

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Dragana D. Samardžija Nenadov

**UTICAJ ATRAZINA I BISFENOLA A NA FUNKCIJU  
GRANULOZA ĆELIJA OVARIJUMA PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Dragana D. Samardzija Nenadov

**EFFECTS OF ATRAZINE AND BISPHENOL A ON  
THE RAT OVARIAN GRANULOSA CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

## **MENTORI:**

dr Nebojša Andrić, docent

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

dr Nebojša Jasnić, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

## **KOMISIJA:**

dr Nebojša Andrić, docent

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

dr Nebojša Jasnić, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Đorđević, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Kristina Pogrmić-Majkić, naučni saradnik

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane.....

## **SPISAK RADOVA U KOJIMA JE PRIKAZAN DEO REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE**

1. Samardzija D, Pogrmic-Majkic K, Fa S, Glisic B, Stanic B, Andric N. (2016) Atrazine blocks ovulation via suppression of Lhr and Cyp19a1 mRNA and estradiol secretion in immature gonadotropin-treated rats. *Reprod Toxicol.* 61:10-18.
2. Pogrmic-Majkic K, Samardzija D, Fa S, Hrubik J, Glisic B, Kaisarević S, Andric N. (2014) Atrazine Enhances Progesterone Production Through Activation of Multiple Signaling Pathways in FSH-Stimulated Rat Granulosa Cells: Evidence for Premature Luteinization. *Biol Reprod.* 91(5):124, 1-10.
3. Fa S, Pogrmic-Majkic K, Samardzija D, Glisic B, Kaisarević S, Kovacevic R, Andric N. (2013) Involvement of ERK1/2 signaling pathway in atrazine action on FSH-stimulated LHR and CYP19A1 expression in rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 270(1):1-8.
4. Samardzija D, Pogrmic-Majkic K, Fa S, Stanic B, Jasnic J, Andric N. Bisphenol A decreases progesterone synthesis by disrupting cholesterol homeostasis in rat granulosa cells. 2017 – rad na recenziji.

*Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta „Ksenobiotici sa hormonskom aktivnošću: reproduktivni, metabolički, razvojni odgovori i mehanizam dejstva kod odabranih model organizama i ćelijskih linija” (br. projekta 173037), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Radmile Kovačević, profesora emeritusa, kao i projekta „EcoSignal: Environmental Signaling and Ovarian Diseases Susceptibility”, (br. projekta 321745), MarieCurie CIG (FP7-2012), pod rukovodstvom doc. dr Nebojše Andrića.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. Radmili Kovačević na ukazanom poverenju, pomoći i savetima tokom realizacije ove doktorske disertacije.*

*Najveću zahvalnost dugujem mom mentoru dr Nebojši Andrić, pre svega na izuzetnoj posvećenosti i stručnosti u vođenju ove doktorske disertacije. Hvala na nemerljivom strpljenju i podršci, nesebičnoj pomoći, savetovanju i usmeravanju, kao i na dragocenom vremenu koje mi je pružio u svim fazama eksperimentalnog rada i pisanja ove doktorske disertacije. Hvala na svemu što me je naučio.*

*Puno hvala mojim dragim koleginicama, Kristini, Svetlani, Jeleni, Branki i Bojani od kojih sam mnogo toga naučila. Hvala na prijateljskoj podršci, savetima i pomoći tokom eksperimentalnog rada i pisanja ove doktorske disertacije.*

*Veliko hvala dragim koleginicama, Sonji, Mariji, Nataši, Maji, Savi, Isidori i Mariji i kolegama Srdji i Saši na lakim dogovorima, kolegijalnom i pre svega prijateljskom odnosu. Hvala Marici i Olji na lepoj saradnji.*

*Hvala Tomislavu Barni i Aleksandru Milovanoviću sa Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad” na reagensima i pripremi ploča za ELISA analizu.*

*Veliko hvala dugujem mom drugom mentoru dr Nebojši Jasniću i članovima komisije prof. dr Jeleni Djordjević i dr Kristini Pogrmić-Majkić na korisnim sugestijama koje su doprinele konačnom obliku ove doktorske disertacije.*

*Najveću zahvalnost dugujem mami Mariji, tati Draganu, Igoru, Svetlani i Davoru na beskrajnoj ljubavi, razmevanju i podršci, a posebno Filipu koji mi je život učinio lepšim i zanimljivijim.*

# UTICAJ ATRAZINA I BISFENOLA A NA FUNKCIJU GRANULOZA ĆELIJA OVARIJUMA PACOVA

## SAŽETAK

Atrazin (ATR), jedan od najčešće korišćenih herbicida, i bisfenol A (BPA), hemikalija koja ulazi u sastav plastike, pripadaju grupi endokrinih ometača koji, između ostalog, ispoljavaju negativne efekte na ženski reproduktivni sistem, prvenstveno na nivou steroidogeneze ovarijumskih granuloza ćelija. Cilj ove doktorske disertacije je da proširi saznanja o uticaju ATR i BPA na steroidogenezu granuloza ćelija, ukaže na nova mesta delovanja ovih endokrinih ometača, kao i da definiše mehanizme preko kojih ATR i BPA utiču na steroidogeni i ovulacioni potencijal granuloza ćelija. *In vitro* tretman primarne kulture granuloza ćelija sa 20  $\mu$ M ATR doveo je do smanjene produkcije estradiola i povećane produkcije progesterona, kao i promena na nivou ekspresije gena za protein uključene u steroidogenezu i diferencijaciju granuloza ćelija (aromataza, LHR, StAR, dezmolaza) i ovulaciju (AREG, EREG, PGR). Mehanizam delovanja ATR uključuje promene u aktivnosti cAMP/PKA, ERK1/2/CEBP $\beta$  i Akt signalnih puteva. *In vivo* tretman sa 50 mg/kg telesne mase ATR doveo je do smanjene ekspresije gena uključenih u kontrolu ovulacije (AREG, PGR) i izostanka ovulacije kod nezrelih ženki pacova tretiranih gonadotropinima. *In vitro* tretman nezrelih granuloza ćelija sa 100  $\mu$ M BPA doveo je do smanjenog stvaranja progesterona putem narušavanja homeostaze holesterola, što se ogleda u sekvestraciji holesterola u perinukleusnom prostoru, smanjenoj ekspresiji gena za protein ABCA1, zaduženog za efluks holesterola, i povećanoj ekspresiji StAR proteina uključenog u transport holesterola i SREBP-1 proteina neophodnog za sintezu holesterola. Dobijeni rezultati ukazuju na nove mehanizme preko kojih ATR i BPA utiču na funkciju granuloza ćelija ovarijuma, kao i na potencijal za razvoj bolesti ovarijuma.

**Ključne reči:** granuloza ćelije, atrazin, bisfenol A, steroidogeneza, ovulacija, signalni putevi

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Reproductivna fiziologija i toksikologija

**UDK broj:** [678.5+632.954]:[612.4:[611.651:577.175.6]](043.3)

# EFFECTS OF ATRAZINE AND BISPHENOL A ON THE RAT OVARIAN GRANULOSA CELLS

## ABSTRACT

Atrazine (ATR), a widely used herbicide, and bisphenol A (BPA), a chemical used in manufacturing of the polycarbonate plastics, belong to the group of endocrine disrupting chemicals. ATR and BPA exert adverse effects on ovarian granulosa cells' steroidogenesis. The aim of this study was to expand the knowledge on the effects of ATR and BPA, reveal new sites of ATR and BPA action in the ovary, and define the mechanisms through which ATR and BPA affect steroidogenic and ovulatory potential of granulosa cells. *In vitro* treatment of the primary culture of granulosa cells with 20  $\mu$ M ATR caused a decrease in estradiol production, an increase in progesterone production, as well as changes in the expression level of the genes involved in steroidogenesis and differentiation of granulosa cells (*Cyp19a1*, *Lhr*, *Star*, *Cyp11a1*) and ovulation (*Areg*, *Ereg*, *Pgr*). The mechanism of ATR action involved changes in the activity of cAMP/PKA, ERK1/2/CEBP $\beta$  and Akt signaling pathways. *In vivo* treatment with 50 mg/kg body weight ATR reduced the expression level of the ovulatory genes (*Ereg*, *Pgr*) and blocked ovulation in the gonadotropin-treated immature female rats. *In vitro* treatment of immature granulosa cells with 100  $\mu$ M BPA decreased progesterone production and altered cholesterol homeostasis, as evident by cholesterol sequestration to the perinuclear area, decrease in the expression level of the gene involved in cholesterol efflux (*Abca1*), and increase in the level of proteins involved in cholesterol transport (StAR) and biosynthesis (SREBP-1). Results reveal the novel mechanisms through which ATR and BPA impair function of ovarian granulosa cells, as well as the potential relationship between exposure to these endocrine disruptors and development of ovarian diseases.

**Key words:** granulosa cells, atrazine, bisphenol A, steroidogenesis, ovulation, cholesterol

**Research area:** Biology

**Area of special interest:** Reproductive physiology and toxicology

UDC number: [678.5+632.954]:[612.4:[611.651:577.175.6]](043.3)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Ovarijumi i folikulogeneza</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. Steroidogeneza u ovarijumima</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Signalni mehanizmi u steroidogenezi</b> .....	<b>7</b>
1.3.1. Signalni putevi koje u granuloza ćelijama aktivira FSH .....	7
1.3.2. Signalni putevi koje u granuloza ćelijama aktivira LH.....	10
<b>1.4. Ovulacija</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5. Endokrini ometači</b> .....	<b>13</b>
1.5.1. Izloženost endokrinim ometačima .....	14
1.5.2. Efekti endokrinih ometača na ljudski organizam .....	15
1.5.3. Mehanizmi delovanja endokrinih ometača .....	15
<b>1.6. Atrazin</b> .....	<b>17</b>
1.6.1. Metabolizam ATR.....	19
1.6.2. Biološki efekti ATR .....	20
1.6.3. Efekti ATR na ženski reproduktivni sistem.....	22
<b>1.7. Bisfenol A</b> .....	<b>23</b>
1.7.1. Izloženost ljudi BPA .....	24
1.7.2. Metabolizam BPA .....	26
1.7.3. Biološki efekti BPA .....	26
1.7.4. Efekti BPA na ženski reproduktivni sistem.....	29
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>31</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1. Hemikalije</b> .....	<b>35</b>
3.1.1. Hemikalije za RIA analizu .....	36
3.1.2. Hemikalije za kvantifikaciju genske ekspresije .....	36
3.1.3. Hemikalije za pERK1/2 enzimski imunotest (ELISA) na granuloza ćelijama i Western blot analizu.....	36
<b>3.2. Eksperimentalne životinje</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3. Eksperimentalni dizajn</b> .....	<b>37</b>
3.3.1. <i>In vitro</i> tretman primarne kulture nezrelih granuloza ćelija sa ATR .....	37



3.3.2. <i>In vivo</i> tretman nezrelih ženki pacova tretiranih gonadotropinima sa ATR .....	41
3.3.3. <i>In vitro</i> tretman primarne kulture nezrelih granulosa ćelija sa BPA.....	43
<b>3.4. Sulforodamin B (SRB) analiza za određivanje vijabilnosti ćelija .....</b>	<b>45</b>
<b>3.5. Određivanje koncentracije progesterona ELISA analizom.....</b>	<b>46</b>
<b>3.6. Određivanje koncentracije estradiola radioimunološkom analizom .....</b>	<b>47</b>
<b>3.7. Određivanje koncentracije cAMP ELISA analizom .....</b>	<b>48</b>
<b>3.8. Izolacija RNK i reverzna transkripcija .....</b>	<b>49</b>
<b>3.9. Relativna kvantifikacija genske ekspresije.....</b>	<b>49</b>
<b>3.10. pERK enzimski imunoesej (ELISA) na granulosa ćelijama.....</b>	<b>51</b>
<b>3.11. Određivanje aktivnosti glutation S-transferaze (GST) .....</b>	<b>52</b>
<b>3.12. Western blot.....</b>	<b>53</b>
3.12.1. Liziranje ćelija, određivanje koncentracije proteina i priprema uzoraka za natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforezu (SDS-PAGE) .....	53
3.12.2. SDS-PAGE, transfer proteina na PVDF membranu, detekcija i kvantifikacija proteina.....	53
<b>3.13. Bojenje Filipinom III .....</b>	<b>55</b>
<b>3.14. Statistička analiza .....</b>	<b>55</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1. <i>In vitro</i> efekat ATR na steroidogeni i ovulacioni potencijal granulosa ćelija .....</b>	<b>57</b>
4.1.1. Efekat ATR na sintezu estradiola u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH i 8-Br-cAMP .....	57
4.1.2. Efekat ATR na nivo iRNK za aromatazu i LHR u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH i 8-Br-cAMP.....	58
4.1.3. Efekat ATR na vijabilnost granulosa ćelija .....	59
4.1.4. Efekat ATR na nivo estradiola i iRNK za aromatazu i LHR u granulosa ćelijama tretiranim sa FSH i inhibitorom aktivacije ERK1/2 signalnog puta .....	59
4.1.5. Efekat ATR na nivo iRNK za proteine uključene u kontrolu procesa ovulacije tokom stimulacije granulosa ćelija sa hCG.....	61
4.1.6. Efekat ATR na nivo iRNK za CYP1B1 u granulosa ćelijama tokom stimulacije sa FSH .....	62
4.1.7. Efekat aktivacije AHR signalnog puta na nivo iRNK za LHR u granulosa ćelijama tretiranim sa FSH, kao i kombinacijom FSH i estradiola .....	63
4.1.8. Efekat ATR na produkciju progesterona i nivo iRNK za StAR, dezmolazu, ERβ i PGR tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH .....	64

4.1.9. Efekat ATR na nivo progesterona i iRNK za StAR i dezmolazu u granulosa ćelijama tretiranim sa FSH i inhibitorima aktivacije Akt i ERK1/2 signalnih puteva.....	65
4.1.10. Efekat ATR na fosforilaciju ERK1/2 u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH .....	66
4.1.11. Efekat ATR na fosforilaciju CREB i Akt i nivo C/EBP $\beta$ proteina u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH.....	67
4.1.12. Efekat ATR na nivo progesterona, iRNK za StAR i dezmolazu, fosforilaciju Akt i nivo C/EBP $\beta$ u granulosa ćelijama tretiranim sa aktivatorima cAMP/PKA i EGFR signalnih puteva .....	68
4.1.13. Efekat inhibitora PDE na fosforilaciju Akt, nivo C/EBP $\beta$ proteina i iRNK za StAR u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH i kombinacijom FSH i ATR.....	70
4.1.14. Efekat ATR na odnos progesterona i estradiola tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH.....	72
<b>4.2. <i>In vivo</i> efekat ATR na steroidogeni i ovulacioni potencijal granulosa ćelija.....</b>	<b>73</b>
4.2.1. Efekat ATR na broj oocita i nivo iRNK za proteine uključene u kontrolu procesa ovulacije kod nezrelih ženki pacova tretiranih gonadotropinima.....	73
4.2.2. Efekat ATR na nivo estradiola u serumu i iRNK za aromatazu, LHR i dezmolazu u granulosa ćelijama nezrelih ženki pacova tretiranih sa eCG .....	74
4.2.3. Efekat ATR na nivo iRNK za CYP1B1 u granulosa ćelijama, i na aktivnost GST enzima u ovarijumima nezrelih ženki pacova tretiranih sa eCG.....	76
<b>4.3. <i>In vitro</i> efekat BPA na steroidogeni potencijal granulosa ćelija.....</b>	<b>77</b>
4.3.1. Efekat BPA na vijabilnost granulosa ćelija .....	77
4.3.2. Efekat BPA na ekspresiju gena za StAR u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH .....	77
4.3.3. Efekat BPA na nivo iRNK za dezmolazu i 3 $\beta$ -HSD u bazalnim uslovima.....	79
4.3.4. Efekat BPA na produkciju progesterona u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH .....	79
4.3.5. Efekat BPA na distribuciju i nivo holesterola u bazalnim uslovima .....	80
4.3.6. Efekat BPA na nivo iRNK za proteine uključene u regulaciju homeostaze holesterola u bazalnim uslovima.....	81
4.3.7. Efekat kombinacije holesterola i BPA na ekspresiju gena za StAR i nivo iRNK za ABCA1 u granulosa ćelijama.....	82
4.3.8. Efekat kombinacije različitih steroidogenih supstrata i BPA na produkciju progesterona u granulosa ćelijama .....	83
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>85</b>
<b>5. 1. Efekat ATR na steroidogeni i ovulacioni potencijal granulosa ćelija.....</b>	<b>86</b>

5.1.1. <i>In vitro</i> efekat ATR.....	86
5.1.2. <i>In vivo</i> efekat ATR .....	92
<b>5.2. Efekat BPA na steroidogeni potencijal granuloza ćelija.....</b>	<b>95</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>99</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>102</b>

# **1. UVOD**

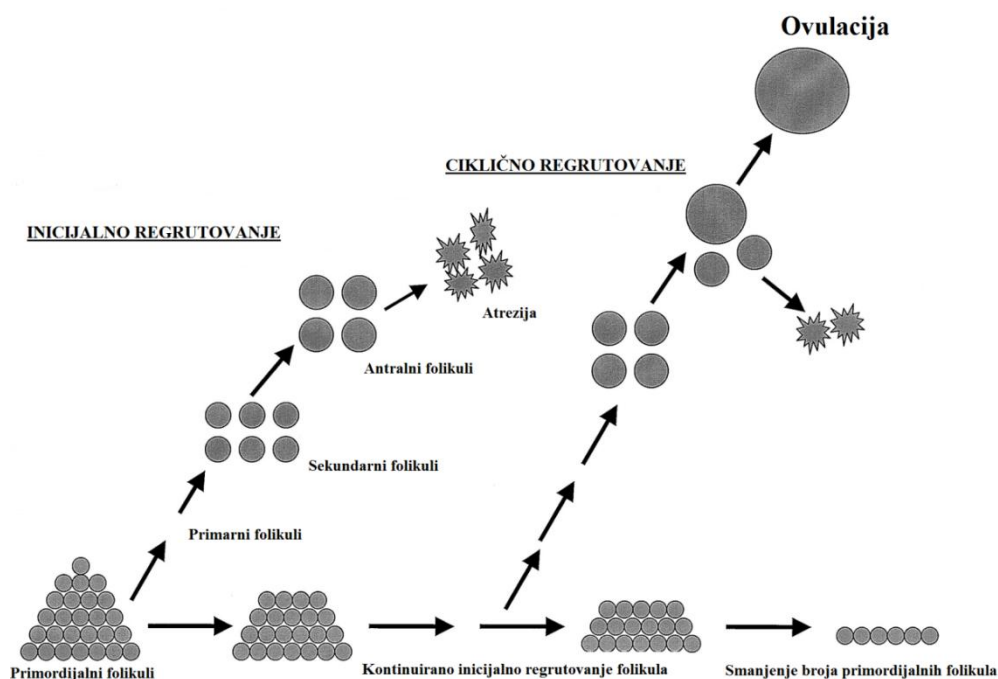
## 1.1. Ovarijumi i folikulogeneza

Ovarijumi predstavljaju deo ženskog reproduktivnog sistema čija je osnovna uloga oslobađanje zrele oocite u cilju fertilizacije i uspešnog produžavanja vrste. Osim toga, ovarijumi imaju i endokrinu ulogu, budući da su uključeni u sintezu steroidnih hormona koji kontrolišu razvoj i funkciju ovarijuma, ispoljavanje ženskih sekundarnih polnih karakteristika, kao i održavanje trudnoće.

Folikul predstavlja osnovnu funkcijsku jedinicu ovarijuma. Folikuli ovarijuma sisara sastoje se od unutrašnje oocite, okružene jednim ili više slojeva folikulskih (granuloza) ćelija, i spoljašnjeg sloja teka ćelija. Tokom razvoja, folikul prolazi kroz stadijume primordijumskog, primarnog, sekundarnog (preantrumskog), tercijarnog (antrumskog) i preovulacijskog (Grafovog) folikula. Razvoj folikula od primordijumskog do antrumskog stadijuma odvija se kontinuirano i nezavisno od delovanja gonadotropnih hormona, a započinje inicijalnim regrutovanjem folikula. U antrumskoj fazi, zahvaljujući cikličnoj stimulaciji gonadotropinima, mali broj folikula dostiže preovulacionu fazu koja se javlja nakon puberteta, dok ostatak podleže degenerativnim promenama označenim kao atrezija. Ovaj proces označen je kao ciklično regrutovanje folikula (McGee i Hsueh, 2000) (Slika 1.1).

Formiranje primordijumskih folikula kod žena započinje pre rođenja, pri čemu se maksimalni broj od 7 miliona primordijumskih folikula dostiže oko 20. nedelje embrionalnog razvoja. Broj folikula tokom fetusnog razvoja dramatično se smanjuje, tako da u trenutku rođenja postoji oko 300 000 do 400 000, dok u periodu nastupanja puberteta u ovarijumima žena preostane približno 200 000 primordijumskih folikula. Tokom reproduktivnog perioda, zahvaljujući kontinuiranom regrutovanju, odnosno rastu primordijumskih i primarnih folikula i njihovom prelasku u kasnije stadijume, dolazi do postepenog smanjenja ovarijumske rezerve folikula, što za posledicu ima pojavu menopauze (McGee i Hsueh, 2000). Kod žena proces sazrevanja Grafovog folikula od primordijumskih traje približno godinu dana (Erickson, 2009). Kod pacova se formiranje primordijumskih folikula završava do trećeg dana života, a razvoj

folikula se odvija mnogo brže nego kod žena. Vreme potrebno da regrutovani primordijumski folikul dostigne preantrumski stadijum iznosi više od 30 dana, dok transformacija sekundarnog u rani antrumski folikul traje približno 28 dana. Kada folikuli dostignu rani antrumski stadijum, podležu cikličnom regrutovanju, tako da nakon 2–3 dana dostižu preovulacioni stadijum (McGee i Hsueh, 2000).



**Slika 1.1.** Inicijalno i ciklično regrutovanje folikula. Preuzeto iz McGee and Hsueh (2000) uz modifikacije. Detalji u tekstu.

Folikulo-stimulišući hormon (FSH) se oslobađa iz hipofize i odgovoran je za razvoj folikula od antrumskog do preovulacionog stadijuma, aktivacijom FSH receptora na membrani nezrelih granuloza ćelija. Nakon vezivanja FSH za receptor dolazi do proliferacije, rasta i diferencijacije granuloza ćelija. U granuloza ćelijama stimulisanim sa FSH povećava se ekspresija gena za protein ciklin D2, koji se vezuje za ciklin zavisne kinaze 4, što inicira progresiju kroz G1 fazu ciklusa i proliferaciju granuloza ćelija. Pored toga, FSH povećava ekspresiju aromataze, enzima odgovornog za konverziju androgena u  $17\beta$ -estradiol, kao i receptora luteinizirajućeg hormona (engl. *luteinizing hormone receptor*; LHR) (Shimada i Yamashita, 2011). Tokom razvoja

folikula pod uticajem FSH dolazi do funkcionalnog razdvajanja granuloza ćelija na muralne i kumulusne ćelije. Muralne ćelije okružuju antrum i eksprimiraju steroidogene gene, uključujući aromatazu i dezmolazu (engl. *cholesterol side-chain cleavage enzyme*, CYP11A1), kao i LHR. Kumulusne ćelije okružuju oocitu, ne eksprimiraju steroidogene gene, ali je pokazana specifična ekspresija anti-milerovog hormona, receptora za androgene hormone i grupe proteina koji učestvuju u formiranju vanćelijskog matriksa (Diaz i sar., 2007). Različita ekspresija gena između muralnih i kumulusnih ćelija je posledica delovanja parakrinih faktora iz oocite (Eppig i sar., 1997). Međutim, ekspresija i prisustvo LHR detektovana je na membrani humanih kumulusnih granuloza ćelija (Baumgarten i sar., 2014). Otpuštanje LH iz hipofize dovodi do daljeg razvoja folikula od preovulacionog do ovulacionog stadijuma, ovulacije i formiranja žutog tela.

## **1.2. Steroidogeneza u ovarijumima**

Estrogeni i progesteron predstavljaju steroidne hormone koji se stvaraju u ovarijumima pod dejstvom FSH, odnosno LH. Sinteza estrogena se odvija po modelu "dva gonadotropina, dva ćelijska tipa", s obzirom da uključuje nekoliko enzimskih reakcija koje se odvijaju u teka i granuloza ćelijama ovarijuma. U teka ćelijama se pod uticajem LH sintetišu androgeni, koji difunduju preko bazalne membrane do granuloza ćelija, gde se pod uticajem FSH prevode u estrogene. Sinteza progesterona se u manjoj meri odvija u granuloza ćelijama tokom razvoja antrumskog folikula pod dejstvom FSH, dok se mnogo veće količine ovog steroidnog hormona stvaraju u preovulacionim granuloza ćelijama, kao i luteinskim ćelijama žutog tela pod dejstvom LH.

Zajednički prekursor za sve steroidne hormone je holesterol, te je njegova dostupnost kritičan uslov za postizanje optimalne steroidogeneze. Holesterol koji steroidogene ćelije koriste za sintezu hormona može se dobiti na najmanje četiri načina: *de novo* sintezom u endoplazmatskom retikulumu, endocitozom lipoproteina male gustine (engl. *low density lipoprotein*, LDL), hidrolizom holesterol estara

deponovanih u lipidnim kapima i selektivnim transportom lipoproteina velike gustine (engl. *high density lipoprotein*, HDL) preko membranskog proteina označenog kao SR-B1 (engl. *scavenger receptor class B member 1*) (Hu i sar., 2010; Miller i Bose, 2011).

Sinteza holesterola vrši se u endoplazmatskom retikulumu od acetil koenzima A (acetil CoA) i obuhvata veći broj enzimskih reakcija, pri čemu ključan korak u sintezi holesterola predstavlja prevođenje 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) u mevalonat posredstvom enzima HMG-CoA reduktaza (HMGCR) (Hampton, 2002). Transkripciona kontrola ekspresije najmanje 30 gena koji kodiraju enzime uključene u proces biosinteze holesterola i lipida, uključujući i HMGCR, regulisana je kompleksom proteina smeštenim u endoplazmatskom retikulumu, a sastoji se od vezujućeg proteina za sterolni regulatorni element (engl. *sterol regulatory element binding protein*, SREBP) i proteina koji aktivira isecanje SREBP (engl. *SREBP cleavage activating protein*, SCAP). Kada u ćeliji nema dovoljno holesterola, SREBP vezan za SCAP odlazi do Goldžijevog aparata, gde podleže proteolitičkom sečenju, što dovodi do oslobađanja transkripcionog faktora. Ovaj transkripcioni faktor potom odlazi u jedro, gde se vezuje za sterolni element odgovora (engl. *sterol response element*, SRE) u okviru promotorskih regiona ciljnih gena koji kodiraju enzime uključene u proces biosinteze holesterola i lipida (Weber i sar., 2004).

Iako ćelije ovarijuma poseduju sposobnost *de novo* sinteze holesterola, zbog velike potrebe za holesterolom tokom steroidogeneze, najzastupljeniji način njegovog ulaska u ćelije je putem cirkulišućih lipoproteina. Osim toga, unos holesterola u steroidogene ćelije zavisi od vrste kojoj organizam pripada. Tako je kod ljudi receptorom posredovana endocitoza primaran način ulaska holesterola u ćelije, dok je kod glodara najzastupljeniji selektivni transport HDL preko SR-B1 (Hu i sar., 2010; Miller i Bose, 2011).

Nakon ulaska HDL u steroidogenu ćeliju glodara, u citoplazmi se oslobađa holesterol delovanjem hormon-senzitivne lipaze (engl. *hormone-sensitive lipase*, HSL), enzima kodiranog *Lipe* genom. Slobodni holesterol se transportuje do mitohondrija gde predstavlja supstrat za steroidogenezu (Miller i Bose, 2011). Enzim acetil koenzim

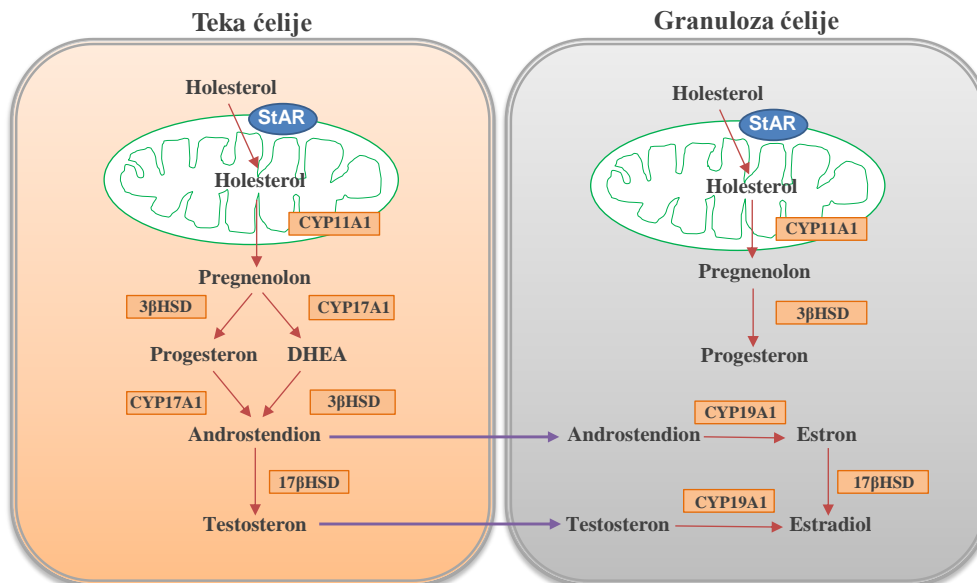


A holesterol acil transferaza (engl. *acetyl-CoA acetyltransferase*, ACAT) konvertuje višak slobodnog holesterola do holesterol estara i na taj način ga skladišti u ćelijama (Chang i sar., 2009). Dostupnost holesterola za steroidogenezu regulisana je i reverznim transportom, odnosno, njegovim efluksom pod dejstvom ABC transportera (engl. *ATP-binding cassette transporters*), ABCA1 i ABCG1 (Kaminski i sar., 2006).

