

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Maja M. Srbovan

**FUNKCIONALNOST I OBRAZAC SIGNALNIH PUTEVA  
LAJDIGOVIH ĆELIJA ODRASLIH PACOVA NAKON  
PRIMENE ANABOLIČKIH ANDROGENIH STEROIDA**  
doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Maja M. Srbovan

**FUNCTIONALITY AND PATTERN OF SIGNALING  
PATHWAYS OF LEYDIG CELLS IN ADULT RATS AFTER  
ADMINISTRATION OF ANABOLIC ANDROGENIC  
STEROIDS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTORI:

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

dr Nebojša Jasnić, vanredni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA:

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

dr Nebojša Jasnić, vanredni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

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

dr Jelena Đorđević, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane \_\_\_\_\_

## INFORMACIJE O MESTU IZRADE, FINANSIRANJU DISERTACIJE I RADOVIMA

Svi eksperimenti su dizajnirani i izvedeni u Laboratoriji za reproduktivnu endokrinologiju i signaling (<https://www.dbe.uns.ac.rs/en/nauka-eng/lares>) Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i odobreni su od strane lokalnog Etičkog komiteta Univerziteta u Novom Sadu (brojevi odobrenja: I-2011-02, III-2011-04).

### PROJEKTI KOJIMA JE FINANSIRANA IZRADA DOKTORSKE DISERTACIJE:

- (1) ON173057 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS  
(rukovodilac: prof. dr Tatjana Kostić)
- (2) APV0253, APV2397, APV2570, APV3417, APV1137 Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj Vojvodine (rukovodilac: prof. dr Silvana Andrić).
- (3) SCOPES #IZ73Z0-128070 Švajcarske nacionalne fondacije (rukovodioci: prof. dr Serge Nef, prof. dr Silvana Andrić).

### RADOVI U KOJIMA SU OBJAVLJENI REZULTATI DOKTORSKE DISERTACIJE:

- (1) **Bjelic MM**, Stojkov NJ, Baburski AZ, Sokanovic SJ, Mihajlovic AI, Janjic MM, Kostic TS, Andric SA (2014) Molecular adaptations of testosterone-producing Leydig cells during systemic *in vivo* blockade of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 396: 10-25. **IF= 4.405**
- (2) **Bjelic MM**, Stojkov NJ, Radovic SM, Baburski AZ, Janjic MM, Kostic TS, Andric SA (2015) Prolonged *in vivo* administration of testosterone-enanthate, the widely used and abused anabolic androgenic steroid, disturbs prolactin and cAMP signaling in Leydig cells of adult rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 149: 58-69. **IF= 3.985**

### DOZVOLA ZA PONOVNU UPOTREBU:

Za sve slike i tabele prikazane u doktorskoj disertaciji, a objavljene u navedenim radovima, dobijena je dozvola tj. autorsko pravo (*engl.* Copyright Permission) za ponovno korišćenje, reprodukciju i modifikaciju jezika, ljubaznošću vlasnika autorskih prava (©Elsvire Ltd) izdavačke kuće Elsvire (Holandija).

## SAŽETAK

Lajdigove ćelije intersticijuma testisa su primarno mesto sinteze androgenih hormona, a dominantno testosterona (T). Ovaj hormon je zajedno sa svojim metabolitom dehidrotosteronom (DHT) neophodan, kako za produženje vrste obezbeđivanjem pravilnog razvoja i funkcionisanja muškog reproduktivnog sistema, tako i za opšte zdravlje individue. U cilju tretiranja brojnih kliničkih poremećaja, kao i u svrhu kontracepcije, sintestisani su derivati androgena čija se primena u klinici zasniva na dejstvu koje ostvaruju posredstvom androgenih i/ili anaboličkih efekata, te su zajedničkim imenom nazvani anabolički androgeni steroidi (AAS). Nažalost, AAS se često zloupotrebljavaju, ne samo od strane profesionalnih i rekreativnih sportista, nego i velike populacije adolescenata, iako je dobro poznato da njihova upotreba u neterapeutske svrhe može izazvati niz neželjenih zdravstvenih posledica. Stoga su AAS svrstani u grupu farmakoloških preparata čija je upotreba strogo regulisana i nisu dostupni bez lekarskog recepta. Uprkos široko rasprostranjenoj kliničkoj upotrebi i zloupotrebi AAS, kao i velikom interesovanju naučne zajednice za ovu problematiku, nisu u potpunosti razjašnjeni molekularni događaji koji su posledica njihove kratkoročne i dugoročne primene.

S obzirom na značaj T za reprodukciju i produženje vrste, ali i zdravlje i kvalitet života individue, kao i široku primenu i zloupotrebu T i njegovih derivata, neophodno je okarakterisati precizne molekularne događaje nastale kao posledica poremećene homeostaze T. Ovo je važno zbog toga što, prema trenutno dostupnoj literaturi, ne postoji dovoljan broj podataka o funkcionalnosti i obrascima signalnih puteva Lajdigovih ćelija, čija je osnovna uloga sinteza i sekrecija T. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja bio da ispita funkcionalnost i obrasce signalnih puteva važnih za održavanje steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija, narušene primenom egzogenih agonista i/ili antagonista T u *in vivo* ili *in vitro* uslovima. U tu svrhu primenjen je derivat T, testosteron-enantat (TE), koji se najčešće upotrebljava u kliničkoj praksi, ali se i u najvećoj meri zloupotrebljava i najprodavaniji je na tzv. "crnom" tj. ilegalnom tržištu. Ovakav model daje mehanistički pristup, ali ima i translacioni aspekt, s obzirom na to da su upotrebljavane doze/koncentracije T koje se koriste u kliničkoj praksi ili se zloupotrebljavaju. Rezultati su pokazali da *in vivo* aplikacija TE inhibira steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija odraslih pacova, kao i relativnu ekspresiju gena za komponente cAMP-PRKA signalizacije, kao glavnog regulatora steroidogeneze ovih ćelija. Suprotno, primena TE je stimulisala ekspresiju enzima koji učestvuju u sintezi T - hidroksteroid

dehidrogenaze 3 beta (HSD3B), zatim androgenog receptora (AR), kao i elemenata JAK-STAT, uključenih u regulaciju ekspresije HSD3B. Sistemska *in vivo* blokada AR je potpuno ili delimično prevenirala TE-poremećenu homeostazu intersticijske tečnosti testisa (TIF), funkcionalnost Lajdigovih ćelija, kao i poremećen obrazac ekspresije komponenti steroidogene mašinerije i cAMP-PRKA signalizacije. *In vitro* blokada AR ciproteron-acetatom u kombinaciji sa T omogućila je razdvajanje tzv. direktnih autokrinih efekata T od onih posredovanih jukstakrinim, parakrinim, endokrinim i nervnim faktorima. Svi ovi rezultati potvrđuju uključenost T i AR u kompleksnim mehanizmima regulacije koji su važni u odgovoru Lajdigovih ćelija neophodnom za očuvanje i sprečavanje potpunog gubitka steroidogene funkcije, ali istovremeno predstavljaju prikaz molekulskih događaja koji su posledica primene AAS. Stoga, rezultati imaju fundamentalan značaj sa aspekta rasvetljavanja mehanizama delovanja T u regulaciji funkcije Lajdigovih ćelija tokom poremećene homeostaze organizma. Pored toga, rezultati su prmenljivi u kliničkoj i forenzičkoj praksi, s obzirom na to da je u *in vivo* modelu korišćen derivat T, TE, u sličnom maniru i u dozi koja se najčešće upotrebljava u kliničkoj praksi, ali se u najvećoj meri i zloupotrebljava.

*Ključne reči:* Lajdigove ćelije, steroidogeneza, testosteron, androgeni receptor, membranski potencijal mitohodrija, HSD3B, ARR19, ADCY-cAMP-PRKA signalizacija, PRL-JAK-STAT signalizacija, androgeni anabolički steroidi.

*Naučna oblast:* Biologija

*Uža naučna oblast:* Reproductivna fiziologija

*UDK broj:* 577.6:[616.681+616.69](043.3)

## ABSTRACT

Leydig cells of testis interstitium represent the major site for synthesis of androgenic hormone, primarily testosterone (T). This hormone, together with its metabolite dihydrotestosterone (DHT), is required, not only for the continuation of the species by ensuring proper development and functioning of male reproductive system, but for overall health of an individual as well. For the purpose of treatment of multiple clinical disorders, as well as for contraception purposes, androgen derivatives have been synthesized, the clinical application of which is based on the influence they have through anabolic and/or androgenic effects, thus having a common name anabolic androgenic steroids (AASs). Unfortunately, AASs are often abused, not only by professional and recreational athletes, but by a large population of adolescents as well, although it is well known that non-therapeutic use thereof may cause a series of adverse health effects. Therefore, AASs are classified into a group of pharmacological preparations, the use of which is strictly regulated and which are not available without a medical prescription. Despite widespread clinical use and abuse of AASs, as well as the great interest shown by the scientific community in this field, molecular events resulting from their short-term and long-term use have not been fully clarified.

Given the importance of T for reproduction and continuation of the species, but also for health and quality of life of an individual, and the widespread use and abuse of T and its derivatives, it is necessary to characterize precise molecular events resulting from disturbed T homeostasis. This is important because, according to the currently available literature, there is insufficient data on the functionality and patterns of signaling pathways of Leydig cells, the basic role of which is the synthesis and secretion of T. Therefore, the main aim of this study is to examine the functionality and patterns of signaling pathways relevant for maintaining the steroidogenic function of Leydig cells, impaired by the use of exogenous T agonists and/or antagonists under *in vivo* or *in vitro* conditions. To this end, a T derivative known as testosterone-enanthate (TE) is applied, which is most commonly used in clinical practice, but is largely abused and best-selling product in the so-called "black" or illegal market. Such model provides a mechanistic approach, but has also a translational aspect, since the applied T doses/concentrations are used in clinical practice or are abused. The results have shown that *in vivo* application of TE inhibits the steroidogenic function of Leydig cells in adult rats, as well as gene expression for cAMP-PRKA signaling components, being the main regulator of steroidogenesis of such cells. On the contrary, the application of TE

has stimulated the expression of an enzyme involved in the synthesis of T - 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B), androgen receptor (AR), and JAK-STAT elements, engaged in HSD3B expression regulation. Systemic *in vivo* blockade of AR has completely or partially prevented TE-disturbed homeostasis of testicular interstitial fluid, functionality of Leydig cells, as well as disturbed expression pattern of steroidogenic machinery components and cAMP-PRKA signaling. *In vitro* blockade of AR by cyproterone acetate in combination with T has enabled the separation of the so-called direct autocrine effects of T from those mediated by juxtacrine, paracrine, endocrine and nerve factors. All these results confirm the involvement of T and AR in complex regulatory mechanisms relevant for the response by Leydig cells required for the preservation and prevention of complete loss of steroidogenic function, but at the same time represent an overview of molecular events arising from the application of AASs. Hence, the results have fundamental significance from the aspect of clarifying the mechanism of T effect in regulating the function of Leydig cells during disrupted organism homeostasis. In addition, the results are applicable both in clinical and forensic practice, since *in vivo* model uses T derivative - TE in a similar manner and with a dose most commonly used in clinical practice, but largely abused, too.

*Key words:* Leydig cells, steroidogenesis, testosterone, androgen receptor, mitochondrial membrane potential, HSD3B, ARR19, ADCY-cAMP-PRKA signaling, PRL-JAK-STAT signaling, anabolic androgenic steroids.

*Research area:* Biology

*Area of special interest:* Reproductive physiology

*UDC number:* 577.6:[616.681+616.69](043.3)



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Funkcionalna organizacija testisa</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.1. Funkcijske karakteristike Lajdigovih ćelija</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.2. Proces steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1.2.1. Izvori holesterola i transport u mitohondrije</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1.2.2. Konverzija pregnenolona u testosteron i značaj mitohondrija</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1.3. Elementi steroidogene mašinerije u Lajdigovim ćelijama</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1.3.1. Osnovni elementi steroidogene mašinerije</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1.3.2. Transkripcioni faktori i koregulatori zaduženi za regulaciju eksprimiranja elemenata steroidogene mašinerije – transaktivatori i transrepresori</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1.4. Regulacija steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija</b> .....	<b>21</b>
<b>1.1.4.1. Signalni putevi uključeni u regulaciju steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama</b> ...	<b>24</b>
<b>1.1.4.1.1. Elementi cAMP–PRKA signalnog puta</b> .....	<b>26</b>
<b>1.2. Biološki efekti anaboličkih androgenih steroida – primena i zloupotreba</b> .....	<b>33</b>
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>37</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1. Hemikalije</b> .....	<b>41</b>
<b>3.2. Eksperimentalne životinje</b> .....	<b>43</b>
<b>3.3. Eksperimentalni modeli</b> .....	<b>43</b>
<b>3.3.1. Eksperimentalni model androgenizacije intramuskularnom aplikacijom testosteron-enantata u dozno- i vremenski–zavisnom maniru</b> .....	<b>44</b>
<b>3.3.2. Eksperimentalni model sistemske blokade androgenih receptora intramuskularnom aplikacijom Androkura zasebno i u kombinaciji sa testosteron-enantatom</b> .....	<b>46</b>
<b>3.3.3. <i>In vitro</i> blokada androgenih receptora u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija</b> .....	<b>49</b>
<b>3.4. Priprema intersticijske tečnosti tkiva testisa</b> .....	<b>49</b>
<b>3.5. Ekstrakcija steroida iz tkiva testisa</b> .....	<b>50</b>
<b>3.6. Izolacija i priprema primarne kulture Lajdigovih ćelija</b> .....	<b>51</b>
<b>3.7. Ekstrakcija steroida iz Lajdigovih ćelija</b> .....	<b>53</b>
<b>3.8. Određivanje koncentracije hormona</b> .....	<b>53</b>
<b>3.9. Određivanje nivoa cikličnog adenozin-monofosfata</b> .....	<b>54</b>
<b>3.10. Merenje mitohondrijskog membranskog potencijala u Lajdigovim ćelijama</b> .....	<b>55</b>
<b>3.11. Analiza transkripcije gena</b> .....	<b>55</b>
<b>3.11.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija</b> .....	<b>55</b>
<b>3.11.2. Analiza relativne ekspresije gena klasičnom PCR metodom</b> .....	<b>56</b>
<b>3.11.3. Analiza relativne ekspresije gena real time PCR metodom</b> .....	<b>56</b>
<b>3.12. Analiza proteina u uzorcima</b> .....	<b>60</b>
<b>3.12.1. Priprema uzoraka Lajdigovih ćelija za analizu proteina</b> .....	<b>60</b>
<b>3.12.2. SDS-PAGE i Western blot</b> .....	<b>61</b>
<b>3.13. Statistička analiza</b> .....	<b>62</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>63</b>
<b>4.1. Steroidogena funkcija Lajdigovih ćelija pacova i obrazac ekspresije elemenata cAMP–PRKA signalnog puta menjaju se nakon <i>in vivo</i> primene testosteron-enantata</b> .....	<b>64</b>
<b>4.1.1. Efekat testosteron-enantata na nivo androgena i luteinizirajućeg hormona u krvi</b> .....	<b>64</b>

4.1.2. Dugoročni tretman testosteron-enantatom moduliše relativnu ekspresiju gena za luteinizirajući hormon i prolaktin, kao i njihove receptore u hipofizi.....	65
4.1.3. Dugoročni tretman testosteron-enantatom umanjuje funkcionalnost Lajdigovih ćelija .....	66
4.1.4. Tretman testosteron-enantatom menja relativnu ekspresiju gena za elemente steroidogene mašinerije Lajdigovih ćelija.....	68
4.1.5. <i>In vivo</i> tretman testosteron-enantatom moduliše ekspresiju elemenata cAMP-PRKA signalnog puta.....	71
4.2. Molekulske adaptacije Lajdigovih ćelija tokom sistemske <i>in vivo</i> blokade androgenih receptora .....	73
4.2.1. Efekat sistemske <i>in vivo</i> blokade androgenih receptora na nivo androgena i luteinizirajućeg hormona u krvi .....	73
4.2.2. Sistemska <i>in vivo</i> blokada androgenih receptora menja efekat testosteron-enantata na parametre intersticijumske tečnosti testisa .....	74
4.2.3. Sistemska <i>in vivo</i> blokada androgenih receptora umanjuje inhibicioni efekat testosteron-enantata na funkcionalnost Lajdigovih ćelija .....	75
4.2.4. Sistemska <i>in vivo</i> blokada androgenih receptora onemogućava inhibiciono dejstvo testosteron-enantata na steroidogenu aktivnost i kapacitet Lajdigovih ćelija .....	76
4.2.5. Sistemska <i>in vivo</i> blokada androgenih receptora umanjuje inhibicioni efekat testosteron-enantata na ekspresiju pojedinih elemenata steroidogene mašinerije i transkripcionih faktora .....	79
4.2.6. Sistemska <i>in vivo</i> blokada androgenih receptora umanjuje inhibicioni efekat testosteron-enantata na ekspresiju pojedinih elemenata cAMP-PRKA signalnog puta .....	81
4.3. Steroidogena funkcija Lajdigovih ćelija i obrasci ekspresije elemenata cAMP-PRKA i JAK-STAT signalnih puteva nakon direktne <i>in vitro</i> primene testosterona i blokatora androgenih receptora .....	83
4.3.1. Efekti <i>in vitro</i> tretmana testosteronom i blokatorom androgenih receptora na funkcionalnost Lajdigovih ćelija.....	83
4.3.2. Efekti <i>in vitro</i> tretmana testosteronom i blokatorom androgenih receptora na relativnu ekspresiju gena za elemente steroidogene mašinerije i transkripcione faktore .....	85
4.3.3. Efekti <i>in vitro</i> tretmana testosteronom i blokatorom androgenih receptora na relativnu ekspresiju gena za elemente cAMP-PRKA signalnog puta.....	88
4.3.4. Efekti <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> tretmana testosteronom na relativnu ekspresiju gena za prolaktinske receptore i elemente JAK-STAT signalnog puta, uključene u regulaciju ekspresije HSD3B u Lajdigovim ćelijama.....	90
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>92</b>
5.1. Testosteron-enantat narušava steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija .....	93
5.2. Obrazac ekspresije elemenata cAMP-PRKA signalnog puta u Lajdigovim ćelijama narušene steroidogene funkcije primenom testosteron-enantata .....	98
5.3. Obrazac ekspresije elemenata JAK-STAT signalnog puta i HSD3B enzima u Lajdigovim ćelijama narušene steroidogene funkcije primenom testosteron-enantata.....	100
5.4. Molekulske adaptacije Lajdigovih ćelija u uslovima sistemske <i>in vivo</i> blokade androgenih receptora .....	102

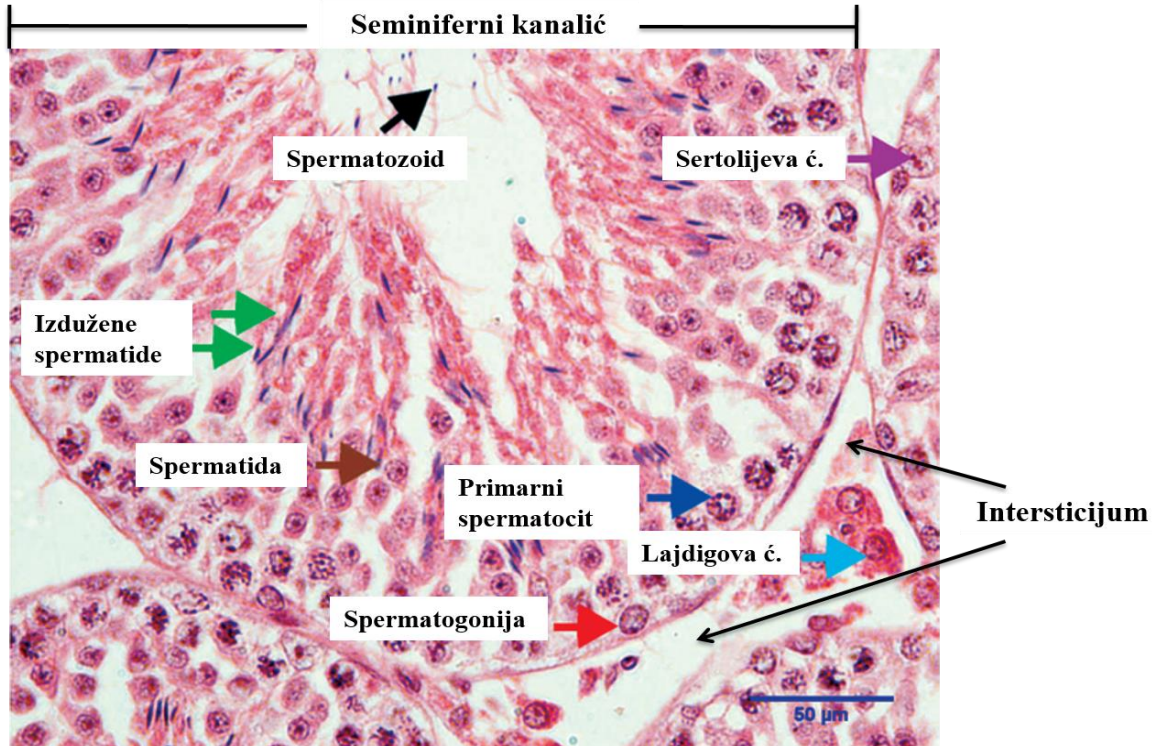
5.5. Obrazac ekspresije elemenata cAMP-PRKA signalnog puta u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih sistemskim blokatorom AR zasebno i u kombinaciji sa testosteron- enantatom .....	106
6.ZAKLJUČCI .....	111
7.LITERATURA.....	115

## **1. Uvod**

## **1.1. Funkcionalna organizacija testisa**

Testisi najvećeg broja sisara se nalaze u skrotumu, čime je obezbeđena temperatura za oko 3° C niža od telesne temperature. Ovo su organi sa dve osnovne funkcije – egzokrinom, koja podrazumeva produkciju muških polnih ćelija spermatozoida (spermatogeneza) i endokrinom, koja se ogleda u sintezi i sekreciji steroidnih hormona (steroidogeneza), dominantno androgena. Kako bi se procesi spermatogeneze i steroidogeneze neometano odvijali, testisi su morfološki i funkcijski podeljeni u dva odeljka: 1) tubulni odeljak, koga čine seminiferne kanaliće u kojima se odvija spermatogeneza i 2) intersticijum testisa odgovoran za proces steroidogeneze, organizaciono smešten između seminiferne kanalića. U okviru tubulnog odeljka su smeštene Sertolijeve i germinativne ćelije, dok se u intersticijumu nalaze Lajdigove ćelije, peritubulne mioidne ćelije, makrofagi, ćelije prirodne ubice, Th1 i Th2 populacije ćelija pomoćnica, fibroblasti, endotelne ćelije, kao i manji broj eritrocita (Slika 1.1). Tesne veze (*engl.* Tight junctions) između Sertolijevih ćelija i bazalna lamina tubula grade krvno-testisnu barijeru. Iako anatomski razdvojeni, ovi odeljci međusobno interaguju, čime obezbeđuju efikasno funkcionisanje testisa (Weinbauer i sar., 2001).

Ćelije testisa sekretuju biološki aktivne materije u vanćelijsku tečnost nazvanu intersticijumska tečnost testisa (*engl.* **T**esticular **i**nterstitial **f**luid, TIF), koja se formira procesima filtracije na nivou kapilarne mreže testisa i specifičnim načinom regulacije vazomotornih pokreta. TIF predstavlja značajan parametar koji utiče na funkciju testisa jer promena zapremine ove tečnosti kontroliše koncentraciju signalnih molekula dopremljenih iz cirkulacije, kao i lokalno produkovanih faktora koji u autokrinom i/ili parakrinom maniru regulišu funkciju ćelija iz okruženja. Značaj TIF se posebno reflektuje u regulaciji endokrine funkcije testisa prilikom produkcije muških polnih hormona. Biosinteza testosterona je strogo kontrolisan proces koji zavisi od brojnih signalnih molekula produkovanih od strane ćelija testisa ili onih pristiglih iz cirkulacije, a čiju dostupnost reguliše upravo zapremina TIF. Sa druge strane, testosteron se oslobađa u TIF, čija zapremina uslovljava njegovu dostupnost ćelijama iz okruženja, kao i količinu testosterona koja će, prelaskom u cirkulaciju, biti transportovana do ostalih ciljnih organa i ćelija (Sharpe i Cooper, 1983; Sharpe, 1984). Pored toga, smatra se da upravo testosteron predstavlja jedan od ključnih faktora zaduženih za kontrolu zapremine TIF, ostvarujući svoj efekat na glatku muskulaturu kapilara (Damber i Bergh, 1992).



Slika 1.1. Poprečni presek testisa. Uz manje modifikacije, preuzeto iz Saeed i sar., 2015.

### 1.1.1. Funkcijske karakteristike Lajdigovih ćelija

Lajdigove ćelije je prvi opisao Franc Lajdig (Franz von Leydig, 1821-1908) 1850. godine, dok je na njihovu endokrinu ulogu u regulaciji muških polnih karakteristika ukazano tek 1903. godine (za reference videti Tahka, 1986). Osnovni produkti Lajdigovih ćelija su INSL3 faktor (*engl.* **Insulin-like factor **3**) i androgeni hormoni. **INSL3** kao biomarker Lajdigovih ćelija ukazuje na status diferencijacije i brojnost ovih ćelija. Član je familije hormona peptidne strukture u koju se još ubrajaju insulin, insulinu slični faktori rasta 1 i 2 (*engl.* **Insulin-like growth factor **1**, IGF1; **Insulin-like growth factor **2**, IGF2) i relaksin. Sintetiše se kao pre-pro-hormon koji nakon posttranslacijskih modifikacija ima strukturu A-B heterodimernog peptida, veoma sličnu insulinu ili, pak, B-C-A strukturu, sličnu IGF. Nije poznato zbog čega su obe strukture prisutne u cirkulaciji mužjaka sisara kao jednako aktivni molekuli. INSL3 svoju funkciju ostvaruje vezivanjem za RXFP2 receptor (*engl.* **Relaxin family peptide receptor **2**). Produkcija INSL3 započinje ubrzo nakon polne determinacije i eksprimiranja steroidogenog faktora 1 (*engl.* **Steroidogenic factor **1**, SF1). Odgovoran je za inicijalnu fazu spuštanja testisa u skrotum kod fetusa, za preživljavanje**********

germinativnih ćelija nakon rođenja, jer poseduje sposobnost da prolazi krvno-testisnu barijeru. (Ivell i sar., 2013; Ivell i sar., 2014; Nef i Parada, 1999). Pored toga, ukazano je na stimulatívni efekat INSL3 na steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama *in vitro*, ali samo u slučaju male gustine Lajdigovih ćelija i niske produkcije INSL3 (Pathirana i sar., 2012). Potpuni gubitak funkcije INSL3 i/ili njegovog receptora kod miševa i ljudi dovodi do osteopenije i/ili osteoporoze i kriptorhizma (Ivell i sar., 2014). Lajdigove ćelije su primarno mesto sinteze **androgenih hormona** odgovornih za “maskulinizaciju” hipotalamusa, virilizaciju fetusa mužjaka, drugu fazu spuštanja testisa u skrotum, razvoj i funkcionisanje muškog reproduktivnog sistema, održavanje sekundarnih polnih karakteristika mužjaka, inicijaciju i odvijanje spermatogeneze, kao i regulaciju metabolizma (Ivell i sar., 2014; Pope i sar., 2014; Tremblay, 2015; Zirkin, 2010). Najpotentniji muški polni hormoni su testosteron (T) i dehidrotosteron (DHT), ali se u ovu grupu hormona svrstavaju i manje potentni hormoni, kao što su  $\Delta^4$ -androstendion i dehidroepiandrosteron (DHEA). Produkcija androgenih hormona je dominantno regulisana endokrinim mehanizmom, odnosno, luteinizirajućim hormonom adenohipofize (*engl.* **L**uteinizing **h**ormone, LH) ili njegovim analogom, placentnim humanim horionskim gonadotropinom (*engl.* **H**uman **ch**orionic **g**onadotropin, hCG) (za reference videti Payne i Hales, 2004; Weinbauer i sar., 2001; Tremblay, 2015; Zhang i sar., 2017). Studije sprovedene na MA-10 kontinualnoj ćelijskoj kulturi miša, kao i primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija pacova ukazuju na to da je produkcija INSL3 nezavisna od kratkoročne stimulacije sa LH i/ili hCG (mereno u satima), odnosno da predstavlja konstitutívni sekretorni produkt Lajdigovih ćelija, suprotno genskom i proteinskom eksprimiranju steroidogenih enzima u odgovoru na ove hormone. Međutim, ukoliko se kultura Lajdigovih ćelija podvrgne procesu diferencijacije, dugoročan tretman (tokom više dana) sa LH i/ili hCG ispoljava značajan stimulatívni efekat na produkciju INSL3, zbog toga što ovi hormoni indukuju proliferaciju i diferencijaciju Lajdigovih ćelija, te posledično i povećanu produkciju INSL3. Sinergističko delovanje INSL3 i androgenih hormona nije u potpunosti ispitano, ali se smatra da je aktivacija androgenog receptora (AR) neophodna za eksprimiranje RXFP2 receptora (Glister i sar., 2013; Ivell i sar., 2014).

Kod mnogih sisarskih vrsta su opisane i okarakterisane dve populacije Lajdigovih ćelija: fetusne Lajdigove ćelije (*engl.* **F**etal **L**eydig **c**ells, FLC) i adultne Lajdigove ćelije (*engl.* **A**dult **L**eydig **c**ells, ALC). FLC nastaju tokom fetusnog razvoja mužjaka, ubrzo nakon aktivacije *Sry* gena i rane diferencijacije fetusnih testisa. Poreklo ovih ćelija nije u potpunosti razjašnjeno, mada se smatra

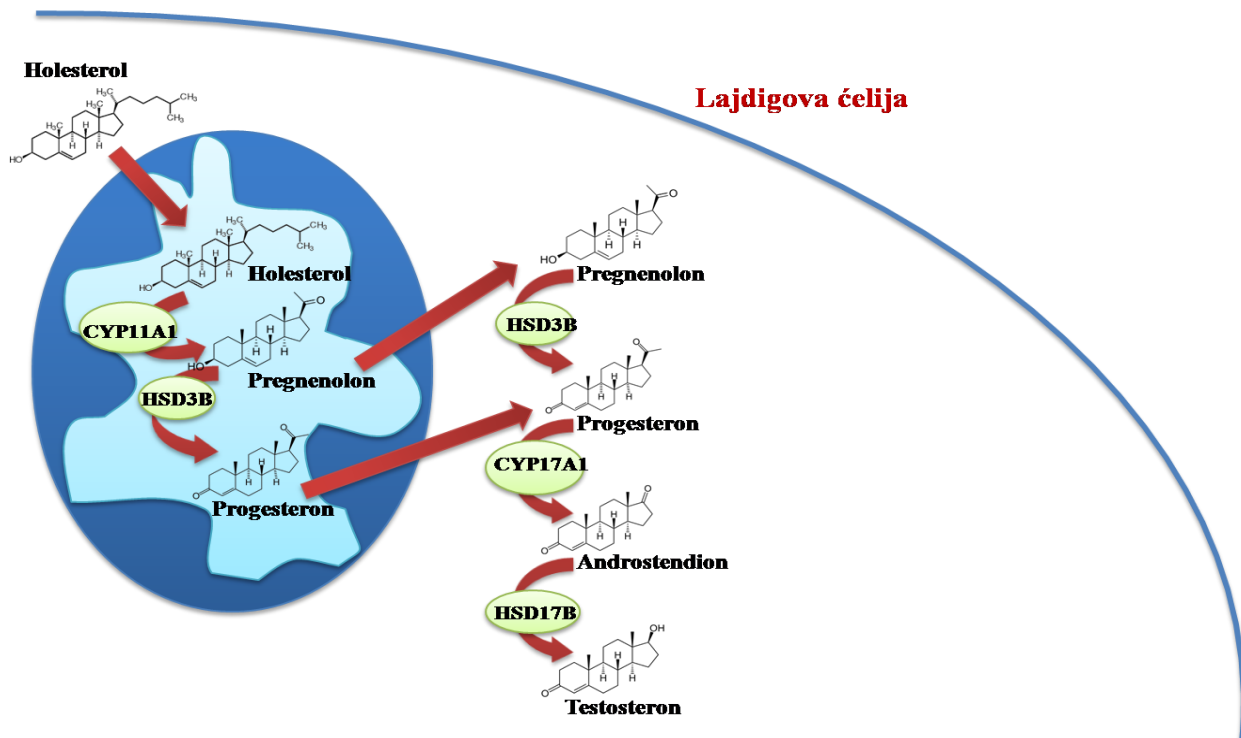
da nastaju *in utero* diferencijacijom progenitornih matičnih ćelija (Yao i sar., 2002). Takođe, regulacija diferencijacije i aktivnosti ove populacije Lajdigovih ćelija je slabo poznata. Iako je poznato da kod ljudi neki aspekti regulacije FLC zavise od LH, kod miševa je pokazano da je diferencijacija FLC nezavisna od uticaja LH, pri čemu se smatra da su adrenokortikotropni hormon (*engl.* **A**drenocorticotropic **h**ormone, ACTH), DHH (*engl.* **D**esert **h**edge**h**og) i faktor rasta poreklom iz trombocita (*engl.* **P**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor, PDGF) ključni za regulaciju ovog procesa (Ivell i sar., 2013; Xing i sar., 2016; Yamashita i sar., 2011). FLC ubrzo nakon rođenja ulaze u proces apoptoze i bivaju zamenjene ALC, mada postoje podaci o njihovom prisustvu i u testisima odraslih glodara, pri čemu svrha njihovog postojanja još nije rasvetljena (Ivell i sar., 2013). Formiranje ALC podrazumeva proliferaciju i diferencijaciju četiri tranzicione forme Lajdigovih ćelija: matične Lajdigove ćelije (*engl.* **S**tem **L**eydig **c**ells, SLC), progenitorne Lajdigove ćelije (*engl.* **P**rogenitor **L**eydig **c**ells, PLC), nezrele Lajdigove ćelije (*engl.* **I**mmature **L**eydig **c**ells, ILC) i ALC (Zirkin, 2010). Proliferacija i diferencijacija peritubulnih SLC u PLC kod pacova započinje između 10. i 13. postnatalnog dana, uveliko brojčano prevazilazeći zaostale FLC. Dalja diferencijacija PLC podrazumeva nastanak ILC oko 28. postnatalnog dana, da bi na kraju nastale zrele ALC, u procesu za koji se smatra da se završava nakon 7–8 nedelja od rođenja (Ivell i sar., 2013). Precizni mehanizmi koji kontrolišu tranziciju pomenutih ćelijskih tipova Lajdigovih ćelija do zrelih ALC nisu poznati. Formirane ALC se odlikuju izuzetno razvijenim endoplazmatskim retikulumom, velikim brojem mitohondrija, kao i receptora za LH (*engl.* **LH/hCG** receptor, LHCGR), te velikom sposobnošću sinteze androgenih hormona (Zirkin, 2010).

### **1.1.2. Proces steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama**

Proces steroidogeneze se u svim steroid-produkujućim ćelijama odvija po istom principu, uz činjenicu da prisustvo specifičnih steroidogenih enzima kontroliše nastanak konkretnog tipa hormona. U Lajdigovim ćelijama je neophodno prisustvo holesterola, čijom će modifikacijom, pomoću elemenata steroidogene mašinerije, nastati androgeni hormoni, u prvom redu T. Holesterol se transportuje u mitohondrije zahvaljujući multiproteinskom kompleksu, gde započinje proces steroidogeneze. Enzim CYP11A1 (*engl.* **C**ytochrome **P**450 **11** **a**lpha **1**) katalizuje prvu reakciju steroidogeneze usled čega nastaje pregnenolon. Konverzija pregnenolona u progesteron se dalje odvija  $\Delta^5$  (5-en-3 $\beta$ -hidroksi) ili  $\Delta^4$  (4-en-3-okso) putem, pri čemu je u



Lajdigovim ćelijama pacova dominantan  $\Delta^4$  put, za koji je u ovom koraku neophodno prisustvo HSD3B enzima (engl. **H**ydroxysteroid **d**ehydrogenase **3** **b**eta). Aktivnošću enzima CYP17A1 (engl. **C**ytochrome **P**450 **17** **a**lpha **1**) i HSD17B (engl. **H**ydroxysteroid **d**ehydrogenase **17** **b**eta) nastaju T i manje količine androstendiona (Slika 1.2) (King i Lavoie, 2012; Lavoie i King, 2009; Midzak i sar., 2011; Payne i Hales, 2004; Tremblay, 2015).



Slika 1.2.  $\Delta^4$  put steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama

### 1.1.2.1. Izvori holesterola i transport u mitohondrije

Holesterol, prekursor svih steroidnih hormona, obezbeđuje se iz nekoliko izvora: 1) *de novo* sintezom iz acetata; 2) mobilizacijom holesterol-estra deponovanog u lipidnim kapima unutar ćelije i 3) preuzimanjem holesterol-estra sadržanog u lipoproteinima male gustine (engl. **L**ow-**d**ensity **l**ipoproteins, LDL) i lipoproteinima velike gustine (engl. **H**igh-**d**ensity **l**ipoproteins, HDL). Regulacija preuzimanja, unutarćelijskog transporta i dalje obrade holesterola je koordinisana familijom SREBP transkripcionih regulatora (engl. **S**terol **r**egulatory **e**lement **b**inding **p**roteins) (Miller, 2013).

*De novo* sinteza holesterola iz acetata se odvija u endoplazmatskom retikulumu uz učešće velikog broja specifičnih enzima, pri čemu je, do sada, najbolje opisana 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktaza (*engl.* 3-**h**ydroxy-3-**m**ethylglutaryl-**co**-enzyme **A** **r**eductase, HMGCoAR). Nakon sinteze, holesterol može biti upotrebljen za biosintezu steroida ili deponovan u lipidne kapi, kako bi kasnije bio iskorišćen. Holesterol se u obliku holesterol-estra deponuje u lipidne kapi pomoću acil-koenzim A-holesterol-acil-transferaze (*engl.* **A**cyl-coenzyme A-**ch**olesterol-**a**cyl-**t**ransferase, ACAT), poznate i pod imenom sterol-O-acetiltransferaza 1 (*engl.* **S**terol-**O**-**a**cetyl**t**ransferase **1**, SOAT1) (Papadopoulos i Miller, 2012). Da bi bio preuzet i iskorišćen u procesu steroidogeneze, neophodno je da hormon-senzitivna lipaza (*engl.* **H**ormone-**s**ensitive **l**ipase, HSL) hidrolizuje esterifikovani holesterol i konvertuje ga u slobodni holesterol (Rone i sar., 2009). Preuzimanje holesterola sadržanog u LDL česticama podrazumeva internalizaciju LDL preko LDL receptora, nakon čega se u endozomima vrši dalja obrada holesterola. Vezivanje i preuzimanje HDL je posredovano SCARB1 (*engl.* **S**cavenger **r**eceptor class **B** member **1**). Kod glodara se najveći deo holesterola preuzima posredstvom HDL/SCARB1, dok kod ljudi glavni izvor holesterola za biosintezu steroida predstavlja receptorom posredovana endocitoza LDL (Papadopoulos i Miller, 2012).

Holesterol preuzet iz LDL čestica endozomskim putem, odnosno, vezikularnim transportom, doprema se do mitohondrija. S obzirom na unutarćelijsku hidrofilnu sredinu, za dalji transport holesterola od kasnog endozoma ili lizozoma, kao i slobodnog holesterola, dobijenog iz HDL ili lipidnih kapi, do spoljašnje mitohondrijske membrane (*engl.* **O**uter **m**itochondrial **m**embrane, OMM), neophodni su proteini transporteri holesterola. Ovu funkciju obavljaju holesterol-vezujući proteini sa START domenom (*engl.* Steroidogenic acute regulatory protein (**StAR**)-related lipid **t**ransfer - START), identifikovani kod gljiva, biljaka i životinja. Proteini sa START domenom pronađeni kod sisara su nazvani StarD1-15 (*engl.* **START**-**d**omain proteins **1-15**) (Hu i sar., 2010; Miller, 2013; Papadopoulos i Miller, 2012).

Da bi holesterol bio dopremljen do unutrašnje mitohondrijske membrane (*engl.* **I**nnner **m**itochondrial **m**embrane, IMM) gde se odigrava prva reakcija steroidogeneze, neophodno je postojanje transportne mašinerije, koja će hidrofobni holesterol transportovati kroz hidrofilni međumembranski prostor između OMM i IMM (Clark i sar., 1994; Miller, 2007). Ovaj multiproteinski kompleks je nedavno nazvan transduceozom, a čine ga specifični proteini

transporteri, smešteni u OMM i IMM. Do sada je opisan veći broj proteina koji čine transduceozom: TSPO/PBR (*engl. **T**ranslocator **p**rotein/**P**eripheral **b**enzodiazepine **r**eceptor*), StAR, VDAC1 (*engl. **V**oltage-**d**eependent **a**nion **c**hannel **1***), ANT (*engl. **A**denine **n**ucleotide **t**ranslocator*), regulatorna subjedinica cAMP-zavisne protein kinaze 1A (*engl. **P**rotein **k**inase **A** **r**egulatory subunit **1** $\alpha$ , PRKAR1A*), ACBD1 (*engl. **A**cyl-**c**oenzyme A **b**inding **d**omain containing **1***), ACBD3/PAP7 (*engl. **A**cyl-**c**oenzyme A **b**inding **d**omain containing **3**/**P**RKA regulatory subunit **R**ia-**a**ssociated **p**rotein **7***), PRAX-1 (*engl. **P**eripheral benzodiazepine **r**eceptor-**a**ssociated protein **1***), ferodoksin (*engl. **F**erro**d**oxin, Fdx*) i flavoprotein ferodoksin reduktaza (*engl. **F**erro**d**oxin **r**eductase, FdxR*), pri čemu su najbolje okarakterisani TSPO i StAR (Midzak i sar., 2011; Miller, 2013; Papadopoulos i Miller, 2012; Rone i sar., 2012). Jezgro transduceozoma čini CYP11A1 enzim, za koji je pokazano da je većim delom smešten u mitohondrijskom matriksu i jednim svojim delom asociran sa IMM (Midzak i sar., 2011). Po ulasku holesterola u mitohondrije, CYP11A1 katalizuje prvu reakciju steroidogeneze.

### **1.1.2.2. Konverzija pregnenolona u testosteron i značaj mitohondrija**

CYP11A1 u mitohondrijama uslovljava odvajanje bočnog lanca izokaproaldehida (C7) od holesterola (C27 steroid) i nastanak pregnenolona (C21 steroid). Konverzija pregnenolona se dalje odvija  $\Delta^5$  (5-en-3 $\beta$ -hidroksi) ili  $\Delta^4$  (4-en-3-okso) putem. Dominantnost nekog od ova dva puta zavisi od afiniteta enzima 17 $\alpha$  hidroksilaze/17, 20 liaze (CYP17A1) za  $\Delta^5$ , odnosno,  $\Delta^4$  supstrate, što ujedno predstavlja karakteristiku vrste. U Lajdigovim ćelijama pacova je dominantan  $\Delta^4$  put, mada je primećeno funkcionisanje i  $\Delta^5$  puta kod odraslih jedinki. Za  $\Delta^4$  put je karakteristična konverzija pregnenolona u progesteron (C21 steroid), katalizovana mitohondrijskom ili mikrozosmskom HSD3B. U nastavku se vrši hidroksilacija progesterona na poziciji C17, a zatim i odvajanje dva ugljenikova atoma (C20 i C21), aktivnošću enzima CYP17A1. Kao produkt ove reakcije nastaje androstendion. Redukciju C17 keto grupe androstendiona i nastajanje T katalizuje HSD17B (Slika 1.2.). U mikrozomima Lajdigovih ćelija androstendion i T mogu biti aromatizovani pomoću citohrom P450 aromataze (*engl. **C**ytochrome **P**450 **19**, CYP19*) i prevedeni u estron i estradiol (C18 steroidi). U metabolizmu T učestvuje i enzim 5 $\alpha$  reduktaza koja ga konvertuje u DHT, potentniju formu T sa većim afinitetom za AR, što predstavlja način pojačavanja efekata T u ciljnim tkivima (za reference videti radove King i Lavoie, 2012; Lavoie i

King, 2009; Midzak i sar., 2011; Payne i Hales, 2004; Rone i sar., 2009; Saez, 1994; Stocco i Clark, 1996; Tremblay, 2015).

Pored važne uloge u procesu steroidogeneze, mitohondrije su značajne i za sintezu adenozin-trifosfata (ATP), glavnog nosioca energije, koji nastaje tokom ćelijskog metabolizma. Tokom aerobne respiracije, ATP se generiše u procesu oksidativne fosforilacije, koji podrazumeva transport elektrona kroz četiri enzimska kompleksa smeštena na IMM. Enzimi lanca za transport elektrona su nikotinamid adenin dinukleotid hidroksohid dehidrogenaza - NADH (kompleks I), sukcinat dehidrogenaza (kompleks II), citohrom  $bc_1$  (kompleks III) i citohrom oksidaza (kompleks IV). Sa kompleksa IV elektrone prihvata molekularni kiseonik. Prilikom transporta elektrona kroz pomenute enzimske komplekse, u reakcijama oksido-redukcije se oslobađa energija, koja se dalje koristi za ispumpavanje protona ( $H^+$ ) iz matriksa u međumembranski prostor mitohondrija. Na ovaj način se u mitohondrijama formira protonski gradijent ( $\Delta pH$ ), kao i električni gradijent, tzv. mitohondrijski membranski potencijal ( $\Delta \psi_m$ ). Nastali potencijal obezbeđuje protonsku silu koja dovodi do sinteze ATP pomoću  $F_0/F_1$  ATPaze (kompleks V) (Allen i sar., 2006; Newmeyer i Ferguson-Miller, 2003).

Blokada lanca za transport elektrona izaziva smanjenje  $\Delta \psi_m$ ,  $\Delta pH$  i sinteze ATP, kao i nakupljanje redukovanih formi (najčešće ubikinona), koje mogu reagovati sa kiseonikom, formirajući reaktivne vrste kiseonika (*engl.* **R**eactive **O**xxygen **S**pecies, ROS). Upravo je disfunkcija lanca za transport elektrona najodgovornija za nastajanje velike količine ROS, uprkos tome što se ROS formiraju i kao nus-produkti reakcija transporta elektrona, kao i u drugim metaboličkim procesima. Takođe, u Lajdigovim ćelijama se proizvode ROS i tokom katalitičkih reakcija steroidogenih citohrom P450 hem-proteina. Pored toga, makrofagi intersticijuma testisa učestvuju u formiranju ROS prilikom inflamacije i infekcija (Diemer i sar., 2003).

Narušavanje elektrohemijskog gradijenta mitohondrija remeti proces steroidogeneze, odnosno uzrokuje značajno smanjenje sinteze progesterona u tumorskim MA-10 ćelijama. Naime, izlaganjem MA-10 ćelija egzogenim izvorima ROS, dolazi do smanjenja  $\Delta \psi_m$ , što dalje dovodi do smanjenog eksprimiranja StAR proteina i cAMP-indukovane sinteze progesterona. Kod tumorskih ćelija promene  $\Delta \psi_m$  i  $\Delta pH$  minimalno utiču na sintezu ćelijskog ATP, osim u slučaju direktne blokade lanca za transport elektrona, što dalje remeti proces steroidogeneze jedino na nivou transporta holesterola u mitohondrije (Allen i sar., 2006; Diemer i sar., 2003). Kod primarne

kulture Lajdigovih ćelija, smanjenje nivoa ATP ispoljava jači efekat, jer pored inhibicije transportne mašinerije na OMM, izaziva i smanjenu aktivnost steroidogenih enzima, poput HSD3B, CYP17A1 i HSD17B (Midzak i sar., 2011).

Rezultati brojnih studija su pokazali da su mitohondrijski membranski potencijal, sinteza ATP i pH mitohondrija neophodni za normalno funkcionisanje ove organele i odvijanje procesa steroidogeneze, što znači da mitohondrije moraju biti energetske bogate, aktivne u respiraciji i održavati optimalan membranski potencijal (Allen i sar., 2006; Hales i sar., 2005).

### **1.1.3. Elementi steroidogene mašinerije u Lajdigovim ćelijama**

Steroidogeneza je multienzimski proces koji zahteva učešće steroidogene mašinerije koju čine transporteri holesterola (Stocco i sar., 2005; Midzak i sar., 2011; Miller, 2013), steroidogeni enzimi (Nebert i sar., 2013; Payne i Hales, 2004) i brojni regulatorni molekuli (Payne i Hales, 2004; Stocco i sar., 2005). Svi elementi svrstani u ovu grupu direktno učestvuju u procesu steroidogeneze ili su indirektno uključeni u regulaciju, odnosno modulaciju regulacije pomenutog procesa.

#### **1.1.3.1. Osnovni elementi steroidogene mašinerije**

U osnovne elemente steroidogene mašinerije se ubrajaju receptor za LH/hCG (LHCGR), zatim proteini koji vrše preuzimanje i transport holesterola - SCARB1 receptor, steroidogeni akutni regulatorni protein (StAR) i protein translokator (TSPO), kao i steroidogeni enzimi – citohrom P450 11A1 (CYP11A), hidroksteroid dehidrogenaza 3 beta (HSD3B), 17 $\alpha$  hidroksilaza/17, 20 liaza (CYP17A1), hidroksteroid dehidrogenaza 17 beta (HSD17B) i citohrom P450 aromataza (CYP19A1).

**LHCGR** pripada familiji membranskih receptora spregnutih sa proteinom G, za koji se vezuju LH i njegov analog, hCG. Interakcija receptora sa ligandom uzrokuje konformacione promene u transmembranskom regionu receptora i aktivaciju odgovarajućeg heterotrimernog proteina G, koji dalje posreduje u pokretanju unutarćelijskih signalnih puteva (Ascoli i sar., 2002; Puett i sar., 2007).

Iako je poznato da su efekti LH/hCG u najvećoj meri posredovani cAMP-PRKA signalnim putem, utvrđeno je učešće i MAPK kaskade (*engl.* **M**itogen-**a**ctivated **p**rotein **k**inase) i fosfolipaze C (*engl.* **P**hospho**l**ipase **C**, PLC) u transdukciji signala od LHCGR. Međutim, neki autori smatraju da su za aktivaciju PLC neophodne visoke koncentracije LH/hCG, te da se PLC signalni put pokreće jedino kod žena tokom preovulacijskog LH pika, kao i tokom trudnoće (Ascoli i sar., 2002). Neki drugi, pak, su mišljenja da se u steroidogenim ćelijama aktiviraju PLC i, posledično, protein kinaza C (*engl.* **P**rotein **k**inase **C**, PRKC) koje pojačavaju cAMP-posredovan odgovor ćelije na gonadotropine (Manna i sar., 2009b).

