pregnenolona kao supstrata, tokom 2 h. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 24 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta, a u svakom eksperimentu LC su dobijene od 5-8 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$, b= $p < 0.01$, c= $p < 0.05$, između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

4.1.5. Efekat *in vivo* primene atrazina na *ex vivo* produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu progesterona kao supstrata

Rezultati pokazuju da je primena rastućih koncentracija progesterona kao supstrata na Leydig-ove ćelije izolovane iz kontrolne i atrazinom-tretirane grupe životinja, dovela do očekivanog povećanja produkcije T+DHT u funkciji doze progesterona. Međutim, Leydig-ove ćelije izolovane iz testisa atrazinom tretiranih životinja pokazale su značajno smanjenje produkcije T+DHT u odnosu na kontrolne vrednosti (Sl. 4.8).



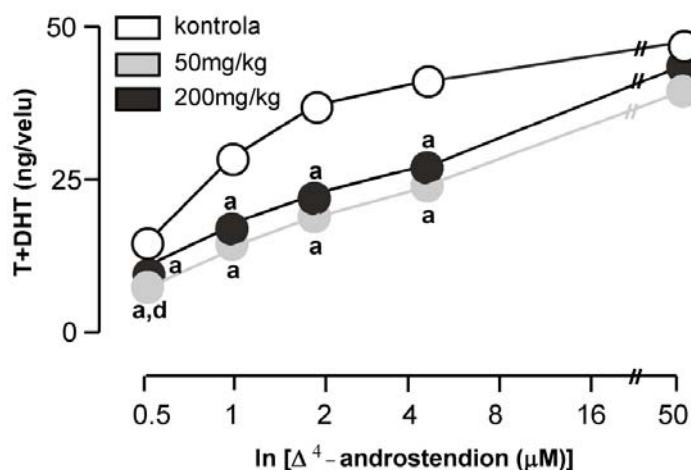
Slika 4.8. Efekat *po*-administracije atrazina na produkciju testosterona u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu progesterona kao supstrata.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane u mikrotitar pločama (50000 LC/ploči) u prisustvu različitih koncentracija progesterona kao supstrata, tokom 2 h. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 24 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta, a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 5-8 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja.

4.1.6. Efekat *in vivo* primene atrazina na *ex vivo* produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu androstendiona kao supstrata

Inkubacija Leydig-ovih ćelija u prisustvu rastućih koncentracija androstendiona kao supstrata dovela je do dozno-zavisnog povećanja produkcije T+DHT u ćelijama izolovanim iz kontrolnih i tretiranih životinja. Rezultati pokazuju da su Leydig-ove ćelije tretiranih životinja pokazale manji odgovor u odnosu na kontrolne vrednosti u prisustvu manjih koncentracija androstendiona. Naime, produkcija androgena u prisustvu koncentracija androstendiona do

5 μM , bila je u Leydig-ovim ćelijama tretiranih životinja signifikantno manja ($p < 0.001$) u odnosu na kontrolu. Međutim, u prisustvu saturacionih koncentracija androstendiona (50 μM), atrazin nije izazvao inhibiciju produkcije T+DHT (Sl. 4.9).

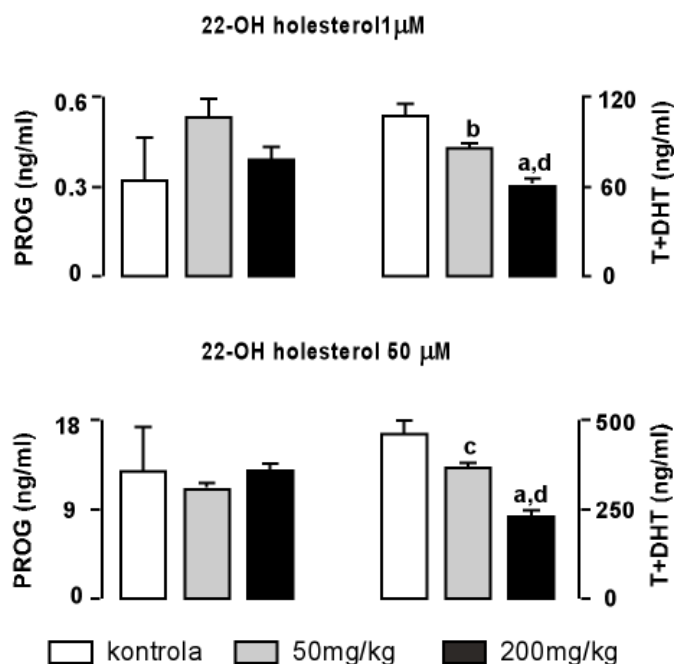


Slika 4.9. Efekat *po*-administracije atrazina na produkciju testosterona u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu androstendiona kao supstrata.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane u mikrotitar pločama (50000 LC/ploči) u prisustvu različitih koncentracija androstendiona kao supstrata, tokom 2 h. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 24 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta, a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 5-8 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

4.1.7. Efekat atrazina na *ex vivo* konverziju 22OH-holesterola u progesteron i testosteron u Leydig-ovim ćelijama kontrolnih i atrazinom-tretiranih životinja

Ispitivanjem aktivnosti različitih steroidogenih enzima, zapaženo je da su Leydig-ove ćelije izolovane iz atrazinom-tretiranih životinja pokazale statistički značajnu inhibiciju produkcije testosterona u prisustvu 22OH-holesterola kao supstrata (Sl. 4.6). Dodatno, da bi se ispitao efekat atrazina na 22OH-holesterolom-potpomognutu produkciju progesterona, Leydig-ove ćelije izolovane iz kontrolnih i atrazinom-tretiranih životinja inkubirane su u prisustvu 22OH-holesterola (1 μM i 50 μM) u trajanju od 2 h. Rezultati pokazuju da se produkcija progesterona ne menja u prisustvu 22OH-holesterola kao steroidnog supstrata, dok je produkciju androgena smanjena kod Leydig-ovih ćelija izolovanih iz atrazinom-tretiranih životinja u odnosu na kontrolne vrednosti (Sl. 4.10.).



Slika 4.10. Efekat atrazina na *ex vivo* konverziju 22OH-holesterola (1 μM i 50 μM) u progesteron i testosteron u Leydig-ovim ćelijama kontrolnih i atrazinom-tretiranih životinja.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane u 50-mm petri pločama (1×10^6 LC/ploči) u prisustvu 22OH-holesterola (1 μM i 50 μM) kao supstrata, u trajanju od 2 h. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 9-18 replikata (3-6 replikata po eksperimentu) dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta, a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 5 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$, b= $p < 0.01$, c= $p < 0.05$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

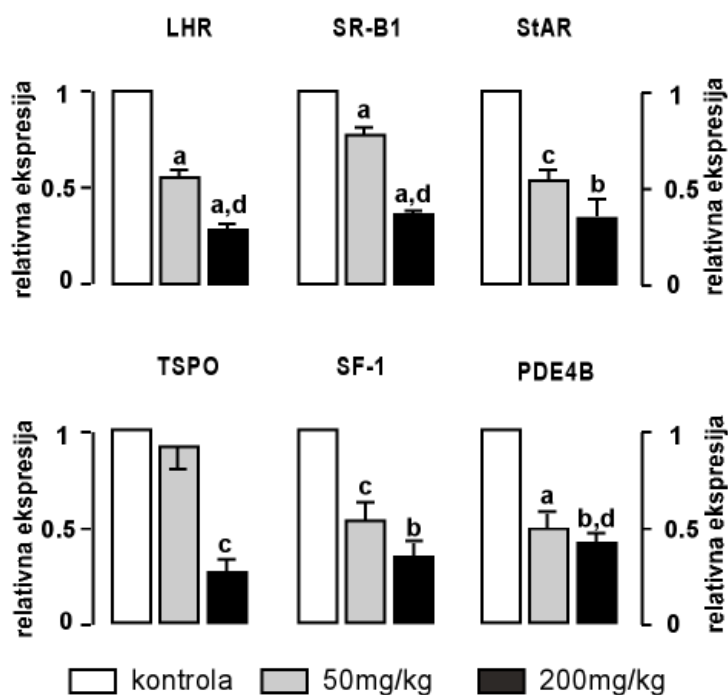
4.1.8. Efekat *in vivo* primene atrazina na ekspresiju gena odgovornih za proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova

U cilju ispitivanja uticaja oralne aplikacije atrazina u trajanju od 28 dana, na ekspresiju gena za steroidogene enzime, StAR protein i druge regulatorne proteine koji učestvuju u cAMP-signalnom putu kontrole steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama, ćelije (2.5×10^6 LC/petri ploči) kontrolnih i atrazinom-tretiranih životinja sadene su u petri ploče i inkubirane u prisustvu 10 ng/ml hCG.

Dobijeni rezultati pokazuju da je došlo do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena za LHR, i to 45% kod životinja tretiranih atrazinom u dozi od 50 mg/kg i 72% kod životinja tretiranih atrazinom u dozi od 200 mg/kg u odnosu na kontrolne vrednosti. Takođe, dozno-zavisno smanjenje primećeno je i u slučaju ekspresije gena za SR-B1, proteina uključenog u transport holesterola kroz plazma membranu, i to 23% kod životinja tretiranih atrazinom u

dozi od 50 mg/kg i 64% kod životinja tretiranih atrazinom u dozi od 200 mg/kg. Dobijeni rezultati su pokazali da je ekspresija gena uključenih u transport holesterola do unutrašnje mitohondrijalne membrane, signifikantno redukovana u Leydig-ovim ćelijama atrazinom-tretiranih životinja. Ekspesija gena za StAR bila je smanjena kod obe grupe tretiranih životinja, 47% kod životinja tretiranih atrazinom u dozi od 50 mg/kg i 66% kod životinja tretiranih atrazinom u dozi od 200 mg/kg. U slučaju TSPO, smanjena ekspresija za 74% primećena je samo u grupi životinja tretiranih većom dozom atrazina. Rezultati pokazuju da je kod obe grupe životinja tretiranih atrazinom došlo do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena za SF-1, 47% kod životinja tretiranih manjom, odnosno 66% kod životinja tretiranih većom dozom atrazina (Sl. 4.11).

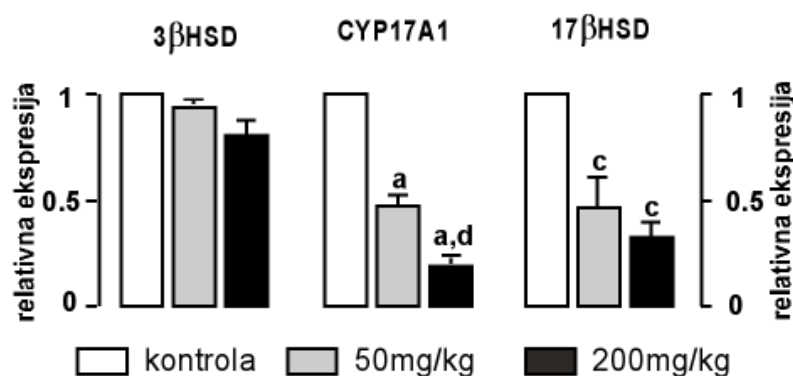
Takođe, u radu je ispitana i ekspresija cAMP-specifične forme fosfodiesteraze, PDE4B koja se ekspresuje u Leydig-ovim i Sertolijevim ćelijama. Pokazano je da su obe doze atrazina imale sličnu efikasnost u redukciji ekspresije gena za PDE4B, 51% kod životinja tretiranih manjom, odnosno 59% kod životinja tretiranih većom dozom atrazina (Sl. 4.11).



Slika 4.11. Efekat *in vivo* primene atrazina na ekspresiju gena za LHR, SR-B1, StAR, TSPO, SF-1 i PDE4B u Leydig-ovim ćelijama.

Ukupna RNK izolovana je iz purifikovanih LC kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom, inkubiranih u 50-mm petri pločama (2.5×10^6 LC/ploči) u prisustvu 10ng/ml hCG, u trajanju od 2 h. RT-QPCR urađen je upotrebom SYBR Green tehnologije u prisustvu specifičnih prajmera. Izračunavanje nivoa relativne ekspresije ciljnog gena vršena je na osnovu $\Delta\Delta C_t$ metode, β -aktin korišćen je kao endogena kontrola. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz 3 nezavisna eksperimenta, a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 5-8 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$, b= $p < 0.01$, c= $p < 0.05$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

Ispitivanjem efekta atrazina na ekspresiju steroidogenih enzima, pokazano je da u slučaju 3 β HSD, enzima koji katališe konverziju pregnenolona u progesteron, nije bilo promene u ekspresiji gena u odnosu na kontrolu. Međutim, obe doze atrazina bile su efikasne u redukciji ekspresije gena za enzime CYP17A1 i 17 β HSD. Ekspresija CYP17A1 bila je inhibisana za 53% kod životinja tretiranih atrazinom u dozi od 50 mg/kg i 81% kod životinja tretiranih atrazinom u dozi od 200 mg/kg, a ekspresija 17 β HSD za 54% kod životinja tretiranih manjom, odnosno 68% kod životinja tretiranih većom dozom atrazina (Sl. 4.12).



Slika 4.12. Efekat *in vivo* primene atrazina na ekspresiju gena za 3 β HSD, CYP17A1 i 17 β HSD u Leydig-ovim ćelijama.

Ukupna RNK izolovana je iz purifikovanih LC kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom inkubiranih u 50-mm petri pločama (2.5×10^6 LC/ploči) u prisustvu 10ng/ml hCG, u trajanju od 2 h. RT-QPCR urađen je upotrebom SYBR Green tehnologije u prisustvu specifičnih prajmera. Izračunavanje nivoa relativne ekspresije ciljnih gena vršena je na osnovu $\Delta\Delta C_t$ metode, β -aktin korišćen je kao endogena kontrola. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz 3 nezavisna eksperimenta, a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 5-8 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$, b= $p < 0.01$, c= $p < 0.05$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

4.1.9. Efekat *in vivo* primene atrazina na težinu androgen-zavisnih organa i telesnu masu

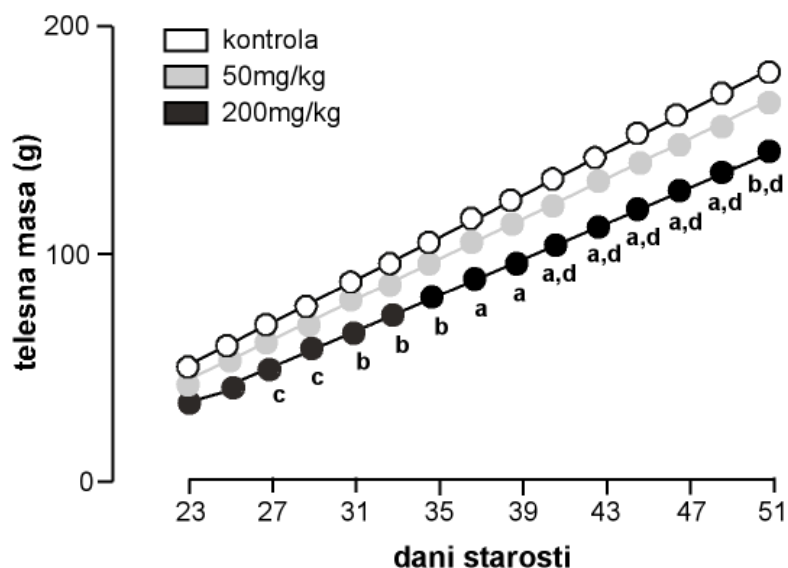
Kao što je prikazano u tabeli 4.1. atrazin prouzrokuje smanjenje mase androgen zavisnih organa. Naime, tretman sa atrazinom statistički značajno redukuje relativnu masu testisa, semenih vezikula, kao i ventralne prostate u dozno-zavisnom maniru. Takođe, redukovana je i masa dorzalne prostate kod životinja tretiranih atrazinom u dozi od 200 mg/kg. Dodatno, rezultati pokazuju povećanje mase adrenalnih žlezda kod životinja tretiranih sa obe doze atrazina.

Merenjem telesne mase kako kontrolnih tako i atrazinom tretiranih životinja, svaki drugi dan od početka tretmana (od 23. do 51. dana starosti) pokazano je da je došlo do statistički značajnog smanjenja telesne mase kod životinja koje su primale veću dozu atrazina počevši od 27. dana starosti pa sve do kraja tretmana, kao i 24 h nakon poslednje oralne aplikacije atrazina (Sl. 4.13).

Tabela 4.1. Efekat *in vivo* primene atrazina na težinu androgen-zavisnih organa

Tretman	Testis (mg/100g tm ¹)	Semene vezikule (mg/100g tm)	Ventralna prostata (mg/100g tm)	Dorzalna prostata (mg/100g tm)	Adrenalne žlezde (mg/100g tm)
Kontrola	483,69±6,92	33,31±2,01	51,63±4,92	21,31±1,77	12,73±1,3
50mg/kg	445,25±10,6 ^a	23,36±1,33 ^c	40,17±2,66 ^a	18,47±1,62	19,96±1,56 ^b
200mg/kg	433,43±16,02 ^b	13,22±0,84 ^{c,d}	33,98±2,86 ^b	13,53±1,2 ^{c,d}	24,75±2,39 ^c

Brojevi predstavljaju ± SEM od 2 nezavisna eksperimenta (8 životinja po eksperimentu). *I* - telesne mase. Signifikantnost: a= $p < 0.05$, b = $p < 0.01$, c = $p < 0.001$ između kontrole i atrazinom tretiranih životinja, i d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa životinja.



Slika 4.13. Efekat *po*-administracije atrazina na telesnu masu tokom i 24 h posle tretmana.

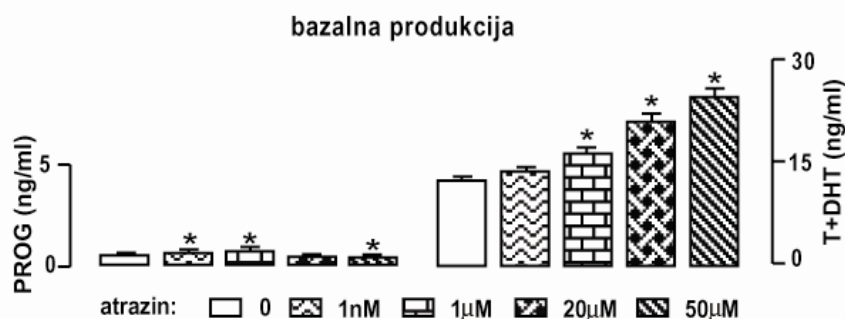
Eksperimentalne životinje su tretirane atrazinom tokom 28 dana, a žrtvovane su 24 h nakon poslednjeg tretmana. Telesne mase merene su svaki drugi dan počev od 23. do 51. dana starosti. Kružići predstavljaju srednju vrednost±SEM od 43 životinje, iz 8 nezavisnih eksperimenta, a u svakom eksperimentu bilo je od 4-8 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$, b = $p < 0.01$, c = $p < 0.001$ između kontrole i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa.