Sinteza estradiola u granulosa ćelijama započinje sintezom androgena u teka ćelijama. Holesterol dospeva do spoljašnje mitohondrijske membrane teka ćelija gde ga steroidogeni akutni regulatorni protein (engl. *steroidogenic acute regulatory protein*, StAR) transportuje do unutrašnje mitohondrijske membrane, gde se nalazi enzim dezmolaza koji konvertuje holesterol u pregnenolon. Pregnenolon se zatim u glatkom endoplazmatskom retikulumu prevodi u progesteron aktivnošću enzima 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze (3 $\beta$ -HSD) ili u dehidroepiandrosteron (DHEA) delovanjem 17 $\alpha$ -hidroksilaze/C17-20 liaze (CYP17A1). Nastali progesteron i DHEA se zatim konvertuju u androstendion delovanjem enzima CYP17A1, odnosno, 3 $\beta$ -HSD. Androstendion se potom prevodi u testosteron aktivnošću enzima 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze (17 $\beta$ -HSD). Androstendion može da difunduje do granulosa ćelija, gde se pod dejstvom enzima aromataze prevodi u slab estrogen, estron, koga 17 $\beta$ -HSD prevodi u najpotentniji estrogen, estradiol. Testosteron nastao u teka ćelijama difunduje do granulosa ćelija, gde ga aromataza takođe konvertuje u estradiol (Hannon i Flaws, 2015) (Slika 1.2).

Osim aromataze, u granulosa ćelijama se tokom stimulacije sa FSH povećava i ekspresija StAR i dezmolaze (Wayne i sar., 2007), što rezultuje sintezom progesterona. Progesteron je osnovni hormon koga stvara žuto telo, pod dejstvom LH. Sinteza progesterona započinje aktiviranjem FSH receptora na membrani granulosa, odnosno, LHR na membrani granulosa-luteinskih ćelija. Aktivacija receptora dovodi do indukcije ekspresije StAR proteina, dezmolaze i 3 $\beta$ -HSD. Holesterol se uz pomoć StAR proteina transportuje do unutrašnje mitohondrijske membrane, gde ga dezmolaza konvertuje u pregnenolon. Pregnenolon se zatim na nivou glatkog

endoplazmatskog retikuluma prevodi u progesteron aktivnošću enzima 3 $\beta$ -HSD (Hannon i Flaws, 2015).



Slika 1.2. Steroidogeneza u ovarijumima. Detalji u tekstu.

### 1.3. Signalni mehanizmi u steroidogenezi

#### 1.3.1. Signalni putevi koje u granulosa ćelijama aktivira FSH

Svoje efekte u granulosa ćelijama FSH ostvaruje modulacijom aktivnosti nekoliko signalnih puteva (Slika 1.3). Vezivanjem FSH za receptor koji pripada porodici receptora spregnutih sa proteinom G (engl. *G protein-coupled receptors*, GPCR) primarno dolazi do aktivacije adenil ciklaze (engl. *adenylyl cyclase*, AC), sinteze 3'-5'-cikličnog adenozin monofosfata (engl. *3',5'-cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) i aktivacije protein kinaze A (engl. *protein kinase A*, PKA), što dovodi do fosforilacije i aktivacije nekoliko transkripcionih faktora, uključujući i CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*). U granulosa ćelijama, CREB je odgovoran za regulaciju ekspresije mnogih gena, uključujući one koji kodiraju aromatazu i  $\alpha$  subjedinicu inhibina (Hunzicker-Dunn i Maizels, 2006).

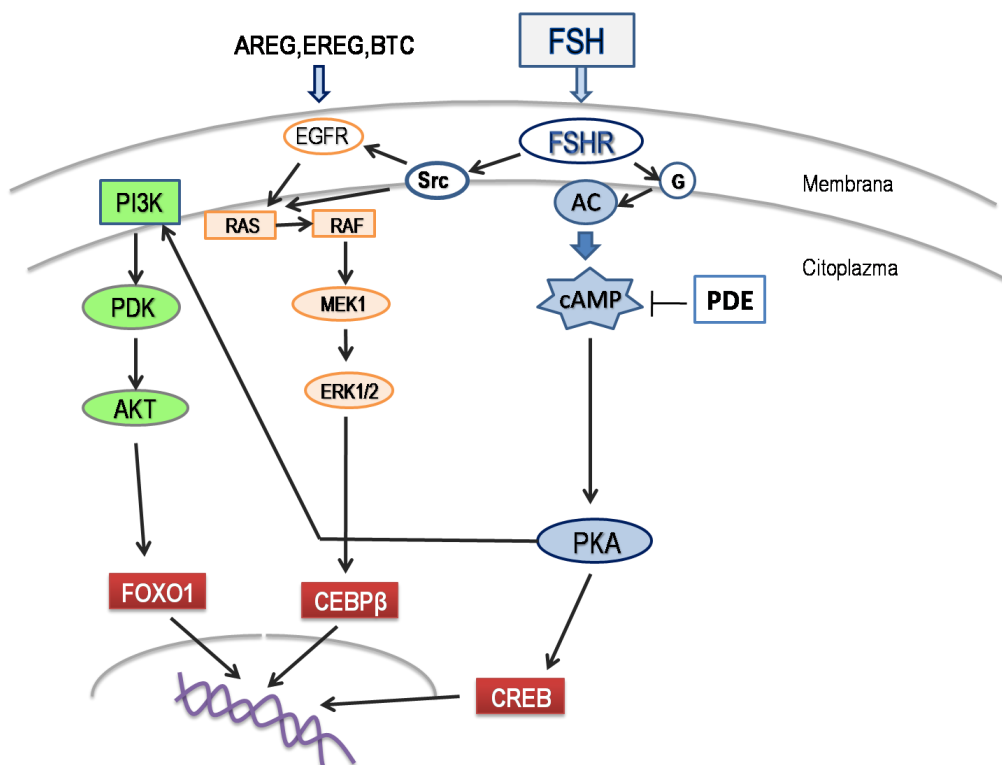
Unutarćelijska koncentracija cAMP regulisana je njegovom *de novo* sintezom, kao i nivoom degradacione aktivnosti cAMP-specifičnih fosfodiesteraza (engl. *cAMP-specific phosphodiesterase*, cPDE). Fosfodiesteraze su prisutne u ovarijumima, pri čemu su PDE3 specifične za oocite, a PDE4 za granuloza ćelije (Conti i sar., 2002). PDE4D ima značajnu ulogu u regulaciji nivoa cAMP tokom diferencijacije granuloza ćelija, ali i ovulacije. Pokazano je da nedostatak PDE4D kod miševa dovodi do promena u akumulaciji cAMP nakon delovanja LH, kao i smanjenja fertilitnosti i stope ovulacije kod ženki. Osim toga, posledice nedostatka PDE4D uključuju luteinizaciju antrumskih folikula u kojima su prisutne zarobljene oocite, kao i promene u ekspresiji gena uključenih u ovulaciju, kao što su ciklooksigenaza-2 i receptor za progesteron (PGR) (Park i sar., 2003).

FSH dovodi i do aktivacije fosfatidilinozitol 3-kinaze (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K). Pokazano je da u granuloza ćelijama stimulisanim sa FSH, PKA fosforiliše IRS1-supstrat 1 insulinskog receptora na Tyr989, koji vezuje regulatornu subjedinicu PI3K veličine 85 kDa, što uzrokuje aktivaciju katalitičke subjedinice ove kinaze. Aktivacija PI3K dovodi do aktivacije protein kinaze B (poznate i kao Akt), fosforilacijom na Thr308 i Ser473 (Hunzicker-Dunn i sar., 2012). Fosforilacija Akt u granuloza ćelijama dešava se već 10 min nakon tretmana sa FSH, dostiže maksimum nakon 1 h, ostaje na tom nivou do 6 h, a zatim se smanjuje. Sekundarna fosforilacija se javlja kasnije, 12 h nakon stimulacije, dok se maksimalna stimulacija detektuje 48 h nakon primene FSH (Gonzalez-Robayna i sar., 2000). Važna uloga ovog signalnog puta u diferencijaciji granuloza ćelija dokazana je sposobnošću PI3K inhibitora wortmanina da ispoljava inhibitoran uticaj na sintezu estradiola i progesterona tokom stimulacije granuloza ćelija sa FSH (Zelevnik i sar., 2003). FOXO (engl. *forkhead box-containing protein*) proteini su najpoznatiji transkripcioni faktori koje fosforiliše Akt u odgovoru na FSH, a učestvuju u regulaciji ekspresije gena koji regulišu proliferaciju granuloza ćelija (Hunzicker-Dunn i Maizels, 2006).

U nezrelim granuloza ćelijama, FSH dovodi i do aktivacije malog GTP vezujućeg proteina, označenog kao RAS, što ima za posledicu aktivaciju RAF, zatim MEK1 (engl.

*mitogen-activated protein kinase kinase*), i na kraju vanćelijskim signalima regulisanih kinaza 1 i 2 (engl. *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*, ERK1/2). Aktivacija RAS proteina odvija se direktno putem SRC familije kinaza ili indirektno putem oslobađanja epidermalnom faktoru rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF)-sličnih proteina, amfiregulina (AREG), epiregulina (EREG) i betacelulina (BTC), a zatim i aktivacije EGF receptora (Wayne i sar., 2007). U granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH, ERK1/2 signalna kaskada je odgovorna za povećanje ekspresije StAR i dezmolaze, markera luteinizacije granulosa ćelija (Wayne i sar., 2007). Osim toga, ovaj signalni put ispoljava inhibitorni efekat na ekspresiju aromataze u nezrelim granulosa ćelijama (Andric i Ascoli, 2006; Fan i sar., 2009).

Tokom stimulacije sa FSH, značajnu ulogu u diferencijaciji granulosa ćelija i razvoju preovulacionog folikula ima estradiol, koji deluje u autokrinom maniru i time pojačava delovanje FSH. Efekti estradiola na folikulogenezu posredovani su aktivnošću dva receptora za estrogene (ER), ER $\alpha$  i ER $\beta$ , pri čemu je ER $\beta$  prisutan u granulosa ćelijama tokom rasta folikula i njegova ekspresija je regulisana gonadotropinima, dok je ER $\alpha$  dominantno eksprimiran u teka ćelijama (Britt i Findlay, 2003). Značaj ER $\beta$  u folikulogenezi i ovulaciji ispitan je korišćenjem *knockout* miševa, pri čemu je pokazano da odsustvo ER $\beta$  narušava ekspresiju aromataze i LHR, što ima za posledicu manju stopu ovulacije kod ženki miševa (Couse i sar., 2005). Osim klasičnog ER $\beta$  receptora, estradiol se u granulosa ćelijama vezuje i za membranski estrogenski GPCR, poznat i kao GPER, koji posreduje u brzim, negenomskim efektima estradiola. Pokazano je da GPER učestvuje u sprečavanju maturacije oocite kod zebrića (*Danio rerio*). Sa druge strane, u ovarijumima miševa starih 5 meseci koji ne poseduju GPER, folikulogeneza se odvija normalno (Edson i sar., 2009).



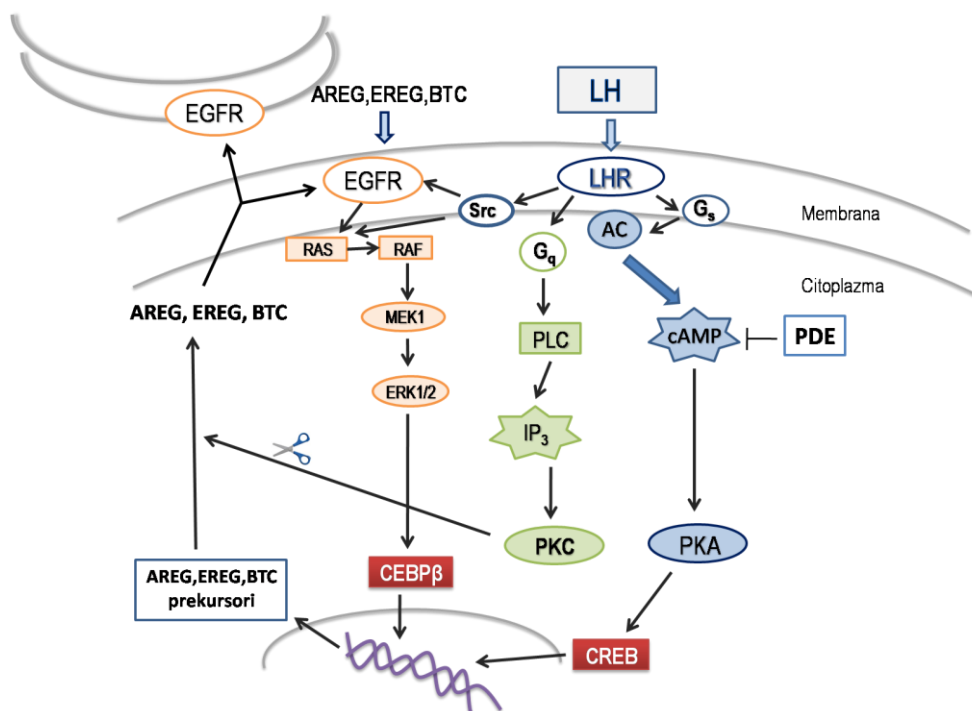
**Slika 1.3.** Signalni putevi koje u granulosa ćelijama aktivira FSH. Detalji u tekstu.

### 1.3.2. Signalni putevi koje u granulosa ćelijama aktivira LH

Vezivanjem LH za svoj receptor na membrani muralnih granulosa ćelija dolazi do aktivacije nekoliko signalnih puteva, uključujući cAMP/PKA i ERK1/2 (Hunzicker-Dunn i Maizels, 2006) (Slika 1.4). Aktivacija ERK1/2 signalnog puta zauzima centralno mesto u delovanju LH na proces transformacije granulosa ćelija od ćelija koje sintetišu estradiol do onih koje sintetišu progesteron, kao i u procesima vezanim za ovulaciju (Fan i sar., 2009). Aktivacija ERK1/2 pod dejstvom LH odvija se preko oslobađanja EGF-sličnih faktora, AREG, EREG i BTC. AREG, EREG i BTC se sintetišu kao membranski integralni proteini koji se pod uticajem metaloproteinaza oslobađaju kao aktivne forme, što zatim omogućava njihovo vezivanje za EGF receptore na membrani muralnih i kumulusnih ćelija (Panigone i sar., 2008). Aktivacija EGF receptora ima za posledicu aktivaciju ERK1/2, koja se uočava i nakon 6–9 h, što deluje antagonistički na

signalne puteve koji ispoljavaju stimulatorni efekat na ekspresiju aromataze. Pokazano je da je ova produžena, ali ne i primarna, kratkotrajna fosforilacija zavisna od protein kinaze C (engl. *protein kinase C*, PKC), kao i od broja gonadotropnih receptora na membrani granuloza ćelija (Andric i Ascoli, 2006; Fan i sar., 2009). Značaj ERK1/2 signalne kaskade dokumentovan je korišćenjem *knockout* miševa, gde je pokazano da nedostatak ERK1/2 u granuloza ćelijama u potpunosti sprečava ovulaciju, luteinizaciju i sazrevanje oocite, procese posredovane dejstvom LH (Fan i sar., 2009).

Najznačajniji transkripcioni faktori aktivirani od strane ERK1/2 u preovulacionim granuloza ćelijama su C/EBP (engl. *CCAAT-enhancer-binding protein*)  $\alpha$  i  $\beta$ . Ekspresija C/EBP $\alpha$  dostiže maksimum 4 h nakon tretmana sa humanim horionskim gonadotropinom (engl. *human chorionic gonadotropin*, hCG), a potom opada na bazalni nivo, dok ekspresija C/EBP $\beta$  započinje 2 h nakon hCG tretmana, dostiže maksimum između 12 h i 16 h, a zadržava se i 48 h nakon tretmana. Pokazano je da odsustvo C/EBP $\alpha$  umereno smanjuje stopu ovulacije (30%), ali su ženke miševa i dalje fertile, dok odsustvo C/EBP $\beta$  ispoljava veći inhibicioni uticaj na ovulaciju i luteinizaciju. Odsustvo oba transkripciona faktora dovodi do potpunog odsustva ovulacije i sterilnosti ženki miševa. Analizom profila genske ekspresije kod *knockout* miševa za C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$  identifikovani su geni čija je ekspresija kontrolisana od strane ova dva transkripciona faktora. Rezultati su pokazali da C/EBP $\alpha/\beta$  učestvuju u formiranju i održavanju žutog tela, vaskularizaciji nakon prskanja folikula i steroidogenezi, prvenstveno putem regulacije ekspresije StAR i dezmolaze (Fan i sar., 2011). Pored toga, pokazano je da odsustvo C/EBP $\beta$  sprečava smanjenje aromataze u preovulacionim granuloza ćelijama uzrokovano delovanjem LH (Sterneck i sar., 1997).



**Slika 1.4.** Signalni putevi koje u granulosa ćelijama aktivira LH. Detalji u tekstu.

## 1.4. Ovulacija

Ovulacija je kompleksan proces koji podrazumeva oslobađanje oocite iz folikula u tačno određeno vreme, a nastaje kao posledica akutnog povećanja nivoa LH koje se naziva preovulacioni LH talas. Tada dolazi do nastavka mejoze oocite, ekspanzije kumulusnih ćelija, prskanja zida folikula i oslobađanja oocite. Muralne granulosa ćelije i teka ćelije transformišu se u luteinske ćelije, formiraju žuto telo i započinju sintezu i sekreciju progesterona, koji ima osnovnu ulogu u održavanju trudnoće (Russell i Robker, 2007). Ukoliko ne dođe do oplodnje, nivo progesterona postepeno opada i 10–12 dana nakon ovulacije dolazi do regresije žutog tela.

Progesteron ispoljava značajnu ulogu i tokom ovulacije. Svoje efekte ostvaruje vezivanjem za PGR, koji pripada familiji nukleusnih receptora koji funkcionišu kao transkripcioni faktori. PGR je značajan za regulaciju transkripcije određenih gena tokom ovulacionog perioda, posebno onih koji su neophodni za uspešno oslobađanje oocite iz preovulacionog folikula (Robker i sar., 2009).

## 1.5. Endokrini ometači

Ksenobiotici (*grč. xeno-strani, bios-živi*) su supstance koji organizmi normalno ne proizvode, a u organizam dospevaju udisanjem, ishranom, apsorpcijom preko kože, intravenski i sl. Mogu da potiču iz prirodne hrane (alkaloidi, flavoni), ili da predstavljaju supstance koje su namerno ili nenamerno unete u organizam. Ksenobioticima pripadaju i hemikalije koje je čovek sintetisao za svoje potrebe, a koje nekontrolisano dospevaju u životnu sredinu, kao što su pesticidi, hemikalije koje se koriste u proizvodima od plastike, razni usporivači gorenja, i dr.

Tokom poslednjih 30 do 40 godina moderan način života doveo je do porasta proizvodnje hemikalija kojima su ljudi svakodnevno izloženi. Uporedo s porastom broja hemikalija, u humanoj populaciji došlo je i do naglog porasta stope mnogih bolesti, kao što su gojaznost, dijabetes, neplodnost, astma, autizam i tumori raznih organa. Iako je vrlo verovatno da je za ovakav porast stope bolesti odgovoran veći broj faktora, postoji opravdana zabrinutost da izlaganje hemikalijama iz spoljašnje sredine ima značajnu ulogu.

Posebna pažnja poslednjih decenija poklanja se hemikalijama koje imaju sposobnost da menjaju homeostazu endokrinog sistema organizma, označenim kao endokrini ometači (engl. *endocrine disrupting chemicals*, EDCs). Američka agencija za zaštitu životne sredine (engl. *U.S. Environmental Protection Agency*, EPA), definiše endokrine ometače kao egzogene agense koji menjaju sintezu, sekreciju, transport, metabolizam, vezivanje ili eliminaciju prirodnih hormona, odgovornih za održavanje homeostaze, kao i reproduktivnih i razvojnih procesa u organizmu. Prema poslednjoj proceni Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO) iz 2012. godine, približno 800 hemikalija koje se koriste u svakodnevnom životu poseduju osobine endokrinih ometača (Bergman i sar., 2012).

Ne postoji jedinstvena klasifikacija hemikalija koje se mogu označiti kao endokrini ometači ili kao potencijalni endokrini ometači. Prema Diamanti-Kandarakis i sar. (2009), endokrini ometači se mogu svrstati u dve kategorije:

- 1) prirodne hemikalije koje se nalaze u ljudskoj i životinjskoj hrani (npr.



fitoestrogeni: genistein i kumestrol)

2) sintetičke hemikalije koje se dalje mogu klasifikovati na sledeći način:

- sastojci industrijskih rastvarača ili maziva, kao i njihovi nusproizvodi (npr. polihlorovani bifenili (PCB), polibromovani bifenili (PCDD), dioksini)
- hemikalije koje ulaze u sastav plastike (npr. bisfenol A (BPA))
- pesticidi (npr. dihlordifenil-trihloretan (DDT), atrazin (ATR))
- fungicidi (npr. vinklozolin)
- farmakološki proizvodi (npr. dietilstilbestrol (DES))

### **1.5.1. Izloženost endokrinim ometačima**

Endokrini ometači dospevaju u ljudski organizam na različite načine:

1) Unos hrane i vode: endokrini ometači kao što su PCB, dioksini, DDT i ATR najčešće se nalaze u industrijskom otpadu, zemljištu kontaminiranom pesticidima ili u podzemnim vodama, te u ljudski organizam dospevaju tokom ishrane. Osim toga, otpuštanje hemikalija kao što su BPA i ftalati iz ambalaže u hranu i piće predstavlja još jedan primer unosa endokrinih ometača u ljudski organizam ovim putem.

2) Kontakt s kožom i/ili inhalacija: ljudski organizam može doći u kontakt s pesticidima koji se često koriste u poljoprivredi, domaćinstvima i kontroli zaraznih bolesti koje se prenose vektorima (DDT, hlorspirifos, vinkozolin, piretroidi) putem inhalacije i/ili kože. Osim toga, hemikalije kao što su bromovani usporivači gorenja, koji se koriste prilikom proizvodnje nameštaja, mogu na ovaj način dospeti u organizam. Ljudi su putem kože svakodnevno izloženi i ftalatima i parabenima, koji se nalaze u kozmetici i proizvodima za ličnu negu.

3) Intravenski: pokazano je da hemikalije poput ftalata, koje ulaze u sastav cevčica koje se koriste prilikom davanja infuzije, dospevaju u ljudski organizam intravenskim putem.

4) Unos putem placente i mleka: tokom trudnoće, endokrini ometači koji su uskladišteni u masnom tkivu majke, mogu proći kroz placentu i ispoljiti negativne

uticaje na fetus. Pored toga, pojedini endokrini ometači detektovani su u mleku i tokom dojenja se unose u organizam deteta (Gore i sar., 2014).

### **1.5.2. Efekti endokrinih ometača na ljudski organizam**

Smatra se da spoljašnje okruženje ima ulogu u nastanku približno 80% najsmrtonosnijih bolesti, kao što su tumori, ali i respiratorna i kardiovaskularna oboljenja. Sve je veći broj dokaza da endokrini ometači u velikoj meri doprinose ovakvoj statistici, s obzirom da su poremećaji funkcije endokrinog sistema u osnovi mnogih bolesti. Učestalost poremećaja povezanih s endokrinim sistemom, poput oboljenja muškog reproduktivnog sistema (kriptorhizam, hipospadija, tumor testisa), preranog ulaska devojčica u pubertet, tumora mozga i neurobiheviornalnih poremećaja, u velikom je porastu tokom poslednjih nekoliko desetina godina. Povećanje incidence ovih bolesti u korelaciji je sa povećanom produkcijom hemikalija. Svetska proizvodnja plastike tokom poslednjih 40 godina porasla je šest puta, sa 50 miliona tona, na blizu 300 miliona tona godišnje, koliko iznosi danas. Sličan trend prisutan je i kod drugih hemikalija, uključujući pesticide, usporivače gorenja, rastvarače i surfaktante (Gore i sar., 2014). Ove, ali i mnoge druge hemikalije poput PCB, BPA i ftalata detektovane su u ljudskom serumu, masnom tkivu i krvi iz pupčane vrpce (Skakkebaek i sar., 2011; Gerona i sar., 2013; Buck Louis i sar., 2014). Iako je već duže vreme jasno da postoji veza između izloženosti ljudi hemikalijama i povećane učestalosti određenih bolesti, eksperimenti na životinjama, kao i brojni *in vitro* eksperimenti sprovedeni tokom poslednjih godina pružili su obilje dokaza koji te navode dodatno potvrđuju.

### **1.5.3. Mehanizmi delovanja endokrinih ometača**

S obzirom da su supstance okarakterisane kao endokrini ometači veoma raznovrsnog porekla i strukture, veoma je teško pretpostaviti njihov mehanizam delovanja. Osim toga, ponekad se dešava da metabolit ispoljava štetnije efekte nego sama supstanca. Istraživanja koja se odnose na definisanje mehanizama delovanja endokrinih ometača u ogromnom su porastu poslednjih nekoliko decenija. Prvobitno

se smatralo da endokrini ometači ispoljavaju negativne efekte isključivo ostvarivanjem direktne interakcije s nukleusnim hormonskim receptorima, prvenstveno sa estrogenskim, androgenim, progesteronskim i tiroidnim receptorima. Na ovaj način endokrini ometači funkcionišu kao antagonisti ili agonisti receptora, odnosno, blokiraju ili oponašaju efekte prirodnih hormona. Međutim, iako su interakcije između pojedinih endokrinih ometača i nukleusnih hormonskih receptora potvrđene, danas se zna da su mehanizmi delovanja endokrinih ometača daleko kompleksniji nego što se pretpostavljalo (Kabir i sar., 2015).

Osim vezivanja za nukleusne hormonske receptore, mnogi endokrini ometači aktiviraju arilhidrokarbonski receptor (engl. *aryl hydrocarbon receptor*, AHR). AHR je transkripcioni faktor koji se aktivira vezivanjem različitih liganada, te posreduje u biološkim odgovorima ćelija na vrlo različite prirodne i sintetske hemikalije. Najznačajniji ligand za ovaj receptor je 2,3,7,8-tetrahlrodibenzo-p-dioksin (TCDD), koji nastaje prilikom spaljivanja organskog otpada, ali i kao nusproizvod u organskoj hemijskoj industriji. Osim toga, pokazano je i da druge supstance, uključujući policiklične aromatične ugljovodonike, ispoljavaju visok afinitet za ovaj receptor. Nakon vezivanja liganda, AHR prelazi u nukleus, gde se vezuje za sekvence na DNK označene kao XRE (engl. *xenobiotic response elements*) i reguliše ekspresiju različitih gena, uključujući i gene koji pripadaju prvoj fazi metabolizma ksenobiotika kao što su CYP1A1 i CYP1B1 (Swedenborg i sar., 2009). CYP1A1 učestvuje u eliminaciji mnogih supstanci iz organizma, a posebno policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Konstitutivna ekspresija ovog enzima u jetri i drugim organima je mala, ali je visoko inducibilna aktivnošću AHR liganada (Roos i sar., 2002). CYP1B1 katališe bioaktivaciju prokarcinogena i promutagena koji mogu da izazovu oštećenja na DNK, a takođe učestvuje i u katabolizmu estradiola, putem konverzije ovog hormona u 4-hidroksiestradiol (Smerdova i sar., 2014). Ovaj enzim eksprimira se u mnogim tkivima kao što su bubrezi, prostata, ovarijumi, nadbubežne žlezde i testisi (Shimada i sar., 2003). Indukcija CYP1B1 se vrši preko AHR, međutim pokazano je da u steroidogenim

ćelijama ovaj protein može biti indukovan i putem koji nije zavisen od AHR (Zheng i sar., 2003).

Transport i dostupnost hormona su takođe meta delovanja pojedinih endokrinih ometača, putem kompeticije sa hormonima za ista vezna mesta na globulinima koji u krvnoj plazmi vezuju endogene hormone (engl. *hormone-binding globuline*, HBG) i na taj način omogućavaju njihov transport. Enzimi uključeni u proces biosinteze i metabolizma hormona takođe predstavljaju značajna mesta delovanja endokrinih ometača (Yang i sar., 2015).

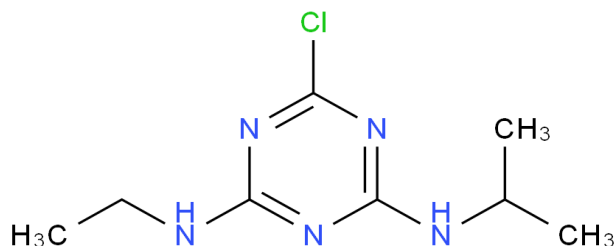
Još jedan mehanizam putem koga endokrini ometači ostvaruju efekte jesu promene u ćelijskoj signalizaciji. Pokazano je da BPA i DES imaju sposobnost aktivacije ER posredstvom ERK1/2 i PI3K u MCF7 humanoj ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke (Li i sar., 2006). Pored toga, pojedini endokrini ometači aktiviraju PKC, za koju je pokazano da učestvuje u modulaciji transkripcione aktivnosti ER (Thorne i sar., 2013), dok je za BPA pokazano da dovodi do brze aktivacije ERK1/2 signalnog puta u GH3/B6/F10 ćelijskoj liniji tumora hipofize pacova (Watson i sar., 2012). Takođe, pojedini endokrini ometači aktiviraju GPER (Thomas i Dong, 2006), membranski estrogenski receptor, dovodeći do modulacije aktivnosti različitih signalnih puteva nizvodno od receptora, kao što su cAMP/PKA, PI3K/Akt i ERK1/2 (Maggiolini i Picard, 2010; Pupo i sar., 2016).

Pokazani su i epigenetski mehanizmi delovanja endokrinih ometača, kojima ostvaruju efekte na naredne generacije. Oni uključuju modifikacije procesa koji regulišu ekspresiju gena, kao što DNK metilacija, acetilacija histona i RNK interferencija (Casati i sar., 2015).

## **1.6. Atrazin**

Atrazin (hemijski naziv (IUPAC): 6-Chloro-N-ethyl-N'-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine; ATR) je herbicid koji pripada familiji triazinskih, tačnije hlorotriazinskih herbicida. ATR je beli prašak, bez mirisa, slabo isparljiv i slabo reaktivan, nije zapaljiv. Molekulska formula ATR je  $C_8H_{14}ClN_5$ , a relativna molekulska masa 216. Strukturna

formula prikazana je na Slici 1.5. Slabo je rastvorljiv u vodi (34,7 mg/L na 26 °C), ali je rastvorljiv u organskim rastvaračima kao što su metanol (18 000 mg/L), etil acetat (28 000 mg/L) i hloroform (52 000 mg/L) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).