Gen za LHCGR je identifikovan u gonadama, placenti, uterusu, mozgu, limfocitima i prostati. U Lajdigovim ćelijama, LH, vezujući se za ove receptore, ima ulogu u održavanju metaboličke aktivnosti i regulaciji transkripcije steroidogenih enzima (Zhang i Dufau, 2003a).

U okviru promotorskog regiona gena za LHCGR, kod pacova je do danas identifikovano nekoliko konsenzus sekvenci za koje se vezuju Sp1/Sp3 (*engl.* **S**pecific **p**roteins **1** and **3**), koji imaju centralnu ulogu u bazalnoj i cAMP-posredovanoj transkripciji *Lhcgr*. Ova aktivacija je značajno pojačana usled acetilacije histona u okviru promotora, i obrnuto, inhibirana usled vezivanja kompleksa histon deacetilaza za promotor. Takođe, u promotoru *Lhcgr* gena pacova je pokazano prisustvo dve konsenzus sekvence za vezivanje SF1 i jedna za vezivanje AP2 (*engl.* **A**ctivating **P**rotein **2**) (Ascoli i sar., 2002; Zhang i Dufau, 2003b).

**SCARB1** je membranski receptor koji inicira selektivno preuzimanje holesterol-estra iz cirkulacije/vanćelijskog prostora, interagujući sa lipoproteinima velike gustine. Preuzimanje holesterol-estra je pojačano u uslovima stimulisane biosinteze steroida, te dostupnost holesterola predstavlja ključni faktor koji određuje optimalnu steroidogenezu. SCARB1 je kod glodara detektovan u jetri i steroidogenim ćelijama nadbubrežnih žlezda, testisa i ovarijuma (Hu i sar., 2010).

Mehanizam kojim SCARB1 obezbeđuje selektivno preuzimanje holesterol-estra iz vanćelijskog prostora nije u potpunosti razjašnjen, ali je jasno da zahteva učešće različitih proteina i lipida, fizičko-hemijske promene strukture ćelijske membrane, kao i specifične promene samog SCARB1 u smislu njegove dimerizacije/oligomerizacije. Naime, pretpostavlja se da SCARB1 formira tzv.

hidrofobnu poru u plazma membrani, kroz koju će holesterol estar, zahvaljujući koncentracijskom gradijentu, biti transportovan u ćeliju (Hu i sar., 2010).

U regulaciju transkripcije *Scarb1* gena je uključen velik broj transkripcionih faktora, pri čemu su kao najznačajniji okarakterisani Sp1 i Sp3, koji se vezuju za GC blokove u okviru promotora za ovaj gen (Mizutani i sar., 2000; Rhains i Brissette, 2004). SRE-vezujući protein (*engl. Steroid-regulated element binding protein*, SREBP) se vezuje za E-blok promotorskog regiona, koji u prisustvu Sp1 i Sp3 ostvaruje maksimalnu aktivnost (Azhar i Reaven, 2002; Rhains i Brissette, 2004). Takođe, u promotoru *SCARB1* gena kod čoveka su identifikovana mesta za koja se vezuju transaktivatori C/EBP (*engl. CAAT/enhancer binding protein*) i SF1. Najznačajniji transrepresori uključeni u regulaciju transkripcije *SCARB1* su DAX1 (*engl. Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*) i YY1 (*engl. Yin Yang protein-1*), koji svoje efekte ostvaruju inhibicijom SREBP1 i SF1 zavisne transkripcije *Scarb1* gena (Rhains i Brissette, 2004).

**StAR** protein je neophodan za akutnu regulaciju biosinteze steroidnih hormona, a uloga mu je da transportuje holesterol od spoljašnje do unutrašnje mitohondrijske membrane gde će otpočeti proces steroidogeneze. Hidrofilni međumembranski prostor u mitohondrijama predstavlja barijeru u transportu holesterola do CYP11A enzima, zbog čega je ovo ključni i ograničavajući korak u procesu steroidogeneze (Clark i sar., 1994; Christenson i Strauss 3<sup>rd</sup> JF, 2001; Selvaraj i sar., 2018; Stocco i Clark, 1996; Stocco, 2001). StAR se, pod dejstvom tropnih hormona hipofize, sintetiše u citoplazmi kao protein molekulske mase od 37 kDa, sa N-terminalnom mitohondrijskom sekvencom u svojoj strukturi, koja se proteolitički odvaja nakon ulaska u mitohondrije, pri čemu nastaje protein od 30 kDa (Arakane i sar., 1997; Stocco i Clark, 1996). Iako je uloga StAR proteina krucijalna za odigravanje procesa biosinteze steroida, jer je pokazano da se svega 10-15% steroidogeneze odvija putem mehanizama nezavisnih od učešća StAR (Clark i sar., 1997; Manna i sar., 2006), tačan mehanizam transporta holesterola nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da StAR svoju ulogu ostvaruje na OMM (Arakane i sar., 1998; Bose i sar., 2002; Manna i sar., 2006) u kompleksu sa drugim proteinima, kao i da, pri niskim vrednostima pH, StAR protein menja konformaciju i formira tzv. hidrofobni džep, koji omogućava transport holesterola (Bose i sar., 1999; Song i sar., 2001).

Za potpunu aktivnost StAR proteina je neophodna fosforilacija specifičnih amino-kiselina u njegovom sastavu. Identifikovana su dva mesta na kojima se vrši fosforilacija StAR proteina, Ser56/57 (kod miša) i Ser194/195 (kod čoveka), pri čemu je, zahvaljujući mutacijama ovih mesta, pokazano da je fosforilacija Ser194/195 mesta neophodna za njegovu potpunu aktivnost (Arakane i sar., 1997; Manna i sar., 2009a). Fosforilacija pomenutih mesta se najčešće odigrava posredstvom PRKA (Arakane i sar., 1997; Manna i sar., 2009a; Stocco i Clark, 1996), iako su i drugi proteini, poput protein kinaze G (*engl. Protein-kinase G*, PRKG) (Andric i sar., 2007; Gambaryan i sar., 2003), PRKC (Jo i sar., 2005; Manna i sar., 2009b; Manna i sar., 2011) i MAPK familije serin/treonin kinaza (Manna i sar., 2007; Martinelle i sar., 2004; Poderoso i sar., 2008), na direktan ili indirektan način, uključeni u aktivaciju StAR proteina.

Novija istraživanja su pokazala da je StAR negativno regulisan sa GRTH/DDX25 (*engl. Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase*) u bazalnom stanju i uslovima hCG stimulacije, te da je ovaj regulacioni mehanizam značajan za održavanje aktivnosti steroidogene mašinerije (Fukushima i sar. 2011; Dai i sar. 2011; Villar i sar. 2012; Kavarthapu i sar., 2013; Tsai-Morris i sar. 2012).

Za pozitivnu i negativnu modulaciju transkripcije *Star* gena je neophodno učešće brojnih transaktivatora i transrepresora. SF1, CREB (*engl. cAMP response element-binding protein*), CREM (*engl. cAMP response element modulator*), C/EBP $\beta$  (*engl. CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$* ), GATA4, GATA6, NUR77, AP1 predstavljaju transaktivatore, dok se u transrepresore svrstavaju c-Fos, c-Jun, Sp1, YY1, COUP-TF i DAX1 (Lavoie i King, 2009).

**TSPO/PBR** je protein molekulske mase od 18 kDa, smešten na spoljašnjoj membrani mitohondrija. Iako je identifikovan u brojnim steroidogenim i nesteroidogenim tkivima, njegovo prisustvo u steroidogenim tkivima je od krucijalnog značaja za proces biosinteze steroida. U skladu s tim, detektovan je u ćelijama kore nadbubrežnih žlezda, Lajdigovim ćelijama, placenti i granuloza ćelijama ovarijuma (Papadopoulos i sar., 1997). Kako se TSPO u različitim tkivima dovodi u vezu sa brojnim fiziološkim funkcijama (od procesa steroidogeneze do funkcije mitohondrija i ćelijske proliferacije), razumevanje promena u njegovoj ekspresiji, koje nastupaju sa razvojem određenih bolesti (poput kancera i neuroloških poremećaja), može biti upotrebljeno u dijagnostičke i terapijske svrhe (Batarseh i sar., 2010).



Kao što je napomenuto, TSPO kao komponenta transducozoma, posreduje u translokaciji holesterola od spoljašnje do unutrašnje membrane mitohondrija (Midzak i sar., 2011; Miller, 2013; Papadopoulos i Miller, 2012; Rone i sar., 2012). Interagujući s VDAC1, TSPO ima ulogu da učvrsti pomenuti multiproteinski kompleks za spoljašnju membranu mitohondrija (Miller, 2013; Papadopoulos i sar., 1997). Iako je neophodna funkcionalna interakcija između StAR i TSPO proteina u Lajdigovim ćelijama (Hauet i sar., 2005), za sada nije pokazano da fizički interaguju (Miller, 2013).

TSPO poseduje pet transmembranskih segmenata,  $\alpha$  heliksa koji prolaze kroz spoljašnju membranu mitohondrija, zbog čega on funkcioniše kao kanal za transport holesterola (Papadopoulos i Miller, 2012). Prilikom tretmana MA-10 ćelija sa hCG, uočeno je formiranje TSPO dimera, trimera i tetramera koji ispoljavaju veći afinitet za holesterol (Hauet i sar., 2005).

U Lajdigovim ćelijama ekspimiranje *Tspo* dominantno je regulisano cAMP-PRKA signalnim putem (Papadopoulos i sar., 1997). Takođe, PRKC i MAPK signalne kaskade u velikoj meri regulišu transkripciju *Tspo* pri normalnom i patološkom stanju, kada je povećan nivo TSPO. U okviru promotora identifikovana su vezujuća mesta za Sp1/Sp3, c-Jun, kao i za članove Ets (*engl. E-twenty-six*) familije transkripcionih faktora, važnih za održavanje bazalne transkripcije *Tspo* (Batarseh i Papadopoulos, 2010; Batarseh i sar., 2010).

**CYP11A1** enzim, smešten na unutrašnjoj membrani mitohondrija, katalizuje konverziju holesterola u pregnenolon, što predstavlja prvi korak u biosintezi svih steroidnih hormona. Prisustvo CYP11A enzima pokazano je u nadbubrežnim žlezdama, gonadama, placenti i centralnom nervnom sistemu. U tkivu testisa CYP11A1 enzim prisutan je isključivo u Lajdigovim ćelijama, u kojima je neuobičajeno visok nivo relativne ekspresije *Cyp11a1*, usled čega se nivo CYP11A1 dosta sporije povećava u odgovoru na LH/hCG ili cAMP tretman u poređenju sa ostalim elementima steroidogene mašinerije (Payne i Hales, 2004; Payne i sar., 1992; Shih i sar., 2008).

Regulacija ekspimiranja *Cyp11a1* je tkivno-specifična i najčešće je stimulisana troprnim hormonima hipofize (ACTH, FSH, LH (odnosno njegovim analogom hCG)) preko cAMP-PRKA signalnog puta (Hanukoglu, 1992; Payne i Hales, 2004). Pored cAMP-PRKA, u transkripciju *Cyp11a1* je uključen i PRKC signalni put (Miller, 2013). Steroidni hormoni i glukokortikoidi negativno regulišu transkripciju *Cyp11a* gena (Payne i sar., 1992).

Transkripcija je regulisana različitim transkripcionim faktorima, uključujući, na prvom mestu, SF1. Represivni efekat na steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama posredovan je jedarnim receptorom DAX1. Bazalna i/ili cAMP-posredovana regulacija *Cyp11a1* gena, pored navedenih, podrazumeva i aktivnost transkripcionih faktora Sp1, GATA4, CREB1, kao i članova familije transkripcionih faktora AP1 (Martin i Tremblay, 2010).

**HSD3B** je protein od 42 kDa koji, pored HSD17B, pripada superfamiliji alkohol dehidrogenaza kratkog lanca. U zavisnosti od tipa ćelija, može biti smešten u mikrozomima, odnosno mitohondrijama (Simard i sar., 2005). Do sada su izolovane i okarakterisane različite izoforme HSD3B enzima kod čoveka, pacova i miša. Kod miša su izoforme 1 i 6 HSD3B enzima u najvećoj meri eksprimirane u steroidogenim ćelijama, dok su tipovi 2 i 3 najprisutniji u jetri i bubrezima. U tkivu testisa, ovarijuma i nadbubrežnih žlezda kod pacova detektovane su izoforme 1 i 2 HSD3B enzima (Bain i sar., 1991).

HSD3B katalizuje 3 $\beta$  hidrosisteroid dehidrogenaciju i izomerizaciju  $\Delta^5$ -steroidnih prekursora: pregnenolona, 17 $\alpha$ -hidrosisteroidpregnenolona, DHEA i androst-5-en-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol u odgovarajuće  $\Delta^4$ -ketosteroide: progesteron, 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron,  $\Delta^4$ -DION i T. Ovaj bifunkcionalni dimerni enzim je uključen u biosintezu svih steroidnih hormona: glukokortikoida, mineralokortikoida, progesterona, androgena i estrogena, te je stoga eksprimiran u tkivu kore nadbubrežnih žlezda, gonada, placente i u različitim perifernim ciljnim tkivima (Bain i sar., 1991; Simard, 2005).

U kulturi Lajdigovih ćelija, LH, hCG i drugi agonisti cAMP-PRKA signalnog puta povećavaju ekspresiju HSD3B (Lavoie i King, 2009). Iako je poznato da je cAMP unutarćelijski medijator transkripcije *Hsd3b* nakon stimulacije tropnim hormonima, zanimljivo je da u proksimalnom 5' delu sekvence nisu pronađeni CRE DNK regioni, odgovorni za vezivanje regulatornih elemenata aktiviranih sa cAMP. Međutim, otkrivena su dva moguća AP1 vezujuća mesta, koja odgovaraju AP1 vezujućim mestima identifikovanim kod drugih gena. Kao i kod ostalih steroidogenih enzima, i regulacija transkripcije gena za HSD3B je u velikoj meri zavisna od SF1 transkripcionog faktora (Simard i sar., 2005). U tumorskim MA-10 Lajdigovim ćelijama, GATA4 i/ili GATA6 pojačavaju efekat dejstva SF1. Takođe, i NUR77 i STAT5 (*engl. Signal transducer and activator of transcription 5*) su okarakterisani kao pozitivni regulatori *Hsd3b* (Lavoie i King, 2009). Nasuprot ovakvoj regulaciji transkripcije koja je zavisna od SF1, postoje i određene forme *Hsd3b* gena čija

transkripcija nije regulisana ovim transkripcionim faktorom (Payne i Hales, 2004). DAX1 predstavlja dominantan transrepresor steroidogeneze. Tačan mehanizam kojim DAX1 moduliše *Hsd3b* transkripciju nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da su protein-protein interakcije između DAX1 i drugih transkripcionih faktora (NUR77, LRH1 (*engl. Liver receptor homolog 1*) i SF1) ključne za funkciju ovih jedarnih receptora (Martin i Tremblay, 2010; Simard i sar, 2005; Tremblay, 2015).

**CYP17A1** enzim je smešten u mikrozomima i ima sposobnost da katalizuje dve reakcije, 17-hidroksilaciju C21 steroida, pregnenolona ( $\Delta^5$  steroida) ili progesterona ( $\Delta^4$  steroida), praćenu odvajanjem bočnog lanca (C17-20 veze), u cilju formiranja C19 steroida, dehidroepiandrosterona ili androstendiona. Prisustvo CYP17A detektovano je u testisima, nadbubrežnim žlezdama, ovarijumima, placenti i mozgu (Hales i sar., 1987; Hall, 1991; Miller i sar., 1997; Shi i sar., 2009).

Kao i u slučaju ostalih elemenata steroidogene mašinerije, eksprimiranje CYP17A enzima je dominantno stimulirano posredstvom cAMP-PRKA signalnog puta. T, sintetisan od strane Lajdigovih ćelija u odgovoru na cAMP, negativno reguliše količinu CYP17A pomoću dva mehanizma. Pri niskim koncentracijama, posredstvom AR, T vrši represiju sinteze ovog enzima, dok pri visokim koncentracijama uzrokuje njegovu povećanu degradaciju (Hales i sar., 1987; Payne, 1990). Pored toga, u H295R ćelijskoj liniji poreklom iz kore nadbubrežnih žlezda čoveka, pokazano je da elementi MAPK signalnog puta učestvuju u regulaciji *CYP17A* transkripcije, modulišući aktivnost SF1, posredstvom PRKA (Sewer i Waterman, 2003a).

Transaktivacija *Cyp17a* gena je regulisana različitim tkivno-specifičnim transkripcionim faktorima i modulirana je u zavisnosti od vrste (Shi i sar, 2009). U većini tkiva svih vrsta *Cyp17a* je regulisan pomoću SF1, posredstvom cAMP. Dokazano je i učešće transaktivatora i transrepresora poput Sp1, Sp3, NUR77 i COUP-TF, neophodnih za optimalnu bazalnu i cAMP-stimuliranu transkripciju (Zhang i Mellon, 1997; Sewer i Waterman, 2003b). U embrionskim matičnim ćelijama GATA faktori predstavljaju glavne aktivatore transkripcije *Cyp17a* (Shi i sar, 2009).

**HSD17B** enzim ima ulogu u završnoj fazi biosinteze T katalizujući redukciju C17-keto grupe androstendiona do T (u  $\Delta^4$  putu), odnosno DHEA do androstendiona (u  $\Delta^5$  putu). Do danas je okarakterisano jedanaest izoformi HSD17B enzima, koje se međusobno razlikuju po tkivnoj

distribuciji, katalitičkoj aktivnosti, smeštenosti unutar ćelije, afinitetu za supstrat i mehanizmima regulacije (Payne i Hales, 2004; Tremblay, 2015).

Izoforme 1, 3 i 7 su značajne za poslednji korak biosinteze aktivnih steroidnih hormona u gonadama, pri čemu je jedino HSD17B3 identifikovana u Lajdigovim ćelijama (Payne i Hales, 2004; Tremblay, 2015). HSD17B3 predstavlja dominantnu izoformu u tkivu testisa odraslih jedinki, dok se kod ljudi u nedostatku ovog enzima razvija pseudohermafroditizam, što implicira da je HSD17B3 neophodan za sintezu T i razvoj muškog fenotipa tokom razvoja fetusa i postnatalnog života (Baker i sar., 1997).

I pored važne uloge koju obavlja u tkivu testisa, regulacija transkripcije za *Hsd17b3* gen je slabo ispitivana. Istraživanja vršena na *HSD17B1* genu čoveka su pokazala učešće Sp1, Sp3, AP2, GATA2 i GATA3 transkripcionih faktora u regulaciji transkripcije za pomenuti gen (Payne i Hales, 2004; Tremblay, 2015).

**CYP19A1** je okarakterisan kao aromataza koja vrši oksidaciju androgena (androstendiona i T) do estrogena (estrone i 17 $\beta$  estradiola) (Payne i Hales, 2004). CYP19A enzim je identifikovan u gonadama i mozgu svih vrsta, dok je kod nekih detektovan i u placenti, koži, masnom tkivu i nadbubrežnim žlezdama (Young i McPhaul, 1998). Istraživanja bazirana na aromatizaciji T u estradiol u testisima pacova su ukazala na to da se ovaj mikrozomski enzim eksprimira u Lajdigovim ćelijama, pri čemu LH i/ili hCG akutno stimulišu proces aromatizacije. Pored sinteze CYP19A1 enzima u Lajdigovim ćelijama, u tkivu testisa je uočeno odvijanje ovog procesa i u germinativnim, kao i Sertolijevim ćelijama polno nezrelih pacova (Carreau i sar., 2002; Payne i Hales, 2004).

Transkripcija *Cyp19a1* gena je strogo regulisana zahvaljujući prisustvu većeg broja promotora čije prisustvo je specifično za pojedina tkiva. U okviru tih promotora je pokazano prisustvo nekoliko motiva, koji imaju važnu ulogu u posredovanju efekata cAMP-PRKA signalnog puta (Sierens i sar., 2010). U cilju što preciznije regulacije aktivnosti promotora gena za CYP19A1, neophodno je učešće transregulatora SF1, DAX1, CREB i CREM (Carreau i sar., 2002; Sierens i sar., 2010). Kao i u slučaju regulacije transkripcije drugih steroidogenih enzima, DAX1 vrši represiju SF1-posredovanu transaktivaciju *Cyp19a1* (Sierens i sar., 2010; Wang i sar., 2001).

### **1.1.3.2. Transkripcioni faktori i koregulatori zaduženi za regulaciju eksprimiranja elemenata steroidogene mašinerije – transaktivatori i transrepresori**

Transkripcioni faktori i koregulatori regulišu transkripciju steroidogenih gena vezujući se za specifičan promotorski region. Steroidogeneza je primarno regulisana LHCGR-cAMP-PRKA signalnim putem, ali i mnogim drugim putevima poput MAPK, NO-cGMP-PRKG, Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin kinaze i PLC-PRKC čija aktivacija uzrokuje regrutovanje transkripcionih faktora i/ili koregulatora. Najčešće mesto vezivanja transkripcionih faktora i/ili koregulatora je DNK sekvenca odgovorna za vezivanje regulatornih elemenata, aktiviranih posredstvom cAMP (*engl. cAMP responsive elements, CRE*).

**DAX1/NR0B** je jedarni receptor “siročće” (*engl. Orphan receptor*), dominantno eksprimiran u okviru hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne/gonadne osovine, koji ima važnu ulogu u regulaciji razvoja, diferencijacije i steroidogene funkcije nadbubrežnih žlezda i gonada. Nefunkcionalnost DAX1 kod miševa rezultuje smanjenom veličinom testisa, narušenom funkcijom Lajdigovih i Sertolijevih ćelija i sterilnošću (Iyer i McCabe, 2004; Manna i sar., 2009a).

Sačinjen je od 470 aminokiselina, sa C-terminalnim regionom koji je homolog ligand-vezujućem domenu jedarnih receptora i N-terminalnim regionom, bogatim aminokiselinama glicinom i alaninom, koji ima ulogu DNK-vezujućeg domena (Manna i sar., 2009a). Upravo zbog toga što ne poseduje klasičan DNK-vezujući domen, svoju ulogu represora transkripcije ostvaruje interakcijom s transaktivatorima poput SF1, NUR77 i LRH1 i dodatnim regrutovanjem brojnih transrepresora (Martin i Tremblay, 2010; Park i sar., 2005; Song i sar., 2004). Pokazano je da je DAX1 negativni regulator transkripcije gena za StAR, CYP11A1, HSD3B, CYP19A, SCARB1 (Azhar i Reaven, 2002; Lavoie i King, 2009; Maris i sar., 2015; Park i sar., 2005; Stocco i sar., 2001), usled čega dolazi do inhibicije biosinteze steroida. Prekomerno eksprimiranje DAX1 proteina u MA-10 Lajdigovim ćelijama uzrokuje smanjenje nivoa SF1 i NUR77 proteina za čak 45-70%, a CYP11A za 25%. Inhibicija aktivnosti DAX1 proteina, posredovana PRKA i PRKC, podrazumeva *de novo* sintezu za sada neidentifikovanih proteina, čija je uloga da izvrše degradaciju DAX1 (Manna i sar., 2009a).

**SF1/NR5A1** predstavlja jedarni receptor “siročće”, član familije NR5A, u kojoj se, pored njega, nalazi i LRH1/NR5A2. Identifikovan je u steroidogenom tkivu testisa, ovarijuma i nadbubrežnih

žlezda, kao i Sertolijevim ćelijama, gonadotropnim ćelijama hipofize i hipotalamusu (Hoivik i sar., 2010; Martin i Tremblay, 2010). Zbog ključne uloge SF1 transkripcionog faktora u procesu steroidogeneze u nadbubrežnom tkivu i tkivu testisa, *Sf1* deficijentni miševi često vrlo brzo umiru usled adrenokortikalne insuficijencije, odnosno, dolazi do regresije gonada. Kako se regresija gonada dešava pre polne diferencijacije, miševi razvijaju ženske unutrašnje i spoljašnje genitalije, sterilni su i ne dostižu polnu zrelost. SF1 kao transkripcioni faktor reguliše brojne elemente steroidogene mašinerije, zbog čega je ovako i izražen njegov uticaj na fenotip (Martin i Tremblay, 2010; Tremblay, 2015).

U Lajdigovim ćelijama SF1 stimuliše transkripciju *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1* gena, vezujući se kao monomer za specifičnu DNK sekvencu odgovarajućeg promotora (Martin i Tremblay, 2010; Park i sar., 2005; Tremblay, 2015).

**C/EBP** predstavlja familiju transkripcionih faktora, čiji članovi, najverovatnije sa SF1, formiraju kompleks tokom transaktivacije *Star* promotora jer je pokazano da je za njegovu transaktivaciju neophodno prisustvo funkcionalnog C/EBP vezujućeg mesta. Povezivanje SF1 sa CREB-vezujućim proteinom (engl. **C**REB-**b**inding **p**rotein, CBP) i p300 se smatra ključnim korakom u modulaciji ekspresije steroidogenih gena, zbog toga što se njihova ključna uloga ogleda u inicijaciji transkripcije pomoću RNK polimeraze II (King i LaVoie, 2012).

**NUR77/NGFI-B/NR4A1** je jedarni receptor „siročće“, član Nur77 familije gena, u koju se ubrajaju još i NURR1/NR4A2 (engl. **Nur** related protein **1**) i NOR1/NR4A3 (engl. **N**euron-derived **o**rphan **r**eceptor **1**). Svi članovi NUR77 familije sadrže slične strukturne karakteristike, konzervisane DNK- i ligand-vezujuće domene, kao i varijabilnu sekvencu N-terminalnog domena odgovornog za aktivaciju (engl. **A**ctivation **f**unction-**1**, AF-1). AF-1 domen NUR77 faktora je značajan za aktivaciju transkripcije, regrutovanje kofaktora, kao i inter- i intramolekulske interakcije (Qamar i sar., 2010). Ligand za NUR77 nije u potpunosti identifikovan i opisan, mada se smatra da citosporin-B (prirodni oktaketid iz *Dothiorella sp.* HTF3), vezujući se direktno za ligand-vezujući domen, ispoljava karakteristike liganda (Pearen i Muscat, 2010).

U Lajdigovim ćelijama, LH, posredstvom cAMP-PRKA signalnog puta, indukuje relativnu ekspresiju *Nur77* (Qamar i sar., 2010). NUR77 je, kroz interakciju sa drugim transregulatorima, uključen u regulaciju procesa steroidogeneze, pošto je utvrđeno da stimuliše transkripciju

steroidogenih enzima poput StAR, CYP17A i HSD3B (King i LaVoie, 2012; Qamar i sar., 2010). Interakcija NUR77 sa c-Jun transkripcionim faktorom pozitivno reguliše transkripciju *Star*, dok interakcija sa SRC-1 (*engl. Steroid receptor coactivator-1*) stimuliše promotorsku aktivnost *Hsd3b* i *Cyp17a1* gena (Martin i Tremblay, 2010). Transkripcioni faktori DAX1 i NF-κB (*engl. Nuclear factor κB*) vrše supresiju NUR77-indukovane transkripcije gena za steroidogene enzime, čime dovode do inhibicije biosinteze steroida. Naime, usled vezivanja NUR77, DAX1 i NF-κB onemogućena je interakcija NUR77 sa SRC-1, zbog čega se remeti transaktivacija NUR77 (Qamar i sar., 2010). Takođe je pokazano da se NUR77 vezuje za DNK sekvencu NBRE (*engl. NGFI-B response element*), sličnu sekvenci za koju se vezuju SF1 i LRH1 transkripcioni faktori (Lavoie i King, 2009).

**ARR19/CKLFSF2A** (*engl. Androgen receptor corepressor-19* kDa) je protein molekulske mase od 19 kDa, član superfamilije hemokinima-sličnih faktora (Qamar i sar., 2009). Najzastupljeniji je u reproduktivnim organima poput testisa i prostate (Qamar i sar., 2015). U tkivu prostate ARR19 vrši represiju transkripcione aktivnosti AR regrutovanjem histon deacetilaze (Jeong i sar., 2004) i važan je za polnu diferencijaciju i maturaciju prostate i epididimisa, dok u Lajdigovim ćelijama inhibira promotorsku aktivnost steroidogenih enzima HSD3B, CYP17A i StAR (Qamar i sar., 2015). Delujući kao antisteroidogeni faktor, ARR19 fizički interaguje sa NUR77, pri čemu inhibira biosintezu steroida, vršeći supresiju NUR77-indukovane transkripcije steroidogenih enzima (Qamar i sar., 2009).

*Arr19* je regulisan LH-cAMP-PRKA signalnim putem preko kontrole GATA1 transkripcionog faktora i CBP. CBP poseduje karakteristike histon acetilaze i deluje kao koaktivator GATA1 (Qamar i sar., 2009).

**AR** pripada superfamiliji jedarnih receptora koji, nakon vezivanja za DNK molekul, modulišu transkripciju ciljnih gena. Strukturne delove ovog receptora čine: N-terminalni domen (*engl. N-terminal domain*, NTD), DNK-vezujući domen (*engl. DNA-binding domain*, DBD), zglobni region, ligand-vezujući domen (*engl. Ligand-binding domain*, LBD) i dva domena zaslužna za aktivaciju transkripcije (Gao i sar., 2005, Kicman i sar., 2008, Li i Al-Azzawi, 2009). Pored uloge u vezivanju adrogenih hormona, ligand-vezujući domen je odgovoran i za dimerizaciju, čime posreduje u aktivaciji transkripcije (Kicman i sar., 2008).

U odsustvu liganda, unutarćelijski receptori za steroidne hormone se nalaze u kompleksu sa proteinom toplotnog šoka 90 (*engl. Heat-shock protein 90*, Hsp90) i p23 koji imaju ulogu molekulskih šaperona, kao i sa tetratrikopeptidnim ponavljajućim motivima (TPR). Šaperoni Hsp40 i Hsp70 i Hop protein (*engl. Heat-shock organizing protein*) imaju ulogu u učvršćivanju kompleksa AR-Hsp90. Pomenuti kompleks je važan za održavanje receptora u neaktivnom stanju, ali u konformaciji u kojoj će imati najveći afinitet za vezivanje liganda (Kicman i sar., 2008).

Nakon prolaska kroz ćelijsku membranu, steroidni hormon se vezuje za ligand-vezujući domen receptora, što uzrokuje disocijaciju Hsp90 i konformacione (alosterične) promene samog receptora, tj. njegovu aktivaciju. U slučaju AR, disocijacija šaperona se dešava u citosolu, nakon čega sledi njegova translokacija u jedro. Aktivirani receptori se kao homodimeri vezuju za specifičnu DNK sekvencu, regrutuju se koregulatori i formira transkripciona mašinerija (Kicman i sar., 2008).

Funkcija domena odgovornih za aktivaciju transkripcije je da posreduju u vezivanju receptora za koregulatory transkripcije. Razlikuju se AF-1 domen u N-terminalnom regionu i AF-2 (*engl. Activation function-2*) domen u C-terminalnom regionu ligand-vezujućeg domena. Mehanizam genske aktivacije preko AF-1 nije u potpunosti razjašnjen, dok je u potpunosti poznat mehanizam aktivacije transkripcije posredovan AF-2 domenom. Za aktivaciju AF-2 je neophodno vezivanje liganda za receptor, što uzrokuje savijanje i postavljanje C-terminalnog heliksa (heliks-12) receptora preko liganda. Zatim sledi vezivanje različitih koaktivatora, pri čemu svi poseduju leucin-X-X-leucin-leucin (LXXLL) motiv neophodan za ovaj vid interakcije (X predstavlja bilo koju aminokiselinu) (Kicman i sar., 2008).

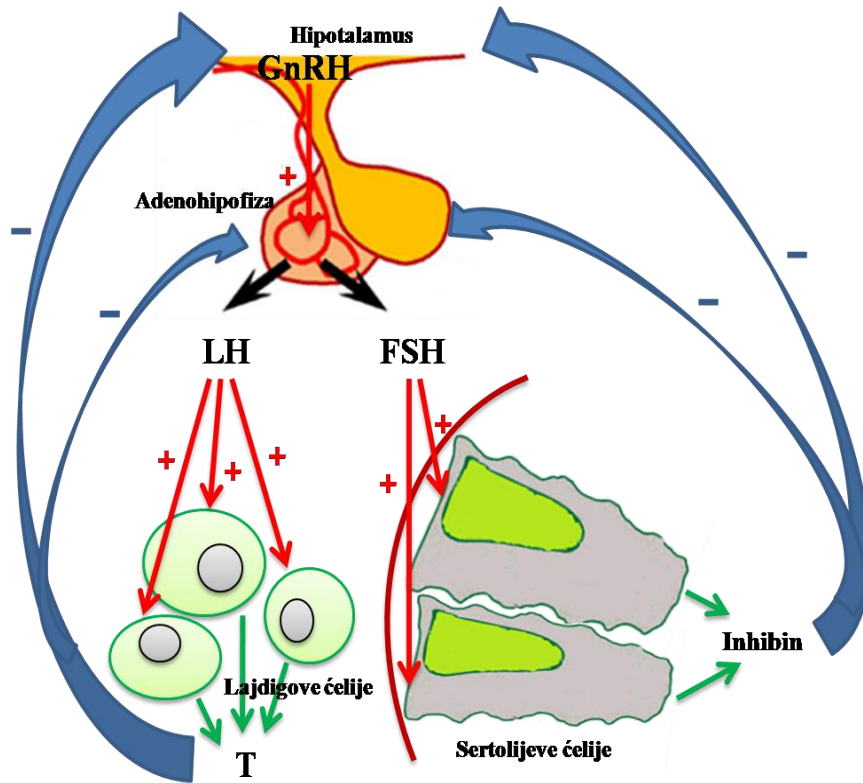
#### **1.1.4. Regulacija steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija**

Da bi se steroidogeneza u Lajdigovim ćelijama neometano odvijala, neophodna je stroga regulacija ovog procesa putem endokrinih, nervnih, parakrinih, autokrinih, kriptokrinih i jukstakrinih mehanizama.

Kao što je već napomenuto, steroidogena funkcija Lajdigovih ćelija je dominantno regulisana hipofiznim LH ili njegovim analogom, hCG, zahvaljujući postavljanju hipotalamo-hipofizno-



gonadne osovine (engl. **H**ypothalamic-**p**ituitary-**g**onadal axis, HPG). Pulsirajuća električna aktivnost GnRH neurona i posledična sekrecija gonadotropin-oslobađajućeg hormona (engl. **G**onadotropin-**r**eleasing **h**ormone, GnRH) iz hipotalamusa, uslovljene aktivacijom GPR54 receptora od strane kipeptina, omogućava oslobađanje LH i FSH (engl. **F**olicle-**s**timulating **h**ormone, FSH) na nivou adenohipofize u istom maniru. LH je dominantno odgovoran za regulaciju steroidogeneze, a FSH dominantno za regulaciju spermatogeneze na nivou testisa (Slika 1.3). Nakon vezivanja LH i/ili hCG za LHCGR, dolazi do aktivacije različitih signalnih puteva zaduženih za kontrolu procesa steroidogeneze, pri čemu je dominantan cAMP-PRKA signalni put. T, kao krajnji produkt endokrine aktivnosti testisa, uključuje se u regulaciju sopstvene produkcije preko negativnih povratnih sprega na hipotalamus i hipofizu (za reference videti Payne i Hales, 2004; Weinbauer i sar., 2001; Tremblay, 2015).



**Slika 1.3. Hipotalamo-hipofizno-gonadna osovina kod mužjaka**

Pored LH i hCG, osteokalcin, produkovan od strane kostnog tkiva, ima sposobnost da stimuliše steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama. Kod miševa deficijentnih za osteokalcin utvrđen je smanjen nivo steroidogeneze, feminizacija, kao i povećana produkcija LH. U Lajdigovim ćelijama,

osteokalcin je neophodan za eksprimiranje određenih gena uključenih u biosintezu T, delujući uglavnom preko CREB transkripcionog faktora (Oury i sar., 2011). Takođe, neke studije ukazuju na to da je prolaktin (PRL) neophodan za efikasno funkcionisanje testisa. Međutim, sa druge strane, postoje navodi da PRL ispoljava inhibitorni (Waeber i sar., 1983) ili dvojak (Manna i sar., 2002) efekat. Smatra se da hiperprolaktinemija uzrokuje povećanje broja LHCGR u testisima i smanjenje produkcije gonadotropina (Pakarinen i sar., 1994). Pored toga, pokazano je i da hiperprolaktinemija uzrokuje redukciju bazalne i hCG-stimulisane biogeneze T u Lajdigovim ćelijama, pri čemu je zabeležena povišena koncentracija T u cirkulaciji, koja se tokom vremena smanjuje. Ovi rezultati se mogu objasniti smanjenim katabolizmom T i/ili narušenom perifernom konverzijom T u DHT (Waeber i sar., 1983). Najznačajniji signalni put koji vrši transdukciju signala nakon aktivacije PRL receptora je JAK-STAT kaskada. Pokazano je da se pojedine komponente ove kaskade, interagujući sa AR, uključuju u kontrolu ekspresije HSD3B (Lavoie i King, 2009; Simard i sar., 2005; Tan i sar., 2008). Iako se primarna regulacija steroidogeneze ostvaruje endokrinim mehanizmom koji podrazumeva učešće HPG osovine, za kontrolu ovog procesa je neophodan i hipotalamo-gonadni nervni put, nezavisan od hipofize, koji indukuje inhibiciju produkcije T (Choi i sar., 2008; Selvage i sar., 2006).

Pored endokrinih i nervnih mehanizama uključenih u regulaciju biosinteze T, od izuzetnog značaja je i precizno i kompleksno koordinisana produkcija lokalnih autokrinih i parakrinih, ali i kriptokrinih i jukstakrinih faktora. Ovi signalni molekuli predstavljaju hormone, faktore rasta i citokine produkovane od strane Lajdigovih ćelija, odnosno, ćelija testisa iz njihovog okruženja – makrofaga, Sertolijevih, peritubulnih mioidnih, endotelnih ili germinativnih ćelija. U faktore rasta sa najizraženijim stimulativnim efektom na steroidogenezu se ubrajaju IGF1 i faktor rasta fibroblasta 9 (*engl. Fibroblast growth factor 9*, FGF9). Sa druge strane, citokini poput transformišućeg faktora rasta  $\beta$ 1 (*engl. Transforming growth factor  $\beta$ 1*, TGF $\beta$ 1), Milerovog inhibirajućeg hormona (*engl. Müllerian-inhibiting hormone*, MIH), faktora nekroze tumora  $\alpha$  (*engl. Tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF $\alpha$ ), interleukina 1 i 6 (*engl. Interleukin-1*, IL-1; *Interleukin-6*, IL-6) inhibiraju proces steroidogeneze. Iako mehanizam delovanja ovih citokina nije u potpunosti okarakterisan, poznato je da TGF $\beta$ 1 i TNF $\alpha$  svoju funkciju ostvaruju interagujući sa NUR77 (Bornstein i sar., 2004; Fynn-Thompson i sar., 2003; Le Roy i sar., 1999; Lin i sar., 1998; Mauduit i sar., 1998; Tremblay, 2015). Pored toga, azot-monoksid (NO) je sekundarni glasnik koga proizvode Lajdigove ćelije ili ćelije iz njihovog okruženja, u najvećoj meri makrofagi. NO

u Lajdigovim ćelijama ispoljava dvojak efekat na steroidogenezu, a u zavisnosti od svoje koncentracije. Kada je prisutan u niskim koncentracijama, ima sposobnost da stimulira biosintezu T (Andric i sar., 2007; Valenti i sar., 1999), dok je pri visokom koncentracijama ovaj proces inhibiran (Andric i sar., 2007; Del Punta i sar., 1996). T, osim opisane regulacije sopstvene produkcije u endokrinom maniru, ispoljava i efekte autokrinog/parakrinog regulatora aktivnosti Lajdigovih ćelija. Inaktivacijom gena za AR je pokazano da je signalizacija koja potiče od AR neophodna za sazrevanje adultne populacije Lajdigovih ćelija, kao i regulaciju transkripcije steroidogenih gena (O'Shaughnessy i sar., 2002).

Za sve ćelije koje sintetišu steroidne hormone, uključujući i Lajdigove ćelije, mitohondrije su ključno mesto kontrole procesa steroidogeneze. Mitohondrije svih eukariotskih vrsta podležu dinamičnim procesima mitofuzije (spajanje mitohondrija), mitofisije (deoba mitohondrija), mitofagije (uklanjanje oštećenih mitohondrija) i mitohondrijske biogeneze (formiranje novih mitohondrija) (Duarte i sar., 2012; Palikaras i Tavernarakis, 2014). U Lajdigovim ćelijama, hormonska stimulacija inicira mitofuziju, koja je neophodna za efikasno funkcionisanje mitohondrija i produkciju T. Mitofuzija reguliše lokalizaciju StAR proteina na membrani mitohondrija (Issop i sar., 2015). Takođe, povećana mitohondrijska biogeneza predstavlja značajan adaptivan mehanizam steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija stresiranih pacova (Gak i sar., 2015).

#### **1.1.4.1. Signalni putevi uključeni u regulaciju steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama**

Kao što je već navedeno, nesporno je da je cAMP-PRKA signalni put dominantna signalna kaskada koja se aktivira nakon stimulacije Lajdigovih ćelija sa LH i/ili hCG i reguliše proces biosinteze steroida. Elementi ovog signalnog puta i njihova uloga u regulaciji steroidogeneze će detaljnije biti opisani u podnaslovu 2.1.4.1.1., s obzirom na to da predstavljaju deo rezultata prikazanih u ovoj disertaciji. Međutim, u kontrolu ovog procesa su uključeni i mnogi drugi signalni putevi (Slika 1.4).

Mitogenom aktivirane protein kinaze imaju značajnu ulogu u regulaciji procesa steroidogeneze. Do sada su najbolje okarakterisane i u Lajdigovim ćelijama identifikovane vanćelijskim signalom regulisane kinaze 1 i 2 (*engl.* **E**xtracellular signal-**r**egulated protein **k**inases **1** and **2**, ERK1/2).

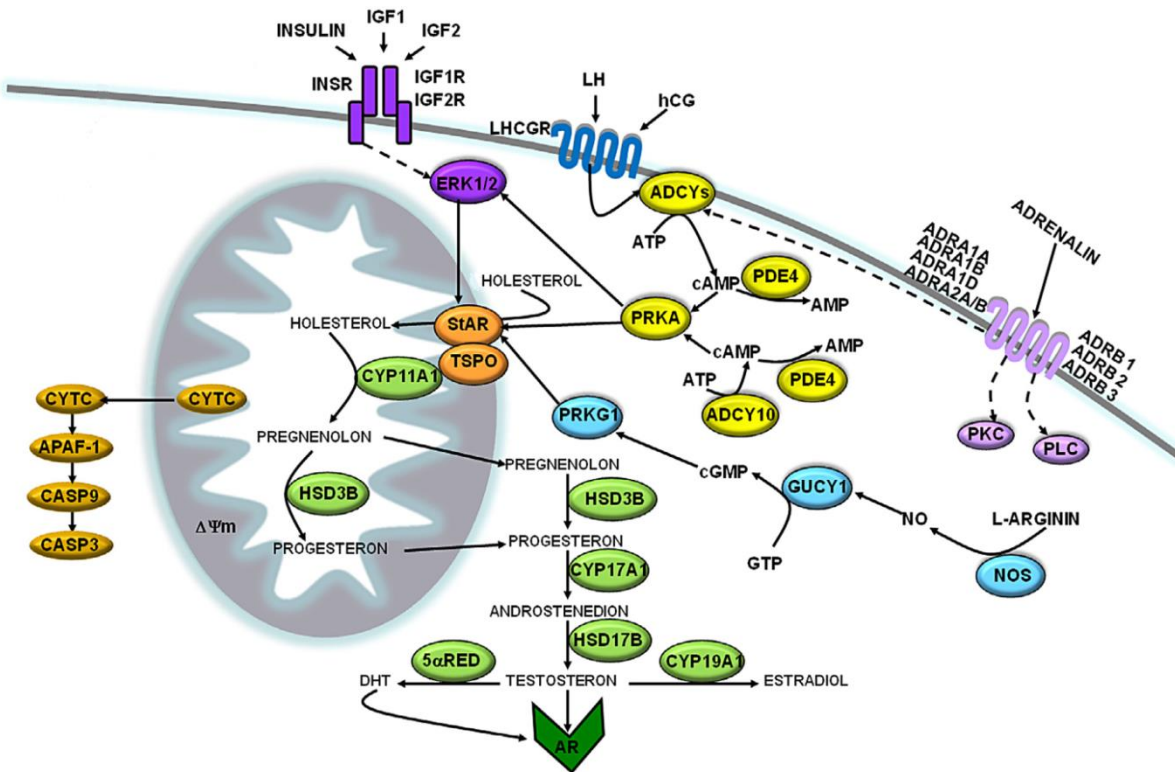
ERK1/2 signalna kaskada se u najvećoj meri aktivira u odgovoru na insulin i IGF-1 i IGF-2 faktore rasta (Roberts i Der, 2007), ali i kao rezultat aktivirane PRKA, obezbeđujući na ovaj način efikasno odvijanje LH-indukovane steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama (Manna i sar., 2007).

NO-cGMP-PRKG signalni put se aktivira u odgovoru na endogeno produkovan NO od strane azot-monoksid sintaza (*engl.* **N**itric-**o**xide **s**ynthases, NOS). Kao što je već napomenuto, niske koncentracije NO stimulišu biosintezu T (Andric i sar., 2007; Valenti i sar., 1999), dok je visoke koncentracije inhibiraju (Andric i sar., 2007; Del Punta i sar., 1996). Stimulacija steroidogeneze zahteva vezivanje NO za unutarćelijski enzim, solubilnu guanil ciklazu (*engl.* **S**oluble **g**uanilyl **c**yclase, sGUCY), koji katalizuje konverziju GTP u cGMP, koji će potom aktivirati PRKG, koja ima sposobnost fosforilacije i aktivacije StAR (Andric i sar., 2007).

Pored povišenog nivoa cAMP i cGMP, za efikasno odvijanje procesa steroidogeneze je neophodan i porast unutarćelijske koncentracije  $Ca^{2+}$ . Povišen nivo  $Ca^{2+}$  aktivira signalni put kinaze  $Ca^{2+}$ /kalmodulin kinaze (*engl.* **C**a<sup>2+</sup>/cal**m**odulin **k**inase **k**inase, CaMKK), što rezultira aktivacijom  $Ca^{2+}$ /kalmodulin kinaze 1 (*engl.* **C**a<sup>2+</sup>/cal**m**odulin **k**inase **1**, CAMK1). CAMK1 je identifikovana u Lajdigovim ćelijama i zajedno sa cAMP-PRKA signalnim putem omogućava maksimalan odgovor ovih ćelija na hormonsku stimulaciju (Martin i sar., 2008; Tremblay, 2015).

PRKC je takođe uključena u sintezu T. Interakcija LH sa receptorom aktivira PLC, što u nastavku indukuje signalni put PRKC. PRKC moduliše aktivnost cAMP-PRKA signalne kaskade, regulišući na ovaj način ekspimiranje i fosforilaciju StAR proteina, odnosno, steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama (Manna i sar., 2009b; Manna i sar., 2011).

Sumarno, za regulaciju steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija je odgovorna kompleksna mreža signalnih puteva, pri čemu se razumevanje čitavog procesa dodatno komplikuje analizom brojnih transkripcionih faktora, opisanih u poglavlju 2.1.3.2. Pored toga, do sada je slabo ispitana uloga epigenetičkih procesa, koji uključuju modifikaciju histona, metilaciju DNK i mikroRNK, u rasvetljavanju mehanizama diferencijacije i funkcije Lajdigovih ćelija (Tremblay, 2015).



Slika 1.4. Najznačajniji signalni putevi uključeni u regulaciju steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama

#### 1.1.4.1.1. Elementi cAMP-PRKA signalnog puta

cAMP-PRKA signalni put reguliše brojne ćelijske procese poput metabolizma, genske aktivnosti, rasta, deobe i diferencijacije ćelija, provodljivosti jonskih kanala i pokretljivosti spermatozoida (Hansson i sar., 2000). Takođe, ovaj signalni put predstavlja dominantnu signalnu kaskadu zaduženu za akutnu i hroničnu regulaciju steroidogeneze u svim steroidogenim ćelijama/tkivima, pa stoga i u Lajdigovim ćelijama. Elementi ovog signalnog puta su:

- 1) enzim adenil ciklaza (ADCY), koja vrši sintezu cAMP od ATP kao supstrata;
- 2) protein kinaza A (PRKA), koja dalje prenosi signal cAMP;
- 3) enzim fosfodiesteraza (*engl. Phosphodiesterase*, PDE), koja imaju ulogu u razgradnji cAMP;
- 4) ABC transporteri (*engl. ATP-binding cassette transporter*), kao što je MRP (*engl. Multidrug resistance protein*, MRP) koji cAMP izbacuje iz ćelije.

**ADCY** predstavljaju familiju glikoproteina molekulske mase od oko 120 kDa koji vrše konverziju ATP u cAMP (Steer, 1975; Tesmer i Sprang, 1998). Do sada je klonirano i okarakterisano deset izoformi ADCY, od kojih je devet membranski-vezanih (ADCY1 – 9) i jedna solubilna izoforma, ADCY10. Svaku pojedinačnu izoformu definišu njoj svojstvena tkivna distribucija i regulatorna svojstva, što ćelijama daje sposobnost da različito odgovore na slične stimulse. Membranski-vezane ADCY se aktiviraju u odgovoru na vanćelijske stimulse putem receptora spregnutih sa proteinom G (*engl. G protein coupled receptors, GPCR*). Nakon vezivanja hormona za GPCR, receptori postaju aktivirani i deluju kao guanin nukleotid izmenjivački faktori (*engl. Guanine nucleotide exchange factors, GEF*) za G proteine. Ovaj događaj obezbeđuje konformacionu promenu receptora, što dalje omogućava da se umesto GDP molekula veže GTP za subjedinicu proteina G.  $G\alpha$  subjedinica za koju je vezan GTP iskazuje slabiji afinitet za  $G\beta\gamma$  subjedinice, usled čega se disocira od njih, nakon čega  $G\alpha$  i  $G\beta\gamma$  subjedinice interaguju sa specifičnim ADCY, dovodeći do aktivacije, odnosno, inhibicije enzimske aktivnosti, u zavisnosti od tipa ADCY. S obzirom na to da je  $G\alpha$  subjedinica heterotrimernog proteina G enzim GTPazne aktivnosti, vrši hidrolizu GTP-vezanog molekula i konvertuje ga u GDP, čime nastaje neaktivna forma proteina G (Wilkie i sar., 1993).