4.2. Efekat *in vitro* primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova

U cilju ispitivanja direktnog *in vitro* efekta atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama korišćene su peripubertalne životinje starosti 51 dan. Nakon žrtvovanja, testisi su izdvojeni, dekapulirani, Leydig-ove ćelije su purifikovane i inkubirane u prisustvu različitih koncentracija atrazina u trajanju od 24 h. Rezultati MTT testa pokazali su da ispitivane doze atrazina nisu ispoljile citotoksičnost na nivou Leydig-ovih ćelija nakon dvadesetčetvoročasovnog tretmana sa ovim herbicidom. Nakon toga vršena je dvočasovna stimulacija sa različitim koncentracijama hCG-a ili sa steroidnim supstratima u prisustvu odgovarajućih doza atrazina. Nakon tretmana meren je nivo progesterona i testosterona, kao i cAMP. Takođe, u *in vitro* eksperimentima praćena je ekspresija gena odgovornih za proces steroidogeneze kod kontrolnih i atrazinom tretiranih ćelija.

4.2.1. Efekat *in vitro* primene atrazina na bazalnu i hCG-stimulisanu produkciju progesterona, testosterona i cAMP u Leydig-ovim ćelijama

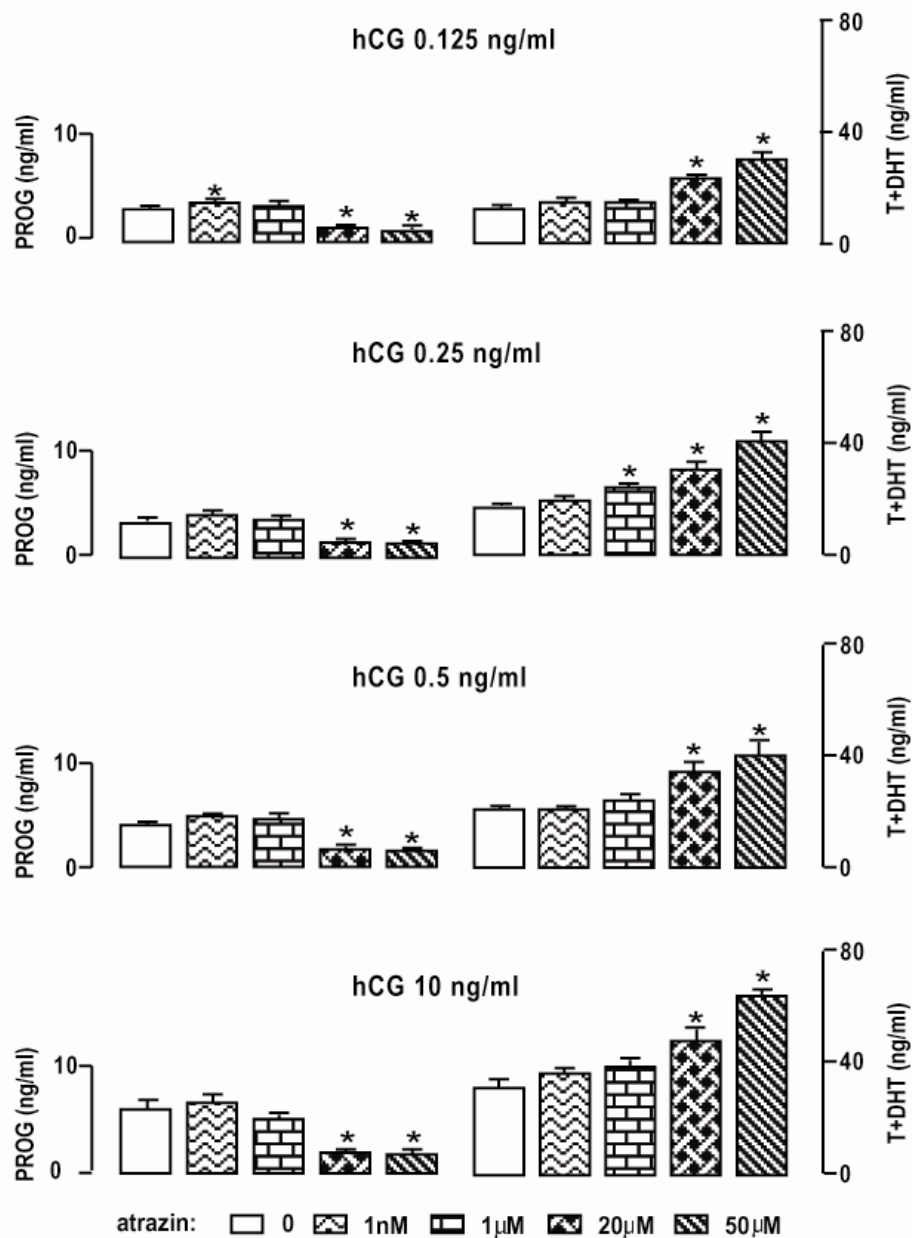
Leydig-ove ćelije su inkubirane u prisustvu različitih koncentracija atrazina u trajanju od 24 h. Dobijeni rezultati pokazuju da atrazin utiče na povećanje bazalne produkcije testosterona i da je povećanje dozno-zavisno u odnosu na kontrolne vrednosti. Sa druge strane, bazalna produkcija progesterona ima bifazni efekat, stimulisana je pri manjim dozama, a inhibirana u prisustvu većih doza atrazina (Sl. 4.14).



Slika 4.14. Efekat *in vitro* primene atrazina na bazalnu produkciju progesterona i testosterona nakon 24 h inkubacije Leydig-ovih ćelija

Purifikovane LC dobijene od životinja starih 51. dan, inkubirane su u 50-mm petri pločama (1×10^6 ćelija/petri ploči) u prisustvu različitih koncentracija atrazina tokom 24 h. Nivo androgena i progesterona je određena RIA metodom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 28-60 replikata dobijenih iz 4 nezavisna eksperimenta (7-15 replikata po eksperimentu), a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 8 životinja. Signifikantnost: * $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih ćelija i kontrole.

U cilju ispitivanja hCG-stimulisane produkcije progesterona i testosterona, Leydig-ove ćelije inkubirane su u prisustvu različitih koncentracija atrazina u trajanju od 24 h. Nakon toga vršena je dvočasovna stimulacija različitim koncentracijama hCG-a u prisustvu odgovarajućih doza atrazina. U inkubacionom medijumu ovih ploča nakon tretmana meren je nivo navedenih hormona.

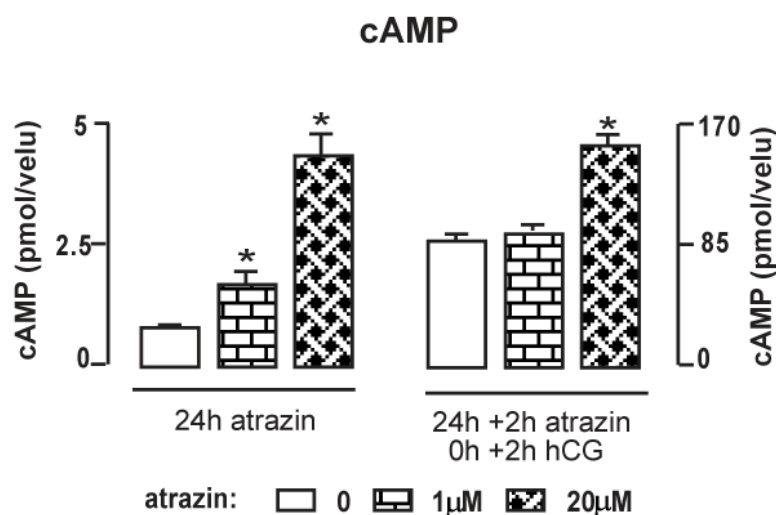


Slika 4.15. Efekat *in vitro* primene atrazina na produkciju progesterona i testosterona u prisustvu različitih koncentracija hCG.

Purifikovane LC dobijene od životinja starih 51. dan, inkubirane su u 50-mm petri pločama (1×10^6 ćelija/petri ploči) u prisustvu različitih koncentracija atrazina tokom 24 h, a nakon toga 2 h u prisustvu atrazina i hCG. Nivo androgena i progesterona je određena RIA metodom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 9 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta (3 replikata po eksperimentu), a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 8 životinja. Signifikantnost: * $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih ćelija i kontrole.

Dobijeni rezultati pokazuju da atrazin utiče na povećanje produkcije testosterona i da je povećanje dozno-zavisno u odnosu na kontrolne vrednosti nakon dvadesetčetvoročasovnog izlaganja atrazinu i dodatnog dvočasovnog izlaganja atrazinu i različitim koncentracijama hCG. Sa druge strane, hCG-stimulisana produkcija progesterona je bila inhibisana u prisustvu većih doza atrazina, pri svim ispitivanim koncentracijama hCG (Sl. 4.15.).

Merenje nivoa ekstracelularnog cAMP u medijum nakon 24-časovnog tretmana atrazinom, ukazuje na dozno-zavisno povećanje cAMP u inkubacionom medijumu kod atrazinom tretiranih ćelija u odnosu na kontrolu. Merenjem nivoa cAMP u medijumu nakon dodatne dvočasovne stimulacije sa hCG 10 ng/ml i odgovarajućom dozom atrazina ukazuju na značajno povećanje cAMP pri koncentraciji atrazina od 20 μ M, u odnosu na kontrolne vrednosti (Sl. 4.16.).

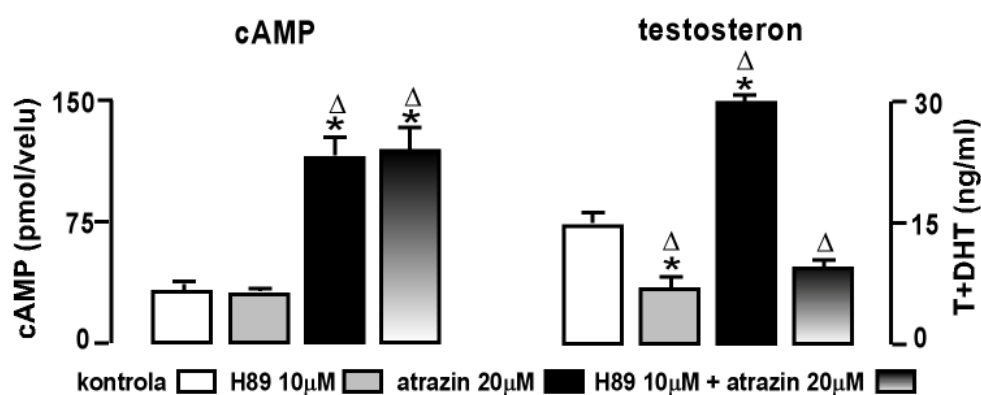


Slika 4.16. Efekat *in vitro* primene atrazina na bazalnu i hCG-stimulisanu akumulaciju cAMP u medijumu Leydig-ovih ćelija.

Purifikovane LC dobijene od životinja starih 51. dan, inkubirane su u 50-mm petri pločama (1×10^6 ćelija/ploči) u prisustvu različitih koncentracija atrazina tokom 24 h, a nakon toga 2 h u prisustvu atrazina i 10 ng/ml hCG. Nivo cAMP je određena EIA metodom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 22 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta (6-8 replikata po eksperimentu), a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 8 životinja. Signifikantnost: * $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih ćelija i kontrole.

U cilju bližeg definisanja mesta delovanja atrazina u okviru cAMP-zavisnog signalnog puta, postavljen je eksperiment sa inhibitorom PKA (H89). Nakon 24-časovnog tretmana sa 20 μ M atrazina, ćelije su tokom naredna 2 h tretirane istom dozom atrazina samostalno ili u kombinaciji sa 10 μ M H89, u prisustvu saturacione doze hCG (10 ng/ml). Paralelno je rađena i inkubacija kontrolnih ćelija u prisustvu hCG ili H89, samostalno ili u kombinaciji. Merenje

nivoa cAMP u medijumu ukazalo je na očekivano povećanje cAMP u inkubacionom medijumu kod atrazinom tretiranih ćelija, kao i kod ćelija tretiranih sa kombinacijom atrazina i inhibitora PKA, u odnosu na kontrolne vrednosti. Takođe, inkubacija ćelija u prisustvu atrazina i hCG dovela je do značajnog povećanja testosterona u odnosu na kontrolne vrednosti (Sl. 4.17), kao i u prethodnim eksperimentima (Sl.4.15). Tretman Leydig-ovih ćelija sa 10 μ M H89 u prisustvu hCG doveo je do očekivanog smanjenja produkcije testosterona u odnosu na ćelije tretirane samo sa hCG. H89 je sprečio atrazinom-indukovano povećanje produkcije testosterona, a vrednost nije bila statistički različita u odnosu na produkciju kod ćelija tretiranih sa H89 u prisustvu hCG (Sl. 4.17).



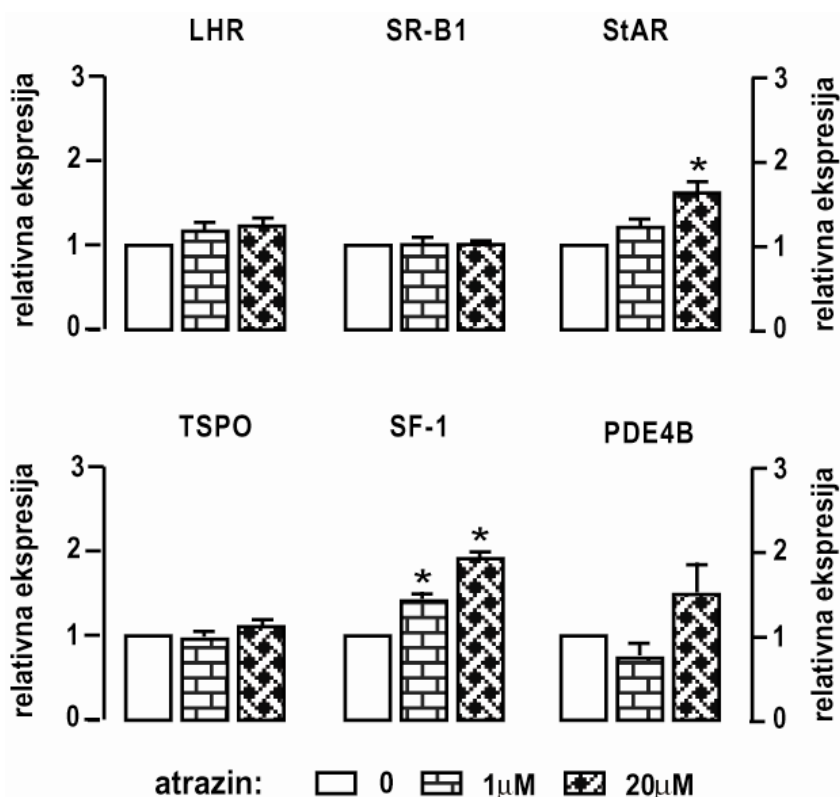
Slika 4.17. Efekat inhibitora PKA (H89) na atrazin-stimulisanu produkciju cAMP i testosterona u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu 10ng/ml hCG.

Purifikovane LC dobijene od životinja starih 51. dan, inkubirane su u 50-mm petri pločama (1 x10⁶ ćelija/ploči) u prisustvu 20 μ M atrazina tokom 24 h, a nakon toga 2 h u prisustvu 20 μ M atrazina ili 10 μ M H89 samostalno ili u kombinaciji, u prisustvu 10ng/ml hCG. Nivo T+DHT je određen RIA metodom. Nivo cAMP je određena EIA metodom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 5 replikata po eksperimentu. LC su dobijene od 12 životinja. Signifikantnost: * p<0.05 između tretiranih ćelija i kontrole (Duncan test); Δ p<0.05 između tretiranih ćelija i kontrole (Mann-Whitney test).

4.2.2. Efekat *in vitro* primene atrazina na ekspresiju gena odgovornih za proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova

Da bi se ispitaio direktan uticaj atrazina na ekspresiju gena za steroidogene enzime, StAR protein i druge regulatorne proteine koji učestvuju u cAMP-signalnom putu kontrole steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama, ukupna RNK je izolovana iz Leydig-ovih ćelija koje

su sađene u koncentraciji od 2.5×10^6 LC/petri ploči i tretirane sa određenim koncentracijom atrazina tokom 24 h, a zatim sa atrazinom i hCG (10 ng/ml) naredna dva sata.

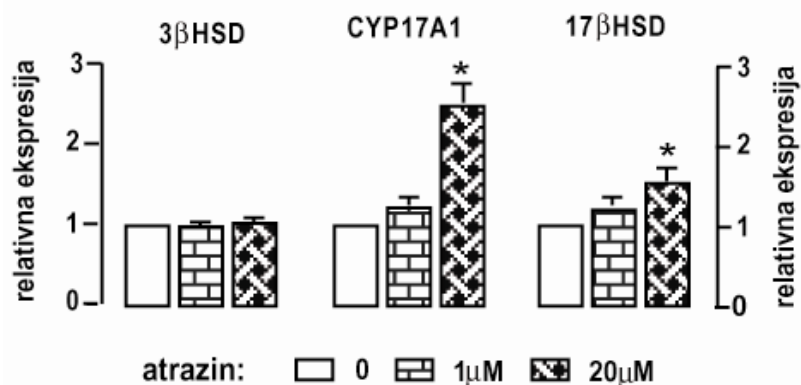


Slika 4.18. Efekat *in vitro* primene atrazina na ekspresiju gena za LHR, SR-B1, StAR, TSPO, SF-1 i PDE4B u Leydig-ovim ćelijama.

Ukupna RNK izolovana je iz purifikovanih LC dobijenih od životinja starih 51.dan. LC sađene su u 50-mm petri pločama (2.5×10^6 LC/ploči), tretirane su sa dve doze atrazina (1 μM i 20 μM) 24 h, a nakon toga 2 h u prisustvu atrazina i 10ng/ml hCG. RT-QPCR urađen je upotrebom SYBR Green tehnologije u prisustvu specifičnih prajmera. Izračunavanje nivoa relativne ekspresije ciljnog gena vršena je na osnovu $\Delta\Delta C_t$ metode, β -aktin korišćen je kao endogena kontrola. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz 3 nezavisna eksperimenta. Signifikantnost: * $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih ćelija i kontrole

Dobijeni rezultati pokazuju da je u prisustvu obe doze atrazina došlo do statistički značajnog povećanja ekspresije gena za SF-1, 141% u Leydig-ovim ćelijama tretiranim atrazinom u dozi od 1 μM i 191% u Leydig-ovim ćelijama tretiranim atrazinom u dozi od 20 μM. Ekspesija gena za StAR, proteina uključenog u transport holesterola do unutrašnje mitohondrijalne membrane, bila je značajno povećana samo pri većoj dozi atrazina (Sl. 4.18.).