**Slika 1.5.** Strukturna formula ATR (preuzeto sa <http://en.chembase.cn/>)

Atrazin je trenutno jedan od najčešće korišćenih herbicida u Sjedinjenim Američkim Državama, gde je u poljoprivredne svrhe tokom 2013. godine upotrebljeno 32 miliona kilograma ovog herbicida. Između 1985. i 2001. godine ATR je bio najčešće korišćen herbicid, ali je poslednje decenije upotreba glifosata nadmašila njegovu primenu. Između 2000. i 2013. godine upotreba ATR ostala je relativno konstantna (U.S. Geological Survey, 2015). U Evropi, upotreba ATR zabranjena je 2004. godine zbog toga što su detektovane koncentracije ostataka ATR, metabolita i transformacionih proizvoda u površinskim i podzemnim vodama (koje su često namenjene vodosnabdevanju) prevazilazile maksimalno dozvoljene vrednosti (0,1 µg/L) (Sass i Colangelo, 2006). Od 2008. godine, ATR se u Republici Srbiji ne nalazi u prometu i njegova upotreba je zabranjena (<http://www.uzb.minpolj.gov.rs>). Ipak, prisustvo ATR i pojedinih metabolita ovog herbicida u koncentraciji iznad 0,1 µg/L zabeleženo je u podzemnim vodama uzorkovanim u periodu između 2007. i 2009. godine na velikom broju lokaliteta u Republici Srbiji. Najveće vrednosti utvrđene su na lokalitetima sa intenzivnom proizvodnjom kukuruza, kao i na površinama pod voćnjacima i vinogradima, gde je ATR primenjivan u velikim količinama (Lazić i sar.,

2013). Osim u Sjedinjenim Američkim Državama, ATR se još koristi u preko 70 zemalja sveta (LeBaron i sar., 2008).

Poluživot ATR u zemljištu kreće se između 13 i 261 dan, u zavisnosti od tipa zemljišta i klime. U površinskim vodama vreme poluraspada ATR iznosi više od 200 dana, dok mu je poluživot u vazduhu oko 14 sati. Ipak, ukoliko se ATR nađe na česticama prašine, može se desiti da uz pomoć vetra dospe do velikih udaljenosti od mesta primene (*Toxicological Profile for Atrazine, 2003*). Koncentracija ATR u spoljašnjoj sredini varira, pri čemu se prosečna vrednost kreće oko 20 µg/L (Solomon i sar., 2013). Maksimalne koncentracije ATR od približno 100 µg/L izmerene su u potocima i rekama poljoprivrednih područja nakon oluje (Murphy i sar., 2006).

Ljudi su najčešće izloženi ATR preko kontaminirane vode, inhalacijom i apsorpcijom preko kože (U.S. EPA, 2001). Obično se radi o profesionalnoj izloženosti, tokom proizvodnje i primene ATR. Međutim, ljudi koji žive u blizini poljoprivrednih područja gde se ATR primenjuje mogu biti izloženi ovom herbicidu putem kontaminirane vode za piće. U Sjedinjenim Američkim Državama, maksimalne dozvoljene koncentracije ATR u vodi za piće iznose 0,003 mg/L (U.S. EPA, 2012). Iako se primenjuje na biljkama koje se koriste u ishrani, prisutnost ATR u hrani je retka, pri čemu su detektovane koncentracije veoma niske i kreću se od 0,001 do 0,028 µg/g (*Toxicological Profile for Atrazine, 2003*).

### **1.6.1. Metabolizam ATR**

Atrazin se apsorbuje putem gastrointestinalnog trakta i veoma brzo eliminiše iz organizma. U organizmu pacova njegov poluživot je veoma kratak (<1 dan), dok se 95% ATR eliminiše iz organizma nakon 7 dana. Pokazano je da se 75% ATR kod glodara izluči urinom, dok se fecesom eliminiše oko 20% (Pathak and Dikshit, 2012).

Do sada je identifikovano 8–12 metabolita ATR kod ljudi i životinja. Rezultati ranijih studija ukazuju da je N-monodealkilacija i izopropilhidroksilacija dominantni put metabolizma ATR kod sisara nakon *in vivo* i *in vitro* tretmana. Za metabolizam ATR primarno su odgovorni enzimi koji pripadaju enzimima prve faze metabolizma ksenobiotika, odnosno citohrom P450 (CYP) superfamiliji. Osim ovih enzima, u

metabolizmu ATR učestvuju i enzimi druge faze metabolizma ksenobiotika, glutation transferaze (engl. *glutathione transferases*, GST), ali u mnogo manjoj meri (Adams i sar., 1990; Hanioka i sar., 1999). Pokazano je da u jetri šarana ATR povećava ekspresiju gena i aktivnost enzima koji učestvuju u prvoj fazi metabolizma ksenobiotika (Xing i sar., 2014).

### 1.6.2. Biološki efekti ATR

Atrazin ispoljava slabu akutnu toksičnost kod laboratorijskih životinja. Oralna LD<sub>50</sub> doza (koja kod 50% životinja ispoljava letalni efekat) se kod pacova kreće u rasponu od 672 do 3000 mg/kg, kod miševa od 850 do 1750 mg/kg, dok kod zečeva iznosi 750 mg/kg. Dermalna LD<sub>50</sub> kod zečeva iznosi 7500 mg/kg, dok je kod pacova veća od 3000 mg/kg. Prilikom jednočasovne izloženosti, inhalaciona LD<sub>50</sub> kod pacova iznosi 700 mg/m<sup>3</sup> (Gros i Rauschenberger, 2006).

Kod ptica i vodenih organizama ATR ispoljava blagu toksičnost. Međutim, istraživanja su pokazala da izloženost larvi mužjaka žaba veoma niskim, ekološki relevantnim koncentracijama ATR dovodi do demaskulinizacije odraslih mužjaka i višestrukog smanjenja nivoa testosterona u odnosu na kontrolne životinje (Hayes i sar., 2002). Takođe, kod riba vrste *Pimephales promelas*, izloženost ATR dovela je do smanjene produkcije gameta, kao i morfoloških promena na nivou gonada (Tillitt i sar., 2010).

Atrazin toksične efekte ostvaruje na nivou različitih organskih sistema. Pokazano je da tretman pacova ima za posledicu smanjenje električne aktivnosti u delu mozga koji je odgovoran za kontrolu mišićnog tonusa i ravnoteže (Podda i sar., 1997), kao i promenu u sekreciji dopamina i noradrenalina (Das i sar., 2000). Osim toga, ATR ispoljava negativan uticaj na imunski sistem, dovodi do degenerativnih promena jetre, poremećaja funkcije bubrega, kao i promena na nivou kardiovaskularnog sistema i funkcije štitaste žlezde (Stoker i sar., 2000).

Istraživanja kancerogenog potencijala ATR vršena na laboratorijskim životinjama pokazala su da hronično izlaganje ATR (400 ppm (engl. *parts per million*, ~ 22,5 mg/kg)) dovodi do ranije pojave tumora mlečnih žlezda kod pacova soja

Sprague Dawley (SD). Međutim, kod ženki pacova soja Fisher 334 nije potvrđena veza između tretmana ATR i pojave tumora (Wetzel i sar., 1994). Isti efekat zabeležen je kod ovarijektomisanih SD pacova koji su dve godine bili izlagani visokim dozama ATR, gde nije došlo do razvoja tumora, niti proliferativnih lezija na mlečnim žlezdama (Eldridge i sar., 1999). Osim toga, *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da ATR ne ispoljava mutagene, niti genotoksične efekte (Kligerman i sar., 2000a; Kligerman i sar., 2000b).

Određeni broj epidemioloških studija doveo je u vezu izloženost ATR i pojavu različitih tipova tumora kod ljudi, kao što su ne-Hoćkin limfomi, tumori prostate, dojke, testisa, ovarijuma, ali i mozga. Sa druge strane, mnoge studije nisu potvrdile navedene efekte ATR (Sathiakumar i sar., 2011). Na primer, istraživanja na populaciji žena na području Kentakija pokazala su da ne postoji rizik za razvoj tumora dojke, kao ni tumora ovarijuma (Hopenhayn-Rich i sar., 2002). Takođe, u studiji sprovedenoj na populaciji farmera na području Ajove i Severne Karoline analizirana je veza između izloženosti ATR i pojave različitih tipova tumora, uključujući tumor prostate, bešike i pluća. Rezultati su pokazali da ATR ne može da se dovede u jasnu vezu sa povećanjem incidence analiziranih tumora (Rusiecki i sar., 2004). Na osnovu svega navedenog, zaključeno je da ATR najverovatnije ne ispoljava kancerogene efekte kod ljudi (U.S. EPA).

ATR ispoljava toksične efekte na muški reproduktivni sistem, prvenstveno na steroidogenezu, koja se odvija u Lajdigovim ćelijama testisa. Pogrmic i saradnici (2009) su pokazali da oralni tretman ATR (50 i 200 mg/kg telesne mase/danu) u postnatalnom periodu od 23. do 50. dana dovodi do smanjenja nivoa iRNK za proteine značajne za proces steroidogeneze, uključujući LHR, SR-B1, StAR i 3 $\beta$ -HSD u Lajdigovim ćelijama testisa. Prilikom *in vitro* tretmana Lajdigovih ćelija sa koncentracijama ATR od 1  $\mu$ M do 50  $\mu$ M došlo je do povećanja bazalne i hCG-stimulisane produkcije testosterona i cAMP (Pogrmic-Majkic i sar., 2010).



### 1.6.3. Efekti ATR na ženski reproduktivni sistem

Potencijalni štetni efekti ATR na ženski reproduktivni sistem prvi put su identifikovani tokom hroničnog hranjenja ženki pacova SD soja sa ATR u koncentraciji od 400 ppm, kada je pokazano da ATR dovodi do pojave tumora mlečnih žlezda (Wetzel i sar., 1994). Kratkotrajno izlaganje većim dozama ATR narušava normalni četvorodnevni estrusni ciklus kod pacova rase Long-Evans (LE) i SD, u smislu pojave produženog trajanja diestrusa kod LE pacova koji su primali 150 mg/kg telesne mase/danu ATR, kao i SD pacova koji su primali ATR u koncentraciji od 150 i 300 mg/kg telesne mase/danu. Ove promene praćene su povišenim nivoom progesterona, a smanjenim nivoom estrogena u serumu, što ukazuje na uslove pseudotrudnoće (Cooper i sar., 1996). Cooper i saradnici (2000) su analizirali oslobađanje LH pod dejstvom estradiola i prolaktina kod ovarijektomisanih SD i LE pacova tretiranih sa ATR (50-300 mg/kg telesne mase/danu) u trajanju od 1, 3 i 21 dan. Rezultati su pokazali da ATR dozno-zavisno inhibira oba hipofizna hormona (75–300 mg/kg telesne mase/danu) kod ženki obe rase nakon 21 dana tretmana. Takođe, oralna administracija ATR kod ovarijektomisanih ženki pacova inhibira oslobađanje LH i FSH (Foradori i sar., 2009a i 2009b), što se ostvaruje putem inhibicije pulsne sekrecije gonadotropnog oslobađajućeg hormona (engl. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) (Foradori i sar., 2013).

Izlaganje ženki pacova različitih sojeva ATR u koncentracijama od 100 i 200 mg/kg/telesne mase tokom rane trudnoće dovodi do prekida trudnoće tokom preimplantacionog i postimplantacionog perioda (Cummings i sar., 2000; Narotsky i sar., 2001). Osim toga, izlaganje ATR u koncentraciji od 100 mg/kg telesne mase tokom kritičnog perioda trudnoće kod potomstva ženki pacova LE soja dovodi do odlaganja vaginalnog otvaranja, ali i usporenog razvoja mlečnih žlezda (Rayner i sar., 2005).

Veliki broj *in vivo* i *in vitro* istraživanja odnose se na ispitivanje uticaja ATR na ovarijumsku steroidogenezu. Quignot i saradnici (2012a) su pokazali da oralni tretman ATR u koncentraciji od 200 mg/kg/telesne mase/danu u trajanju od 14 dana

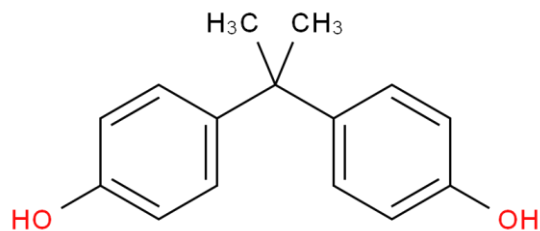
povećava ekspresiju aromataze, kao i *ex vivo* aktivnost ovog enzima u ovarijumima ženki pacova. U *in vitro* eksperimentima, 10  $\mu$ M ATR povećava nivo ekspresije i aktivnost aromataze u granuloza ćelijama tretiranim sa FSH i cAMP. ATR je doveo do dozno-zavisnog povećanja ekspresije i aktivnosti aromataze u H295R ćelijama, dok je u JEG-3 ćelijama samo najveća testirana koncentracija ovog herbicida ispoljila navedeni efekat (Quignot i sar., 2012b). Analogni profil indukcije aromataze primećen je u ranijim istraživanjima, na modelu primarne kulture granuloza ćelija pacova (Tinfo i sar., 2011), kao i H295R (Sanderson i sar., 2000; Fan i sar., 2007; Tinfo i sar., 2011) i JEG-3 ćelijskih linija (Laville i sar., 2006).

Rezultati različitih studija pokazali su da ATR svoje efekte ne ostvaruje preko vezivanja, niti aktivacije klasičnog nukleusnog ER $\alpha$  (Connor i sar., 1996; Roberge i sar., 2004; de la Casa-Resino i sar., 2014). Međutim, Albanito i saradnici (2015) su pokazali da ATR uzrokuje aktivaciju membranskog estrogenskog receptora, GPER, što dalje vodi do aktivacije AC i ERK1/2.

Žene koje žive na poljoprivrednim područjima u kojima je ATR u intenzivnoj upotrebi najčešće su izložene štetnom delovanju ovog herbicida. Tako se izloženost ATR može dovesti u vezu sa prevremenim porođajem (Rinsky i sar., 2012), produženom folikulskom fazom menstruacijskog ciklusa (Cragin i sar., 2011) i intermenstruacijskim krvarenjima kod premenopauzalnih žena (Farr i sar., 2004).

## 1.7. Bisfenol A

Bisfenol A (hemijski naziv (IUPAC): 4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane; BPA) je organsko jedinjenje koje pripada grupi fenola. Molekulska formula BPA je  $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ , a molekulska masa 228.291. Strukturna formula prikazana je na Slici 1.6. BPA je beli prašak sa slabim fenolnim mirisom. Sintetičko je jedinjenje koje se proizvodi reakcijom fenola i acetona u prisustvu kisele jonoizmenjivačke smole kao katalizatora. Slabo je rastvorljiv u vodi (300 mg/L na 26 °C), ali je dobro rastvorljiv u etanolu, sirćetnoj kiselini i dietil etru (Mikołajewska i sar., 2015).



**Slika 1.6.** Strukturna formula BPA (preuzeto sa <http://en.chembase.cn/>)

Bisfenol A je prvi put sintetisan 1891. godine, a njegov estrogini potencijal otkriven je 1936. godine. Od sredine prošlog veka, BPA se upotrebljava u proizvodnji polikarbonatne plastike, epoksidnih smola (Vandenberg i sar., 2007) i termičkog papira koji se, između ostalog, koristi za štampanje fiskalnih računa (Biedermann i sar., 2010). Zahvaljujući visokom stepenu čvrstoće, transparentnosti i otpornosti na visoke temperature i kiseline, polikarbonatna plastika se intenzivno upotrebljava u industrijskoj proizvodnji. Između ostalog, koristi se u proizvodnji ambalaže za hranu i piće, igračaka za bebe i decu, kao i u proizvodnji medicinske opreme, kompakt diskova i prozorskih panela. Epoksidne smole se koriste u proizvodnji boja koje pokrivaju unutrašnje metalne površine konzervi za skladištenje hrane. Derivati BPA našli su primenu i u stomatologiji, gde se sve više koriste u proizvodnji kompozitnih materijala (Mikołajewska i sar., 2015).

### **1.7.1. Izloženost ljudi BPA**

Najčešći način unosa BPA u ljudski organizam je oralno, putem unosa kontaminirane tečnosti i hrane skladištene u posudama od polikarbonatne plastike ili konzervama koje su presvučene slojem epoksidnih smola. Osim toga, ljudi su izloženi BPA preko disajnih puteva, ali i kože. Zbog specifičnih svojstava, BPA se lako oslobađa iz ambalaže i migrira u okolinu. Zagrevanje, ali i kisela i alkalna sredina ubrzavaju proces otpuštanja BPA, s obzirom da tada dolazi do hidrolize estarske veze kojom su molekuli BPA povezani. Na taj način dolazi do oslobađanja slobodnog BPA i njegovog

prelaska u hranu, piće i spoljašnju sredinu. Osim toga, migracija BPA se ubrzava ponovljenim pranjem deterdžentima i sterilizacijom (Mikołajewska i sar., 2015).

Procena nivoa izloženosti BPA putem određivanja njegove koncentracije u različitim prehrambenim proizvodima, ali i ljudskom organizmu predstavlja predmet istraživanja velikog broja studija. Tako su Simoneau i saradnici (2011) zabeležili nivo BPA ispod granice detekcije (0,1 µg/kg) u 32 od 40 bočica za bebe napravljenih od polikarbonatne plastike kada je 50% etanol korišćen kao simulator mleka, a bočice ostavljene 2 sata na 70 °C nakon kuvanja u trajanju od 5 minuta. Najveća vrednost migracije BPA iznosila je 1,83 µg/kg. Značajne koncentracije BPA detektovane su u produktima od mesa (0,49-56 µg/kg), ribe (7,1-102,7 µg/kg), povrću i voću (11,0-95,3 µg/kg) i žitaricama (1,0-3,8 µg/kg) (Michałowicz, 2014). Do danas je sproveden veliki broj istraživanja u kojima je analizirano prisustvo BPA u ljudskom organizmu, telesnim tečnostima i tkivima. Rezultati analize sprovedene u Norveškoj pokazali su da koncentracija BPA u urinu trudnica iznosi 4,5 µg/dm<sup>3</sup> (Ye i sar., 2009). Navedena koncentracija je veća u odnosu na nivo BPA nađenog u urinu stanovnika Holandije (2,5 µg/dm<sup>3</sup>) i Belgije (2,55 µg/dm<sup>3</sup>), ali uporediva sa nivoom (3,9 µg/dm<sup>3</sup>) izmerenim u urinu stanovnika SAD. Analiza sprovedena na preko 2500 stanovnika SAD, pokazala je merljive nivoe BPA u uzorcima urina kod 92,6% učesnika pomenute studije (Michałowicz, 2014). U istraživanju sprovedenom na teritoriji Vojvodine u kojoj su učestvovala 103 žene, BPA je pronađen u 35,92% uzoraka urina (Milošević i sar., 2016). Alarmantni rezultati dobijeni su tokom analize sadržaja BPA u urinu 42 prevremeno rođene bebe na intenzivnoj nezi. Srednja koncentracija BPA iznosila je 30 µg/dm<sup>3</sup>, što je 10 puta više od koncentracija zabeleženih u urinu opšte populacije SAD (Calafat i sar., 2009).

Osim u urinu, BPA je nađen i u znoju i krvi žena i muškaraca, a takođe i u drugim telesnim tečnostima, kao što su folikulska i amnionska tečnost, ali i krvi iz pupčane vrpce. Nekonjugovani BPA detektovan je u krvi u koncentracijama od 0,2 do 20 ng/dm<sup>3</sup>, dok je konjugovana forma pronađena u mnogo većim koncentracijama (Sajiki i sar., 1999).

S obzirom da se BPA proizvodi u ogromnim količinama širom sveta i ulazi u sastav mnogih proizvoda koji su u svakodnevnoj upotrebi, procena potencijalnih štetnih efekata na ljudsko zdravlje je od izuzetnog značaja. Zbog toga je procena toksičnosti BPA predmet mnogobrojnih istraživanja širom sveta. U poslednjih nekoliko godina, pokrenuti su postupci u cilju smanjenja izloženosti ljudi ovom endokrinom ometaču. Kanada je prva zemlja koja je ovu supstancu priključila listi toksičnih supstanci, a 2008. godine zabranila uvoz i plasiranje bočica za bebe koje su napravljene od polikarbonatne plastike. Što se tiče zemalja Evropske unije, prodaja proizvoda koji sadrže BPA, a dolaze u kontakt sa hranom za decu starosti do 3 godine, zabranjena je 2010. godine u Danskoj i Francuskoj, dok je Francuska u januaru 2015. zabranila upotrebu BPA i u ambalažama za hranu i piće. Početkom 2015. godine, Evropska agencija za bezbednost hrane (European Food Safety Authority, EFSA) je smanjila dozvoljeni dnevni unos (engl. *tolerable daily intake*, TDI), sa 50 µg/kg na 4 µg/kg telesne mase po danu.

### **1.7.2. Metabolizam BPA**

U radu objavljenom 2002. godine pokazano je da se BPA nakon ulaska u ljudski organizam oralnim putem veoma brzo apsorbuje u gastrointestinalnom traktu i metaboliše u jetri i intestinumu. Većina unesenog BPA izlučuje se urinom u formi dva metabolita, BPA glukuronida i u manjoj meri BPA sulfata, u roku od 6 h ( $t_{1/2} = 5,4$  h), a u potpunosti se eliminiše iz organizma nakon 24 h (Völkel i sar., 2002). BPA glukuronid je biološki neaktivna forma BPA u pogledu vezivanja i aktivacije ER. Međutim, nije isključeno da ovaj metabolit ostvaruje negativne efekte nezavisno od ER (Matthews i sar., 2001).

### **1.7.3. Biološki efekti BPA**

BPA ispoljava srednju akutnu toksičnost kod sisara. Oralna LD<sub>50</sub> kod pacova iznosi 3250 mg/kg telesne mase (Richter i sar., 2007), dok intraperitoneumska i intravenska LD<sub>50</sub> iznose 841 odnosno 35,16 mg/kg telesne mase. Injekcija letalne

doze uzrokuje akutnu toksičnost koja se odlikuje zastojem disanja i hipotenzijom, a zatim i bradikardijom (Pant i Deshpande, 2012).

Estrogenska aktivnost BPA je dokumentovana 1993. godine, tokom ispitivanja estrogen-vezujućih proteina kod kvasca. Kao posledica migracije BPA iz polikarbonatne plastike tokom autoklaviranja, uočena je estrogena aktivnost koja nije poticala od kvasca, već od BPA. Ovi navodi su kasnije potvrđeni korišćenjem različitih eseja kao što su kompetitivno vezivanje za estrogenski receptor, proliferacija MCF7 humane ćelijske linije adenokarcinoma dojke, kao i indukcija PGR (Krishnan i sar., 1993). U kasnijoj studiji, utvrđeno je da je kod miševa koji su bili izloženi BPA u koncentracijama od 0,1 do 100 mg/kg telesne mase došlo do pojave proliferativnih promena na uterusu analognim delovanju estradiola (Markey i sar., 2001).

Iako je estrogenski potencijal BPA prepoznat od samog početka, on se smatra slabim aktivatorom estrogenskih receptora, s obzirom da je njegov kapacitet vezivanja za ER $\alpha$  i ER $\beta$  oko 1000–10 000 puta slabiji u odnosu na prirodni estradiol (Kuiper i sar., 1998; Andersen i sar., 1999), pri čemu ispoljava veći afinitet za ER $\beta$  (Matthews i sar., 2001). Osim toga, istraživanja su pokazala da u pojedinim tipovima ćelija BPA deluje kao agonist ER $\beta$ , dok na ER $\alpha$  ispoljava kako agonističke, tako i antagonističke efekte (Kurosawa i sar., 2002).

Osim genomskih efekata koje ostvaruje vezivanjem za nukleusne estrogenske receptore, pokazano je da BPA može da dovede do brzih negenomskih promena na nivou ćelijske signalizacije čak i pri veoma niskim koncentracijama. Eksperimenti na HEK293 ćelijskoj liniji pokazali su da BPA ima sposobnost vezivanja za membranski estrogenski receptor GPER, što za posledicu ima povećanu aktivnost AC (Thomas i Dong, 2006). Osim toga, BPA dovodi do brze aktivacije EGFR/ERK1/2 signalnog puta i ekspresije transkripcionog faktora AP-1 (engl. *activator protein-1*) u ER $\alpha$ / $\beta$ -pozitivnim i ER $\alpha$ / $\beta$ -negativnim humanim ćelijskim linijama kancera dojke (MCF-7, MDA-MB-231 i SKBR3). Pokazano je da je ovaj efekat BPA posledica aktivacije GPER na membrani ovih ćelija (Dong i sar., 2011).

Istraživanja na laboratorijskim životinjama, ali i epidemiološka ispitivanja, dovode u vezu izloženost BPA sa povećanjem telesne mase. Tako je pokazano da izloženost miševa niskim koncentracijama BPA tokom perinatalnog perioda doprinosi povećanju volumena adipocita, kao i povećanju telesne mase u odraslom dobu (Bodin i sar., 2013). U studiji sprovedenoj na humanoj populaciji u SAD u kojoj je učestvovalo 2838 dece i adolescenata, zabeležena je značajna veza između koncentracije BPA u urinu i gojaznosti (Trasande i sar., 2012). Osim gojaznosti, veća izloženost BPA dovodi se u vezu i sa insulinskom rezistencijom (Wang i sar., 2012), kao i nastankom dijabetesa tipa 2 (Shankar and Teppala, 2011). Povećane koncentracije BPA u urinu u pozitivnoj su korelaciji i sa koronarnom bolesti srca (Melzer i sar., 2010) i hipertenzijom (Bae i sar., 2012).

Istraživanja kancerogenog potencijala BPA sprovedena na laboratorijskim životinjama pokazala su da tretman pacova niskim koncentracijama BPA povećava incidencu tumora mlečnih žlezda (Soto i sar., 2013), prostate i bradavica (Keri i sar., 2007), te nastanak tumora testisa (Michałowicz, 2014). Veza između koncentracije BPA u serumu žena i tumora dojke predmet su epidemioloških istraživanja. Pokazano je da se u serumu žena kod kojih je dijagnostikovao tumor dojke ne nalaze povišene koncentracije BPA (Yang i sar., 2009). Ovi nalazi potvrđeni su rezultatima još jedne studije gde je ispitivana veza između profesionalne izloženosti žena različitim ksenoestrogenima, uključujući i BPA, i tumora dojke (Aschengrau i sar., 1998). Sa druge strane, značajno povišeni nivoi BPA detektovani su u urinu pacijenata koji boluju od karcinoma prostate (Tarapore i sar., 2014).

Negativni efekti BPA na muški reproduktivni sistem dokumentovani su brojnim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima. Tako je pokazano da oralni tretman mladih mužjaka miševa BPA u koncentraciji od 50 µg/mL dovodi do smanjenog nivoa slobodnog testosterona u plazmi nakon 4–8 nedelja tretmana (Takao i sar., 1999). BPA dovodi do dozno- i vremenski-zavisnog povećanja ekspresije i aktivnosti aromataze u Lajdigovim RC2 ćelijama (Kim i sar., 2010). Sa druge strane, Akingbemi i saradnici (2004) pokazali su da tretman mužjaka pacova sa BPA (2,4 µg/kg telesne

mase/danu) između 21. i 35. dana starosti dovodi do supresije ekspresije aromataze, kao i smanjenog nivoa estradiola u serumu ovih pacova.

#### **1.7.4. Efekti BPA na ženski reproduktivni sistem**

Izlaganje ženki pacova dozi BPA od 0,05 mg/kg telesne mase/danu u periodu između 1. i 7. postnatalnog dana prouzrokovalo je neregularnosti u estrusnom ciklusu. Veće doze od 20 mg/kg/danu uzrokovale su supresiju oslobađanja LH nakon tretmana estradiolom (Monje i sar., 2010). Osim toga, pokazano je da BPA dovodi do ranijeg vaginalnog otvaranja kod ženki miševa, što ukazuje na preranu pojavu puberteta (Fernández i sar., 2009), dok su Nah i saradnici (2011) pokazali da tretman ženki pacova sa BPA (500 µg/50µL) u periodu od 1. do 10. postnatalnog dana dovodi do pojave perzistentnog estrusa. Osim toga, izloženost laboratorijskih životinja BPA dovodi do formiranja ovarijumskih cista (Fernández i sar., 2010), akumulacije velikih antrumskih folikula (Adewale i sar., 2009), smanjenja ovarijumske rezerve primordijumskih folikula (Chao i sar., 2012), kao i atrezije folikula (Lee i sar., 2013).

Proces steroidogeneze je takođe meta delovanja BPA. Pokazano je da tretman ženki miševa u perinatalnom i postanatalnom periodu niskim koncentracijama BPA dovodi do povećane ekspresije aromataze u ovarijumima i placenti, kao i nivoa estradiola u serumu (Xi i sar., 2011; Tan i sar., 2013). Sa druge strane, tretman sa BPA u koncentracijama od 6,75 i 10,125 mg/životinji tokom perioda rane trudnoće nije uticao na nivo estradiola, ali je doveo do značajnog smanjenja koncentracije progesterona u urinu ovih životinja (Berger i sar., 2008). Osim toga, kod odraslih ženki pacova tretiranih sa BPA u koncentracijama od 0,001 mg/kg/danu i 0,1 mg/kg/danu došlo je do smanjenja nivoa estradiola u serumu, kao i nivoa aromataze i StAR proteina u granulosa i teka ćelijama (Lee i sar., 2013). Rezultati *in vitro* studije na kulturi antrumskih folikula miševa pokazali su da BPA u koncentracijama od 44 do 440 µM ispoljava inhibitorski efekat na razvoj folikula, stvaranje estradiola, testosterona, androstendiona, estrona, progesterona, kao i na nivo StAR i dezmolaze (Peretz i sar., 2011; Ziv-Gal i sar., 2013). Sa druge strane, u eksperimentima na primarnoj kulturi teka ćelija BPA (0,1–100 µM) je doveo do suprotnih efekata,



odnosno, do povećanja sinteze testosterona i ekspresije CYP17A1, dezmolaze i StAR, dok je u eksperimentima na primarnoj kulturi granulosa ćelija doveo do povećane ekspresije StAR proteina, a smanjene sinteze progesterona (Zhou i sar., 2008). Rezultati eksperimenata na KGN ćelijskoj liniji (tumorske ćelije slične ovarijumskim granulosa ćelijama) i granulosa ćelijama dobijenim tokom procedure vantelesne oplodnje pokazali su da se inhibitoran efekat BPA na ekspresiju aromataze stimulisanu sa FSH i sintezu estradiola najverovatnije ostvaruje putem aktivacije PPAR $\gamma$  (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) (Kwintkiewicz i sar., 2010).