Na osnovu amino-kiselinske sekvence membranski-vezanih ADCY, ustanovljeno je da se transmembranski region ovih enzima sastoji od dva seta sa po šest hidrofobnih rezidua koje su umetnute u membranu, pri čemu su setovi odvojeni velikim hidrofilnim domenom. Stoga su ovi enzimi sačinjeni od kratkog varijabilnog amino-terminalnog domena (N) u čijem se nastavku nalaze: prvi transmembranski set (M1), prvi veliki citoplazmatski domen (C1), drugi transmembranski set (M2) i još jedan veliki citoplazmatski domen (C2). Citoplazmatski domeni međusobno interaguju formirajući katalitičko jezgro enzima. M1 i M2 domeni mogu funkcionisati i kao membranski voltažni senzori koji promenom konformacije regulišu aktivnost ADCY (Cooper i Crossthwaite, 2006; Patel i sar., 2001; Tesmer i Sprang, 1998).

Na osnovu regulatornih sposobnosti i sličnosti u amino-kiselinskoj sekvenci, članovi familije ADCY su podeljeni u nekoliko grupa (Tabela 1.1.). U prvu grupu ADCY regulisanih  $Ca^{2+}$  i kalmodulinom se ubrajaju ADCY1, ADCY3 i ADCY8. Iako su sva tri enzima regulisana na ovaj način, ADCY3 je regulisana  $Ca^{2+}$ -kalmodulin kompleksom isključivo u prisustvu forskolina. Drugu grupu čine ADCY2, ADCY4 i ADCY7 izoforme, čija je aktivnost stimulirana  $\beta\gamma$

subjedinicom proteina G. ADCY5 i ADCY6 predstavljaju izoforme inhibirane  $\alpha_i$  subjedinicom proteina G, dok četvrtu kategoriju čini ADCY9, koja je regulisana kalcineurinom (Patel i sar., 2001). Poslednju kategoriju čini jedina solubilna izoforma, ADCY10, za koju se veruje da nije osetljiva na stimulatornu alfa subjedinicu G proteina i forskolin (Chen i sar., 2000), a da pokazuje sličnost cijanobakterijskoj ADCY (Sunahara i Taussig, 2002).

Membranski-vezane ADCY izoforme su takođe regulisane procesima fosforilacije. Pokazano je da PRKC stimuliše aktivnost ADCY2 i ADCY7 izoformi, dok istovremeno inhibira aktivnost ADCY4 i ADCY6. Takođe, iako  $Ca^{2+}$  i kalmodulin aktiviraju ADCY1 i ADCY3, njihova aktivnost je inhibirana nakon fosforilacije kalmodulin kinazama 4 i 2 (Patel i sar., 2001).

**Tabela 1.1. Klasifikacija sisarskih ADCY na osnovu njihove regulacije različitim modulatorima**  
Korišćene skraćenice: Fsk, forskolin; CaM, kalmodulin.

Grupa	Izoforma	Aktivatori	Inhibitori
1	ADCY1	Gs $\alpha$ , Fsk, Ca <sup>2+</sup> /CaM	Gi $\alpha$ , G $\beta\gamma$ , CaMK 4, analozi P domena
1	ADCY3	Gs $\alpha$ , Fsk, Ca <sup>2+</sup> /CaM	CaMK 2, analozi P domena
1	ADCY8	Gs $\alpha$ , Fsk, Ca <sup>2+</sup> /CaM	Analozi P domena
2	ADCY2	Gs $\alpha$ , Fsk, G $\beta\gamma$ , PRKC	Analozi P domena
2	ADCY4	Gs $\alpha$ , Fsk, G $\beta\gamma$	Analozi P domena, PRKC
2	ADCY7	Gs $\alpha$ , Fsk, G $\beta\gamma$ , PRKC	Analozi P domena
3	ADCY5	Gs $\alpha$ , Fsk, PRKC	Gi $\alpha$ , G $\beta\gamma$ , PRKA, Ca <sup>2+</sup> , analozi P domena
3	ADCY6	Gs $\alpha$ , Fsk	Gi $\alpha$ , PRKC, PRKA, Ca <sup>2+</sup> , analozi P domena
4	ADCY9	Gs $\alpha$	Kalcineurin, analozi P domena
5	ADCY10	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	?

Uz manje modifikacije, tabela je prevod tabele iz revijalnog rada Patel i sar., 2001.

Postoje brojni podaci koji ukazuju na jasno utvrđenu lokalizaciju cAMP signalizacije, tj. promenu nivoa cAMP u konkretnim delovima ćelije. Oligomerizacija ADCY, njihova pozicija u okviru

specifičnih lipidnih nakupina u membrani (*engl.* lipid rafts), kao i interakcija ADCY sa multiproteinskim signalnim kompleksima, obezbeđuju nastanak cAMP i njegovu dalju reakciju sa efektorima u tačno utvrđenim mestima unutar ćelije (Cooper i Crossthwaite, 2006).

Glavni unutarćelijski receptor za cAMP je cAMP-zavisna protein kinaza A, **PRKA**, koja reguliše brojne biohemijske procese fosforilacijom ciljnih proteina. U odsustvu cAMP molekula, PRKA je neaktivan tetramerni holoenzim kog čine dve katalitičke (C) i dve regulatorne (R) subjedinice (Scott, 1991). Katalitičko jezgro PRKA ima ulogu u vezivanju specifičnog supstrata/efektora i katalitičkoj reakciji koja podrazumeva fosforilaciju serinskih i/ili treoninskih ostataka. Neaktivna forma PRKA se u ćeliji održava zahvaljujući konformacionoj strukturi same kinaze koja katalitičko jezgro čini nedostupnim za supstrat/efektor. Vezivanjem po dva cAMP molekula u okviru obe regulatorne subjedinice, dolazi do odvajanja regulatornih subjedinica, čime katalitičko mesto postaje dostupno za supstrat/efektor, odnosno, PRKA prelazi u svoje aktivno stanje (Scott, 1991; Taylor i sar., 2004).

U ćelijama sisara katalitičku subjedinicu PRKA kodiraju dva gena, te su prisutne njene dve izoforme (C $\alpha$  i C $\beta$ ), dok regulatornu subjedinicu kodiraju četiri gena, te se razlikuju njene četiri izoforme (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  i RII $\beta$ ). U kasnoj pahiten fazi spermatoocita i ranim haploidnim germinativnim ćelijama primata je pokazano prisustvo dodatne C subjedinice, C $\gamma$ . U zavisnosti od toga koje izoforme regulatornih subjedinica sadrže, PRKA su svrstane u dve grupe: tip I (PRKA1) sa RI subjedinicom u strukturi, i tip II (PRKA2) sa RII subjedinicom u strukturi. RI i RII subjedinice na svom N kraju sadrže domen odgovoran za dimerizaciju, region koji ostvaruje interakciju sa C subjedinicom i dva cAMP-vezujuća mesta na C kraju (Hansson i sar., 2000; Taylor i sar., 2008). Specifičnost za supstrate i katalitička svojstva su identična za C $\alpha$  i C $\beta$ , dok se regulatorne subjedinice funkcijski razlikuju po afinitetu za cAMP, kao i unutarćelijskoj lokalizaciji (Scott, 1991).

Nivo eksprimiranja različitih PRKA subjedinica zavisi od hormonske regulacije koja se ostvaruje preko receptora spregnutih sa proteinom G, signalizacijom mitogena posredstvom receptora vezanih sa tirozin kinazama, kao i steroidnim hormonima. Regulacija nivoa PRKA subjedinica, koja je posredovana cAMP, primarno se odvija preko transkripcije gena, ali takođe podrazumeva i održavanje stabilnosti iRNK (Hansson i sar., 2000).



Različiti neurotransmiteri i/ili hormoni produkcijom cAMP izazivaju brojne biohemijske procese upravo aktivacijom specifičnih podtipova PRKA, smeštenih u okviru konkretnog regiona unutar ćelije. Proteini koji interaguju sa regulatornim subjedinicama PRKA i time obezbeđuju jasno definisanu lokalizaciju kinaze su nazvani proteini “skele” (*engl.* Scaffold proteins) ili proteini za “usidranje” (*engl.* **A** **k**inase **a**nchoring **p**roteins, AKAP) (Scott, 1991; Taylor i sar., 2004). Do sada je klonirano i okarakterisano preko 20 AKAP proteina, pri čemu neki tipovi ćelija mogu sadržati i 10–15 različitih AKAP proteina, smeštenih u različitim regionima unutar ćelije, poput jedra, citoskeleta, centrozoma, jonskih kanala, peroksizoma, Goldžijevog aparata, mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i membrana (Hansson i sar., 2000).

Pored interakcije sa PRKA, pokazano je da unutarćelijski cAMP ima sposobnost direktne modulacije različitih tipova jonskih kanala, kao i sposobnost vezivanja za GEF, koji je poznat i kao EPAC (*engl.* **E**xchange **p**rotein **a**ctivated by **c**AMP) (Godinho i sar., 2015).

S obzirom na velik značaj cAMP molekula u brojnim ćelijskim procesima, neophodna je fina regulacija njegove koncentracije, koja se ostvaruje balansiranim odnosom produkcije cAMP posredstvom ADCY i njegovom razgradnjom od strane PDE, odnosno mehanizmom izbacivanja cAMP iz ćelije putem MRP (Stojilkovic i sar., 2012).

**PDE** katalizuju reakciju hidrolize veze 3' cikličnog fosfata u okviru cikličnih nukleotida. Do danas je opisano i okarakterisano 11 genskih familija PDE (PDE1 – PDE11), čija je podela bazirana na amino-kiselinskoj sekvenci, biohemijskim svojstvima, regulaciji i osetljivosti na farmakološke agense. Različite PDE mogu imati istu katalitičku funkciju, ali se međusobno mogu razlikovati na osnovu tkivne zastupljenosti i lokalizacije unutar ćelije (Levy i sar., 2011; Lugnier, 2006). U okviru svake familije identifikovano je nekoliko izoformi, kodiranih od strane jednog do četiri različita gena (Lugnier, 2006). Na osnovu supstrata koji hidrolizuju, razlikuju se cAMP-specifične (PDE4, 7 i 8), cGMP-specifične (PDE5, 6 i 9) i dvojno specifične PDE (koje katališu hidrolizu i cAMP i cGMP; PDE1, 2, 3, 10 i 11) (Tabela 1.2.) (Bender i Beavo, 2006; Vezzosi i Bertherat, 2011).

**Tabela 1.2. Klasifikacija sisarskih PDE na osnovu njihove specifičnosti i načina regulacije aktivnosti**

Genska familija	Gen	Supstrat	Regulacija	Lokalizacija
<b>PDE1</b>	<i>Pde1a</i>	cAMP, cGMP	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin	citosol
	<i>Pde1b</i>			
	<i>Pde1c</i>			
<b>PDE2</b>	<i>Pde2a</i>	cAMP, cGMP	stimulisana cGMP	membrana i citosol
<b>PDE3</b>	<i>Pde3a</i>	cAMP, cGMP	inhibisana cGMP	membrana i citosol
	<i>Pde3b</i>			
<b>PDE4</b>	<i>Pde4a</i>	cAMP	ubikvitinacija specifična za cAMP	membrana
	<i>Pde4b</i>			
	<i>Pde4c</i>			
	<i>Pde4d</i>			
<b>PDE5</b>	<i>Pde5a</i>	cGMP	cGMP specifična	citosol
<b>PDE6</b>	<i>Pde6a</i>	cGMP	fotoreceptorska	membrana i citosol
	<i>Pde6b</i>			
	<i>Pde6c</i>			
<b>PDE7</b>	<i>Pde7a</i>	cAMP	neosetljiva na rolipram	citosol
	<i>Pde7b</i>			
<b>PDE8</b>	<i>Pde8a</i>	cAMP	cAMP specifična	citosol
	<i>Pde8b</i>			
<b>PDE9</b>	<i>Pde9a</i>	cGMP	cGMP specifična	citosol i jedro
<b>PDE10</b>	<i>Pde10a</i>	cAMP, cGMP	inhibisana cAMP	citosol
<b>PDE11</b>	<i>Pde11a</i>	cAMP, cGMP	regulisana cAMP i cGMP	citosol

Tabela je formirana korišćenjem podataka iz revijalnih radova Bender i Beavo, 2006; Levy i sar., 2011; Lugnier, 2006.

Sve sisarske PDE dele istu strukturnu organizaciju sa konzervisanim katalitičkim domenom, smeštenim u blizini C-terminalnog domena, i regulatornim domenima u blizini N-terminalnog regiona proteina. Regulatorni domeni su odgovorni za regulaciju katalitičkog domena, kao i za lokalizaciju PDE unutar ćelije. Takođe, u okviru njih se nalaze vezna mesta za ciklične nukleotide, domeni koji obezbeđuju protein-protein interakcije i regioni za fosforilaciju. Smatra se da se u

okviru C-terminalnog domena nalaze regioni odgovorni za dimerizaciju, kao i dodatna mesta odgovorna za regulaciju PDE, poput mesta za fosforilaciju. Iako fiziološki značaj fosforilacije PDE nije u potpunosti razjašnjen, utvrđeno je da PRKA, PRKG, protein kinaza B (*engl.* **P**rotein **k**inase **B**, PRKB; poznata i kao Akt) i MAP kinaze mogu vršiti fosforilaciju PDE (Lugnier, 2006; Mehats i sar., 2002).

Pokazano je da nefunkcionalnost PDE enzima dovodi do visokog nivoa cAMP unutar ćelije, što dalje uzrokuje konstantnu aktivaciju cAMP-PRKA signalne kaskade. Ovakve promene mogu uticati na nastanak različitih tumora i hiperplazija (Levy i sar., 2011), erektilne disfunkcije, plućne hipertenzije i sl. (Godinho i sar., 2015).

Devet opisanih **MRP** proteina (MRP1-9) predstavlja članove ABCC podfamilije, jedne od sedam podfamilija velike superfamilije membranskih ABC transportera. ABC transporteri vrše transport velikog broja različitih endogenih i egzogenih supstanci, a posebno medikamenata ili farmakološki aktivnih supstanci (Chen i Tiwari, 2011).

Četiri člana ABCC podfamilije, MRP4, 5, 8 i 9 (poznati i kao ABCC4, 5, 11 i 12) su nazvani tzv. “kratki” MRP jer poseduju četiri domena u okviru svoje strukture, odnosno, dva domena koja zasecaju membranu (*engl.* **M**embrane-**s**panning **d**omains **1** and **2**, MSD1 i MSD2), a iza kojih slede nukleotid-vezujući domeni (*engl.* **N**ucleotide-**b**inding **d**omains **1** and **2**, NBD1 i NBD2). Ostali članovi ove podfamilije MRP1, 2, 3, 6 i 7 (poznati i kao ABCC1, 2, 3, 6 i 10) su tzv. “dugi” MRP, iz razloga što poseduju dodatni, peti domen (*engl.* **M**embrane-**s**panning **d**omain **0**, MSD0) na N kraju proteina (Chen i Tiwari, 2011; Deeley i sar., 2006).

Utvrđeno je da sposobnost izbacivanja cikličnih nukleotida iz ćelije poseduju MRP4, 5 i 8. Distribuirani su u velikom broju tkiva, poput srčanog i skeletnog mišića, jetre, mozga, hipofize, placente i testisa. MRP4 iskazuje nizak afinitet prema cAMP i cGMP, te se sve češće dovodi u pitanje njegovo učešće u regulaciji unutarćelijskog nivoa ovih molekula. Međutim, s obzirom na strogo regulisanu lokalizaciju ovih membranskih proteina posredstvom proteina “skela” i proteina za “usidranje”, neki autori smatraju da MRP4 ima značajnu ulogu u održavanju nivoa cikličnih nukleotida u okviru specifičnih, jasno utvrđenih mikrodomena ćelije. MRP5 pokazuje visok afinitet za cGMP i u ćelijama hipofize deluje kao selektivni transporter za cGMP. Stoga se MRP5 često označava kao pumpa za izbacivanje cikličnih nukleotida (Chen i Tiwari, 2011). Zahvaljujući

aktivnosti MRP proteina, od skoro je zastupljeno mišljenje da cAMP može funkcionisati i kao vanćelijski signalni molekul (Jackson i Raghvendra, 2004).

Kao što je već napomenuto, cAMP-PRKA signalni put u **Lajdigovim ćelijama** vrši akutnu ili hroničnu stimulaciju steroidogeneze, u zavisnosti od toga da li fosforiliše već postojeće proteine unutar ćelije uključene u ovaj proces ili dovodi do aktivacije transkripcionih faktora koji će indukovati transkripciju specifičnih gena. Ovaj signalni put u velikoj meri ima uticaj na druge signalne molekule/puteve, koji se zatim uključuju u regulaciju procesa steroidogeneze. PRKA može da interaguje sa Ras proteinom, nakon čega se aktivira MAPK signalizacija (Manna i sar., 2007) koji ima sposobnost modifikacije biosinteze steroida putem fosforilacije StAR proteina (Brion i sar., 2011; Poderoso i sar., 2009) ili promovisanja transkripcije *Star* gena (Brion i sar., 2011). Pored toga, PRKA preko regulacije voltažno-zavisnih  $Ca^{2+}$  kanala obezbeđuje povišen nivo  $Ca^{2+}$  u ćeliji. Kako je  $Ca^{2+}$  uključen u pozitivnu regulaciju steroidogeneze, nedostatak ovih jona utiče na smanjen nivo ekspimiranja gena za StAR i SF1, te tako i posledično smanjenu produkciju steroida (Manna i sar., 1999).

## **1.2. Biološki efekti anaboličkih androgenih steroida – primena i zloupotreba**

T i DHT predstavljaju muške polne hormone koji regulišu različite fiziološke procese posredstvom androgenih i/ili anaboličkih efekata. Najznačajniji androgeni efekti podrazumevaju razvoj hipotalamusa mužjaka, održavanje sekundarnih polnih karakteristika mužjaka, inicijaciju i odvijanje spermatogeneze, uvećan libido, stimulisano lučenje lojnih žlezda i nastanak akni (Pope i sar., 2014). Zahvaljujući anaboličkom efektu, ovi hormoni obezbeđuju normalan rast i razvoj usled stimulanog anabolizma proteina, povećanog mitotičkog indeksa mišićnih ćelija i kostnog matriksa, kao i deponovanja  $Ca^{2+}$  (Kicman, 2008).

Imajući u vidu navedene činjenice, u cilju terapije je razvijen niz polusintetskih derivata, anaboličkih androgenih steroida (AAS) (Graham i sar., 2008), koji se mogu primenjivati oralno, injektovati intramuskularno ili koristiti u formi gelova i krema (Kadi, 2008). To su relativno srodne strukture, derivati androstana ili samog T. Anabolički androgeni se primenjuju kao supstituciona terapija androgenima kod zakasnele pojave puberteta kod dečaka, u cilju razvoja sekundarnih polnih karakteristika, kao i kod muškaraca koji boluju od hipogonadizma, a mogu biti korišćeni i

u kontracepciji. Terapija AAS se dodatno primenjuje nakon velikih hirurških zahvata koji predstavljaju značajan stres za organizam, kao i kod pacijanata sa uznapredovalom infekcijom HIV, kod kojih se javlja gubitak mišićne mase. Takođe se koriste, mada sve ređe, za indukovanje rasta kod dece sa poremećajima rasta, kao i za stimulaciju kostne srži (Clark i Henderson, 2003).

S obzirom na to da egzogeno uneti androgeni utiču na povećanje telesne i mišićne mase, oni predstavljaju predmet zloupotrebe, najčešće od strane rekreativnih i profesionalnih sportista, bodibildera, adolescenata, kao i mnogih drugih u cilju poboljšanja fizičkog izgleda i performansi (Imperlini i sar., 2015). Upotreba različitih supstanci u cilju poboljšanja fizičkih sposobnosti sportista datira još iz vremena stare Grčke i prvih održanih Olimpijskih igara, kada su sportisti konzumirali različite ekstrakte biljnog i životinjskog porekla (Basaria i sar., 2010). Uvaženi francuski fiziolog, Brown-Sequard, je 1889. godine sebi aplicirao ekstrakt testisa životinjskog porekla, nakon čega je uvideo da isti može poboljšati libido i mišićnu snagu. T je po prvi put izolovan i okarakterisan 1935. godine od strane dve grupe autora, nakon čega su sintetisani brojni derivati ovog hormona nazvani zajedničkim imenom AAS (Graham i sar., 2008; Kanayama i sar., 2010). Smatra se da je zloupotreba AAS započeta 1952. godine od strane nemačkih veslača, odnosno, 1954. godine od strane ruskih dizača tegova. AAS su se 1974. godine našli na listi zabranjenih supstanci koju je propisao Internacionalni Olimpijski Komitet i do današnjih dana predstavljaju najčešće zloupotrebljavane supstance među profesionalnim i rekreativnim sportistima (Basaria i sar., 2010; Graham i sar., 2008; Kicman, 2008).

Do danas je opisan velik broj različitih AAS koji se međusobno razlikuju po svojoj hemijskoj strukturi, načinu metabolisanja i fiziološkim efektima koje izazivaju. Kao i endogeno produkovani androgeni, sastavljeni su od četiri prstena sa devetnaest C atoma, ali sa tom razlikom što su pretrpeli određene modifikacije koje podrazumevaju dodavanje etil, metil, hidroksi ili benzil grupa, koje im omogućavaju duži poluživot i veću anaboličku efikasnost (Clark i Henderson, 2003; Graham i sar., 2008). Najčešće modifikacije oralno primenjivanih AAS podrazumevaju dodavanje metil ili etil grupe na  $17\alpha$ -OH poziciji, kako bi nastali  $17\alpha$ -alkilovani AAS, čija je razgradnja u jetri značajno smanjena. AAS koji se intramuskularno aplikuju rastvoreni u ulju u formi depoa, najčešće bivaju esterifikovani na mestu  $17\beta$ -OH, kako bi se tokom vremena sporije otpuštali u cirkulaciju (Clark i Henderson, 2003; Kicman, 2008).

AAS se mogu zloupotrebljavati na direktan ili indirektan način. Njihova direktna zloupotreba podrazumeva egzogenu administraciju prirodnih i sintetskih androgena, dok se indirektna zloupotreba bazira na primeni supstanci koje dovode do povećane endogene produkcije T, tj. predstavljaju antagoniste estrogenog receptora, inhibitore enzima aromataze, prekursore androgena (DHEA, androstendiona) i gonadotropina (Basaria i sar., 2010).

AAS svoje efekte najčešće ispoljavaju vezivanjem za AR, ali i za progesteronske i estrogene receptore, koji dalje interaguju sa brojnim koregulatorima, regulišući konačno transkripciju ciljanih gena. Od negenomskih efekata, najbolje su proučeni efekti posredovani GABA<sub>A</sub> receptorom nakon vezivanja AAS najverovatnije za steroid-vezujuće mesto, kao i oni posredovani SHBG receptorom (*engl. Sex-hormone-binding globuline receptor, SHBG-R*) (Clark i Henderson, 2003; Kicman, 2008). Takođe, pokazano je da AAS modulišu ekspimiranje AR (Clark i Henderson, 2003). Naime, zabeležen je povećan nivo *Ar* gena nakon jednomesečnog tretmana T. Međutim, postoje podaci koji ukazuju na to da se nivo *Ar* gena vraća na početnu vrednost nakon šest meseci primene T, što može predstavljati mehanizam kojim se održava konstantan broj AR (Kadi, 2008).

Pretpostavlja se da su potencijalni zdravstveni rizici upotrebe AAS u neterapeutske svrhe izuzetno visoki, posebno ukoliko se primenjuju dugotrajno i u visokim dozama (Barone i sar., 2017; Basaria i sar., 2001; Basaria, 2010; Bhasin, 2010). Zbog androgenog dejstva, njihova primena može dovesti do niza neželjenih posledica poput smanjenja koncentracije T, inhibicije sekrecije gonadotropnih hormona, supresije spermatogeneze, ginekomastije i dr. (Barone i sar., 2017; Basaria i sar., 2010; Imperlini i sar., 2015). AAS najčešće svoje efekte ispoljavaju na nivou velikog mozga, hipotalamusa i hipofize koji ekspimiraju visok nivo steroidnih receptora, i u skladu sa tim, uzrokuju agresivno ponašanje, anksioznost, smanjenu mogućnost opažanja/spoznaje i remete reproduktivnu funkciju (Clark i Henderson, 2003). Kako egzogeno uneti AAS vrše supresiju HPG osovine, vrlo često se kod muškaraca nakon dugoročne zloupotrebe AAS razvija hipogonadizam. Za ponovno uspostavljanje normalne funkcije HPG osovine neophodno je da prođe nekoliko nedelja do godinu dana. Hipogonadizam indukovani AAS može dovesti do seksualne disfunkcije i steriliteta (Kanayama i sar., 2010).

Neželjena dejstva koja se mogu javiti usled zloupotrebe AAS zavise od pola, primenjene doze, vremena tokom koga traje zloupotreba i genetskih faktora. Doza i vreme tokom koga se AAS

zloupotrebljavaju su izuzetno varijabilni, ali su primenjivane doze uglavnom deset do sto puta veće u odnosu na fiziološku koncentraciju androgena, a prosečan fiziološki nivo T+DHT u serumu muškarca iznosi 10 nM (Imperlino i sar., 2015).

Brojne studije su pokazale da AAS izazivaju zavisnost. Mogući faktor rizika za nastanak zavisnosti može biti depresivno stanje koje se javlja kao posledica hipogonadizma, koji se razvija nakon prestanka konzumiranja AAS (Kanayama i sar., 2010). AAS predstavljaju treću najčešće konzumiranu grupu jedinjenja od strane dece u Velikoj Britaniji, odmah iza kanabisa i amfetamina (Graham i sar., 2008). Takođe, različite studije su pokazale da čak 5% srednjoškolaca i 50% profesionalnih bodibildera zloupotrebljava AAS (Kicman, 2008). AAS su uvršteni na listu 19 zabranjenih droga, zajedno sa heroinom, kokainom, ekstazijem i kanabisom (van Amsterdam i sar., 2010).

## **2. Ciljevi istraživanja**



S obzirom na značaj T za reprodukciju i produženje vrste, ali i zdravlje i kvalitet života individue, kao i široku primenu i zloupotrebu T i njegovih derivata, neophodno je okarakterisati precizne molekulske događaje nastale kao posledica poremećene homeostaze T. Ovo je važno zbog toga što, prema trenutno dostupnoj literaturi, ne postoji dovoljan broj podataka o funkcionalnosti i obrascima signalnih puteva Lajdigovih ćelija, čija je osnovna uloga sinteza i sekrecija T.

Stoga je glavni cilj ovog istraživanja bio da ispita funkcionalnost i obrasce signalnih puteva važnih za održavanje steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija, narušene primenom egzogenih agonista i/ili antagonista T u *in vivo* ili *in vitro* uslovima. U tu svrhu je primenjen derivat ovog hormona - TE, koji se najčešće upotrebljava u kliničkoj praksi, ali se i u najvećoj meri zloupotrebljava i najprodavaniji je na tzv. "crnom" tj. ilegalnom tržištu. Ovakav model daje mehanistički pristup, ali ima i translacioni aspekt, s obzirom na to da su upotrebljavane doze/koncentracije T koje se koriste u kliničkoj praksi ili se zloupotrebljavaju. Shodno tome, postavljeni su specifični ciljevi istraživanja:

**(1) Ispitati efekte kratkoročne i dugoročne sistemske *in vivo* primene najčešće upotrebljavanog i zloupotrebljavanog AAS - TE, na steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija odraslih pacova, kao i obrazac ekspresije elemenata cAMP-PRKA signalnog puta, kao glavnog regulatora procesa steroidogeneze. Praćeni su sledeći parametri:**

- Nivo androgena i LH u cirkulaciji, kao potvrda uspešnosti tretmana i validnosti modela.
- *Ex vivo* produkcija androgenih hormona i cAMP, relativna ekspresija *Ins13* gena i vrednost membranskog potencijala mitohondrija u Lajdigovim ćelijama, kao biomarkeri funkcionalnosti Lajdigovih ćelija.
- Relativna ekspresija gena za transportere holesterola, steroidogene enzime, regulatorne transkripcione proteine i druge signalne molekule, važne za regulaciju procesa biosinteze T u Lajdigovim ćelijama.
- Ekspresija elemenata cAMP-PRKA signalne kaskade u Lajdigovim ćelijama.

**(2) Ispitati ulogu AR u efektima T, primenom blokatora za ove receptore u *in vivo* (Androkur, A) ili *in vitro* (ciproteron-acetat, CPA) uslovima. Praćeni su sledeći parametri:**

- Nivo androgena i LH u cirkulaciji, kao potvrda uspešnosti tretmana i validnosti modela.
- Zapremina TIF, nivo androgenih hormona i cAMP u TIF i nivo androgena u tkivu testisa, kao parametri endokrine funkcionalnosti tkiva testisa.
- *Ex vivo* produkcija androgenih hormona i cAMP, relativna ekspresija *Insl3* gena, vrednost membranskog potencijala mitohondrija i steroidogeni kapacitet i aktivnost Lajdigovih ćelija, kao parametri funkcionalnosti ovih ćelija.
- Ekspresija transportera holesterola, steroidogenih enzima, regulatornih transkripcionih proteina i drugih signalnih molekula, važnih za regulaciju procesa biosinteze T u Lajdigovim ćelijama.
- Ekspresija elemenata cAMP-PRKA signalizacije u Lajdigovim ćelijama.

### **3. Materijal i metode**

Svi ogledi su izvedeni u Laboratoriji za reproduktivnu endokrinologiju i signaling (<https://www.dbe.uns.ac.rs/en/nauka-eng/lares>), Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i odobreni su od lokalnog Etičkog komiteta Univerziteta u Novom Sadu (brojevi odobrenja: I-2011-02, III-2011-04).

### **3.1. Hemikalije**

Zečiji antiserum za StAR protein je velikodušni poklon profesora Douglas M. Stocco (Clark i sar., 1994) i Dale B. Hales (Hales i sar., 2000), dok je prečišćeno zečije poliklonsko antitelo za HSD3B velikodušni poklon profesora Ian Masson (Bain i sar., 1991; Abbaszade i sar., 1997). Antitela koja specifično prepoznaju ACTIN (kataloški br. sc-1616), AR (kataloški br. sc-816), ADCY3 (kataloški br. sc-588), ADCY5/6 (kataloški br. sc-590) i ADCY9 (kataloški br. sc-8578) su nabavljena od kompanije Santa Cruz Biotechnology ([www.scbt.com](http://www.scbt.com)). Antitela specifična za PRKAC (kataloški br. 610980) i PRKAR1 (kataloški br. 610165) kupljena su od kompanije BD Transduction Laboratory ([www.translab.com](http://www.translab.com)). Zečije poliklonsko antitelo specifično za AR (kataloški br. ab3510) kupljeno je od kompanije Abcam ([www.abcam.com](http://www.abcam.com)), dok je ACTIN detekcioni komplet, koji se sastoji od mišijeg monoklonskog antitela specifičnog za ACTIN i kozijeg anti-mišijeg IgM antitela konjugovanog sa peroksidazom rena, kupljen od Oncogene Research Product ([www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)). Anti-mišije, anti-zečije i anti-kozije sekundarno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena kupljena su od Kirkegaard & Pery Labs ([www.kpl.com](http://www.kpl.com)).

Anti-testosteron-11-BSA serum No. 250 dobijen je ljubaznošću Gordon D. Niswender (Colorado State University, Fort Collins, CO). Komercijalni RIA komplet za luteinizirajući hormon (LH (Rat) RIA) nabavljen je od Alpco Diagnostics ([www.alpco.com](http://www.alpco.com)), dok su standard i specifično antitelo za LH esej nabavljeni od Dr A. F. Parlow (The National Pituitary Agency, Harbor UCLA Medical Center, Torrance, CA). (1,2,6,7<sup>3</sup>H(N))-testosteron i <sup>125</sup>I-LH kupljeni od Perkin-Elmer Life Sciences ([www.PerkinElmer.com](http://www.PerkinElmer.com)). Dekstran T-70 je nabavljen od Pharmacia ([www.pfizer.com](http://www.pfizer.com)), a aktivni ugalj Norit A od Serva ([www.serva.de](http://www.serva.de)).

Komercijalni cAMP EIA komplet kupljen je od Cayman Chemicals ([www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)).

RNeasy kit za izolaciju ukupne RNK kupljen je od kompanije Qiagen ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)), a Superscript III kit za reverznu transkripciju od kompanije ThermoFisher Scientific ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Hemikalije korišćene za RQ-PCR metodu (*engl.* Power SYBR® Green PCR Master Mix) kupljene su od Applied Biosystems ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)). Prajmeri za RQ-PCR reakcije nabavljeni su od kompanije Integrated DNA Technologies ([www.dnatechnologies.com](http://www.dnatechnologies.com)).

Hemikalije korišćene za određivanje koncentracije proteina i SDS-PAGE elektroforezu, akrilamid/bis-akrilamid, N, N, N', N'-tetrametiletlen-diamin (TEMED), amonijum persulfat, Trizma base, SDS (*engl.* Sodium dodecyl sulfate), glicin, fosforna kiselina i boja za proteine (*engl.* **C**ommassie **b**riliant **b**lue G – CBB) kupljene su od Sigma Aldrich kompanije ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)), dok je pufer za pripremu uzoraka za SDS elektroforezu (*engl.* SDS protein gel loading solution) kupljen od Quality biological Inc. ([www.qualitybiological.com](http://www.qualitybiological.com)). U sastav pufera za liziranje ćelija su ušli HEPES, etilendiamintetra-acetatna kiselina (EDTA), ditiotritol (DTT), β-glicerofosfat, tergitol (*engl.* Niaproof, type 4), inhibitori proteaza kao što su aprotinin i leupeptin, koji su naručeni od Sigma Aldrich, dok su 4-(aminoetil)-benzensulfonil fluorid hidro-hlorid (AEBSF) i set koktel inhibitora fosfataza poručeni od kompanije Calbiochem ([www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)). Supstrati za detekciju koji su korišćeni u Western blot analizi (*engl.* SuperSignal west dura chemiluminescent substrate i SuperSignal west femto chemiluminescent substrate) su kupljeni od PIERCE ([www.piercenet.com](http://www.piercenet.com)).

Medijum M199 (*engl.* Medium M199 with earle's salts and L-glutamine), medijum DMEM/F12 (*engl.* DMEM/nutrient mixture F-12 ham with L-glutamine), goveđi serum albumin (*engl.* **B**ovine **s**erum **a**lbumin, BSA, frakcija V), kolagenaza (*engl.* Collagenase, type IA from *Clostridium histolyticum*), 0.4% rastvor tripan plavog (*engl.* Trypan blue), perkol, sekundarno antitelo za LH esej, agaroz, holesterol (HOL), progesteron (PROG), pregnenolon (PREG), Δ4-androstendion (Δ4-AND), T i ciproteron-acetat (CPA) su kupljeni od Sigma Aldrich. Testosteron depo (testosteron-enantat, TE, 250 mg/ml, 5x1 ml), streptomycin i penicilin su kupljeni od ICN Galenika ([www.galenika.rs](http://www.galenika.rs)). Humani horionski gonadotropin (hCG) je nabavljen od kompanije Organon ([www.organon.co.uk](http://www.organon.co.uk)), tetrametilrodamin etilestar (TMRE) od kompanije Fluka ([www.fluka.com](http://www.fluka.com)), dok je Androkur depo (A, 300 mg rastvoreno u ulju, 3x3 ml) kupljen od Bayer Schering Pharma ([www.pharma.bayer.com](http://www.pharma.bayer.com)). Maslinovo i ricinusovo ulje su poručeni od Pharma Vera

([www.pharmavera.rs](http://www.pharmavera.rs)), a etidijum-bromid od Invitrogen. Ostale hemikalije su bile analitičke čistoće.

### **3.2. Eksperimentalne životinje**

U eksperimentalnom radu su korišćeni odrasli mušjaci belih pacova soja *Wistar*, starosti 90–120 dana i telesne mase 250–300 g. Životinje su uzgajane u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju (registarski br. 16), Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Životinje su uzgajane u standardnim laboratorijskim uslovima kontrolisanog osvetljenja (12 h svetlo/12 h mrak, pri čemu je svetlo uključivano ujutru u 7h) i temperature ( $22\pm 2$  °C). Hranjene su standardnom briketiranom laboratorijskom hranom za pacove (Veterinarski zavod, Subotica), a vodu su uzimale po potrebi (*ad libitum*).

Svi eksperimenti su odobreni od strane lokalnog Etičkog komiteta za zaštitu životinja koje se koriste u eksperimentalne svrhe na Univerzitetu u Novom Sadu (brojevi odobrenja: I-2011-02, III-2011-04), i u skladu su sa uputstvom o gajenju, čuvanju i upotrebi laboratorijskih životinja Nacionalnih instituta za zdravlje u SAD (*NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, NIH Publications No. 80 23, revised 1996, 7<sup>th</sup> edition).

### **3.3. Eksperimentalni modeli**

U cilju ispitivanja signalnih molekula i puteva važnih za funkcionisanje Lajdigovih ćelija u prisustvu egzogenih AAS, izvedena su dva *in vivo* i jedan *in vitro* eksperimentalni model:

- (1) Eksperimentalni model androgenizacije eksperimentalnih životinja intramuskularnom aplikacijom testosteron-enantata u dozno- i vremenski- zavisnom maniru.
- (2) Eksperimentalni model sistemske blokade androgenih receptora intramuskularnom aplikacijom Androkura (u dozi koja se klinički primenjuje) zasebno i u kombinaciji s TE (u dozi koja se klinički primenjuje).
- (3) *In vitro* blokada androgenih receptora u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija.

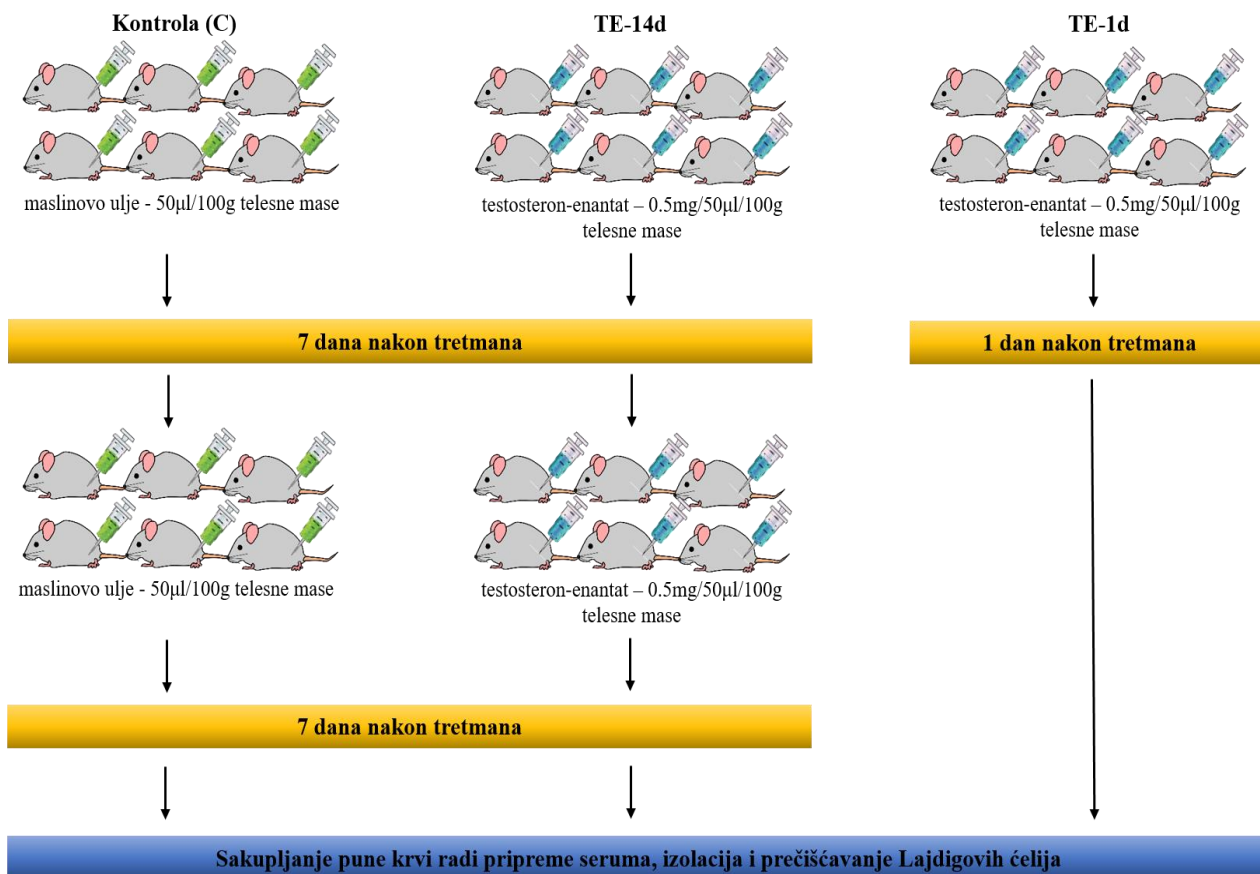
Svi eksperimentalni modeli su opisani u radovima objavljenim u časopisima međunarodnog značaja (Andric i sar., 2010; Janjic i sar., 2012; Kostic i sar., 2011).

### **3.3.1. Eksperimentalni model androgenizacije intramuskularnom aplikacijom testosteron-enantata u dozno- i vremenski- zavisnom maniru**

Androgenizacija eksperimentalnih životinja je izvršena tako što su životinje jednom nedeljno tretirane intramuskularnom injekcijom rastvora TE u maslinovom ulju. Izvedena su dva eksperimentalna pristupa: I) vremenski-zavisni i II) dozno-zavisni.

U prvom eksperimentalnom pristupu, odrasli mužjaci pacova podeljeni su u tri grupe od po šest jedinki: 1) kontrolna grupa (C) je primala samo maslinovo ulje (50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase); 2) grupu TE-1d su činile jedinke kojima je intramuskularno injektovan rastvor TE (0,5 mg/ 50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase) 24 h pre žrtvovanja; 3) grupu TE-14d su činile jedinke koje su tretirane sa dve doze rastvora TE (0,5 mg/ 50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase), 14 i 7 dana pre žrtvovanja (Slika 3.1). Eksperimenti sa orhidektomisanim makaki majmunima (*Cynomolgus macaques*) pokazali su da je minimalno sedam dana potrebno za potpuno iskorišćenje prethodno unetog egzogenog T (Weinbauer i sar., 1990). S obzirom na to da su raniji ogledi pokazali da intramuskularna aplikacija ulja ne utiče na nivo T u cirkulaciji, korišćena je jedna kontrolna grupa koja je jednom nedeljno, u toku dve nedelje, tretirana maslinovim uljem. Eksperiment je ponavljen tri puta.

**Androgenizacija odraslih mužjaka pacova aplikacijom testosteron-enantata (TE) u vremenski-zavisnom maniru**

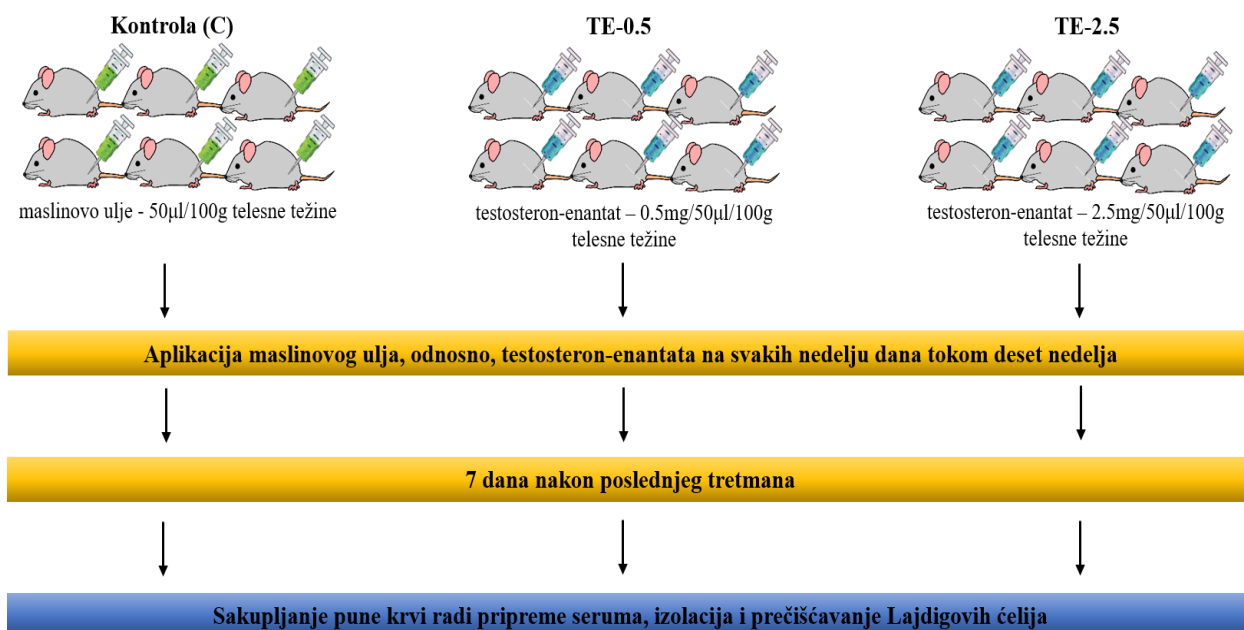


**Slika 3.1.** Šematski prikaz eksperimenta androgenizacije pacova u vremenski-zavisnom maniru

U drugom eksperimentalnom pristupu, odrasli mužjaci pacova intramuskularno su tretirani rastvorom TE, jednom nedeljno tokom deset nedelja, ali sa dve različite doze: prva doza je bila ista kao i u prethodnom pristupu (0,5 mg/ 50 µl/ 100 g telesne mase), dok je druga doza bila pet puta veća (2,5 mg/ 50 µl/ 100 g telesne mase). Eksperimentalne životinje su podeljene u tri grupe od po šest jedinki: 1) kontrolna grupa (C) je jednom nedeljno, tokom deset nedelja, primala maslinovo ulje (50 µl/ 100 g telesne mase); 2) grupa TE-0,5 je jednom nedeljno, tokom deset nedelja, primala manje koncentracije rastvora TE (0,5 mg/ 50 µl/ 100 g telesne mase); 3) grupa TE-2,5 je tretirana jednom nedeljno, tokom deset nedelja, rastvorom veće koncentracije TE (2,5 mg/ 50 µl/ 100 g telesne mase). Vremenski razmak između apliciranja maslinovog ulja, odnosno rastvora TE, iznosio je sedam dana, pri čemu je poslednji tretman sproveden sedam dana pre žrtvovanja (Slika 3.2). Eksperiment je ponovljen tri puta.



### **Androgenizacija odraslih mužjaka pacova aplikacijom testosteron-enantata (TE) u dozno-zavisnom maniru**



**Slika 3.2.** Šematski prikaz eksperimenta androgenizacije pacova u dozno-zavisnom maniru

Nakon tretmana, kontrolna i eksperimentalne grupe životinja su žrtvovane dakapitovanjem, bez primene anestezije i sakupljana je puna krv za pripremu uzoraka seruma. Individualni uzorci seruma skladišteni su na temperaturi od -80 °C do trenutka merenja nivoa androgena (T+DHT) i LH radioimunološkom analizom (RIA).