Međutim, ekspresija gena za LHR, kao i ekspresija gena uključenih u transport holesterola: SR-B1 i TSPO nije bila promenjena nakon tretmana Leydig-ovih ćelija sa atrazinom, kao ni ekspresija gena za PDE4B (Sl. 4.18.).



Slika 4.19. Efekat *in vitro* primene atrazina na ekspresiju gena za steroidogene enzime 3βHSD, CYP17A1 i 17βHSD u Leydig-ovim ćelijama.

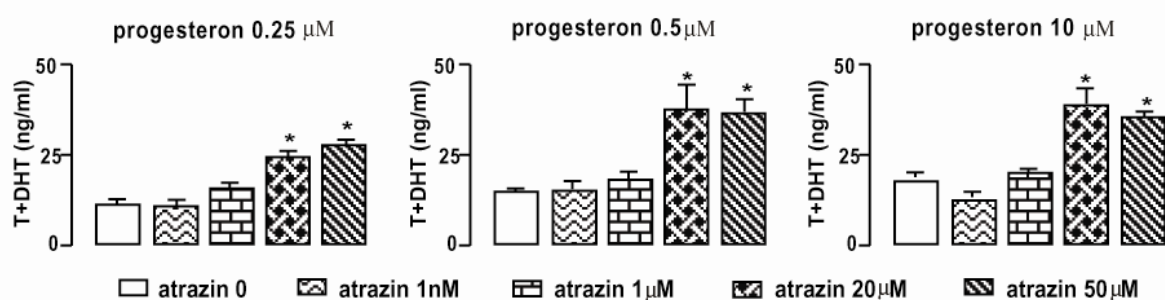
Ukupna RNK izolovana je iz purifikovanih LC dobijenih od životinja starih 51. dan. LC su sadene u 50-mm petri pločama (2.5×10^6 LC/ploči), tretirane su sa dve doze atrazina (1 μM i 20 μM) 24 h, a nakon toga 2 h u prisustvu atrazina i 10 ng/ml hCG. RT-QPCR urađen je upotrebom SYBR Green tehnologije u prisustvu specifičnih prajmera. Izračunavanje nivoa relativne ekspresije ciljnog gena vršena je na osnovu $\Delta\Delta C_t$ metode, β-aktin korišćen je kao endogena kontrola. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz 3 nezavisna eksperimenta. Signifikantnost: * $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih ćelija i kontrole.

Nasuprot tome, veća doza atrazina bila je efikasna u indukciji gena za enzim CYP17A1, koji katališe konverziju progesterona u androstendion, i to 247% u odnosu na kontrolne vrednosti. Dalja konverzija androstendiona u testosteron katalisana je enzimom 17βHSD čija je ekspresija bila povećana 153% samo pri dozi atrazina od 20 μM. U slučaju 3βHSD, enzima koji katališe konverziju pregnenolona u progesteron, nije bilo promene u ekspresiji gena u odnosu na kontrolu (Sl. 4.19). Dodatno je ispitana i ekspresija gena za CYP19A1, enzima koji katališe konverziju androgena u estrogene, obzirom da je u mnogim radovima pokazan efekat atrazina na ovaj enzim. Dobijeni rezultati ukazali su da je ekspresija ovog enzima ostala nepromenjena nakon direktnog 24-časovnog tretmana sa atrazinom i dodatne stimulacije sa hCG (rezultati nisu prikazani).

4.2.3. Efekat *in vitro* primene atrazina na produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu progesterona kao supstrata

Rezultati genske ekspresije pokazali su da se ekspresija gena za CYP17A1 povećava 2.5 puta u odnosu na kontrolu. Stoga je praćen uticaj atrazina na konverziju progesterona u testosteron, kao pokazatelja aktivnosti ovog enzima.

Da bi se ispitaio efekat atrazina na progesteronom-potpomognutu produkciju testosterona, Leydig-ove ćelije inkubirane su najpre u prisustvu različitih koncentracija atrazina u trajanju od 24 h. Tretman je nastavljen dvočasovnom inkubacijom ćelija sa odgovarajućom koncentracijom atrazina i različitim koncentracijama progesterona. Rezultati pokazuju da atrazin izaziva povećanje produkcije testosterona u prisustvu progesterona kao supstrata, pri čemu je dozna-zavisnost izraženija u prisustvu nižih koncentracija progesterona (Sl. 4.20.).



Slika 4.20. Efekat *in vitro* primene atrazina na produkciju testosterona u prisustvu progesterona kao supstrata

Purifikovane LC dobijene od životinja starih 51. dan, inkubirane su u 50-mm petri pločama (1×10^6 ćelija/petri ploči) u prisustvu različitih koncentracija atrazina tokom 24 h, a nakon toga 2 h u prisustvu atrazina i različitih koncentracija progesterona kao supstrata. Nivo androgena je određen RIA metodom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 9 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta (3 replikata po eksperimentu), a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 8 životinja. Signifikantnost: * $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih ćelija i kontrole.

4.2.4. Efekat *in vitro* primene atrazina na produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama u prisustvu androstendiona kao supstrata

Da bi se ispitaio efekat atrazina na aktivnost 17β HSD praćena je konverzija androstendiona u testosteron. Leydig-ove ćelije inkubirane su najpre u prisustvu različitih koncentracija atrazina u trajanju od 24 h. Tretman je nastavljen dvočasovnom inkubacijom ćelija sa odgovarajućom koncentracijom atrazina i različitim koncentracijama androstendiona. Pri manjoj koncentraciji androstendiona uočava se povećana produkcija testosterona pri dozi atrazina od $1 \mu\text{M}$ i $20 \mu\text{M}$, dok je pri većim koncentracijama androstendiona stimulacija produkcije testosterona statistički značajna samo pri tretmanu Leydig-ovih ćelija sa $20 \mu\text{M}$ atrazinom (Sl. 4.21.).

Dakle, rezultati pokazuju da atrazin izaziva povećanje produkcije testosterona u prisustvu androstendiona kao supstrata, pri čemu je povećanje koncentracije testosterona manje izraženo nego u prisustvu progesterona kao supstrata.



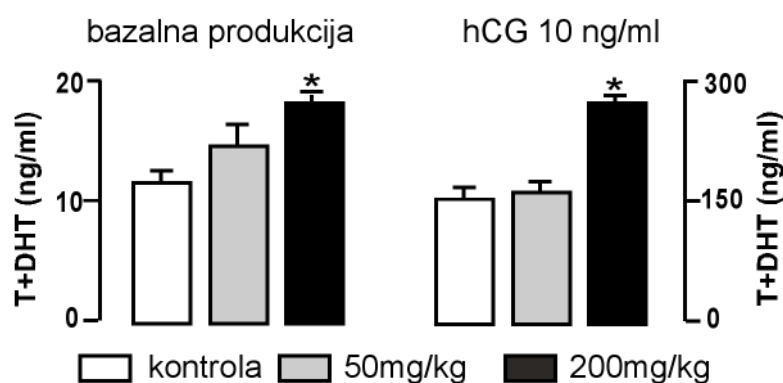
Slika 4.21. Efekat *in vitro* primene atrazina na produkciju testosterona u prisustvu androstendiona kao supstrata

Purifikovane LC dobijene od životinja starih 51. dan, inkubirane su u 50-mm petri pločama (1×10^6 ćelija/petri ploči) u prisustvu različitih koncentracija atrazina tokom 24 h, a nakon toga 2 h u prisustvu atrazina i različitih koncentracija androstendiona kao supstrata. Nivo androgena je određen RIA metodom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 9 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta (3 replikata po eksperimentu), a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 8 životinja. Signifikantnost: * $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih ćelija i kontrole.

4.3. Efekat jednokratne *in vivo* primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova

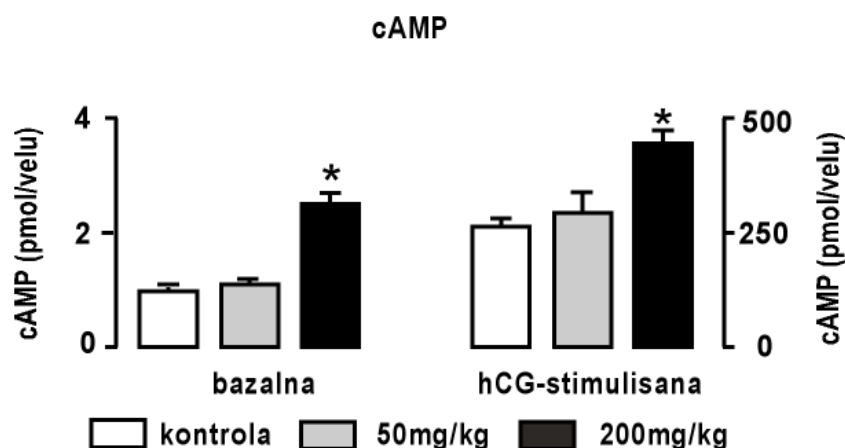
Kako su rezultati *in vitro* analize pokazali da atrazin posle dvadesetčetvoročasovnog tretmana stimuliše testikularnu steroidogenezu, a sa druge strane, prolongirani 28-dnevni *in vivo* tretman atrazinom izaziva suprotan efekat, odnosno inhibiciju androgeneze u Leydig-ovim ćelijama, postavljen je *in vivo* eksperiment u trajanju od 24 h.

U cilju ispitivanja kratkotrajnog *in vivo* efekta atrazina, mužjaci pacova tretirani su *po* 50. dana starosti, atrazinom u dozi od 50 mg/kg i 200 mg/kg telesne mase. Životinje su žrtvovane 24 h nakon jednokratnog tretmana. Leydig-ove ćelije su purifikovane, i praćena je *ex vivo* produkcija testosterona i cAMP u bazalnim i hCG-stimulisanim uslovima, kao i ekspresija gena za steroidogene enzime, StAR protein i druge regulatorne proteine koji učestvuju u cAMP-signalnom putu kontrole steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama. Leydig-ove ćelije su sađene u koncentraciji od 2.5×10^6 LC/petri ploči i stimulisane sa hCG (10 ng/ml) u trajanju od dva sata.



Slika 4.22. Efekat jednokratne primene atrazina na *ex vivo* bazalnu i hCG-stimulisanu produkciju testosterona u Leydig-ovim ćelijama.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane sa ili bez prisustva 10ng/ml hCG u 50-mm petri pločama (2.5×10^6 LC/petri ploči) u trajanju od 2 h. Nivo androgena je određen RIA metodom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 16 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta (4-8 replikata po eksperimentu), a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 4-5 životinja po grupi. Signifikantnost: * $p < 0.05$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja.



Slika 4.23. Efekat jednokratne primene atrazina na *ex vivo* bazalnu i hCG-stimulisanu akumulaciju cAMP u medijumu Leydig-ovih ćelija.

Purifikovane LC su izolovane iz testisa kontrolnih i životinja tretiranih atrazinom i inkubirane u 50-mm petri pločama (2.5×10^6 LC/ploči) sa i bez prisustva 10ng/ml hCG, u trajanju od 2 h. Nivo cAMP je određen ELISA metodom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM od 24 replikata dobijenih iz 3 nezavisna eksperimenta, a iz svakog eksperimenta LC su dobijene od 4-5 životinja po grupi. Signifikantnost: a= $p < 0.001$ između kontrolnih i atrazinom tretiranih životinja, d= $p < 0.05$ između atrazinom tretiranih grupa životinja.

Dobijeni rezultati pokazuju da je jednokratna *in vivo* primena veće doze atrazina prouzrokovala značajno povećanje *ex vivo* produkcije testosterona u Leydig-ovim ćelijama kako u bazalnim, tako i u hCG-stimulisanim uslovima u odnosu na kontrolu (Sl. 4.22.). Paralelno sa stimulisanom produkcijom androgena u Leydig-ovim ćelijama izolovanim iz atrazinom-tretiranih životinja, došlo je i do povećanja ekstracelularnog nivoa cAMP, kako u bazalnim, tako i u hCG stimulisanim uslovima. (Sl. 4.23).

Rezultati RT-QPCR analize pokazali su da nije došlo do promene u ekspresiji gena za LHR, SF-1, kao i gena uključenih u transport holesterola: SR-B1, StAR i TSPO nakon jednokratnog *in vivo* tretmana Leydig-ovih ćelija atrazinom. U radu je bila analizirana i ekspresija gena za PDE4B, CYP19A1, kao i 3β HSD, CYP17A1 i 17β HSD i rezultati su ukazali na odsustvo promena u odnosu na kontrolne vrednosti (rezultati nisu prikazani).

5. DISKUSIJA

5.1. Efekat 28-dnevne *in vivo* primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova

I pored brojnih literaturnih podataka o smanjenju nivoa testosterona u serumu peripubertalnih mužjaka pacova nakon *in vivo* primene atrazina (Friedmann, 2002; Stoker i sar., 2000; Trentacoste i sar., 2001; Rosenberg i sar., 2008), ne mogu se pretpostaviti mogući mehanizmi inhibitorynog delovanja ovog herbicida. Stoga je jedan deo ove doktorske disertacije bio usmeren na moguće efekte 28-dnevne *in vivo* primene atrazina na ekspresiju gena za steroidogene enzime u Leydig-ovim ćelijama, kao i na cAMP-signalni put kontrole steroidogeneze.

Nakon *in vivo* tretmana atrazinom, izolovane su Leydig-ove ćelije i izmerena je *ex vivo* produkcija progesterona i testosterona nakon dva časa inkubacije u bazalnim i hCG-stimulisanim uslovima, nivo cAMP u medijumu, praćena je steroidogena aktivnost Leydig-ovih ćelija u prisustvu različitih steroidogenih supstrata, kao i ekspresija gena za steroidogene enzime i druge regulatorne proteine odgovorne za proces steroidogeneze.

Steroidogeneza u Leydig-ovim ćelijama primarno je regulisana interakcijom gonadotropnog hormona LH sa svojim receptorom, LHR, što indukuje aktivaciju G proteina koji u sledećem koraku, stimuliše adenilil ciklazu (AC). Povećava se nivo intracelularnog cAMP i aktivira se protein kinaza A (PKA). Iako postoje brojni drugi, cAMP-nezavisni signalni putevi uključeni u proces regulacije steroidogeneze, cAMP/PKA signalni put je bez sumnje najvažniji put regulacije steroidogeneze (Manna i sar., 2006, 2007). Biosinteza testosterona zavisi kako od akutne tako i od hronične stimulacije Leydig-ovih ćelija od strane LH (Stocco i sar., 2005). Akutni odgovor počinje mobilizacijom i dostavljanjem holesterola, potrebnog za biosintezu svih steroidnih hormona, sa spoljašnje do unutrašnje mitohondrijalne membrane, gde se metabolizuje do pregnenolona (uz učešće enzima P450_{scc}) (Stocco i sar., 2005). Pod hroničnim odgovorom se podrazumeva povećana transkripcija/translacija gena, i to u prvom redu steroidogenih enzima koji su potrebni za biosintezu testosterona od holesterola.

Rezultati naših istraživanja pokazuju da 28-dnevna primena atrazina tokom prepubertalnog perioda razvoja mužjaka pacova dovodi do statistički značajnog smanjenja ekspresije brojnih gena odgovornih za proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama, dozno-zavisnog smanjenja nivoa cAMP i snažne inhibicije androgenoze u prisustvu hCG ali i ostalih steroidnih supstrata. Transkripcija gena za LHR u Leydig-ovim ćelijama atrazinom-tretiranih životinja značajno je smanjena u dozno-zavisnom maniru što bi mogao biti razlog za redukciju nivoa cAMP. Sa druge strane, poznato je da cAMP/PKA put stimuliše ekspresiju gena za StAR protein (Rao i sar., 2003; Stocco i sar., 2005), SR-B1 (Azhar i Reaven, 2002; Rao i sar., 2003) i SF-1 (Lehmann i sar., 2005; Urs i sar., 2007). Naši rezultati koji ukazuju na smanjenje ekspresije gena za StAR protein, SR-B1 i SF-1 u okruženju smanjenog nivoa cAMP u Leydig-ovim ćelijama atrazinom-tretiranih životinja, potvrda su takvih odnosa. Dakle, može se pretpostaviti da smanjena koncentracija cAMP dovodi do smanjene ekspresije datih gena. Osim toga, poznato je da SF-1 kontroliše ekspresiju gena odgovornih za proces steroidogeneze, uključujući gen za CYP17A1 (Li i sar., 2007; Sewer i Jagarlapudi, 2009), StAR, CYP11A1 (Suzawa i Ingraham, 2008) i SR-B1 (Azhar i Reaven, 2002). Rezultati dobijeni u ovom radu pokazali su dozno-zavisno smanjenje ekspresije pomenutih gena: CYP17A1, StAR i SR-B1 kod pacova izloženih uticaju atrazina, izuzev za CYP11A1 čija ekspresija nije praćena tokom ovih istraživanja. Međutim, kada su Leydig-ove ćelije izolovane iz kontrolnih i atrazinom-tretiranih životinja inkubirane u prisustvu 22OH-holesterola kao supstrata, pokazano je da se produkcija progesterona ne menja, dok je produkciju androgena značajno smanjena kod Leydig-ovih ćelija izolovanih iz atrazinom-tretiranih životinja u odnosu na kontrolne vrednosti. Rezultati o nepromenjom nivou progesterona nakon inkubacije Leydig-ovih ćelija sa 22OH-holesterolom ukazuju na odsustvo efekta atrazina na aktivnost enzima 3 β HSD i CYP11A1. Moglo bi se pretpostaviti da atrazin ne utiče ni na ekspresiju gena za ove enzime, a rezultati o nepromenjenoj ekspresiji gena za 3 β HSD potvrđuju ovakvu pretpostavku. Prema rezultatima Payne i Youngblood (1995) ekspresija 3 β HSD i CYP11A1 u Leydig-ovim ćelijama miša ne zavisi od nivoa cAMP, što bi odgovaralo našim rezultatima o odsustvu promene u ekspresiji 3 β HSD uprkos smanjenju nivoa cAMP kod atrazinom-tretiranih pacova. Međutim, prema drugim autorima, SF-1 je uključen u kontrolu genske ekspresije CYP11A1 (Lehmann i sar., 2005; Suzawa i Ingraham, 2008), što bi ukazivalo na mogućnost smanjene aktivnosti ovog enzima u Leydig-ovim ćelijama atrazinom-tretiranih životinja. Kao što je već napomenuto, u radu nije meren nivo ekspresije

ovog enzima, ali nepromenjen intenzitet konverzije 22OH-holesterola u progesteron ukazuje na odsustvo promena na nivou ovog enzima.