Rezultati studije sprovedene na malom broju žena pokazali su odsustvo BPA u serumu žena koje nemaju endometriozu. Kod 52,7% žena sa endometriozom, detektovane su određene koncentracije BPA u serumu (Cobellis i sar., 2009). Izloženost BPA se dovodi u vezu i sa ponovljenim spontanim pobačajima (Sugiura-Ogasawara i sar., 2005), prevremenim porođajima (Cantonwine i sar., 2015), kao i manjom telesnom masom novorođenčadi (Miao i sar., 2011).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su efekti i mehanizmi delovanja atrazina i bisfenola A na granulosa ćelije ovarijuma pacova. S tim u vezi, postavljena su tri cilja istraživanja:

- Ispitati efekte endokrinog ometača atrazina na put biosinteze estradiola i progesterona nakon *in vitro* tretmana primarne kulture granulosa ćelija izolovanih iz nezrelih ženki pacova starih 21–24 dana. Zbog toga će biti ispitivano stvaranje hormona estradiola i progesterona, kao i ekspresija gena koji kodiraju proteine uključene u sintezu estradiola (aromataza) i progesterona (StAR i dezmolaza) u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH. Takođe, analiziraće se i uticaj atrazina na nivo iRNK za LHR nakon stimulacije sa FSH, kao i ovulacioni odgovor ćelija nakon stimulacije sa hCG. Za definisanje mehanizma delovanja atrazina na put biosinteze estradiola i progesterona kod granulosa ćelija stimulisanih sa FSH ispitivaće se aktivnost cAMP/PKA, ERK1/2 i Akt signalnih puteva i ekspresija gena koji kodiraju enzime koji pripadaju prvoj fazi metabolizma ksenobiotika (CYP1A1, CYP1B1).
- Ispitati efekte *in vivo* tretmana atrazinom na ovulaciju i stvaranje hormona estradiola kod nezrelih ženki pacova starih 21–24 dana i tretiranih gonadotropinima. Analiziraće se oslobađanje oocita nakon primene protokola za superovulaciju, kao i nivoi iRNK za aromatazu, LHR i proteine uključene u regulaciju ovulacije kod nezrelih ženki pacova tretiranih atrazinom i gonadotropinima. Za definisanje potencijalnog mehanizma delovanja atrazina u *in vivo* uslovima pratiće se geni koji kodiraju enzime koji pripadaju prvoj fazi metabolizma ksenobiotika (CYP1A1, CYP1B1), kao i aktivnost GST enzima koji pripada drugoj fazi metabolizma ksenobiotika.
- Ispitati efekte endokrinog ometača bisfenola A na put biosinteze progesterona nakon *in vitro* tretmana primarne kulture granulosa ćelija izolovanih iz nezrelih ženki pacova starih 21–24 dana. Zbog toga će biti ispitivano stvaranje progesterona i nivoi iRNK za proteine uključene u biosintezu ovog hormona, StAR, dezmolaze i 3β-HSD. Za definisanje mehanizma delovanja bisfenola A na

put biosinteze progesterona analiziraće se distribucija i metabolizam holesterola u granulosa ćelijama tretiranim ovim endokrinim ometačem.

## **3. MATERIЈAL I METODE**

Svi ogledi su izvođeni u Laboratoriji za ekotoksikologiju, Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

### 3.1. Hemikalije

Atrazin korišćen u *in vitro* eksperimentima, BPA, dimetil-sulfoksid (DMSO), medijum DMEM/F12, HEPES, goveđi serum albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA, frakcija V), rastvor penicilina i streptomocina, fungizon, etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), fibronektin, estradiol, testosteron, holesterol, 22(R)-hidroksiholesterol, pregnenolon, trihlorsirćetna kiselina, perhlorna kiselina, sulfurodamin B, rastvor tripan plavog (Trypan Blue 0,4 %), 8-bromoadenozin cAMP (8-Br-cAMP), U0126, vortmanin, rolipram, 3-izobutil-1-metilksantin (IBMX), forskolin, EGF, kolagenaza (*Collagenase, Type IA*, iz *Clostridium histolyticum*), humani horionski gonadotropin, Filipin III nabavljeni su od Sigma Chemical Company (Steinheim, Nemačka). Atrazin (hemijske čistoće >97%) korišćen u *in vivo* eksperimentima nabavljen je od Galenika Fitofarmacija A.D. (Beograd, Srbija). Fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) nabavljen je od Gibco (Grand Island, NY, SAD). Prečišćeni rekombinantni hFSH nabavljen je od Serono (Randolph, MA, SAD). Horionski gonadotropin ždrebne kobile (engl. *equine chorionic gonadotropin*, eCG) - Sugonal nabavljen je od Veterinarskog zavoda, Subotica. Kompleti za određivanje koncentracije proteina *Pierce BCA* i *Dc* nabavljeni su od Thermo Scientific (Rockford, IL, SAD) i Bio-Rad (Hercules, CA, SAD).

cAMP EIA komplet nabavljen je od Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, SAD). ELISA komplet za određivanje nivoa progesterona u eksperimentima u kojima je korišćen ATR dobijen je od dr Aleksandra Milovanovića (Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad), dok je ELISA komplet za određivanje nivoa progesterona u eksperimentima sa bisfenolom A nabavljen od Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, SAD).

### 3.1.1. Hemikalije za RIA analizu

[1, 2, 6, 73H(N)]-estradiol i p-Bis [2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene (POPOP) kupljeni su od New England Nuclear (Brisel, Belgija). Antiestradiol-11-BSA serum No.244 dobijen je od dr G. D. Niswender (Colorado State University, Fort Collins, CO, SAD). 2,5-diphenyloxazole nabavljen je od Sigma Chemical Company (St. Louise, MO, SAD). Dekstran T-70 kupljen je od Pharmacia (Upssala, Švedska). Aktivni ugljik – Norit A kupljen je od Serva (Heidelberg, Nemačka). Ostale hemikalije su bile analitičke čistoće.

### 3.1.2. Hemikalije za kvantifikaciju genske ekspresije

*TRIZol Reagent* za izolaciju RNK nabavljen je od Invitrogen (Carlsbad, CA, SAD). Komplet za sintezu cDNK - *High-Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase inhibitor* i komplet za PCR reakciju *Power SYBR Green PCR Master Mix* nabavljeni su od Applied Biosystems (Foster City, SAD), dok su prajmeri za real-time PCR nabavljeni od Invitrogen (Carlsbad, CA, SAD).

### 3.1.3. Hemikalije za pERK1/2 enzimski imunotest (ELISA) na granuloza ćelijama i Western blot analizu

Paraformaldehid, kozji serum (engl. *normal goat serum*, NGS), *o*-phenylenediamine (OPD), 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilen glikol (Triton X-100), Crystal Violet, TWEEN® 20, Nonidet™ P 40 (NP-40), sodium deoxycholate, amonijum persulfat, akrilamid/bis-akrilamid, N,N,N',N'-tetrametiletlen-diamin (TEMED), β-merkaptoetanol, natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), glicin, TRIZMA base, ditiotretitol (DTT) kupljeni su od Sigma Chemical Company (Steinheim, Nemačka). Supstrat za detekciju Western blot analize *SuperSignal West Femto* kupljen je od Thermo Scientific (Rockford, IL, SAD). Proteinski marker *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* je nabavljen od Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, SAD). Proteinski marker *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™* nabavljen je od Bio-Rad (Hercules, CA, SAD). Poliklonska zečja antitela za fosfo-

ERK1/2 i fosfo-AKT i monoklonska zečja antitela za fosfo-CREB i GAPDH nabavljena su od Cell Signaling Technology (Danvers, MA, SAD). Antitela za CEBPB i SREBP-1 nabavljena su od Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, SAD). Antitelo za StAR protein je poklon od dr. Douglas M. Stocco (Texas Tech University, Lubbock, TX). Kozje anti-zečije sekundarno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (engl. *horse radish peroxidase*, HRP) nabavljeno je od Bio-Rad (Hercules, CA, SAD). Ostale hemikalije su bile analitičke čistoće.

## **3.2. Eksperimentalne životinje**

U eksperimentalnom radu su korišćene ženke belih pacova (*Rattus norvegicus*) rase Wistar, starosti 21–24 dana. Životinje su uzgajane u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu pri standardnim laboratorijskim uslovima kontrolisanog osvetljenja (12 h svetlo/12 h mrak, pri čemu je svetlo uključivano ujutru u 7 h) i kontrolisane temperature od  $22 \pm 2$  °C. Hranjene su standardnom paletiziranom laboratorijskom hranom za pacove (Veterinarski zavod, Subotica), a vodu su uzimale po potrebi. Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Univerziteta u Novom Sadu, u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije (*"Sl. glasnik RS"*, br. 41/2009).

## **3.3. Eksperimentalni dizajn**

### **3.3.1. *In vitro* tretman primarne kulture nezrelih granulosa ćelija sa ATR**

Kao eksperimentalni model za ispitivanje *in vitro* efekata ATR na steroidogeni potencijal i mehanizme delovanja kod granulosa ćelija korišćena je primarna kultura granulosa ćelija izolovana iz nezrelih ženki pacova, koje su subkutano tretirane estradiolom (2 mg/0,2 mL maslinovog ulja/ženki/dan) u trajanju od 4 dana, od 21 do 24 dana starosti. Pretretman estradiolom vršen je u cilju dobijanja većeg broja ćelija, s obzirom da estradiol promoviše proliferaciju (Rae i sar., 1978), a ne utiče na diferencijaciju granulosa ćelija (Louvet i Vaitukaitis, 1976; Dunkel i sar., 1994; ). 24 h



nakon poslednje injekcije estradiola, ženke pacova su žrtvovane procesom dekapitacije, izolovani su ovarijumi, nakon čega se pristupilo izolaciji granulosa ćelija.

### **3.3.1.1. Izolacija granulosa ćelija**

Izolacija granulosa ćelija je rađena prema prethodno opisanoj proceduri (Campbell, 1979). Izdvojeni ovarijumi čišćeni su od okolnog tkiva, a potom prebacivani u petri posude i dva puta ispirani medijumom DMEM/F12 koji sadrži 100 mg streptomicina, 100 000 IU penicilina i 250 µg fungizona po litri. Na ovarijume je zatim dodavano 3 mL DMEM/F12 sa EDTA u koncentraciji 2,28 mg/mL, nakon čega je vršena inkubacija u trajanju od 20 minuta u CO<sub>2</sub> inkubatoru (37 °C; 5% CO<sub>2</sub>). Nakon isteka inkubacionog perioda, uklanjan je DMEM/F12 medijum sa EDTA. Potom je u istu petri ploču dodavano 3 mL DMEM/F12 sa saharozom (0,17 g/mL), nakon čega je vršena inkubacija u CO<sub>2</sub> inkubatoru (37 °C; 5% CO<sub>2</sub>) u trajanju od 10 minuta. Po isteku inkubacionog perioda ovarijumi su dvostruko ispirani sa po 2 mL DMEM/F12 medijuma. U petri posudu je potom dodavano još 2 mL DMEM/F12, nakon čega je vršeno punktiranje ovarijuma pomoću 27G sterilne igle u trajanju od 1 minuta za svaki ovarijum, čime je omogućeno oslobađanje granulosa ćelija iz ovarijuma. Ćelije su zajedno sa medijumom sakupljane u sterilnu epruvetu zapremine 12 mL i centrifugirane na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min na 1200 obrtaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm).

Supernatant je pažljivo odlivan, nakon čega je talog resuspendovan u 6 mL 0,1% BSA DMEM/F12 koji je sadržao 100 mg streptomicina, 100 000 IU penicilina i 250 µg fungizona po litri. Vijabilnosti granulosa ćelija određivana je bojenjem sa 0,4% rastvorom tripan plavog, pri čemu je broj živih ćelija određivan njihovim brojanjem u hemocitometru. Metoda se zasniva na principu da žive ćelije ne apsorbuju boju, dok se mrtve ćelije boje plavo, jer tripan plavo prodire kroz oštećenu ćelijsku membranu. Postupak je sledeći: pripremljena suspenzija granulosa ćelija dobro je mešana pipetom i dodavano je 0,05 mL ove suspenzije u epruvetu koja je sadržala 0,05 mL tripan plavog. Posle nekoliko minuta na oba polja hemocitometra nanošena je po kap

obojene suspenzije i vršilo se brojanje u ugaonim tzv. A kvadratima, pri uvećanju 100x. Brojane se žive ćelije, sa neoštećenom membranom, koje se za razliku od mrtvih, raspadnutih ćelija i ćelija sa oštećenom membranom, nisu bojile plavo. Površina na kojoj su brojane ćelije bila je 1 mm<sup>2</sup>, a visina komore 0,1 mm. Prosečan broj ćelija po kvadratu množen je sa odgovarajućim razblaženjem, i sa brojem 10<sup>4</sup> da bi se odredio broj izolovanih ćelija po mL.

Suspenzija je zatim razblaživana do finalne koncentracije ćelija u kojoj se sade ćelije, nakon čega su ćelije sađene u ploče prethodno oblagane fibronektinom (5% fibronektin u DMEM/F12). Nakon lepljenja za podlogu u trajanju od 20-24 h, ćelije su isprane sa 0,1% BSA u DMEM/F12 koji je sadržao 100 mg streptomocina i 100 000 IU penicilina (0,1% BSA DMEM/F12), nakon čega je pristupano dodavanju odgovarajućih tretmana u zavisnosti od eksperimentalnog dizajna.

#### **3.3.1.2. Tretman sa ATR**

Osnovni rastvor ATR je pravljen u DMSO, pri čemu su radni rastvori pripremani u 0,1% BSA DMEM/F12 tako da % DMSO u svakom bunariću ne bude veći od 0,1%, dok je % DMSO u kontrolnim bunarićima odgovarao % u tretiranim bunarićima. Isti princip pravljenja rastvora ATR je sproveden kroz čitavo istraživanje, uključujući tretmane kada su dodatno korišćeni pojedini aktivatori/inhibitori takođe rastvarani u DMSO.

Ćelije su tretirane sa FSH (100 ng/mL), odnosno, kombinacijom FSH (100 ng/mL) i estradiola (100 ng/mL), samostalno ili u kombinaciji sa 10 μM ili 20 μM ATR u različitim vremenskim intervalima (2 h, 6h, 12 h, 24 h ili 48 h), nakon čega su mereni nivoi akumuliranog estradiola i progesterona u inkubacionom medijumu ili je izolovana RNK radi utvrđivanja efekta ATR na nivo iRNK za LHR i drugih iRNK u granulosa ćelijama. Eksperimenti u kojima su mereni nivoi akumuliranog estradiola u inkubacionom medijumu rađeni su u prisustvu supstrata za aromatazu, testosterona (50 ng/mL).

Radi ispitivanja potencijalnog citotoksičnog efekta ATR, ćelije su tretirane sa FSH (100 ng/mL), samostalno ili u kombinaciji sa 20  $\mu$ M ATR u trajanju od 72 h, nakon čega je broj ćelija određivan korišćenjem sulforodamin B (SRB) analize.

Radi potvrđivanja efekta ATR na LHR, kao i na ovulacione procese, nakon završenog 48 h tretmana sa ATR (20  $\mu$ M) u prisustvu i odsustvu FSH (100 ng/mL), rađena je stimulacija sa hCG (1 IU/mL) u trajanju od 3 h, nakon čega je izolovana RNK i analizirani nivoi iRNK za proteine uključene u kontrolu ovulacije.

Uticaj ATR na pojedine signalne puteve analiziran je prilikom 0,5 h, 2 h, 4 h i 6 h tretmana u prisustvu i odsustvu FSH (100 ng/mL), nakon čega je rađen enzimski imunotest (ELISA) na granuloza ćelijama i Western blot analiza.

Radi potvrđivanja mesta delovanja ATR, tretmani su urađeni u prisustvu aktivatora signalnih puteva: 8-br-cAMP (aktivator PKA; 1 mM), forskolina (aktivator adenil ciklaze; 1  $\mu$ M), EGF (aktivator EGFR; 100 ng/mL) i bNF (aktivator aril hidrokarbonskog receptora; 10  $\mu$ M), kao i nakon pretretmana sa sledećim inhibitorima: U0126 (inhibitor MEK1/2; 10  $\mu$ M), vortmanin (inhibitor PI3K; 0.5  $\mu$ M), IBMX (neselektivni inhibitor PDE; 1 mM), rolipram (inhibitor PDE4; 10  $\mu$ M), nakon čega je kvantifikovana genska ekspresija, određivana koncentracija hormona akumuliranih u medijumu ili rađena Western blot analiza, u zavisnosti od eksperimentalnog dizajna.

Za potrebe ispitivanja uticaja ATR na akumulaciju hormona, ekspresiju gena, kao i za Western blot analizu ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića (250 000 ćelija/bunariću), dok su za ELISA test na granuloza ćelijama i SRB analizu ćelije sađene u ploče sa 96 bunarića (100 000 ćelija/bunariću). Nakon 20–24 h lepljenja, ćelije su tretirane prema određenoj šemi, pri čemu je zapremina tretmana bila 0,5 mL/bunariću za ploče sa 24 bunarića i 0,2 mL/bunariću za ploče sa 96 bunarića. Prilikom svih tretmana ćelije su inkubirane u CO<sub>2</sub> inkubatoru, na temperaturi od 37 °C, gde je obezbeđivana atmosfera 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>.

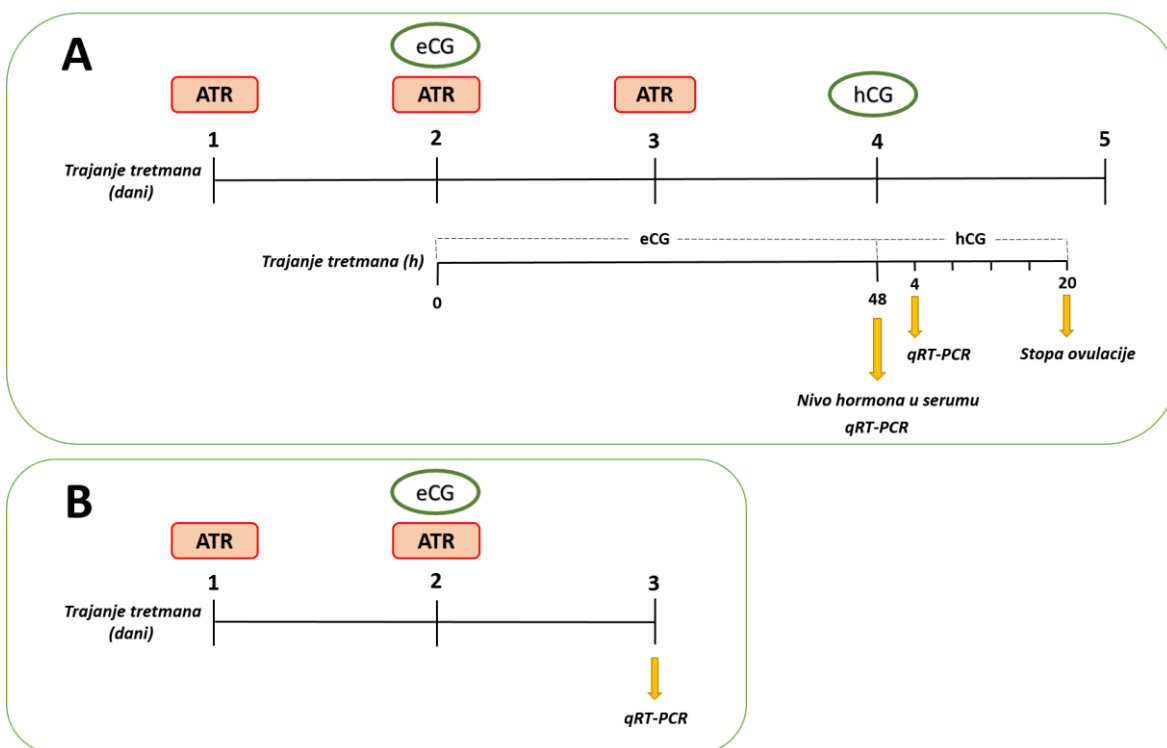
### 3.3.2. *In vivo* tretman nezrelih ženki pacova tretiranih gonadotropinima sa ATR

Za ispitivanje *in vivo* efekata ATR na ovulaciju i funkciju granuloza ćelija, kao eksperimentalni model korišćene su nezrele ženke pacova starosti 21–24 dana, tretirane intraperitonealno (i.p.) sa horionskim gonadotropnim hormonom ždrebne kobile (engl. *equine chorionic gonadotropin*, eCG; 10 IU/životinji), a nakon toga i sa hCG (i.p.; 10 IU/životinji.). eCG se kao analog FSH vezuje za FSH receptor i na taj način dovodi do proliferacije i diferencijacije granuloza ćelija ovarijuma, kao i do povećanja broja LHR na membrani ćelija, dok tretman sa hCG ima za cilj izazivanje ovulacije i luteinizacije granuloza ćelija.

Tretman suspenzijom ATR (i.p.; 50 mg/kg telesne mase) rađen je pre i tokom tretmana ženki pacova sa eCG, u trajanju od dva (Slika 2.1.B) ili tri (Slika 2.1.A) dana, u zavisnosti od eksperimentalnog dizajna.

Osnovna suspenzija ATR pravljen je u DMSO, dok su radne suspenzije pravljen u PBS puferu (140 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), tako da je % DMSO koji je injektiran životinjama iznosio 5%. Kontrolne životinje su tretirane intraperitonealno sa PBS puferom koji je sadržao 5% DMSO. Radni rastvori eCG i hCG pravljeni su u PBS puferu.

Kontrolne životinje koje nisu odgovorile na eCG i/ili hCG tretman isključivane su iz daljih eksperimenata. Odluka je donošena na osnovu veličine ovarijuma i dijametra uterusa, odnosno, u slučaju genske ekspresije na osnovu nivoa indukcije ekspresije gena (indukcija manja od 5 u odnosu na odgovarajuću kontrolu), za gene čija je ekspresija indukovana sa eCG i/ili hCG.



**Slika 3.1. Eksperimentalni dizajn *in vivo* tretmana sa ATR. (A)** Trodnevni tretman sa ATR – Nezrele ženke pacova starosti 21–24 dana tretirane su suspenzijom ATR (i.p.; 50 mg/kg telesne mase) u trajanju od tri dana: 24 h pre eCG administracije (i.p.; 10 IU/životinji), u trenutku eCG administracije i 24 h nakon eCG administracije. Stopa ovulacije određivana je 4 h nakon injekcije hCG (i.p.; 10 IU/životinji). Nivo hormona u serumu i genska ekspresija u granulosa ćelijama analizirani su u različitim vremenskim intervalima nakon tretmana sa eCG/hCG. **(B)** Dvodnevni tretman sa ATR – Nezrele ženke pacova tretirane su suspenzijom ATR (i.p.; 50 mg/kg telesne mase) 24 h pre eCG administracije (i.p.; 10 IU/životinji), i u trenutku eCG administracije. Genska ekspresija u granulosa ćelijama analizirana je 24 h nakon tretmana sa eCG.

### 3.3.2.1. Trodnevni tretman sa ATR

Nezrele ženke pacova starosti 21–24 dana tretirane su suspenzijom ATR (i.p.; 50 mg/kg telesne mase) u trajanju od tri dana: 24 h pre eCG administracije (i.p.; 10 IU/životinji), u trenutku eCG administracije i 24 h nakon eCG administracije.

Životinje su žrtvovane 48 h nakon eCG injekcije, nakon čega je određivan nivo estradiola u serumu. Za ispitivanje uticaja *in vivo* tretmana ATR na gensku ekspresiju granulosa ćelija, izdvajani su ovarijumi, a potom su granulosa ćelije izolovane

punktiranjem ovarijuma sa 27G iglom u trajanju od 1 minuta za svaki ovarijum. Čelije su ispirane dva puta sa hladnim PBS puferom, centrifugirane na 1200 rpm u trajanju od 5 min, nakon čega je talog ćelija resuspendovan u 250 µL TRIzol reagensa i sačuvan na -70 °C do postupka izolacije ukupne RNK. 44 h do 48 h nakon eCG injekcije grupa životinja je tretirana sa hCG (i.p.; 10 IU/životinji). Za potrebe ispitivanja uticaja *in vivo* tretmana ATR na ekspresiju gena uključenih u proces ovulacije granuloza ćelije su izolovane 4 h nakon hCG tretmana i čuvane u TRIzol reagensu na -70 °C do postupka izolacije ukupne RNK. 20 h nakon hCG injekcije, ženke su žrtvovane procesom dekapitacije i rađena je disekcija ampule jajovoda, prilikom čega je došlo do oslobađanja kumulus-oocitnih kompleksa. Kako bi se oocite oslobodile od okolnih kumulusnih ćelija, kumulus-oocitni kompleksi inkubirani su sa 1% rastvorom kolagenaze na 37 °C u trajanju od 30 min. Nakon toga, broj prisutnih oocita određivan je korišćenjem mikroskopa. Stopa ovulacije je definisana kao broj oslobođenih oocita po životinji.

#### **3.3.2.2. Dvodnevni tretman sa ATR**

Nezrele ženke pacova starosti 21–24 dana tretirane su suspenzijom ATR (i.p.; 50 mg/kg telesne mase) 24 h pre eCG administracije (i.p.; 10 IU/životinji), i u trenutku eCG administracije. Životinje su žrtvovane 24 h nakon eCG tretmana. Za analizu genske ekspresije granuloza ćelije su izolovane na način opisan u prethodnom poglavlju, resuspendovane u TRIzol reagensu i čuvane na -70 °C do postupka izolacije ukupne RNK.

#### **3.3.3. *In vitro* tretman primarne kulture nezrelih granuloza ćelija sa BPA**

Kao eksperimentalni model za ispitivanje *in vitro* efekata BPA na steroidogeni potencijal i funkciju granuloza ćelija korišćena je primarna kultura granuloza ćelija izolovana iz nezrelih ženki pacova. Prilikom ispitivanja efekata BPA, nezrele ženke pacova nisu pretretirane sa estradiolom, s obzirom da je pokazano da se BPA vezuje za estrogenske receptore. Ženke pacova starosti 21–24 dana su žrtvovane procesom

dekapitacije, izolovani su ovarijumi, nakon čega je pristupano izolaciji granuloza ćelija na način opisan u poglavlju 3.3.1.1.

Nakon izolacije ćelija, talog je resuspendovan u 6 mL 5% FBS DMEM/F12 koji sadrži 100 mg streptomicina, 100 000 IU penicilina i 250 µg fungizona po litri, i potom su ćelije brojane na način opisan u poglavlju 3.3.1.1. Suspenzija je zatim razblaživana do finalne koncentracije ćelija u kojoj se sade ćelije, nakon čega su ćelije sađene u ploče prethodno oblagane fibronektinom. Medijum u kome su sađene ćelije zamenjen je sa 0,1% BSA DMEM/F12 koji je sadržao 100 mg streptomicina i 100 000 IU penicilina i 250 µg fungizona po litri, 4–6 h nakon sađenja. Nakon lepljenja za podlogu u trajanju od 20–24 h, ćelije su ispirane sa 0,1% BSA DMEM/F12 koji je sadržao 100 mg streptomicina i 100 000 IU penicilina (0,1% BSA DMEM/F12), nakon čega je pristupano dodavanju tretmana.

#### **3.3.3.1. Tretman sa BPA**

Osnovi rastvor BPA koji je korišćen za sve tretmane napravljen je u metanolu, pri čemu su radni rastvori pripremani u 0,1% BSA DMEM/F12 tako da % metanola u svakom bunariću ne bude veći od 0,2%, dok je % metanola u kontrolnim bunarićima odgovarao % u tretiranim bunarićima. Isti princip pravljenja rastvora BPA sproveden je kroz čitavo istraživanje.

Granuloza ćelije su tretirane sa 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM ili 100 µM BPA samostalno ili u prisustvu FSH (100 ng/mL) u trajanju od 24 h i 48 h. Vijabilnost ćelija određivana je 48 h nakon tretmana korišćenjem SRB analize. Nivoi iRNK za StAR, dezmolazu i 3β-HSD određivani su qRT-PCR analizom 24 i 48 h nakon tretmana sa BPA, dok je nivo StAR proteina određivan Western blot analizom 24 h i 48 h nakon tretmana, odnosno, SREBP-1 proteina 24 h nakon tretmana. Nivoi progesterona u inkubacionom medijumu nakon tretmana sa BPA u trajanju od 24 h određivani su u odsustvu ili prisustvu FSH, holesterola (20 µM), 22-OH holesterola (20 µM) i pregnenolona (20 µM).

Radi ispitivanja uticaja BPA na distribuciju i sadržaj slobodnog holesterola ćelije su tretirane sa 100  $\mu$ M BPA u trajanju od 24 h, nakon čega je slobodni holesterol detektovan bojenjem ćelija Filipin III bojom.

Za potrebe ispitivanja uticaja BPA na akumulaciju hormona, ekspresiju gena, kao i za Western blot analizu ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića (350 000 ćelija/bunariću), dok su za Filipin III bojenje ćelije sađene na mikroskopske pločice sa 8 bunarića (200 000 ćelija/bunariću). Za SRB analizu sađeno je 150 000 ćelija/bunariću u ploče sa 96 bunarića. Nakon 20-24 h lepljenja ćelije su tretirane prema određenoj šemi, pri čemu je zapremina tretmana bila 0,5 mL/bunariću za ploče sa 24 bunarića, i 0,25 mL/ bunariću za mikroskopske pločice sa 8 bunarića i 0,2 mL/bunariću za ploče sa 96 bunarića. Prilikom svih tretmana ćelije su inkubirane u CO<sub>2</sub> inkubatoru, na temperaturi od 37 °C, gde je obezbeđivna atmosfera 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.4. Sulforodamin B (SRB) analiza za određivanje vijabilnosti ćelija**

Analiza se zasniva na usvajanju negativno obojenog ljubičastog aminoksantina sulforodamina B (SRB) od strane određenih aminokiselinskih ostataka ćelijskih proteina. Prisustvo većeg broja živih ćelija dovodi do usvajanja veće količine boje. Intenzitet boje se meri fotometrijski.