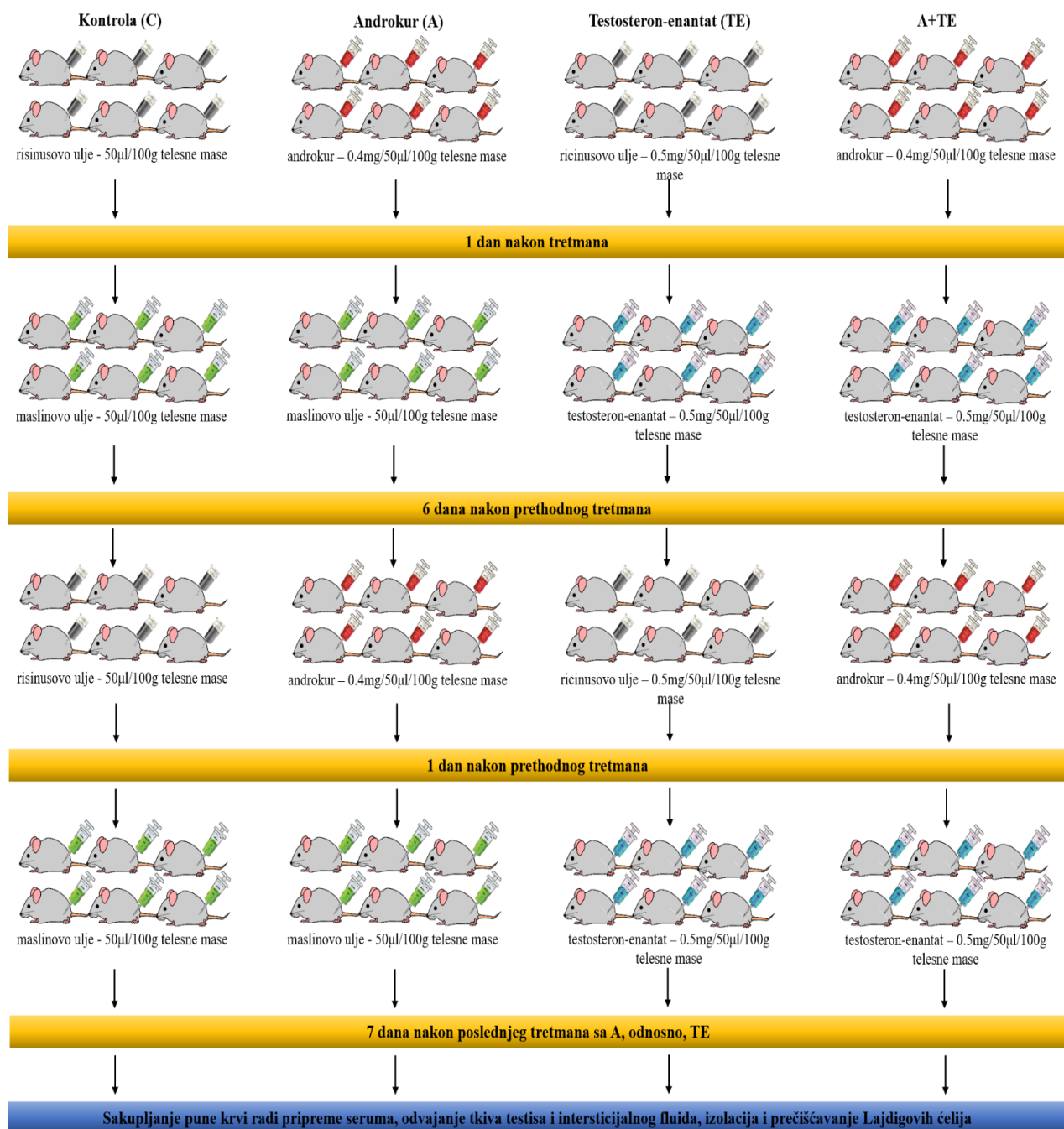
### **3.3.2. Eksperimentalni model sistemske blokade androgenih receptora intramuskularnom aplikacijom Androkura zasebno i u kombinaciji sa testosteron-enantatom**

U cilju sistemske blokade AR, adultnim mužjacima pacova je jednom nedeljno tokom dve nedelje, intramuskularno injektovan Androkur (A), potentni antagonist AR, prethodno rastvoren u ricinusovom ulju. Kako bi se ustanovilo da li se efekti T na ispitivane signalne molekule i parametre funkcionalnosti Lajdigovih ćelija ostvaruju preko AR, životinje su A tretirane u kombinaciji sa TE ili bez njega. Eksperimentalne životinje su podeljene u četiri grupe od po šest jedinki, a zbog različitih farmakoloških osobina i farmakokinetike A i TE, tretman se odvijao tokom dva uzastopna dana: 1) kontrolna grupa (C) je prvog dana intramuskularno primila

ricinusovo ulje (50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase), a drugog dana maslinovo ulje (50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase), pri čemu je tretman ponovljen nakon nedelju dana u istom maniru; 2) grupa A je prvog dana tretirana intramuskularnom injekcijom A (0,4 mg/ 50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase), a drugog dana maslinovim uljem (50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase) i takođe je tretman ponovljen nakon nedelju dana u istom maniru; 3) grupa TE je predstavljala androgenizovane životinje koje su tretirane jedan dan sa TE (0,5 mg/ 50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase), a sutradan sa 50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase ricinusovog ulja, i sve je ponovljeno nakon nedelju dana; 4) A+TE grupa je prvog dana tretirana intramuskularnom injekcijom A (0,4 mg/ 50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase), a zatim sutradan, intramuskularnom injekcijom TE (0,5 mg/ 50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase). Na isti način, tretman je ponovljen nakon nedelju dana. Životinje su žrtvovane nedelju dana nakon poslednje injekcije kod svih eksperimentalnih grupa (Slika 3.3). Eksperiment je ponovljen pet puta.

Nakon tretmana, kontrolna i eksperimentalne grupe životinja su žrtvovane dekapitovanjem, bez primene anestezije i sakupljana je puna krv za pripremu uzoraka seruma. Individualni uzorci seruma skladišteni su na temperaturi od -80 °C do trenutka merenja nivoa T+DHT i LH radioimunološkom analizom (RIA).

**Sistemska blokada androgenih receptora odraslih mužjaka pacova aplikacijom Androkura (A) zasebno i u kombinaciji s TE**



**Slika 3.3. Šematski prikaz eksperimenta sistemske blokade AR kod pacova zasebno i u kombinaciji sa TE**

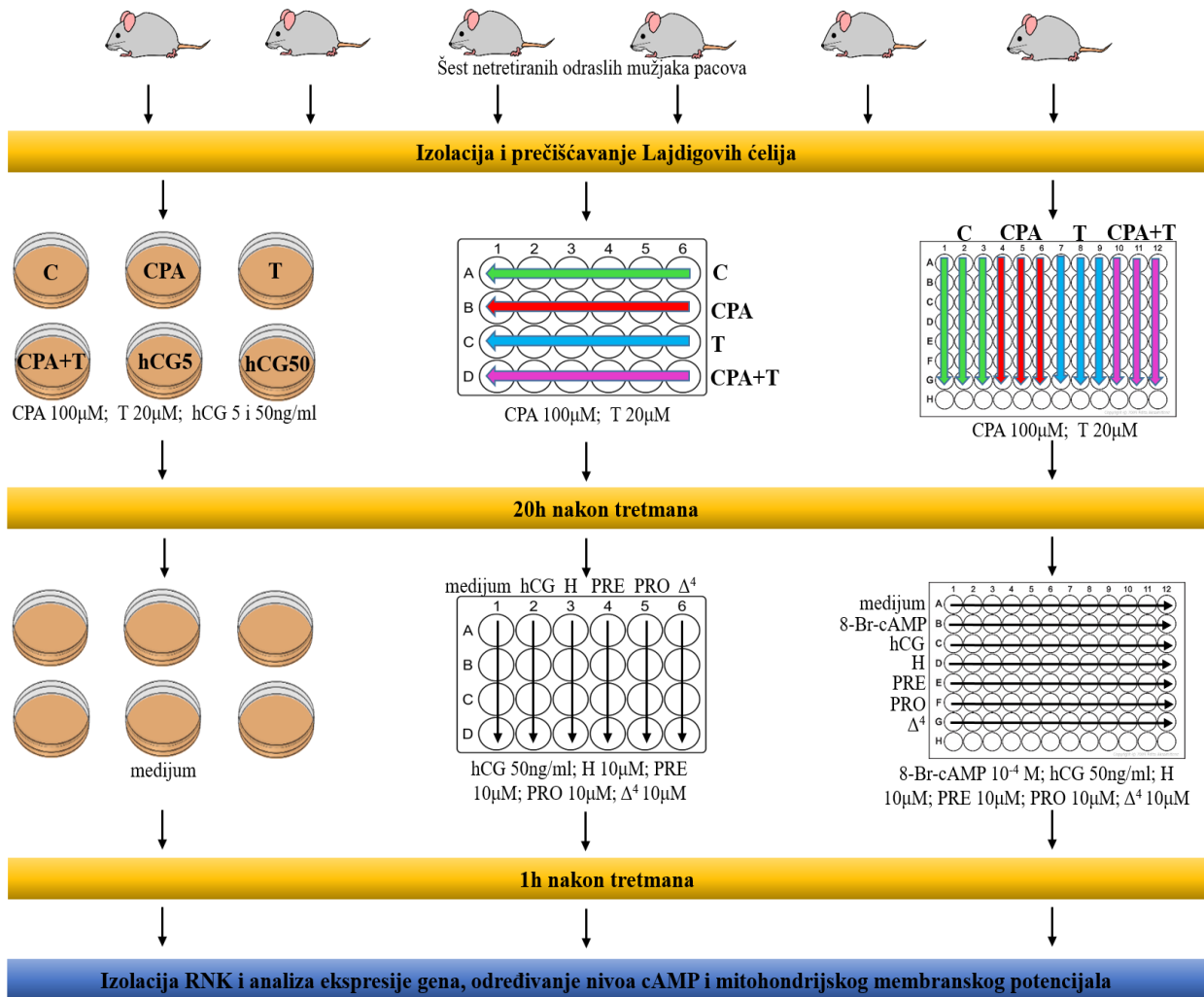
### **3.3.3. *In vitro* blokada androgenih receptora u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija**

Primarna kultura Lajdigovih ćelija dobijena je od šest netretiranih odraslih mužjaka pacova, nakon čega su zasađene u: 1) Petri ploče prečnika 55 mm ( $2 \times 10^6$  Lajdigovih ćelija/ploči) u cilju ispitivanja relativne ekspresije gena RQ-PCR metodom; 2) mikrotitar ploče sa 24 rupice (*engl.* well) ( $0,5 \times 10^6$  Lajdigovih ćelija/rupici) zbog određivanja koncentracije cAMP u ćelijskom sadržaju; 3) crne mikrotitar ploče sa 96 rupica ( $1 \times 10^5$  Lajdigovih ćelija/rupici) zbog praćenja mitohondrijskog membranskog potencijala. Ćelije su tretirane steroidnim blokatorom AR – ciproteron-acetatom (CPA, 100  $\mu$ M) ili sa T (20  $\mu$ M), odnosno njihovom kombinacijom (CPA+T) ili hCG (5 i 50 ng/ml) tokom 20 h. Po isteku inkubacionog perioda, ćelije su isprane i dodatno inkubirane 1 h u svežem DMEM/F12 medijumu ili medijumu sa dodatkom 8-Br-cAMP ( $10^{-4}$  M) ili hCG (50 ng/ml) ili u prisustvu različitih steroidnih supstrata (holesterol 10  $\mu$ M – HOL, pregnenolon 10  $\mu$ M – PREG, progesteron 10  $\mu$ M – PROG i  $\Delta^4$  androstendion 10  $\mu$ M –  $\Delta^4$  AND) (Slika 3.4). Eksperiment je ponovljen tri do pet puta.

### **3.4. Priprema intersticijske tečnosti tkiva testisa**

Sakupljanje i priprema intersticijske tečnosti testisa (TIF) su izvršeni po ranije opisanom postupku (Janjic i sar., 2012; Stojkov i sar., 2014). Ukratko, nakon dekapitovanja životinja po isteku tretmana, testisi kontrolnih i tretiranih životinja su izolovani i oslobođeni kapsule i glavnog krvnog suda. Postavljeni su na najlonske mrežice (Falcon, Mesh No. 100) ([www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)), prethodno pričvršćene za epruvete od 50 ml (jedan testis po epruveti), i centrifugirani na 100 g tokom 7 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon izdvajanja TIF, zabeležena je njegova zapremina, a sadržaj je čuvan na  $-80$  °C do trenutka određivanja nivoa T+DHT (RIA metodom) i cAMP (EIA metodom).

**Direktna *in vitro* blokada androgenih receptora primenom CPA zasebno i u kombinaciji s T u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija**



Slika 3.4. Šematski prikaz *in vitro* eksperimenta blokade AR zasebno i u kombinaciji sa T u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija

### 3.5. Ekstrakcija steroida iz tkiva testisa

Pre i nakon prikupljanja TIF, odvajani su komadići tkiva testisa i zamrzavani u suvom ledu, dok je preostali deo tkiva korišćen za izolaciju Lajdigovih ćelija. Za ekstrakciju steroida zamrznuto tkivo je izmereno i homogenizovano u odgovarajućoj zapremini 1xPBS pufera (1:5 w/v) prema ranije opisanoj proceduri (Qamar i sar., 2010) uz manje modifikacije (Janjic i sar., 2012; Stojkov i sar., 2014). Proces ekstrakcije izvođen je u tri ciklusa mešanja homogenata sa tri puta većom zapreminom etra, zamrzavanja u suvom ledu, a potom odlivanja nezamrznute etarske frakcije u

druge epruvete. Etarski ekstrakt je uparavan, nakon čega su suvi ekstrakti resuspendovani u 200 µl osnovnog pufera koji se koristi za određivanje nivoa T+DHT RIA metodom.

### **3.6. Izolacija i priprema primarne kulture Lajdigovih ćelija**

Priprema preparata primarne kulture Lajdigovih ćelija vršena je iz suspenzije intersticijskih ćelija, koja je dobijena prema proceduri Anakwe i sar. (1985) uz određene modifikacije. Nakon odvajanja TIF i komadića tkiva testisa, ostatak tkiva testisa je stavljan u epruvete zapremine 50 ml (2 testisa/epruveti). U svaku epruvetu je prethodno dodavano 3 ml medijuma M199, obogaćenog sa 20 mM HEPES, 1,2 mg/ml kolagenaze i 1,5% BSA i pH vrednosti 7,4. Ovako pripremljen preparat je inkubiran 15 min na 34 °C u vodenom kupatilu pri oscilacijama od 120 ciklusa/min. Reakcija enzimskog razlaganja vezivnog tkiva prekidana je dodavanjem 20 ml hladnog medijuma M199 obogaćenog sa 0,5% BSA. Nakon toga je vršeno odvajanje seminiferne tubula od intersticijuma testisa filtriranjem kroz najlonsku mrežicu (Mesh No.100) u dve epruvete zapremine 12 ml, koje su potom centrifugirane 5 minuta na 160 g. U cilju uklanjanja eventualno zaostale kolagenaze, talog je ispiran sa 12 ml M199-0,5% BSA, a zatim centrifugiran 5 minuta na 160 g. Istaložene intersticijske ćelije su resuspendovane u 4 ml medijuma DMEM/F12/testisu. Na ovaj način je dobijena suspenzija intersticijskih ćelija, odnosno gruba suspenzija Lajdigovih ćelija, jer osim 15–20% Lajdigovih ćelija, sadrži i ostale tipove ćelija intersticijuma testisa, kao što su makrofage, ćelije endotela, peritubulne mioidne ćelije, germinativne ćelije, eritrociti i leukociti (Klinefelter i sar., 1987). Test tripan plavog (*engl.* Trypan blue exclusion) korišćen je za određivanje vijabilnosti i ukupnog broja živih ćelija u suspenziji. Metoda je zasnovana na principu da žive ćelije ne apsorbuju boju (0,2% rastvor tripan plavog), dok se mrtve boje usled prodora boje unutar ćelije zbog oštećene ćelijske membrane. Postupak je izvođen mešanjem 50 µl suspenzije intersticijskih ćelija i 50 µl 0,4% rastvora tripan plavog, nakon čega su u A kvadratima Neubauer-ove komore izbrojane ćelije. Prosečna vrednost vijabilnosti tokom ovih eksperimenata prevazilazila je 95%.

Nakon brojanja intersticijskih ćelija, vršen je proces izdvajanja Lajdigovih ćelija iz suspenzije intersticijskih ćelija. Postupak je zasnovan na principu gradijentnog centrifugiranja, tokom koga se Lajdigove ćelije pozicioniraju u sloju koji najviše odgovara njihovoj specifičnoj gustini.

Receptura za pripremu rastvora perkola različitih gustina (predstavljena u zapremini preračunatoj za pet životinja) prikazana je u Tabeli 3.1.

**Tabela 3.1. Prikaz pripreme i sastav perkolnih rastvora različitih specifičnih gustina**

SPECIFIČNA GUSTINA (g/ml)	3% BSA-10xM199 (ml)	PERKOL (ml)	DESTILOVANA VODA (ml)
1,045	2	6,031	11,969
1,065	2	9,108	8,892
1,080	2	1,415	6,582
1,090	2	12,954	5,046

Sterilni rastvori perkola različite gustine naslojavani su u zapremini od po 2 ml u plastičnim epruvetama zapremine 12 ml. Naslojavanje rastvora započinjano je od rastvora perkola najveće gustine (1,090), redom po opadajućoj vrednosti gustina, sve do rastvora najmanje gustine (1,045). Nakon toga, na vrh kolona nanošeno je po 4 ml suspenzije intersticijskih ćelija ( $35-40 \times 10^6$  ćelija/koloni). Epruvete sa ćelijama na gradijentima perkola centrifugirane su 28 minuta na 1100 g, na sobnoj temperaturi. Izdvajanje Lajdigovih ćelija uočeno je u međufazama slojeva 1,065/1,080 i 1,045/1,065 perkolnog gradijenta. Ove frakcije sakupljane su u epruvete zapremine 50 ml, koje su dopunjavane medijumom M199-0,1% BSA do 50 ml kako bi se ćelije isprale od perkola, a zatim je vršeno centrifugiranje 5 minuta na 200 g. Talog je resuspendovan u 2,5 ml DMEM/F12 medijuma/testisu. Broj i vijabilnost Lajdigovih ćelija određivani su po opisanoj proceduri upotrebom testa tripan plavog. Proporcija Lajdigovih ćelija prisutnih u kulturi određivana je ispitivanjem aktivnosti HSD3B enzima (Payne i sar., 1980). Pripremljena suspenzija sadržala je  $96,7 \pm 1,9\%$  Lajdigovih ćelija vijabilnosti preko 90%.

Prečišćene Lajdigove ćelije sakupljane su u okviru grupe, a zatim sađene u 90 mm Petri ploče za kulturu ćelija, u gustini  $5 \times 10^6$  Lajdigovih ćelija/ploči u 5 ml medijuma DMEM/F12, u 55 mm Petri ploče u gustini  $3 \times 10^6$  Lajdigovih ćelija/ploči u 3 ml medijuma DMEM/F12, kao i u mikrotitar ploče sa 96 rupica u gustini  $5 \times 10^4$  Lajdigovih ćelija/rupica u 200  $\mu$ l medijuma DMEM/F12. U okviru svakog eksperimenta sađeno je 3-5 serija svakog pula/grupe, odnosno u 8 rupica, ukoliko se radi o mikrotitar pločama, nakon čega su ploče ostavljane 3 h na 34 °C u CO<sub>2</sub> inkubatoru, kako

bi se zalepile za podlogu, oporavile od procesa izolacije i uspostavile normalnu metaboličku aktivnost.

Nakon perioda oporavka, inkubacioni medijum je menjan svežim sa/bez dodatka određene supstance, zavisno od željenog tretmana, i nastavljena je inkubacija na 34 °C u trajanju od 1 ili 2 h. Po završenoj inkubaciji medijum je sakupljan i zamrzavan na -80 °C da bi se iz njega kasnije odredila koncentracija izlučenih T+DHT. Lajdigove ćelije na pločama su isprane 1xPBS-om i zamrzavane na -80 °C, kako bi poslužile za određivanje nivoa steroida RIA analizom, odnosno cAMP EIA metodom, ili kao izvor RNK za analizu relativne ekspresije gena RQ-PCR metodom, odnosno izvor proteina za analizu Western blotom.

### **3.7. Ekstrakcija steroida iz Lajdigovih ćelija**

Lajdigove ćelije ( $3 \times 10^6$ ) su lizirane sa 200  $\mu$ l 1xPBS rastvora, nakon čega je rađena ekstrakcija steroida prema ranije opisanom protokolu (Qamar i sar., 2010) uz određene modifikacije (Janjic i sar., 2012; Stojkov i sar., 2014). Proces ekstrakcije izvođen je u tri ciklusa mešanja homogenata ćelija sa tri puta većom zapreminom etra, zamrzavanja u suvom ledu, a potom odlivanja nezamrznute etarske frakcije u druge epruvete. Etarski ekstrakt je uparavan, nakon čega su suvi ekstrakti resuspendovani u 200  $\mu$ l osnovnog pufera koji se koristi u RIA postupku prilikom određivanja nivoa T+DHT.

### **3.8. Određivanje koncentracije hormona**

Određivanje koncentracije LH i T+DHT vršeno je RIA analizom, specifičnom za određeni hormon. Svi uzorci u okviru eksperimenta mereni su u duplikatu u jednom radioimunološkom eseju za svaki od navedenih hormona.

Nivo T+DHT u serumu, TIF, tkivu testisa, medijumu i ćelijskom sadržaju određivan je korišćenjem anti-testosteron-11-BSA seruma No. 250 koji specifično prepoznaje i T i DHT. Osetljivost RIA metode za androgene je 6 pg po epruveti (koeficijent varijacije unutar eseja tzv. intra-esejski koeficijent: 5-8%; koeficijent varijacije između eseja tzv. inter-esejski koeficijent: 7,5%). Iako je pokazano da je kod odraslog mužjaka pacova koncentracija cirkulišućeg T skoro 20



puta veća od koncentracije DHT (Punjabi i sar., 1983), rezultati su predstavljeni kao zbirni nivo T+DHT, zbog toga što je pokazano da anti-testosteron-11-BSA serum No. 250 ispoljava 100% unakrsne reaktivnosti sa DHT.

Za određivanje koncentracije LH u serumu korišćen je komercijalni komplet (ALPCO Diagnostic-LH (Rat) RIA) prema uputstvu proizvođača ([www.alpco.com/products/LH\\_Rat\\_RIA.asp](http://www.alpco.com/products/LH_Rat_RIA.asp)). Preciznost je bila 1 ng/ml (intra-esejski koeficijent: 4,2%; inter-esejski koeficijent: 6,8%), dok je minimalna detektovana koncentracija iznosila 0,14 ng/ml. Nivo radioaktivnosti je određivan Wallac-1410 scintilacionim brojačem ([www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)).

### **3.9. Određivanje nivoa cikličnog adenzin-monofosfata**

Količina cAMP u TIF i ćelijskom sadržaju određivana je pomoću komercijalnog cAMP EIA kompleta prema uputstvu proizvođača ([www.caymanchem.com/pdfs/581001.pdf](http://www.caymanchem.com/pdfs/581001.pdf)).

Određivanje nivoa cAMP u ćelijskom sadržaju Lajdigovih ćelija najpre zahteva ekstrakciju cikličnih nukleotida iz sadržaja ovih ćelija, a vršena je korišćenjem ćelija zamrznutih suvim ledom neposredno nakon eksperimenta i čuvanim na -80 °C. Na ćelije je dodavan 100% alkohol (2x0,5 ml na  $1 \times 10^6$  ćelija) ohlađen na temperaturu suvog leda, a potom su ćelije lizirane skidanjem/grebanjem sa ploče (Andric i sar., 2006). Etanolski ekstrakt ćelija uparavan je do suvog, a potom resuspendovan u 1xPBS-0,1% BSA koji je bio obogaćen dodatkom IBMX, neselektivnog inhibitora PDE, u finalnoj koncentraciji od 1mM. Uzorci su čuvani na -80 °C do određivanja cAMP.

Priprema uzoraka i standarda podrazumevao je postupak acetilacije cAMP na 2'OH grupi, čime je 10 puta povećano vezivanje antitela. Standardna inhibiciona kriva za određivanje nivoa cAMP je bila raspona 10–0,78 pmol/ml, tipične  $IC_{50}$  vrednosti 0,5 pmol/ml i limita detekcije 0,1 pmol/ml (pri 80% B/B<sub>0</sub>) za acetilovane uzorke. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 412 nm pomoću fotometra Multiskan EX ([www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com)).

### **3.10. Merenje mitohondrijskog membranskog potencijala u Lajdigovim ćelijama**

Radi merenja mitohondrijskog membranskog potencijala u Lajdigovim ćelijama, korišćen je tetrametilrodamin etil estar (TMRE). TMRE je lipofilna, katjonska fluorofora, koja slobodno prolazi kroz membrane ćelija i organela. Nakon prolaska kroz mitohondrijske membrane, TMRE boja se akumulira unutar mitohondrija, proporcionalno nivou negativnog potencijala u njima (Allen i sar., 2006). Izolovane Lajdigove ćelije kontrolnih i tretiranih pacova sađene su u crne mikrotitarske ploče ( $1 \times 10^5$  Lajdigovih ćelija/200  $\mu$ l/rupici) u osam ponavljanja od svake grupe, nakon čega su 3h ostavljane u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 34 °C, kako bi se zalepile za podlogu i uspostavile normalnu metaboličku aktivnost. Nakon ovog perioda, odbacivan je kultivacioni medijum i ćelije su dodatno inkubirane (20 min/34 °C u CO<sub>2</sub> inkubatoru) u prisustvu TMRE boje rastvorene u medijumu M199-0,1% BSA, prema proceduri opisanoj od strane Allen i sar. (2006). Po isteku inkubacionog perioda, rastvor TMRE boje zamenjivan je rastvorom 1xPBS-0,1% BSA i meren je nivo fluorescencije pomoću fluorimetra Fluoroskan-Ascent FL ([www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com)) sa maksimumom ekscitacije na  $\lambda=550$  nM i maksimumom emisije na  $\lambda=590$  nM.

### **3.11. Analiza transkripcije gena**

Primarna kultura Lajdigovih ćelija i tkivo hipofize, izolovani iz kontrolnih i tretiranih životinja, poslužili su kao izvor ukupne RNK. U reakciji reverzne transkripcije, sintetisana je komplementarna DNK (cDNK), koja je korišćena u PCR analizi. Analiza transkripcije gena sprovedena je relativnom kvantifikacijom produkata Real time PCR reakcije, korišćenjem SYBR Green tehnologije prema uputstvu proizvođača ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

#### **3.11.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija**

Ukupna RNK iz Lajdigovih ćelija i hipofize izolovana je upotrebom komercijalnog kompleta koji sadrži sve komponente i reagense neophodne za izolaciju RNK (RNeasy mini kit Qiagen) po uputstvu proizvođača ([www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=352&r3678](http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=352&r3678)). Specijalizovani puferski sistem obezbeđuje da se 100 ng–2  $\mu$ g RNK, duže od 200 baza, veže za specifičnu silika

gel membranu. Čistoća i koncentracija RNK u uzorcima određivane su spektrofotometrijski (Nanodrop, (<https://www.thermofisher.com>)). Koncentracija je određivana merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 260 nm, dok su čistoća i kvalitet uzoraka RNK dobijeni upoređivanjem odnosa apsorbanci merenim na talasnim dužinama od 260 nm i 280 nm, kao i 260 nm i 230 nm. Odnos  $A_{260}/A_{280}$  kretao se u intervalu od 1,8 do 2, a odnos  $A_{260}/A_{230}$  je iznosio od 2 do 2,1.

U cilju eliminacije zaostale genomske DNK, ukupna RNK tretirana je DNK-zom I, prema uputstvu proizvođača (<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/18068015.pdf>).

Nakon tretmana DNK-zom I, od RNK je, procesom reverzne transkripcije, sintetisana cDNK uz pomoć komercijalnog kompleta Superscript III prema uputstvu proizvođača ([http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/data/Reverse\\_transcription.qwiki](http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/data/Reverse_transcription.qwiki)). Reakcije reverzne transkripcije izvođene su upotrebom 100 ng-2 µg ukupne RNK svakog uzorka, koja je u prisustvu oligo(dT)18 prajmera i Superscript III reverzne transkriptaze prevedena u cDNK. Kvalitet RNK i integritet DNK molekula proveravani su PCR reakcijom, upotrebom prajmera za *Gapdh* i *Rs16*. U reakcijama u kojima je bilo potrebno, analizirane su pozitivna i negativna kontrola. Dobijena cDNK je korišćena za real time PCR analizu.

### **3.11.2. Analiza relativne ekspresije gena klasičnom PCR metodom**

U PCR reakciji ukupne zapremine 15 µl, umnoženo je 2 µl cDNK u prisustvu 0,4 µM specifičnih prajmera, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP i 1,25 U *Taq* polimeraze prema uputstvu proizvođača ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)). Za proveru integriteta cDNK i kao endogena kontrola (gen čija se relativna ekspresija ne menja tretmanom) korišćen je gen za ribozomsku subjedinicu 16, *Rs16*. Produkti PCR reakcije analizirani su na 1% agaroznom gelu, a vizuelizovani sa etidijum bromidom pomoću aparata za digitalnu detekciju signala MyECL Imager.

### **3.11.3. Analiza relativne ekspresije gena real time PCR metodom**

Relativna kvantifikacija ekspresije gena vršena je real time PCR metodom korišćenjem SYBR Green tehnologije prema uputstvu proizvođača ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

Power SYBR Green PCR Master Mix i ROX internalna referentna boja korišćeni su za detekciju amplikona. Real time PCR reakcija izvođena je u standardnim uslovima (50 °C/2 min, 95 °C/ 10 min; i 40 ciklusa, a svaki od 95 °C/15 sek i 60 °C/1 min) korišćenjem aparata ABI Prism 7900HT Fast Real-Time ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) u prisustvu specifičnih prajmera. Prajmeri su dizajnirani upotrebom odgovarajućeg softverskog programa (*engl.* Primer Express 3.0, [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) i genskih sekvenci dostupnih na internet stranici Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (*engl.* National center for biotechnology information, [www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). Sekvence svih prajmera i njihovi kodovi za pristup genskoj banci podataka dati su u tabelama (Tabele 3.2, 3.3, 3.4 i 3.5).

Za proveru integriteta cDNK i kao endogena kontrola korišćeni su *Actb* i/ili *Gapdh*. Kinetika relativne ekspresije gena praćena je korišćenjem softvera ABI Prism 7900HT SDS 2.3 ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) u prisustvu 500 nM direktnog (*engl.* forward, F) i reverznog (*engl.* reverse, R) prajmera i 5 µl cDNK produkta reakcije reverzne transkripcije (12,5 ng RNK po reakciji, preračunato na početnu koncentraciju RNK).

Relativna kvantifikacija gena rađena je u duplikatu, tri puta za svaki gen i dva puta za svaki od nezavisnih eksperimenata korišćenjem programa SDS RQ Manager 1.2 ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

*Gapdh* gen korišćen je za endogenu kontrolu, kao i za korigovanje odstupanja u sadržaju RNK između uzoraka (30 ng uzorka/ulazu). Svaki uzorak rađen je u duplikatu, tri puta za svaki gen, i dva puta za svaki od nezavisnih *in vivo* eksperimenata.

**Tabela 3.2. Sekvence prajmera i pristupni kodovi u banci gena korišćenih u RQ-PCR analizi za gene koji kodiraju elemente steroidogene mašinerije i transkripcione faktore**

Gen	Pristupni kod u banci gena	Sekvence prajmera
<i>Lhcgr</i>	NM_012978	F: 5'-CGGGCTGGAGTCCATTCA-3' R: 5'-TTCTTTGGAGGGCAGTGTTC-3'
<i>Tspo</i>	NM_0125105	F: 5'-TTGGTGCCCGCAGAT-3' R: 5'-TTGCCACCCCACTGACAAG-3'
<i>Star</i>	NM_031558	F: 5'-AGCCAGCAGGAGAATGGAGAT-3' R: 5'-CACCTCCAGTCGGAACACCTT-3'
<i>Cyp11a1</i>	NM_017286	F: 5'-CAACATGGAGTCAGTTTACA-3' R: 5'-GACCCTCGCAGGAGAAGAGA-3'
<i>Hsd3b1/2</i>	NM_001007719 (NM_001042619)	F: 5'-GACAGGAGCAGGAGGGTTTGTGG-3' R: 5'-CTCCTTCTAACATTGTCACCTTGGCCT-3'
<i>Hsd3b5</i>	NM_012584	F: 5'-AACTGGTCTTCAGGTCACCAGAA-3' R: 5'-GTCCCCTGCACCTTGTTC-3'
<i>Cyp17a1</i>	NM_012753	F: 5'-GCCACGGGCGACAGAA-3' R: 5'-GCCTTTGTTGGGAAAATCG-3'
<i>Hsd17b3</i>	NM_054007	F: 5'-AGTGTGTGAGGTTCTCCCGGTACCT-3' R: 5'-TACAACATTGAGTCCATGTCTGGCCAG-3'
<i>Hsd17b4</i>	NM_024392	F: 5'-CCTTTGGCTTTGCCATGAGA-3' R: 5'-CAATCCATCCTGCTCCAACCT-3'
<i>Sf1 (Nr5a1)</i>	NM_001191099	F: 5'-CCGCGGGCATGGACTA-3' R: 5'-TTGTCACCACACACTGGACACA-3'
<i>Dax1 (Nr0b1)</i>	NM_053317	F: 5'-GCCGAGGGCCCCCTGGTGGGAC-3' R: 5'-GATCTGGAAGCAAGGCAAGT-3'
<i>Arr19 (Cmtm2a)</i>	NM_001013142	F: 5'-TGCTGCAATCTCTTGTTC-3' R: 5'-TGTGCCATGATGAAAAGGT-3'
<i>Ar (Nr3c4)</i>	NM_012502	F: 5'-CGGAAATGTTATGAAGCAGGG-3' R: 5'-GGAATCAGGCTGGTTGTTGTC-3'
<i>Esr1 (Nr3a1)</i>	NM_012689	F: 5'-GGGCTTCCCAACACCAT-3' R: 5'-CGTTTCAGGGATTTCGAGAA-3'
<i>Creb1a</i>	NM_134443	F: 5'-CCAACCCGATTTACCAAACCT-3' R: 5'-CCATTGTTAGCCAGCTGTATTGC-3'
<i>Nur77 (Nr4a1)</i>	XM_006242355	F: 5'-GGCATGGTGAAGGAAGTTGT-3' R: 5'-GATTGGTAGGGGAGGCATCT-3'
<i>Gata4</i>	NM_144730	F: 5'-GATGGGACAGGACACTACCTATGC-3' R: 5'-GGCGCTGAGCTTGATGA-3'
<i>Ppargc1a</i>	NM_031347	F: 5'-AGCCGTAGGCCAGGTATGACA-3' R: 5'-TGCTTGCCCTTTCAGACTCCC-3'
<i>Ppargc1b</i>	NM_176075	F: 5'-ACCTTCCGGTGTTCGGAGCATG-3' R: 5'-GTGGAAGGAGGGCTCATTGCGT-3'
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTAGT-3'

Prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) i kompletnih genskih sekvenci iz Banke gena dobijenih preko NCBI Entrez Nucleotide database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). F-direktni prajmer; R-reverzni prajmer.

**Tabela 3.3. Sekvence prajmera i pristupni kodovi u banci gena korišćenih u RQ-PCR analizi za gene koji kodiraju elemente cAMP-PRKA signalnog puta**

Gen	Pristupni kod u banci gena	Sekvence prajmera
<i>Adcy3</i>	NM_130779	F: 5'-GCATCGAAACCTACCTCATCA-3' R: 5'-TGGGCTCCTTGGTCTCAATAA-3'
<i>Adcy5</i>	NM_022600	F: 5'-AACCAGGTGAACGCATGTCA-3' R: 5'-CTCTGGGAAGTTGCAGTTGGA-3'
<i>Adcy6</i>	NM_012821	F: 5'-CTGCCTCAGCCTGCTTATGTG-3' R: 5'-GGAGTCCTGGCGGAAGCT-3'
<i>Adcy7</i>	NM_053396	F: 5'-TTCCGTGCGTGTAACCCGCT-3' R: 5'-GCCTTCTGCCTCCGTCCGTT-3'
<i>Adcy9</i>	NM_001106980	F: 5'-TCACCAAGCTGTACGCCCGG-3' R: 5'-GGGCTGTCAACACGTCCCGA-3'
<i>Adcy10</i>	NM_021684	F: 5'-CCAGGCATCGTGACCTGCGA-3' R: 5'-ACTGGTCCGGGATCCGCAAC-3'
<i>Prkaca</i>	NM_001100922	F: 5'-TCAGTGAGCCCCACGCCCGTT-3' R: 5'-TCTCGGGCTTCAGGTCGCCG-3'
<i>Prkacb</i>	NM_001077645	F: 5'-GGGTCATGGGGAACACGGCG-3' R: 5'-CCAGCATTACTCGGGGAGGGT-3'
<i>Prkar1a</i>	NM_013181	F: 5'-TGTGCTGCAGCGTCGGTCAG-3' R: 5'-AGTGGCAGCCCGAGGACGAT-3'
<i>Prkar2a</i>	NM_019264	F: 5'-GCCCCACCTCGTCTGACTTCG-3' R: 5'-TCCTGCGCGTGAAAGGTCGT-3'
<i>Prkar2b</i>	NM_001030020	F: 5'-CCCATGCGCTCCGATTCCGA-3' R: 5'-GCACATACCGAGGCACGCCT-3'
<i>Pde4a</i>	NM_013101	F: 5'-CGGGAGCGTGGAATGG-3' R: 5'-GATGAAGCCCACCTGAGACTTC-3'
<i>Pde4b</i>	NM_017031	F: 5'-AGGCCTGCACAAAACAAAGG-3' R: 5'-CCTTGCATTCTGGCTCCAAA-3'
<i>Pde4d</i>	NM_001113328	F: 5'-GCTACCTGTACTGCCGTGCCAT-3' R: 5'-AAGACGAGGGCCAGGACATCCT-3'
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'

Prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) i kompletnih genskih sekvenci iz Banke gena dobijenih preko NCBI Entrez Nucleotide database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). F-direktni prajmer; R-reverzni prajmer.

**Tabela 3.4. Sekvence prajmera i pristupni kodovi u banci gena korišćenih u RQ-PCR analizi za gene koji kodiraju LH, prolaktin i njihove receptore**

Gen	Pristupni kod u banci gena	Sekvence prajmera
<i>Lhb</i>	NM_012858.2 (NM_001033975.1)	F: 5'-TCTTCTGATGCCCACTCA-3' R: 5'-TATTGGGAGGGATGGTTAGAACA-3'
<i>Cga</i>	NM_053918.2	F: 5'-CAGTGTATGGGCTGTTGCTTCT-3' R: 5'-GGAACCAACATTGTCTTCTTGGGA-3'
<i>Prl</i>	NM_012629.1	F: 5'-CATCAATGACTGCCCCACTTC-3' R: 5'-CCAAACTGAGGATCAGGTTCAAA-3'

<i>Prlr1</i>	NM_001034111.1	F: 5'-CTGGGCAGTGGCTTTGAAG-3' R: 5'-CCAAGGCACTCAGCAGCTCT-3'
<i>Prlr2</i>	NM_012630.1	F: 5'-CTGGGCAGTGGCTTTGAAG-3' R: 5'-AAGGGCCAGGTACAGATCCA-3'
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'

Prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) i kompletnih genskih sekvenci iz Banke gena dobijenih preko NCBI Entrez Nucleotide database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). F-direktni prajmer; R-reverzni prajmer.

**Tabela 3.5. Sekvence prajmera i pristupni kodovi u banci gena korišćenih u RQ-PCR analizi za gene koji kodiraju elemente JAK-STAT signalnog puta**

Gen	Pristupni kod u banci gena	Sekvence prajmera
<i>Jak1</i>	NM_053466.1	F: 5'-CTGGGCTCTCGGCAATATGT-3' R: 5'-CCGATCTTCACTTGGTGTTCAC-3'
<i>Jak2</i>	NM_031514.1	F: 5'- GTGGAGGAGACAAGCCTCTGAGT-3' R: 5'-TGCTGGGAGCTGGTGCTTAT-3'
<i>Jak3</i>	NM_012855.2	F: 5'-AGTGAGGCGCATGTGAAGATT-3' R: 5'-TCGCGGACCACGTAGTAGTCT-3'
<i>Tyk2</i>	NM_001257347.1	F: 5'-TTCGACTGTGAACTCGGACTCA-3' R: 5'-CCAAATCCCGGATCCTTTTC-3'
<i>Stat5a</i>	NM_017064.1	F: 5'-ACCGAAACCTGTGGAATCTG-3' R: 5'-GCATTGACAACTCAGGGAC-3'
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'

Prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) i kompletnih genskih sekvenci iz Banke gena dobijenih preko NCBI Entrez Nucleotide database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). F-direktni prajmer; R-reverzni prajmer.

### 3.12. Analiza proteina u uzorcima

#### 3.12.1. Priprema uzoraka Lajdigovih ćelija za analizu proteina

Izvor proteina bile su Lajdigove ćelije primarne kulture ( $5 \times 10^6$  Lc/ploči) izolovane iz kontrolnih i tretiranih pacova. Ćelije su nakon inkubacije isprane u hladnom 1xPBS rastvoru i lizirane u 0,5 ml pufera za liziranje (20 mM HEPES, 10 mM EDTA, 40 mM  $\beta$ -glicerofosfat, 1% tergitol, 2,5 mM MgCl, 1 mM ditiotritol, 0,5 mM AEBSF, 20  $\mu$ g/ml aprotinin, 20  $\mu$ g/ml leupeptin, koktel inhibitora fosfataza (0,05 mM (-)-P-bromotetramizol oksalat, 10  $\mu$ M kantaridin i 10 nM mikrocistinLR; pH 7,5)).

Koncentracija ukupnih proteina određivana je kolorimetrijski, pomoću Bradford-ove metode (Bradford, 1976) upotrebom tzv. Bradford reagensa (50 mg Commasie Brilliant Blue G-250 (CBB),

25 ml 95% etanol, 50 ml 85% fosforne kiseline u 500 ml destilovane vode). Metoda se zasniva na vezivanju CBB boje za bazne i aromatične ostatke aminokiselina u proteinima pri čemu se maksimum apsorpcije pomera sa 465 nm na 595 nm i proporcionalan je količini vezane boje. Izračunavanje koncentracije proteina u uzorku vršeno je na osnovu standardne krive raspona 0,4-3 µg proteina/50 µl, upotrebom BSA proteinskog standarda. Nakon određivanja koncentracije proteina u uzorcima iz kontrolnih i eksperimentalnih grupa, vršeno je ujednačavanje koncentracije proteina između grupa.

Uzorci ujednačenih koncentracija proteina pripremani su za lodiranje na gelove za SDS-PAGE.

### **3.12.2. SDS-PAGE i Western blot**

SDS-PAGE (sodijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza) je tehnika za razdvajanje denaturisanih proteina prema njihovoj relativnoj molekulskoj masi. Priprema uzoraka za lodiranje na gelove za SDS-PAGE izvođena je mešanjem jednakih zapremina ćelijskog lizata i SDS-PAGE pufera za pripremu uzoraka, nakon čega je smeša podvrgavana kujanju od 5 min na 100 °C, a zatim i centrifugiranju 3 min pri brzini od 10000 g.

Ovako pripremljeni proteini lizata Lajdigovih ćelija razdvajani su jednodimenzionom SDS-PAGE, u kontinuiranom puferskom sistemu, upotrebom 12% gelova. Elektroforeza je vršena u aparaturi Mini – PROTEAN 3 Cell (BIORAD), pri naponu od 100 V i trajanju od oko 2 h.

Po završenoj elektroforezi vršen je prenos proteina sa gela na poliviniliden difluorid (PVDF) membranu (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) metodom mokrog transfera (elektroblotting) prema uputstvu proizvođača, pri naponu od 40 V i temperaturi 4 °C, preko noći ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/surelock\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/surelock_man.pdf)). Kvalitet transfera proveravan je bojenjem gelova u rastvoru Commassie Blue R-250 boje.

Po završenom transferu, blokiranje nespecifičnih mesta na membrani vršeno je njenom inkubacijom u 3% rastvoru BSA u TBS (*engl. Tris buffer saline*) puferu sa 0,1% Tween-om, 2 h na sobnoj temperaturi.



Nakon toga, membrana je inkubirana najpre sa antitelom specifičnim za ispitivani protein (4 °C preko noći), a zatim sa sekundarnim antitelom obeleženim peroksidazom rena (sobna temperatura/1 h). Između svakog od ovih koraka usledile su serije ispiranja membrane u TBS puferu sa 0,1% Tween. Imunoreaktivne trake uzoraka detektovane su upotrebom rastvora sa luminolom (Pierce, Rockford, IL, USA). Emitovana hemiluminiscencija detektovana je upotrebom aparata za digitalnu detekciju signala MyECL Imager.

Optička gustina dobijenih imunoreaktivnih traka ispitivanih proteina, analizirana je upotrebom programa Image J (verzija 1.32; <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

### **3.13. Statistička analiza**

Statistička analiza podataka vršena je korišćenjem statističkog softverskog paketa "Statistica 10". Za *in vivo* eksperimente rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ispitivanih eksperimentalnih grupa  $\pm$  SEM individualnih varijacija iz tri do pet nezavisnih ponavljanja (šest životinja/grupi/eksperimentu). Za *ex vivo* i *in vitro* merenja rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM iz tri do pet nezavisnih ponavljanja. Rezultati svakog eksperimenta analizirani su Mann-Whitney neparametarskim testom (za eksperimente sa dva ispitivana eksperimentalna podatka), dok je za poređenja među eksperimentalnim grupama korišćena one-way ANOVA, praćena Post-hoc analizom primenom Student-Newman-Keuls testa. Za sve statističke analize kao kriterijum statističke značajnosti razlika uzimana je granica verovatnoće  $p < 0,05$ .

Linearne korelacije su računane upotrebom softverskog programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA; <https://www.graphpad.com>).

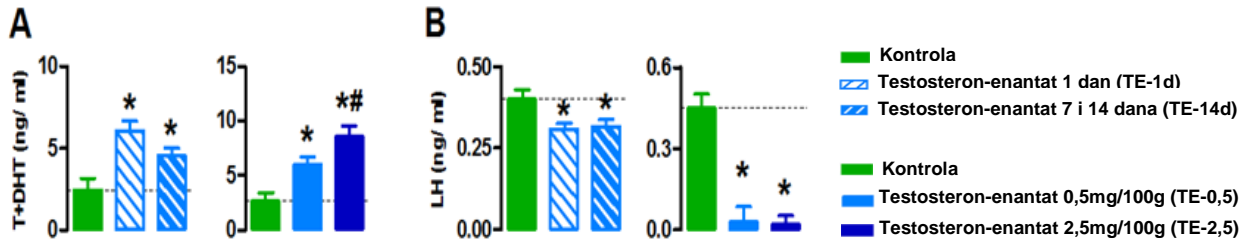
## **4. Rezultati**

#### **4.1. Steroidogena funkcija Lajdigovih ćelija pacova i obrazac ekspresije elemenata cAMP-PRKA signalnog puta menjaju se nakon *in vivo* primene testosteron-enantata**

S obzirom na to da nema objavljenih podataka o molekulskim obrascima funkcionisanja Lajdigovih ćelija tokom narušene homeostaze androgena, dizajnirani su *in vivo* eksperimentalni modeli. Primenom TE, najčešće upotrebljavanog i zloupotrebljavanog AAS, ispitan je efekat T na steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija i obrazac ekspresije elemenata cAMP-PRKA signalne kaskade, dominantne signalizacije uključene u regulaciju procesa steroidogeneze. Odrasli mužjaci pacova *in vivo* su tretirani intramuskularnim injekcijama T u formi TE (0,5mg/100g telesne mase) u vremenski-zavisnom maniru 1 dan (TE-1d), kao i 7 i 14 dana pre žrtvovanja (TE-14d), kao i u dozno-zavisnom maniru sa dve različite doze TE svakih sedam dana tokom deset nedelja (TE-0,5 i TE-2,5). Opisani tretmani sprovedeni su u cilju analize efekata tretmana na funkcionalnost Lajdigovih ćelija, kao i na relativnu ekspresiju gena za elemente steroidogene mašinerije, transkripcione faktore i komponente cAMP-PRKA signalnog puta.

##### **4.1.1. Efekat testosteron-enantata na nivo androgena i luteinizirajućeg hormona u krvi**

Kao što je i očekivano, intramuskularnom aplikacijom TE (0,5 mg/100g telesne mase) u vremenski-zavisnom maniru 24h (TE-1d) i 7 i 14 dana (TE-14d) pre žrtvovanja, kao i u dozno-zavisnom maniru TE svakih sedam dana tokom deset nedelja (TE-0,5 i TE-2,5), značajno je povišen nivo androgena T+DHT u svim eksperimentalnim grupama (Slika 4.1.A), a smanjen nivo LH (Slika 4.1.B) u serumu. Povišen nivo T+DHT je rezultat egzogeno unetog i endogeno produkovanog T, dok snižen nivo LH reflektuje efekat negativne povratne sprege visokih koncentracija T na produkciju LH, čime je potvrđeno da su životinje reagovalе na primenjeni tretman.



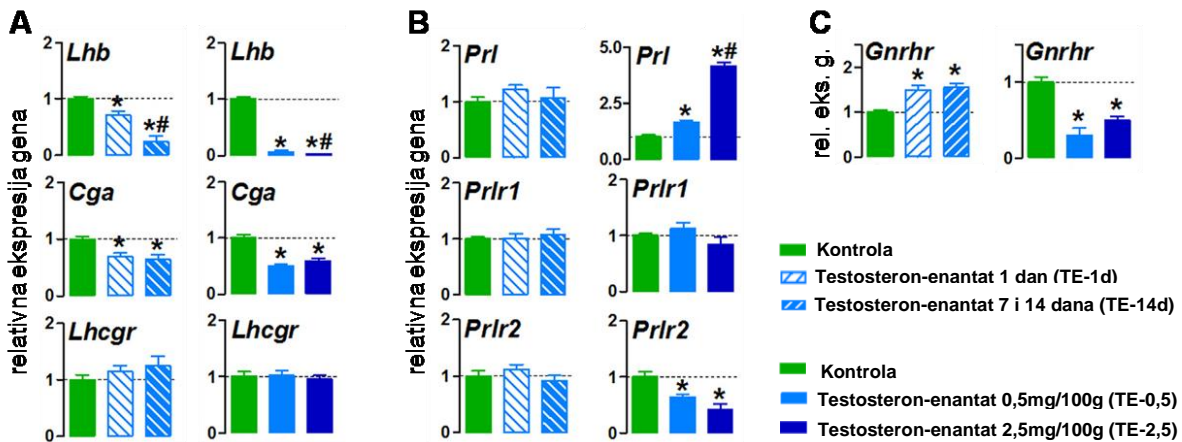
**Slika 4.1. Efekat TE na nivo T+DHT i LH u serumu.**

Životinje su tretirane intramuskularnim injekcijama TE (0,5 mg/100g telesne mase) tokom jednog dana (TE-1d) i jedan put nedeljno tokom dve nedelje (TE-14d), odnosno, jedan put nedeljno tokom deset nedelja dozama od 0,5 mg/100g telesne mase (TE-0,5) i 2,5 mg/100g telesne mase (TE-2,5) i dekapitovane nakon jednog dana, odnosno, nedelju dana nakon poslednje injekcije. Kontrolna grupa je tokom dve ili deset nedelja intramuskularno primala maslinovo ulje. Sakupljana je puna krv radi određivanja koncentracije T+DHT (A) i LH (B) u serumu RIA metodom.

Stubič predstavljaju srednju vrednost  $\pm$ SEM iz tri nezavisna eksperimenta ( $n=6$  životinja po grupi i eksperimentu). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou  $p<0,05$  u odnosu na adekvatnu kontrolnu grupu, odnosno tarabom (#) u odnosu na TE-0,5.