Pored StAR proteina, u transport holesterola do unutrašnje mitohondrijalne membrane uključen je i translokator protein ili TSPO. TSPO može funkcionisati kao kanal ili transporter za holesterol, prenoseći ga sa spoljašnje na unutrašnju mitohondrijalnu membranu (Papadopoulos i sar., 2007). Stoga je, regulacija ekspresije TSPO kanala važna u kontroli količine holesterola koja stoji na raspolaganju CYP11A1 enzimu za sintezu testosterona. Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da je ekspresija gena uključenih u transport holesterola do unutrašnje mitohondrijalne membrane, signifikantno redukovana u Leydig-ovim ćelijama atrazinom-tretiranih životinja. Ekspresija gena za StAR bila je smanjena kod obe grupe tretiranih životinja, dok je ekspresija gena za TSPO, smanjena u Leydig-ovim ćelijama izolovanim iz testisa životinja tretiranih većom dozom atrazina. Atrazin je takođe bio efikasan i u redukciji ekspresije gena za CYP17A1 i 17 β HSD. Naime, *de novo* sinteza CYP17A1 prestaje u odsustvu cAMP, a ekspresija ovog enzima zavisi od SF-1 transkripcionog faktora (Payne, 2007). Smanjena konverzija steroidogenih supstrata, progesterona i androstendiona do testosterona u Leydig-ovim ćelijama atrazinom tretiranih životinja u ovoj studiji, mogla bi se pripisati smanjenoj enzimskoj aktivnosti u tom delu steroidogenog puta zajedno sa smanjenom ekspresijom enzima CYP17A1 i 17 β HSD.

Kao što je već rečeno, u ovom radu ispitivan je i efekat atrazina na produkciju cAMP, čija je koncentracija regulisana na nivou aktivnosti/sinteze adenilil ciklaze (AC) ili na nivou degradacione aktivnosti cAMP-specifične PDE4. Paralelno sa inhibicijom produkcije androgena u Leydig-ovim ćelijama izolovanim iz atrazinom-tretiranih životinja, došlo je i do dozno-zavisnog smanjenja ekstracelularnog nivoa cAMP, kako u bazalnim, tako i u hCG stimulisanim uslovima. U testisima pacova, cAMP-specifične PDE4 se ekspresuju na ćelijski specifičan način. Izoforma PDE4A je pretežno lokalizovana u germinativnim ćelijama, dok je PDE4B lokalizovana u Leydig-ovim i Sertolijevim ćelijama (Farooqui i sar., 2001). U ovom istraživanju nismo pratili sudbinu adenilil ciklaze, ali kako je nivo transkripta za LHR redukovano u dozno-zavisnom maniru, može se pretpostaviti da je efekat na nivou adenilil ciklaze takođe redukcija, što rezultira smanjenim nivoom cAMP. S druge strane, u ovom radu je pokazano da su obe doze atrazina bile efikasne u redukciji ekspresije gena za PDE4B. Ako je to smanjenje ekspresije PDE4B bilo praćeno i smanjenjem nivoa ovog proteina u Leydig-ovim ćelijama, moglo bi se pretpostaviti da je hidroliza cAMP takođe bila smanjena.

Međutim, obzirom da rezultati jasno ukazuju na inhibiciju cAMP-signalnog puta u atrazinom-tretiranim životinjama, hipotetski-pretpostavljeno smanjenje hidrolize cAMP usled redukcije ekspresije gena za PDE4B nije izraženo u tolikoj meri da bi se prevazišla redukovana aktivnost adenilil ciklaze. Rezultati o smanjenju ekstracelularnog nivoa cAMP kod životinja tretiranih sa atrazinom, ukazuju na to da atrazin deluje uzvodno od cAMP, pri čemu to smanjenje ne mora biti rezultat samo smanjene ekspresije gena za LHR.

Takođe, rezultati su pokazali da je došlo do smanjenja bazalne i hCG-stimulisane produkcije androgena u Leydig-ovim ćelijama, što potvrđuje inhibitorni uticaj atrazina na proces steroidogeneze opisan u literaturi. Pokazano je da atrazin ima uticaj na androgenu funkciju testisa pacova i da pri *in vivo* tretmanu od 23-51 dana starosti, u dozi od 50 mg/kg, dolazi do smanjenja nivoa testosterona u serumu (za 50%) (Friedmann, 2002). Takođe, pokazano je da primena atrazina u dozi od 100 mg/kg i 200 mg/kg svakodnevno tokom 28 dana izaziva signifikantno smanjenje koncentracije testosterona, dok je smanjenje LH u serumu bilo evidentno samo pri većoj dozi (Trentacoste i sar., 2001).

Rezultati koji su dobijeni nakon dvočasovne inkubacije Leydig-ovih ćelija sa rastućim dozama steroidogenih supstrata: 22OH-holesterola, pregnenolona, progesterona i androstendiona, pokazuju da dolazi do očekivanog povećanja koncentracije T+DHT u funkciji doze supstrata, ali je to povećanje bilo signifikantno manje u Leydig-ovim ćelijama koje su izolovane iz životinja tretiranih atrazinom. Rezultati pokazuju da pri dodatku različitih koncentracija 22OH-holesterola kao supstrata postoji statistički značajna razlika u produkciji androgena u Leydig-ovim ćelijama kontrolnih i tretiranih životinja. Ovaj trend postoji i u slučaju kada su kao supstrat dodati pregnenolon i progesteron. Dodatkom androstendiona kao supstrata u manjim koncentracijama takođe se javlja statistički značajna razlika ($p < 0.001$) u produkciji androgena Leydig-ovih ćelija izolovanih iz tretiranih životinja u odnosu na kontrolu, ali pri dodatku androstendiona u većoj koncentraciji od saturacione ($50 \mu\text{M}$), inhibicija produkcije androgena izostaje. Rezultati pokazuju da je procenat smanjenja produkcije androgena kod Leydig-ovih ćelija izolovanih iz životinja tretiranih atrazinom u dozi od 50 mg/kg najveći kada je kao supstrat ponuđen progesteron (pri dozi do $5 \mu\text{M}$ procenat smanjenja je 62% kod životinja tretiranih sa 50 mg/kg atrazina, a kod životinja tretiranih sa 200 mg/kg atrazina taj procenat iznosio je 57%). Kada je kao supstrat ponuđen androstendion, produkcije testosterona smanjenja je pri dozi androstendiona od $5 \mu\text{M}$ za 36%, a pri dozi od $50 \mu\text{M}$ samo 15%, i razlika nije statistički značajna. Kao što je već rečeno u

tekstu, pokazano je da atrazin ne deluje na ekspresiju gena za 3β HSD, te kao ciljne molekule na putu delovanja atrazina ostaju steroidogeni enzimi na delu steroidogenog puta od progesterona do testosterona. Izostanak inhibicije produkcije androgena kod primene najveće saturacione doze androstendiona ne znači da atrazin ne deluje na 17β HSD, imajući u vidu inhibiciju pri manjim koncentracijama ovog supstrata. Takođe, kao što je već rečeno, ekspresija gena za steroidogene enzime CYP17A1 i 17β HSD značajno je redukovana u dozno-zavisnom maniru kod životinja tretiranih atrazinom. Dodatno, što je već diskutovano u tekstu, kada su Leydig-ove ćelije izolovane iz kontrolnih i atrazinom-tretiranih životinja inkubirane u prisustvu 22OH-holesterola kao supstrata, pokazano je da se produkcija progesterona ne menja, te nepromenjen nivo progesterona ukazuju da ekspresija gena za 3β HSD i CYP11A1 takođe nije bila promenjena.

Dakle, na osnovu iznetih rezultata moglo bi se pretpostaviti da atrazin deluje ne samo u delu puta od LH receptora do produkcije i metabolizma cAMP, već da utiče i na transport holesterola u mitohondrije kao i na konverziju progesterona u testosteron, odnosno na aktivnost i ekspresiju CYP17A1 i 17β HSD, što onda smanjuje produkciju androgena. Iako u ovom radu nije meren nivo ispitivanih proteina Western blot analizom, podaci o ekspresiji gena u kombinaciji sa nivoom cAMP, progesterona i testosterona mogu da ukažu na potencijalna mesta delovanja atrazina u okviru cAMP-zavisnog signalnog puta u Leydig-ovim ćelijama nakon *in vivo* tretmana.

Rezultati su takođe pokazali da 28-dnevna oralna administracija atrazina prouzrokuje signifikantno smanjenje nivoa androgena u serumu peripubertalnih pacova tretiranih sa većom dozom atrazina, kao i značajnu redukciju u težini androgen-zavisnih organa kod životinja tretiranih sa obe doze atrazina. Naime, tretman sa atrazinom statistički značajno redukuje relativnu težinu testisa, semenih vezikula, kao i ventralne prostate u dozno-zavisnom maniru. Takođe, redukovana je i težina dorzalne prostate kod životinja tretiranih atrazinom u dozi od 200 mg/kg.

Pored toga, rezultati pokazuju da nakon 28-dnevnog oralnog tretmana sa atrazinom ne dolazi do statistički značajne promene nivoa LH u serumu, ali ukazuju na postojanje tendencije u redukciji nivoa LH kod životinja tretiranih sa atrazinom u koncentraciji od 200 mg/kg. Kod životinja tretiranih sa atrazinom u dozi od 200 mg/kg uočeno je statistički značajno smanjenje

telesne mase počevši od 27. dana starosti pa sve do kraja tretmana, kao i 24 h posle poslednje oralne aplikacije. U skladu sa ovim opažanjima su i rezultati Trentacoste i saradnici (2001) koji su pokazali da je oralna aplikacija atrazina mužjacima pacova rase Sprague-Dawley u postnatalnom periodu od 22 do 47 dana starosti, u dozama od 100 mg/kg i 200 mg/kg, značajno smanjila nivo testosterona u serumu i intersticijalnoj tečnosti, kao i nivo LH. Takođe, došlo je do redukcije telesne mase, smanjenja težine semenih vezikula i ventralne prostate. Da bi utvrdili da li je promena u nivou testosterona kod ovih životinja u direktnoj vezi sa atrazinom ili smanjenom telesnom masom, ovi autori su jednoj grupi životinja smanjili unos hrane, tj. sveli na količinu koju su uzimali pacovi tretirani atrazinom. U kontrolnoj grupi, kojoj je bio ograničen unos hrane, takođe je uočen pad serumskog testosterona, smanjenje telesne mase androgen-zavisnih tkiva i nizak nivo LH u serumu, tako da su autori pretpostavili da je redukcija androgeneze možda rezultat smanjenja telesne mase (Trentacoste i sar., 2001). Rezultati prikazani u ovom radu, pokazuju da uprkos izostanku smanjenja telesne mase u grupi životinja tretiranih sa atrazinom u dozi od 50 mg/kg dolazi do signifikantnog smanjenja *ex vivo* bazalne i hCG-stimulisane produkcije testosterona na nivou Leydig-ovih ćelija. Takođe, rezultati Stoker i saradnici (2002) su pokazali da smanjenje telesne mase nije preduslov za ostvarivanje efekta kako atrazina tako i njegovih metabolita na reproduktivni razvoj.

U našem radu je primećen značajan porast mase nadbubrežnih žlezda kod obe grupe životinja tretiranih atrazinom, u poređenju sa kontrolom. Kako u radu nije praćen efekat atrazina na nivou nadbubrežnih žlezda, samo se može pretpostaviti da bi atrazin mogao da inhibira steroidogenezu i u adrenalnom korteksu, kao što je inhibisao u Leydig-ovim ćelijama atrazinom-tretiranih životinja, te da je adrenalna insuficijencija možda dovela do hipertrofije nadbubrežnih žlezda (Harvey i Everett, 2003). U nama dostupnoj literaturi ima malo podataka o *in vivo* efektima različitih ksenobiotika na nadbubrežne žlezde, tako da se za ovaj rezultat o povećanju mase nadbubrega ne mogu naći relevantni podaci u literaturi. U radu Grote i saradnici (2004) koji su ispitivali efekat tributiltina i trifeniltina na pubertalni razvoj mužjaka pacova, konstatovano je povećanje mase nadbubrežnih žlezda paralelno sa opadanjem nivoa testosterona u serumu peripubertalnih pacova nakon 30-dnevnog tretmana sa ovim ksenobioticima. Ni ovi autori nisu dali potpunije objašnjenje hipertrofije nadbubrega, oni su pretpostavili da je povećanje mase nadbubrežnih žlezda posledica efekta ovih hemikalija na upliv hormona nadbubrežne žlezde na hipofizno-gonadalnu osovinu u periodu kada razvoj nadbubrežnih žlezda nije završen.

5.2. Efekat *in vitro* primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova

Jedan deo ove doktorske disertacije usmeren je na direktne efekte koje atrazin ostvaruje na nivou Leydig-ovih ćelija. Dobijeni rezultati ukazuju na efekte *in vitro* primene različitih doza atrazina na aktivnost i ekspresiju steroidogenih enzima i drugih regulatornih proteina uključenih u proces steroidogeneze, i na akumulaciju cAMP u medijumu u kulturi prečišćenih Leydig-ovih ćelija peripubertalnih pacova soja Wistar. Leydig-ove ćelije tretirane su sa različitim koncentracijama atrazina u trajanju od 24 h, nakon čega je medijum zamenjen svežim uz dodatak različitih koncentracija hCG ili steroidogenih supstrata: progesterona i androstendiona i odgovarajuće koncentracije atrazina, pri čemu je ovaj deo tretmana trajao 2 h.

Postoje brojni literaturni podaci koji ukazuju na to da atrazin remeti funkcije reproduktivnog sistema, a pregled literature je dat u uvodnom delu. Takođe, rezultati prikazani u ovom radu, pokazali su da prolongirana oralna aplikacija atrazina peripubertalnim mužjacima pacova u trajanju od 28 dana inhibiše ekspresiju gena za steroidogene enzime i regulatorne proteine uključene u kontrolu testikularne steroidogeneze (Pogrmic i sar., 2009). Međutim, gotovo da nema literaturnih podataka koji se odnose na direktan uticaj atrazina na Leydig-ove ćelije, izuzev jednog dela studije Friedmann (2002). Naime, Friedmann (2002) je pokazao da atrazin u dozi od 232 μM , nakon 3 h izlaganja u *in vitro* uslovima, redukuje LH-stimulisanu produkciju testosterona u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova. Sa druge strane, naši rezultati pokazali su da atrazin u rasponu doza od 1 μM -50 μM povećava steroidogeni kapacitet Leydig-ovih ćelija nakon 24 h *in vitro* izlaganja. Ovaj suprotan efekat nakon direktnog izlaganja Leydig-ovih ćelija atrazinu u poređenju sa rezultatima Friedmann (2002) može se objasniti u kontekstu hormezis efekta, kada niže doze ksenobiotika imaju stimulatorno, a visoke doze inhibitorno dejstvo. Stimulatorni odgovor sistema na manju dozu mogao bi da predstavlja kompenzatorni mehanizam praćen početnim narušavanjem homeostaze (Calabrese, 2005).

Osim toga, Friedmann, (2002) nije istraživao mehanizme kojima atrazin ostvaruje svoje efekte na nivou Leydig-ovih ćelija. Generalno, sposobnost atrazina da remeti proces steroidogeneze i mehanizmi kojima deluje na ovaj proces predstavljaju relativno neistraženu oblast, kao i motiv za dalja istraživanja.

Na modelu H295R humanih adrenokortikalnih karcinoma ćelija pokazano je da atrazin indukuje aromataznu aktivnost na dozno-zavisani način i povećava nivo CYP19 iRNK (Heneweer i sar., 2004; Sanderson i sar., 2000, 2002, 2003). Pretpostavlja se da mehanizam indukcije aromataze ide preko inhibicije aktivnosti fosfodiesteraze i povećanja nivoa cAMP (Sanderson i sar., 2002).

U ovom radu je bila analizirana ekspresija gena za PDE4B i CYP19A1, međutim nivo transkripata je bio nepromenjen u odnosu na kontrolne vrednosti, što govori o tome da u Leydig-ovim ćelijama atrazin ne indukuje ekspresiju aromataze.

U našem radu pokazano je da atrazin dodat direktno u inkubacioni medijum izaziva povećanje bazalne i hCG-stimulisane produkcije testosterona i da je povećanje dozno-zavisno u odnosu na kontrolne vrednosti. Ispitivanjem efekta atrazina na produkciju cAMP, pokazano je da je paralelno sa povećanjem bazalne i hCG-stimulisane produkcije testosterona, u Leydig-ovim ćelijama došlo i do povećanja ekstracelularnog nivoa cAMP, kako u bazalnim, tako i u hCG stimulisanim uslovima. Kako je koncentracija cAMP regulisana na nivou aktivnosti/sinteze AC ili na nivou aktivnosti cAMP-specifične PDE4, a rezultati u ovom radu su pokazali da ekspresija PDE4B nije bila promenjena pod uticajem tretmana sa atrazinom, ostaje otvoreno pitanje AC kao ciljnog molekula na putu delovanja ovog herbicida.

Rezultati o ekspresiji gena, u ćelijama tretiranim sa dve doze atrazina (1 μ M i 20 μ M) i stimulisanim saturacionom dozom hCG, pokazuju da je u prisustvu obe doze atrazina došlo do statistički značajnog povećanja ekspresije gena za SF-1, dok je ekspresija gena za StAR, proteina uključenog u transport holesterola do unutrašnje mitohondrijalne membrane, bila povećana pri većoj dozi atrazina. Takođe, veća doza atrazina bila je efikasna u indukciji gena za enzim CYP17A1, koji katališe konverziju progesterona u androstendion. Dalja konverzija androstendiona u testosteron katalisana je enzimom 17 β HSD čija je ekspresija bila povećana pri dozi atrazina od 20 μ M. Međutim, ekspresija gena za LHR, kao i ekspresija gena uključenih u transport holesterola, SR-B1 i TSPO, nije bila promenjena nakon tretmana

Leydig-ovih ćelija atrazinom. Takođe, u slučaju 3β HSD, enzima koji katališe konverziju pregnenolona u progesteron, nije bilo promene u ekspresiji gena u odnosu na kontrolu. Povećanje transkripcije gena za SF-1, StAR, CYP17A1 i 17β HSD moglo bi da bude uzrok povećane produkcije testosterona u hCG-stimulisanim Leydig-ovim ćelijama. Povećanje ekspresije gena za StAR i SF-1 moglo bi se objasniti povećanim nivoom cAMP-a kod atrazinom tretiranih ćelija. Postoje brojni podaci o fosforilaciji StAR proteina od strane PKA (Papadopoulos i sar., 2007). S druge strane, prema Fan i saradnicima (2007) atrazin ne samo da povećava nivo cAMP i ekspresiju SF-1, već se pretpostavlja da se direktno vezuje za SF-1. Prema Payne i Youngblood (1995) ekspresija 3β HSD i CYP11A1 u Leydig-ovim ćelijama miša ne zavisi od nivoa cAMP, iako s druge strane tretman mišijih MA-10 Leydig-ovih ćelija sa cAMP povećava nivo CYP11A1 proteina i iRNK za ovaj enzim. Odsustvo efekta atrazina na ekspresiju gena za 3β HSD mogli bi da se objasne gore navedenim literaturnim podacima.