Po isteku tretmana ćelije su fiksirane na 4 °C u trajanju od 1 h trihlorsirćetnom kiselinom (50% w/v; TCA je pripremana u hladnoj destilovanoj vodi) koja je dodavana na postojeći medijum u količini od ¼ početne zapremine medijuma. Nakon fiksiranja ćelija, ploče su ispirane pet puta sa po 200  $\mu$ l destilovane vode u cilju uklanjanja ostataka TCA i proteina seruma, nakon čega je dodavana SRB boja rastvarana u 1% sirćetnoj kiselini, u količini od ½ početne zapremine medijuma. Tokom inkubacionog perioda od 30 min na sobnoj temperaturi SRB boja je vezivana za aminokiselinske rezidue proteina u ćeliji. Po isteku inkubacionog perioda ploče su ispirane pet puta sa po 200  $\mu$ l 1% sirćetne kiseline kako bi se uklonila nevezana boja. Nakon ispiranja, dodavan je pufer (10 mM *Tris base*, pH 10.5) u zapremini identičnoj



početnoj zapremini medijuma (200  $\mu$ l), kako bi se rastvorila inkorporirana boja. Nakon inkubacije sa puferom u trajanju od 5 min, merene su apsorbance na dve talasne dužine:  $\lambda_1=492$  nm i  $\lambda_2= 690$  nm pomoću Multiscan EX (Thermo LabSystems, Champaign, IL, SAD), a konačna apsorbance je računata kao razlika prve i druge apsorbance. Dobijene apsorbance su normalizovane u odnosu na vrednosti koje su se očitavale za kontrolu, koja predstavlja 100% vijabilnost.

### **3.5. Određivanje koncentracije progesterona ELISA analizom**

U eksperimentima sa ATR nivo progesterona u inkubacionom medijumu, odnosno, serumu određivan je ELISA analizom koja se bazira na kompeticiji između progesterona iz standarda ili uzorka i progesterona koji je obeležen enzimom peroksidaza rena (engl. *horsradish peroxidase*, HRP) za ista vezna mesta na specifičnom antitelu. Formirani kompleks se vezuje za kozja anti-zečja antitela kojima je ploča sa 96 bunarića prethodno obložena. Laboratorijski deo oblaganja ploče sa kozjim anti-zečjim antitelima sproveden je na Odeljenju za reprodukciju Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad". Oblaganje ploča rađeno je tako što je u svaki bunarić dodavano po 100  $\mu$ L rastvora anti-zečjih IgG antitela (MP Biomedicals Inc, Ohio, SAD) koncentracije 4  $\mu$ g/mL, pripremanog u karbonatnom puferu (0,05M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i 0,05M  $\text{NaHCO}_3$  u odnosu 2:5; pH=9,7). Pokrivene ploče su potom inkubirane 48 h na sobnoj temperaturi, uz mešanje na 300 rpm pomoću termomiksera (Thermomixer comfort, Eppendorf, Nemačka). Po isteku inkubacionog perioda ploče su tri puta ispirane sa po 300  $\mu$ L 0,9% rastvora NaCl, a nakon toga blokirane sa 200  $\mu$ L pufera za blokiranje (0,05M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  i 0,05M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  u odnosu 1,5:5, pH 7.4 koji sadrži 3% saharoze i 0,1% BSA) u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi uz mešanje na 300 rpm. Zatim su ploče ispirane tri puta sa po 300  $\mu$ l PBS pufera koji sadrži 0,05 % Tween-20 i ostavljane da se suše preko noći.

Analiza uzoraka rađena je tako što je u odgovarajuće bunariće ploče dodavano po 50  $\mu$ l uzorka, odnosno, 50  $\mu$ l standarda određene koncentracije. Potom je u svaki bunarić dodavano po 50  $\mu$ l HRP-obebeženog progesterona, a zatim i 50  $\mu$ l anti-

progesteronskih antitela. Nakon inkubacije u trajanju od 4 h na sobnoj temperaturi, ploča je ispirana tri puta sa PBS puferom koji je sadržao 0,05% Tween-20. Kao supstrat za razvijanje bojene reakcije korišćeni su rastvori vodonik peroksida i tetrametilbenzidina-TMB (INEP, Zemun). Inkubacija je odvijana tokom 20 minuta, na sobnoj temperaturi, u mraku. Reakcija je zaustavljena sa 50  $\mu$ L prekidača reakcije (2M rastvor  $H_2SO_4$ ) po bunariću, pri čemu je nastajao produkt žute boje. Absorbanca je merena na Multiscan EX (Thermo Labsystems, Champaign, IL, SAD) na talasnoj dužini 405 nm. Koncentracija progesterona u uzorcima određivana je na osnovu standardne inhibicione krive raspona 0,02-10 ng/mL dobijane pomoću standardnog rastvora progesterona poznate koncentracije. Svi uzorci u okviru jednog eksperimenta mereni su u jednoj analizi. Koeficijent varijacije u okviru jedne analize bio je 4,8%.

U eksperimentima sa BPA koncentracija progesterona u inkubacionom medijumu određivana je pomoću komercijalnog kompleta za merenje nivoa progesterona prema uputstvu proizvođača. Ovo je kompetitivni tip ELISA metode, koji se bazira na kompeticiji progesterona iz standarda ili uzorka sa progesteronom koji je obeležen enzimom acetilholinesteraza, za ista vezna mesta na specifičnom antitelu. Koncentracija progesterona u uzorcima određena je na osnovu standardne inhibicione krive raspona 7,8–1000 pg/mL dobijene pomoću standardnog rastvora progesterona poznate koncentracije. Limit detekcije je iznosio 10 pg/mL (pri 80% B/B<sub>0</sub>). Svi uzorci u okviru jednog eksperimenta mereni su u jednoj analizi.

### **3.6. Određivanje koncentracije estradiola radioimunološkom analizom**

Koncentracija estradiola akumuliranog u medijumu, odnosno, u serumu određivana je radioimunološkom analizom. Osnovni princip ove analize je kompeticija između estradiola iz standarda, odnosno, uzorka koji se testira i radioaktivno obeleženog estradiola za ista vezna mesta na specifičnom antitelu. Određivanje nepoznate koncentracije estradiola rađeno je pomoću standardne inhibicione krive

korišćenjem standardnog rastvora estradiola. Osnovni standardni rastvor koncentracije 100 ng/mL korišćen je za formiranje standardne inhibicione krive raspona 0,00625–0,8 ng/0,1 mL. Antiserum specifičan za estradiol razblaživan je tako da je maksimalno vezivanje radioaktivno obeleženog estradiola u odsustvu neobeleženog 30–50%. Radioaktivnost obeleženog estradiola je podešavana na 4200 otkucaja/min/0,1 mL. Odvajanje slobodnog od vezanog liganda vršeno je suspenzijom aktivnog uglja. Svi uzorci u okviru jednog eksperimenta mereni su u jednoj analizi. Koeficijent varijacije u okviru jedne analize bio je 5,8%.

### **3.7. Određivanje koncentracije cAMP ELISA analizom**

Koncentracija cAMP određivana je pomoću komercijalnog kompleta za merenje nivoa cAMP prema uputstvu proizvođača. Ovo je kompetitivni tip ELISA metode, koji se bazira na kompeticiji specifičnog cikličnog nukleotida iz uzorka sa cikličnim nukleotidom, koji je obeležen enzimom acetilholinesteraza, za ista vezna mesta na specifičnom antitelu. Ekstrakcija cAMP iz inkubacionog medijuma i ćelija vršena je dodavanjem perhlorne kiseline na postojeći medijum, nakon čega su ploče inkubirane na 4 °C u trajanju od 45 min. Nakon isteka inkubacionog perioda, ekstrakti su sakupljeni u prethodno ohlađene tubice i centrifugirani na 16 000 *xg* na 4 °C u trajanju od 10 minuta. Neutralizacija supernatanata vršena je dodatkom 0,72M KOH/0,6M KHCO<sub>3</sub>, nakon čega je precipitirani KClO<sub>4</sub> uklanjan centrifugiranjem na 16 000 *xg* na 4 °C u trajanju od 10 minuta, a supernatant korišćen za određivanje koncentracije cAMP.

Sastavni deo pripreme uzoraka i standarda bio je postupak acetilacije cikličnih nukleotida na 2'OH grupi, čime se vezivanje antitela povećalo deset puta. Koncentracija cAMP u uzorcima određivana je na osnovu standardne inhibicione krive raspona 0,078–10 pmol/mL dobijane pomoću standardnog rastvora cAMP poznate koncentracije. Limit detekcije iznosio je 0,1 pmol/mL (pri 80% B/B<sub>0</sub>) za acetilovane uzorke. Svi uzorci u okviru jednog eksperimenta mereni su u jednoj analizi.

### 3.8. Izolacija RNK i reverzna transkripcija

Izolacija ukupne RNK iz granulosa ćelija rađena je upotrebom TRIzol reagensa. Koncentracija i čistoća RNK u uzorcima određivane su pomoću aparata Biospec-Nano (Shimadzu, Japan), pri čemu su dobijani podaci o koncentraciji RNK ( $\text{ng}/\mu\text{l} = \text{A}260\text{nm} \times 40$ ), čistoći u odnosu na proteine ( $\text{A}260\text{nm}/\text{A}280\text{nm}$ ), kao i u odnosu na organske materije ( $\text{A}260\text{nm}/\text{A}230\text{nm}$ ). Na osnovu oba parametra, čistoća RNK se kretala u optimalnom opsegu, 1,7–2,0. RNK je prevođena u cDNK reverznom transkripcijom, korišćenjem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* kompleta sa *RNase inhibitorom* prema uputstvu proizvođača. Dobijena cDNK je upotrebljavana za relativnu kvantifikaciju genske ekspresije.

### 3.9. Relativna kvantifikacija genske ekspresije

Relativna kvantifikacija genske ekspresije rađena je prema „POWER SYBR Green PCR Master Mix“ protokolu. „Power SYBR Green PCR Master Mix“ predstavlja pre-miks komponenti (izuzev matrice, prajmera i vode) neophodan za izvođenje qRT-PCR (engl. *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Komplet koristi SYBR Green I boju koja se vezuje za dvolančanu DNK, što obezbeđuje fluorescentni signal koji odražava količinu dvolančanog DNK produkta koji nastaje tokom PCR. Što je količina ciljnog produkta veća to je fluorescentni signal jači. Reakciona smeša je sadržala 2,5  $\mu\text{l}$  cDNK (cDNK je razblažena tako da se u 2,5  $\mu\text{l}$  nalazi cDNK od 10 ng polazne RNK), i 10  $\mu\text{l}$  miksa koji je sadržao specifične prajmere (Tabela 3.1.) u koncentraciji 500 nM *forward* (F) i *reverse* (R) prajmera i *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) korišćenjem 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)). Real-time PCR reakcija je izvođena u standardnim uslovima (50 °C/2 min, 95 °C/10 min; i 40 ciklusa, od kojih je svaki bio pri 95 °C/15 sec, a potom 60 °C/1 min) korišćenjem aparata ABI Prism 7900HT Fast Real-Time (Applied Biosystems, Foster City, USA) u eksperimentima u kojima je

korišćen ATR, odnosno Mastercycler Realplex (Eppendorf) aparata u eksperimentima u kojima je korišćen BPA. Kao endogena kontrola korišćen je gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH).

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

$$\Delta Ct = Ct_{\text{ciljni gen}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

Zatim je rađena normalizacija tretiranog uzorka sa kontrolnim:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tretman}} - \Delta Ct_{\text{kontrola}}$$

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

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

**Tabela 3.1.** Sekvence prajmera korišćenih u real-time PCR analizi

GEN	PRISTUPNI KOD U BANCI GENA	SEKVENCE PRAJMERA
<i>Ereg</i>	NM_021689.1	5'-TATCAGCACAACCGTGATTCC-3' 5'-ATGCAAGCAGTAGCCGTCC-3'
<i>Areg</i>	NM_017123.1	5'- CGGAAAAGGCAGAAGAAACAGG-3' 5'-TGATGACAATGGCAGGTCACC-3'
<i>Pgr</i>	NM_022847.1	5'-CCAGAGCCCACAATATGG-3' 5'-TAAATAGTTATGCTGCCCTTCC-3'
<i>Cyp19a1</i>	NM_017085	5'-TCCTCCTGATTCCGGAATTGTG-3' 5'-GGCCCGATTCCCAGACA-3'
<i>Cyp11a1</i>	NM_017286	5'-GCAGCGACTCTTCTCCTGCG-3' 5'-GCCATCACCTCTTGTTTAGGACAATT-3'
<i>Lhr</i>	NM_012978	5'-CGGGCTGGAGTCCATTCA-3' 5'-TTCTTTGGAGGGCAGTGTTTTTC-3'
<i>Star</i>	NM_031558	5'- AGCCAGCAGGAGAATGGAGAT-3' 5'- CACCTCCAGTCGGAACACCTT-3'
<i>Esr2</i>	NM_012754.1	5'-GAGGCAGAAAGTAGCCGGAA-3' 5'-CGTGAGAAAGAAGCATCAGGA-3'
<i>Hsd3b1/2</i>	NM_001007719	5'-GACAGGAGCAGGAGGGTTTGTGG-3' 5'- CTCCTTCTAACATTGTACCTTGGCCT-3'
<i>Cyp1a1</i>	NM_012540.2	5'-CCTCTTTGGAGCTGGGTTTG-3' 5'-TGCTGTGGGGGATGGTGAAG-3'

GEN	PRISTUPNI KOD U BANCI GENA	SEKVENCE PRAJMERA
<i>Cyp1b1</i>	XM_017594045.1	5'-AATTGGCTCTTATTTAGGATGGCA-3' 5'-GCAGTGAAAACAGAAATGGGAAAC-3'
<i>Hmgcr</i>	NM_013134.2	5'-CTGGGCCCCACGTTCA-3' 5'-ATGGTGCCAACCTCCAATCACA-3'
<i>Dhcr7</i>	NM_022389.2	5'-TCTCCTCCTTCCCTCAGATCCT-3' 5'-TGGCTTTGGAAGCGTTGTG-3'
<i>Scarb1</i>	NM_031541.1	5'-GAAGGCATCCCCACTTAT-3' 5'-CGGACCCGTTGGCAAA-3'
<i>Abca1</i>	NM_178095.2	5'-TGCCCGGCGGAGTAGAA-3' 5'-AGGGCGATGCAAACAAAGAC-3'
<i>Lipe</i>	NM_012859.1	5'-CTGAGCCTCATGGATCCTCTTC-3' 5'-TGAATAGGCGCTCACACACTTG-3'
<i>Acat1</i>	NM_017075.2	5'-TGTCTGGAGCTCGGATTGTTG-3' 5'-AGACCGAATTCTCCTTGCTTCA-3'
<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	5'TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'

### 3.10. pERK enzimski imunoesej (ELISA) na granulosa ćelijama

Nakon završenog tretmana, ćelije su fiksirane sa 4% paraformaldehidom u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi, a potom ispirane dva puta sa 100 µL PBS pufera. Zatim je sledila inkubacija sa 100 µL PBS pufera koji je sadržao 0,1% Triton X-100 u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi se permeabilizovale ćelijske membrane. Nespecifična mesta blokirana su sa 5% NGS u 0,1% Triton X-100/PBS na sobnoj temperaturi tokom 2 h, nakon čega je sledila inkubacija preko noći sa 50 µL primarnog pERK antitela (razblaženje 1:500) pripremljenog u PBS puferu koji je sadržao 0,1% Tween-20 i 1% BSA. Narednog dana, ćelije su ispirane sa 100 µL PBS pufera pet puta u trajanju od po 5 min na laboratorijskoj mešalici, na 100 rpm, a zatim inkubirane sa 50 µL sekundarnog antitela (kozje anti-zečje antitelo konjugovano sa HRP; razblaženje 1:300) pripremanog u PBS koji je sadržao 0,1% Tween-20 i 1% BSA, u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacionog perioda, ćelije su ispirane pet puta sa PBS puferom, a potom inkubirane sa 100 µL rastvora koji je sadržao 0,4 mg/mL OPD u 0,05 M fosfatno-citratnom puferu (0,1 M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i 0,05 M limunska kiselina; pH 5,0) i 0,015%  $\text{H}_2\text{O}_2$  tokom 15–30 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena na Multiscan EX (Thermo LabSystems, Champaign, IL, SAD) na talasnoj dužini od 450 nm.

U cilju određivanja broja ćelija u bunarićima nakon ELISA testa, ćelije su bojene Crystal Violet rastvorom. Nakon merenja apsorbance na 450 nm, ćelije su ispirane dva puta sa 100  $\mu\text{L}$  PBS koji je sadržao 0,1% Tween-20 i dva puta sa 100  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ , a potom je u svaki bunarić dodavano po 100  $\mu\text{L}$  Crystal Violet rastvora (0,1% Crystal Violet u 4% etanolu). Ploče su zatim inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi, na laboratorijskoj mešalici, na 50 rpm. Po isteku vremena inkubacije, ploče su ispirane četiri puta sa po 100  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ , a nakon toga inkubirane sa 100  $\mu\text{L}$  10% sirćetne kiseline u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi, na laboratorijskoj mešalici, na 150 rpm, kako bi se rastvorila inkorporirana boja. Apsorbanca je merena na Multiscan EX (Thermo LabSystems, Champaign, IL, SAD) na talasnoj dužini 595 nm.

### **3.11. Određivanje aktivnosti glutathion S-transferaze (GST)**

Aktivnost glutathion S-transferaze (GST) u homogenatima ovarijuma određivana je spektrofotometrijski metodom po Habig i saradnici (1974). GST katališe reakciju između 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB), koji se koristi kao supstrat, i redukovanog glutathiona (GSH), pri čemu se formira kompleks sa maksimumom apsorpcije na 340 nm. Nakon završenih tretmana, ovarijumi su sakupljeni i homogenizovani u 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4), nakon čega je homogenat centrifugiran na 12 000 *xg* u trajanju od 10 minuta. Reakciona smeša (250  $\mu\text{L}$ ) za određivanje aktivnosti enzima sadržala je 100 mM fosfatni pufer (pH 6,5), 1 mM CDNB, 1 mM GSH i homogenat ovarijuma (50  $\mu\text{L}$ ). Praćen je porast apsorbance na 340 nm tokom 10 minuta kontinuirano u intervalima od 30 sekundi. Koncentracija proteina u homogenatima ovarijuma određivana je metodom po Bradford (1976). Specifična aktivnost enzima izražavana je kao  $\mu\text{M}$  konjugovanog CDNB po mg protein po minuti.

## 3.12. Western blot

### 3.12.1. Liziranje ćelija, određivanje koncentracije proteina i priprema uzoraka za natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforezu (SDS-PAGE)

Nakon završenog tretmana, ćelije su dva puta ispirane hladnim PBS puferom i lizirane sa 30 µl RIPA pufera za liziranje (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, pH 7,4) koji je sadržao inhibitore proteaza (NaF; 1 mM) i inhibitore fosfataza (NaVO<sub>4</sub>; 1 mM), u trajanju od 30 min, na laboratorijskoj mešalici, na 4 °C. Nakon isteka 30 min, lizat je sakupljan u tubice i centrifugiran 5 min na 10 000 *xg*, čime su istaloženi ćelijski ostaci, a supernatant sa proteinima je prebacivan u nove tubice.

Koncentracija proteina u lizatu je određivana fotometrijski, na osnovu standardne krive, korišćenjem komercijalnog kompleta za određivanje proteina *Dc* (Bio-Rad) u eksperimentima sa ATR, odnosno *Pierce BCA* (Thermo Scientific) u eksperimentima sa BPA, prema uputstvu proizvođača.

Radi pripreme uzoraka za elektroforezu, 5x koncentrovani pufer sa redukujućim agensima (sadrži: 372 g EDTA, 6 g SDS, 15 mL β-merkaptioetanol, 20 mL glicerola, 383 g ditiotreitola, 378 g Tris, pH 6,8, 50 mg bromofenol plavog) je dodavan u odnosu 1/5 pufera i 4/5 uzorka. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 5 min na 95 °C.

### 3.12.2. SDS-PAGE, transfer proteina na PVDF membranu, detekcija i kvantifikacija proteina

Za potrebe SDS-PAGE elektroforeze, pravljene su gelove koji su imali deo za koncentrovanje uzoraka (3% akrilamid/bis-akrilamid: 4,57 mL dH<sub>2</sub>O, 1,87 mL 0,5 mM Tris-HCl - pH 6,8, 75 µL 10% SDS, 0,99 mL 30% akrilamid/bis, 37,5 µL 10% amonijum persulfat i 7,5 µL TEMED) i separacioni deo (12% akrilamid/bis-akrilamid: 3,35 mL dH<sub>2</sub>O, 2,5 mL 1,5 mM Tris-HCl - pH < 8,8, 100 µL 10% SDS, 4 mL 30% akrilamid/bis, 50 µL 10% amonijum persulfat i 5 µL TEMED).



U džepiće gela su nalivani uzorci (5–15 µg proteina po džepiću), kao i proteinski marker. Elektroforeza je tekla u Mini-PROTEAN 3 Cell aparatu (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD), pri naponu od 120 V i trajanju od oko 90 min.

Transfer proteina sa gela na PVDF membranu je vršen mokrim transferom, u Mini-PROTEAN 3 Cell aparatu (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD), pri naponu 100 V, u trajanju od 2,5 h. Nakon transfera, membrane su blokirane u TBS puferu (10 mM *Tris base*, 100 mM NaCl, pH 7,4) koji je sadržao 0,1% Tween-20 (TBS/Tween) i 3% BSA (kada su analizirani fosfo-AKT i fosfo-CREB), odnosno 5% mleko (kada su analizirani StAR, C/EBPβ, SREBP-1 i GAPDH) u toku 2 h na sobnoj temperaturi. Primarna antitela fosfo-AKT (1:3000), fosfo-CREB (1:2000), CEBPB (1:1000), StAR (1:1000), SREBP-1 (1:1000) i GAPDH (1:5000) su pripremana u TBS/Tween koji je sadržao 3% BSA, a inkubacija membrana sa primarnim antitelom se odvijala preko noći, na 4 °C. Nakon toga, membrane su ispirane pet puta sa TBS/Tween, a potom inkubirane sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa enzimom HRP. Sekundarno antitelo (1:3000) je pripremano u TBS/Tween koji je sadržao 3% BSA i rađena je inkubacija u trajanju 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga, membrane su ispirane dva puta naizmenično sa TBS koji je sadržao 1% NP-40 (NTBS) i TBS puferima. Razvijanje membrana rađeno je sa hemiluminescentnim supstratom *Supersignal West Femto*. Da bi se procenila preciznost nalivanja uzoraka, sa PVDF membrana su odvajana vezana antitela postupkom tzv. stripovanja membrana, korišćenjem pufera za stripovanje (65 mM Tris-HCl, 20% SDS i 0,7% β-merkaptotanol; pH 6,7). Stripovane membrane su ispirane pet puta sa NTBS puferom i jednom sa PBS puferom, blokirane i ponovo inkubirane sa primarnim antitelom za GAPDH, a potom i sa odgovarajućim sekundarnim antitelom. Hemiluminescencija je merena myECL aparatom (Thermo Scientific, IL, USA), a dobijeni signali su kvantifikovani korišćenjem NIH ImageJ programa (Schneider i sar., 2012).

### 3.13. Bojenje Filipinom III

Za bojenje Filipinom III ćelije su sadene na mikroskopske pločice sa 8 bunarića. Nakon završenih tremana, ćelije su fiksirane sa 4% paraformaldehidom u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon fiksiranja, ćelije su ispirane tri puta sa PBS puferom i inkubirane sa glicinom (1,5 mg/mL PBS) u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi u cilju neutralizacije paraformaldehida, a potom ponovo ispirane tri puta sa PBS puferom. Bojenje ćelija vršeno je Filipin III bojom pripremanom u PBS puferu (10 µg/mL) u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega su ćelije ispirane tri puta sa PBS puferom, postavljane za vizualizaciju u 85% glicerolu pripremanom u Tris puferu (pH 8.5), nakon čega je fluorescencija detektovana korišćenjem konfokalnog mikroskopa (TCS SP8, Leica), pri čemu je talasna dužina ekscitacije iznosila 405 nm, a emisije 430 nm. U svakom eksperimentu, 3–9 slučajno odabranih polja po uzorku (93–186 ćelija u svakom polju) je vizualizovano i sačuvano. Kvantifikacija fluorescentnog signala vršena je korišćenjem NIH ImageJ programa (Schneider i sar., 2012), a rezultati su predstavljani kao relativna fluorescencija po ćeliji.

### 3.14. Statistička analiza

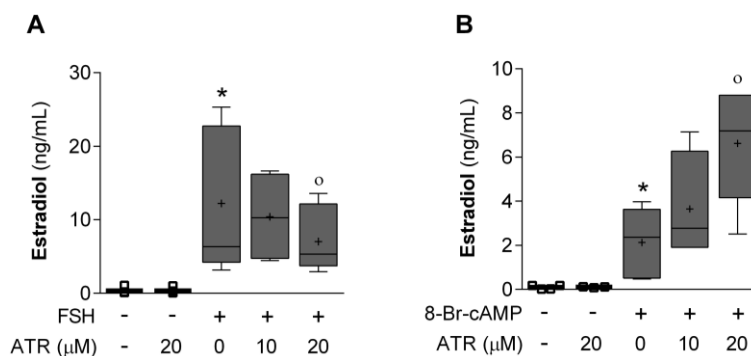
Svi eksperimenti su rađeni u najmanje tri ponavljanja, a prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost  $\pm$ SEM. Statistička analiza je rađena korišćenjem GraphPad Prism softvera (La Jolla, CA, USA). Statistička obrada podataka između više grupa rađena je ANOVA analizom, korišćenjem *Dunnett* ili *Tukey post hoc* testa. Kada su upoređivane samo dve grupe, korišćen je t-test. Za sve statističke analize kao kriterijum statističke značajnosti uzimana je granica verovatnoće  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

## 4.1. *In vitro* efekat ATR na steroidogeni i ovulacioni potencijal granuloza ćelija

### 4.1.1. Efekat ATR na sintezu estradiola u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granuloza ćelija sa FSH i 8-Br-cAMP

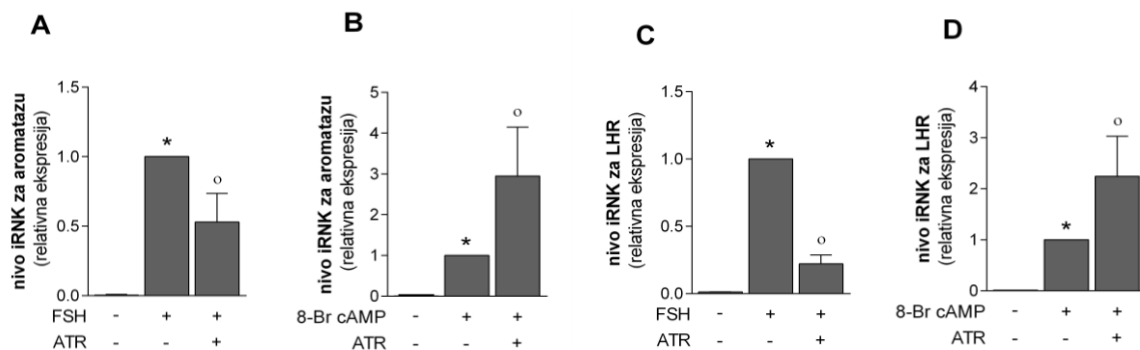
U cilju ispitivanja uticaja ATR na sintezu estradiola u bazalnim uslovima i nakon stimulacije sa FSH i 8-Br-cAMP, granuloza ćelije su tretirane sa 20  $\mu\text{M}$  ATR u nestimulisanim ćelijama, odnosno sa 10  $\mu\text{M}$  ili 20  $\mu\text{M}$  ATR u kombinaciji sa FSH i 8-Br-cAMP u trajanju od 48 h, nakon čega su mereni nivoi akumuliranog estradiola u inkubacionom medijumu. Eksperimenti su rađeni u prisustvu supstrata za aromatazu, testosterona. Dobijeni rezultati su pokazali da 20  $\mu\text{M}$  ATR ne dovodi do promena u bazalnom nivou estradiola (Slika 4.1.1). Kombinacija 20  $\mu\text{M}$  ATR i FSH dovela je do inhibicije sinteze estradiola u poređenju sa ćelijama stimulisanim sa FSH (Slika 4.1.1A). Ista koncentracija ovog pesticida dovela je do povećanja sinteze estradiola kod ćelija stimulisanim sa 8-Br-cAMP (Slika 4.1.1B).



**Slika 4.1.1. *In vitro* efekat ATR na sintezu estradiola u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granuloza ćelija sa FSH- i 8-Br-cAMP.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću. Ćelije su tretirane sa ATR (20  $\mu\text{M}$ ) samostalno, ili sa ATR (10 i 20  $\mu\text{M}$ ) u kombinaciji sa (A) FSH (100 ng/mL) ili (B) 8-Br-cAMP (1 mM), u prisustvu testosterona (50 ng/mL) u trajanju od 48 h. Nivoi estradiola u inkubacionom medijumu određivani su RIA analizom. Rezultati su predstavljeni „box and whisker“ dijagramima (10-90 procenata). Plusevi u stubićima predstavljaju srednju vrednost, a linije predstavljaju medijane. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost iz 6-7 nezavisnih eksperimenata. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove. <sup>o</sup> $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granuloza ćelije stimulisane sa (A) FSH ili (B) 8-Br-cAMP.