#### 4.1.2. Dugoročni tretman testosteron-enantatom moduliše relativnu ekspresiju gena za luteinizirajući hormon i prolaktin, kao i njihove receptore u hipofizi

Promenom sekrecije androgenih hormona i LH u cirkulaciju potvrđena je uspešnost sprovedenog tretmana, te je nakon toga, u cilju dodatne potvrde o uspešnosti tretmana, ispitivana relativna ekspresija gena za LH. Kod pacova svih eksperimentalnih grupa tretiranih sa TE značajno je bio snižen nivo relativne ekspresije gena za LHB ( $\beta$  subjedinice LH) i CGA (zajedničke  $\alpha$  subjedinice svih hipofiznih glikoproteinskih hormona) u tkivu hipofize (Slika 4.2.A). Desetonedeljni tretmani sa TE (TE-0,5 i TE-2,5) drastično su smanjili relativnu ekspresiju *Lhb* u hipofizi, ali tretman većom dozom TE imao je još izraženiji efekat u odnosu na TE-0,5. U istim uzorcima pokazano je da je relativna ekspresija gena za prolaktin (*Prl* gena) bila značajno povišena i, kao i u slučaju *Lhb*, izraženiji je bio efekat TE-2,5 u odnosu na TE-0,5 (Slika 4.2.B). Pored toga, ekspresija *Prlr2* (gena za prolaktinski receptor 2) bila je smanjena u Lajdigovim ćelijama tretiranih sa TE-0,5 i TE-2,5 (Slika 4.2.B), dok je nivo relativne ekspresije gena za PRLR1 i LHCGR (Slika 4.2.A) ostao nepromenjen. Tretman TE tokom jednog dana i jednom nedeljno tokom dve nedelje značajno je povećao nivo *Gnrhr* gena u hipofizi, dok je TE-2,5 tretman jednom nedeljno tokom deset nedelja smanjio nivo *Gnrhr* gena (Slika 4.2.C).



**Slika 4.2. Efekat TE na relativnu ekspresiju gena za LH, PRL, njihove receptore i GnRHR u hipofizi.**

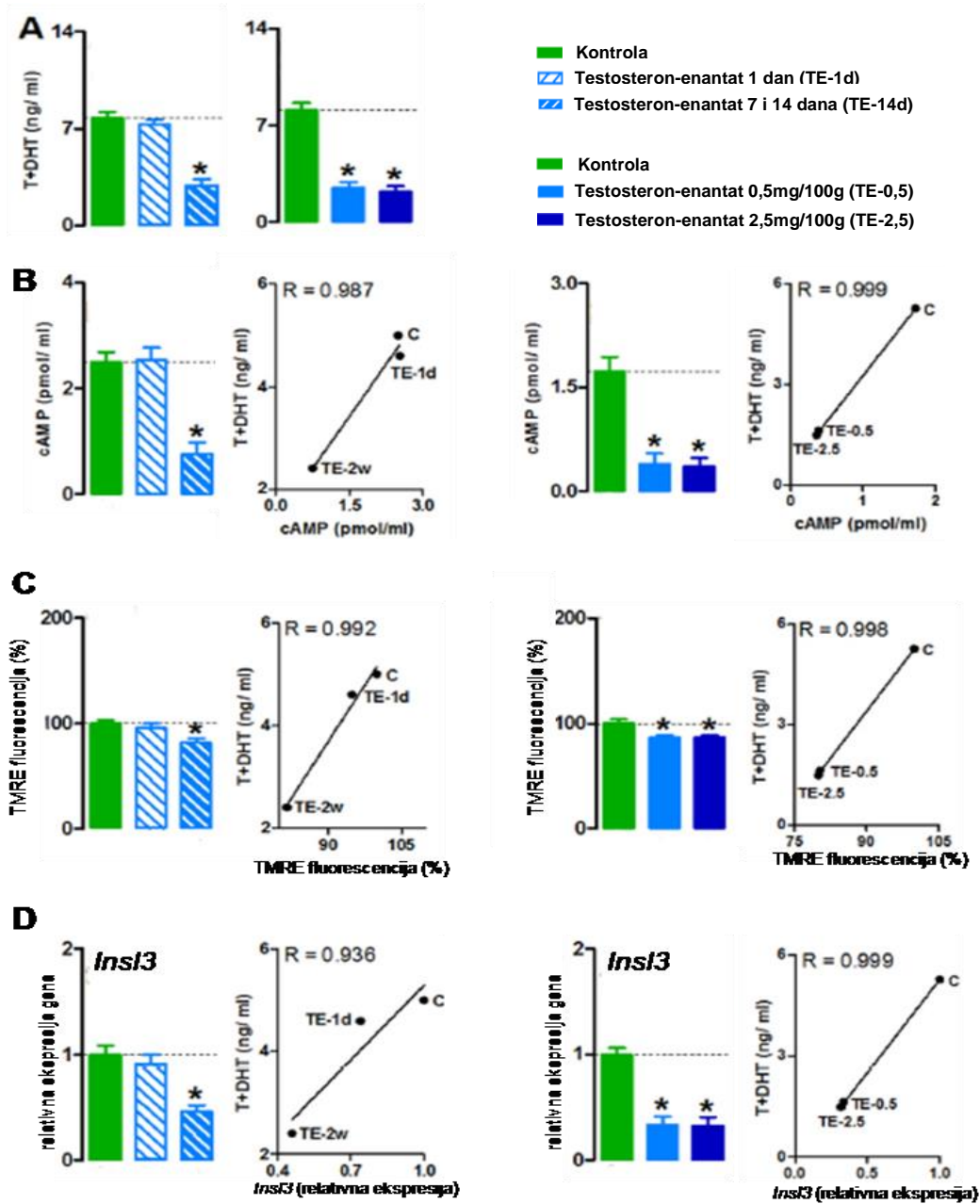
Životinje su tretirane intramuskularnim injekcijama TE (0,5 mg/100g telesne mase) tokom jednog dana (TE-1d) i jedan put nedeljno tokom dve nedelje (TE-14d), odnosno, jedan put nedeljno tokom deset nedelja dozama od 0,5 mg/100g telesne mase (TE-0,5) i 2,5 mg/100g telesne mase (TE-2,5) i dekapitovane nakon jednog dana, odnosno, nedelju dana nakon poslednje injekcije. Kontrolna grupa je tokom dve ili deset nedelja intramuskularno primala maslinovo ulje. Izolovane hipofize su homogenizovane i upotrebljivane za analizu relativne ekspresije gena upotrebom SYBR Green tehnologije.

Stubići predstavljaju srednju vrednost  $\pm$ SEM iz tri nezavisna eksperimenta ( $n=6$  životinja po grupi i eksperimentu). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou  $p<0,05$  u odnosu na adekvatnu kontrolnu grupu, odnosno tarabom (#) u odnosu na TE-14d ili TE-0,5.

#### 4.1.3. Dugoročni tretman testosteron-enantatom umanjuje funkcionalnost Lajdigovih ćelija

Nakon potvrde o uspešnosti sprovedenog tretmana, u nastavku je ispitivana funkcionalnost Lajdigovih ćelija koja se ogleda u njihovoj sposobnosti da *ex vivo* proizvode androgene hormone i cAMP (dominantni regulator steroidogeneze), kao i u promenama mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\Delta\Psi_m$ ) i nivoa relativne ekspresije *Insl3* (Slika 4.3.). Značajno snižena produkcija T+DHT (Slika 4.3.A) i cAMP (Slika 4.3.B), kao i snižen  $\Delta\Psi_m$  (Slika 4.3.C) i nivo relativne ekspresije gena za INSL3 (Slika 4.3.D) u Lajdigovim ćelijama zabeleženi su nakon tretmana TE jedan put nedeljno tokom dve nedelje (TE-14d), pri čemu je uočena pozitivna linearna korelacija između nivoa cAMP ( $R=0,987$ ),  $\Delta\Psi_m$  ( $R=0,992$ ) i *Insl3* ( $R=0,936$ ) i produkcije T+DHT (Slika 4.3.B-D). Takođe, i u slučaju tretmana TE sa dve doze jednom nedeljno tokom deset nedelja (TE-0,5 i TE-2,5) detektovana je smanjena produkcija T+DHT (Slika 4.3.A) i cAMP (Slika 4.3.B),  $\Delta\Psi_m$  (Slika 4.3.C) i nivo *Insl3* (Slika 4.3.D), kao i pozitivna linearna korelacija između nivoa cAMP ( $R=0,999$ ),  $\Delta\Psi_m$  ( $R=0,998$ ) i *Insl3* ( $R=0,999$ ) i produkcije T+DHT (Slika 4.3.B-D).

Prikazane pozitivne korelacije između markera funkcionalnosti Lajdigovih ćelija ukazuju na narušenu sposobnost ovih ćelija da produkuju T u prisustvu TE.



**Slika 4.3. Efekat TE na produkciju T+DHT i cAMP, nivo  $\Delta\Psi_m$  i relativnu ekspresiju *Ins13* u Lajdigovim ćelijama.**

Primarna kultura Lajdigovih ćelija ( $1 \times 10^6$  ćelija/ml medijuma) je tokom 2h na temperaturi od 34 °C bila inkubirana u medijumu. Po isteku inkubacionog perioda, ćelijski sadržaj je upotrebljavan za određivanje nivoa T+DHT (A) RIA metodom, cAMP (B) EIA metodom,  $\Delta\Psi_m$  (C) upotrebom TMRE boje i analizu relativne ekspresije *Ins13* gena upotrebom SYBR Green tehnologije.

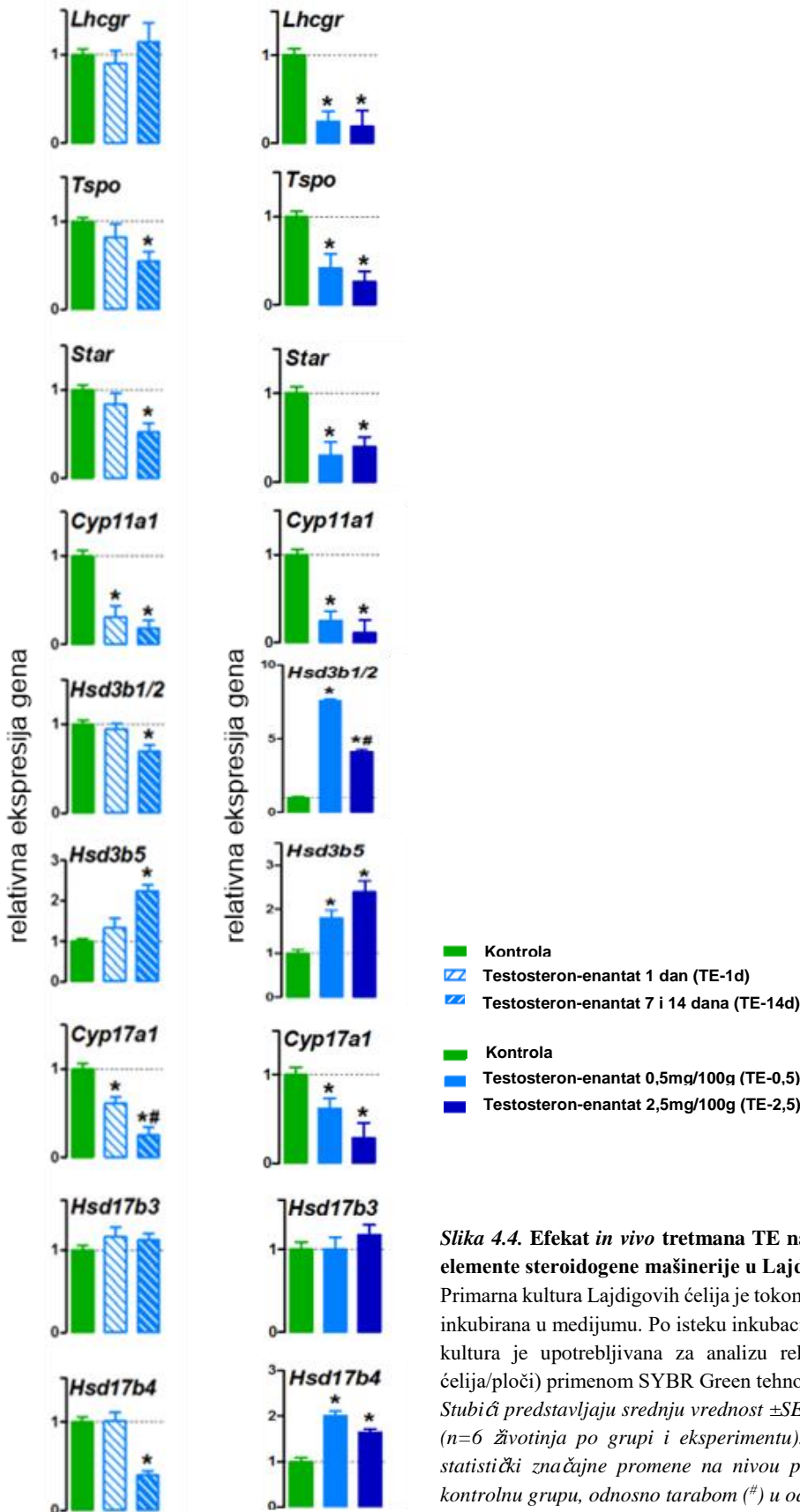
Stubi č predstavljaju srednju vrednost  $\pm$ SEM iz tri nezavisna eksperimenta ( $n=6$  životinja po grupi i eksperimentu). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou  $p < 0,05$  u odnosu na adekvatnu kontrolnu grupu.

#### **4.1.4. Tretman testosteron-enantatom menja relativnu ekspresiju gena za elemente steroidogene mašinerije Lajdigovih ćelija**

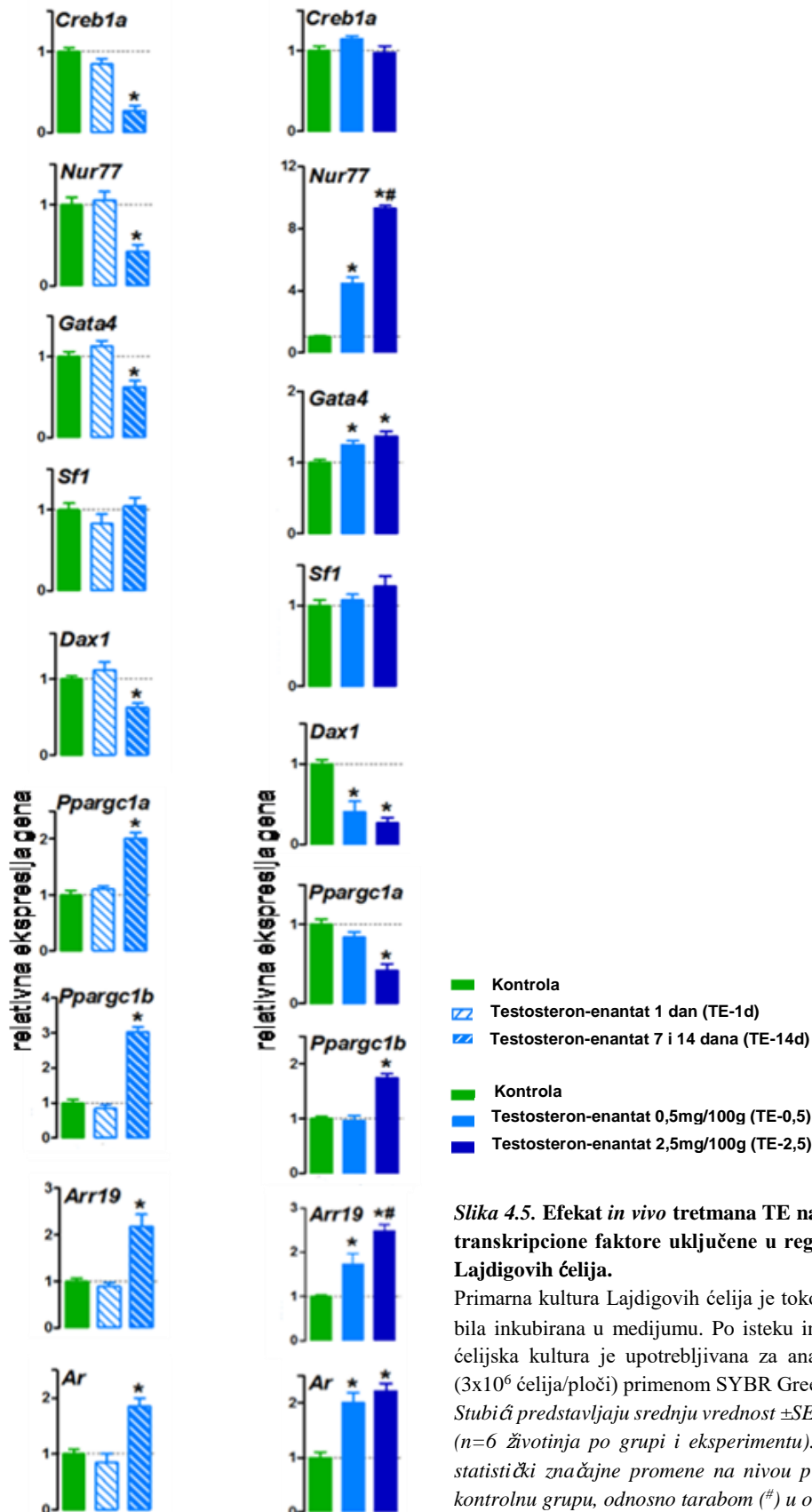
S obzirom na to da je pokazano da tretman TE moduliše endogenu sintezu androgenih hormona u Lajdigovim ćelijama, u nastavku je vršena analiza relativne ekspresije gena za komponente steroidogene mašinerije, kao i transkripcione faktore uključene u regulaciju steroidogene funkcije ovih ćelija. Relativna ekspresija gena analizirana je ekstrakcijom iRNK iz izolovanih Lajdigovih ćelija, poreklom od kontrolnih i svih TE tretiranih odraslih mužjaka pacova. Nivo relativne ekspresije gena određivan je RQ-PCR analizom.

Rezultati RQ-PCR analize pokazali su smanjen nivo relativne ekspresije gena za CYP enzime (*Cyp11a1* i *Cyp17a1* gena), kao i relativne ekspresije *Tspo* i *Star* u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih TE-14d, TE-0,5 i TE-2,5. Nasuprot tome, jednonedeljni tretmani TE tokom dve i deset nedelja doveli su do povećane relativne ekspresije *Hsd3b5* gena, ali nisu imali efekta na nivo *Hsd14b*. Profil relativne ekspresije *Star* i *Hsd3b5* gena je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima Western blot analize nivoa proteina (Kostic i sar., 2011), koji su ukazali na smanjen nivo StAR proteina, ali i povišen nivo HSD3B enzima kod pacova dugotrajno tretiranih TE (TE-14d, TE-0,5 i TE-2,5) nezavisno od primenjene doze T. Transkripcija *Lhcgr* gena bila je značajno inhibirana samo nakon aplikacije TE jednom nedeljno tokom deset nedelja, nezavisno od primenjene doze (Slika 4.4).

Analizom relativne ekspresije gena za neke transkripcione faktore uključene u regulaciju ekspresije gena za elemente steroidogene mašinerije, utvrđeno je da je dugoročni tretman TE izazvao povećanje nivoa relativne ekspresije *Ar* i *Arr19*, kao i smanjenje relativne ekspresije *Dax1*. Ovo je u skladu sa objavljenim rezultatima Western blot analize nivoa proteina koji su potvrdili profil relativne ekspresije *Ar* gena, odnosno, ukazali na povišen nivo proteina AR u Lajdigovim ćelijama pacova izolovanih nakon TE-14d, TE-0,5 i TE-2,5 tretmana (Kostic i sar., 2011).







Slika 4.5. Efekat *in vivo* tretmana TE na relativnu ekspresiju gena za transkripcione faktore uključene u regulaciju steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija.

Primarna kultura Lajdigovih ćelija je tokom 2h na temperaturi od 34 °C bila inkubirana u medijumu. Po isteku inkubacionog perioda, primarna ćelijska kultura je upotrebljivana za analizu relativne ekspresije gena ( $3 \times 10^6$  ćelija/ploči) primenom SYBR Green tehnologije.

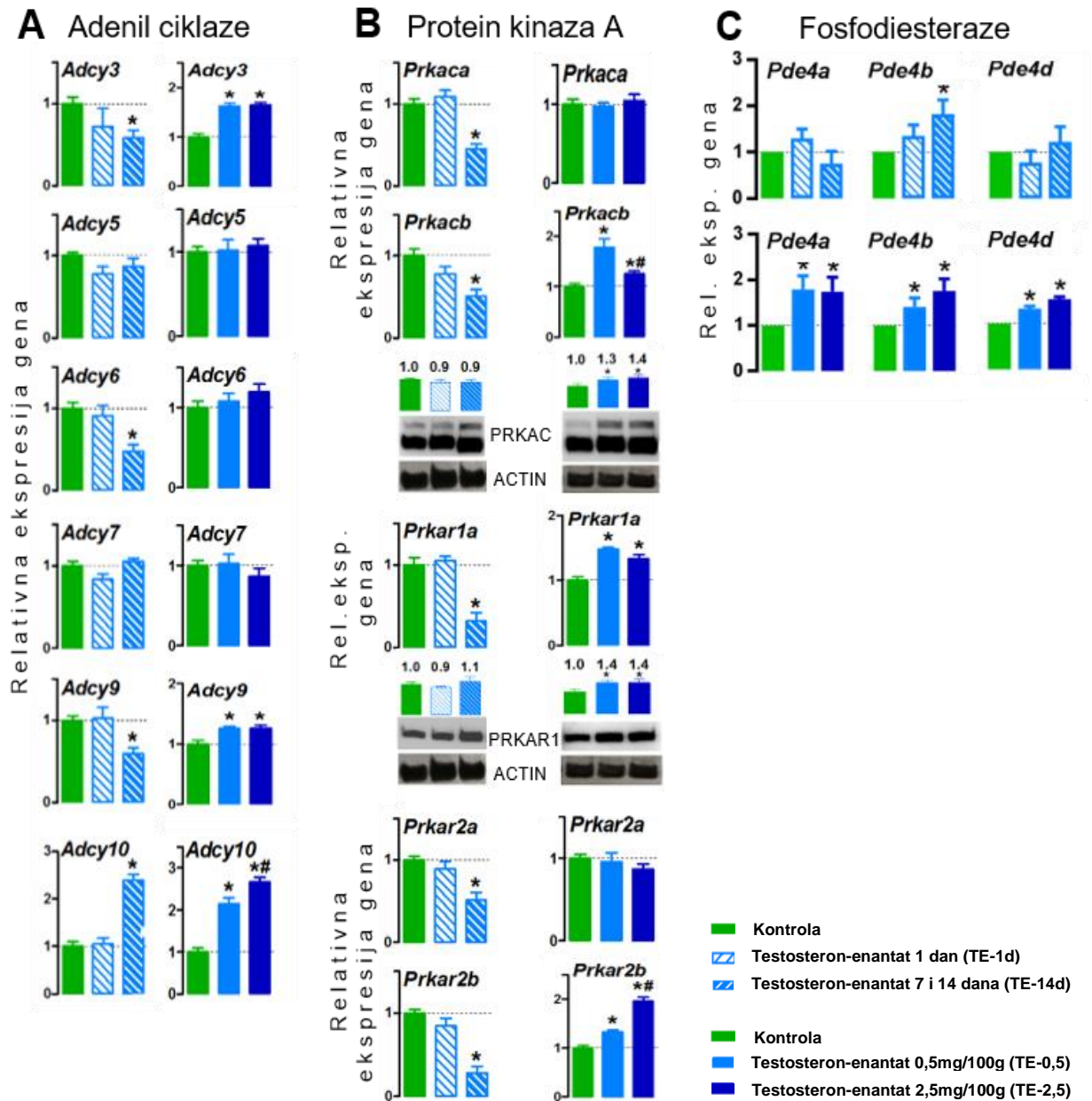
Stubići predstavljaju srednju vrednost  $\pm$ SEM iz tri nezavisna eksperimenta ( $n=6$  životinja po grupi i eksperimentu). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou  $p < 0,05$  u odnosu na adekvatnu kontrolnu grupu, odnosno tarabom (#) u odnosu na TE-0,5.

Oprečni rezultati RQ-PCR analize dobijeni su analizom relativne ekspresije gena za NUR77 i GATA4 transkripcione faktore, jer je pokazano da TE-14d uzrokuje smanjenje relativne ekspresije ovih gena, a TE-0,5 i TE-2,5 tretmani povećanje. Takođe, tretman TE jednom nedeljno tokom dve nedelje povećao je relativnu ekspresiju *Ppargc1a* i *Ppargc1b*, dok je visoka doza TE, primenjivana jednom nedeljno tokom deset nedelja, povećala transkripciju *Ppargc1b*, a smanjila *Ppargc1a*. Relativna ekspresija *Creb1a* bila je značajno snižena jedino u Lajdigovim ćelijama pacova nakon TE-14d tretmana, dok promene relativne ekspresije *Sfl* gena nisu bile detektovane (Slika 4.5).

#### **4.1.5. *In vivo* tretman testosteron-enantatom moduliše ekspresiju elemenata cAMP-PRKA signalnog puta**

S obzirom na nesporan značaj cAMP-PRKA signalnog puta u svim steroidogenim ćelijama, pa i Lajdigovim ćelijama (za reference videti radove Dufau, 1998; Hansson i sar., 2000; Payne i Hales, 2004; Tsai i Beavo, 2011), ispitivana je relativna ekspresija gena za ADCY, subjedinice PRKA i PDE, kao komponenti ove signalne kaskade. Relativna ekspresija gena analizirana je ekstrakcijom iRNK iz izolovanih Lajdigovih ćelija, poreklom iz kontrolnih i svih TE tretiranih mužjaka pacova i RQ-PCR analizom, dok je Western blot metodom praćen nivo proteina.

Rezultati RQ-PCR analize pokazali su da je dvonedeljna androgenizacija pacova smanjila nivo relativne ekspresije gena za enzime koji dovode do stvaranja cAMP u Lajdigovim ćelijama, poput ADCY3, ADCY6, ADCY9, a povećala nivo relativne ekspresije *Adcy10*, dok je desetonedeljna androgenizacija značajno povećala nivo *Adcy3*, *Adcy9* i *Adcy10* gena (Slika 4.6.A). Relativna ekspresija gena za PRKA bila je izmenjena nakon primene TE. Nivo relativne ekspresije gena za katalitičke (PRKACA i PRKACB) i regulatorne (PRKAR1A, PRKAR2A i PRKAR2B) subjedinice PRKA bio je smanjen nakon dvonedeljne androgenizacije, dok je nivo proteina PRKAC i PRKAR1 ostao nepromenjen. Nasuprot tome, u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih TE-0,5 i TE-2,5, relativna ekspresija gena za katalitičke PRKACB i regulatorne PRKAR1A i PRKAR2B subjedinice bila je povišena (Slika 4.6.B). Desetonedeljna androgenizacija pacova sa obe doze TE dovela je do povećanja relativne ekspresije gena za najčešće eksprimirane izoforme PDE: 4A, 4B i 4D. Nakon TE-14d tretmana uočeno je povećanje relativne ekspresije *Pde4b*.



**Slika 4.6.** Efekat *in vivo* tretmana TE na ekspresiju elemenata cAMP-PRKA signalnog puta u Lajdigovim ćelijama.

Primarna kultura Lajdigovih ćelija je tokom 2h na temperaturi od 34 °C bila inkubirana u medijumu. Po isteku inkubacionog perioda, primarna ćelijska kultura je upotrebljivana za analizu relativne ekspresije gena za ADCY (A), subjedinice PRKA (B) i PDE (C) primenom SYBR Green tehnologije ( $3 \times 10^6$  ćelija/ploči), kao i za Western blot analizu nivoa proteina ( $5 \times 10^6$  ćelija/ploči).

Umetnuti iseći predstavljaju reprezentativne rezultate Western blot analize za subjedinice PRKA, PRKAC i PRKAR1. Srednja vrednost denzitometrijskih merenja, normalizovanih u odnosu na vrednosti za AKTIN, je prikazana u obliku stubića.

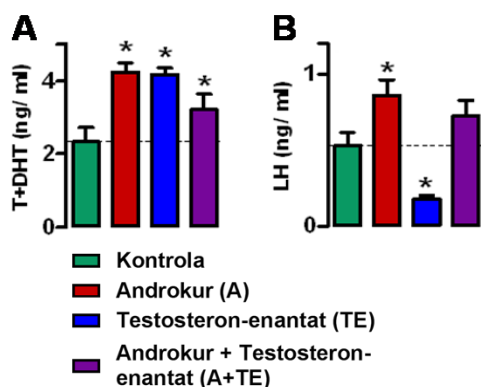
Stubići predstavljaju srednju vrednost  $\pm$ SEM iz tri nezavisna eksperimenta ( $n=6$  životinja po grupi i eksperimentu). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou  $p < 0,05$  u odnosu na adekvatnu kontrolnu grupu, odnosno tarabom (#) u odnosu na TE-0,5.

## 4.2. Molekulske adaptacije Lajdigovih ćelija tokom sistemske *in vivo* blokade androgenih receptora

Prethodno predstavljeni rezultati pokazali su da TE, najčešće upotrebljavan i zloupotrebljavan AAS, narušava steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija. Kako bi se utvrdilo da li se ovi efekti TE odvijaju posredstvom AR, kao i da bi se ispitali potencijalni mehanizmi koji se uključuju u oporavak narušene steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija, sprovedeni su *in vivo* eksperimenti sistemske blokade AR. U tu svrhu, odrasli mužjaci pacova su tokom dve nedelje tretirani intramuskularnim injekcijama blokatora AR (Androkur, A, 0,4mg/ 100g telesne mase) ili TE (0,5mg/ 100g telesne mase), odnosno, njihovom kombinacijom (A+TE). Ispitivana je funkcionalnost Lajdigovih ćelija analizom biomarkera ovih ćelija, steroidogena aktivnost i kapacitet, kao i ekspresija gena za proteine steroidogene mašinerije i komponente cAMP-PRKA signalizacije.

### 4.2.1. Efekat sistemske *in vivo* blokade androgenih receptora na nivo androgena i luteinizirajućeg hormona u krvi

Kako bi se utvrdilo da li su životinje reagovala na sprovedeni tretman, određivane su koncentracije T+DHT i LH u serumu kontrolnih i eksperimentalnih životinja. Rezultati su pokazali da su svi *in vivo* tretmani povećali nivo T+DHT u serumu. A je povećao, a TE smanjio sekreciju LH, dok je njihova kombinacija vratila ovu vrednost na nivo kontrole (Slika 4.7). Ovim rezultatima potvrđena je uspešnost sprovedenog tretmana i validnost modela.



**Slika 4.7. Efekat TE i sistemske blokade AR na nivo T+DHT i LH u serumu.**

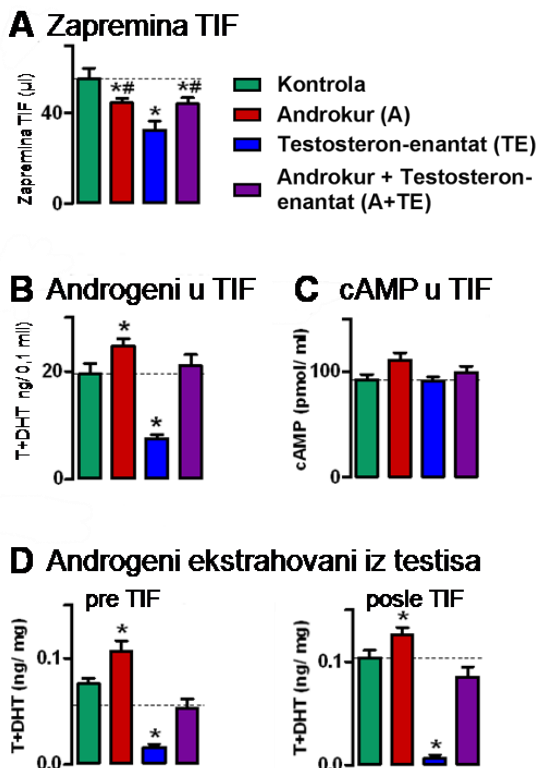
Životinje su jednom nedeljno tokom dve nedelje tretirane intramuskularnim injekcijama A (0,4 mg/100g telesne mase) ili TE (0,5 mg/100g telesne mase), odnosno, kombinacijom A i TE (A+TE; tretman A se sprovodi 24h pre tretmana TE) i dekapitovane nedelju dana nakon poslednje injekcije. Kontrolna grupa je jednom nedeljno tokom dve nedelje intramuskularno primala ricinusovo i maslinovo ulje. Sakupljana je puna krv radi određivanja koncentracije T+DHT (A) i LH (B) u serumu RIA metodom.

Stubići predstavljaju srednju vrednost  $\pm$ SEM iz pet nezavisnih eksperimenata ( $n=6$  životinja po grupi). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou  $p<0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu.

#### 4.2.2. Sistemska *in vivo* blokada androgenih receptora menja efekat testosteron-enantata na parametre intersticijske tečnosti testisa

Koncentracija androgenih hormona u krvi je rezultat stimulacije Lajdigovih ćelija sa LH, mikrocirkulacije u tkivu testisa, zapremine i sadržaja intersticijske tečnosti testisa (TIF), kao i ekspresije elemenata steroidogene mašinerije, regulisane brojnim signalnim molekulima. U cilju razdvajanja direktnih efekata A, TE ili A+TE na sintezu androgena od pomenutih parakrinih i/ili autokrinih mehanizama, određivana je zapremina TIF, kao i nivo androgena u TIF i tkivu testisa.

Rezultati su pokazali da je zapremina TIF značajno bila smanjena u testisima svih eksperimentalnih pacova, pri čemu je efekat bio najizraženiji nakon primene TE (Slika 4.8.A). Sistemska blokada AR povećala je nivo T+DHT u TIF, dvonedeljna androgenizacija životinja sa TE značajno je smanjila nivo T+DHT u TIF, dok je kombinovani tretman A+TE vratio ovaj parametar na nivo zabeležen u TIF kontrolnih životinja (Slika 4.8.B). Koncentracija cAMP nije bila promenjena nijednim sprovedenim *in vivo* tretmanom (Slika 4.8.C). Nivo androgenih hormona, ekstrahovanih iz komadića testisa odvojenih pre, odnosno, nakon sakupljanja TIF, značajno je bio snižen u testisima pacova tretiranih sa TE, povećan u testisima pacova tretiranih sa A, dok je aplikacija A pre tretmana sa TE onemogućila ove efekte (Slika 4.8.D).



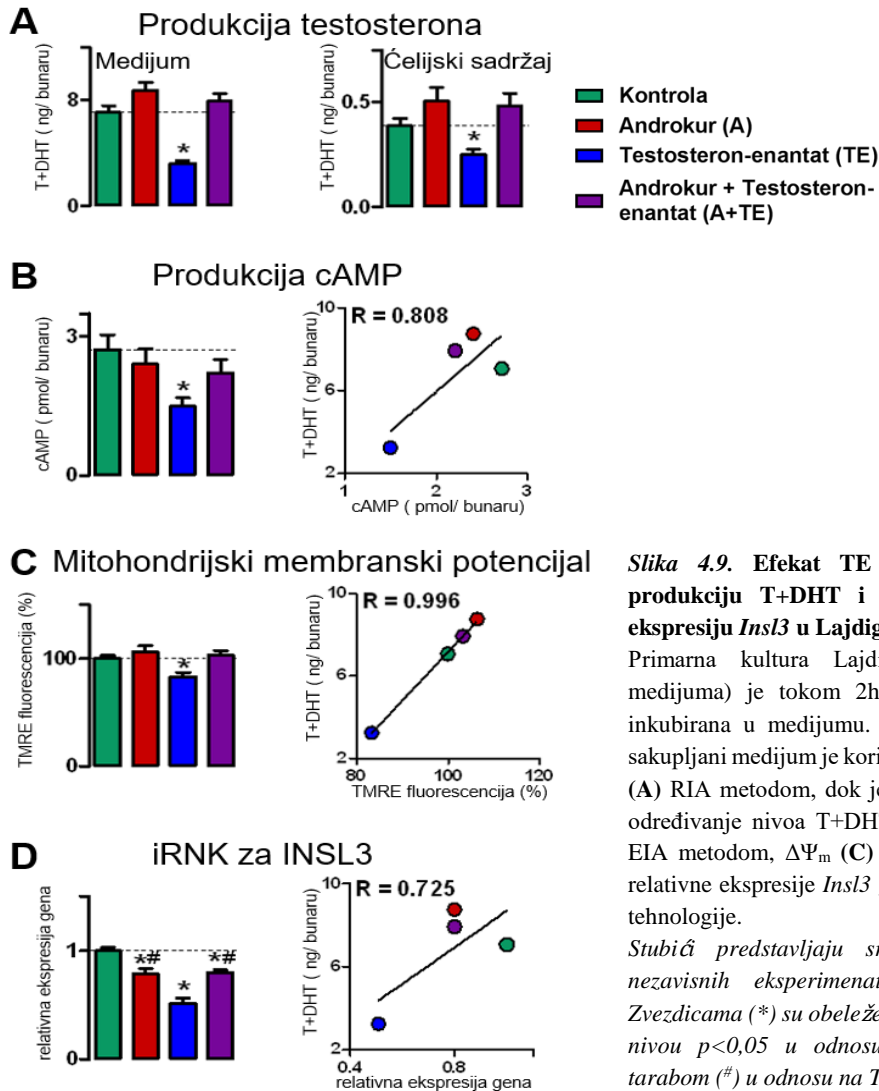
**Slika 4.8. Efekat TE i sistemske blokade AR na zapreminu TIF i nivo T+DHT u TIF i tkivu testisa.**

Nakon izolovanja i dekapuliranja testisa, odvajani su komadići tkiva, sakupljan TIF, a potom ponovo odvajani komadići tkiva testisa. Merena je zapremina prikupljanog TIF (A), određivane su koncentracije T+DHT u TIF (B) RIA metodom i cAMP u TIF (C) EIA metodom, dok su komadići testisa upotrebljavani za ekstrakciju steroida i određivanje nivoa T+DHT (D) RIA metodom.

Stubići predstavljaju srednju vrednost  $\pm$ SEM iz pet nezavisnih eksperimenata ( $n=6$  životinja po grupi). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou  $p<0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno tarabom (#) u odnosu na TE.

### **4.2.3. Sistemska *in vivo* blokada androgenih receptora umanjuje inhibitorni efekat testosteron-enantata na funkcionalnost Lajdigovih ćelija**

Funkcionalnost Lajdigovih ćelija ispitivana je analizom njihove *ex vivo* produkcije T+DHT i cAMP (dominantnog regulatora steroidogeneze), kao i određivanjem nivoa relativne ekspresije *Insl3* i  $\Delta\Psi_m$  (Slika 4.9). Rezultati su pokazali da je TE inhibirao *ex vivo* produkciju androgena i cAMP od strane Lajdigovih ćelija i smanjio  $\Delta\Psi_m$ , a sistemska blokada AR u kombinaciji sa TE je ove parametre vratila na nivo kontrolnih vrednosti (Slika 4.9.A-C). Smanjen nivo relativne ekspresije *Insl3* gena bio je zabeležen u Lajdigovim ćelijama svih tretiranih pacova, pri čemu je najizraženiji efekat bio uočen nakon tretmana sa TE (Slika 4.9.D). *In vivo* aplikacija samog blokatora AR, kao i blokatora AR u kombinaciji sa TE značajno je povećala relativnu ekspresiju *Insl3* u poređenju sa relativnom ekspresijom za ovaj gen u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih sa TE. Pozitivna linearna korelacija bila je zabeležena između nivoa cAMP ( $R=0,808$ ),  $\Delta\Psi_m$  ( $R=0,996$ ) i *Insl3* ( $R=0,725$ ) i produkcije androgena (Slika 4.9.B-D). Dobijeni rezultati ukazali su na narušenu sposobnost Lajdigovih ćelija da endogeno produkuju T u prisustvu egzogenog T (u formi TE), kao i na značaj AR u mehanizmu koji ima ulogu u onemogućavanju TE da ispolji inhibitorno dejstvo na steroidogenu funkciju ovih ćelija.



**Slika 4.9.** Efekat TE i sistemske blokade AR na produkciju T+DHT i cAMP, nivo  $\Delta\Psi_m$  i relativnu ekspresiju *Insl3* u Lajdigovim ćelijama.

Primarna kultura Lajdigovih ćelija ( $1 \times 10^6$  ćelija/ml medijuma) je tokom 2h na temperaturi od 34 °C bila inkubirana u medijumu. Po isteku inkubacionog perioda, sakupljeni medijum je korišćen za određivanje nivoa T+DHT (A) RIA metodom, dok je ćelijski sadržaj upotrebljavan za određivanje nivoa T+DHT (A) RIA metodom, cAMP (B) EIA metodom,  $\Delta\Psi_m$  (C) upotrebom TMRE boje i analizu relativne ekspresije *Insl3* gena (D) upotrebom SYBR Green tehnologije.

Stubići predstavljaju srednju vrednost  $\pm$ SEM iz pet nezavisnih eksperimenata ( $n=6$  životinja po grupi). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno tarabom (#) u odnosu na TE.

#### 4.2.4. Sistemska *in vivo* blokada androgenih receptora onemogućava inhibitorno dejstvo testosteron-enantata na steroidogenu aktivnost i kapacitet Lajdigovih ćelija

Nakon što je utvrđeno da funkcionalnost Lajdigovih ćelija ostaje nepromenjena ukoliko se AR blokiraju pre apliciranja TE, ispitivana je steroidogena aktivnost, kao i kapacitet Lajdigovih ćelija.

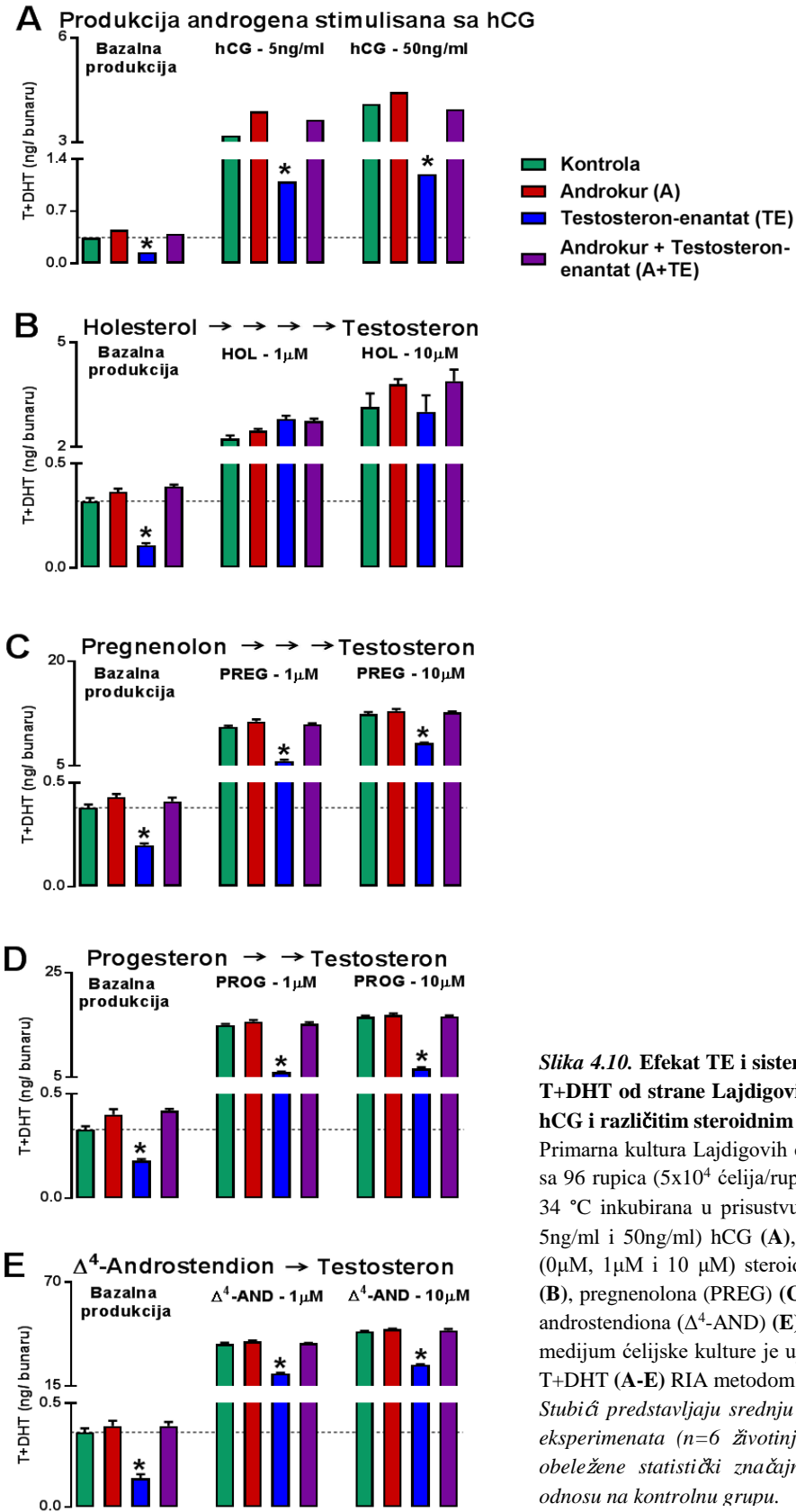
Steroidogeni kapacitet Lajdigovih ćelija predstavlja sposobnost ovih ćelija da sintetišu relevantne steroidne hormone u odgovoru na *ex vivo* tretman sa hCG. S tim u vezi, ispitivan je nivo sintetisanog T *ex vivo*, nakon što je primarna kultura Lajdigovih ćelija bila tretirana rastućim koncentracijama (0 ng/ml, 5 ng/ml i 50 ng/ml) hCG. Rezultati su pokazali da je *ex vivo* produkcija T, nakon izlaganja Lajdigovih ćelija različitim koncentracijama hCG (tj. nakon aktivacije LHCGR

receptora), odgovarala obrascu bazalne produkcije T od strane Lajdigovih ćelija netretiranih sa hCG. Značajno smanjena produkcija T bila je zapažena u medijumu primarne kulture Lajdigovih ćelija pacova *in vivo* tretiranih sa TE, dok je blokada AR pre aplikacije TE, onemogućio da TE ispolji inhibitorno dejstvo (Slika 4.10.A).

U cilju ispitivanja steroidogene aktivnosti (sposobnosti ćelija da vrše konverziju različitih steroidnih supstrata u T), Lajdigove ćelije, izolovane iz kontrolnih i *in vivo* tretiranih životinja, su izlagane različitim koncentracijama (0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) steroidnih supstrata (holesterola (HOL), pregnenolona (PREG), progesterona (PROG) i  $\Delta^4$ -androstendiona ( $\Delta^4$ -AND)). Inkubacija Lajdigovih ćelija sa obe doze HOL dovodi do izostanka efekta TE na smanjenje sinteze T, uočeno u ćelijskoj kulturi bez HOL (Slika 4.10.B). TE je uzrokovao smanjenje konverzije PREG, PROG i  $\Delta^4$ -AND u T, nezavisno od koncentracije dodatog steroidnog supstrata. U istim uzorcima je primećeno da je izostao efekat TE na smanjenje konverzije steroidnih supstrata u T, ukoliko se prethodno sistemski blokiraju AR (Slika 4.10.C-E).

Dobijeni rezultati su ukazali na to da sistemsko *in vivo* blokiranje AR, sprovedeno pre tretiranja životinja TE, sprečava narušavanje steroidogenog kapaciteta i aktivnosti Lajdigovih ćelija.





**Slika 4.10.** Efekat TE i sistemske blokade AR na produkciju T+DHT od strane Lajdigovih ćelija nakon *ex vivo* tretmana hCG i različitim steroidnim supstratima.

Primarna kultura Lajdigovih ćelija sađena je u mikrotitar ploče sa 96 rupica ( $5 \times 10^4$  ćelija/rupici) i tokom 1h na temperaturi od 34 °C inkubirana u prisustvu različitih koncentracija (0ng/ml, 5ng/ml i 50ng/ml) hCG (A), odnosno, različitih koncentracija (0μM, 1μM i 10 μM) steroidnih supstrata: holesterola (HOL) (B), pregnenolona (PREG) (C), progesterona (PROG) (D) i Δ<sup>4</sup>-androstendiona (Δ<sup>4</sup>-AND) (E). Po isteku inkubacionog perioda, medijum ćelijske kulture je upotrebljavan za određivanje nivoa T+DHT (A-E) RIA metodom.

Stubića predstavljaju srednju vrednost ±SEM iz pet nezavisnih eksperimenata (n=6 životinja po grupi). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu.

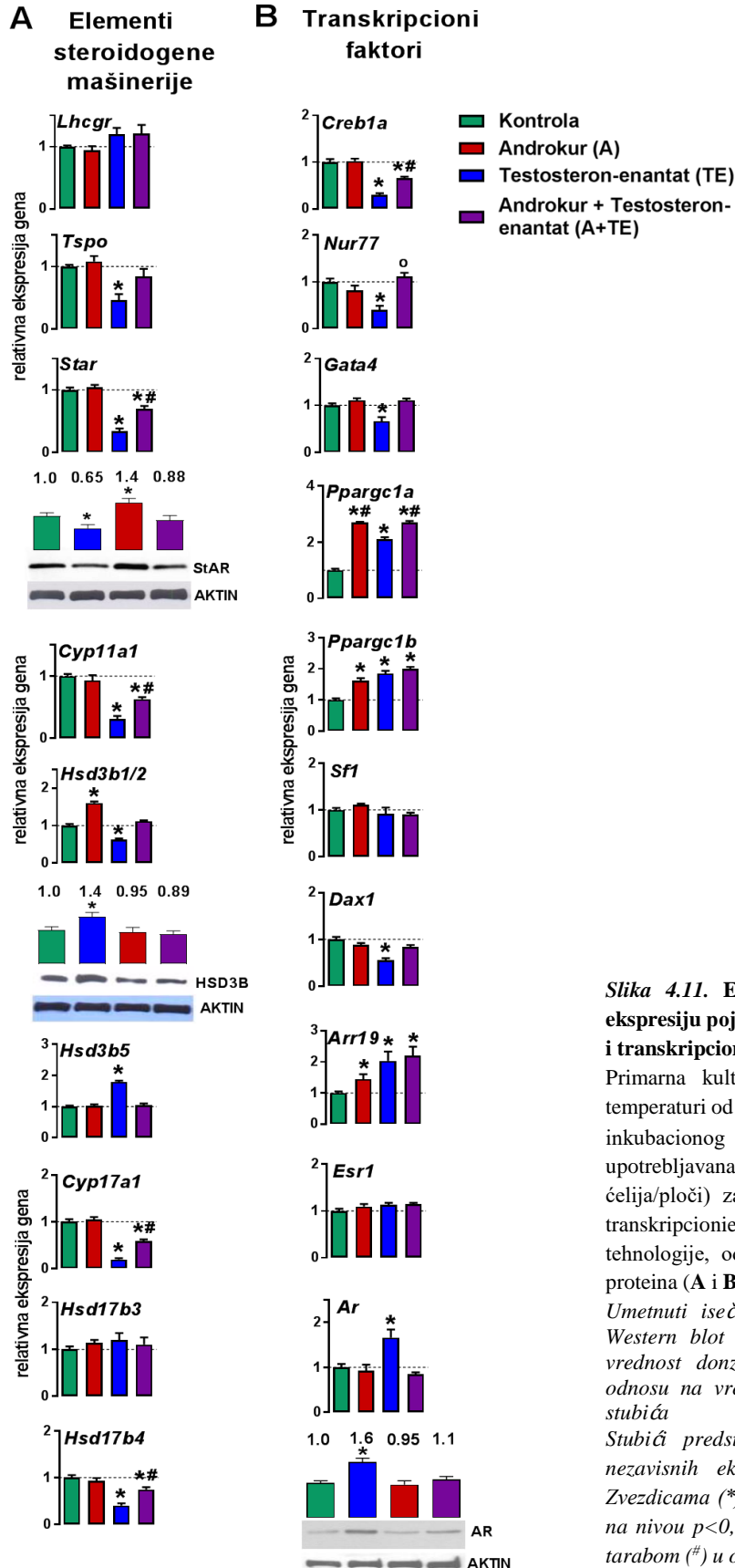
#### **4.2.5. Sistemska *in vivo* blokada androgenih receptora umanjuje inhibitorni efekat testosteron-enantata na ekspresiju pojedinih elemenata steroidogene mašinerije i transkripcionih faktora**

Kako je pokazano da je *in vivo* tretman kombinacijom blokatora AR i TE doveo do izostanka inhibitornog dejstva TE na funkcionalnost, steroidogenu aktivnost i kapacitet Lajdigovih ćelija, u nastavku je bila analizirana ekspresija elemenata uključenih u i/ili povezanih sa steroidogenom funkcijom Lajdigovih ćelija. Relativna ekspresija gena analizirana je ekstrakcijom iRNK iz Lajdigovih ćelija kontrolnih i svih eksperimentalnih životinja i RQ-PCR analizom, dok je Western blot metodom bio praćen nivo proteinskog produkta.