S druge strane, sinteza CYP17A1 prestaje u odsustvu cAMP (Payne, 2007) što ukazuje na visoki stepen zavisnosti ekspresije ovog enzima od nivoa cAMP. Na osnovu navedenog može se pretpostaviti, da bi povećanje nivoa cAMP-a moglo voditi povećanoj ekspresiji ovog gena. U literaturi se, takođe, navodi da je transkripcioni faktor SF-1 neophodan za aktivaciju transkripcije gena za P450 steroidogene enzime (Payne, 2007). Obzirom na sposobnost ovog nuklearnog receptora da poveća ekspresiju ciljnih gena, povećanje njegove ekspresije moglo bi biti uzrok povećanja ekspresije odgovarajućih enzima.

Navedeni rezultati o ekspresiji gena ukazuju na potencijalno stimulatorno dejstvo atrazina u *in vitro* uslovima, kako u delu steroidogenog puta do ulaska holesterola u mitohondrije, tako i na delu puta od progesterona do testosterona, s tim što bi se moglo pretpostaviti da je uticaj atrazina na povećanje nivoa cAMP inicijalni okidač ovih promena.

Takođe, rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da je bazalna produkcija testosterona bila praćena povećanim nivoom progesterona u prisustvu manjih doza atrazina, dok je u prisustvu najveće doze atrazina nivo progesterona statistički značajno smanjen. hCG-stimulisana produkcija testosterona bila je praćena nepromenjenim nivoom progesterona u prisustvu manjih doza atrazina, odnosno statistički značajnim smanjenjem u prisustvu većih doza atrazina. Smanjenje nivoa progesterona u medijumu Leydig-ovih ćelija tretiranih atrazinom bi se možda moglo objasniti njegovim ubrzanim prevođenjem u androgene, obzirom na

povećanu ekspresiju gena za CYP17A1 i 17 β HSD. U prilog tome govore i rezultati o produkciji androgena kada je atrazinom-tretiranim Leydig-ovim ćelijama bio ponuđen progesteron kao supstrat. Naime, u navedenim uslovima došlo je do značajnog povećanja produkcije testosterona u odnosu na kontrolne vrednosti. Dozna zavisnost bila je izraženija u prisustvu malih koncentracija progesterona. Povećana konverzija progesterona u testosteron, što bi ukazivalo na povećanu aktivnost enzima u tom delu steroidogenog puta, mogla bi da se poveže sa povećanom ekspresijom prvenstveno gena za CYP17A i/ili 17 β HSD. Dodavanjem androstendiona, kao supstrata, primećena je dozna zavisnost u prisustvu malih koncentracija androstendiona, a takođe je zabeleženo i povećanje produkcije testosterona pri većim dozama ovog supstrata u prisustvu atrazina u koncentraciji od 20 μ M. Povećana produkcija testosterona nakon tretmana Leydig-ovih ćelija sa atrazinom i dodatne stimulacije sa androstendionom ukazuju na povećanu aktivnost 17 β HSD, što se opet može povezati i sa povećanom ekspresijom ovog gena.

Obzirom na mnogobrojne mehanizme regulacije genske ekspresije, povećan nivo transkripata trebalo bi potvrditi i podatkom o povećanom nivou datih proteina. U slučaju CYP17A1 i 17 β HSD proteina, povećana produkcija testosterona u našim eksperimentima sugerise na povećan nivo pomenutih proteina u ćelijama, a time i veću enzimsku aktivnost.

U cilju bližeg definisanja mesta delovanja atrazina u okviru cAMP-zavisnog signalnog puta, postavljen je eksperiment sa inhibitorom PKA (H89). Rezultati su pokazali da H89 efikasno poništava stimulatorni efekat atrazina na produkciju testosterona, uprkos povećanim nivoima cAMP. Pad testosterona u atrazinom tretiranim Leydig-ovim ćelijama nakon tretmana sa H89, ukazuje da je H89 blokirao efekte cAMP-aktivirane PKA u atrazin-tretiranim Leydig-ovim ćelijama. Dobijeni rezultati potvrđuju ranije iznetu pretpostavku da je jedno od mesta delovanja atrazina uzvodno od cAMP.

5.3. Efekat jednokratne *in vivo* primene atrazina na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova

Rezultati dobijeni u ovom radu pokazali su da prolongirana oralna aplikacija atrazina peripubertalnim mužjacima pacova dovodi do inhibicije testikularne steroidogeneze, smanjujući ekspresiju gena za LHR i SR-B1, redukujući transport holesterola do mitohondrija, kao i konverziju progesterona u testosteron. Sa druge strane, rezultati pokazuju da direktno *in vitro* izlaganje Leydig-ovih ćelija atrazinu povećava steroidogeni kapacitet ovih ćelija nakon 24 h-tretmana. Da bi pokušali da objasnimo zašto postoje razlike u efektu atrazina u zavisnosti od načina primene, postavili smo jednokratni *in vivo* eksperiment. Naime, mužjaci pacova tretirani su *po* 50. dana starosti, atrazinom u dozi od 50 mg/kg i 200 mg/kg telesne mase. Životinje su žrtvovane 24 h nakon jednokratnog hranjenja. Leydig-ove ćelije su purifikovane, praćena je produkcija testosterona i cAMP u *ex vivo* bazalnim i hCG-stimulisanim uslovima. Dobijeni rezultati ukazali su na up-regulaciju testikularne steroidogeneze nakon jednokratnog *in vivo* tretmana sa atrazinom. Naime, povećan nivo cAMP bio je praćen povećanim nivoom testosterona u medijumu Leydig-ovih ćelija izolovanih iz životinja tretiranih sa atrazinom u dozi od 200 mg/kg kako u bazalnim tako i u hCG-stimulisanim uslovima. Sa druge strane, rezultati naših istraživanja pokazuju da nije došlo do promene ekspresije gena odgovornih za proces steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama atrazinom tretiranih životinja nakon jednokratnog *in vivo* tretmana. Kao što je već rečeno u diskusiji, koncentracija cAMP regulisana je na nivou aktivnosti/sinteze AC ili na nivou aktivnosti cAMP-specifične PDE4. Rezultati u ovom radu su pokazali da ekspresija PDE4B nije bila promenjena pod uticajem tretmana sa atrazinom, tako da ostaje otvoreno pitanje stimulacije aktivnosti/sinteze AC, ili degradacije proteina PDE4B, kao mogućeg mesta delovanja atrazina nakon jednokratnog *in vivo* tretmana.

Uzimajući u obzir i rezultate prolongiranog tretmana, mogli bi konstatovati da je oralna aplikacija atrazina dovela do bifaznog odgovora u produkciji testosterona u *ex vivo* uslovima. Naime, odgovor Leydig-ovih ćelija dobijenih od životinja tretiranih ovim herbicidom manifestuje se prvo kao stimulacija produkcije androgena nakon jednokratnog tretmana, a potom nakon 28-dnevnog, prolongiranog *in vivo* izlaganja kao snažna inhibicija androgenoze.

Sličan fenomen zabeležen je i u radu Andric i saradnici (2006). Naime, oralni tretman piralenom, koji predstavlja tehničku smešu PCB, prouzrokuje bifazni odgovor, koji se ispoljava prolaznom stimulacijom produkcije testosterona u prvih 24 h tretmana, koja potom prelazi u inhibiciju već nakon 48 h tretmana i zadržava se sve do četvrtog dana posle prestanka 7-dnevnog tretmana piralenom.

Sumarno, rezultati prikazani u ovom radu opisuju efekte *in vivo* primene atrazina na ekspresiju gena za steroidogene enzime i druge regulatorne proteine uključene u kontrolu testikularne steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova. Dobijeni rezultati jasno ukazuju da 28-dnevna *in vivo* primena atrazina snažno inhibira testikularnu steroidogenezu, smanjujući ekspresiju gena za LHR i SR-B1, nivo cAMP, kao i ekspresiju gena za SF-1, StAR i TSPO. Takođe, rezultati ukazuju na inhibiciju supstrat-stimulisane produkcije androgena paralelno sa redukcijom ekspresije steroidogenih enzima CYP17A1 i 17 β HSD. Obzirom na blokadu ekspresije LHR, prvog elementa u aktivaciji cAMP-signalnog puta, moglo bi se pretpostaviti da je to uzrok blokade androgeneze u atrazinom-tretiranim životinjama.

Sa druge strane, ispitivanjem efekta direktne *in vitro* primene različitih doza atrazina na ekspresiju i aktivnost steroidogenih enzima u kulturi prečišćenih Leydig-ovih ćelija testisa peripubertalnih pacova soja Wistar zabeleženo je stimulatorno dejstvo pomenutog herbicida. Naime, zabeleženo je povećanje bazalne i hCG-stimulisane produkcije testosterona praćeno povećanim nivoom cAMP u medijumu tretiranih ćelija. Pri ispitivanju ekspresije gena za steroidogene enzime i regulatorne proteine, zabeleženo je povećanje ekspresije gena za SF-1, StAR, CYP17A1 i 17 β HSD u hCG-stimulisanim uslovima. Povećana produkcija testosterona nakon dodavanja progesterona i androstendiona, ukazuje na povećanu aktivnost ovih enzima u tom delu steroidogenog puta. Poređenjem efekata *in vivo* i *in vitro* tretmana uočava se odsustvo upliva 24-časovnog *in vitro* tretmana na ekspresiju gena za LHR i SR-B1, i smanjenje, odnosno povećanje nivoa cAMP, kao i ekspresije gena za SF-1, transkripcionog faktora koji utiče na prepisivanje ostalih ispitivanih gena. Drugim rečima, nivo cAMP i ekspresija gena za SF-1 su modulirani primenom atrazina, s tim što 28-dnevni oralni tretman izaziva inhibiciju, a 24-časovni *in vitro* tretman stimulaciju ovih parametara. Ako u diskusiju uključimo i rezultate 24-časovne oralne primene atrazina, vidimo da on nije izazvao promene u ekspresiji gena, ali je indukovao povećanje nivoa cAMP u bazalnim i hCG-stimulisanim uslovima. Znači, nivo cAMP se pojavljuje kao karika koja povezuje sva tri korišćena

eksperimentalna pristupa. Međutim, ostaje otvoreno pitanje na koji način atrazin utiče na modulaciju nivoa cAMP.

Razlika između prolongiranog *in vivo* i dvadesetčetvoročasovnog *in vitro* tretmana sa atrazinom mogla bi se objasniti metabolisanjem atrazina u organizmu, te bi se mogao pretpostaviti različit efekat metabolita ovog herbicida na testikularnu steroidogenezu u poređenju sa atrazinom. Međutim, ovakvo objašnjenje je malo verovatno, zato što su Stoker i saradnici (2002) pokazali da i metaboliti atrazina, kao i atrazin, imaju inhibitorski uticaj na pubertalni razvoj mužjaka pacova rase Wistar nakon prolongiranog oralnog tretmana.

Rezultati jednokratnog *in vivo* eksperimenta donekle mogu da povežu ova dva suprotna efekta atrazina na nivou Leydig-ovih ćelija, te se može pretpostaviti da je rani odgovor Leydig-ovih ćelija na delovanje atrazina stimulacija produkcije androgena, a potom nakon prolongiranog tretmana sa atrazinom Leydig-ove ćelije odgovaraju snažnom inhibicijom androgeneze.

Različiti efekti atrazina ispoljeni u *in vitro* i *in vivo* uslovima ukazuju na potrebu kako *in vitro* tako i *in vivo* ispitivanja delovanja potencijalno toksičnih supstanci na testikularnu steroidogenezu.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata o efektima atrazina na nivou steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama peripubertalnih pacova korišćenjem različitih eksperimentalnih modela (*in vivo* oralni tretman od 23. do 50. dana starosti; jednokratni *in vivo* oralni tretman 50. dana starosti; 24-časovni *in vitro* tretman Leydig-ovih ćelija izolovanih iz 51 dan starih pacova) i diskusije relevantnih literaturnih podataka, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- √ Dobijeni rezultati ukazuju da je atrazin kod sva tri eksperimentalna modela izazvao promene u nivou cAMP; prolongirani *in vivo* tretman rezultirao je inhibicijom produkcije cAMP, dok je 24 h izlaganje atrazinu dovelo do stimulacije, bez obzira na način tretmana.
- √ Promene u nivou cAMP rezultirale su promenama u steroidogenom kapacitetu Leydig-ovih ćelija u sva tri eksperimentalna modela, kao i ekspresiji cAMP-zavisnih gena nakon prolongiranog *in vivo* i 24 h *in vitro* tretmana, što je imalo za posledicu promene u delu steroidogenog puta do ulaska holesterola u mitohondrije, i na putu konverzije progesterona do testosterona.
- √ 28-dnevni *in vivo* efekat atrazina u našim eksperimentalnim uslovima uticao je na smanjenje ekspresije gena za LHR, kao prvog elementa u aktivaciji cAMP-signalnog puta, kao i gena za SR-B1 koji učestvuje u transportu holesterola u ćelije.
- √ Rezultati 24-časovnog *in vitro* tretmana atrazinom ukazuju da je cAMP inicijalni okidač promena na nivou testikularne steroidogeneze, kao i da je stimulatorno mesto dejstva ovog herbicida uzvodno od cAMP, ali bez promene ekspresije gena za LHR.
- √ Dobijeni rezultati ukazuju da 24-časovni tretman atrazinom izaziva povećanje, a prolongirani tretman snažno smanjenje steroidogenog kapaciteta Leydig-ovih ćelija peripubertalnih pacova.

7. LITERATURA

-
-
- Abbaszade, I.G., Arensburg, J., Park, C.H., Kasa-Vubu, J.Z., Orly, J., Payne, A.H. (1997). Isolation of a new mouse 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoform, 3 β -HSD VI, expressed during early pregnancy. *Endocrinology* 138: 1392-1399.
- Abbaszade, I.G., Clarke, T.R., Park, C.H., Payne, A.H. (1995). The mouse 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase multigene family includes two functionally distinct groups of proteins. *Mol. Endocrinol.* 19: 1214-1222.
- Abd-Elaziz, M., Moriya, T., Akahira, J., Suzuki, T., Sasano, H. (2005). StAR and progesterone producing enzymes (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and cholesterol side-chain cleavage cytochromes P450) in human epithelial ovarian carcinoma: immunohistochemical and real-time PCR studies. *Cancer Sci.* 96(4): 232-239.
- Abel, E.L., Opp, S.M., Verlinde, C.L.M.J., Bammler, T.K., Eaton, D.L. (2004). Characterization of atrazine biotransformation by human and murine glutathion S-transferases. *Toxicol. Sci.* 80: 230-238.
- Adamski, J., Jakob, F.J. (2001). A guide to 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171: 1-4.
- Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R., Hardy, M.P. (2004). Inhibition of Testicular Steroidogenesis by the Xenoestrogen Bisphenol A Is Associated with Reduced Pituitary Luteinizing Hormone Secretion and Decreased Steroidogenic Enzyme Gene Expression in Rat Leydig Cells. *Endocrinology* 145 (2): 592-603.
- Albanito, L., Lappano R., Madeo A., Chimento A., Prossnitz E., R., Cappello A., R., Dolce V., Abonante S., Pezzi V., Maggiolini M. (2008). G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor- α are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells. *Environ. Health Perspect.* 12: 1648-1655.
- Andric, N.L., Kostic, T.S., Zoric, S.N., Stanic, B.D., Andrić, S.A., Kovacevic, R.Z. (2006). Effect of a PCB-based transformer oil on testicular steroidogenesis and xenobiotic-metabolizing enzymes. *Reprod. Toxicol.* 22 : 102–110.
- Andrić, S.A., Janjić, M.M., Stojkov, N.J., Kostić, T.S., (2007). Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293: 1399-1408.
- Annand, R.J.K., Paust, H.J., Altenpohl, K., Mukhopadhyay, A.K. (2003). Regulation of vascular Endothelial Growth Factor production by Leydig Cells In Vitro: The Role of

-
-
- protein Kinase A and Mitogen-Activated protein Kinase cascade. *Biol. Reprod.* 68: 1663-1673.
- Arensburg, J., Payne, A.H., Orly, J. (1999). Expression of steroidogenic genes in maternal and extraembryonic cells during early pregnancy in mice. *Endocrinology* 140 (11): 5220-32.
- Ashby, J., Tinwell, H., Stevens, J., Pastoor, T., Breckenridge, C.D. (2002). The effects of atrazine on the sexual maturation of female rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 35: 468-473.
- Azhar, S., Reaven, E., (2002). Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 195: 1-26.
- Azhar, S., Reaven, E., (2007) Regulation of Leydig cell cholesterol metabolism. In: *The Leydig Cell in Health and Disease*.(A.H. Payne, and M.P. Hardy, Eds.) pp.136-148. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Babić-Gojmerac, T., Kniewald, Z., Kniewald, J. (1989). Testosterone metabolism in neuroendocrine organs in male rats under atrazine and deethylatrazine influence. *J. Steroid Biochem.* 33: 141-146.
- Baker, M.E. (2001). Hydroxysteroid dehydrogenases: ancient and modern regulators of adrenal and sex steroid action. *Mol. Cell. Endocrinol.* 175: 1-4.
- Baker, P.J., Sha, J.A., McBride, M.W., Peng, L., Payne, A.H., O'Shaughnessy, P.J. (1999). Expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur. J. Biochem.* 260: 911-917.
- Baker, P.J., Sha, J.H., O'Shaughnessy, P.J. (1997). Localization and regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 mRNA during development in the mouse testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 133: 127-133.
- Bao, B., Garverick, H.A. (1998). Expression of Steroidogenic Enzyme and Gonadotropin Receptor Genes in Bovine Follicles During Ovarian Follicular Waves: A Review. *J. Anim. Sci.* 76: 1903-1921.
- Barr, D.B., Panuwet, P., Nguyen, J.V., Udunka, S., Needham, L.L. (2007). Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring. *Environ. Health Perspect.* 115:1474-1478.
- Bisson, M., Hontela, A (2002). Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 180: 110-117.
-
-

-
-
- Blomquist, C.H., Bonenfant, M., McGinley, D.M., Posalaky, Z., Lakatua, D.J., Tuli-Puri, S., Bealka, D.G., Tremblay, Y. (2002). Androgenic and estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase in human ovarian epithelial tumors: evidence for the type 1,2 and 5 isoforms. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81: 343-351.
- Blystone, C.R., Lambright, C.S., Cardon, M.C., Furr, J., Rider, C.V., Hartig, P.C., Wilson, V.S., Gray, L.E. (2009). Cumulative and Antagonistic Effects of a Mixture of the Antiandrogens Vinclozolin and Iprodione in the Pubertal Male Rat. *Toxicol. Sci.* 111(1):179–188.
- Borch, J., Metzdorff, S.B., Vinggaard, A.M., Brokken, L., Dalgaard, M. (2006). Mechanism underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology* 223: 144-155.
- Borstein, S.R., Rutkowski, H., Vrezas, I. (2004). Cytokines and steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215: 134-141.
- Boujrad, N., Vidic, B., Gazouli, M., Culty, M., Papadopoulos, V. (2000). The Peroxisome Proliferator Perfluorodecanoic Acid Inhibits the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor (PBR) Expression and Hormone-Stimulated Mitochondrial Cholesterol Transport and Steroid Formation in Leydig Cells. *Endocrinology* 141(9): 3137-3148.
- Breitling, R., Marjanovic, Z., Petrovic, D., Adamski, J. (2001). Evolution of 17 β -HSD type 4, a multifunctional protein of β -oxidation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171: 205-210.
- Brereton, P., Suzuki, T., Sasano, H., Li, K., duarte, C., Obyesekere, V., Haeseleer, F., Palczewski, K., Smith, I., Komesaroff, P., Krozowski, Z. (2001). Pan1b (17 β -HSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171: 111-117.
- Brown, W.M., Metzger, L.E., Barlow, J.P., Hunsaker, L.A., Deck, L.M., Royer, R.E., Vander Jaght, D.L. (2003). 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: computational design of active site inhibitors targeted to the Rossmann fold. *Chem. Biol. Interact.* 143: 481-491.
- Buchholz, B.A., Fultz, E., Haack, K.W., Vogel, J.S., Gilman, D., Gee, S.J., Hammock, B.D., Hui, X., wester, R.C., Maibach, H.I. (1999) HPLC-Accelerator MS measurement of atrazine metabolites in human urine after dermal exposure. *Anal. Chem.* 71: 3519-3525.
- Calabrese, E.J. (2005). Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environ. Pollut.* 138(3): 378-411.