#### 4.1.2. Efekat ATR na nivo iRNK za aromatazu i LHR u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH i 8-Br-cAMP

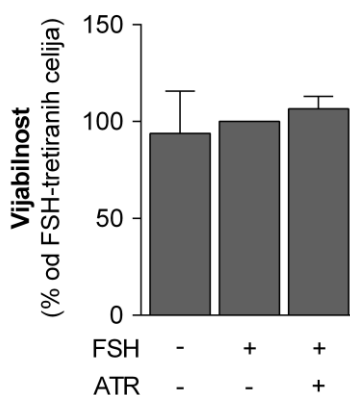
S obzirom da su rezultati pokazali da 20  $\mu$ M ATR dovodi do promene u sintezi estradiola tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH, ova doza je odabrana za dalje ispitivanje efekata ATR na funkciju granulosa ćelija. Ispitan je uticaj ATR na nivo iRNK za aromatazu i LHR. Granuloza ćelije su tretirane sa ATR, samostalno, kao i u kombinaciji sa FSH ili 8-br-cAMP u trajanju od 48 h, nakon čega su određivani nivoi iRNK navedenih proteina. Rezultati su pokazali da je kombinacija ATR i FSH dovela do smanjenja nivoa iRNK za aromatazu (Slika 4.1.2A) i LHR (Slika 4.1.2C) u poređenju sa ćelijama stimulisanim sa FSH. Suprotno, kada su granulosa ćelije tretirane sa ATR i 8-Br-cAMP došlo je do povećanja nivoa iRNK za oba proteina u poređenju sa samostalnom primenom 8-Br-cAMP (Slika 4.1.2B i 4.1.2D).



**Slika 4.1.2. *In vitro* efekat ATR na nivo iRNK za aromatazu i LHR u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH i 8-Br-cAMP.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću i tretirane sa ATR (20  $\mu$ M) u kombinaciji sa (A, C) FSH (100 ng/mL) ili (B, D) 8-Br-cAMP (1 mM) u trajanju od 48 h. Nivoi iRNK za (A, B) aromatazu i (C, D) LHR određivani su qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor dobijen nakon stimulacije sa FSH ili 8-Br-cAMP u granulosa ćelijama koje nisu tretirane sa ATR, definisan kao 1. Stubići predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$ SEM dobijene iz 3-4 nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove.  $^{\circ}p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu granulosa ćelije stimulisane sa (A, C) FSH ili (B, D) 8-Br-cAMP.

#### 4.1.3. Efekat ATR na vijabilnost granulosa ćelija

Radi ispitivanja potencijalnog citotoksičnog efekta ATR, granulosa ćelije su tretirane sa kombinacijom 20  $\mu$ M ATR i FSH, u trajanju od 72 h, nakon čega je vijabilnost ćelija određivana SRB analizom. Rezultati su pokazali da ATR nije uticao na vijabilnost granulosa ćelija u uslovima stimulacije sa FSH (Slika 4.1.3).

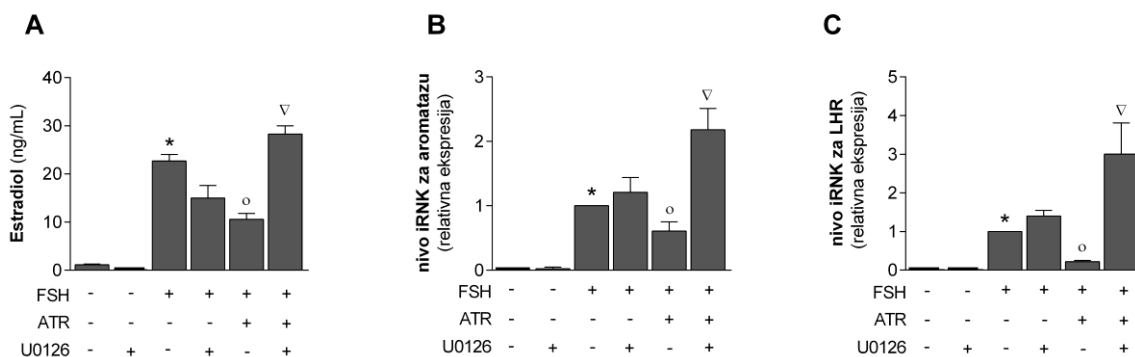


**Slika 4.1.3. *In vitro* efekat ATR na vijabilnost granulosa ćelija tokom stimulacije sa FSH.** Granulosa ćelije su sadene u ploče sa 96 bunarića, 100 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa kombinacijom ATR (20  $\mu$ M) i FSH (100 ng/mL) u trajanju od 72 h. Vijabilnost ćelija određivana je SRB analizom. Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na ćelije tretirane sa FSH (100%). Stubići predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$ SEM dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta.

#### 4.1.4. Efekat ATR na nivo estradiola i iRNK za aromatazu i LHR u granulosa ćelijama tretiranim sa FSH i inhibitorom aktivacije ERK1/2 signalnog puta

U cilju definisanja mehanizma delovanja ATR, ispitali smo akumulaciju cAMP u medijumu nakon tretmana granulosa ćelija sa FSH i ATR u trajanju od 48 h. Tretman granulosa ćelija sa ATR i FSH uzrokovao je blago povećanje koncentracije cAMP u medijumu koje nije statistički značajno u odnosu na ćelije stimulisane sa FSH (nestimulisane granulosa ćelije:  $0,41 \pm 0,06$  pmol/mL; granulosa ćelije tretirane sa FSH:  $85,50 \pm 4,11$  pmol/mL; granulosa ćelije tretirane sa FSH i ATR:  $112,40 \pm 9,13$  pmol/mL). Potom je analizirana uloga ERK1/2 signalnog puta u smanjenju sinteze estradiola i nivoa iRNK za aromatazu i LHR nakon tretmana sa ATR. Nezrele granulosa

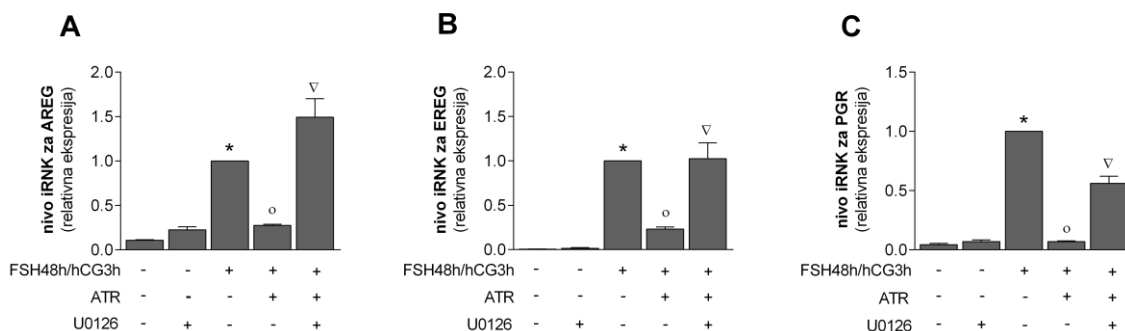
ćelije su pretretirane sa U0126, inhibitorom aktivacije ERK1/2, u trajanju od 30 min, nakon čega je sledio tretman u trajanju od 48 h sa FSH ili kombinacijom FSH i ATR. Eksperimenti su rađeni u prisustvu supstrata za aromatazu, testosterona. Kao što je prikazano na Slici 4.1.4., kombinacija ATR i FSH dovela je do smanjenja nivoa estradiola i iRNK za aromatazu i LHR u poređenju sa ćelijama stimulisanim sa FSH. U0126 nije uticao na nivo estradiola i iRNK za aromatazu i LHR u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH. U granulosa ćelijama tretiranim sa kombinacijom U0126, FSH i ATR došlo je do statistički značajnog povećanja nivoa estradiola (Slika 4.1.4A) i iRNK za aromatazu (Slika 4.1.4B) i LHR (Slika 4.1.4C) u poređenju sa ćelijama tretiranim sa FSH i ATR. Ovi rezultati ukazuju na uključenost ERK1/2 signalnog puta u efektima ATR na nivo estradiola i iRNK za aromatazu i LHR u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH.



**Slika 4.1.4. In vitro efekat kombinacije ATR sa FSH i U0126 na nivo estradiola i iRNK za aromatazu i LHR.** Granuloza ćelije su sadene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću, i pretretirane sa U0126 (10  $\mu$ M) u trajanju od 30 min, a zatim tretirane sa FSH (100 ng/mL) ili kombinacijom FSH (100 ng/mL) i ATR (20  $\mu$ M), u prisustvu testosterona (50 ng/mL) u trajanju od 48 h. (A) Nivo estradiola u inkubacionom medijumu određivan je RIA analizom. Nivoi iRNK za (B) aromatazu i (C) LHR određivani su qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor dobijen nakon stimulacije sa FSH u granulosa ćelijama koje nisu tretirane sa ATR, definisan kao 1. Stubići predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene iz 4 nezavisna eksperimenta. \* $p$ <0,05 statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove. <sup>o</sup> $p$ <0,05 statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije stimulisane sa FSH. <sup>∇</sup> $p$ <0,05 statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije tretirane sa FSH i ATR.

#### 4.1.5. Efekat ATR na nivo iRNK za proteine uključene u kontrolu procesa ovulacije tokom stimulacije granulosa ćelija sa hCG

Na osnovu rezultata koji pokazuju da ATR u velikoj meri smanjuje nivo iRNK za LHR u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH, dalje je ispitivan potencijal hCG da preko aktivacije LHR poveća nivo iRNK za proteine uključene u kontrolu procesa ovulacije. Granulosa ćelije su tretirane sa FSH tokom 48 h, kako bi se stimulisalo povećanje nivoa iRNK za LHR u *in vitro* uslovima. Tokom tretmana sa FSH, jedna grupa granulosa ćelija tretirana je sa ATR ili kombinacijom ATR i U0126. Nakon ovih tretmana, ćelije su bile tretirane sa hCG u trajanju od 3 h. Rezultati su pokazali da su ćelije tretirane sa ATR i FSH/hCG imale smanjen nivo iRNK za proteine uključene u kontrolu procesa ovulacije, AREG (Slika 4.1.5A), EREG (Slika 4.1.5B) i PGR (Slika 4.1.5C) u poređenju sa ćelijama koje su tretirane samo sa FSH/hCG. Primena U0126 zajedno sa ATR i FSH/hCG dovela je do povećanja nivoa iRNK za ispitivane proteine u poređenju sa ćelijama koje su tretirane sa ATR i FSH/hCG (Slika 4.1.5).

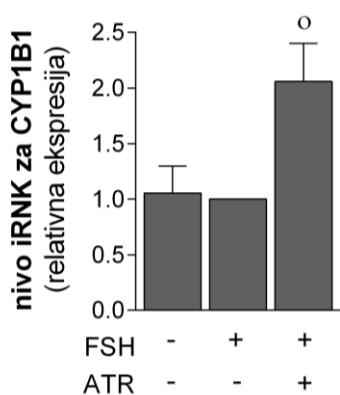


**Slika 4.1.5. *In vitro* efekat ATR na nivo iRNK za AREG, EREG i PGR tokom stimulacije granulosa ćelija sa hCG.** Granulosa ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću, i pretretirane sa U0126 (10  $\mu$ M) u trajanju od 30 min, a zatim tretirane sa FSH, ili kombinacijom FSH (100 ng/mL) i ATR (20  $\mu$ M), u trajanju od 48 h. Nakon toga, ćelije su tretirane sa hCG (1 IU/mL) u trajanju od 3 h. Nivoi iRNK za (A) AREG, (B) EREG i (C) PGR određivani su qRT-PCR analizom. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor dobijen nakon stimulacije sa hCG u granulosa ćelijama koje nisu tretirane sa ATR, definisan kao 1. Stubići predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$ SEM dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove. ° $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije stimulisane sa FSH/hCG. ∇ $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije tretirane sa FSH/hCG i ATR.



#### 4.1.6. Efekat ATR na nivo iRNK za CYP1B1 u granulosa ćelijama tokom stimulacije sa FSH

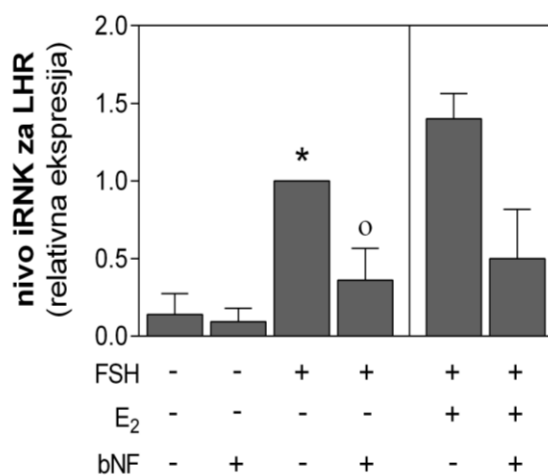
S obzirom da je pokazano da aktivacija AHR signalnog puta i povećana ekspresija CYP1A1 ima ulogu u negativnom delovanju ATR u ćelijama jetre pacova (Pogrmic-Majkic i sar., 2012) i embrionima zebrića (Glisic i sar., 2016), ispitali smo ulogu ovog signalnog puta u smanjenju produkcije estradiola nakon tretmana sa ATR u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH. Za te potrebe, granulosa ćelije su tretirane sa FSH ili kombinacijom FSH i 20  $\mu$ M ATR u trajanju od 6 h. Rezultati su pokazali da FSH nije doveo do povećanja iRNK za CYP1B1, dok je tretman granulosa ćelija sa ATR i FSH doveo do povećanja nivoa iRNK za CYP1B1 u poređenju sa samostalnim tretmanom sa FSH (Slika 4.1.6).



**Slika 4.1.6. *In vitro* efekat ATR na nivo iRNK za CYP1B1 u granulosa ćelijama tokom stimulacije sa FSH.** Granulosa ćelije su sadene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa FSH, ili kombinacijom FSH (100 ng/mL) i ATR (20  $\mu$ M) u trajanju od 6 h. Nivo iRNK za CYP1B1 određivan je qRT-PCR analizom. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor u granulosa ćelijama koje su tretirane sa FSH, definisan kao 1. Stubići predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$ SEM dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta.  $^{\circ}$ p<0,05 statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije stimulisane sa FSH.

#### 4.1.7. Efekat aktivacije AHR signalnog puta na nivo iRNK za LHR u granuloza ćelijama tretiranim sa FSH, kao i kombinacijom FSH i estradiola

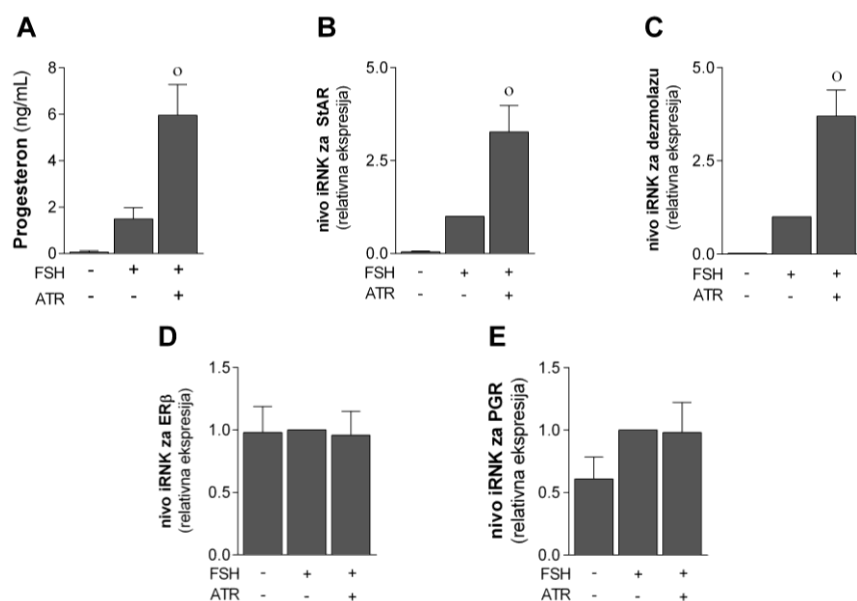
S obzirom da su prethodni rezultati pokazali da ATR dovodi do povećanja nivoa iRNK za CYP1B1 u FSH stimulisanim ćelijama, ispitali smo uticaj beta-naftoflavona (bNF), agoniste AHR, na nivo iRNK za LHR tokom stimulacije granuloza ćelija sa FSH, kao i kombinacijom FSH i estradiola. Za te potrebe, nezrele granuloza ćelije tretirane su sa bNF, samostalno ili u kombinaciji sa FSH, odnosno FSH i estradiolom u trajanju od 48 h. Kao što je prikazano na Slici 4.1.7., tretman granuloza ćelija sa bNF i FSH doveo je do statistički značajnog smanjenja nivoa iRNK za LHR u poređenju sa samostalnim FSH tretmanom. Takođe, bNF je doveo do smanjenja nivoa iRNK za LHR kod ćelija tretiranih sa FSH i estradiolom, u odnosu na ćelije stimulisane samo sa FSH i estradiolom, ali bez statističke značajnosti ( $p=0.058$ ).



**Slika 4.1.7. Efekat bNF na nivo iRNK za LHR u granuloza ćelijama tretiranim sa FSH, kao i kombinacijom FSH i estradiola.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa bNF (10  $\mu$ M), samostalno ili u kombinaciji sa FSH (100 ng/mL), odnosno, FSH (100 ng/mL) i estradiolom (E<sub>2</sub>; 100 ng/mL) u trajanju od 48 h. Nivo iRNK za LHR određivan je qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor u granuloza ćelijama koje su stimulisane sa FSH, definisan kao 1. Stubići predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene iz 3-4 nezavisna eksperimenta. \* $p<0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove. ° $p<0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granuloza ćelije stimulisane sa FSH.

#### 4.1.8. Efekat ATR na produkciju progesterona i nivo iRNK za StAR, dezmolazu, ER $\beta$ i PGR tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH

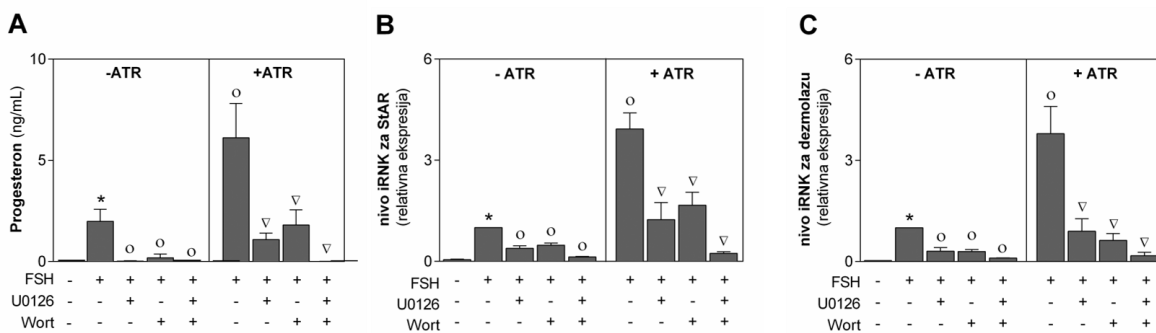
Dalje je ispitivan efekat ATR na produkciju progesterona nakon tretmana granulosa ćelija sa FSH, samostalno ili u kombinaciji sa ATR, u trajanju od 48 h. Primena ATR i FSH je dovela do statistički značajnog, približno četverostrukog povećanja produkcije progesterona u odnosu na ćelije tretirane sa FSH (Slika 4.1.8A). Ovi rezultati naveli su nas da ispitamo uticaj ATR na nivo iRNK za dva proteina koja imaju ključnu ulogu u sintezi progesterona, StAR i dezmolaze. Rezultati su pokazali da je tretman ćelija sa ATR i FSH doveo do povećanja nivoa oba transkripta u odnosu na samostalni tretman sa FSH (Slike 4.1.8B i 4.1.8C). U istim eksperimentalnim uslovima, ATR nije doveo do promene u nivou iRNK za ER $\beta$  i PGR (Slike 4.1.8D i 4.1.8E).



**Slika 4.1.8. *In vitro* efekat ATR na produkciju progesterona i nivo iRNK za StAR, dezmolazu, ER $\beta$  i PGR tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću, i i tretirane sa FSH (100 ng/mL), ili kombinacijom FSH (100 ng/mL) i ATR (20  $\mu$ M) u trajanju od 48 h. (A) Nivo progesterona u inkubacionom medijumu određivan je ELISA analizom. Nivoi iRNK za (B) StAR, (C) dezmolazu, (D) ER $\beta$  i (E) PGR određivani su qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor u granulosa ćelijama koje su stimulisane sa FSH, definisan kao 1. Stubići predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene iz 5 nezavisnih eksperimenata.  $^{\circ}$ p<0,05 statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije stimulisane sa FSH.

#### 4.1.9. Efekat ATR na nivo progesterona i iRNK za StAR i dezmolazu u granulosa ćelijama tretiranim sa FSH i inhibitorima aktivacije Akt i ERK1/2 signalnih puteva

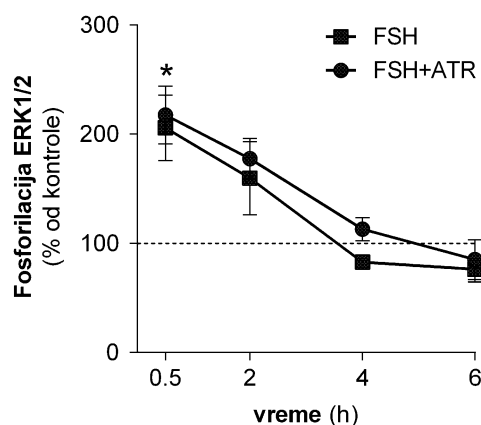
U cilju definisanja signalnih mehanizama uključenih u efekat ATR na put biosinteze progesterona, granulosa ćelije su pretretirane sa farmakološkim inhibitorima aktivacije Akt (vortmanin) i ERK1/2 (U0126), a nakon toga stimulisane sa FSH, u prisustvu i odsustvu ATR u trajanju od 48 h. Rezultati su pokazali da je kombinovani tretman granulosa ćelija sa FSH, vortmaninom i U0126 smanjio stvaranja progesterona i nivo iRNK za StAR i dezmolazu u poređenju sa ćelijama tretiranim sa FSH. Pored toga, pojedinačna ili kombinovana primena U0126 i vortmanina zajedno sa ATR i FSH dovela je do smanjenja stvaranja progesterona i nivoa iRNK za StAR i dezmolazu u poređenju sa ćelijama tretiranim sa FSH i ATR (Slika 4.1.9).



**Slika 4.1.9. Efekat ATR na nivo progesterona i iRNK za StAR i dezmolazu u granulosa ćelijama tretiranim sa FSH, vortmaninom i U0126.** Granulosa ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću. Ćelije su pretetirane sa vortmaninom (Wort; 1  $\mu$ M) i U0126 (10  $\mu$ M) u trajanju od 30 min, a nakon toga tretirane sa FSH (100 ng/mL), ili kombinacijom FSH (100 ng/mL) i ATR (20  $\mu$ M) u trajanju od 48 h. (A) Nivo progesterona u inkubacionom medijumu određivan je ELISA analizom. Nivoi iRNK za (B) StAR i (C) dezmolazu određivani su qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor u granulosa ćelijama koje su stimulisane sa FSH, definisan kao 1. Stubići predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SEM dobijene iz 4-5 nezavisnih eksperimenata. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove.  $^{\circ}p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije stimulisane sa FSH.  $\nabla p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije tretirane sa FSH i ATR.

#### 4.1.10. Efekat ATR na fosforilaciju ERK1/2 u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH

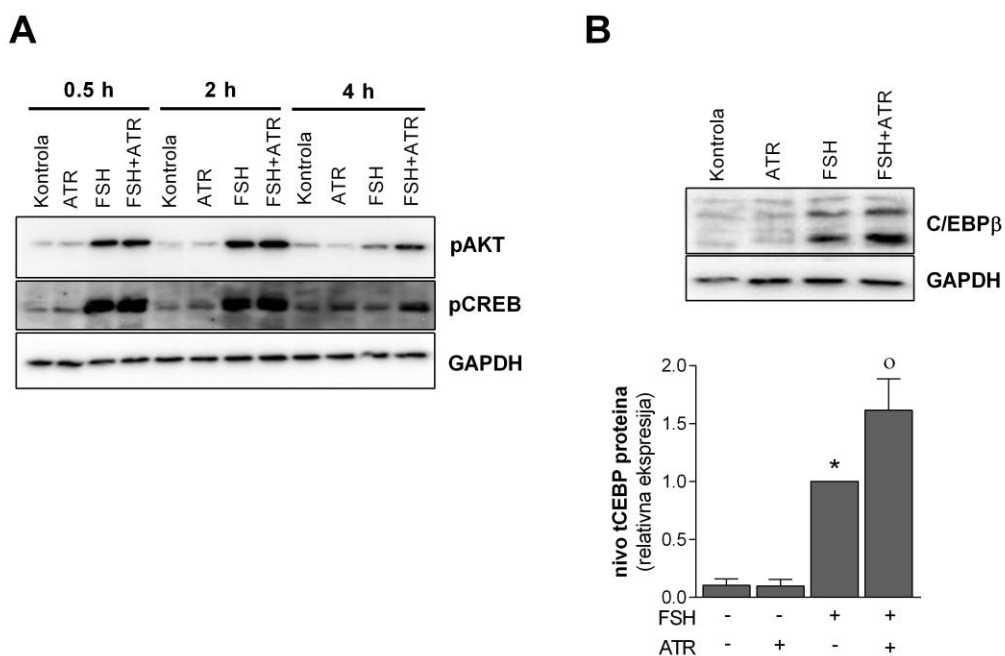
Kako je prikazano na slikama 4.1.4. i 4.1.9., inhibitor aktivacije ERK1/2, U0126, sprečava negativne efekte ATR na biosintezu estradiola, progesterona, kao i na nivoe iRNK za markere diferencijacije (aromataza i LHR) i luteinizacije (StAR i dezmolaza) u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH. Stoga je ispitan uticaj ATR na fosforilaciju ERK1/2 korišćenjem ELISA testa. Ćelije su tretirane sa FSH, samostalno ili u kombinaciji sa ATR, u trajanju od 0,5 h, 2 h, 4 h i 6 h. Rezultati su pokazali da FSH dovodi do kratkotrajne fosforilacije ERK1/2, koja se vraća na bazalni nivo 4 h nakon tretmana. Tretman ćelija sa ATR i FSH nije značajno promenio profil fosforilacije ERK1/2 u poređenju sa granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH (Slika 4.1.10). Ovi rezultati ukazuju da ATR ne utiče na FSH-stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 u nezrelim granulosa ćelijama.



**Slika 4.1.10. *In vitro* efekat ATR na fosforilaciju ERK1/2 u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH.** Granulosa ćelije su sađene u ploče sa 96 bunarića, 100 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa FSH (100 ng/mL), ili kombinacijom FSH (100 ng/mL) i ATR (20  $\mu$ M) u trajanju od 0,5 h, 2 h, 4 h i 6 h. pERK1/2 ELISA test korišćen je za određivanje nivoa fosforilacije ERK1/2 u granulosa ćelijama. Fosforilacija ERK1/2 normalizovana je na broj ćelija koji je određen korišćenjem *Crystal Violet* testa. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor u bazalnim uslovima, definisan kao 100% (isprekidana linija). Kružići predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene iz 4 nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove.

#### **4.1.11. Efekat ATR na fosforilaciju CREB i Akt i nivo C/EBP $\beta$ proteina u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH**

S obzirom da su prethodni rezultati pokazali da ATR ne uzrokuje direktnu aktivaciju ERK1/2, analizirane su promene u pojedinim elementima drugih signalnih puteva koji učestvuju u regulaciji biosinteze estradiola progesterona u granulosa ćelijama, kao što su CREB i Akt. Takođe, analiziran je nivo ERK1/2-zavisnog transkripcionog faktora, C/EBP $\beta$  proteina. Rezultati su pokazali da FSH dovodi do rane i prolazne fosforilacije CREB i Akt proteina koja prestaje 4 h nakon stimulacije. Istovremeni tretman sa ATR i FSH doveo je do promene u profilu fosforilacije, dovodeći do produžene aktivacije CREB i Akt, koja je trajala i 4 h nakon tretmana, u poređenju sa samostalnim FSH tretmanom (Slika 4.1.11A). Primena ATR i FSH dovela je do povećanja nivoa C/EBP $\beta$  u odnosu na sam FSH (Slika 4.1.11B). Ovi rezultati ukazuju da ATR ostvaruje efekte na nivou ćelijske signalizacije, dovodeći do produžene fosforilacije CREB i Akt i povećanog nivoa C/EBP $\beta$  u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH.

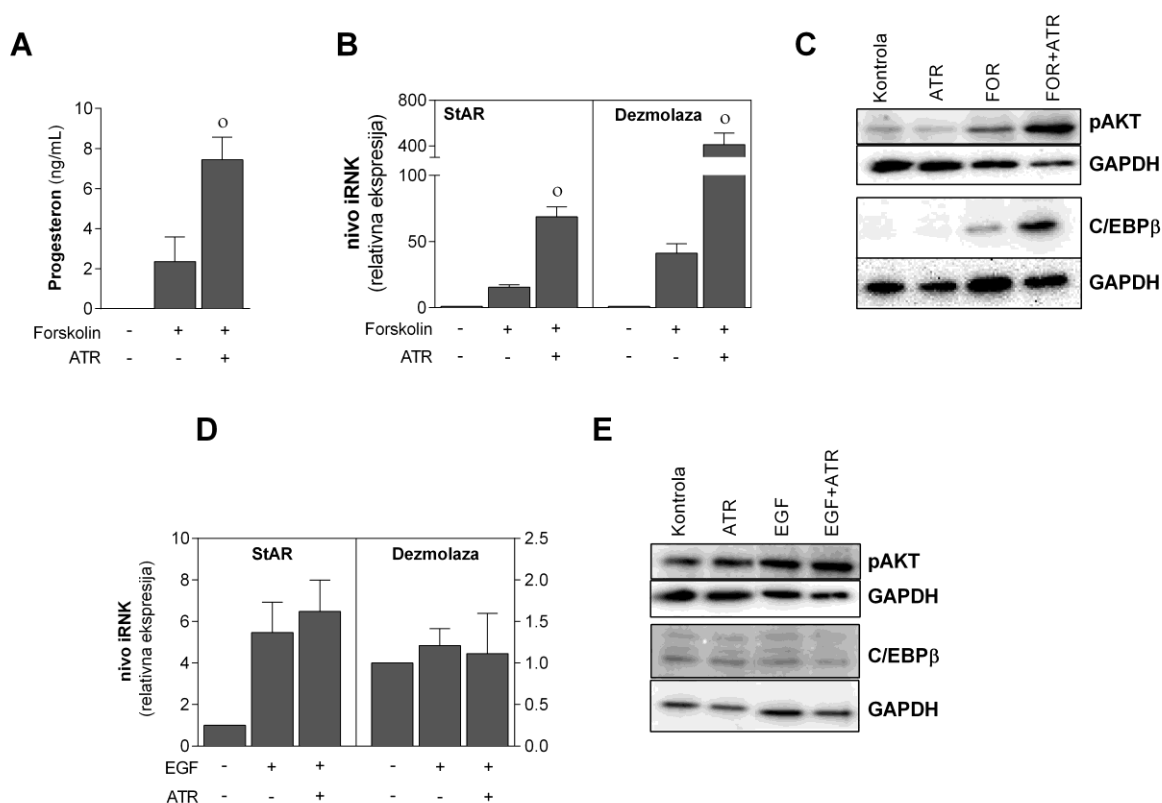


**Slika 4.1.11. *In vitro* efekat ATR na fosforilaciju CREB i Akt i nivo C/EBP $\beta$  proteina u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa ATR (20  $\mu$ M) i FSH (100 ng/mL), samostalno ili u kombinaciji. Western blot analizom je određen nivo fosforilacije (A) CREB i Akt nakon 0,5 h, 2 h i 4 h i (B) nivo C/EBP $\beta$  nakon 4 h. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH, definisan kao 1. Stubići predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene iz 6 nezavisnih eksperimenata. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove. <sup>o</sup> $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije stimulisane sa FSH.