Kao što je već pokazano, *in vivo* tretman sa TE indukovao je značajno smanjenje nivoa relativne ekspresije *Cyp11a1*, *Cyp17a1* gena u Lajdigovim ćelijama, kao i *Star/StAR*, *Tspo*, *Hsd3b1/2* i *Hsd17b4*, dok je povećao relativnu ekspresiju *Hsd3b5* gena i HSD3B enzima (Slike 4.4 i 4.11.A). Blokada AR pre aplikacije TE u potpunosti je vratila ovaj nivo relativne ekspresije gena za TSPO, HSD3B1/2 i HSD3B5, kao i nivo StAR i HSD3B enzima na nivo kontrolnih vrednosti, dok je delimično povećala relativnu ekspresiju *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1* i *Hsd17b4* gena i približila je kontrolnim vrednostima. Aplikacija samog A značajno je povećala nivo *Hsd3b1/2* i StAR. Nijedan tretman nije menjao relativnu ekspresiju *Lhcgr* i *Hsd17b3* (Slika 4.11.A).

Pored elemenata steroidogene mašinerije, ispitivana je i ekspresija gena za transkripcione faktore uključene u regulaciju procesa steroidogeneze u Lajdigovim ćelijama. Kao što je već pokazano, tretman TE jednom nedeljno tokom dve nedelje doveo je do smanjenja nivoa relativne ekspresije gena za transkripcione faktore CREB1A, NUR77, GATA4 i DAX1, odnosno do povećanja ekspresije *Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Arr19* i *Ar/AR* (Slike 4.4 i 4.11.B). Blokada AR pre aplikacije TE u potpunosti je vratila nivo ekspresije *Nur77*, *Gata4*, *Dax1* i *Ar/AR* na nivo kontrolnih vrednosti, a delimično povećala nivo relativne ekspresije *Creb1a* i približila je kontrolnim vrednostima. Relativna ekspresija *Ppargc1a*, *Ppargc1b* i *Arr19* bila je povišena u Lajdigovim ćelijama svih eksperimentalnih pacova u poređenju sa kontrolnim, dok je relativna ekspresija *Sfl* i *Esr1* gena ostala nepromenjena (Slika 4.11.B).

Fiziološki značaj dobijenih rezultata bio je potvrđen određivanjem produkcije T u Lajdigovim ćelijama (Slika 4.9.A).



**Slika 4.11.** Efekat TE i sistemske blokade AR na ekspresiju pojedinih elemenata steroidogene mašinerije i transkripcionih faktora u Lajdigovim ćelijama.

Primarna kultura Lajdigovih ćelija je tokom 3h na temperaturi od 34° C bila inkubirana u medijumu. Po isteku inkubacionog perioda, primarna ćelijska kultura je upotrebljavana za analizu relativne ekspresije gena (3x10<sup>6</sup> ćelija/ploči) za elemente steroidogene mašinerije (A) i transkripcionie faktore (B) upotrebom SYBR Green tehnologije, odnosno, za Western blot analizu količine proteina (A i B; 5x10<sup>6</sup> ćelija/ploči).

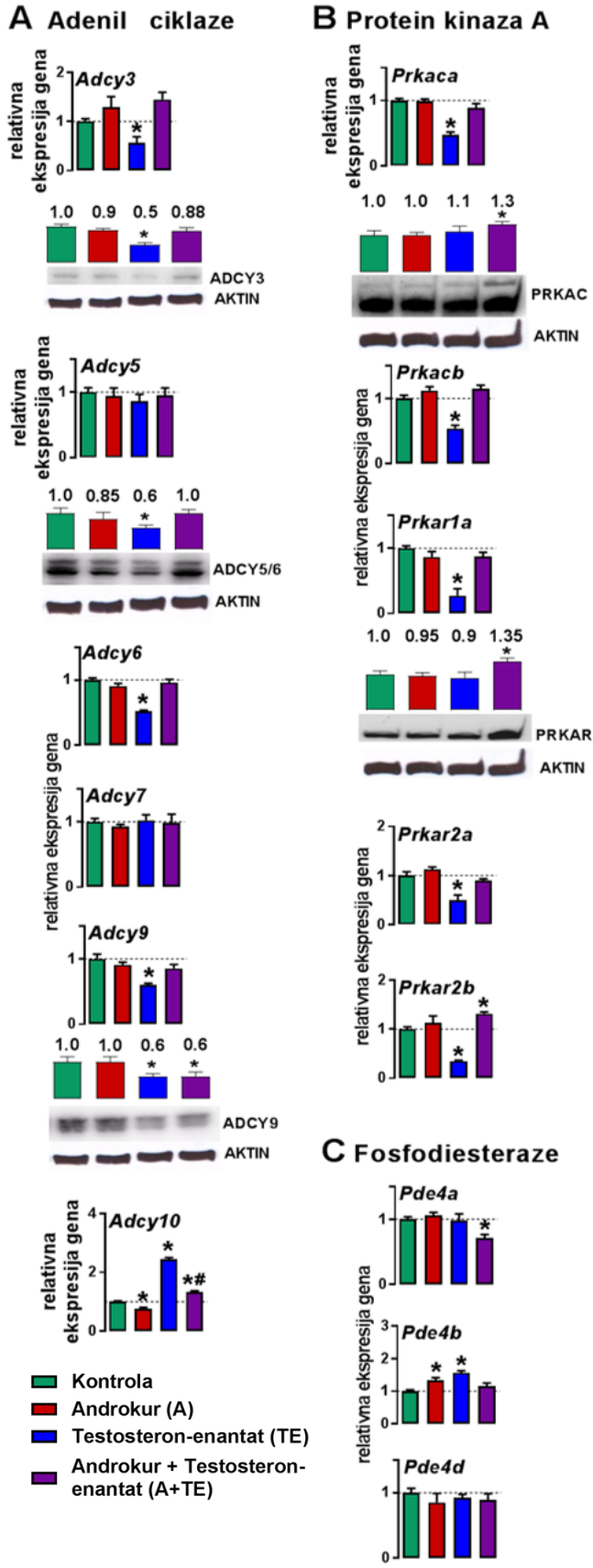
Umetnuti iseči predstavljaju reprezentativne rezultate Western blot analize za StAR, HSD3B i AR. Srednja vrednost donzimetrijskih merenja, normalizovanih u odnosu na vrednosti za AKTIN, je prikazana u obliku stubića

Stubići predstavljaju srednju vrednost ±SEM iz pet nezavisnih eksperimenata (n=6 životinja po grupi). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno tarabom (#) u odnosu na TE i kružićem (°) u odnosu na A.

#### **4.2.6. Sistemska *in vivo* blokada androgenih receptora umanjuje inhibitorni efekat testosteron-enantata na ekspresiju pojedinih elemenata cAMP-PRKA signalnog puta**

Zbog nesporno velikog značaja cAMP-PRKA signalnog puta u regulaciji steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija (za reference videti radove Dufau, 1998; Hansson i sar., 2000; Payne i Hales, 2004; Tsai i Beavo, 2011), ispitivana je ekspresija gena za ADCY, subjedinice PRKA i PDE, kao komponenti ovog signalnog puta. Relativna ekspresija gena analizirana je ekstrakcijom iRNK iz Lajdigovih ćelija, izolovanih iz kontrolnih i svih eksperimentalnih životinja i RQ-PCR analizom, dok je Western blot metodom bio praćen nivo proteina.

Kao što je već pokazano, *in vivo* tretman TE jednom nedeljno tokom dve nedelje značajno je smanjio transkripciju *Adcy3*, *Adcy6* i *Adcy9* gena, a povećao transkripciju *Adcy10* gena (Slike 4.9.A i 4.12.A). Blokada AR pre androgenizacije životinja u potpunosti je vratila relativnu ekspresiju gena za ADCY3, ADCY6 i ADCY9 na kontrolne vrednosti, dok je samo delimično povećala relativnu ekspresiju gena za ADCY10 i približila je kontrolnoj vrednosti. Nivo ADCY3, ADCY5/6 i ADCY9 enzima u Lajdigovim ćelijama bio je smanjen nakon *in vivo* primene TE, dok je A+TE tretmanom količina ADCY3 i ADCY5/6 proteina bila vraćena na nivo kontrole. Tretman A povećao je relativnu ekspresiju *Adcy10*, dok je relativna ekspresija *Adcy5* i *Adcy7* ostala nepromenjena u Lajdigovim ćelijama svih eksperimentalnih pacova (Slika 4.12.A). Kod sistemske blokade AR pre aplikacije TE bio je zabeležen izostanak efekta TE na smanjenje ekspresije gena za katalitičke A i B i regulatorne 1A, 2A i 2B subjedinice PRKA. Nivo PRKAC i PRKAR1 (najzastupljenije izoforme regulatorne subjedinice PRKA) bio je povišen jedino u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih A+TE kombinacijom (Slika 4.12.B). Aplikacija A pre TE ukinula je TE indukovano povećanje relativne ekspresije *Pde4b* gena. U istim uzorcima, transkripcija *Pde4a* gena bila je smanjena, a *Pde4d* gena nepromenjena (Slika 4.12.C).



Slika 4.12. Efekat TE i sistemske blokade AR na ekspresiju pojedinih elemenata cAMP-PRKA signalnog puta u Lajdigovim ćelijama.

Primarna kultura Lajdigovih ćelija je tokom 3h na temperaturi od 34 °C bila inkubirana u medijumu. Po isteku inkubacionog perioda, primarna ćelijska kultura je upotrebljavana za analizu relativne ekspresije gena za ADCY (A), subjedinice PRKA (B) i PDE (C) (3x10<sup>6</sup> ćelija/ploči) upotrebom SYBR Green tehnologije, odnosno, za Western blot analizu količine proteina (A i B; 5x10<sup>6</sup> ćelija/ploči).

Umetnuti iseći predstavljaju reprezentativne rezultate Western blot analize ADCY3, ADCY5/6, ADCY9, PRKAC i PRKAR1. Srednja vrednost donzimetrijskih merenja, normalizovanih u odnosu na vrednosti za AKTIN, je prikazana u obliku stubića

Stubić predstavljaju srednju vrednost ±SEM iz pet nezavisnih eksperimenata (n=6 životinja po grupi). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno tarabom (#) u odnosu na TE.

### **4.3. Steroidogena funkcija Lajdigovih ćelija i obrasci ekspresije elemenata cAMP-PRKA i JAK-STAT signalnih puteva nakon direktne *in vitro* primene testosterona i blokatora androgenih receptora**

Kako bi se utvrdilo da li su efekti *in vivo* tretmana TE na funkcionalnost Lajdigovih ćelija, ekspresiju elemenata steroidogene mašinerije i cAMP-PRKA signalnog puta direktni (posredovani AR) ili indirektni (posredovani LH ili drugim signalnim molekulima), Lajdigove ćelije su izolovane iz netretiranih odraslih mužjaka pacova i *in vitro* tretirane T ili blokatorom AR (CPA), odnosno, njihovom kombinacijom (CPA+T) ili hCG (dozama od 5 i 50 ng/ml).

#### **4.3.1. Efekti *in vitro* tretmana testosteronom i blokatorom androgenih receptora na funkcionalnost Lajdigovih ćelija**

Kako je prethodno pokazano da primena kombinovanog A+TE tretmana dovodi do izostanka inhibitorynog dejstva TE na funkcionalnost Lajdigovih ćelija (Slika 4.9), ispitivani su direktni efekti ovih supstanci na funkcionalnost Lajdigovih ćelija. U tu svrhu, analizirana je *ex vivo* produkcija cAMP, relativna ekspresija *Insl3*, kao i nivo  $\Delta\Psi_m$ , nakon *in vitro* primene T ili CPA ili CPA+T na primarnu kulturu Lajdigovih ćelija (Slika 4.13).

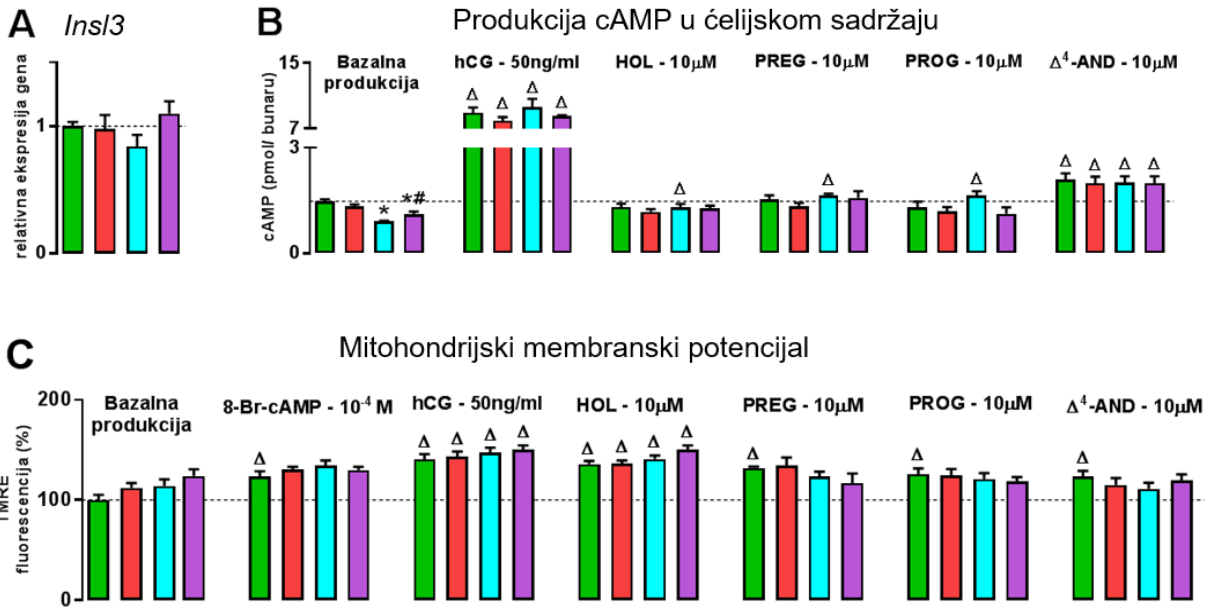
Rezultati su pokazali da dvadesetočasovna inkubacija Lajdigovih ćelija sa CPA ili T ili CPA+T nije menjala relativnu ekspresiju gena za INSL3, biomarker Lajdigovih ćelija (Slika 4.13.A).

Produkcija cAMP u Lajdigovim ćelijama određivana je nakon *in vitro* tretmana ovih ćelija sa CPA ili T ili CPA+T tokom dvadeset sati, odlivanja inkubacionog medijuma i izlaganja svih kultura Lajdigovih ćelija (kontrolne, CPA, T i CPA+T) medijumu koji sadrži ili ne sadrži hCG (50 ng/ml) tokom jednog sata (Slika 4.18.B). Utvrđeno je da je prisustvo T u medijumu primarne kulture Lajdigovih ćelija smanjilo produkciju cAMP. Blokator AR nije menjao nivo cAMP, dok je kombinacija blokatora AR i T umanjila negativno dejstvo T (Slika 4.13.B, bazalna produkcija). Prisustvo aktivatora LHCGR, hCG, dovelo je do značajno povišene produkcije cAMP u svim kulturama Lajdigovih ćelija (kontrolna, CPA, T i CPA+T) u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe (kontrolna, CPA, T i CPA+T, bez dodavanja hCG). Pritom, svi efekti T/CPA na nivo stvaranja cAMP uočeni u kulturama ćelija bez hCG su izostali u ćelijama inkubiranim sa hCG

(Slika 4.13.B, bazalna produkcija, hCG-50ng/ml). Inkubacija svih kultura Lajdigovih ćelija (kontrolna, CPA, T i CPA+T) prekursorima T (HOL, PREG i PROG) tokom jednog sata, dovela je do izostanka inhibitornog dejstva T na stvaranje cAMP (Slika 4.13.B, bazalna produkcija, HOL - 10 $\mu$ M, PREG - 10 $\mu$ M, PROG - 10 $\mu$ M). Dodavanje direktnog prekursora T ( $\Delta^4$ -AND) medijumu svih kultura Lajdigovih ćelija (kontrolna, CPA, T i CPA+T), dovelo je do povećane produkcije cAMP u odnosu na ćelijske kulture koje nisu inkubirane sa  $\Delta^4$ -AND (Slika 4.13.B, bazalna produkcija,  $\Delta^4$ -AND - 10 $\mu$ M).

Rezultati analize  $\Delta\Psi_m$  pokazali su da inkubacija Lajdigovih ćelija sa CPA ili T ili CPA+T tokom 20h ne menja  $\Delta\Psi_m$  (Slika 4.13.C, bazalna produkcija). Prisustvo 8-Br-cAMP u medijumu svih kultura Lajdigovih ćelija značajno je povećalo procenat TMRE fluorescencije jedino u kontrolnoj kulturi, netretiranoj sa CPA/T/CPA+T (Slika 4.13.C, bazalna produkcija, 8-Br-cAMP – 10<sup>-4</sup> M). Aktivacija LHCGR pomoću hCG povećala je vrednost  $\Delta\Psi_m$  u svim kulturama Lajdigovih ćelija (kontrolna, CPA, T i CPA+T) u odnosu na ove ćelijske kulture netretirane sa hCG (Slika 4.13.C, bazalna produkcija, hCG – 50ng/ml). Inkubacija svih kultura Lajdigovih ćelija (kontrolna, CPA, T i CPA+T) sa HOL tokom jednog sata značajno je povećala  $\Delta\Psi_m$  u poređenju sa ovim ćelijskim kulturama koje nisu inkubirane sa HOL (Slika 4.13.C, bazalna produkcija, HOL - 10 $\mu$ M). C21 prekursori T, PREG i PROG, kao i direktni prekursor,  $\Delta^4$ -AND, značajno su povećali procenat TMRE fluorescencije jedino u kulturi Lajdigovih ćelija netretiranoj sa CPA/T/CPA+T (Slika 4.13.C, bazalna produkcija, PREG - 10 $\mu$ M, PROG - 10 $\mu$ M,  $\Delta^4$ -AND - 10 $\mu$ M).

Svi ovi rezultati indirektno ukazuju na narušenu sposobnost Lajdigovih ćelija da vrše biosintezu T. Važno je napomenuti da nije moguće tačno odrediti nivo androgenih hormona sintetisanih od strane Lajdigovih ćelija zbog mogućnosti zaostajanja T u ovim ćelijama usled *in vitro* tretmana Lajdigovih ćelija ovim hormonom. S tim u vezi, u nastavku je analizirana ekspresija elemenata steroidogene mašinerije, transkripcionih faktora uključenih u regulaciju procesa steroidogeneze, kao i komponenti cAMP-PRKA i JAK-STAT signalnih puteva.



**Slika 4.13.** Efekat *in vitro* tretmana T i blokade AR na relativnu ekspresiju *InsI3*, produkciju cAMP i nivo  $\Delta\Psi_m$  u Lajdigovim ćelijama.

Lajdigove ćelije, izolovane iz netretiranih odraslih mužjaka pacova, su tokom 20h na temperaturi od 34 °C bile tretirane CPA (100  $\mu$ M) ili T (20  $\mu$ M) ili kombinacijom CPA+T *in vitro*. Po isteku inkubacionog perioda, primarna ćelijska kultura isprana je i, tokom 1h, dodatno inkubirana u svežem medijumu (bazalna produkcija) ili u prisustvu 8-Br-cAMP (10 $^{-4}$  M) ili hCG (50 ng/ml) ili različitih steroidnih supstrata: HOL (10  $\mu$ M), PREG (10  $\mu$ M), PROG (10  $\mu$ M) ili  $\Delta^4$ -AND (10  $\mu$ M). Nakon toga, ćelijski sadržaj je upotrebljavan za analizu relativne ekspresije *InsI3* gena (2x10 $^6$  ćelija/ploči) (A) upotrebom SYBR Green tehnologije, za određivanje nivoa cAMP (0,5x10 $^6$  ćelija/bunaru) (B) EIA metodom i  $\Delta\Psi_m$  (10 $^5$  ćelija/bunaru) (C) upotrebom TMRE boje.

Stubići predstavljaju srednju vrednost  $\pm$ SEM iz tri do pet nezavisnih eksperimenata (n=6 životinja po eksperimentu). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno tarabom (#) u odnosu na T, i trougлом ( $\Delta$ ) u odnosu na bazalnu produkciju odgovarajuće grupe.

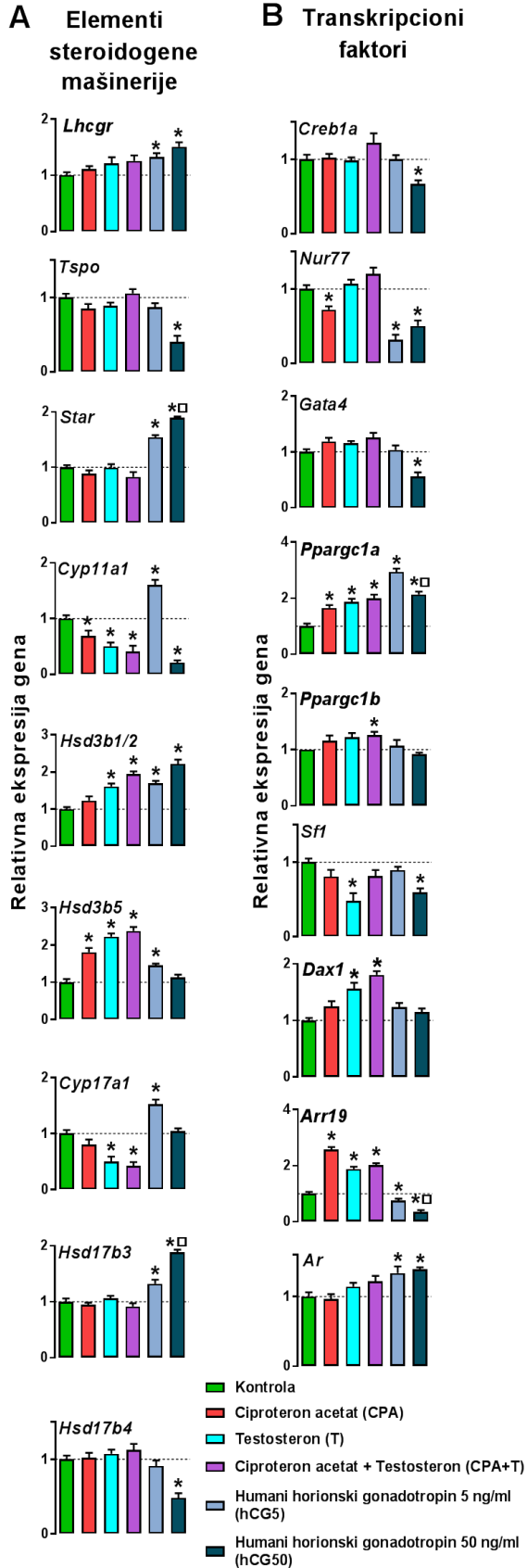
#### 4.3.2. Efekti *in vitro* tretmana testosteronom i blokatorom androgenih receptora na relativnu ekspresiju gena za elemente steroidogene mašinerije i transkripcione faktore

U cilju ispitivanja direktnog uticaja T i blokatora AR na elemente uključene u i/ili povezane sa steroidogenom funkcijom Lajdigovih ćelija, analizirana je relativna ekspresija gena za elemente steroidogene mašinerije i pojedine transkripcione faktore, nakon *in vitro* primene T ili CPA, odnosno, njihove kombinacije (CPA+T) ili hCG (dozama od 5 i 50 ng/ml). Relativna ekspresija gena određivana je izolacijom iRNK iz svih kultura Lajdigovih ćelija i RQ-PCR analizom. Neki od rezultata bili su u korelaciji sa rezultatima eksperimenata dobijenih iz sprovedenog A/TE *in vivo* tretmana, dok su drugi pokazali suprotan efekat.



Rezultati *in vivo* i *in vitro* tretmana bili su u skladu kada je reč o relativnoj ekspresiji gena za LHCGR i HSD17B3. Tretman kulture Lajdigovih ćelija sa hCG (5 i 50 ng/ml) *in vitro* doveo je do povećanja relativne ekspresije *Lhcgr* i *Hsd17b3* gena u dozno-zavisnom maniru. Kao i kod *in vivo* tretmana TE, *in vitro* aplikacija T značajno je smanjila relativnu ekspresiju *Cyp11a1* i *Cyp17a1*. Kombinacija blokatora AR i T nije uticala na ovu vrednost, kao što je to bio slučaj kod *in vivo* tretmana. Manja doza hCG (5 ng/ml) značajno je povećala relativnu ekspresiju gena za oba ispitivana enzima, dok je veća doza hCG (50 ng/ml) smanjila relativnu ekspresiju samo *Cyp11a1* gena. Takođe, u skladu sa *in vivo* rezultatima, relativna ekspresija *Hsd3b5* bila je povećana nakon tretmana kulture Lajdigovih ćelija sa T. Nasuprot rezultatima *in vivo*, inhibitorni efekat T na ovu vrednost se zadržao i nakon kombinovanog tretmana (CPA+T) kulture Lajdigovih ćelija. Suprotno *in vivo*, *in vitro* tretman sa CPA nije promenio relativnu ekspresiju *Hsd3b1/2* gena, dok je ova vrednost bila povećana nakon inkubacije Lajdigovih ćelija sa CPA+T. *In vitro* tretman hCG povećao je transkripciju *Hsd3b5* i *Hsd3b1/2*. Takođe suprotno rezultatima sprovedenih *in vivo* eksperimenata, *in vitro* tretmani nisu uticali na relativnu ekspresiju gena za StAR, TSPO i HSD17B4, ali je aplikacija hCG značajno povećala relativnu ekspresiju *Star* gena u dozno-zavisnom maniru, dok je veća koncentracija hCG smanjila relativnu ekspresiju *Tspo* i *Hsd17b4* (Slika 4.14.A).

Rezultati su pokazali da su sprovedeni *in vitro* tretmani sa CPA/T/CPA+T povećali relativnu ekspresiju *Ppargc1a* i *Arr19* u Lajdigovim ćelijama, dok je relativna ekspresija gena za CREB1A i AR ostala nepromenjena. Zapaženo je da je jedino tretman primarne kulture Lajdigovih ćelija sa T snizio relativnu ekspresiju gena za SF1 transkripcioni faktor. Blokada AR pre inkubacije ćelijske kulture sa T, vratila je ovaj parametar na nivo kontrolne vrednosti. Takođe, primećeno je da je inkubacija kulture Lajdigovih ćelija sa CPA smanjila relativnu ekspresiju *Nur77*, pri čemu je kombinovani tretman blokatora AR i T ovu vrednost vratio na nivo kontrole. Suprotno *in vivo* uslovima, T je sam, kao i u kombinaciji sa blokatorom AR *in vitro* povećao relativnu ekspresiju *Dax1* u Lajdigovim ćelijama, s tim da je efekat kombinovanog tretmana bio izraženiji. CPA+T tretman povećao je i relativnu ekspresiju *Ppargc1b*. Aktivator LHCGR, hCG, primenjivan u dozi od 50 ng/ml značajno je smanjio relativnu ekspresiju *Creb1a*, *Gata4* i *Sfl* gena u Lajdigovim ćelijama. Obe koncentracije hCG smanjile su relativnu ekspresiju gena za NUR77 i ARR19, a povećale za AR i PPARGC1A (Slika 4.14.B).



**Slika 4.14. Efekat *in vitro* tretmana T i blokade AR na relativnu ekspresiju gena za elemente steroidogene mašinerije i transkripcione faktore u Lajdigovim ćelijama.**

Lajdigove ćelije, izolovane iz netretiranih odraslih mužjaka pacova, su tokom 20h na temperaturi od 34 °C bile *in vitro* tretirane CPA (100 μM) ili T (20 μM) ili njihovom kombinacijom (CPA+T) ili hCG (5 ili 50 ng/ml). Po isteku inkubacionog perioda, primarna ćelijska kultura je isprana i, tokom 1h, dodatno inkubirana u svežem medijumu. Nakon toga, ćelijski sadržaj (2x10<sup>6</sup> ćelija/ploči) je upotrebljavan za analizu relativne ekspresije gena za elemente steroidogene mašinerije (A) i transkripcione faktore (B) upotrebom SYBR Green tehnologije.

Subič predstavljaju srednju vrednost ±SEM iz tri do pet nezavisnih eksperimenata (n=6 životinja po eksperimentu). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno kvadratićem (□) u odnosu na hCG5.

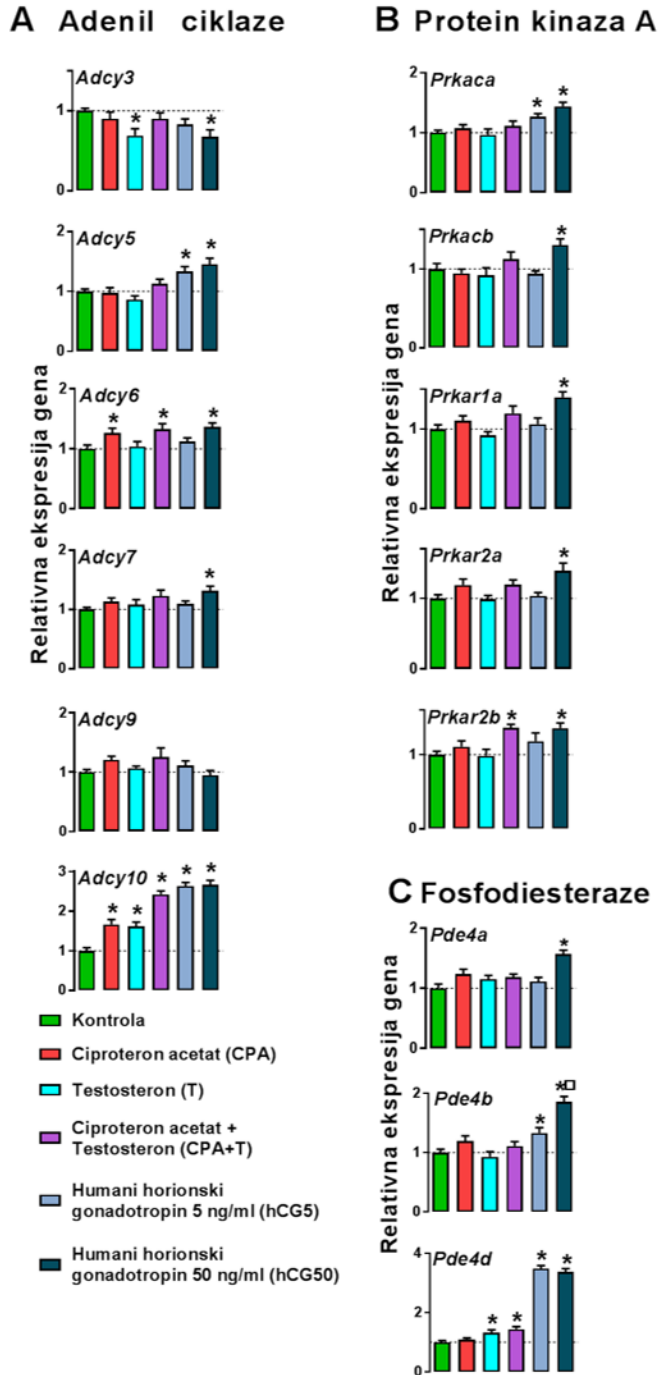
### **4.3.3. Efekti *in vitro* tretmana testosteronom i blokatorom androgenih receptora na relativnu ekspresiju gena za elemente cAMP-PRKA signalnog puta**

Relativna ekspresija gena za komponente cAMP-PRKA signalne kaskade (ADCY, subjedinica PRKA i PDE) ispitivana je u cilju analiziranja direktnog uticaja CPA/T/CPA+T/hCG5/hCG50 na elemente ovog signalnog puta. Iz netretiranih i svih *in vitro* tretiranih kultura Lajdigovih ćelija ekstrahovana je iRNK i rađena RQ-PCR analiza ciljnih gena.

RQ-PCR analizom utvrđeno je da je *in vitro* tretman T značajno smanjio relativnu ekspresiju gena za ADCY3, dok kombinacija T sa blokatorom AR nije ispoljila efekat na ovaj parametar (Slika 4.15.A). S obzirom na to da je slične efekte ispoljio i *in vivo* tretman A/TE (Slika 4.16.A), pretpostavljeno je da je AR uključen u regulaciju ovog procesa. Suprotno tome, *in vitro* tretman sa T povećao je relativnu ekspresiju *Adcy10* gena, pri čemu je u kombinaciji sa CPA ovaj efekat bio izraženiji. Inkubacija kulture Lajdigovih ćelija sa CPA i CPA+T dovela je do povećanja relativne ekspresije za ADCY6 i ADCY10. Nakon primene veće doze hCG (50 ng/ml) zapažena je povećana transkripcija *Adcy6* i *Adcy7*, dok su obe koncentracije hCG (5 i 50 ng/ml) izazvale povećanje relativne ekspresije gena za ADCY5 i ADCY10 (Slika 4.15.A).

RQ-PCR analizom pokazano je da je jedino relativna ekspresija gena za regulatornu 2B subjedinicu PRKA značajno bila povišena u Lajdigovim ćelijama tretiranim kombinacijom CPA+T. CPA i T odvojeno nisu menjali relativnu ekspresiju gena za ostale ispitivane subjedinice PRKA. *In vitro* aplikacija hCG50 povećala je relativnu ekspresiju *Prkacb*, *Prkar1a*, *Prkar2a* i *Prkar2b* gena. Inkubacija Lajdigovih ćelija sa hCG5 izazvala je povećanje relativne ekspresije *Prkaca* gena (Slika 4.15.B).

T sam ili u kombinaciji sa CPA *in vitro* značajno je povećao relativnu ekspresiju *Pde4d* gena u Lajdigovim ćelijama. Obe primenjivane koncentracije hCG izazvale su povećanje relativne ekspresije gena za 4B i 4D izoforme PDE, a jedino je veća koncentracija hCG povećala relativnu ekspresiju gena za 4A izoformu PDE (Slika 4.15.C).



**Slika 4.15.** Efekat *in vitro* tretmana T i blokade AR na relativnu ekspresiju gena za elemente cAMP-PRKA signalnog puta u Lajdigovih ćelijama.

Lajdigove ćelije, izolovane iz netretiranih odraslih mužjaka pacova, su tokom 20h na temperaturi od 34 °C *in vitro* bile tretirane CPA (100 μM) ili T (20 μM) ili njihovom kombinacijom (CPA+T) ili hCG (5 ili 50 ng/ml). Po isteku inkubacionog perioda, primarna ćelijska kultura je isprana i, tokom 1h, dodatno inkubirana u svežem medijumu. Nakon toga, ćelijski sadržaj (2x10<sup>6</sup> ćelija/ploči) upotrebljavan je za analizu relativne ekspresije gena za ADCY (A), subjedinice PRKA (B) i PDE (C) upotrebom SYBR Green tehnologije.

Subiči predstavljaju srednju vrednost ±SEM iz tri do pet nezavisnih eksperimenata (n=6 životinja po eksperimentu). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno kvadratićem (□) u odnosu na hCG5.

#### **4.3.4. Efekti *in vivo* i *in vitro* tretmana testosteronom na relativnu ekspresiju gena za prolaktinske receptore i elemente JAK-STAT signalnog puta, uključene u regulaciju ekspresije HSD3B u Lajdigovim ćelijama**

S obzirom na to da su obe doze TE stimulisale relativnu ekspresiju gena za PRL u tkivu hipofize, pretpostavljeno je da je i koncentracija PRL u krvi pacova takođe bila povišena. Pored toga, kako je poznato da ekspresiju HSD3B reguliše JAK-STAT signalni put (Payne i Hales, 2004) i da su rezultati jasno pokazali da je, od svih ispitivanih gena za elemente steroidogene mašinerije u Lajdigovim ćelijama, jedino ekspresija HSD3B bila povišena nakon obe primenjivane doze TE, u nastavku je ispitivana relativna ekspresija gena za elemente JAK-STAT kaskade i PRL receptore (PRLR) u Lajdigovim ćelijama nakon *in vivo* i *in vitro* tretmana T (Tabela 4.1). Eksperimentalni model *in vivo* androgenizacije odraslih mužjaka pacova sa TE u vremenski- i dozno-zavisnom maniru ranije je opisan u poglavlju 4.3.1. *In vitro* tretmani (CPA/T/CPA+T/hCG5/hCG50) su sprovedeni u cilju razdvajanja direktnih efekata T (posredovanih AR) od indirektnih (posredovanih LH ili drugim signalnim molekulima).

Rezultati *in vivo* istraživanja pokazali su da su svi tipovi tretmana TE značajno smanjili relativnu ekspresiju gena za PRL u Lajdigovim ćelijama. Svi tipovi dugoročne primene TE smanjili su relativnu ekspresiju *Prlr2* gena, dok je desetonedeljna androgenizacija pacova sa dve različite doze TE smanjila relativnu ekspresiju *Prlr1*. Isti tretmani značajno su promenili relativnu ekspresiju gena za JAK kinaze, enzime koji se aktiviraju u odgovoru na stimulaciju PRLR. TE-14d tretman je doveo do povećanja relativne ekspresije *Jak1*, *Jak3* i *Tyk2*, a TE-0,5 i TE-2,5 tretmani do stimulacije relativne ekspresije *Jak2* i *Jak3*. Nijedan sprovedeni tretman nije imao uticaj nivo *Stat5a* (Tabela 4.1). Kao što je već prikazano, relativna ekspresija gena za HSD3B1/2, kao krajnjeg efektoru JAK-STAT signalne kaskade, inhibirana je u Lajdigovim ćelijama nakon primenjivanog TE-14d tretmana, a stimulisana nakon TE-0,5 i TE-2,5 tretmana. Takođe, svi dugoročni tretmani TE značajno su povećali relativnu ekspresiju *Hsd3b5* (Slika 4.4; Tabela 4.1).

Rezultati sprovedenog *in vitro* tretmana pokazali su da T značajno smanjuje relativnu ekspresiju gena za PRL u Lajdigovim ćelijama. Blokator AR anulirao je ovu vrednost, dok je veća doza hCG (50 ng/ml) povećala njegovu relativnu ekspresiju u Lajdigovim ćelijama. Nakon dodavanja CPA/T/CPA+T primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija značajno je bila povećana relativna ekspresija *Prlr1* i *Prlr2*, pri čemu relativna ekspresija gena za STAT5A i JAK kinaze nije bila menjana.

Jedino je *in vitro* tretman kulture Lajdigovih ćelija sa većom dozom hCG (50 ng/ml) izazvao povećanje relativne ekspresije *Jak2* i *Tyk2* gena. Svi sprovedeni tretmani, izuzev CPA, povećali su relativnu ekspresiju *Hsd3b1/2* gena, dok je relativna ekspresija *Hsd3b5* bila povećana primenom svih tretmana, izuzev tretmana sa većom dozom hCG (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1.** Efekat *in vivo* tretmana TE u vremenski- i dozno-zavisnom maniru i *in vitro* tretmana T i blokatorom AR na relativnu ekspresiju gena za PRLR, elemente JAK-STAT signalnog puta i HSD3B u Lajdigovim ćelijama.

Grupa Gen	<i>In vivo</i> eksperimenti						<i>In vitro</i> eksperimenti					
	C	TE-1d	TE-14d	C	TE-0.5	TE-2.5	C <sub>UT</sub>	CPA	T	CPA+T	hCG5	hCG50
<i>Gnrhr</i>	1.0 ±0.06	1.5* ↑ ±0.09	1.8* ↑ ±0.06	1.0 ±0.08	1.0 ±0.05	0.5* ↓ ±0.1	1.0 ±0.06	1.1 ±0.1	1.1 ±0.04	1 ±0.07		
<i>Prl</i>	1.0 ±0.05	0.3* ↓ ±0.02	0.2* ↓ ±0.05	1.0 ±0.04	0.06* ↓ ±0.03	0.03* ↓ ±0.03	1.0 ±0.06	1.1 ±0.09	0.5* ↓ ±0.06	0.9 ±0.07	1.2 ±0.1	1.5* ↑ ±0.09
<i>Prlr1</i>	1.0 ±0.04	0.9 ±0.07	1.0 ±0.04	1.0 ±0.03	0.4* ↓ ±0.02	0.4* ↓ ±0.04	1.0 ±0.06	1.5* ↑ ±0.09	1.4* ↑ ±0.06	1.6* ↑ ±0.1	0.9 ±0.1	1.0 ±0.2
<i>Prlr2</i>	1.0 ±0.07	1.0 ±0.1	0.5* ↓ ±0.08	1.0 ±0.03	0.2* ↓ ±0.1	0.1* ↓ ±0.06	1.0 ±0.09	1.5* ↑ ±0.02	1.6* ↑ ±0.1	1.8* ↑ ±0.09	1.0 ±0.1	1.0 ±0.1
<i>Jak1</i>	1.0 ±0.04	0.7* ↓ ±0.04	1.3* ↑ ±0.07	1.0 ±0.06	1.1 ±0.07	1.1 ±0.05	1.0 ±0.05	1.0 ±0.09	1.1 ±0.06	1.0 ±0.07	1.0 ±0.06	1.2 ±0.08
<i>Jak2</i>	1.0 ±0.05	1.0 ±0.03	1.0 ±0.1	1.0 ±0.03	1.3* ↑ ±0.05	1.2* ↑ ±0.03	1.0 ±0.07	0.9 ±0.09	0.8 ±0.1	0.9 ±0.09	0.9 ±0.07	1.4* ↑ ±0.05
<i>Jak3</i>	1.0 ±0.08	0.9 ±0.1	1.9* ↑ ±0.1	1.0 ±0.04	1.9* ↑ ±0.05	1.3*# ↑ ±0.06	1.0 ±0.07	0.9 ±0.07	1.0 ±0.08	0.9 ±0.05	1.0 ±0.07	1.1 ±0.1
<i>Tyk2</i>	1.0 ±0.07	0.8 ±0.09	1.5* ↑ ±0.1	1.0 ±0.05	0.9 ±0.07	0.9 ±0.02	1.0 ±0.07	1.1 ±0.1	1.2 ±0.1	1.0 ±0.07	1.2 ±0.1	1.5* ↑ ±0.08
<i>Stat5a</i>	1.0 ±0.07	1.0 ±0.05	1.2 ±0.09	1.0 ±0.03	0.9 ±0.05	1.0 ±0.1	1.0 ±0.08	1.0 ±0.04	0.9 ±0.06	0.9 ±0.09	1.1 ±0.04	1.1 ±0.1
<i>Hsd3b1</i>	1.0 ±0.05	0.9 ±0.06	0.7* ↓ ±0.08	1.0 ±0.1	7.6* ↑ ±0.1	4.1* ↑ ±0.1	1.0 ±0.1	1.2 ±0.1	1.6* ↑ ±0.09	1.8* ↑ ±0.1	1.6* ↑ ±0.1	2.2*o ↑ ±0.2
<i>Hsd3b5</i>	1.0 ±0.07	1.3* ↑ ±0.2	2.2* ↑ ±0.2	1.0 ±0.08	1.8* ↑ ±0.2	2.4* ↑ ±0.2	1.0 ±0.06	1.7* ↑ ±0.1	2.1* ↑ ±0.1	2.4* ↑ ±0.1	1.4* ↑ ±0.1	1.1 ±0.07

Nakon sprovedenog *in vivo* tretmana intramuskularnim injekcijama TE (0,5 mg/100g telesne mase) tokom jednog dana (TE-1d) i jedan put nedeljno tokom dve nedelje (TE-14d), odnosno, jedan put nedeljno tokom deset nedelja dozama od 0,5 mg/100g telesne mase (TE-0,5) i 2,5 mg/100g telesne mase (TE-2,5), Lajdigove ćelije su tokom 2h na temperaturi od 34 °C bile inkubirane u medijumu.

Kod *in vitro* eksperimenata, Lajdigove ćelije, izolovane iz netretiranih odraslih mužjaka pacova, su tokom 20h na temperaturi od 34 °C bile tretirane CPA (100 μM) ili T (20 μM) ili njihovom kombinacijom (CPA+T) ili hCG (5 ili 50 ng/ml). Po isteku inkubacionog perioda, primarna ćelijska kultura je isprana i, tokom 1h, dodatno inkubirana u svežem medijumu.

Ćelijski sadržaj (2x10<sup>6</sup> ćelija/ploči) iz *in vivo* i *in vitro* eksperimenata upotrebljavan je za analizu relativne ekspresije gena za PRLR, elemente JAK-STAT signalnog puta i HSD3B upotrebom SYBR Green tehnologije.

Tabelarne vrednosti predstavljaju srednju vrednost ±SEM iz tri nezavisna *in vivo* eksperimenta (n=6 životinja po grupi i eksperimentu) i tri do pet nezavisnih *in vitro* eksperimenata (n=6 životinja po eksperimentu). Zvezdicama (\*) su obeležene statistički značajne promene na nivou p<0,05 u odnosu na adekvatnu kontrolnu grupu (C – kontrola za *in vivo* eksperimente; C<sub>n</sub> – kontrola za *in vitro* eksperimente/netretirane ćelije), odnosno tarabom (#) u odnosu na TE-0,5 i kvadratićem (°) u odnosu na hCG5.

## **5. Diskusija**

AAS predstavljaju polusintetske derivate androstana ili T koji su razvijeni u terapeutske svrhe. AAS se primenjuju u cilju povećanja telesne i mišićne mase, terapije brojnih kliničkih stanja, kao i u svrhe kontracepcije (Bagatell i Bremner, 1996; Bhasin, 2010; Bhasin i sar., 2006; Clark i Henderson, 2003; van Amsterdam i sar., 2010). Sa druge strane, AAS predstavljaju predmet zloupotrebe, najčešće od strane rekreativnih i profesionalnih sportista, bodibildera, adolescenata, kao i mnogih drugih u cilju poboljšanja fizičkog izgleda i performansi, iako je dobro poznato da njihova upotreba u neterapeutske svrhe može izazvati niz neželjenih zdravstvenih posledica, u prvom redu na endokrinu funkciju testisa i čitav reproduktivni sistem organizma (Basaria, 2010; Bhasin, 2010; Bhasin i sar., 2006; Hartgens i Kuipers, 2004; Imperlini i sar., 2015; Nieschlag i Vorona, 2015). Međutim, uprkos široko rasprostranjenoj kliničkoj upotrebi i zloupotrebi AAS, nisu u potpunosti razjašnjeni molekularni mehanizmi kratkoročne i dugoročne primene AAS, kao i mehanizmi koji se aktiviraju u cilju sprečavanja potpunog gubitka endokrine funkcije testisa (Pope i sar., 2014). U tom smislu, u prvom delu ovog rada ispitivani su efekti TE, najčešće upotrebljavanog i zloupotrebljavanog AAS, na funkcionisanje Lajdigovih ćelija. Kako bi se utvrdilo da li se ovi efekti TE odvijaju posredstvom androgenog receptora (AR), odnosno, da bi se ispitali potencijalni molekularni mehanizmi Lajdigovih ćelija koji se aktiviraju u odgovoru na efekte TE, sprovedeni su *in vivo* eksperimenti sistemske blokade AR. S obzirom na to da je osnovna funkcija Lajdigovih ćelija biosinteza androgenih hormona, analizirani su različiti parametri koji definišu funkcionalnost ovih ćelija, kao i elementi pojedinih signalnih puteva/transkripcionih faktora koji se uključuju u regulaciju steroidogene funkcije.

### **5.1. Testosteron-enantat narušava steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija**

U prvom delu ovog rada ispitan je efekat *in vivo* primene TE (0,5 mg/100g telesne mase) u vremenski-zavisnom maniru tokom jednog dana (TE-1d) i jednom nedeljno tokom dve nedelje (TE-14d), kao i u dozno-zavisnom maniru sa dve doze TE (TE-0,5 i TE-2,5) jednom nedeljno tokom deset nedelja na funkcionalnost Lajdigovih ćelija odraslih pacova, kao i na ekspresiju elemenata steroidogene mašinerije, transkripcionih faktora i komponenti cAMP-PRKA signalnog puta.