-
-
- Calkins, H., Sigel, M.M., Nankin, H.R., Lin, T. (1988). Interleukin-1 Inhibits Leydig Cell Steroidogenesis in Primary Culture. *Endocrinology* 123(3): 1605-1610.
- Casellas, P., Sylvaine, G., Basile, A.S. (2002). Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem. Int.* 40(6): 475-486.
- Chan, Y.C., Chang S.C., Hsuan S.L., Chien M.S., Lee W.C., Kang J.J., Wang, S.C., Liao, J.V. (2007). Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. *Toxicol. In Vitro* 21: 595–603.
- Chen, H., Midzak, A., Luo, L., Zirkin, B.R. (2007). Aging and the decline of androgen production. In: *The Leydig Cell in Health and Disease*. (A.H. Payne, and M.P. Hardy, Eds.) pp.157-171. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Cherifi, M., Raveton, M., Picciocchi, A., Ravanel, P., Tissut, M. (2001). Atrazine metabolism in corn seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 39 : 665–672.
- Cherradi, N., Rossier, M.F., Vallotton, M.B., Timberg, R., Friedberg, I., Orly, J., Wang, K.J., Stocco, D.M., Capponi, A.M. (1997). Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450_{scc} and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 272: 7899-7907.
- Christenson, L.K., Strauss III, J.F. (2001). Steroidogenic Acute Regulatory Protein: An Update on Its Regulation and Mechanism of Action. *Arch. Med. Res.* 32: 576-586.
- Clark, B.J., Combs, R., Hales, K.H., Hales, D.B., Stocco, D.M. (1997). Inhibition of Transcription Affects Synthesis of Steroidogenic Acute Regulatory Protein and Steroidogenesis in MA-10 Mouse Leydig Tumor Cells. *Endocrinology* 138(11): 4893-4901.
- Clarke, T.R., Bain, P.A., Sha, L., Payne, A.H. (1993). Enzyme characteristic of two distinct forms of mouse 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase complementary deoxyribonucleic acids expressed in COS-1 cells. *Endocrinology* 132: 1971-1976.
- Clem, B.F., Hudson, E.A., Clark, B.J. (2005). Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate (cAMP) Enhances cAMP-Responsive Element Binding (CREB) Protein Phosphorylation and Phospho-CREB Interaction with the Mouse Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein Gene Promoter. *Endocrinology* 146(3):1348–1356.
- Coady, K.K., Murphy, M.B., Villeneuve, D.L., Hecker, M., Jones, P.D., Carr, J.A., Solomon, K.R., Smith, E.E., van der Kraak, G., Kendall, R.J., Giesy, J.P. (2005). Effect of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase

-
-
- activity, and sex steroid concentration in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62: 160-173.
- Cole, S.P.C., Deeley, R.G. (2006). Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (8): 438- 446.
- Compagnone, N.A., Bulfone, A., Rubenstein, J.L.R., Mellon, S.H. (1995). Expression of the Steroidogenic Enzyme P450_{scc} in the Central and Peripheral Nervous Systems during Rodent Embryogenesis. *Endocrinology* 136(6): 2689-2696.
- Conley, A.J., Bird, I.M. (1997). The Role of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Integration of Gonadal and Adrenal Steroidogenesis via the Δ 5 and Δ 4 Pathways of Steroidogenesis in Mammals. *Biol. Reprod.* 56: 789-799.
- Connor, K., Howell, J., Chen, I., Liu, H., Berhane, K., Sciarretta, C., Safe, S., Zacharewski, T. (1996). Failure of chloro-s-triazine-derived compounds to induce estrogen receptor-mediated responses in vivo and in vitro. *Fundam Appl Toxicol* 30: 93-101.
- Conti, M. (2000). Phosphodiesterases and Cyclic Nucleotide Signaling in Endocrine Cells. *Mol. Endocrinol.* 14(9): 1317–1327
- Cooper, R.L., Stoker, T.E., Goldman, J.M., Parrish, M.B., Tyrey, L. (1996). Effect of atrazine on ovarian function in the rat. *Reprod. Toxicol.* 10: 257-264.
- Cooper, R.L., Stoker, T.E., Tyrey, L., Goldman, McElroy, W.K. (2000). Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol. Sci.* 53: 297-307.
- Culty, M., Thuillier, R., Li, W., Wang, Y., Martinez-Arguelles, D.B., Benjamin, C.G., Triantafyllou, K.M., Zirkin, B.R., Papadopoulos V. (2008). In Utero Exposure to Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Exerts Both Short-Term and Long-Lasting Suppressive Effects on Testosterone Production in the Rat. *Biol. Reprod.* 78: 1018–1028.
- Cummings, A.M., Rhodes, B.E., Cooper, R.L. (2000). Effect of atrazine on implantation and Early pregnancy in 4 strains of rats. *Toxicol. Sci.* 58: 135-143.
- Dalla Valle, L., Toffolo, V., Vianello, S., Belvedere, P., Colombo, L. (2004). Expression of cytochrome P450_{scc} mRNA and protein in the rat kidney from birth to adulthood. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88: 79-89.
- Dalla Valle, L., Vianello, S., Belvedere, P., Colombo, L. (2002). Rat cytochrome P450_{c17} gene transcription is initiated at different start sites in extraglandular and glandular tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82: 377-384.

-
-
- Danzo, B.J. (1997). Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ. Health Perspect.* 105: 294-301.
- De Prado, R., Lopez-Martinez, N., Gonzalez-Gutierrez, J. (2000). Identification of Two Mechanisms of Atrazine Resistance in *Setaria faberi* and *Setaria viridis* Biotypes. *Pestic Biochem Physiol* 67: 114–124.
- Dharia, S., Slane, A., Jian, M., Conner, M., Conley, A.J., Parker, C.R.Jr. (2004). Colocalization of P450c17 and Cytochrome b5 in Androgen-Synthesizing Tissues of the Human. *Biol. Reprod.* 71: 83-88.
- Dooley, G.P., Prenni, J.E., Prentiss, P.L., Cranmer, B.K. Andersen, M.E., Tessari, J.D. (2006). Identification of a Novel Hemoglobin Adduct in Sprague Dawley Rats Exposed to Atrazine. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 692-700.
- Dooley, G.P., Reardon, K.F, Prenni, J.E., Tjalkens, R.B., Legare, M.E., Foradori, C.D., Tessari, J.E., Hanneman, W.H. (2008). Proteomic Analysis of Diaminochlorotriazine Adducts in Wistar Rat Pituitary Glands and LβT2 Rat Pituitary Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 21 (4): 844–851.
- Dufort, I., Rheault, P., Huang, X.F., Soucy, P., Luu-The, V. (1999). Characteristics of a Highly Labile Human Type 5 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Endocrinology* 140(2): 568-574.
- Ehmer, P.B., Jose, J., Hartmann, R.W. (2000). Development of a simple and rapid assay for the evaluation of human 17α-hydroxylase-C17,20-lyase (P450c17) by coexpression of P450c17 with NADPH-cytochrome-P450-reductase in *Escherichia coli*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75: 57-63.
- Eldridge, J.C., Fleenor-Heyser, D.G., Extrom, P.C., Wetzel, L.T., Breckenridge, C.B., Gillis, J.H., Luempert, L.G., and Stevens, J. T. (1994). Short-term effects of chlorotriazines on estrus in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 43: 155–167.
- Eldridge, J.C., Wetzel, L.T., and Tyrey, L. (1999a). Estrous cycle patterns of Sprague-Dawley rats during acute and chronic atrazine administration. *Reprod Toxicol.* 13: 491–499.
- Eldridge, J.C., Wetzel, L.T., Stevens, J.T., Simpkins, J.W. (1999b). The mammary tumor response in triazine-treated female rats: A threshold-mediated interaction with strain and species-specific reproductive senescence. *Steroids* 64: 672-678.

-
-
- Endoh, A., Kristiansen, S.B., Casson, P.R., Buster, J.E., Hornsby, P.J. (1996). The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 181: 3558-3565.
- Enoch, R.R., Stanko, J.P., Greiner, S.N., Youngblood, G.L., Rayner, J.L., Fenton, S.E. (2007). Mammary gland development as a sensitive end point after acute prenatal exposure to an atrazine metabolite mixture in female Long-Evans rats. *Environ. Health Perspect.* 115: 541-547.
- Evaul, K., Hammes, S.R. (2008). Cross-talk between G Protein-coupled and Epidermal Growth Factor Receptors Regulates Gonadotropin-mediated Steroidogenesis in Leydig Cells. *J. Biol. Chem.* 283(41): 27525–27533.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Komatsu, T., Morohashi, K., Hayes, T.B., Takayanagi, R., Nawata, H. (2007). Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ. Health Perspect.* 115: 720-727.
- Farooqui, S.M., Al-Bagdadi, F., Houslaye, M.D., Bolgerf, G.B., Stoutd, R., Specianc, R.D., Cherryg, J.A., Contih, M. and O'Donnelli, J.M. (2001). Surgically Induced Cryptorchidism-Related Degenerative Changes in Spermatogonia Are Associated with Loss of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Phosphodiesterases Type 4 in Abdominal Testes of Rats. *Biol. Reprod.* 64: 1583-1589.
- Farr, S.L., Cooper, G.S., Cai, J., Savitz, D.A., Sandler, D.P. (2004). Pesticide Use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the agricultural health study. *Am. J. Epidemiol.* 160: 1194-1204.
- Feix, M., Wolf, L., Schweikert, H.V. (2001). Distribution of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human osteoblast-like cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171: 163-164.
- Filipov, N.M., Stewart, M.A., Carra, R.L., Sistrunk, S.C. (2007). Dopaminergic toxicity of the herbicide atrazine in rat striatal slices. *Toxicology* 232(1-2): 68–78.
- Fisher, J.S. (2004). Are all EDC effects mediated via steroid hormone receptors? *Toxicol. Sci.* 205: 33-41.
- Fluck, C.E., Miller, W.L., Auchus, R.J. (2003). The 17,20-Lyase Activity of Cytochrome P450c17 from Human Fetal testis Favors the Δ 5 Steroidogenic Pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(8): 3762-3766.

-
-
- Friedmann, A.S. (2002). Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod. Toxicol.* 16: 275-279.
- Friedrich, C.L. (2001). Steroidogenesis and CYP enzymes. *J Mol Med* 79: 549-550.
- Garcia-Ovejero, D., Azcoitia, I., DonCarlos, L.L., Melcangi, R.C., Garcia-Segura, L.M. (2005). Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Rev* 48(2): 273-286.
- Garney, J.C., Guthrie, H.D., Garrett, W.M., Stoler, M.H., Veldhuis, J.D. (2000). Localization and expression of low-density lipoprotein receptor, steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome P450 side-chain cleavage and P450 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase in developing swine follicles: in situ molecular hybridization and immunocytochemical studies. *Mol. Cell. Endocrinol.* 170: 57-65.
- Gazouli, M., Yao, Z.X., Boujrad, N., Corton, C., Culty, M., Papadopoulos, V. (2002). Effect of Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Gene Expression, Hormone-Stimulated Mitochondrial Cholesterol Transport, and Steroidogenesis: Role of the Peroxisome Proliferator-Activator Receptor α . *Endocrinology* 143(7): 2571-2583.
- Gojmejac, T., Kartal, B., Ćurić, S., Žurić, M., Kušević, S., Cvetnić, Ž. (1996). Serum biochemical changes associated with cystic ovarian degeneration in pigs after atrazine treatment. *Toxicol. Lett.* 85: 9-15.
- Gojmerac, T., Kniewald, J. (1989). Atrazine biodegradation in rats- a model for mammalian metabolism. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 199-206.
- Gore, A.C., Heindel, J.J., Zoeller R.T. (2006). Endocrine Disruption for Endocrinologists (and Others). *Endocrinology* 147(6) (Supplement):S1-S3.
- Gower, D.B. i Cooke G.M. (1983). Regulation of steroid-transforming enzymes by endogenous steroids. *Biochem.* 19(4): 1527-1556.
- Gros, T.S., Rauschenberger, R.H. (2006). Triazines. In: *Endocrine Disruption. Biological bases for health effects in wildlife and humans.* (D.O. Norris, J.A. Carr, Eds.) pp.424-449. Oxford, University Press.
- Grote, K., Stahlschmidt, B., Talsness, C.E., Gericke, C., Appel, K. E., Chahouda, I. (2004). Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicology* 202: 145-158.
- Guo, H., Calkins, H., Sigel, M.M., Lin, T. (1990). Interleukin-2 Is a Potent Inhibitor of Leydig Cell steroidogenesis. *Endocrinology* 127(3): 1234-1239.
- Hackney, A.C. (1996). The male reproductive system and endurance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 28(2): 180-189.

-
-
- Hagenbuch, B., Gui, C. (2008). Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* 38 (7-8): 778-801.
- Hagenbuch, B., Meier, P.J. (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1609: 1 – 18.
- Haider, S.G. (2004). Cell Biology of Leydig Cells in the Testis. *Internat. Rew. Cyt.* 233: 181-220.
- Hales, D.B. (2002). Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 57: 3-18.
- Halkier, B.A. (1996). Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* 43(1): 1-21.
- Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-kagawa, T., Nishimura, T., Ando, M. (1999). In vitro metabolism of chlorotriazines: characterization of simazine, atrazine, and propazine metabolism using liver microsomes from rats treated with various cytochrome P450 inducers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156: 195-205.
- Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 779-804.
- Harvey, P.H. and Everett, D.J. (2003). The Adrenal Cortex and Steroidogenesis as Cellular and Molecular Targets for Toxicity: Critical Omissions from Regulatory Endocrine Disrupter Screening Strategies for Human Health? *J. Appl. Toxicol.* 23: 81–87.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. (2003). Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* 111: 568-575.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *PNAS* 99: 5476-5480.
- Hecker, M., Park, J.W., Murphy, M.B., Jones, P.D., Solomon, K.R., Van Der Kraak, G., Carr, J.A., Smith, E.E., du Preez, L., Kendall, R.J., Giesy, J.P. (2005). Effects of atrazine on CYP19 gene expression and aromatase activity in testes and on plasma sex steroid concentrations of male african clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Toxicol. Sci.* 86: 273-280.
- Hedger, M.P. (1997). Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev. Reprod.* 2: 38-47.
- Heneweer, M., Van der Berg, M., Sanderson, T. (2004). A comparasion of human H295 and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicol. Lett.* 146: 183-194.
-
-

-
-
- Hopenhayn-Rich, C., Stump, M.L., Browning, S.R. (2002). Regional assessment of atrazine exposure and incidence of breast and ovarian cancers in Kentucky. *Arch Environ Contam Toxicol* 42: 127-136.
- Hossain, M.M., Filipov, N.M. (2008). Alteration of dopamine uptake into rat striatal vesicles and synaptosomes caused by an in vitro exposure to atrazine and some of its metabolites. *Toxicology* 248(1): 52–58.
- Houk, C.P., Pearson, E.J., Martinelle, N., Donahoe, P.K., Teixeira, J. (2004). Feedback Inhibition of Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression in Vitro and in Vivo by Androgens. *Endocrinology* 145(3): 1269-1275.
- Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Blystone, C.R., Hotchkiss, A.K., Gray, L.E. (2008). A Mixture of Five Phthalate Esters Inhibits Fetal Testicular Testosterone Production in the Sprague-Dawley Rat in a Cumulative, Dose-Additive Manner. *Toxicol. Sci.* 105(1): 153–165.
- Hu, G.X., Lian, Q.Q., Ge, R.S., Hardy, D.O., Li, X.K. (2009). Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (3): 139-145.
- Hu, M.C., Chiang, E.F.L., Tong, S.K., Lai, W., Hsu, N.C., wang, L.C.K., Chung, B. (2001). Regulation of steroidogenesis in transgenic mice and zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171: 9-14.
- Huang, M.C., Miller, W.L. (2001). Creation and Activity of COS-1 Cells Stably Expressing the F2 Fusion of the Human Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme System. *Endocrinology* 142(6): 2569-2576.
- Huet, T., Yao, Z.X., Bose, H.S., Wall, C.T., Han, Z., Liw, Hales D.B., Miller W.L., Culty, M., Papadopoulos, V. (2005). Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of of Steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into Leydig cell mitochondria. *Mol. Endocrinol.* 19(2): 540-544.
- Huhtaniemi, I., Toppari, J.(1995). Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis. U: *Tissue Renin-Angiotensin Systems*. Edited by Mukhopadhyay A. K., Raizada M. K., Plenum Press, New York.
- Ishimura, K., Fujita, H. (1997). Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes. *Microsc Res Tech* 36(6): 445-53.
- Jursinić, P.A., Percy, R.W. (1988). Determination of the rate limiting step for photosynthesis in a nearly isonuclear rapeseed (*Brassica napus* L.) biotype resistant to atrazine. *Plant Physiol* 88: 1195-1200.
-
-