#### **4.1.12. Efekat ATR na nivo progesterona, iRNK za StAR i dezmolazu, fosforilaciju Akt i nivo C/EBP $\beta$ u granulosa ćelijama tretiranim sa aktivatorima cAMP/PKA i EGFR signalnih puteva**

U cilju definisanja mehanizma putem kog ATR ostvaruje efekte na nivo progesterona, iRNK za StAR i dezmolazu, fosforilaciju Akt i nivo C/EBP $\beta$ , granulosa ćelije su tretirane sa aktivatorima AC (forskolin) i EGF receptora (EGF). Primena ATR i forskolina je dovela do povećanja u stvaranju progesterona (Slika 4.1.12A) i nivoa iRNK za StAR i dezmolazu (Slika 4.1.12B) u odnosu na granulosa ćelije koje su

stimulisane forskolinom. Osim toga, ATR je doveo do povećanja aktivacije Akt i nivoa C/EBP $\beta$  proteina u granulosa ćelijama stimulisanim forskolinom (Slika 4.1.12C), 4 h nakon tretmana. Sa druge strane, tokom istog vremenskog perioda, ATR nije uzrokovao promene kada su granulosa ćelije stimulisane sa EGF (Slika 4.1.12D i 4.1.12E). Ovi rezultati ukazuju na to da cAMP signalni put ima ulogu posrednika u negativnim efektima ATR na put biosinteze progesterona.

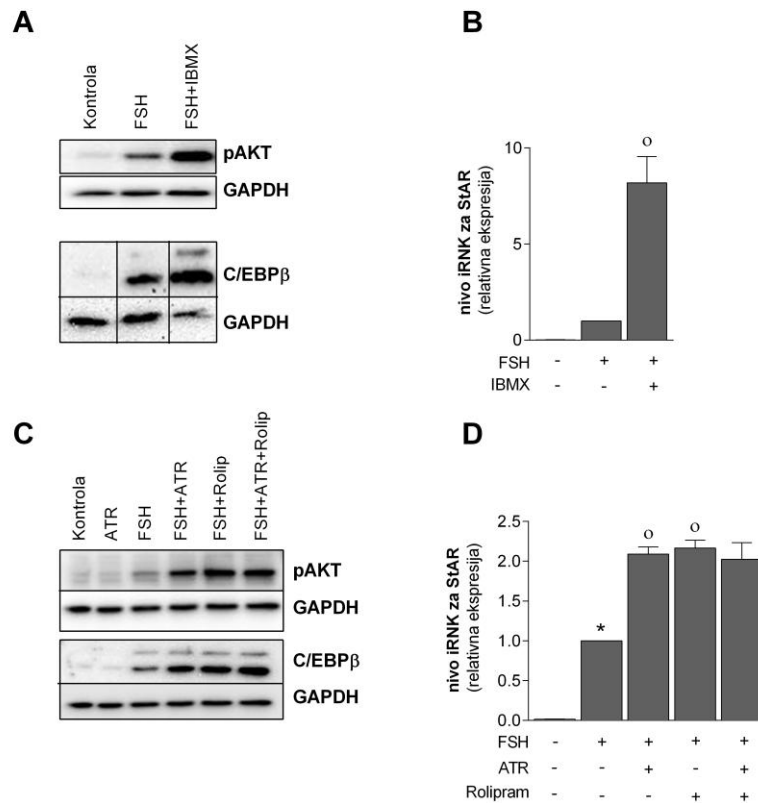


**Slika 4.1.12. In vitro efekat ATR na nivo progesterona, iRNK za StAR i dezmolazu, fosforilaciju Akt i nivo C/EBP $\beta$  u granulosa ćelijama tretiranim sa forskolinom i EGF.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa ATR (20  $\mu$ M) i (A, B, C) forskolinom (1  $\mu$ M) ili (D, E) EGF (100 ng/mL), samostalno ili u kombinaciji. (A) Nivo progesterona u inkubacionom medijumu određivan je ELISA analizom. Nivoi iRNK za (B) StAR i dezmolazu određivani su qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor u nestimulisanim granulosa ćelijama, definisan kao 1. (C, E) Fosforilacija Akt i nivo C/EBP $\beta$  analizirani su 4 h nakon tretmana Western blot analizom. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Stubići predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene iz 3-4 nezavisnih eksperimenata.  $^{\circ}p<0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije stimulisane sa FSH.



#### **4.1.13. Efekat inhibitora PDE na fosforilaciju Akt, nivo C/EBP $\beta$ proteina i iRNK za StAR u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH i kombinacijom FSH i ATR**

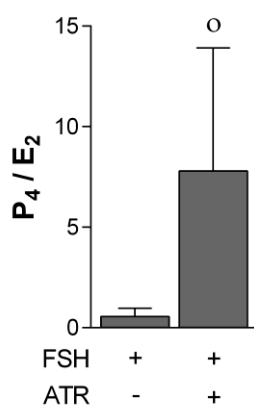
S obzirom da ATR povećava nivo progesterona tokom stimulacije granulosa ćelija forskolinom, a takođe je pokazano da inhibira PDE4 u hipofiznim i Lajdigovim ćelijama pacova (Kucka i sar., 2012), pretpostavka je da je PDE4 potencijalna meta delovanja ATR i u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH. U cilju testiranja navedene hipoteze, granulosa ćelije su pretretirane sa neselektivnim farmakološkim inhibitorom PDE (IBMX), kao i specifičnim inhibitorom PDE4, rolipramom. Nakon pretretmana sa navedenim inhibitorima, ćelije su tretirane sa FSH ili ATR u trajanju od 4 h i 48 h. Rezultati su pokazali da je zajednička primena IBMX i FSH dovela do povećanja fosforilacije Akt, kao i nivoa C/EBP $\beta$  proteina u poređenju sa samostalnim FSH tretmanom (Slika 4.1.13A). Takođe, IBMX je doveo i do povećanja nivoa iRNK u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH (Slika 4.1.13B). Tretman granulosa ćelija sa rolipramom i FSH doveo je do povećanja fosforilacije Akt, povećanja nivoa C/EBP $\beta$  proteina i nivoa iRNK za StAR u poređenju sa ćelijama stimulisanim sa FSH. Međutim, istovremeni tretman ćelija sa rolipramom, ATR i FSH nije doveo do daljeg povećanja fosforilacije Akt, kao i nivoa C/EBP $\beta$  proteina i iRNK za StAR, u odnosu na ćelije koje su tretirane sa rolipramom i FSH (Slika 4.1.13C i 4.1.13D). Ovi rezultati ukazuju da su PDE, a posebno PDE4, potencijalne mete delovanja ATR u granulosa ćelijama.



**Slika 4.1.13. *In vitro* efekat inhibitora PDE na fosforilaciju Akt, nivo C/EBP $\beta$  proteina i iRNK za StAR u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH, i kombinacijom FSH i ATR.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću i pretretirane sa (A, B) IBMX (1 mM) ili (C, D) rolipramom (10  $\mu$ M) u trajanju od 1 h, a nakon toga tretirane sa FSH (100 ng/mL) i ATR (20  $\mu$ M), samostalno ili u kombinaciji. (A, C) Fosforilacija Akt i nivo C/EBP $\beta$  analizirani su 4 h nakon tretmana Western blot analizom. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. (B, D) Nivoi iRNK za StAR određivani su nakon 48 h tretmana qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovor u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH, definisan kao 1. Stubići predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$ SEM dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove.  $^{\circ}p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije stimulisane sa FSH.

#### 4.1.14. Efekat ATR na odnos progesterona i estradiola tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH

Prethodni rezultati su pokazali da ATR ispoljava inhibitorni uticaj na nivo iRNK za aromatazu tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH, što ima za posledicu smanjenu produkciju estradiola. Sa druge strane, u istim uslovima ATR dovodi do povećane produkcije progesterona. Odnos koncentracije progesterona i estradiola tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH trebao bi da bude manji od 1, dok je odnos iznad 1 prihvaćen kao klinički marker prevremene luteinizacije (Ozçakir i sar., 2004). Zbog toga je određivan odnos progesterona i estradiola u granulosa ćelijama nakon tretmana sa ATR. Rezultati su pokazali da je tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH produkcija progesterona niža u odnosu na produkciju estradiola, dajući odnos koncentracije progesterona i estradiola manjim od 1. Međutim, nakon tretmana sa ATR, ovaj odnos dostigao je vrednost iznad 1 (Slika 4.1.14).

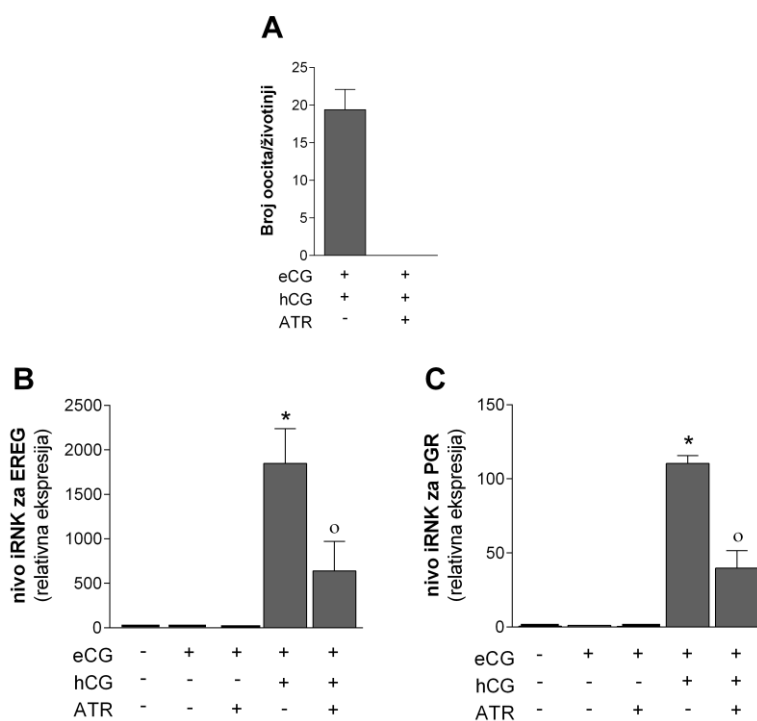


**Slika 4.1.14. *In vitro* efekat ATR na odnos progesterona i estradiola tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH.** Granulosa ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 250 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa FSH (100 ng/mL), ili kombinacijom ATR (20 µM) i FSH (100 ng/mL) u trajanju od 48 h. Nivoi progesterona (P<sub>4</sub>) i estradiola (E<sub>2</sub>) u inkubacionom medijumu određivani su ELISA, odnosno RIA analizom. Stubići predstavljaju srednje vrednosti ±SEM dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta. °p<0,05 statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije stimulisane sa FSH.

## **4.2. *In vivo* efekat ATR na steroidogeni i ovulacioni potencijal granulosa ćelija**

### **4.2.1. Efekat ATR na broj oocita i nivo iRNK za proteine uključene u kontrolu procesa ovulacije kod nezrelih ženki pacova tretiranih gonadotropinima**

Rezultati *in vitro* eksperimenata su pokazali da ATR smanjuje nivo iRNK za LHR i proteine uključene u kontrolu procesa ovulacije u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH. Zbog toga je ispitana ovulacija kod nezrelih ženki pacova tretiranih gonadotropinima nakon *in vivo* tretmana ATR. Za te potrebe, nezrele ženke pacova tretirane su sa ATR (i.p.; 50 mg/kg telesne mase) u trajanju od tri dana: 24 h pre eCG administracije (i.p.; 10 IU/životinji), u trenutku eCG administracije i 24 h nakon eCG administracije. 44 h do 48 h nakon eCG injekcije, grupa životinja je tretirana sa hCG (i.p.; 10 IU/životinji), u cilju povećanja ekspresije proteina uključenih u proces ovulacije, kao i indukcije ovulacije. Rezultati su pokazali da je primena ATR tokom stimulacije ženki pacova sa eCG i hCG u potpunosti blokirala oslobađanje oocita u odnosu na životinje tretirane samo sa gonadotropinima (Slika 4.2.1A). Osim toga, tretman sa ATR doveo je u granulosa ćelijama do približno trostrukog smanjenja nivoa iRNK za proteine koji učestvuju u kontroli procesa ovulacije, EREG i PGR (Slika 4.2.1B i 4.2.1C).

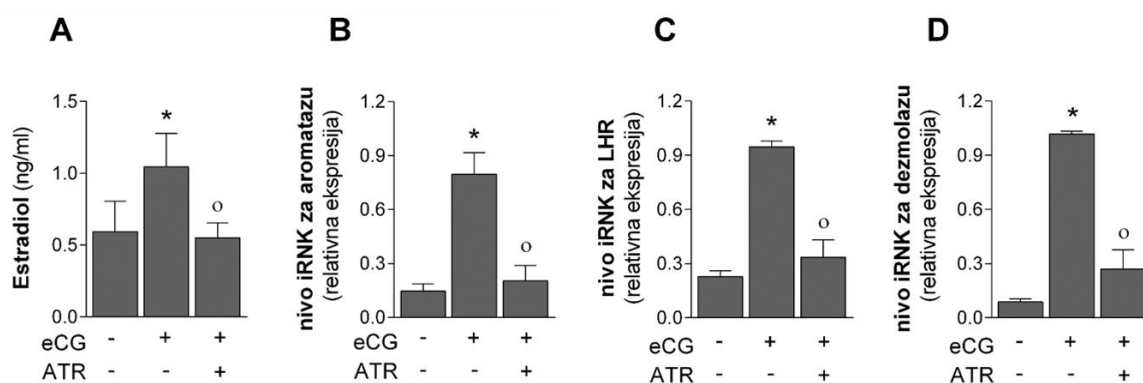


**Slika 4.2.1. In vivo efekat ATR na broj oocita i nivo iRNK za EREG i PGR kod nezrelih ženki pacova tretiranih gonadotropinima.** Nezrele ženke pacova tretirane su sa ATR (i.p.; 50 mg/kg telesne mase) u trajanju od tri dana: 24 h pre eCG administracije (i.p.; 10 IU/životinji), u trenutku eCG administracije i 24 h nakon eCG administracije. 44 h do 48 h nakon eCG injekcije, grupa životinja je tretirana sa hCG (i.p.; 10 IU/životinji). (A) Broj oocita/životinji određen je 20 h nakon hCG administracije (tretman eCG+hCG n = 5; tretman eCG+hCG+ATR n = 6 životinja/grupi). Nivoi iRNK za (B) EREG i (C) PGR određivani su qRT-PCR analizom 4 h nakon hCG administracije (kontrola, netretirane ćelije n = 3; tretman eCG+hCG n = 3-5; tretman eCG+hCG+ATR n = 7 životinja/grupi). qRT-PCR rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na srednju vrednost nivoa ekspresije kod životinja tretiranih sa eCG. Stubići predstavljaju srednje vrednosti±SEM. \*p<0,05 statistički značajna razlika u odnosu na netretirane životinje. <sup>o</sup>p<0,05 statistički značajna razlika u odnosu na životinje tretirane sa eCG i hCG.

#### 4.2.2. Efekat ATR na nivo estradiola u serumu i iRNK za aromatazu, LHR i dezmolazu u granuloza ćelijama nezrelih ženki pacova tretiranih sa eCG

S obzirom da estradiol ima značajnu ulogu tokom razvoja folikula i ovulacije, ispitivana je sposobnost granuloza ćelija da stvaraju estradiol nakon tretmana sa eCG i ATR. Očekivano, eCG je stimulisao produkciju estradiola, dok je tretman životinja sa

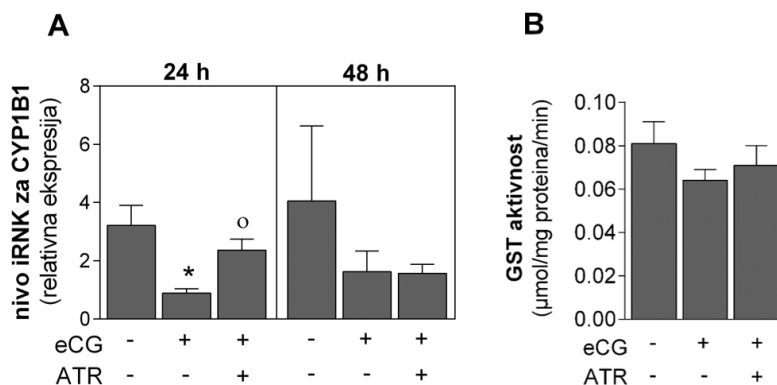
ATR tokom eCG stimulacije sveo produkciju estradiola na bazalni, nestimulisani nivo (Slika 4.2.2A). S obzirom da je aromataza enzim koji ima ključnu ulogu u sintezi estradiola, ispitan je uticaj ATR na eCG-stimulisan nivo iRNK za aromatazu u granulosa ćelijama izolovanim iz nezrelih ženki pacova tretiranih sa eCG i ATR, 48 h nakon administracije eCG. Osim toga, ispitan je i uticaj ATR na nivo iRNK za LHR i dezmolazu. Kako se može videti na slici 4.2.2, tretman životinja sa ATR tokom eCG stimulacije sveo je nivo iRNK za aromatazu, LHR i dezmolazu na bazalni, nestimulisani nivo. Ovi rezultati ukazuju da ATR ispoljava negativne efekte na proliferaciju i diferencijaciju granulosa ćelija stimulisanu delovanjem eCG.



**Slika 4.2.2. *In vivo* efekat ATR na nivo estradiola u serumu i iRNK za aromatazu, LHR i dezmolazu u granulosa ćelijama nezrelih ženki pacova tretiranih sa eCG.** Nezrele ženke pacova tretirane su sa ATR (i.p.; 50 mg/kg telesne mase) u trajanju od tri dana: 24 h pre eCG administracije (i.p.; 10 IU/životinji), u trenutku eCG administracije i 24 h nakon eCG administracije. (A) Nivo estradiola u serumu određivan je 48 h nakon eCG administracije RIA analizom (n = 5 životinja/grupi). Nivoi iRNK za (B) aromatazu, (C) LHR i (D) dezmolazu određivani su qRT-PCR analizom 48 h nakon eCG administracije (kontrola, netretirane životinje n = 7; eCG tretman n = 4; eCG+ATR tretman n = 6 životinja/grupi). qRT-PCR rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na srednju vrednost nivoa ekspresije kod životinja tretiranih sa eCG. Stubići predstavljaju srednje vrednosti±SEM. \*p<0,05 statistički značajna razlika u odnosu na netretirane životinje. <sup>o</sup>p<0,05 statistički značajna razlika u odnosu na životinje tretirane sa eCG.

### 4.2.3. Efekat ATR na nivo iRNK za CYP1B1 u granuloza ćelijama, i na aktivnost GST enzima u ovarijumima nezrelih ženki pacova tretiranih sa eCG

S obzirom da su rezultati *in vitro* istraživanja pokazali da ATR povećava nivo iRNK za CYP1B1, enzim koji pripada I fazi metabolizma ksenobiotika, i ima značajnu ulogu u katabolizmu estradiola, ispitan je uticaj ATR na nivo iRNK za ovaj enzim u granuloza ćelijama nakon *in vivo* tretmana. Tretman sa eCG i ATR u trajanju od 24 h doveo je do povećanja nivoa iRNK za CYP1B1 u odnosu na nivo prisutan u granuloza ćelijama izolovanim iz nezrelih ženki pacova tretiranih sa eCG. Ovaj efekat ATR je izostao nakon 48 h tretmana (Slika 4.2.3A). Osim toga, aktivnost GST enzima ima značajnu ulogu u drugoj fazi biotransformacije ATR (Abel i sar., 2004). Zbog toga je ispitana aktivnost ovog enzima u ovarijumima pacova tretiranih sa eCG, nakon tretmana sa ATR. Rezultati pokazuju da ATR ne menja aktivnost GST enzima 48 h nakon tretmana sa eCG (Slika 4.2.3B).

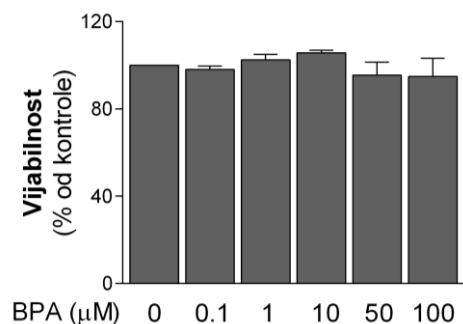


**Slika 4.2.3. *In vivo* efekat ATR na nivo iRNK za CYP1B1 u granuloza ćelijama, i na aktivnost GST enzima u ovarijumima nezrelih ženki pacova tretiranih sa eCG.** Nezrele ženke pacova tretirane su sa ATR (i.p.; 50 mg/kg telesne mase) u trajanju od dva ili tri dana tokom stimulacije sa eCG. Nivo iRNK za CYP1B1 određivan je qRT-PCR analizom 24 h i 48 h nakon eCG administracije (kontrola, netretirane životinje n = 5-8; eCG tretman n = 6-7; eCG+ATR tretman n = 6-12 životinja/grupi). qRT-PCR rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na srednju vrednost nivoa ekspresije kod životinja tretiranih sa eCG (B) Aktivnost GST enzima u ovarijumima određena je 24 h nakon eCG administracije (kontrola, netretirane životinje n = 3; eCG tretman n = 4; eCG+ATR tretman n = 5 životinja/grupi). Stubići predstavljaju srednje vrednosti±SEM. \*p<0,05 statistički značajna razlika u odnosu na netretirane životinje. <sup>o</sup>p<0,05 statistički značajna razlika u odnosu na životinje tretirane sa eCG.

### 4.3. *In vitro* efekat BPA na steroidogeni potencijal granuloza ćelija

#### 4.3.1. Efekat BPA na vijabilnost granuloza ćelija

Istraživanje uticaja BPA započeto je ispitivanjem njegovog potencijalnog citotoksičnog efekta na granuloza ćelije. Granuloza ćelije su tretirane rastućim koncentracijama BPA (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od 48 h, nakon čega je vijabilnost ćelija određivana SRB analizom. Rezultati pokazuju da nijedna od korišćenih koncentracija BPA nije dovela do promena u vijabilnosti granuloza ćelija u odnosu na netretirane ćelije (Slika 4.3.1).



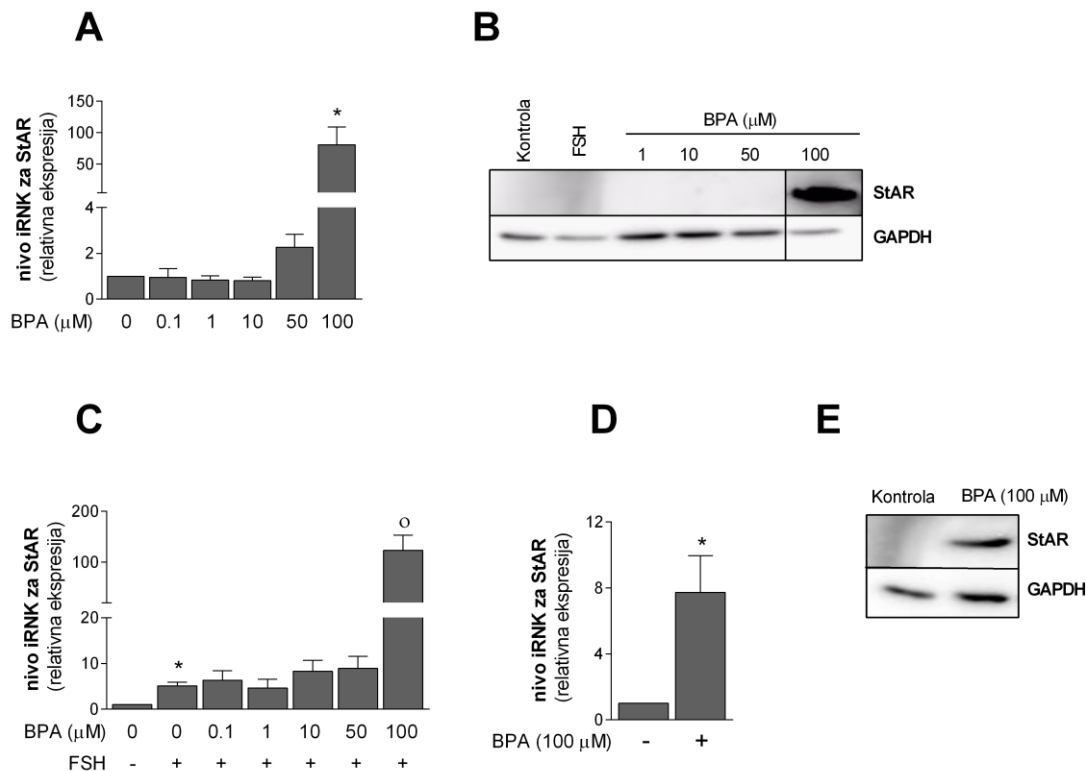
**Slika 4.3.1. *In vitro* efekat BPA na vijabilnost granuloza ćelija.** Granuloza ćelije su sadene u ploče sa 96 bunarića, 150 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa različitim koncentracijama BPA (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od 48 h. Vijabilnost ćelija određivana je SRB analizom. Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu (100%). Stubići predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SEM dobijene iz 4-6 nezavisnih eksperimenata.

#### 4.3.2. Efekat BPA na ekspresiju gena za StAR u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granuloza ćelija sa FSH

Za ispitivanje uticaja BPA na ekspresiju gena za StAR, granuloza ćelije su tretirane sa rastućim koncentracijama BPA, samostalno ili u kombinaciji sa FSH u trajanju od 48 h. Rezultati su pokazali da je 100  $\mu\text{M}$  BPA doveo do statistički značajnog povećanja nivoa iRNK za StAR (Slika 4.3.2A), kao i do povećanja nivoa StAR proteina (Slika 4.3.2B) u poređenju sa nestimulisanim ćelijama. Takođe, tretman ćelija sa BPA i FSH je doveo do povećanja nivoa iRNK za StAR u odnosu na samostalnu FSH primenu



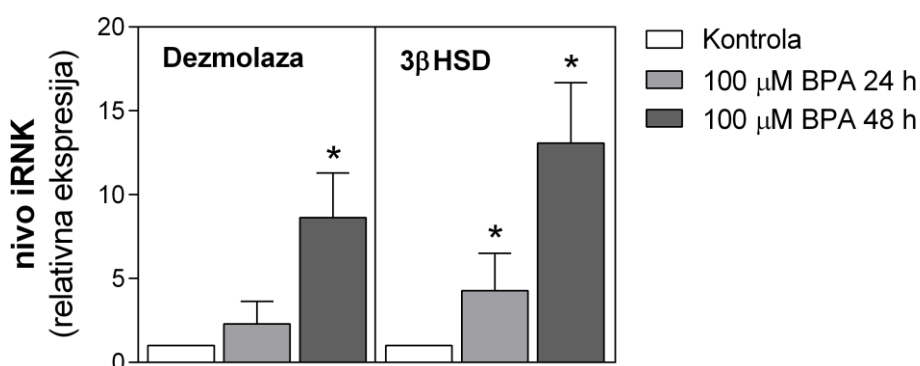
(Slika 4.3.2C). Osim toga, 100  $\mu\text{M}$  BPA je doveo do povećanja ekspresije gena za StAR i nakon kraćeg tretmana u trajanju od 24 h (Slika 4.3.2D i 4.3.2E).



**Slika 4.3.2. In vitro efekat BPA na ekspresiju gena za StAR u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 350 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ili 100  $\mu\text{M}$  BPA, (A, B, D, E) samostalno ili (C) u kombinaciji sa FSH (100 ng/mL) u trajanju od (A, B, C) 48 h ili (D, E) 24 h. (A, C, D) Nivo iRNK za StAR određivan je qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na nivo u bazalnim uslovima, definisan kao 1. (B, E) Određivanje nivoa StAR proteina rađeno je Western blot analizom, nakon tretmana u trajanju od (B) 48 h ili (E) 24 h. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Uzorci su pušteni na istom gelu, a slika je isečena zbog boljeg predstavljanja. Stubići predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene iz 3-10 nezavisnih eksperimenata. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove. <sup>o</sup> $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije stimulisane sa FSH.

#### 4.3.3. Efekat BPA na nivo iRNK za dezmolazu i 3 $\beta$ -HSD u bazalnim uslovima

Kako bismo utvrdili da li 100  $\mu$ M BPA utiče na enzime uključene u sintezu progesterona, analizirali smo nivo iRNK za dezmolazu i 3 $\beta$ -HSD nakon tretmana sa BPA u trajanju od 24 h i 48 h. Rezultati su pokazali da 100  $\mu$ M BPA povećava nivo iRNK za 3 $\beta$ -HSD nakon 24 h, dok je nakon tretmana u trajanju od 48 h uočeno povećanje nivoa oba transkripta u odnosu na nestimulisane granuloza ćelije (Slika 4.3.3).