Rezultati ove disertacije pokazali su značajno povišen nivo androgenih hormona, a smanjen nivo LH u serumu svih eksperimentalnih životinja. Ovi navodi su u skladu sa literaturnim podacima (Anderson i Wu, 1996; Basaria i sar., 2010; Imperlini i sar., 2015). Registracija povišenog nivoa androgena u serumu predstavlja zbirni rezultat egzogeno unetog i endogeno produkovanog T, dok snižen nivo LH reflektuje efekat negativne povratne sprege visokih koncentracija T na produkciju LH, što je u skladu sa literaturnim podacima (Abbot i sar., 1988; Gnessi i sar., 1997; Payne i Hales, 2004; Saez, 1994; Winters i sar., 1992). Kao potvrda tome, ustanovljena je snižena relativna ekspresija gena za LHB ( $\beta$  subjedinice LH) i CGA (zajedničke  $\alpha$  subjedinice svih hipofiznih glikoproteinskih hormona) u tkivu hipofize svih pacova tretiranih sa TE. Pored toga, primena TE tokom jednog dana (TE-1d) i jednom nedeljno tokom dve nedelje (TE-14d) povećala je relativnu ekspresiju gena za receptor za GnRH, najverovatnije usled smanjenja nivoa LH, dok je tretman sa obe doze TE (TE-0,5 i TE-2,5) jednom nedeljno tokom deset nedelja značajno smanjio relativnu ekspresiju *Gnrhr*, verovatno zbog prisustva visokih doza TE u krvi pacova. S obzirom na redukovan nivo LH u cirkulaciji tretiranih pacova (glavnog regulatora procesa steroidogeneze u testisima), očekivana snižena produkcija androgenih hormona u Lajdigovim ćelijama potvrđena je određivanjem nivoa androgena u ćelijskom sadržaju i medijumu ćelijske kulture. Rezultati su pokazali da dugoročni *in vivo* tretman TE inhibira produkciju androgena u Lajdigovim ćelijama, čime je dodatno potvrđena supresija hipotalamo-hipofizno-gonadne osovine.

Kako su rezultati ukazali na izmenjenu produkciju androgenih hormona u Lajdigovim ćelijama testisa nakon aplikacije TE jednom nedeljno tokom dve i deset nedelja, u nastavku ovog rada analizirani su parametri koji definišu funkcionalnost ovih ćelija. Zapaženo je da dugoročna *in vivo* primena TE narušava funkcionalnost Lajdigovih ćelija, odnosno, pored toga što smanjuje produkciju T, izaziva i smanjenu akumulaciju cAMP, kao i redukciju mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\Delta\Psi_m$ ) i relativne ekspresije *Insl3* (Slika 5.1). Ciklični AMP predstavlja unutarćelijski signalni molekul kojim se aktivira glavni signalni put zadužen za pozitivnu regulaciju steroidogeneze (Saez, 1994; Tremblay, 2015), te detektovana smanjena koncentracija cAMP u Lajdigovim ćelijama ukazuje na redukovanu steroidogenu funkciju ovih ćelija. S obzirom na izuzetan značaj mitohondrija u preuzimanju holesterola i otpočinjanju procesa steroidogeneze u svim steroidogenim ćelijama, pa i Lajdigovim (King i Lavoie, 2012; Lavoie i King, 2009; Midzak i sar., 2011; Payne i Hales, 2004; Tremblay, 2015), smanjen  $\Delta\Psi_m$  nakon dugoročnog tretmana pacova TE, ukazuje na smanjenu sposobnost ovih ćelija da produkuju androgene.

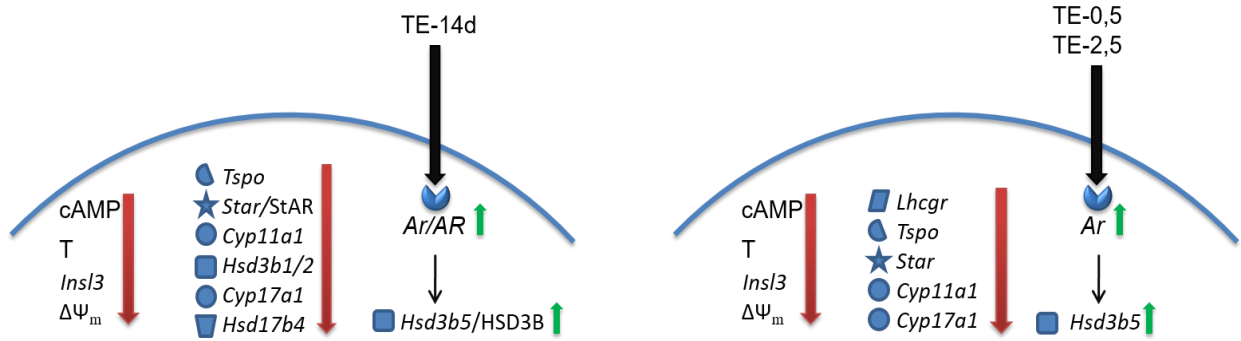
Smanjena relativna ekspresija gena za INSL3, biomarkera funkcionalnosti i diferencijacije Lajdigovih ćelija (Ivell i sar., 2013), nakon dugoročnog *in vivo* tretmana TE, u skladu je sa rezultatima koji ukazuju na antagonistički efekat T na transkripciju *Insl3* u Lajdigovim ćelijama (Lague i Tremblay, 2008). INSL3 predstavlja signalni molekul, produkovan isključivo od strane Lajdigovih ćelija, koji reflektuje dinamičnost diferencijacije, proliferacije i funkcionalnosti Lajdigovih ćelija, kao i važan efektor hipotalamo-hipofizno-gonadne osovine (za reference pogledati radove Ivell i sar., 2013; Ivell i sar., 2014). Takođe, rezultati ove disertacije su pokazali da se LH u serumu i relativna ekspresija *Insl3* u Lajdigovim ćelijama pacova dugoročno tretiranih TE, na isti način menjaju, što je u skladu sa navodima koji su ukazali na to da je nivo INL3 u serumu u korelaciji sa nivoom LH (Trabado i sar., 2014).

S obzirom na to da *in vivo* administracija TE narušava parametre funkcionalnosti Lajdigovih ćelija, u cilju boljeg razumevanja molekulskih događaja koji imaju ulogu u posredovanju ovih efekata, analizirana je relativna ekspresija gena za elemente uključene ili povezane sa steroidogenom funkcijom Lajdigovih ćelija. Rezultati su pokazali da tretman TE jednom nedeljno tokom deset nedelja značajno snižava relativnu ekspresiju *Lhcgr* u Lajdigovim ćelijama, ukazujući najverovatnije na smanjenu osetljivost Lajdigovih ćelija na delovanje LH, jer odgovor ćelija na LH ne zavisi isključivo od njegove koncentracije, nego i od broja receptora specifičnih za ovaj hormon (Catt i Dufau, 1973). Ovaj podatak dodatno objašnjava sniženu produkciju androgena. Pored toga, relativna ekspresija *Cyp11a1* i *Cyp17a1* gena u Lajdigovim ćelijama značajno je bila snižena, nezavisno od primenjene doze ili dužine tretmana sa TE, što ukazuje na to da CYP11A1 i CYP17A1 enzimi predstavljaju najosetljivije komponente steroidogene mašinerije, jer je isključivo transkripcija gena za ove enzime bila inhibirana već 24h nakon primene TE. Suprotno tome, relativna ekspresija gena za HSD3B enzim bila je povišena u Lajdigovim ćelijama pacova dugoročno tretiranih TE. Razlika u efektima TE na relativnu ekspresiju gena za CYP enzime i HSD3B u Lajdigovim ćelijama može se objasniti različitim regulatornim mehanizmima koji kontrolišu transkripciju ovih gena. Naime, HSD3B je u velikoj meri konstitutivno ekspimiran u Lajdigovim ćelijama miša, dok relativna ekspresija *Cyp11a1* i *Cyp17a1* zavisi isključivo od cAMP (Payne i Sha, 1991). Rezultati ove disertacije potvrdili su značajnu redukciju nivoa cAMP u Lajdigovim ćelijama pacova dugoročno tretiranih TE. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima različitih studija koje su ukazale na to da T ispoljava inhibitoran efekat na cAMP-stimulisanu transkripciju *Cyp17a1* u primarnoj kulturi Lajdigovih ćelija, kao i u MA-10 tumorskoj liniji Lajdigovih ćelija

(Barone i sar., 2017; Burgos-Trinidad i sar., 1997; Hales i sar., 1987; Pomara i sar., 2016). T sintetisan usled stimulacije cAMP signalizacije negativno reguliše količinu CYP17A1 enzima preko dva mehanizma: represijom cAMP-stimulisane sinteze CYP17A1 posredstvom AR ili povećanom degradacijom CYP17A1 (Hales i sar., 1987). Represija posredovana AR se ostvaruje vezivanjem AR za CRE region u okviru promotora za *Cyp17a1* gen, najverovatnije interakcijom sa proteinima koji su uključeni u cAMP indukovanu relativnu ekspresiju *Cyp17a1* (Burgos-Trinidad i sar., 1997). Na kraju, drastično snižena relativna ekspresija *Cyp11a1* i *Cyp17a1* gena može biti posledica i povišenog nivoa represora steroidogeneze, *Arr19*. Isti profil promene, kao i kod ova dva gena, uočen je i u transkripciji *Tspo* i *Star* gena. Poznato je da je regulacija genske ekspresije za elemente steroidogene mašinerije složen i tkivno specifičan proces, kontrolisan od strane velikog broja transkripcionih faktora i koregulatora, kao i njihovih međusobnih interakcija. Promotorska aktivnost *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1/2* i *Hsd3b5* gena u Lajdigovim ćelijama primarno zavisi od delovanja CREB, NUR77, GATA4 i SF1 transkripcionih faktora, kao i represora poput DAX1 i ARR19 (za reference videti radove King i LaVoie, 2012; Lavoie i King, 2009; Payne i Hales, 2004; Payne i Sha, 1991; Shi i sar., 2009; Simard i sar., 2005; Stocco i sar., 2005; Tremblay, 2015; Qamar i sar., 2009; Qamar i sar., 2010). Tretman TE jednom nedeljno tokom dve nedelje značajno je inhibirao relativnu ekspresiju gena za aktivatore transkripcije - CREB1A, NUR77 i GATA4. Suprotno tome, relativna ekspresija *Nur77* gena bila je 4,5 puta povišena u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih nižom dozom TE i skoro 10 puta u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih većom dozom TE. U istim uzorcima, relativna ekspresija gena za GATA4 bila je povišena, dok je za CREB1A ostala nepromenjena. Glavni stimulator ekspresije steroidogenih gena, SF1 (King i LaVoie, 2012; Lavoie i King, 2009; Tremblay, 2015), nije bio značajno promenjen ni u jednom eksperimentalnom pristupu, čime je ukazano na uključenost drugih transkripcionih faktora, poput antisteroidogenih faktora DAX1 (Manna i sar., 2009) i ARR19 (Qamar i sar., 2009; Qamar i sar., 2010). Transkripcija *Dax1* gena bila je značajno snižena, dok je relativna ekspresija gena za glavni represor AR, ARR19, bila povišena u Lajdigovim ćelijama pacova dugoročno tretiranih TE. Dozno-zavisno povećanje relativne ekspresije *Arr19* može biti objašnjeno smanjenom koncentracijom LH, cAMP, kao i relativnom ekspresijom *Lhcgr*, a s obzirom na to da je relativna ekspresija gena za ARR19 u Lajdigovim ćelijama negativno regulisana LH-LHCGR-cAMP-PRKA signalnim putem. ARR19 inhibira NUR77 indukovanu

promotersku aktivnost *Star* i *Cyp17a1* gena (Qamar i sar., 2009; Qamar i sar., 2010), što je i potvrđeno u uzorcima Lajdigovih ćelija nakon *in vivo* primene TE (Slika 5.1).

Svakako da najzanimljiviji rezultat predstavlja povišen nivo HSD3B u Lajdigovim ćelijama androgenizovanih pacova, a s obzirom na to da je relativna ekspresija gena za gotovo sve ostale steroidogene enzime u istim uzorcima bila snižena. Prethodno objavljeni rezultati (Kostic i sar., 2011) pokazali su da je konverzija različitih koncentracija pregnenolona u progesteron bila značajno stimulisana u grupama tretiranim sa TE jednom nedeljno tokom dve i deset nedelja. Ovi rezultati su ukazali na povećanu aktivnost HSD3B (steroidogenog enzima odgovornog za konverziju pregnenolona u progesteron), pored stimulisane ekspresije HSD3B enzima u Lajdigovim ćelijama androgenizovanih pacova. Osim povećane aktivnosti i nivoa HSD3B, potvrđeno je da T značajno povećava i ekspresiju AR u Lajdigovim ćelijama (Slika 5.1). Dobijeni rezultati su u skladu sa ranije poznatim činjenicama koje su ukazale na *in vivo* i *in vitro* stimulisanu ekspresiju AR u prisustvu androgena u različitim ćelijskim tipovima skeletnog mišića (Sinha-Hikim i sar., 2004). Pokazana je različita, ćelijski specifična regulacija ekspresije gena za AR, kao i njena posttranskripciona regulacija posredstvom androgena (Bhasin i sar., 2006; Bhasin, 2010). Nefunkcionalnost AR u Lajdigovim ćelijama značajno remeti steroidogenu funkciju ovih ćelija, spermatogenezu i fertilitnost (Eacker i sar., 2008; Wang i sar., 2009). Signalizacija koja se pokreće u Lajdigovim ćelijama nakon vezivanja androgena za AR, ima udela u autokrinoj regulaciji (Hales i sar., 1987). Pored toga, kod miševa sa hipomorfnom mutacijom AR, i pritom poremećenom negativnom povratnom spregom sinteze T, stimulisana je ekspresija gena uključenih u biosintezu i preuzimanje holesterola, kao i sama biosinteza steroida (Eacker i sar., 2008). Shodno svemu tome, pretpostavljeno je da se AR, kao transkripcioni faktor, uključuje u regulaciju ekspresije HSD3B. Iako promotorski region *Hsd3b* gena ne poseduje vezujuće mesto za AR, smatra se da AR utiče na transkripciju *Hsd3b* vezujući se za udaljenu sekvencu i delujući kao pojačivač. Stoga se smatra da pozitivna regulacija AR i HSD3B u testosteronom narušenoj steroidogenezi Lajdigovih ćelija, ukazuje na određeni mehanizam, značajan za funkcionisanje ovih ćelija, pri čemu je neophodno dobiti dodatnu potvrdu pretpostavljenog mehanizma i ispitati signalne puteve koji bi imali udela u njegovoj kontroli.



**Slika 5.1. TE narušava steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija.**

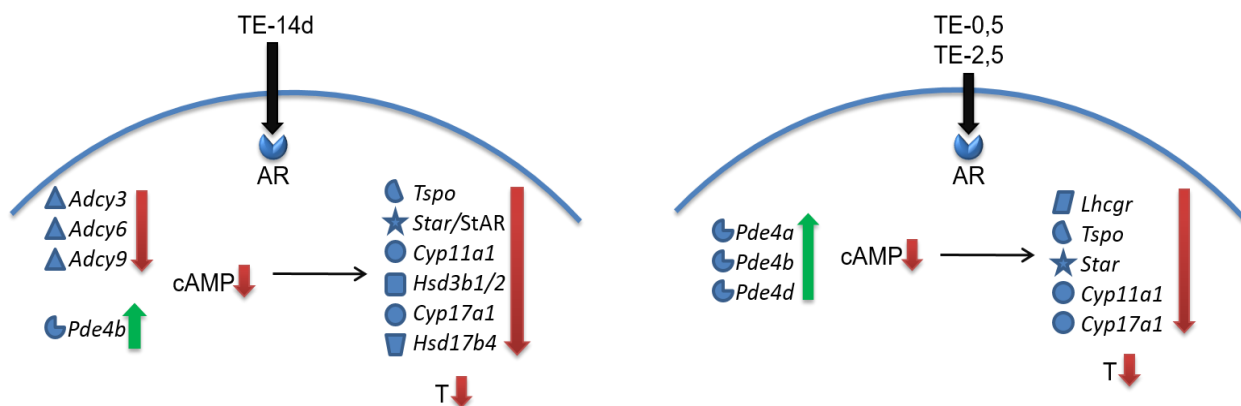
Dugoročno primenjivan TE (TE-14d, TE-0,5 i TE-2,5) umanjio je funkcionalnost Lajdigovih ćelija, što je utvrđeno smanjenom produkcijom cAMP i T, relativnom ekspresijom *Insl3* i promenom  $\Psi_m$ . Svi tretmani TE smanjili su relativnu ekspresiju gena za elemente koji su uključeni ili povezani sa steroidogenom funkcijom Lajdigovih ćelija: TSPO, StAR, CYP11A1 i CYP17A1, dok je TE-14d tretman smanjio transkripciju i *Hsd3b1/2* i *Hsd17b4* gena, a TE-0,5 i TE-2,5 tretmani *Lhcgr* gena. Ovi rezultati su potvrdili smanjenu sposobnost Lajdigovih ćelija da produkuju T. Osim toga, svi sprovedeni tretmani povećali su ekspresiju AR i HSD3B, sugerišući ulogu AR u regulaciji transkripcije *Hsd3b5*.

## 5.2. Obrazac ekspresije elemenata cAMP-PRKA signalnog puta u Lajdigovim ćelijama narušene steroidogene funkcije primenom testosteron-enantata

Imajući u vidu značajnu ulogu cAMP-PRKA signalnog puta u regulaciji steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija, odnosno, ekspresije elemenata steroidogene mašinerije, analizirana je ekspresija komponenti ovog signalnog puta.

Dobijeni rezultati pokazali su da dugoročan tretman TE u dvojakom maniru menja transkripcioni profil elemenata ove signalne kaskade. Dvonedeljna androgenizacija pacova smanjuje transkripciju gena za enzime koji produkuju cAMP u Lajdigovim ćelijama, poput ADCY3, ADCY6, ADCY9, a povećava relativnu ekspresiju gena za ADCY10. Ovi rezultati su u skladu sa detektovanom niskom koncentracijom LH u serumu pacova, hormonom koji obezbeđuje aktivaciju ADCY i sintezu cAMP, kao i sa povišenom relativnom ekspresijom gena za PDE4B, enzima koji specifično razgrađuje cAMP. Osim toga, ranije objavljeni rezultati (Kostic i sar., 2011) ukazali su na inhibiranu transkripciju *Pde1c*, *Pde3a*, *Pde7a*, *Pde8b* i *Pde10a* gena u Lajdigovim ćelijama nakon dvonedeljne androgenizacije pacova, što dodatno objašnjava nizak nivo cAMP. Sa druge strane, desetonedeljna androgenizacija značajno povećava relativnu ekspresiju gena za ADCY3, ADCY9 i ADCY10 u Lajdigovim ćelijama, iako je u istim uzorcima izmerena niska koncentracija cAMP. Dobijeni rezultat je verovatno posledica značajno povišene relativne

ekspresije gena za najzastupljenije izoforme PDE u Lajdigovim ćelijama (PDE4A, PDE4B i PDE4D). Svakako da je rezultate relativne ekspresije gena neophodno tumačiti sa rezervom, odnosno, objediniti ih sa analizom nivoa i aktivnosti ADCY i PDE, ali i MRP proteina, koji vrše izbacivanje cikličnih nukleotida iz ćelija, vršeći, na taj način, finu regulaciju nivoa cAMP unutar ćelije. Glavni enzim koji prenosi signal cAMP i time reguliše proces steroidogeneze je PRKA. Desetonedeljna androgenizacija pacova povećala je relativnu ekspresiju gena za katalitičku subjedinicu B i regulatorne 1A i 2B, kao i nivo proteina katalitičke i regulatorne 1 subjedinice PRKA (Slika 5.2). Proteini “skele” i/ili proteini za “usidranje” (AKAP) interaguju sa regulatornim subjedinicama PRKA i time obezbeđuju jasno definisanu lokalizaciju kinaze unutar ćelije (Scott, 1991; Taylor i sar., 2004). U cilju dobijanja preciznije slike, svakako je neophodno ispitati i lokalizaciju PRKA u ćelijama, naročito u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih jednom nedeljno tokom deset nedelja sa dve doze TE, gde je uočen povišen nivo ovog proteina. Osim toga, neophodno je izvršiti i analizu aktivnosti PRKA u istim uzorcima, a s obzirom na to da je zabeležen nizak nivo cAMP, molekula koji vrši aktivaciju PRKA.



**Slika 5.2. TE moduliše ekspresiju elemenata zaduženih za produkciju i uklanjanje cAMP, pri čemu nizak nivo cAMP u Lajdigovim ćelijama utiče na smanjenu ekspresiju pojedinih elemenata steroidogene mašinerije.**

Tretman TE jednom nedeljno tokom dve nedelje (TE-14d) smanjio je transkripciju *Adcy3*, *Adcy6* i *Adcy9* gena, a povećao relativnu ekspresiju *Pde4b* gena. Tretman sa obe primenjene doze TE (TE-0,5 i TE-2,5) jednom nedeljno tokom deset nedelja povećao je relativnu ekspresiju gena za najzastupljenije izoforme PDE u Lajdigovim ćelijama: PDE4A, PDE4B i PDE4D. Ovi rezultati su ukazali na smanjenu produkciju cAMP od strane ADCY i/ili povećanu degradaciju cAMP od strane PDE, usled čega je bio detektovan nizak nivo cAMP u Lajdigovim ćelijama. Smanjena količina cAMP imala je za posledicu smanjenu relativnu ekspresiju gena za elemente steroidogene mašinerije, odnosno smanjenu produkciju T, ukazujući na značaj cAMP-PRKA signalnog puta u regulaciji testosteronom narušene steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija.

Kako su prikazani rezultati u ovom radu jasno ukazali na negativnu regulaciju LH-LHCGR-cAMP signalnog puta usled tretmana TE, pretpostavljeno je da ovaj put ima značajnog udela u kontroli

smanjene transkripcije gena za brojne elemente steroidogene mašinerije, dok nije odgovoran za povećanu ekspresiju HSD3B pri androgenizaciji. Kao što je već navedeno, ekspresija HSD3B, posmatrana sa dve vremenske distance (nakon dve i deset nedelja aplikacije TE) bila je u skladu sa povećanom ekspresijom AR u istim uzorcima, te je pretpostavljeno da ekspresija HSD3B regulisana AR. U skladu s tim, ispitivane su komponente JAK-STAT signalnog puta, za koje je pokazano da se, interagujući sa AR, uključuju u kontrolu ekspresije HSD3B (Lavoie i King, 2009; Simard i sar., 2005).

### **5.3. Obrazac ekspresije elemenata JAK-STAT signalnog puta i HSD3B enzima u Lajdigovim ćelijama narušene steroidogene funkcije primenom testosteron-enantata**

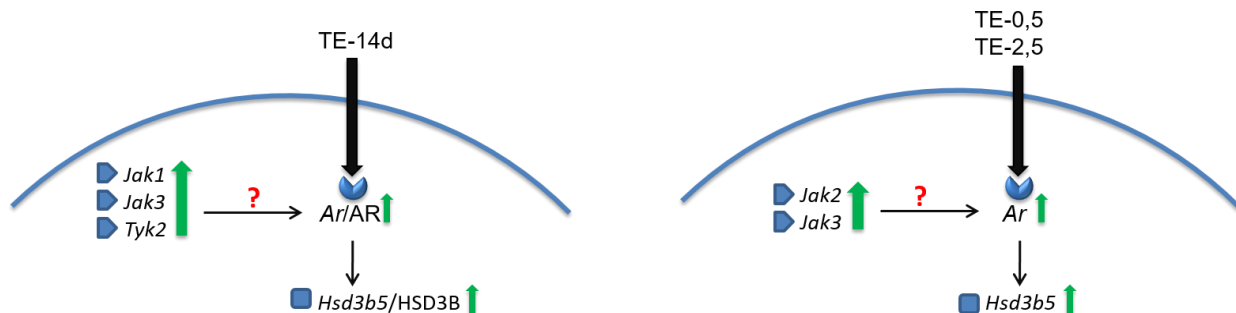
Različiti faktori rasta, steroidi, citokini i sl., delujući u autokrinom, parakrinom, jukstakrinom i endokrinom maniru, aktiviraju brojne signalne puteve, koji takođe mogu modulirati relativnu ekspresiju *Hsd3b* gena. Neki od ovih signalnih puteva se završavaju aktivacijom transkripcionih faktora, poput STAT5A/B, koji je odgovoran za finu kontrolu gena (Lavoie i King, 2009; Simard i sar., 2005). Shodno tome, kao i navodima da je PRL neophodan za efikasno funkcionisanje testisa i biogenezu T, u nastavku ovog rada analizirane su komponente PRL-JAK-STAT signalnog puta.

Relativna ekspresija gena za PRL u tkivu hipofize bila je povišena jedino nakon tretmana TE jednom nedeljno tokom deset nedelja, pri čemu je ovaj efekat bio izraženiji nakon primene veće doze TE (TE-2,5). Sa druge strane, zapaženo je da svi tipovi *in vivo* primene TE značajno snižavaju relativnu ekspresiju *Prl* u Lajdigovim ćelijama. Sličan efekat uočen je i nakon *in vitro* tretmana primarne kulture Lajdigovih ćelija T, pri čemu je kombinovani tretman blokatora AR (CPA) i T anulirao ovu vrednost, ukazujući na uključenost AR u regulaciji nivoa PRL u Lajdigovim ćelijama. Dugoročna *in vivo* primena TE smanjila je relativnu ekspresiju *Prlr2*, dok je relativna ekspresija *Prlr1* bila smanjena jedino nakon desetonedeljne androgenizacije pacova. Suprotno rezultatima *in vivo* eksperimenata, *in vitro* aplikacija CPA, T i CPA+T povećala je relativnu ekspresiju *Prlr1* i *Prlr2* gena u Lajdigovim ćelijama. Jedno od mogućih objašnjenja za ovu suprotnost u efektima T u *in vivo* i *in vitro* sistemima, može biti činjenica da su Lajdigove ćelije, izolovane iz *in vivo* tretiranih životinja, nedostupne inhibitornim i stimulativnim signalnim molekulima, koji se

oslobađaju iz ćelija njihovog okruženja, poput makrofaga, fibroblasta, endotelnih, peritubulnih mioidnih i Sertolijevih ćelija (Hutson, 2006; Klinefelter i sar., 1987; Saez, 1994). Povećana relativna ekspresija ovih gena nakon primene antagonista AR (CPA), agonista AR (T) i njihove kombinacije, može biti posledica delovanja CPA, koji, pored antagonističkog, ispoljava i agonističko svojstvo (Klokk i sar., 2007). Pored toga, delovanje liganda za AR nije ograničeno isključivo na Lajdigove ćelije, nego se odvija i na nivou Sertolijevih i drugih nesteroidnih ćelija intersticijuma testisa, menjajući, na taj način, sekreciju i dostupnost različitih endokrinih molekula. Rezultati prikazani u ovom radu su pokazali da dugoročna androgenizacija pacova značajno menja relativnu ekspresiju gena za JAK kinaze, molekule koji prenose signal od prolaktinskog receptora. Povećana relativna ekspresija *Jak1*, *Jak2*, *Jak3* i *Tyk2* gena u Lajdigovim ćelijama pacova dugoročno tretiranih TE u skladu je sa rezultatima koji su ukazali na ulogu JAK2 u posredovanju efekata hormona u ćelijama jajnika (Carvalho i sar., 2003) i nadbubrega (Li i sar., 2003). Desetonedeljna androgenizacija pacova povećala je relativnu ekspresiju *Jak2* i *Jak3* gena, kao i nivo PRKA i HSD3B proteina u Lajdigovim ćelijama, a *in vitro* dodat hCG (aktivator LHCGR) u dozi 50 ng/ml je povećao relativnu ekspresiju *Prl*, *Jak2*, *Tyk2* i *Hsd3b1/2* gena. Ovi nalazi su u skladu sa ranije objavljenim rezultatima koji pokazuju fizičku interakciju STAT5A/B i AR, a s obzirom na to da se oba proteina transportuju u jedro ćelije pomoću importina-a i importina-h, pretpostavljeno je da grade kompleks sa njima (Tan i sar., 2008). Takođe, smatra se da je JAK2 uključen u kontrolu steroidogeneze u nadbubrežnim žlezdama, interagujući sa PRKA i dovodeći do fosforilacije CREB transkripcionog faktora, koji bi mogao dovesti do povećanja ekspresije gena za HSD3B enzim (Lefrancois-Martinez i sar., 2011).

Shodno svemu navedenom, može se pretpostaviti da *in vivo* primena TE indukuje promene u ekspresiji elemenata PRL-PRLR-JAK signalnog puta, što, zajedno sa povećanjem nivoa HSD3B i AR, može predstavljati jedan od molekulskih mehanizama važnih za očuvanje i sprečavanje potpunog gubitka steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija (Slika 5.3).





**Slika 5.3. TE povećava relativnu ekspresiju gena za JAK kinaze, koje, najverovatnije posredstvom AR, povećavaju ekspresiju HSD3B enzima u Lajdigovih ćelijama.**

Tretman TE jednom nedeljno tokom dve nedelje (TE-14d) povećao je relativnu ekspresiju gena za JAK1, JAK3 i TYK2, dok je desetonedeljna androgenizacija pacova sa obe primenjene doze (TE-0,5 i TE-2,5) povećala relativnu ekspresiju gena za JAK2 i JAK3. Kako je i ranije predstavljeno, dugoročni tretman TE je povećao ekspresiju AR i HSD3B enzima, što, zajedno sa JAK kinazama, može predstavljati jedan od mehanizama važnih za očuvanje i sprečavanje potpunog gubitka steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija.

#### 5.4. Molekulske adaptacije Lajdigovih ćelija u uslovima sistemske *in vivo* blokade androgenih receptora

AR je unutarćelijski receptorski protein koji, nakon vezivanja liganda, podleže konformacionim promenama, usled čega mu je omogućena translokacija u jedro i transkripcija ciljnih gena. Ligandi za AR su androgeni hormoni, odgovorni za “maskulinizaciju” hipotalamusa, virilizaciju fetusa mužjaka, drugu fazu spuštanja testisa u skrotum, razvoj i funkcionisanje muškog reproduktivnog sistema, održavanje sekundarnih polnih karakteristika mužjaka, inicijaciju i odvijanje spermatogeneze, kao i regulaciju metabolizma (Ivell i sar., 2014; Pope i sar., 2014; Tremblay, 2015; Zirkin, 2010). Osim toga, androgeni hormoni svoje efekte ispoljavaju i na mnoga nesteroidna tkiva poput kožnog, kostnog, mišićnog i moždanog tkiva, regulišući brojne fiziološke funkcije (Li i Al-Azzawi, 2009). Imajući u vidu sve navedene funkcije AR, ispitivan je njegov značaj u posredovanju efekata TE na steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija tako što je vršeno sistemsko blokiranje AR na nivou svih organskih sistema. Ovo je bilo neophodno zbog toga što posledice ovog tretmana mogu posredno uticati na funkcionisanje Lajdigovih ćelija, kao što je to poznato u slučaju hipotalamo-hipofizno-gonadne osovine. U tu svrhu ispitivani su *in vivo* efekti primene blokatora AR (A) ili TE ili njihove kombinacije (A+TE) jednom nedeljno tokom dve nedelje na molekulske markere funkcionalnosti Lajdigovih ćelija, kao i na ekspresiju elemenata steroidogene mašinerije i cAMP-PRKA signalnog puta. Radi dobijanja preciznije slike o tome da li su zapaženi efekti TE posredovani AR ili nekim drugim signalnim molekulima, vršena je

direktna *in vitro* aplikacija blokatora AR na nivou Lajdigovih ćelija (CPA), zatim direktna aplikacija T, odnosno, njihova kombinacija (CPA+T), kao i direktno dodavanje aktivatora LHCGR, hCG (5 i 50 ng/ml).

Zastupljenost androgenih hormona je rezultat interakcija LH sa LHCGR, mikrocirkulacije u testisima, zapremine i sadržaja TIF, kao i zastupljenosti i aktivnosti elemenata steroidogene mašinerije u Lajdigovim ćelijama. Kako T predstavlja produkt Lajdigovih ćelija, određivanje zapremine TIF, kao i koncentracije androgena u TIF je značajno iz razloga što steroidogeneza predstavlja strogo kontrolisan proces koji zavisi od brojnih signalnih molekula sintetisanih od strane ćelija testisa, kao i onih pristiglih iz cirkulacije, a čiju dostupnost reguliše upravo zapremina TIF. Brojna istraživanja su pokazala da se određivanjem zapremine TIF mogu dobiti podaci o transportu i dostupnosti LH i drugih signalnih molekula Lajdigovim ćelijama, kao i koncentraciji sekretovanih androgena, za koje se smatra da imaju udela u regulaciji zapremine TIF (Bergh i sar., 1986; Damber i Bergh, 1992; Sharpe i Cooper, 1983; Sharpe, 1980, 1981, 1984; Widmark i sar., 1989). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da svi sprovedeni *in vivo* tretmani smanjuju zapreminu TIF, pri čemu je najizraženiji efekat uočen nakon administracije TE. AR je identifikovan u glatkim mišićnim ćelijama arteriola, gde može posredovati u pojedinim efektima T na mikrocirkulaciju i vazomociju u testisima, a samim tim i na zapreminu TIF (Bremner i sar., 1994; Damber i Bergh, 1992). Mehanizmi koji kontrolišu vazomociju su kompleksni i u nedovoljnoj meri ispitani, ali je poznato da je u testisima pacova vazomocija proces koji je regulisan T (Damber i Bergh, 1992). Smatra se da je mikrocirkulacija u testisima fino regulisana, te da je značajno prisustvo funkcionalnih AR, kao i jasno definisana koncentracija T. U prilog ovoj pretpostavci stoje rezultati koji ukazuju na narušenu vazomociju i promenu zapremine TIF kod miševa kojima je uklonjen gen za AR (naročito u ćelijama glatkih mišića, SMARKO), sugerišući značaj AR u lokalnoj regulaciji steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija i mikrocirkulaciji testisa (Welsh i sar., 2010). Kako je poznato da su receptori za LH/hCG na endotelnim ćelijama testisa pacova istovetni onim na Lajdigovim ćelijama, efekti koje ispoljavaju ligandi za AR su dodatno komplikovani za tumačenje. Stoga, brojni su faktori koji učestvuju u regulaciji zapremine TIF nakon aplikacije liganda za AR (Setchell i sar., 2002). Takođe, rezultati ove disertacije su pokazali da intramuskularna administracija blokatora AR značajno povećava nivo androgenih hormona u TIF i tkivu testisa, najverovatnije kao rezultat povećane koncentracije LH u cirkulaciji. Primenom

blokatora AR u kombinaciji sa TE (A+TE), anuliraju se efekti oba pojedinačna tretmana, sugerišući značajnu ulogu AR u posredovanju ovih efekata.

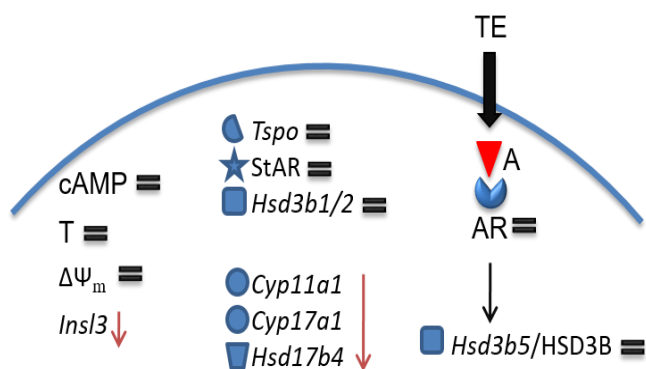
Sistemska *in vivo* blokada AR je, u potpunosti ili delimično, onemogućila da TE ostvari inhibitorno dejstvo na funkcionalnost Lajdigovih ćelija, tj. na sintezu T, akumulaciju cAMP,  $\Delta\Psi_m$ , kao i relativnu ekspresiju *Insl3*. Visok nivo pozitivne korelacije između parametara koji definišu funkcionalnost Lajdigovih ćelija, kao i između promena u zapremini TIF i relativnoj ekspresiji *Insl3*, ukazao je na ulogu AR u autokrinoj regulaciji funkcije ovih ćelija. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim navodima koji ukazuju na značaj AR u lokalnoj regulaciji steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija i mikrocirkulaciji testisa (Welsh i sar., 2010).

U cilju dobijanja kompletnije slike o steroidogenoj funkciji Lajdigovih ćelija, analizirani su efekti A/TE/A+TE na steroidogeni kapacitet (sposobnost ćelija da reaguju na tretman hCG, tj. aktivaciju LHCGR) i steroidogenu aktivnost (sposobnost ćelija da vrše konverziju različitih steroidnih supstrata u T). Dobijeni rezultati su pokazali da je sistemska *in vivo* blokada AR onemogućila da TE inhibira steroidogeni kapacitet i aktivnost Lajdigovih ćelija, ukazujući na značajnu ulogu AR i u ovim procesima. Suprotno primeni svih steroidnih prekursora T, prisustvo holesterola u medijumu ćelijske kulture anuliralo je inhibitorno dejstvo TE na steroidogenu aktivnost. Jedno od mogućih objašnjenja bi moglo biti to da je holesterol značajan za pozitivnu regulaciju  $\Delta\Psi_m$ , što su i potvrdili neobjavljeni rezultati, koji sugerišu da *in vitro* tretman Lajdigovih ćelija (izolovanih iz netretiranih mužjaka pacova) sa holesterolom povećava  $\Delta\Psi_m$ , kao i da postoji pozitivna korelacija između  $\Delta\Psi_m$  i sinteze T. Osim toga, holesterol je jedini steroidni supstrat koji zahteva prisustvo transduceozoma za transport u mitohondrije (Midzak i sar., 2011; Miller, 2013; Papadopoulos i Miller, 2012; Rone i sar., 2012), te bi svakako u budućnosti trebalo ispitati ekspresiju, aktivnost i interakciju proteina koji čine komponente ovog kompleksa.

Kako je pokazano da je A sprečio TE da negativno deluje na steroidogeni kapacitet i aktivnost Lajdigovih ćelija, u nastavku je analizirana ekspresija elemenata uključenih ili povezanih sa steroidogenom funkcijom Lajdigovih ćelija. Najzanimljiviji rezultat se ponovo odnosio na analizu ekspresije HSD3B enzima i AR. Naime, blokada AR je u potpunosti anulirala stimulativan efekat TE na ekspresiju HSD3B i AR, nedvosmisleno potvrđujući hipotezu o ulozi AR u kontroli ekspresije HSD3B, čime se verovatno obezbeđuje očuvanje i sprečavanje potpunog gubitka steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija u uslovima sistemske aplikacije TE. Osim toga, blokada

AR je u potpunosti sprečila inhibitorno dejstvo TE na ekspresiju gena za elemente steroidogene mašinerije TSPO, HSD3B1/2 i StAR i transkripcione faktore NUR77, GATA4 i DAX1, dok je delimično sprečila smanjenje relativne ekspresije *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd17b4* i *Creb1a* gena (Slika 5.4). Ovakav efekat sprovedenih tretmana na ekspresiju elemenata steroidogene mašinerije može biti posledica povišene koncentracije LH u serumu, kao i izmenjene produkcije cAMP u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih kombinacijom blokatora AR i TE u odnosu na one tretirane TE, zatim povećane transkripcije gena za transkripcione faktore koji stimulišu proces steroidogeneze, CREB1A, NUR77 i GATA4 (King i LaVoie, 2012; Lavoie i King, 2009; Payne i Sha, 1991; Qamar i sar., 2009, 2010; Shi i sar., 2009; Simard i sar., 2005), ali i tzv. “oporavka” ADCY enzima i povećane ekspresije PRKA. Sinteza T u Lajdigovim ćelijama je regulisana kratkom povratnom spregom koju T ostvaruje na ekspresiju gena uključenih u proces steroidogeneze. Negativnoj povratnoj sprezi T na sopstvenu produkciju najbolje svedoči inhibicija cAMP-stimulisane transkripcije *Cyp17a1* gena u primarnoj kulturi i MA-10 tumorskoj liniji Lajdigovih ćelija (Burgos-Trinidad i sar., 1997; Hales i sar., 1987), kao i inhibicija ekspresije StAR proteina u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Houk i sar., 2004). Kao što je već naglašeno, za adekvatnu regulaciju steroidogeneze je neophodna aktivnost/interakcija brojnih transkripcionih faktora, te je poznato da promotorsku aktivnost *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1/2* i *Hsd3b5* gena u Lajdigovim ćelijama stimulišu CREB, NUR77, GATA4 i SF1 transkripcioni faktori, a inhibiraju DAX1 i ARR19 (King i LaVoie, 2012; Lavoie i King, 2009; Qamar i sar., 2009, 2010; Shi i sar., 2009; Simard i sar., 2005). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je *in vivo* tretman pacova kombinacijom A+TE povećao ekspresiju *Creb1a* gena u Lajdigovim ćelijama u poređenju sa tretmanom TE, kao i da je anulirao inhibitorni efekat TE na transkripciju *Nur77* i *Gata4*. CREB transkripcioni faktor se aktivira fosforilacijom različitih kinaza, a kao rezultat povećane koncentracije  $Ca^{2+}$  ili cAMP. CREB i cAMP-PRKA signalizacija predstavljaju najznačajnije regulatore ekspresije gena za proteine uključene ili povezane sa steroidogenom funkcijom Lajdigovih ćelija, poput StAR, CYP11A1, CYP17A1, HSD3B1/2, HSD3B5, NUR77 i GATA4 (King i LaVoie, 2012; Lavoie i King, 2009; Payne i Hales, 2004; Qamar i sar., 2009, 2010; Shi i sar., 2009; Simard i sar., 2005; Tremblay i Viger, 2003). U skladu s tim, rezultati ovog istraživanja su ukazali na paralelizam između povećane transkripcije *Creb1a*, izostanak inhibitornog dejstva TE na relativnu ekspresiju *Nur77* i *Gata4* gena, kao i povećane ekspresije za elemente cAMP-PRKA signalnog puta u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih kombinacijom A i TE, a u odnosu

na vrednosti dobijene nakon tretmana TE. Sistemska blokada AR sprečila je TE da ostvari inhibitorno dejstvo na relativnu ekspresiju *Dax1*, ali i dodatno povećala transkripciju *Arr19*. Dobijeni rezultat je teško objasniti, s obzirom na to da je ekspresija gena za ARR19 negativno regulisana LH-LHCGR-cAMP-PRKA signalnim putem (Qamar i sar., 2009; Qamar i sar., 2010), a pokazano je da je A+TE tretman povećao transkripciju *Arr19* u uslovima visoke koncentracije LH u serumu, kao i normalne produkcije cAMP u Lajdigovim ćelijama. Ipak, ARR19, kao korepresor AR, inhibira NUR77 indukovanu promotorsku aktivnost *Star* i *Cyp17a1* gena (Qamar i sar., 2009; Qamar i sar., 2010), te povećana relativna ekspresija *Arr19* u Lajdigovim ćelijama pacova nakon primene kombinovanog tretmana A+TE može predstavljati jedan od razloga zbog kojih ekspresija gena za CYP enzime nije svedena na nivo kontrole u ovim uzorcima.



**Slika 5.4. Sistemska blokada AR moduliše steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija.**

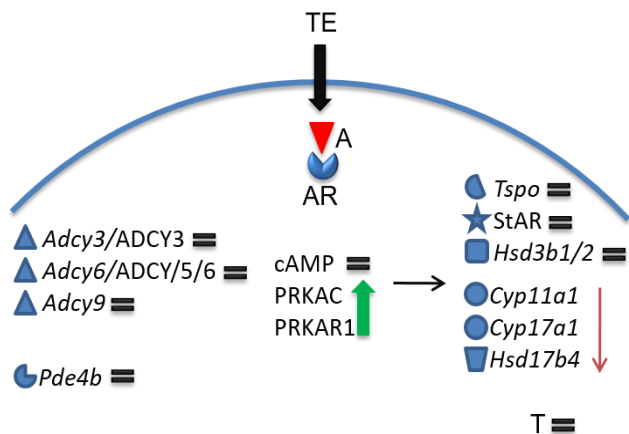
Sistemska blokada AR je u potpunosti onemogućila inhibitorno dejstvo TE na parametre funkcionalnosti Lajdigovih ćelija - cAMP, T i  $\Delta\Psi_m$ , dok je delimično sprečila TE-indukovanu inhibiciju *Insl3* transkripcije. Takođe, sistemsko blokiranje AR je u potpunosti sprečilo smanjenje ekspresije gena za elemente steroidogene mašinerije TSPO, StAR i HSD3B1/2, dok je delimično sprečilo inhibiciju transkripcije *Cyp11a1*, *Cyp17a1* i *Hsd17b4* gena, izazvanu primenom TE. U istim uzorcima je zapaženo i anuliranje efekta TE na ekspresiju AR i *Hsd3b5/HSD3B*. Dobijeni rezultati ukazuju na uplitanje AR u regulaciju steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija.

### 5.5. Obrazac ekspresije elemenata cAMP-PRKA signalnog puta u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih sistemskim blokatorom AR zasebno i u kombinaciji sa testosteron-enantatom

U cilju ispitivanja potencijalnih mehanizama putem kojih ligandi za AR mogu modifikovati proces steroidogeneze, u nastavku je analizirana ekspresija elemenata cAMP-PRKA signalnog puta. Pojedini rezultati su ukazali na značajnu ulogu AR u kontroli sinteze cAMP u Lajdigovim ćelijama. Nivo sintetisanog cAMP u Lajdigovim ćelijama nakon A+TE tretmana bio je značajno povišen u poređenju sa TE tretmanom, što je ukazalo na povećanu sintezu ovog signalnog molekula od strane ADCY i/ili smanjen nivo degradacije od strane cAMP-specifične PDE. U

skladu s tim, zapaženo je da je sistemska blokada AR u potpunosti onemogućila TE da inhibira ekspresiju *Adcy3/ADCY3*, *Adcy6/ADCY5/6* i *Adcy9*, odnosno, da stimuliše transkripciju *Pde4b*. Efekat TE na relativnu ekspresiju *Adcy10* gena delimično je izostao u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih kombinacijom A i TE. Osim toga, administracija blokatora AR pre tretmana TE, dovela je do izostanka inhibitorynog dejstva TE na relativnu ekspresiju *Prkaca/b*, *Prkar1a*, *Prkar2a/b* gena, dok je nivo PRKA proteina bio povišen u odnosu na kontrolne vrednosti. Sumarno, dobijeni rezultati su potvrdili značaj AR u regulatornim mehanizmima koji dovode do porasta koncentracije cAMP u Lajdigovim ćelijama pacova kombinovano tretiranih sa A i TE u odnosu na pojedinačni tretman sa TE. U tom smislu, povećan nivo cAMP u Lajdigovim ćelijama pacova kombinovano tretiranih sa A i TE, može aktivirati PRKA koja, procesima fosforilacije, može aktivirati StAR, CREB, kao i druge proteine/transkripcione faktore steroidogene mašinerije (Slika 5.5).

Rezultati sprovedenih *in vivo* eksperimenata pokazali su da tretman blokatorom AR u kombinaciji sa TE umanjuje efekte TE na parametre koji definišu endokrinu funkciju Lajdigovih ćelija, ali i ukazali na uključenost LH-LHCGR-cAMP-PRKA signalnog puta u ovim događajima. Međutim, nije poznato da li ovi efekti predstavljaju rezultat aktivnosti AR, LHCGR signalizacije ili nekih drugih signala. Na primer, relativna ekspresija *Arr19* gena bila je povišena u Lajdigovim ćelijama svih *in vivo* tretiranih pacova, iako je poznato da je ARR19 negativno regulisan LH-LHCGR-cAMP-PRKA signalnim putem (Qamar i sar., 2009; Qamar i sar., 2010). S tim u vezi, u cilju razdvajanja efekata T koje ostvaruje aktiviranjem AR od onih koji se ostvaruju posredstvom LH ili drugih signala, sprovedeni su *in vitro* eksperimenti.



**Slika 5.5. Sistemska blokada AR anulira efekte TE na ekspresiju pojedinih elemenata cAMP-PRKA signalnog puta.**

Sistemska blokada AR je onemogućila negativno dejstvo TE na ekspresiju *Adcy3*, *Adcy6/ADCY5/6* i *Adcy9*, kao i pozitivno dejstvo TE na relativnu ekspresiju *Pde4b* gena, usled čega je detektovan nivo cAMP u Lajdigovim ćelijama jednak kontrolnim vrednostima. Osim toga, sistemska blokada AR je povećala nivo katalitičke i regulatorne 1 subjedinice PRKA. Usled svega toga, nivo ekspresije za elemente steroidogene mašinerije, kao i sinteza T bili su svedeni na nivo kontrolnih vrednosti. Sumarno, rezultati su ukazali na značaj cAMP-PRKA signalnog puta i AR u regulaciji steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija.

Kao što je već opisano, Lajdigove ćelije, izolovane iz netretiranih mužjaka pacova, su *in vitro* tretirane T ili CPA, odnosno njihovom kombinacijom (CPA+T) ili aktivatorom LHCGR, hCG. Dobijeni rezultati pokazali su da su svi sprovedeni *in vitro* tretmani uticali na steroidogenu mašineriju i cAMP-PRKA signalizaciju u Lajdigovim ćelijama, pri čemu su pojedini rezultati potvrdili efekte uočene kod *in vivo* tretmana, dok su drugi ukazali na suprotan efekat. Kao što je već napomenuto, određene razlike u efektima *in vivo* A/TE/A+TE i *in vitro* CPA/T/CPA+T tretmana moguće je objasniti činjenicom da su Lajdigove ćelije, izolovane iz *in vivo* tretiranih životinja, nedostupne različitim signalnim molekulima koji na njih ispoljavaju inhibitoran i stimulativan efekat, a koje se oslobađaju iz ćelija njihovog okruženja, poput makrofaga, fibroblasta, endotelnih, peritubulnih mioidnih i Sertolijevih ćelija (Hutson, 2006; Klinefelter i sar., 1987; Saez, 1994). Takođe, pokazano je da *in vivo* tretman TE povećava nivo NOS2, što dovodi do apoptoze Lajdigovih ćelija, posredstvom mehanizama koji se odvijaju preko AR (Janjic i sar., 2012). Uz to, delovanje liganda za AR nije ograničeno isključivo na Lajdigove ćelije, nego se odvija i na nivou Sertolijevih ćelija, kao i drugih nesteroidnih ćelija intersticijuma testisa, menjajući, na taj način, sekreciju i dostupnost različitih hemijskih glasnika (Sharpe i Cooper, 1983; Sharpe, 1984). Rezultati *in vitro* eksperimenata su ukazali na to da su CPA/T/CPA+T tretmani ispoljili isti efekat na transkripciju pojedinih elemenata steroidogene mašinerije i cAMP-PRKA signalnog puta u Lajdigovim ćelijama. Kako je pokazano da CPA, pored antagonističkog, ispoljava i agonističko svojstvo (Klokk i sar., 2007), pretpostavljeno je da je to jedan od razloga uočenih istovetnih efekata koji se javljaju primenom različitih tretmana. Takođe, brojni antagonisti AR, uključujući i CPA, zapravo iniciraju brzu i kratkotrajnu interakciju AR sa specifičnom sekvencom na DNK, dok se njihov antagonistički efekat ogleda u inhibiciji transkripcije usled regrutovanja različitih korepresora (Klokk i sar., 2007; McNally i sar., 2000; Schaffner, 1988). Oprečni rezultati su dobijeni i primenom različitih doza hCG na ekspresiju gena za elemente steroidogene mašinerije (TSPO, CYP11A1, HSD3B5 i CYP17A1) u Lajdigovim ćelijama. Iako je nesporno da je LH-LHCGR-cAMP signalni put glavni regulator ekspresije komponenti steroidogene mašinerije (King i LaVoie, 2012; Lavoie i King, 2009; Payne i Hales, 2004; Qamar i sar., 2009, 2010), kao i subjednica PRKA (Hansson i sar., 2000), pokazano je i da LH indukuje desenzitizaciju/neosetljivost ADCY, kao i internalizaciju LHCGR u Lajdigovim ćelijama pacova (Habberfield i sar., 1987). Stoga je pretpostavljeno da je dvadesetočasovna inkubacija Lajdigovih ćelija sa većom dozom hCG indukovala smanjenu aktivnost cAMP-PRKA signalnog puta. Ipak, s

obzirom na to da regulacija ekspresije elemenata steroidogene mašinerije i cAMP-PRKA signalne kaskade predstavlja kompleksan proces u koji su uključeni brojni signalni molekuli, neophodna su dalja istraživanja kako bi se definisali precizni mehanizmi delovanja hCG i liganda za AR *in vitro*.