-
-
- Keith, L.H. (1998). Environmental endocrine disruptors. *Pure and Appl. Chem.* 70(12): 2319-2326.
- Keller, J.M., McClellan-Green, P. (2004). Effects of organochlorine compounds on cytochrome P450 aromatase activity in an immortal sea turtle cell line. *Mar. Environ. Res.* 58: 347-351.
- Klaassen, C.D., Lu, H. (2008). Xenobiotic Transporters: Ascribing Function from Gene Knockout and Mutation Studies. *Toxicol. Sci.* 101(2): 186–196.
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, A.H., Zucker, R.M. (2000a). Cytogenetic studies of three triazine herbicides. I. In vitro studies. *Mutat. Res.* 465: 53-59.
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, Peng, B. (2000b). Cytogenetic studies of three triazine herbicides. II. In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 471: 107-112.
- Kniewald, J., Jakominic, M., Tomljenovic, A., Simic, B., Romac, P., Vranesic, D., Kniewald, Z. (2000). Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *J Appl Toxicol* 20: 61-68.
- Kniewald, J., Mildner, P., Kniewald, Z. (1979). Effects of s-triazine herbicides on hormone-receptor complex formation, 5 α -reductase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity at the anterior pituitary level. *J. Steroid Biochem.* 11: 833-838.
- Kniewald, J., Mildner, P., Kniewald, Z. (1980). Effects of s-triazine herbicides on 5 α -dihydrotestosterone receptor complex formation in hypothalamus and ventral prostate. *Pharmacological Modulation of Steroid Action*, edited by E. Genazzani et al. Raven press, New York.
- Kniewald, J., Osredecki, V., Gojmerac, T., Zechner, V., Kniewald, Z. (1995). Effects of s-triazine compounds on testosterone metabolism in the rat prostate. *J Appl Toxicol* 15: 215-218.
- Kniewald, J., Peruzović, M., Gojmerac, T., Milković, K., Kniewald, Z. (1987). Indirect influence of s-triazines on rat gonadotropic mechanism at early postnatal period. *J. Steroid Biochem.* 27: 1095-1100.
- Krusche, C.A., Moller, G., Beier, H.M., Adamski, J. (2001). Expression and regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 7 in the rabbit. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171: 169-177.

-
-
- Kumar, V., Balomajumder, C., Roy, P., (2008). Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: Probable mechanism of action. *Toxicology* 250: 124–131.
- Kumar, V., Chakraborty, A., Kural, M.R., Roy, P., (2009). Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reprod. Toxicol.* 27: 177–185.
- Lang, D.H., Rettie, A.E., Bocker, R.H. (1997) Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbuthylazine, ametryne, and terbutryne in human liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 1037-1044.
- Laws, S.C., Ferrell, J.M., Stoker, T.E., Schmid, J., Cooper, R.L. (2000). The effects of atrazine on female Wistar rats: an evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. *Toxicol. Sci.* 58: 366-376.
- Leckie, C.M., Welberg, L.A.M., and Seckl, J.R. (1998). 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase is a predominant reductase in intact rat Leydig cells. *J. Endocrinol.* 159: 233-238.
- Lee-Robichaud, P., Kaderbhai, M.A., Kaderbhai, N., Wright, J.N., Akhtar, M. (1997). Interaction of human CYP17 (P-45017 α , 17 α -hydroxylase-17,20-lyase) with cytochrome b5: importance of the orientation of the hydrophobic domain of cytochrome b5. *Biochem J* 321: 857-863.
- Lehmann, T.P, Biernacka-Lukanty, J.M., Saraco, N., Langlois D., Li J.Y., and Trzeciak W. H. (2005). Temporal pattern of the induction of SF-1 gene expression by the signal transduction pathway involving 3',5'-cyclic adenosine monophosphate. *Acta Biochim. Pol.* 52(2), 485-491.
- Li, D., Urs, A.N. Allegood, J., Leon, A., Merrill Jr., A.H., and Sewer, M.B. (2007). Cyclic AMP-Stimulated Interaction between Steroidogenic Factor 1 and Diacylglycerol Kinase theta Facilitates Induction of CYP17. *Mol. Cell. Biol.* 27(19): 6669-6685.
- Lukyanenko, Y.O., Carpenter, A.M., Brigham, D.E., Stocco, D.M., Hutson, J.C. (1998). Regulation of Leydig cells through a steroidogenic acute regulatory protein-independent pathway by a lipophilic factor from macrophages. *J. Endocrinol.* 158: 267-275.
- Lukyanenko, Y.O., Chen, J.J. Hutson, J.C. (2002). Testosterone Regulates 25-Hydroxycholesterol Production in testicular macrophages. *Biol. Reprod.* 67: 1435-1438.

-
-
- Luu-The, U., Zhang, Y., Poirier, D., Labrie, F. (1995). Characteristics of Human type 1,2 and 3 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activities: Oxidation/Reduction and Inhibition. *J Steroid Biochem Molec Biol* 55(5/6): 581-587.
- Ma, L. (2009). Endocrine disruptors in female reproductive tract development and carcinogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 20(7): 357-363.
- Maffini, M.V., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M. (2006). Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A. *Mol. Cell. Endocrinol.* 254–255: 179–186.
- Majdić, G., Saunders, P.T.K., Teerds, K.J. (1998). Immunoexpression of the Steroidogenic Enzymes 3-Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase and 17 α -Hydroxylase, C17,20 Lyase and the Receptor for Luteinizing Hormone (LH) in the Fetal Rat Testis Suggests That the Onset of Leydig Cell Steroid Production Is Independent of LH Action. *Biol. Reprod.* 58: 520-525.
- Manna, P., Pakarinen, P., El-Hefnawy, T., Huhtaniemi, I.T. (1999). Functional Assessment of the Calcium Messenger System in Cultured Mouse Leydig Tumor Cells: Regulation of Human Chorionic Gonadotropin-Induced Expression of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein. *Endocrinology* 140(4): 1739-1751.
- Manna, P.R., Chandrala, S.P., Jo, Y. and Stocco, D.M. (2006). cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. *J. Mol. Endocrinol.* 37: 81-95.
- Manna, P.R., Eubank, D.W., Stocco, D.M. (2004). Assessment of the Role of Activator Protein-1 on Transcription of the Mouse Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene. *Molecular Endocrinology* 18(3): 558–573.
- Manna, P.R., Huhtaniemi, I.T., Wang, X.J., Eubank, D.W., Stocco, D.M. (2002). Mechanisms of Epidermal Growth Factor Signaling; regulation of Steroid Biosynthesis and steroidogenic Acute Regulatory protein in Mouse Leydig Tumor Cells. *Biol. Reprod.* 67: 1393-1404.
- Manna, P.R., Jo, Y., Stocco, D.M. (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: 53-63.
- Manna, P.R., Wang, X.J., Stocco, D.M. (2003). Involvement of multiple transcription factors in the regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *Steroids* 68 :1125–1134.
-
-

-
-
- Martinele, N., Holst, M., Soder, O., Svechnikov, K. (2004). Extracellular Signal-Regulated Kinases Are Involved in the Acute Activation of Steroidogenesis in Immature Rat Leydig Cells by Human Chorionic Gonadotropin. *Endocrinology* 145(10): 4629-4634.
- Mason, J.I., Howe, B.E., Howie, A.F., Moraley, S.D., Nicol, M.R., Payne, A.H. (2004). Promiscuous 3 beta-hydroxydteroid dehydrogenase: testosterone 17 beta-hydroxydteroid dehydrogenase activities of mouse type I and VI 3 beta-hydroxydteroid dehydrogenase. *Endocr. Res.* 30(4): 709-14.
- Masuyama, H., Hiramatsu, Y. (2004). Involvement of Suppressor for Gal 1 in the Ubiquitin/proteasome-mediated Degradation of Estrogen Receptors. *J. Biol. Chem.*: 13: 12020-12026.
- Matsunaga, M., Ukena, K., Tsutsui, K. (2001). Expression and localization of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17,20-lyase in the avian brain. *Brain Research* 899: 112-122.
- McMullin, T.S., Andersen, M.E., Nagahara, A., Lund, T.D., Pak, T., Handa, R.J., Hanneman, W.H. (2004). Evidence that atrazine and diaminochlorotriazine inhibit the estrogen/progesterone induced surge of luteinizing hormone in female Sprague-Dawley rats without changing estrogen receptor action. *Toxicol. Sci.* 79: 278-286.
- McMullin, T.S., Andersen, M.E., Tessari, J.D., Cranmer, B., Hanneman, W.H. (2007). Estimating constants for metabolism of atrazine in freshly isolated rat hepatocytes by kinetic modeling. *Toxicol. In Vitro* 21:492-501.
- McMullin, T.S., Brzezicki, J.M., Cranmer, B.K., Tessari, J.D., Andersen, M.E. (2003). Pharmacokinetic modeling of disposition and time-course studies with [14C]-atrazine. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66 : 941-964.
- Millena, A.C., Reddy, S.C., Bowling, G.H., Khan, S.A. (2004). Autocrine regulation of steroidogenic function of Leydig cells by transforming growth factor- α . *Mol. Cell. Endocrinol.* 224: 29-39.
- Miller, W.L. (1995). Mitochondrial Specificity of the Early Steps in Steroidogenesis. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 55(5/6): 607-616.
- Miller, W.L., Auchus, R.J., Geller, D. (1997). The regulation of 17,20 lyase activity. *Steroids* 62: 133-142.
- Mindich, R., Moller, G., Adamski, J. (2004). The role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol. Cell. Endocrinol.* 218: 7-20.
- Morales, V., Santana, P., Diaz, R., Tabraune, C., Gallardo, G., Blanco, F.L., Hernandez, I., Fanjul, L.F. (2003). Intratesticular Delivery of Tumor Necrosis Factor- α and

-
-
- Ceramide Directly Abrogates Steroidogenic Acute regulatory Protein Expression and Leydig Cell Steroidogenesis in Adult Rats. *Endocrinology* 144(11): 4763-4772.
- Morinaga, H., Yanase, T., Noura, M., Okabe, T., Goto K., Harada N., Nawata H. (2004). A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology* 145(4):1860-1869.
- Morohashi, K., Fujii-Kuriyama, Y., Okada, Y., Sogawa, K., Hirose, T., Inayama, S. (1984). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450(SCC) of bovine adrenal cortex. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 81: 4647-4651.
- Morohashi, K., Sogawa, K., Omura, T., Fujii-Kuriyama, Y. (1987). Gene structure of human cytochrome P-450 (SCC), cholesterol desmolase. *J Biochem (Tokyo)* 101(4): 879-87.
- Murphy, M.B., Hecker, M., Coady, K.K, Tompsett, A.R., Higley, E.B., Jones, P.D., Du Preez, L.H., Solomon, K.R., Carr, J.A., Smith, E.E., Kendall, R.J., Van Der Kraak, G., Giesy, J.P. (2006). Plasma steroid hormone concentrations, aromatase activities and GSI in ranid frogs collected from agricultural and non- agricultural sites in Michigan (USA). *Aquat. Toxicol.* 77: 153-166.
- Murray, A.J. (2008). Pharmacological PKA Inhibition: All May Not Be What It Seems. *Sci Signal* 1 (22) re4. [DOI: 10.1126/scisignal.122re4].
- Napoli, J.L. (2001). 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 9 and other short-chain dehydrogenases/reductases that catalyze retinoid, 17 β - and 3 α -hydroxysteroid metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171: 103-109.
- Narasaka, T., Suzuki, T., Moriya, T., Sasano, H. (2001). Temporal and spatial distribution of Corticosteroidogenic Enzymes Immunoreactivity in developing human adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 174: 111-120.
- Narotsky, M.G., Best, D.S., Guidici, D.L., Cooper, R.L. (2001). Strain comparison of atrazine-induced pregnancy loss in the rat. *Reprod. Toxicol.* 15: 61-69.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzales, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12(1): 1-51.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. (1996).
-
-

-
-
- P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6(1): 1-42.
- Nordling, E., Oppermann, V.C.T., Jornvall, H., Persson, B. (2001). Human type 10 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Molecular modelling and substrate docking. *J. Mol. Graph. Model.* 19: 514-520.
- Noriega, N.C., Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Wilson, V.S., Gray, L.E. (2009). Pubertal Administration of DEHP Delays Puberty, Suppresses Testosterone Production, and Inhibits Reproductive Tract Development in Male Sprague-Dawley and Long-Evans Rats. *Toxicol. Sci.* 105(1): 163–178.
- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson E.R. (2001). Estrogen and Spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 22(3): 289-318.
- Oh, S.M., Shim, S.H., Chung, K.H. (2003). Antiestrogenic action of atrazine and its major metabolites in vitro. *J. Health Sci.* 49: 65-71.
- Oishi, S. (2001). Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health* 17: 31 – 39.
- Papadopoulos, V., Brown, A.S. (1995). Role of the peripheral type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 103-110.
- Papadopoulos, V., Liu, J., and Martine, C. (2007). Is there a mitochondrial signaling complex facilitating cholesterol import. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265-266: 59-64.
- Payne, A.H. (2007). Steroidogenic enzymes in Leydig cells. In: *The Leydig Cell in Health and Disease*. (A.H. Payne, and M.P. Hardy, Eds.) pp.157-171. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Payne, A.H., Abbaszade, I.G., Clarke, T.R., Bain, P.A., Park, C.H. (1997). The multiple murine 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms: structure, function, and tissue- and developmentally specific expression. *Steroids* 62: 169-175.
- Payne, A.H., Hales, D.B. (2004). Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocr. Rev.* 25(6): 947-970.
- Payne, A.H., Youngblood, G.L. (1995). Regulation of Expression of Steroidogenic Enzymes in Leydig Cells. *Biol. Reprod.* 52: 217-225.
- Pelletier, G., Li, S., Luu-The, V., Tremblay, Y., Belanger, A., Labrie, F. (2001). Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes

-
-
- (cytochrome P450(scc), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17) in rat adrenal cortex and gonads. *J Endocrinol* 171: 373-383.
- Peltoketo, H., Nokelainen, P., Piao, Y., Vihko, R., Vihko, P. (1999). Two 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 HSDs) of estradiol biosynthesis: 17 HSD type 1 and type 7. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69: 431-439.
- Peng, L., Arensburg, J., Orly, J., Payne, A.H. (2002). The murine 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) gene family: a postulated role for 3 β -HSD VI during early pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 187: 213-221.
- Penning, T.M., Burczynski, M.E., Jez, J.M., Lin, H.K., Ma, H., Moore, M., Ratnam, K., Palacakal, N. (2001). Structure-function aspects and inhibitor design of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Mol. Cell. Endocrinol.* 171: 137-149.
- Perkins, L.M., Payne, A.H. (1988). Quantification of P450scc, P450c(17) alpha, and iron sulfur protein reductase in Leydig cells and adrenals of inbred strain of mice. *Endocrinology* 123: 2675-2682.
- Pinchuk, L.M., Lee, S.R., Filipov, N.M. (2007). *In vitro* Atrazine Exposure Affects the Phenotypic and Functional Maturation of Dendritic Cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 223(3): 206–217.
- Pogrmic, K., Fa, S., Dakic, V., Kaisarevic, S. and Kovacevic, R., (2009). Atrazine Oral Exposure of Peripubertal Male Rats Down-Regulates Steroidogenesis Gene Expression in Leydig Cells. *Toxicol. Sci.* 111(1): 189-197.
- Provost, P.R., Tremblay, Y. (2005). Genes involved in the adrenal pathway of glucocorticoid synthesis are transiently expressed in the developing lung. *Endocrinology* 146(5): 2239-45.
- Pucarevic, M., Šovljanski, R., Lazić, S., and Marjanović, N. (2002), Atrazine in groundwater of Vojvodina Province. *Water Res.* 36: 5120-5126.
- Rao, R.M., Jo, Y., Leers-Sucheta, S., Bose, H.S., Miller, W.L., Azhar, S., Stocco, D.M. (2003). Differential Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis in R2C and MA-10 Leydig Tumor Cells: Role of SR-B1-Mediated Selective Cholesteryl Ester Transport. *Biol. Reprod.* 68: 114-121.
- Rayner, J.L., Enoch, R.R., Fenton, S.E. (2005). Adverse effects of prenatal exposure to atrazine during a critical period of mammary gland growth. *Toxicol. Sci.* 87: 255-266.