Sumarno, rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su pokazali da A u kombinaciji sa TE čuva funkcionalnost Lajdigovih ćelija, kao i ekspresiju gena za pojedine elemente steroidogene mašinerije u odnosu na tretman samo sa TE. Ovi efekti mogu biti posredovani cAMP-PRKA, ali i/ili cGMP-PRKG1 zavisnom fosforilacijom i aktivacijom StAR proteina (Andric i sar., 2010), kao i fosforilacijom i aktivacijom transkripcionih faktora, uključenih u regulaciju transkripcije gena za elemente steroidogene mašinerije (King i LaVoie, 2012; Lavoie i King, 2009; Payne i Hales, 2004; Stocco i sar., 2005). Razumevanje pomenutih mehanizama dodatno je otežano usled postojanja kompleksne strukturne organizacije testisa. Ipak, brojni dobijeni rezultati su ukazali na značajnu ulogu AR u regulaciji dinamike TIF, produkcije T i ekspresije elemenata steroidogene mašinerije, cAMP-PRKA signalnog puta i transkripcionih faktora, te samim tim, i na očuvanje steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija.

Već je naglašeno da T, dominantno sintetisan u Lajdigovim ćelijama intersticijuma testisa, predstavlja neophodan hormon za održanje reproduktivne funkcije organizma. Imajući u vidu da svoju funkciju ostvaruje posredstvom androgenih i/ili anaboličkih efekata, sintetisani su derivati T, zajedničkim imenom nazvani AAS, u cilju lečenja različitih kliničkih poremećaja. Međutim, upravo zbog efekata koje ostvaruju, AAS često predstavljaju i predmet zloupotrebe, najčešće od strane rekreativnih i profesionalnih sportista, ali i adolescenata. Njihova upotreba u neterapeutske svrhe može izazvati niz neželjenih zdravstvenih posledica, u prvom redu na endokrinu funkciju testisa i čitav reproduktivni sistem organizma (Andric i sar., 2007; Basaria, 2010; Bhasin, 2010; Bhasin i sar., 2006; Hartgens i Kuipers, 2004; Imperlini i sar., 2015; Nieschlag i Vorona, 2015). Osim toga, AAS su uvršteni na listu 19 zabranjenih droga, zajedno sa heroinom, kokainom, ekstazijem i kanabisom (van Amsterdam i sar., 2010). Kako nisu u potpunosti razjašnjeni molekularni događaji koji dovode do posledica primene ovih supstanci (Pope i sar., 2014), doprinos rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji se ogleda u jasnijem razumevanju molekularnih mehanizama koji se aktiviraju u cilju sprečavanja potpunog gubitka endokrine funkcije testisa. Bez obzira na to da li su uočeni efekti direktni ili indirektni, odnosno, posredovani AR ili drugim signalnim molekulima, dobijeni rezultati ukazuju na molekularne događaje koji posreduju u



narušenoj produkciji T, što predstavlja izuzetan značaj za reproduktivno zdravlje ljudi u svetlu upotrebe i zloupotrebe AAS.

## **6. Zaključci**

Na osnovu postavljenih ciljeva istraživanja i prikazanih rezultata evidentno je da su funkcionalnost i obrasci signalnih puteva, važni za održavanje steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija, narušeni primenom egzogenih agonista i/ili antagonista T u *in vivo* ili *in vitro* uslovima. Registrovane su promene u brojnim parametrima funkcionalnosti Lajdigovih ćelija nastale kao posledica primene TE, derivata T koji se najčešće upotrebljava u kliničkoj praksi, ali se u najvećoj meri i zloupotrebljava i najprodavaniji je na tzv. "crnom" tj. ilegalnom tržištu.

**(1) Sistemska *in vivo* primena TE, najčešće upotrebljavanog i zloupotrebljavanog AAS, narušava steroidogenu funkciju i profil ekspresije elemenata cAMP-PRKA signalizacije (glavnog regulatora steroidogeneze) Lajdigovih ćelija odraslih pacova. Dokazi da je navedena tvrdnja tačna su:**

- Povećanje koncentracije androgena i smanjenje koncentracije LH u cirkulaciji, kao potvrda uspešnosti *in vivo* tretmana i validnosti modela.
- Smanjenje *ex vivo* produkcije androgenih hormona i cAMP, relativne ekspresije *Insl3* gena, kao i vrednosti membranskog potencijala mitohondrija u Lajdigovim ćelijama, što je ukazalo na poremećenu funkcionalnost ovih ćelija.
- Smanjenje relativne ekspresije gena za elemente steroidogene mašinerije u Lajdigovim ćelijama: transportere holesterola (TSPO i StAR), steroidogene enzime (CYP11A1 i CYP17A1), transkripcione faktore (CREB1A, NUR77 i GATA4), ali i povećanje ekspresije HSD3B, AR, kao i relativne ekspresije gena za pojedine komponente JAK-STAT signalne kaskade, za koju je pokazano da je uključena u regulaciju ekspresije HSD3B.
- Promena profila ekspresije komponenti cAMP-PRKA signalne kaskade u Lajdigovim ćelijama i smanjen nivo cAMP. Ova promena u nivou cAMP je verovatno posledica smanjene relativne ekspresije gena za ADCY3, ADCY6 i ADCY9, enzima koji stvaraju cAMP, kao i povećane relativne ekspresije gena za PDE4A, PDE4B i PDE4D, enzima koji vrše njegovu razgradnju.

**(2) AR posreduju efekte T i njegovog derivata TE na obrasce ekspresije elemenata cAMP-PRKA signalnog puta i autokrine/parakrine efekte kojima se testisi i Lajdigove ćelije**

**prilagodavaju na poremećenu homeostazu androgena u cilju sprečavanja potpunog gubitka steroidogene funkcije. Dokazi da je navedena tvrdnja tačna su:**

- Promene u koncentracijama androgena i LH u cirkulaciji koje su potvrdile uspešnost *in vivo* tretmana i validnost modela.
- Kombinacija sistemske *in vivo* blokade AR i TE delimično je prevenirala TE-uzrokovano smanjenje zapremine TIF, a u potpunosti prevenirala TE-uzrokovano smanjenje nivoa androgenih hormona u TIF i tkivu testisa, što ukazuje na parakrinu ulogu T i AR u regulaciji dinamike tečnosti intersticijuma testisa.
- Kombinacija sistemske *in vivo* blokade AR i TE, je u potpunosti ili delimično, onemogućila inhibitorni efekat TE na parametre funkcionalnosti Lajdigovih ćelija: sintezu i sekreciju androgena, akumulaciju cAMP, relativnu ekspresiju *Ins13*, vrednost mitohondrijskog membranskog potencijala, kao i steroidogeni kapacitet i aktivnost Lajdigovih ćelija. Ovi rezultati sugerišu da je T posredstvom AR uključen u autokrinu regulaciju steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija.
- Kombinacija sistemske *in vivo* blokade AR i TE, je u potpunosti ili delimično, onemogućila efekte TE na ekspresiju elemenata steroidogene mašinerije u Lajdigovim ćelijama: transportera holesterola (TSPO i StAR), steroidogenih enzima (CYP11A1, HSD3B1/2, CYP17A1 i HSD17B4) i transkripcionih faktora (CREB1A, NUR77 i GATA4). Takođe, kombinacija sistemske blokade AR i TE je u potpunosti prevenirala TE-uzrokovano povećanje ekspresije HSD3B i AR, što je potvrdilo ulogu AR u kontroli ekspresije HSD3B, kao dodatno obezbeđenje očuvanja i sprečavanje potpunog gubitka steroidogene funkcije Lajdigovih ćelija u uslovima poremećene homeostaze T sistemskom primenom TE.
- Kombinacija sistemske *in vivo* blokade AR i TE je u potpunosti onemogućila TE-uzrokovanu promenu ekspresije ADCY3, ADCY5/6, ADCY9 i PDE4B, a delimično i ADCY10 u Lajdigovim ćelijama. Fiziološka potvrda ovog nalaza je “oporavak” nivoa cAMP u Lajdigovim ćelijama pacova tretiranih kombinacijom A+TE u odnosu na Lajdigove ćelije pacova tretiranih sa TE. Ovi rezultati potvrđuju značaj autokrine uloge T i AR u mehanizmima regulacije elemenata cAMP-PRKA signalnog puta u Lajdigovim ćelijama.

- *In vitro* blokada AR u kombinaciji sa T omogućila je razdvajanje autokrinih, tzv. direktnih, efekata T od onih posredovanih jukstakrinim, parakrinim, endokrinim i nervnim signalima.

Rezultati imaju fundamentalan značaj sa aspekta rasvetljavanja mehanizama delovanja T u regulaciji funkcije Lajdigovih ćelija tokom poremećene homeostaze organizma. Pored toga, rezultati su prmenljivi u kliničkoj i forenzičkoj praksi, s obzirom na to da je u *in vivo* modelu korišćen derivat T - TE, u sličnom maniru i u dozi koja se najčešće upotrebljava u kliničkoj praksi, ali se i u najvećoj meri zloupotrebljava.

## **7. Literatura**

**Abbaszade IG, Arensburg J, Park CH, Kasa-Vubu JZ, Orly J, Payne AH** (1997) Isolation of a new mouse 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoform, 3b-HSD VI, expressed during early pregnancy. *Endocrinology* 138 (4): 1392-1399.

**Abbot SD, Docherty K, Clayton R** (1988) Gonadal regulation of pituitary hormone mRNA levels of male rats. *J Mol Endocrinol* 1 (1): 61-68.

**Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, Hales KH, Hales DB** (2006) Energized, polarized, and actively respiring mitochondria are required for acute Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 147 (8): 3924-3935.

**Anakwe OO, Murphy PR, Moger WH** (1985) Characterization of beta-adrenergic binding sites on rodent Leydig cells. *Biol Reprod* 33 (4): 815-826.

**Anderson RA, Wu FC** (1996) Comparison between testosterone enanthate-induced azoospermia and oligospermia in a male contraceptive study. II. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of once weekly administration of testosterone enanthate. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (3): 896-901.

**Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS** (2007) Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293 (5): E1399-1408.

**Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS** (2010) Testosterone-induced modulation of nitric-oxide-cGMP signaling pathway and androgenesis in the rat Leydig cells. *Biol Reprod* 83 (3): 434-442.

**Andric SA, Kostic TS, Stojilkovic SS** (2006) Contribution of multidrug resistance protein MRP5 in control of cyclic guanosine 5'-monophosphate intracellular signaling in anterior pituitary cells. *Endocrinology* 147 (7): 3435-3445.

**Arakane F, Kallen CB, Watari H, Foster JA, Sepuri NB, Pain D, Stayrook SE, Lewis M, Gerton GL, Strauss 3rd JF** (1998) The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. *J Biol Chem* 273 (26): 16339-16345.

**Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Strauss 3rd JF** (1997) Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 272 (51): 32656-32662.

**Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL** (2002) The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine reviews* 23 (2): 141-174.

**Azhar S, Reaven E** (2002) Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 195 (1-2): 1-26.

**Bagatell CJ, Bremner WJ** (1996) Androgens in men – uses and abuses. *N Engl J Med* 334 (11): 707-714.

**Bain PA, Yoo M, Clarke T, Hammond SH, Payne AH** (1991) Multiple forms of mouse 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase and differential expression in gonads, adrenal glands, liver, and kidneys of both sexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (20): 8870-8874.

**Baker PJ, Sha JH, O'Shaughnessy PJ** (1997) Localisation and regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 mRNA during development in the mouse testis. *Mol Cell Endocrinol* 133 (2): 127-133.

**Barone R, Pitruzzella A, Marino Gammazza A, Rappa F, Salerno M, Barone F, Sangiorgi C, D'Amico D, Locorotondo N, Di Gaudio F, Cipolloni L, Di Felice V, Schiavone S, Rapisarda V, Sani G, Tambo A, Cappello F, Turillazzi E, Pomara C** (2017) Nandrolone decanoate interferes with testosterone biosynthesis altering blood-testis barrier components. *J Cell Mol Med* 21 (8): 1636-1647.

**Basaria S, Coviello AD, Travison TG, Storer TW, Farwell WR, Jette AM, Eder R, Tennstedt S, Ulloor J, Zhang A, Choong K, Lakshman KM, Mazer NA, Miciek R, Krasnoff J, Elmi A, Knapp PE, Brooks B, Appleman E, Aggarwal S, Bhasin G, Hede-Brierley L, Bhatia A, Collins L, LeBrasseur N, Fiore LD, Bhasin S** (2010) Adverse events associated with testosterone administration. *N Engl J Med* 363 (2): 109-122.

**Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS** (2001) Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (11): 5108-5117.

**Basaria S** (2010) Androgen abuse in athletes: detection and consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (4): 1533-1543.

**Batarseh A, Li J, Papadopoulos V** (2010) Protein kinase C epsilon regulation of translocator protein (18 kDa) Tsps gene expression is mediated through a MAPK pathway targeting STAT3 and c-Jun transcription factors. *Biochemistry* 49 (23): 4766-4778.

**Batarseh A, Papadopoulos V** (2010) Regulation of translocator protein 18 kDa (TSPO) expression in health and disease states. *Mol Cell Endocrinol* 327 (1-2): 1-12.

**Bender AT, Beavo JA** (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58 (3): 488-520.



**Bergh A, Widmark A, Damber JE, Cajander S** (1986) Are leukocytes involved in the human chorionic gonadotropin-induced increase in testicular vascular permeability? *Endocrinology* 119 (2): 586-590.

**Bhasin S, Calof OM, Storer TW, Lee ML, Mazer NA, Jasuja R, Montori VM, Gao W, Dalton JT** (2006) Drug insight: Testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2 (3): 146-159.

**Bhasin S** (2010) The brave new world of function-promoting anabolic therapies: testosterone and frailty. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (2): 509-511.

**Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I** (2004) Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215 (1-2): 135-141.

**Bose HS, Lingappa VR, Miller WL** (2002) The steroidogenic acute regulatory protein, StAR, works only at the outer mitochondrial membrane. *Endocr Res* 28 (4): 295-308.

**Bose HS, Whittal RM, Baldwin MA, Miller WL** (1999) The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (13): 7250-7255.

**Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

**Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT** (1994) Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135 (3): 1227-1234.

**Brion L, Maloberti PM, Gomez NV, Poderoso C, Gorostizaga AB, Mori Sequeiros Garcia MM, Acquier AB, Cooke M, Mendez CF, Podesta EJ, Paz C** (2011) MAPK phosphatase-1 (MKP-1) expression is up-regulated by hCG/cAMP and modulates steroidogenesis in MA-10 Leydig cells. *Endocrinology* 152 (7): 2665-2677.

**Burgos-Trinidad M, Youngblood GL, Maroto MR, Scheller A, Robins DM, Payne AH** (1997) Repression of cAMP-induced expression of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase gene (Cyp17) by androgens. *Mol Endocrinol* 11 (1): 87-96.

**Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Levallet J** (2002) Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 193 (1-2): 137-143.

**Carvalho CR, Carvalho JB, Lima MH, Zimmerman SF, Caperuto LC, Amanso A, Gasparetti AL, Meneghetti V, Zimmerman LF, Velloso LA, Saad MJ** (2003) Novel signal

transduction pathway for luteinizing hormone and its interaction with insulin: activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and phosphoinositol 3-kinase/Akt pathways. *Endocrinology* 144 (2): 638-347.

**Catt KJ, Dufau ML** (1973) Interactions of LH and hCG with testicular gonadotropin receptors. *Adv Exp Med Biol* 36 (0): 379-418.

**Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J** (2000) Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily bicarbonate sensor. *Science* 289 (5479): 625-628.

**Chen ZS, Tiwari AK** (2011) Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J* 287 (18): 3226-3245.

**Choi IY, Lee S, Rivier C** (2008) Novel role of adrenergic neurons in the brain stem in mediating the hypothalamic-pituitary axis hyperactivity caused by prenatal alcohol exposure. *Neuroscience* 155 (3): 888-901.

**Christenson LK, Strauss 3rd JF** (2001) Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch Med Res* 32 (6): 576-586.

**Clark AS, Henderson LP** (2003) Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neurosci Biobehav Rev* 27 (5): 413-436.

**Clark BJ, Combs R, Hales KH, Hales DB, Stocco DM** (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.

**Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM** (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse leydig tumor cells. *J Biol Chem* 269 (45): 28314–28322.

**Cooper DM, Crossthwaite AJ** (2006) Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends Pharmacol Sci* 28 (8): 426-431.

**Dai L, Tsai-Morris CH, Sato H, Villar J, Kang JH, Zhang J, Dufau ML** (2011) Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: implications of its role in germ cell development. *J Biol Chem* 286 (52): 44306-44318.

**Damber JE, Bergh A** (1992) Testicular microcirculation – a forgotten essential in andrology? *Int J Androl* 15 (4): 285-292.

**Deeley RG, Westlake C, Cole SP** (2006) Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 86 (3): 849-899.

**Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP** (1996) Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 137 (12): 5337-5343.

**Diemer T, Allen JA, Hales KH, Hales DB** (2003) Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology* 144 (7): 2882–2891.

**Duarte A, Poderoso C, Cooke M, Soria G, Cornejo Maciel F, Gottifredi V, Podesta EJ** (2012) Mitochondrial fusion is essential for steroid biosynthesis. *PLoS One* 7 (9): e45829.

**Dufau ML** (1998) The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol* 60: 461-496.

**Eacker SM, Agrawal N, Qian K, Dichek HL, Gong EY, Lee K, Braun RE** (2008) Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Mol Endocrinol* 22 (3): 623-635.

**Fukushima M, Villar J, Tsai-Morris CH, Dufau ML** (2011) Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25), a negative regulator of luteinizing/chorionic gonadotropin hormone-induced steroidogenesis in Leydig cells: central role of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 286 (34): 29932-29940.

**Fynn-Thompson E, Cheng H, Teixeira J** (2003) Inhibition of steroidogenesis in Leydig cells by Mullerian-inhibiting substance. *Mol Cell Endocrinol* 211 (1-2): 99-104.

**Gambaryan S, Butt E, Marcus K, Glazova M, Palmetshofer A, Guillon G, Smolenski A** (2003) cGMP-dependent protein kinase type II regulates basal level of aldosterone production by zona glomerulosa cells without increasing expression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *J Biol Chem* 278 (32): 29640-29648.

**Gao W, Bohl CE, Dalton JT** (2005) Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev* 105 (9): 3352-3370.

**Gak IA, Radovic SM, Dukic AR, Janjic MM, Stojkov-Mimic NJ, Kostic TS, Andric SA** (2015) Stress triggers mitochondrial biogenesis to preserve steroidogenesis in Leydig cells. *Biochim Biophys Acta* 1853 (10 Pt A): 2217-2227.

**Gnessi L, Fabbri A, Spera G** (1997) Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 18 (4): 541-609.

**Glister C, Satchell L, Bathgate RA, Wade JD, Dai Y, Ivell R, Anand-Ivell R, Rodgers RJ, Knight PG** (2013) Functional link between bone morphogenetic proteins and insulin-like 3 signaling in modulating ovarian androgen production. *Proc Natl Acad Sci USA* 110 (15): E1426-E1435.

**Godinho RO, Duarte T, Pacini ESA** (2015) New perspectives in signaling mediated by receptors coupled to stimulatory G protein: the emerging significance of cAMP efflux and extracellular cAMP-adenosine pathway. *Front Pharmacol* doi: 10.3389/fphar.2015.00058.

**Graham MR, Davies B, Grace FM, Kicman A, Baker JS** (2008) Anabolic steroid use: patterns of use and detection of doping. *Sports Med* 38 (6): 505-525.

**Habberfield AD, Dix CJ, Cooke BA** (1987) The dynamics of LH-induced desensitization of adenylate cyclase and LH receptor internalization in rat Leydig cells at physiological levels of LH. *J Endocrinol* 114 (3): 415-422.

**Hansson V, Skalhegg BS, Tasken K** (2000) Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 73 (1-2): 81-92.

**Hanukoglu I** (1992) Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43 (8): 779-804.

**Hales DB, Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, Hales KH** (2005) Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1061: 120-134.

**Hales DB, Sha LL, Payne AH** (1987) Testosterone inhibits cAMP-induced *de novo* synthesis of Leydig cell cytochrome P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  by an androgen receptor-mediated mechanism. *J Biol Chem* 262 (23): 11200-11206.

**Hales KH, Diemer T, Ginde S, Shankar BK, Roberts M, Bosmann HB, Hales DB** (2000) Diametric effects of bacterial endotoxin lipopolysaccharide on adrenal and Leydig cell steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 141 (11): 4000-4012.

**Hall PF** (1991) Cytochrome P-450<sub>scc</sub>: one enzyme with two actions: hydroxylase and lyase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40 (4-6): 527-532.

**Hartgens F, Kuipers H** (2004) Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med* 34 (8): 513-554.

**Hauet T, Yao Z, Bose HS, Wall CT, Han Z, Li W, Hales DB, Miller WL, Culty M, Papadopoulos V** (2005) Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into Leydig cell mitochondria. *Mol Endocrinol* 19 (2): 540-554.

**Hoivik EA, Lewis AE, Aumo L, Bakke M** (2010) Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Mol Cell Endocrinol* 315 (1-2): 27-39.

**Houk CP, Pearson EJ, Martinelle N, Donahoe PK, Teixeira J** (2004) Feedback inhibition of steroidogenic acute regulatory protein expression *in vitro* and *in vivo* by androgens. *Endocrinology* 145 (3): 1269-1275.

**Hutson JC** (2006) Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 231 (1): 1-7.

**Hu J, Zhang Z, Shen W-J, Azhar S** (2010) Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond.)* 7: 47.

**Imperlini E, Mancini A, Alfieri A, Martone D, Caterino M, Orrù S, Buono P** (2015) Molecular effects of supraphysiological doses of doping agents on health. *Mol Biosyst* 11 (6): 1494-1506.

**Issop L, Fan J, Lee S, Rone MB, Basu K, Mui J, Papadopoulos V** (2015) Mitochondria-associated membrane formation in hormone-stimulated Leydig cell steroidogenesis: role of ATAD3. *Endocrinology* 156 (1): 334-345.

**Ivell R, Heng K, Anand-Ivell R** (2014) Insulin-like factor 3 and the HPG axis in the male. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:6. doi: 10.3389/fendo.2014.00006.

**Ivell R, Wade JD, Anand-Ivell R** (2013) INSL3 as a biomarker of Leydig cell functionality. *Biol Reprod* 88 (6): 147, 1-8.

**Iyer AK, McCabe ER** (2004) Molecular mechanisms of DAX1 action. *Mol Genet Metab* 83 (1-2): 60-73.

**Jackson EK, Raghvendra** (2004) The extracellular cyclic AMP-adenosine pathway in renal physiology. *Annu Rev Physiol* 66: 571-599.

**Janjic MM, Stojkov NJ, Andric SA, Kostic TS** (2012) Anabolic-androgenic steroids induce apoptosis and NOS2 (nitric-oxyde synthase 2) in adult rat Leydig cells following in vivo exposure. *Reprod Toxicol* 34 (4): 686-693.

**Jeong BC, Hong CY, Chattopadhyay S, Park JH, Gong EY, Kim HJ, Chun SY, Lee K** (2004) Androgen receptor corepressor-19 kDa (ARR19), a leucine-rich protein that represses the transcriptional activity of androgen receptor through recruitment of histone deacetylase. *Mol Endocrinol* 18 (1): 13-25.

**Jo Y, King SR, Khan SA, Stocco DM** (2005) Involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent kinase in steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid biosynthesis in Leydig cells. *Biol Reprod* 73 (2): 244-255.

**Kadi F** (2008) Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. *Br J Pharmacol* 154 (3): 522-528.

**Kanayama G, Hudson JI, Pope HG Jr** (2010) Illicit anabolic-androgenic steroid use. *Horm Behav* 58 (1): 111-121.

**Kavarthapu R, Tsai-Morris CH, Fukushima M, Pickel J, Dufau ML** (2013) A 5'-flanking region of gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25) gene directs its cell-specific androgen-regulated gene expression in testicular germ cells. *Endocrinology* 154 (6): 2200-2207.

**Kicman AT** (2008) Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol* 154 (3): 502-521.

**King SR, LaVoie HA** (2012) Gonadal Transactivation of STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Front Biosci* 17: 824-846.

**Klinefelter GR, Hall PF, Ewing LL** (1987) Effect of luteinizing hormone deprivation in situ on steroidogenesis of rat Leydig cells purified by a multistep procedure. *Biol Reprod* 36 (3): 769-783.

**Klokk TI, Kurys P, Elbi C, Nagaich AK, Hendarwanto A, Slagsvold T, Chang CY, Hager GL, Saatcioglu F** (2007) Ligand-specific dynamics of the androgen receptor at its response element in living cells. *Mol Cell Biol* 27 (5): 1823-1843.

**Kostic TS, Stojkov NJ, Bjelic MM, Mihajlovic AI, Janjic MM, Andric SA** (2011) Pharmacological doses of testosterone upregulated androgen receptor and 3-beta-hydroxysteroid

dehydrogenase/delta-5-delta-4 isomerase and impaired Leydig cells steroidogenesis in adult rats. *Toxicol Sci* 121 (2): 397-407.

**Lague E, Tremblay JJ** (2008) Antagonistic effects of testosterone and the endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate on INSL3 transcription in Leydig cells. *Endocrinology* 149 (9): 4688-4694.

**Lavoie HA, King SR** (2009) Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med* 234 (8): 880-907.

**Lefrancois-Martinez AM, Blondet-Trichard A, Binart N, Val P, Chambon C, Sahut-Barnola I, Pointud JC, Martinez A** (2011) Transcriptional control of adrenal steroidogenesis: novel connections between Janus kinase (JAK) 2 protein and protein kinase A (PKA) through stabilization of cAMP response element-binding protein (CREB) transcription factor. *J Biol Chem* 286 (38): 32976-32985.

**Levy I, Horvath A, Azevedo M, de Alexandre RB, Stratakis CA** (2011) Phosphodiesterase function and endocrine cells: links to human disease and roles in tumor development and treatment. *Curr Opin Pharmacol* 11 (6): 689-697.

**Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, Saez JM, Langlois D** (1999) Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69 (1-6): 379-384.

**Lin T, Wang D, Hu J, Stocco DM** (1998) Upregulation of human chorionic gonadotrophin-induced steroidogenic acute regulatory protein by insulin-like growth factor-I in rat Leydig cells. *Endocrine* 8 (1): 73-78.

**Li J, Al-Azzawi F** (2009) Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* 63 (2): 142-148.

**Li J, Feltzer RE, Dawson KL, Hudson EA, Clark BJ** (2003) Janus kinase 2 and calcium are required for angiotensin II-dependent activation of steroidogenic acute regulatory protein transcription in H295R human adrenocortical cells. *J Biol Chem* 278 (52): 52355-52362.

**Lugnier C** (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109 (3): 366-398.

**Manna PR, Chandrala SP, King SR, Jo Y, Counis R, Huhtaniemi IT, Stocco DM** (2006) Molecular mechanisms of insulin-like growth factor-I mediated regulation of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig cells. *Mol Endocrinol* 20 (2): 362-378.

**Manna PR, Dyson MT, Jo Y, Stocco DM** (2009a) Role of dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome, gene 1 in protein kinase A- and protein kinase C-mediated regulation of the steroidogenic acute regulatory protein expression in mouse Leydig tumor cells: mechanism of action. *Endocrinology* 150 (1): 187–199.

**Manna PR, Huhtaniemi IT, Stocco DM** (2009b) Mechanisms of protein kinase C signaling in the modulation of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated steroidogenesis in mouse gonadal cells. *Endocrinology* 150 (7): 3308-3317.

**Manna PR, Huhtaniemi IT, Wang XJ, Eubank DW, Stocco DM** (2002) Mechanisms of epidermal growth factor signaling: regulation of steroid biosynthesis and the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig tumor cells. *Biol Reprod* 67 (5): 1393-1404.

**Manna PR, Jo Y, Stocco DM** (2007) Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling. *J Endocrinol* 193 (1): 53-63.

**Manna PR, Pikarinen P, El-Hefnawy T, Huhtaniemi IT** (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 PR, Soh JW, Stocco DM** (2011) The involvement of specific PKC isoenzymes in phorbol ester-mediated regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid synthesis in mouse Leydig cells. *Endocrinology* 152 (1): 313-325.

**Maris P, Campana A, Barone I, Giordano C, Morelli C, Malivindi R, Sisci D, Aquila S, Rago V, Bonofiglio D, Catalano S, Lanzino M, Andò S** (2015) Androgens inhibit aromatase expression through DAX-1: insights into the molecular link between hormone balance and Leydig cancer development. *Endocrinology* 156 (4): 1251-1262.

**Martinelle 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.

**Martin LJ, Boucher N, Brousseau C, Tremblay JJ** (2008) The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I. *Mol Endocrinol* 22 (9): 2021-2037.



**Martin LJ, Tremblay JJ** (2010) Nuclear receptors in Leydig cell gene expression and function. *Biol Reprod* 83 (1): 3-14.

**Mauduit C, Gasnier F, Rey C, Chauvin MA, Stocco DM, Louisot P, Benahmed M** (1998) Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits Leydig cell steroidogenesis through a decrease in steroidogenic acute regulatory protein expression. *Endocrinology* 139 (6): 2863-2868.

**McNally JG, Muller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL** (2000) The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* 287 (5456): 1262-1265.

**Mehats C, Andersen CB, Filopanti M, Jin SL, Conti M** (2002) Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol Metab* 13 (1): 29-35.

**Midzak A, Rone M, Aghazadeh Y, Culty M, Papadopoulos V** (2011) Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 336 (1-2): 70-79.

**Miller WL, Auchus RJ, Geller DH** (1997) The regulation of 17, 20 lyase activity. *Steroids* 62 (1): 133-142.

**Miller WL** (2007) StAR search – what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Mol Endocrinol* 21 (3): 589-601.

**Miller WL** (2013) Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 379 (1-2): 62-73.

**Mizutani T, Yamada K, Minegishi T, Miyamoto K** (2000) Transcriptional regulation of rat scavenger receptor class B type I gene. *J Biol Chem* 275 (29): 22512–22519.

**Nebert DW, Wikvall K, Miller WL** (2013) Human cytochrome P450 in health and disease. *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci* 368 (1612): 20120431.

**Nef S, Parada LF** (1999) Cryptorchidism in mice mutant for Ins13. *Nat Genet* 22 (3): 295-299.

**Newmeyer DD, Ferguson-Miller S** (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112 (4): 481–490.

**Nieschlag E, Vorona E** (2015) MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: effects on reproductive functions. *Eur J Endocrinol* 173 (2): R47-58.

**Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P, Karsenty G** (2011) Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 144 (5): 796-809.

**O'Shaughnessy PJ, Johnston H, Willerton L, Baker PJ** (2002) Failure of normal Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J Cell Sci* 115 (Pt 17): 3491-3496.

**Pakarinen P, Niemimaa T, Huhtaniemi IT, Warren DW** (1994) Transcriptional and translational regulation of LH, prolactin and their testicular receptors by hCG and bromocriptine treatments in adult and neonatal rats. *Mol Cell Endocrinol* 101 (1-2): 37-47.

**Palikaras K, Tavernarakis N** (2014) Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol* 56: 182-188.

**Papadopoulos V, Amri H, Boujrad N, Cascio C, Culty M, Garnier M, Hardwick M, Li H, Vidic B, Brown AS, Reversa JL, Bernassau JM, Drieu K** (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 62 (1): 21-28.

**Papadopoulos V, Miller WL** (2012) Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26 (6): 771-790.

**Park SY, Meeks JJ, Raverot G, Pfaff LE, Weiss J, Hammer GD, Jameson JL** (2005) Nuclear receptors Sf1 and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development* 132 (10): 2415-2423.

**Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K** (2001) Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269 (1-2): 13-25.

**Pathirana IN, Kawate N, Bullesbach EE, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H** (2012) Insulin-like peptide 3 stimulates testosterone secretion in mouse Leydig cells via cAMP pathway. *Regul Pept* 178 (1-3): 102-106.

**Payne AH, Downing JR, Wong KL** (1980) Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells. *Endocrinology* 106 (5): 1424-1429.

**Payne AH, Hales DB** (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25 (6): 947-970.

**Payne AH, Sha LL** (1991) Multiple mechanisms for regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase, 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450,

and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells. *Endocrinology* 129 (3): 1429-1435.

**Payne AH, Youngblood GL, Sha L, Burgos-Trinidad M, Hammond SH** (1992) Hormonal regulation of steroidogenic enzyme gene expression in Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43 (8): 895-906.

**Payne AH** (1990) Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17-20</sub> lyase in Leydig cells. *Biol Reprod* 42 (3): 399-404.

**Pearen MA, Muscat GE** (2010) Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease. *Mol Endocrinol* 24 (10): 1891-1903.

**Poderoso C, Converso DP, Maloberti P, Duarte A, Neuman I, Galli S, Maciel FC, Paz C, Carreras MC, Poderoso JJ, Podestá EJ** (2008) A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis. *PLoS ONE* 3 (1): e1443.

**Poderoso C, Maloberti P, Duarte A, Neuman I, Paz C, Cornejo Maciel F, Podesta EJ** (2009) Hormonal activation of A kinase cascade localized at the mitochondria is required for StAR protein activity. *Mol Cell Endocrinol* 300 (1-2): 37-42.

**Pomara C, Barone R, Marino Gammazza A, Sangiorgi C, Barone F, Pitruzzella A, Locorotondo N, Di Gaudio F, Salerno M, Maglietta F, Sarni AL, Di Felice V, Cappello F, Turillazzi E** (2016) Effects of Nandrolone stimulation on testosterone biosynthesis in Leydig cells. *J Cell Physiol* 231 (6): 1385-1391.

**Pope HG Jr, Wood RI, Rogol A, Nyberg F, Bowers L, Bhasin S** (2014) Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 35 (3): 341-375.

**Puett D, Li Y, DeMars G, Angelova K, Fanelli F** (2007) A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol Cell Endocrinol* 260-262: 126-136.

**Punjabi U, Deslypere JP, Verdonck L, Vermeulen A** (1983) Androgen and precursor levels in serum and testes of adult rats under basal conditions and after hCG stimulation. *J Steroid Biochem* 19 (4): 1481-1490.

**Qamar I, Ahmad MF, Narayanasamy A** (2015) A time-course study of long term over-expression of ARR19 in mice. *Sci Rep* 5:13014. doi: 10.1038/srep13014.

**Qamar I, Gong EY, Kim Y, Song CH, Lee HJ, Chun SY, Lee K** (2010) Anti-steroidogenic factor ARR19 inhibits testicular steroidogenesis through the suppression of Nur77 transactivation. *J Biol Chem* 285 (29): 22360-22369.

**Qamar I, Park E, Gong EY, Lee HJ, Lee K** (2009) ARR19 (androgen receptor corepressor of 19 kDa), an antisteroidogenic factor, is regulated by GATA-1 in testicular Leydig cells. *J Biol Chem* 284 (27): 18021-18032.

**Rhainds D, Brissette L** (2004) The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. Defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol* 36 (1): 39-77.

**Roberts PJ, Der CJ** (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26 (22): 3291-3310.

**Rone MB, Fan J, Papadopoulos V** (2009) Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease state. *Biochim Biophys Acta* 1791 (7): 646-658.

**Rone MB, Midzak AS, Issop L, Rammouz G, Jagannathan S, Fan J, Ye X, Blonder J, Veenstra T, Papadopoulos V** (2012) Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol Endocrinol* 26 (11): 1868-1882.

**Saeed K, Tahir M, Lone KP** (2015) Effect of dactyliferia (date palm) pit powder on nicotine induced spermatotoxicity in adult albino mice. *J Pak Med Assoc* 65 (1): 43-48.

**Saez JM** (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15 (5): 574-626.

**Salerno M, Cascio O, Bertozzi G, Sessa F, Messina A, Monda V, Cipolloni L, Biondi A, Daniele A, Pomara C** (2018) Anabolic androgenic steroids and carcinogenicity focusing on Leydig cell: a literature review. *Oncotarget* 9 (27): 19415-19426.

**Schaffner W** (1988) Gene regulation. A hit-and-run mechanism for transcriptional activation? *Nature* 336 (6198): 427-428.

**Scott JD** (1991) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacol Ther* 50 (1): 123-145.

**Selvage DJ, Parsons L, Rivier C** (2006) Role played by brainstem neurons in regulating testosterone secretion via a direct neural pathway between the hypothalamus and the testes. *Endocrinology* 147 (6): 3070-3075.

**Selvaraj V, Stocco DM, Clark BJ** (2018) Current knowledge on the acute regulation of steroidogenesis. *Biol Reprod* doi: 10.1093/biolre/ioy102.

**Setchell BP, Pakarinen P, Huhtaniemi I** (2002) How much LH do the Leydig cells see? *J Endocrinol* 175 (2): 375-382.

**Sewer MB, Waterman MR** (2003a) cAMP-dependent protein kinase enhances CYP17 transcription via MKP-1 activation in H295R human adrenocortical cells. *J Biol Chem* 278 (10): 8106-8111.

**Sewer MB, Waterman MR** (2003b) ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Micros Res Tech* 61 (3):300-307.

**Sharpe RM, Cooper I** (1983) Testicular interstitial fluid as a monitor for changes in the intratesticular environment in the rat. *J Reprod Fertil* 69 (1): 125-135.

**Sharpe RM** (1980) Temporal relationship between interstitial fluid accumulation and changes in gonadotropin receptor numbers and steroidogenesis in the rat testis. *Biol Reprod* 22 (4): 851-857.

**Sharpe RM** (1981) The importance of testicular interstitial fluid in the transport of injected hCG to the Leydig cells. *Int J Androl* 4 (1): 64-74.

**Sharpe RM** (1984) Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod* 30 (1): 29-49.

**Shih MC, Hsu NC, Huang CC, Wu TS, Lai PY, Chung BC** (2008) Mutation of mouse *Cyp11a1* promoter caused tissue-specific reduction of gene expression and blunted stress response without affecting reproduction. *Mol Endocrinol* 22 (4): 915-923.

**Shi Y, Schonemann MD, Mellon SH** (2009) Regulation of P450c17 expression in the early embryo depends on GATA factors. *Endocrinology* 150 (2): 946-956.

**Sierens J, Jakody I, Poobalan Y, Meachem SJ, Knower K, Young MJ, Sirianni R, Pezzi V, Clyne CD** (2010) Localization and regulation of aromatase liver receptor homologue-1 in the developing rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 323 (2): 307-13.

**Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA and Melner MH** (2005) Molecular biology of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase/D5-D 4 isomerase gene family. *Endoc Rev* 26 (4): 525–582.

**Sinha-Hikim I, Taylor WE, Gonzales-Cadavid NF, Zheng W, Bhasin S** (2004) Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (10): 5245-5255.

**Song KH, Park YY, Park KC, Hong CY, Park JH, Shong M, Lee K, Choi HS** (2004) The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation. *Mol Endocrinol* 18 (8): 1929-1940.

**Song M, Shao H, Mujeeb A, James TL, Miller WL** (2001) Molten-globule structure and membrane binding of the N-terminal protease-resistant domain (63-193) of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Biochem J* 356 (Pt 1): 151-158.

**Steer ML** (1975) Adenyl cyclase. *Ann Surg* 182 (5): 603-609.

**Stocco DM, Clark BJ, Reinhart AJ, Williams SC, Dyson M, Dassi B, Walsh LP, Manna PR, Wang X, Zeleznik AJ, Orly J** (2001) Elements involved in the regulation of StAR gene. *Mol Cell Endocrinol* 177 (1-2): 55-59.

**Stocco DM, Clark BJ** (1996) Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 17 (3): 221-244.

**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 DM** (2001) StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63: 193-213.

**Stojilkovic SS, Kretschmannova K, Tomić M, Stratakis CA** (2012) Dependence of the excitability of pituitary cells on cyclic nucleotides. *J Neuroendocrinol* 24 (9): 1183-1200.

**Stojkov NJ, Baburski AZ, Bjelic MM, Sokanovic SJ, Mihajlovic AI, Drljaca DM, Janjic MM, Kostic TS, Andric SA** (2014) In vivo blockade of  $\alpha$ 1-adrenergic receptors mitigates stress-disturbed cAMP and cGMP signaling in Leydig cells. *Mol Hum Reprod* 20 (1): 77-88.

**Sunahara RK, Taussig R** (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* 2 (3): 168-184.

**Tahka KM** (1986) Current aspects of Leydig cell function and its regulation. *J Reprod Fertil* 78 (2): 367-380.

**Tan SH, Dagvadorj A, Shen F, Gu L, Liao Z, Abdulghani J, Zhang Y, Gelmann EP, Zellweger T, Culig Z, Visakorpi T, Bubendorf L, Kirken RA, Karras J, Nevalainen MT** (2008) Transcription factor Stat5 synergizes with androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* 68 (1): 236-248.

**Taylor SS, Kim C, Cheng CY, Brown SH, Wu J, Kannan N** (2008) Signaling through cAMP and cGMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1784 (1): 16-26.

**Taylor SS, Yang J, Wu J, Haste NM, Radzio-Andzelm E, Anand G** (2004) PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1697 (1-2): 259-269.

**Tesmer JJ, Sprang SR** (1998) The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol* 8 (6): 713-719.

**Trabado S, Maione L, Bry-Gauillard H, Affres H, Salenave S, Sarfati J, Bouvattier C, Delemer B, Chanson P, Le Bouc Y, Brailly-Tabard S, Young J** (2014) Insuline-like peptide 3 (INSL3) in men with congenital hypogonadotropic hypogonadism/Kallmann syndrome and effects of different modalities of hormonal treatment: a single-center study of 281 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 99 (2): E268-275.

**Tremblay JJ, Viger RS** (2003) Transcription factor GATA-4 is activated by phosphorylation of serine 261 via the cAMP/protein kinase A signaling pathway in gonadal cells. *J Biol Chem* 278 (24): 22128-22135.

**Tremblay JJ** (2015) Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids* 103: 3-10.

**Tsai-Morris CH, Sato H, Gutti R, Dufau ML** (2012) Role of gonadotropin regulated testicular RNA helicase (GRTH/Ddx25) on polysomal associated mRNAs in mouse testis. *PLoS One* 7 (3): e32470.

**Tsai LC, Beavo JA** (2011) The roles of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in steroidogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 11 (6): 670-675.

**Valenti S, Cuttica CM, Fazzuoli L, Giordano G, Giusti M** (1999) Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified rat Leydig cells cultured *in vitro*. *Int J Androl* 22 (5): 336-341.

**van Amsterdam J, Opperhuizen A, Hartgens F** (2010) Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. *Regul Toxicol Pharmacol* 57 (1): 117-123.

**Vezzosi D, Berthart J** (2011) Phosphodiesterases in endocrine physiology and disease. *Eur J Endocrinol* 165 (2): 177-188.

**Villar J, Tsai-Morris CH, Dai L, Dufau ML** (2012) Androgen-induced activation of gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/Ddx25) transcription: essential role of a nonclassical androgen response element half-site. *Mol Cell Biol* 32 (8): 1566-1580.

**Waeber C, Reymond O, Reymond M, Lemarchand-Beraud T** (1983) Effects of hyper and hypoprolactinemia on gonadotropin secretion, rat testicular luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors and testosterone production by isolated Leydig cells. *Biol Reprod* 28 (1): 167-177.

**Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C** (2009) Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev* 30 (2): 119-132.

**Wang ZJ, Jeffs B, Ito M, Achermann JC, Yu RN, Hales DB, Jameson JL** (2001) Aromatase (Cyp19) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (14): 7988-7993.

**Weinbauer GF, Jackwerth B, Yoon YD, Behre HM, Yeung CH, Nieschlag E** (1990) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of testosterone enanthate and dihydrotestosterone enanthate in non-human primates. *Acta Endocrinol (Copenh)* 122 (4): 432-442.

**Weinbauer GF, Schlatt S, Walter V, Nieschlag E** (2001) Testosterone-induced inhibition of spermatogenesis is more closely related to suppression of FSH than to testicular androgen levels in the monkey model (*Macaca fascicularis*). *J Endocrinol* 168 (1): 25-38.

**Welsh M, Sharpe RM, Moffat L, Atanassova N, Saunders PT, Kilter S, Bergh A, Smith LB** (2010) Androgen action via testicular arteriole smooth muscle cells is important for Leydig cell function, vasomotion and testicular fluid dynamics. *PLoS One* 5 (10): e13632.

**Widmark A, Damber JE, Bergh A** (1989) High and low doses of luteinizing hormone induce different changes in testicular microcirculation. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121 (5): 621-627.



**Wilkie TM, Chen Y, Gilbert DJ, Moore KJ, Yu L, Simon MI, Copeland NG, Jenkins NA** (1993) Identification, chromosomal location, and genome organization of mammalian G-protein-coupled receptors. *Genomics* 18 (2): 175-184.

**Winters SJ, Ishizaka K, Kitahara S, Troen P, Attardi B** (1992) Effects on testosterone on gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 130 (2): 726-734.

**Xing X, Zhang Z, Zhong L, Ju G, Zou X, Zhu Y, Sun J** (2016) Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into steroidogenic cells *in vitro*. *Exp Ther Med* 12 (6): 3527-3534.

**Yamashita S, Tai P, Charron J, Ko C, Ascoli M** (2011) The Leydig cell MEK/ERK pathway is critical for maintaining a functional population of adult Leydig cells and for fertility. *Mol Endocrinol* 25 (7): 1211-1222.

**Yao HH, Whoriskey W, Capel B** (2002) Desert hedgehog/patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* 16 (11): 1433-1440.

**Young M, McPhaul MJ** (1998) A steroidogenic factor-1-binding site and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response element-like elements are required for the activity of the rat aromatase promoter in rat Leydig tumor cell lines. *Endocrinology* 139 (12): 5082-5093.

**Zhang P, Mellon SH** (1997) Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action. *Mol Endocrinol* 11 (7): 891-904.

**Zhang Y, Dufau ML** (2003a) Dual mechanisms of regulation of transcription of luteinizing hormone receptor gene by nuclear orphan receptors and histone deacetylase complexes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85 (2-5): 401-414.

**Zhang Y, Dufau ML** (2003b) Repression of the luteinizing hormone receptor gene promoter by cross talk among EAR3/COUP-TFI, Sp1/Sp3, and TFIIB. *Mol Cell Biol* 23 (19): 6958-6972.

**Zhang Y, Yang H, Han L, Li F, Zhang T, Pang J, Feng X, Ren C, Mao S, Wang F** (2017) Long noncoding RNA expression profile changes associated with dietary energy in the sheep testis during sexual maturation. *Sci Rep* 7 (1): 5180.

**Zirkin BR** (2010) Where do adult Leydig cells come from? *Biol Reprod* 82 (6): 1019-1020.

## BIOGRAFIJA



Maja Srbovan (prethodno Bjelić) rođena je u Zrenjaninu 01.08.1986. godine, gde je završila osnovnu školu i Zrenjaninsku gimnaziju. Osnovne akademske studije Molekularne biologije upisala je 2005. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, koje je završila 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,50/10,0. Zvanje Diplomirani biolog-master, molekularni biolog stekla je 2010. godine, takođe na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, sa postignutom prosečnom ocenom tokom studija 9,73/10,00. Doktorske akademske studije Biologije, modul Animalna i humana fiziologija, upisala je 2010. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Iste godine angažovana je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva Prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a u okviru Laboratorije za Reproductivnu endokrinologiju i signaling. 2011. godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik, a 2014. godine u zvanje asistent za užu naučnu oblast Fiziologija životinja na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. Od 2017. godine zaposlena je u BiologicsHub d.o.o. u Novom Sadu kao istraživač zadužen za ekstrakciju naučnih podataka i analizu naučne literature uz pisanje revija. Bila je uključena u realizaciju dva projekta Ministarstva Prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, jednog projekta Autonomne pokrajine Vojvodine, jednog međuvladinog projekta bilateralne saradnje između Republike Srbije i Republike Slovenije, kao i jednog SCOPES projekta Švajcarske nacionalne fondacije za nauku. Kao prvi autor objavila je 2 rada u časopisima međunarodnog značaja kategorije M21, 3 kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja kategorije M34 i 2 kongresna saopštenja na skupovima domaćeg značaja kategorije M64. U koautorstvu je objavila 11 radova kategorije M21, 16 saopštenja kategorije M34 i 7 saopštenja kategorije M64.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Маја М. Србован \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ Б3056/2010 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Функционалност и образац сигналних путева Лајдигових ћелија одраслих пацова након примене анаболичких андрогених стероида”

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Маја М. Србован \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3056/2010 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Функционалност и образац сигналних путева Лајдигових ћелија одраслих пацова након примене анаболичких андрогених стероида \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ проф. др Силвана Андрић и проф. др Небојша Јаснић \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_ Маја М. Србован \_\_\_\_\_

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Функционалност и образац сигналних путева Лајдигових ћелија одраслих пацова након примене анаболичких андрогених стероида

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.