-
-
- Rayner, J.L., Wood, C., Fenton, S.E. (2004). Exposure parameters necessary for delayed puberty and mammary gland development in Long-Evans rats exposed in utero to atrazine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195: 23-34.
- Reyland, M.E., Evans, R.M., White, E.K. (2000). Lipoproteins Regulate Expression of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) in the Mouse Adrenocortical Cells. *J. Biol. Chem.* 275(47): 36637-36644.
- Rheaume, E., Lachance, Y., Zhao, H.F., Breton, N., Dumont, M., deLaunoit, Y., Trudel, C., Luu-The, V., Simard, J., Labrie, F. (1991). Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol* 5: 1147-1157.
- Roberge, M., Hakk, H., Larsen, G. (2004). Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicol. Lett.* 154: 61-68.
- Rodriguez, V., Thiruchelvam, M., Corz-Slechta. (2005). Sustained exposure to the widely used herbicide atrazine: altered function and loss of neurons in brain monoamine systems. *Environ Health Perspect* 113 (6): 708-715.
- Rosenberg, B.G., Chen, H., Folmer, J., Liu, J., Papadopoulos, V., and Zirkin, B.R. (2008). Gestational exposure to atrazine: effects on the postnatal development of male offspring. *J. Androl.* 29: 304-311.
- Ross, M.K., Jones T.L., Filipov, N.M (2008). Disposition of the herbicide atrazine and its major metabolites in mice: An LC-MS analysis of urine, plasma, and tissue levels. *Drug Metab. Dispos. Fast Forward*, DOI: 10.1124/dmd.108.024927.
- Ross, M.K., Filipov, N.M (2006). Determination of atrazine and its metabolites in mouse urine and plasma by LC-MS analysis. *Anal Biochem* 351:161-173.
- Sanderson, J.T. (2006). The steroid hormone biosynthesis pathways as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol. Sci.* 94: 3-21.
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., Van der Berg, M. (2002). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182: 44-54.
- Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P., Van der Berg, M. (2000). 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54: 121-127.
- Sanderson, J.T., Van der Berg, M. (2003). Interaction of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. *Pure Appl. Chem.* 75: 1957-1971.
-
-

-
-
- Sandreson, J.T., Letcher, R.J., Heneweer, M., Giesy, J.P., Van der Berg, M. (2001). Effects of Chloro-S-triazines and metabolites on aromatase activity in various cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Enviro Health Perspect.* 109:1027-31.
- Saradha, B., Vaithinathan, S., Mathur, P.P. (2008). Single exposure to low dose of lindane causes transient decrease in testicular steroidogenesis in adult male Wistar rats. *Toxicology* 244 : 190–197.
- Sass, J.B., Colangelo, A. (2006). European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *Int J Occup Environ Health* 12: 260-267.
- Schulz, R. W., Visher, H.F., Cavaco, J.E.B., Santos, E.M., Tyler, C.R., Goos, H.J.Th., Bogerd, J. (2001). Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Compar. Biochem Physiol. Part B* 129: 407-417.
- Schwarzenbach, H., Manna, P.R., Stocco, D.M., Chakrabarti, G. (2003). Stimulatory Effect of Progesterone on the Expression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein in MA-10 Leydig Cells. *Biol. Reprod.* 68: 1054-1063.
- Scott, H.M., Mason, J.I., Sharpe, R.M. (2009). Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds. *Endocr. Rev.* 30(7): 883–925.
- Sewer, M.B. and Jagarlapudi, S. (2009). Complex assembly on the human CYP17 promoter. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300 (1-2): 109-114.
- Sewer, M.B., Waterman, M.R. (2003). ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Micros. Res. Tech.* 61: 300-307.
- Sha, J.A., Dudley, K., Rajapaksha W.R.A.K.J.S., O'shaughnessy, P.J. (1996). Sequence of Mouse 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and type 3 Isoform mRNAs. *J Steroid Biochem Molecular Biol* 60(1-2): 19-24.
- Sharpe, R.M. (2001). Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol. Lett.*, 120 : 221–232
- Shimabukuro, R.H., Swason, H.R.; Walsh, W.C. (1970). Glutathione conjugation. Atrazine detoxication mechanism in corn. *Plant Physiol* 46: 103-107.
- Simard, J., Couet, J., Durocher, F., Labrie, Y., Sanchez, R., Breton, N., Turgeon, C., Labrie, F. (1993). Structure and tissue-specific expression of a novel member of rat 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase (3 β -HSD) family. The exclusive 3 β -HSD gene expression in the skin. *J Biol Chem* 268: 19659-19668.

-
-
- Simard, J., deLaunoit, Y., Labrie, F. (1991). Characterization of the structure-activity relationships of rat types I and II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase by site-directed mutagenesis and expression in HeLa cells. *J Biol Chem* 266: 14842-14845.
- Simić, B., Kniewald, J., Kniewald, Z. (1994). Effects of atrazine on reproductive performance in the rat. *J Appl Toxicol* 14: 401-404.
- Singh, M., Sandhir, R., Kiran, R. (2008). Atrazine-Induced Alterations in Rat Erythrocyte Membranes: Ameliorating Effect of Vitamin E. *J Biochem Molecular Toxicology* 22 (5): 363-369.
- Solomon, G.M., Schettler, T., (2000). Environment and health: Endocrine disruption and potential human health implications. *Can Med Assoc J*: 1471-1476.
- Solomon, K.R., Carr, J.A., Du Preez, L.H., Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., Van Der Kraak, G.J. (2008). Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review. *Crit. Rev. Toxicol.* 38: 721–772.
- Speirs, U., Green, A.R., Atkin, S.L. (1998). Activity and Gene Expression of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I in Primary Cultures of Epithelial and Stromal cells Derived from Normal and Tumorous Human Breast Tissue: the Role of IL-8. *J Steroid Biochem Molec Biol* 67: 267-274.
- Steckelbroeck, S., Watzka, M., Reissinger, A., Wegener-Topper, P., Bidlingmaier, F., Bliesener, N., Hans, V.H.J., Clusmann, H., Ludwig, M., Siekmann, L., Klingmuller, D. (2003). Characterisation of estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) activity in the human brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86: 79-92.
- Steckelbroeck, S., Watzka, M., Stoffel-Wagner, B., Hans, V.H.J., Redel, L., Clusmann, H., Elger, C.E., Bidlingmaier, F., Klingmuller, D. (2001). Expression of the 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 mRNA in human brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171: 165-168.
- 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.
- Stocco, D.M. (1998). Recent advances in the role of StAR. *Rev. Reprod.* 3: 82-85.
- Stocco, D.M. (2001). Tracking the Role of a StAR in the Sky of the New Millennium. *Mol. Endocrinol.* 15(8): 1245-1254.

-
-
- Stocco, D.M., Clark, B.J. (1996). Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells. *Endoc. Rev.* 17(3): 221-244.
- Stocco, D.M., Clark, B.J. (1997). The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids* 62: 29-36.
- Stocco, D.M., Clark, B.J., Reinhart, A.J., Williams, S.C., Dyson, M., Dassi, B., Walsh, L.P., Manna, P.R., Wang, X., Zeleznik, A.J., Orly, J. (2001). Elements involved in the regulation of StAR gene. *Mol Cell Endocrinol* 177: 55-59.
- Stoker, T.E., Guidici, D.L., Laws, S.C., Cooper, R.L. (2002). The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. *Toxicol. Sci.* 67: 198-206.
- Stoker, T.E., Laws, S.C., Guidici, D.L., Cooper, R.L. (2000). The effects of atrazine on puberty in male Wistar rats: An evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *Toxicol. Sci.* 58: 50-59.
- Stoker, T.E., Robinette, C.L., Cooper, R.L. (1999). Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses suckling-induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring. *Toxicol. Sci.* 52: 68-79.
- Stromstedt, M., Waterman, M.R. (1995). Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 34: 75-88.
- Sugawara, T., Lin, D., Holt, J.A., Martin, K.O., Javitt, N.B., Miller, W.L., Strauss, J.F. III (1995). Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity. *Biochemistry* 34: 12506– 12512.
- Sulmon, C., Gouesbet, G., Couee, I., El Amrani, A. (2004). Sugar-induced tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine and soluble sugars on *psbA* mRNA and D1 protein levels. *Plant Sci.* 167: 913–923.
- Suzawa, M. and Ingraham, H.A (2008). The Herbicide Atrazine Activates Endocrine Gene Networks via Non-Steroidal NR5A Nuclear Receptors in Fish and Mammalian Cells. *PLoS ONE* 3(5): e2117 doi:10.1371/journal.pone.0002117.
- Suzuki, T., Sasano, H., Takeyama, J., Kaneko, C., Freije, W.A., Carr, B.R., Rainey, W.E. (2000). Developmental changes in steroidogenic enzymes in human postnatal adrenal cortex: immunohistochemical studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 53: 739-747.

-
-
- Svechnikov, K., Svechnikova, I., Soder, O. (2008). Inhibitory effects of mono-ethylhexyl phthalate on steroidogenesis in immature and adult rat Leydig cells in vitro. *Reprod. Toxicol.* 25(4): 485-490.
- Swan, S.H. (2006). Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int. J. Androl.* 29: 62-68.
- Swan, S.H., Kruse, R.L., Liu, F., Barr, D.B., Drobni, E.Z., Redmon, J.B., Wang, C., Brazil, C., Overstreet, J.W. and the Study for Future Families Research Group (2003). Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ. Health Perspect.* 111: 1478-1484.
- Swart, P., Lombard, N., Swart, A.C., van der Merwe, T., Murry, B.A., Nicol, M., Mason, J.I. (2003). Ovine steroid 17α -hydroxylase and lyase activities of the adrenal cortex enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 409: 145-152.
- Tabb, M.M., Blumberg, B. (2005). New modes of action for endocrine disrupting chemicals. *Mol. Endocrinol.* 20: 475-482.
- Takamiya, M., Lambard, S., Huhtaniemi, I.T. (2007). Effect of bisphenol A on human chorionic gonadotrophin-stimulated gene expression of cultured mouse Leydig tumour cells. *Reprod. Toxicol.* 24: 265-275.
- Taxvig, C., Vinggaard, A.M., Hass, U., Axelstad, M., Boberg, J., Hansen, P.R., Frederiksen, H., Nellemann, C. (2008). Do Parabens Have the Ability to Interfere with Steroidogenesis? *Toxicol. Sci.* 106 (1): 206-213.
- Thomas, J.L., Mason, J.I., Brandt, S., Spencer, J.B.R., Norris, W. (2002). Structure/ function relationships responsible for the kinetic differences between human type 1 and type 2 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and for the catalysis of the type 1 activity. *J Biol Chem* 277: 42795-42801.
- Thomas, J.L., Duax, W.L., Addlagatta, A., Brandt, S., Fuller, R.R., Norris, W. (2003). Structure/ function relationships responsible for coenzyme specificity and the isomerase activity of human type 1 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase. *J Biol Chem* 278: 35483-35490.
- Thomas, J.L., Duax, W.L., Addlagatta, A., Kacsoh, B., Brandt, S.E., Norris, W.B. (2004). Structure/ function aspects of human 3β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215: 73-82.

-
-
- Thomas, P. i Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by enviromental eatrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102: 175-179.
- Thomson, M. (1998). Molecular and Cellular Mechanisms Used in the Acute Phase of Stimulated Steroidogenesis. *Horm. Metab. Res.* 30: 16-28.
- Timchalk, C., Dryzga, M.D., Langvardt, PW. (1990). Determination of the effect of tridiphane on thempharmacokinetics of [14C]-atrazine following oral administration to male Fischer 344 rats. *Toxicology* 61: 27-40.
- Torn, S., Nokelainen, P., Kurkela, R., Pulkka, A., Menjivar, M., Ghosh, S., Coca-Prados, M., peltoketo, H., Isomaa, V., Vihko, P. (2003). Production, purification, and functional analysis of recombinant human and mouse 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 37-45.
- Toth, I., Szesci, M., Julesz, J., Faredin, I. (1997). Actyvity and Inhibition of 3-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Delta-5-4-Isomerase in Human Skin. *Skin Pharmacol* 10: 160-168.
- Toxicological Profile for Atrazine, 2003 ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry ToxFAQs Chemical Fact Sheets, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp153-c2.pdf>
- Tremblay, J.J. (2007). Transcription factors as regulators of gene expression during Leydig cell differentiation and function. U: *The Leydig Cell in Health and Desease*.(A.H. Payne, and M.P. Hardy, Eds.) pp.333-343. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Trentacoste, S.V., Friedmann, A.S., Youker, R.T., Breckenridge, C.B., Zirkin, B.R. (2001). Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. *J. Androl.* 22: 142-148.
- Triazine network, (2004). Review of the carcinogenic potential of atrazine in light of its nomination by niehs for listing in the 12th national toxicology program report on carcinogenesis.
- U.S. EPA. (2001). Revised preliminary human health risk assessment: atrazine. Memorandum from Catherine Eiden, Health Effects Division. Case #0062. http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/atrazine/revsd_pra.pdf
- U.S. EPA. (2002). The grouping of a series of triazine pesticides based on a common mechanism of toxicity. <http://www.epa.gov/pesticides/cumulative/triazines/triazinestransmittalmemo.htm>

-
-
- Ukena, K., Kohchi, C., Tsutsui, K. (1999). Expression and Activity of 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 Isomerase in the Rat Purkinje Neuron during Neonatal Life. *Endocrinology* 140(2): 805-813.
- Urs, A.N., Dammer, E., Kelly, S., Wang, E., Merrill Jr., A.H., and Sewer, M.B. (2007). Steroidogenic factor-1 is a sphingolipid binding protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265-266: 174-178.
- Van der Berg, M., Sanderson, T., Kurihara, N., Katayama, A. (2003). Role of metabolism in the endocrine-disrupting effects of chemicals in aquatic and terrestrial systems. *Pure Appl. Chem.* 75: 1917-1932.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57-149.
- Vianello, S., Waterman, M.R., Dalla Valle, L., Colombo, L. (1997). Developmentally Regulated Expression and Activity of 17 α -Hydroxylase/C17,20-Lyase Cytochrome P450 in Rat Liver. *Endocrinology* 138(8): 3166-3174.
- Vihko, P., Isomaa, V., Ghosh, D. (2001). Structure and Function of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171: 71-76.
- Villanueva, C.M., Durand, G., Coutte, M.B., Chevrier, C., Cordier, S. (2006). Atrazine in municipal water and risk of low birth weight, preterm delivery, and small-for-gestational- age status. *Occup Environ Med* 62: 400-405.
- Wang, Y., Ge, W. (2004). Cloning of zebrafish ovarian P450c17 (CYP17, 17 α -hydroxylase-17/20-lyase) and characterization of its expression in gonadal and extra-gonadal tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135: 241-249.
- Watson, E.D., Bae, S.E., Steele, M., Thommasen, R., Pedersen, H.G., Bramley, T., Hogg, C.O., Armstrong, D.G. (2004). Expression of messenger ribonucleic acid encoding for steroidogenic acute regulatory protein and enzymes, and luteinizing hormone receptor during the spring transitional season in equine follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 26: 215-230.
- Weng, Q., Medan, M.S., Watanabe, G., Tsubota, T., Tanioka, Y., Taya, K. (2005). Immunolocalization of steroidogenic enzymes P450scc, 3 β HSD, P450c17, P450 arom in Gottingen miniature pig testes. *J Reprod Dev* 51(3): 299-304.
- Wiegand, C., Pugmacher, S., Giese, M., Frank, H., Steinberg, C. (2000). Uptake, Toxicity, and Effects on Detoxication Enzymes of Atrazine and Trifluoroacetate in Embryos of Zebrafish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45: 122-131.
-
-

-
-
- Wilhelms, K., Fitzpatrick, K., Scanes, C. (2006). *In vivo* exposure to a triazine herbicide: effects of atrazine on circulating reproductive hormones and gonadal histology in young Japanese quail. *Arch Environ Contam Toxicol* 51(1): 117-22.
- Wilhelms, K.W., Cutler, S.A., Proudman, J.A., Anderson, L.L., Scanes, C.G. (2005). Atrazine and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sexually maturing precocial birds: Studies in male Japanese quail. *Toxicol. Sci.* 86: 152-160.
- Wurthner, J.U., Kistler, M., Kratzmeier, M, Mukhopadhyay, A.K. (1995). LH/hCG-receptor is coupled to both adenylate cyclase and protein kinase C signaling pathways in isolated mouse Leydig cells. *Endocrine* 3: 579-584.
- Zhang, L., Rodriguez, H., Ohno, S., Miller, W.L. (1995). Serine Phosphorylation of Human P450c17 Increases 17,20-Lyase Activity: Implications for Adrenarche and the Polycystic Ovary Syndrome. *Proceedings of the National Academy of Science* 92: 10619-10623.
- Zhang, P., Han, X.G., Mellon, S.H., Hall, P.F. (1996). Expression of the gene for cytochrome P-450 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase (CYP17) in porcine Leydig cells: identification of a DNA sequence that mediates cAMP response. *Biochemica et Biophysica Acta* 1307: 73-82.
- Zhao, H.F., Rheaume, E., Trudel, C., Couet, J., Labrie, F., Simard, J. (1990). Structure and sexual dimorphic expression of a liver-specific rat 3 beta-hydroxydteroid dehydrogenase/ isomerase. *Endocrinology* 127(6): 3237-9.
- Zirkin, B.R., Chen, H., Luo, L. (1997). Leydig cell steroidogenesis in aging rats. *Exp. Gerontol.* 32(4/5): 529-537.
- Zorrilla, L.M., Gibson, E.K., Jeffay, S.C., Crofton, K.M., Setzer, W.R., Cooper, R.L., Stoker, T.E. (2009). The Effects of Triclosan on Puberty and Thyroid Hormones in Male Wistar Rats. *Toxicol. Sci.* 107(1): 56–64.
- Zwain, I.H., Yen, S.S.C. (1999). Dehydroepiandrosterone: Biosynthesis and Metabolism in the Brain. *Endocrinology* 140(2): 880-887.
- Željčić, D., Garaj-Vrhovac, V., (2004). Genotoxicity evaluation of pesticide formulations containing alachlor and atrazine in multiple mouse tissues (blood, kidney, liver, bone marrow, spleen) by comet assay. *Neoplasma* 51(3): 198-203.

BIOGRAFIJA



Kristina Pogrmić rođena je 01. jula 1978. godine u Sremskoj Mitrovici. Osnovnu i srednju školu završila je u Šidu, sa odličnim uspehom. Na Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, odsek biologija, smer diplomirani biolog, upisala se 1997. godine. Diplomirala je 2002. godine, sa prosečnom ocenom 9.21 i stekla naziv diplomiranog biologa. Iste godine upisala je poslediplomske studije na PMF-u u Novom Sadu, odsek hemija, disciplina biohemija. 2006. se prebacila na doktorske studije na PMF-u u Novom Sadu, odsek hemija, disciplina biohemija, gde je položila sve ispite predviđene Nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00. Od 2006. do 2008. bila je angažovana kao istraživač-pripravnik na Fiziologiji životinja, Departman za Biologiju i Ekologiju PMF-a u Novom Sadu, finansirana od Pokrajinskog Sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj, a od 2008. finansirana sa projekta REP-LECOTOX i projekta Ministarstva nauke i zaštite životne sredine. U proteklom periodu bila je angažovana u izvođenju vežbi na predmetima: Reproductivna Endokrinologija, Uporedna Fiziologija životinja, Fiziologija životinja, Osnovi fiziologije životinja i Imunologija, na Departmanu za Biologiju i Ekologiju PMF-a u Novom Sadu.

Bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta tokom osnovnih studija, Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, tokom poslediplomskih studija. Dobila je stipendije FEBS i IUBMB za učešće na kongresima, kao i stipendiju Marine Biological Laboratory za stručno usavršavanje. Aktivno koristi engleski jezik.

Bavi se naučno-istraživačkim radom iz oblasti reproduktivne endokrinologije i ekotoksikologije, u okviru kojih se i usavršavala. 2008. godine pohađala je kurs "Frontiers in Reproduction 2008", na Institutu Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA, a 2006. godine pohađala je letnju školu: "2nd Summer School of Environmental Chemistry and Ecotoxicology 2006", RECETOX, Brno, Češka Republika.