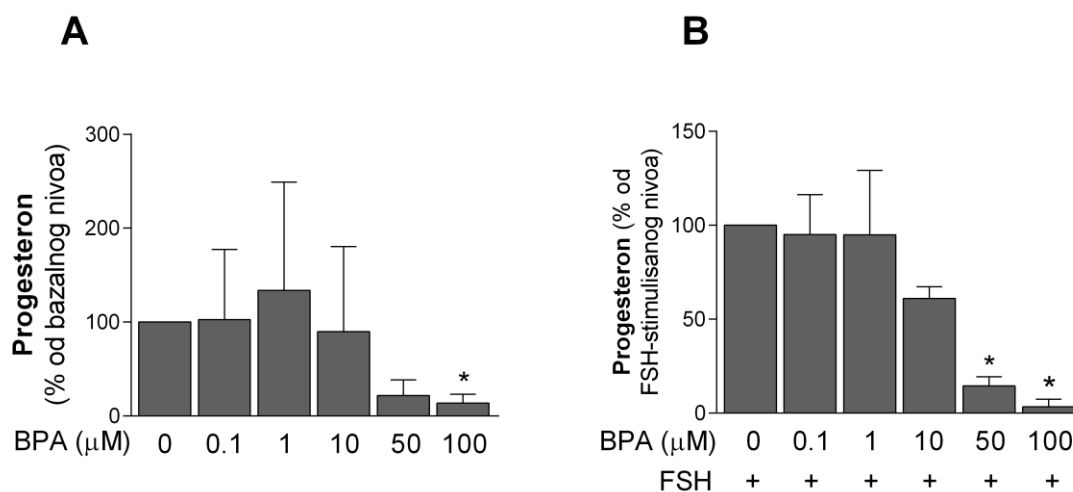


**Slika 4.3.3. *In vitro* efekat BPA na nivo iRNK za dezmolazu i 3 $\beta$ -HSD u bazalnim uslovima.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 350 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa 100  $\mu$ M BPA u periodu od 24 h i 48 h. Nivoi iRNK za dezmolazu i 3 $\beta$ -HSD određivani su qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na nivo u bazalnim uslovima, definisan kao 1. Stubići predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM dobijenu iz 4-5 nezavisnih eksperimenata. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove.

#### 4.3.4. Efekat BPA na produkciju progesterona u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granuloza ćelija sa FSH

S obzirom da su rezultati pokazali da BPA dovodi do povećane ekspresije gena koji učestvuju u procesu biosinteze progesterona, ispitan je efekat BPA na produkciju progesterona od strane nezrelih granuloza ćelija. Ćelije su tretirane sa 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M i 100  $\mu$ M BPA, samostalno ili u kombinaciji sa FSH u trajanju od 24 h, nakon čega je određivan nivo progesterona akumuliranog u medijumu. Rezultati pokazuju da 100  $\mu$ M BPA dovodi do izraženog smanjenja produkcije progesterona u

bazalnim uslovima (Slika 4.3.4A). Tokom kombinovane stimulacije ćelija sa FSH i BPA, inhibitoran efekat BPA na stvaranje progesterona uočen je u koncentracijama od 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  u poređenju sa samostalnim FSH tretmanom (Slika 4.3.4B). Ostale koncentracije BPA nisu dovele do statistički značajnih promena u produkciji progesterona.

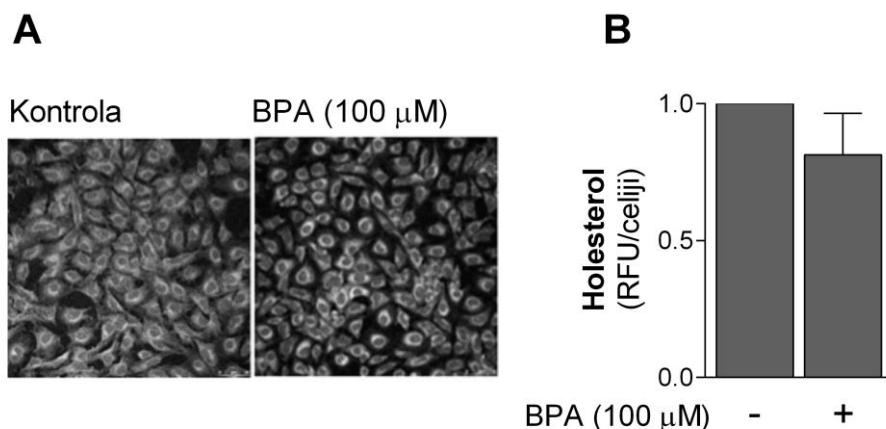


**Slika 4.3.4. Efekat BPA na produkciju progesterona u bazalnim uslovima i tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH.** Granuloza ćelije su sadene u ploče sa 24 bunarića, 350 000 ćelija/bunariću, i tretirane u trajanju od 24 h sa različitim koncentracijama BPA (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ ), (A) samostalno ili (B) u kombinaciji sa FSH (100 ng/mL). Nivo progesterona u inkubacionom medijumu određivan je ELISA analizom. Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na nivo u (A) bazalnim uslovima, odnosno, (B) granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH, definisan kao 100%. Stubići predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$ SEM dobijene iz 6-9 nezavisnih eksperimenata. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na (A) bazalne uslove ili (B) granulosa ćelije stimulisane sa FSH.

#### 4.3.5. Efekat BPA na distribuciju i nivo holesterola u bazalnim uslovima

S obzirom da su prethodni rezultati pokazali inhibitoran uticaj BPA na produkciju progesterona, ispitivano je da li je za to odgovorna narušena homeostaza holesterola, prekursora za sintezu progesterona. Slobodan holesterol detektovan je bojenjem ćelija Filipin III bojom. Rezultati pokazuju da je u kontrolnim ćelijama holesterol difuzno raspoređen, dok je u granulosa ćelijama tretiranim sa BPA holesterol u većoj meri lokalizovan u perinukleusnim regionima ćelije (Slika 4.3.5A). Međutim, kvantitativna analiza sadržaja holesterola pokazala je da BPA ne dovodi do

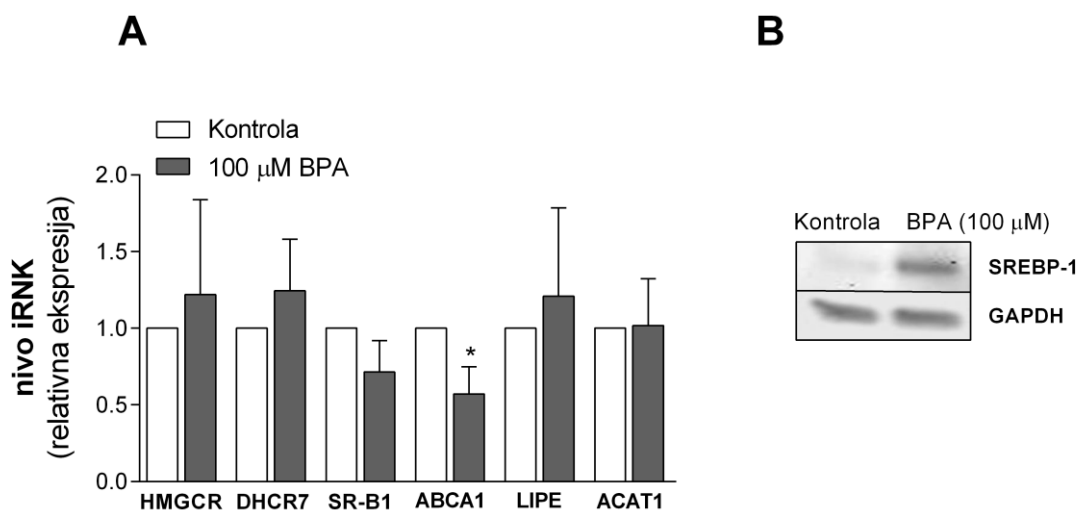
promena u nivou slobodnog holesterola u odnosu na nestimulisane ćelije (Slika 4.3.5B). Ovi rezultati ukazuju da BPA narušava distribuciju, ali ne utiče na nivo slobodnog holesterola u granuloza ćelijama.



**Slika 4.3.5. *In vitro* efekat BPA na distribuciju i nivo holesterola u bazalnim uslovima.** Granuloza ćelije sadene su na mikroskopske pločice sa 8 bunarića, 350 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa 100 μM BPA u trajanju od 24 h. Distribucija i sadržaj slobodnog holesterola detektovani su bojenjem Filipinom III. (A) Prikazane su reprezentativne fluorescentne slike. (B) Sadržaj slobodnog holesterola određivan je kvantifikacijom intenziteta bojenja. Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na nivo u bazalnim uslovima, definisan kao 100%. Stubići predstavljaju srednje vrednosti relativnih fluorescentnih jedinica (engl. *relative fluorescent units*, RFU) po ćeliji (RFU/ćeliji)±SEM dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta (3-9 polja analizirano je po grupi po eksperimentu).

#### 4.3.6. Efekat BPA na nivoe iRNK za proteine uključene u regulaciju homeostaze holesterola u bazalnim uslovima

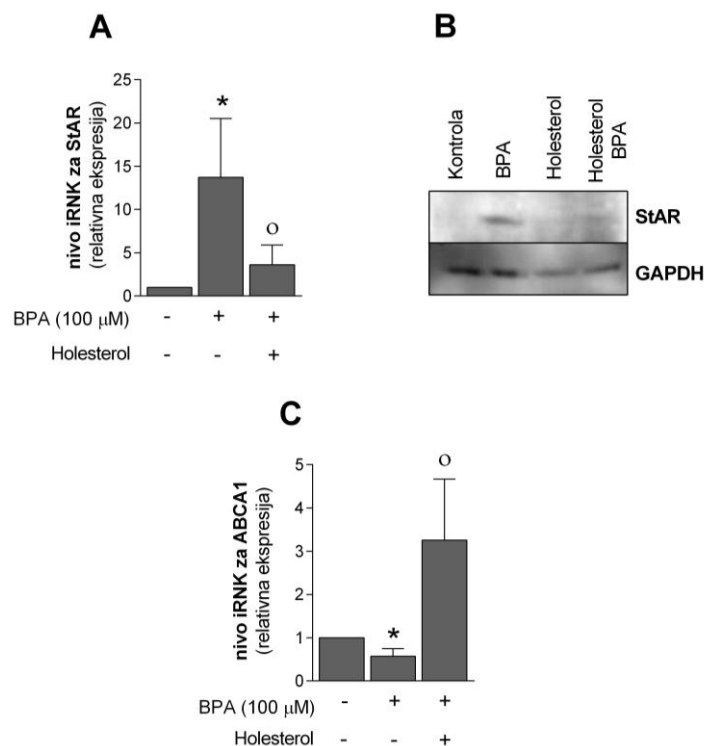
Dalje su ispitivani nivoi iRNK za proteine uključene u regulaciju homeostaze holesterola, uključujući HMGCR i 7-dehidroholesterolne reduktaze (DHCR7) (sinteza holesterola), SR-B1 i ABCA1 (influx i efluks holesterola), LIPE (oslobađanje slobodnog holesterola) i ACAT (konverzija holesterol estara u slobodni holesterol). Rezultati su pokazali da BPA dovodi do smanjenja nivoa iRNK za ABCA1 (Slika 4.3.6A). Osim toga, rezultati pokazuju da BPA dovodi do povećanog nivoa SREBP-1 proteina (Slika 4.3.6B) u nestimulisanim granuloza ćelijama.



**Slika 4.3.6. *In vitro* efekat BPA na nivoe iRNK za proteine uključene u regulaciju homeostaze holesterola u bazalnim uslovima.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 350 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa 100 μM BPA u trajanju od 24 h. (A) Nivoi iRNK za HMGCGR, DHCR7, SCARB1, ABCA1, LIPE i ACAT1 određivani su qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na nivo u bazalnim uslovima, definisan kao 1. (B) Određivanje nivoa SREBP-1 proteina rađeno je Western blot analizom. Prikazana je reprezentativna Western blot slika. Stubići predstavljaju srednje vrednosti±SEM dobijene iz 3-7 nezavisnih eksperimenata. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove.

#### **4.3.7. Efekat kombinacije holesterola i BPA na ekspresiju gena za StAR i nivo iRNK za ABCA1 u granuloza ćelijama**

S obzirom da su prethodni rezultati pokazali da BPA narušava homeostazu holesterola, ispitivano je da li dodatak holesterola granuloza ćelijama utiče na efekat BPA na ekspresiju gena za StAR i nivo iRNK za ABCA1. U te svrhe, granuloza ćelije su tretirane kombinacijom BPA i holesterola u trajanju od 24 h. Kao što je prikazano na Slici 4.3.7, kombinacija holesterola i BPA dovela je do smanjenja ekspresije StAR gena (Slika 4.3.7A i B), ali i povećanja nivoa iRNK za ABCA1 (Slika 4.3.7C) u poređenju sa ekspresijom u granuloza ćelijama tretiranim samo sa BPA.

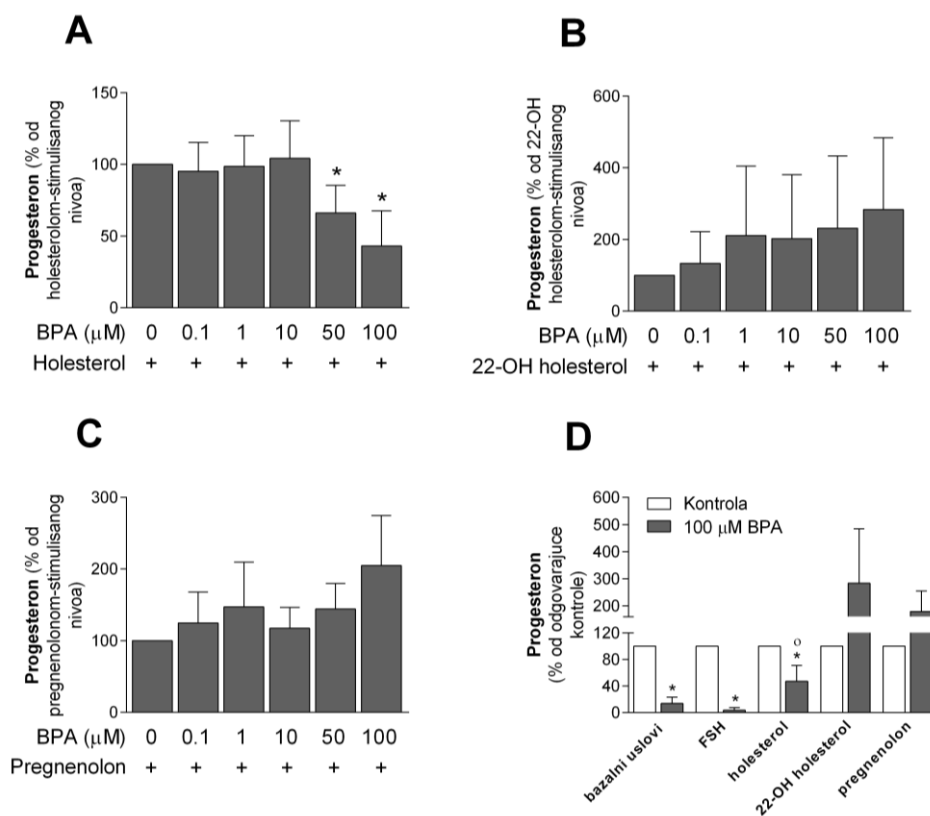


**Slika 4.3.7. *In vitro* efekat kombinacije holesterola i BPA na ekspresiju gena za StAR i nivo iRNK za ABCA1 u granulosa ćelijama.** Granuloza ćelije su sadene u ploče sa 24 bunarića, 350 000 ćelija/bunariću, i tretirane sa 100  $\mu$ M BPA i 20  $\mu$ M holesterolom samostalno ili u kombinaciji u trajanju od 24 h. Nivoi iRNK za (A) StAR i (C) ABCA1 određivani su qRT-PCR analizom, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na nivo u bazalnim uslovima, definisan kao 1. (B) Određivanje nivoa StAR proteina rađeno je Western blot analizom. Prikazana je reprezentativna Western blot slika. Stubići predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene iz 4-7 nezavisnih eksperimenata. \* $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na bazalne uslove. <sup>o</sup> $p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije tretirane sa BPA.

#### 4.3.8. Efekat kombinacije različitih steroidogenih supstrata i BPA na produkciju progesterona u granulosa ćelijama

Ispitivano je da li dodatak različitih steroidogenih supstrata menja stvaranje progesterona nakon tretmana nezrelih granulosa ćelija sa BPA. Granuloza ćelije tretirane su sa rastućim koncentracijama BPA u prisustvu holesterola, 22-OH holesterola (forma holesterola koja slobodno difunduje do unutrašnje mitohondrijske membrane i predstavlja supstrat za enzim dezmolazu) ili pregnenolona (supstrat za enzim  $3\beta$ -HSD) u trajanju od 24 h. BPA je doveo do delimičnog smanjenja produkcije progesterona u granulosa ćelijama tretiranim sa holesterolom (Slika 4.3.8A), dok je

efekat BPA na stvaranje progesterona izostao kada su ćelije tretirane sa 22-OH holesterolom (Slika 4.3.8B) i pregnenolonom (Slika 4.3.8C). Osim toga, rezultati su pokazali da BPA dovodi do izraženijeg smanjenja nivoa progesterona u bazalnim uslovima, kao i u ćelijama stimulisanim FSH u poređenju sa ćelijama stimulisanim holesterolom, 22-OH holesterolom i pregnenolonom (Slika 4.3.8D).



**Slika 4.3.8. *In vitro* efekat kombinacije različitih steroidogenih supstrata i BPA na produkciju progesterona u granulosa ćelijama.** Granuloza ćelije su sađene u ploče sa 24 bunarića, 350 000 ćelija/bunariću, i tretirane u trajanju od 24 h sa različitim koncentracijama BPA (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ ) u prisustvu (A) 20  $\mu\text{M}$  holesterola, (B) 20  $\mu\text{M}$  22-OH holesterola ili (C) 20  $\mu\text{M}$  pregnenolona. (D) Produkcija progesterona u granulosa ćelijama tretiranim sa 100  $\mu\text{M}$  BPA, odnosno, sa 100  $\mu\text{M}$  BPA u prisustvu FSH ili različitih steroidogenih supstrata. Nivo progesterona u inkubacionom medijumu određivan je ELISA metodom. Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na nivo progesterona u bazalnim uslovima, odnosno, u granulosa ćelijama tretiranim sa FSH ili odgovarajućim steroidogenim supstratom, definisan kao 100%. Stubići predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene iz 3-9 nezavisnih eksperimenata. (A) \* $p < 0.05$  statistički značajna razlika u odnosu na nivo u granulosa ćelijama tretiranim holesterolom. (D) \* $p < 0.05$  statistički značajna razlika u odnosu na odgovarajuću kontrolu.  $^{\circ}p < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na granulosa ćelije tretirane sa BPA, i kombinacijom FSH i BPA.

## **5. DISKUSIJA**



## 5. 1. Efekat ATR na steroidogeni i ovulacioni potencijal granulosa ćelija

### 5.1.1. *In vitro* efekat ATR

U ovom radu ispitivani su *in vitro* efekti ATR na steroidogenezu, proliferaciju i diferencijaciju granulosa ćelija tokom stimulacije sa FSH. Raniji rezultati su pokazali različite efekte ATR na stvaranje estradiola. Neki autori su pokazali da ATR povećava stvaranje estradiola i aktivnost aromataze u granulosa ćelijama pacova, kao i humanim ćelijskim linijama kao što su JEG-3 i H295R (Quignot i sar., 2012b). Sa druge strane, pojedini radovi sugerišu da *in vitro* tretman ATR ne dovodi do promene u nivou ekspresije aromataze u granulosa ćelijama pacova (Tinfo i sar., 2011; Quignot i sar., 2012b). Naši rezultati su pokazali da ATR ne menja bazalnu, ali ispoljava inhibitoran uticaj na ekspresiju aromataze i stvaranje estradiola u granulosa ćelijama u uslovima stimulacije sa FSH. Za razliku od ostalih radova, u ovim istraživanjima inhibitorni efekat ATR na put biosinteze estradiola se javlja tokom delovanja FSH na ćelije. Različiti efekti ovog pesticida na ekspresiju aromataze i stvaranje estradiola najverovatnije su posledica razlika u dužini trajanja tretmana, tipu tretmana i ćelija korišćenih u eksperimentima.

Budući da tokom proliferacije i diferencijacije nezrelih granulosa ćelija dolazi do povećanja ekspresije LHR, u ovom radu ispitan je efekat ATR na relativnu ekspresiju gena za ovaj receptor. Naši rezultati su pokazali da ATR smanjuje nivo iRNK za LHR u uslovima stimulacije sa FSH, što je u skladu sa nalazima drugih autora koji su ispitivali dejstvo drugih endokrinih ometača, kao što su TCDD i metabolit metoksihlora, 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane (HPTE). Slično našim rezultatima, i za ove endokrine ometače je pokazano da u uslovima stimulacije sa FSH menjaju nivo iRNK za LHR u granulosa ćelijama (Hirakawa i sar., 2000; Zachow and Uzumcu, 2006). Adekvatna ekspresija LHR na membrani granulosa ćelija tokom ovulacionog LH talasa je neophodna za proces ovulacije i transformacije granulosa ćelija u luteinske ćelije. Naime, nekoliko sati pre ovulacije, LH delujući na svoj receptor indukuje brzu i prolaznu ekspresiju EGF-sličnih faktora rasta, kao što su AREG i EREG,

koji se potom vezuju za EGFR na membrani muralnih i kumulusnih granulosa ćelija, indukujući na taj način ekspresiju gena koji su od ključnog značaja za ovulaciju i luteinizaciju (Park i sar., 2004). Značaj EGF-sličnih faktora rasta u ovulaciji pokazan je korišćenjem *knockout* miševa, gde su ženke miševa koje ne poseduju gene za AREG i EREG i homozigotne su za EGFR pokazale poremećaj na nivou ekspanzije kumulusnih granulosa ćelija, luteinizacije i oslobađanja oocite, što ukazuje na ključnu ulogu ovih faktora rasta tokom ovulacije (Hsieh i sar., 2007). Pored toga, nedostatak *Pgr* kod ženki miševa dovodi do izostanka ovulacije usled neuspešnog prskanja folikula nakon stimulacije sa LH (Conneely, 2010). Naši rezultati su pokazali da ATR narušava ovulacioni potencijal granulosa ćelija smanjenjem nivoa iRNK za LHR u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH, što sprečava hCG da izazove maksimalnu ekspresiju gena za proteine uključene u kontrolu ovulacije, AREG, EREG i PGR.

Tačan mehanizam putem koga ATR ostvaruje efekte na nivo estradiola i iRNK za aromatazu i LHR nije u potpunosti razjašnjen. Različiti signalni putevi uključeni su u regulaciju ekspresije gena za aromatazu i LHR (Dufau i sar., 2010), kao i u stvaranju estradiola. Pokazano je da cAMP/PKA/CREB signalni put stimuliše (Chen i sar., 2000; Stocco, 2008), dok ERK1/2 signalni put inhibira navedene procese (Fan i sar., 2009). Pored toga, regulacija nivoa LHR odvija se i na post-transkripcionom nivou, aktivacijom mevalonatne kinaze koja se vezuje za iRNK receptora i dovodi do njene degradacije (Menon and Menon, 2012). Međutim, kada su granulosa ćelije stimulisane sa 8-Br-cAMP, ATR je doveo do povećanja nivoa iRNK za LHR nakon 48 h. Ovaj rezultat isključuje mogućnost da ATR ostvaruje inhibitoran uticaj na LHR putem degradacije iRNK receptora, već najverovatnije uzrokuje promene aktivnosti signalnih puteva i transkripcionih faktora uključenih u regulaciju ekspresije gena za LHR. Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju na ključnu ulogu ERK1/2 signalnog puta u delovanju ATR na granulosa ćelije. Primenom U0126, farmakološkog inhibitora fosforilacije ERK1/2, u kombinaciji sa ATR i FSH povećava se nivo iRNK za LHR i aromatazu u poređenju sa granulosa ćelijama tretiranim sa FSH i ATR. Ovaj podatak ukazuje da ATR inhibitorno dejstvo na ekspresiju gena za aromatazu i LHR ostvaruje

preko ERK1/2 signalnog puta. Međutim, analiza fosforilacije ERK1/2 pokazala je da ATR ne dovodi do dodatnog povećanja aktivnosti ove kinaze u granulosa ćelijama stimuliranim sa FSH. Rezultati studija u kojima su ispitivani drugi endokrini ometači bi mogli da pomognu u razjašnjavanju mehanizma delovanja ATR na stvaranje estradiola i relativnu ekspresiju gena za LHR, AREG i EREG. Naime, pokazano je da se negativni efekti endokrinih ometača na reproduktivni sistem često ostvaruju interakcijom signalnih puteva aktiviranih od strane prirodnih hormona i endokrinih ometača. Tako je, na primer, sinergističko delovanje FSH i BPA neophodno za aktivaciju PPAR $\gamma$ , transkripcionog faktora koji u humanim granulosa ćelijama stimuliranim sa FSH dovodi do smanjenja sinteze estradiola i ekspresije gena koji kodiraju insulinu sličan faktor rasta 1, steroidogeni faktor 1 (SF-1) i aromataze (Kwintkiewicz i sar., 2010). Pokazano je da ATR može da aktivira članove NR5A familije transkripcionih faktora, SF-1 i LHR-1 (engl. *liver receptor homolog-1*) (Suzawa and Ingraham, 2008), koji su uključeni u regulaciju ekspresije gena i steroidogeneze u granulosa ćelijama (Val i sar., 2003; Kim i sar., 2004). Ovi transkripcioni faktori se fosforilišu i aktiviraju od strane ERK1/2 (Lee i sar., 2006). Stoga, može da se pretpostavi da u našem modelu ATR menja ekspresiju nekog od transkripcionih faktora koji kontrolišu ekspresiju aromataze i LHR, a koga zatim aktivira ERK1/2 u granulosa ćelijama stimuliranim sa FSH. Jedan od potencijalnih transkripcionih faktora je i C/EBP $\beta$ , koji se u granulosa ćelijama takođe aktivira od strane ERK1/2 (Fan i sar., 2011) i ima značajnu ulogu u regulaciji ekspresije aromataze (Sterneck i sar., 1997). Naši rezultati su pokazali da ATR povećava nivo C/EBP $\beta$  proteina u granulosa ćelijama stimuliranim sa FSH. Moguće je da FSH aktivira ERK1/2, koji zatim fosforiliše C/EBP $\beta$ , što za posledicu ima inhibiciju stvaranja estradiola i transkripcije gena za aromatazu i LHR u uslovima stimulacije sa FSH.

U cilju dalje identifikacije mehanizama preko kojih ATR ispoljava efekte na nivo estradiola i relativnu ekspresiju gena za LHR ispitivani su enzimi koji učestvuju u prvoj fazi metabolizma ksenobiotika. Rezultati su pokazali da tretman ćelija sa ATR tokom stimulacije sa FSH, u trajanju od 6 h dovodi do povećanja relativne ekspresije

gena za CYP1B1, enzima čija se ekspresija indukuje aktivacijom AHR. CYP1B1 katalizuje konverziju estradiola u 4-hidroksiestradiol (Badawi i sar., 2001), te se može pretpostaviti da povećanje nivoa iRNK za ovaj enzim, pored smanjenja nivoa iRNK za aromatazu, doprinosi smanjenju nivoa estradiola nakon tretmana granulosa ćelija sa ATR. Nizak nivo estradiola najverovatnije je uzrok manjeg nivoa iRNK za LHR u granulosa ćelijama tretiranim sa ATR i FSH u poređenju sa ćelijama tretiranim samo sa FSH. Da je nizak nivo estradiola moguć razlog za smanjenje relativne ekspresije gena za LHR u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH svedoče i rezultati eksperimenata koji su pokazali da indukcija ekspresije gena za CYP1B1 nakon tretmana granulosa ćelija sa aktivatorom AHR, bNF, ima za posledicu smanjenje nivoa iRNK za LHR.

Osim ispitivanja uticaja ATR na sintezu estradiola u uslovima stimulacije sa FSH, u ovom radu ispitivani su i efekti ATR na stvaranje progesterona i ekspresiju gena koji kodiraju StAR i dezmolazu, proteine odgovorne za sintezu progesterona. Iako u nezrelim granulosa ćelijama FSH aktivira stvaranje progesterona, nivo ovog hormona održava se na relativno niskom nivou, čime se sprečava stvaranje većih količina progesterona pre nego što granulosa ćelije dostignu preovulacioni stadijum. Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da tretman ATR u trajanju od 48 h u FSH-stimulisanim granulosa ćelijama dovodi do povećanog stvaranja progesterona i povećane relativne ekspresije gena za StAR i dezmolazu. Sposobnost ATR da dovede do povećanja nivoa progesterona pokazana je na modelu preovulacionih granulosa ćelija, kao i na ćelijskoj liniji H295R (Tinfo i sar., 2011). Osim toga, pokazano je da kod ženki pacova ATR povećava produkciju progesterona u tek formiranom žutom telu (Taketa i sar., 2011). Pored toga, *in vivo* tretman odraslih ženki svinja sa ATR dovodi do povećanja stvaranja progesterona i smanjenja produkcije estradiola pre pojave estrusa (Gojmerac i sar., 1996). Činjenica da ATR dovodi do povećanja produkcije progesterona tokom tranzicije nezrelih granulosa ćelija do preovulacionog stadijuma ukazuje na potencijal ovog pesticida da ispolji negativan uticaj na funkciju ovarijuma, uključujući i ovulacioni proces. Pokazano je da visok nivo progesterona sprečava

razvoj folikula i promoviše atreziju velikih preantrumskih folikula (Telfer i sar., 1991), defekte kumulusnih granuloza ćelija, kao i smanjenu fertilitnost (Pangas i sar., 2006). Pored toga, prevremen porast koncentracije progesterona tokom procesa *in vitro* fertilizacije povezan je sa nižom stopom implantacije (Kyrou i sar., 2012).

Tokom stimulacije nezrelih granuloza ćelija sa FSH, odnos između progesterona i estradiola je uvek manji od 1, što omogućava proliferaciju i diferencijaciju granuloza ćelija. Međutim, povećanje nivoa progesterona nakon tretmana sa ATR dovodi do povećanja odnosa progesterona i estradiola iznad 1. Promena ovog odnosa ukazuje da ATR tokom proliferacije i diferencijacije granuloza ćelija u uslovima stimulacije sa FSH promoviše proces prevremene luteinizacije putem povećanja biosinteze progesterona.

Regulacija sinteze progesterona je veoma kompleksna. Signalni putevi cAMP/PKA/CREB, Akt i ERK1/2 imaju ulogu pozitivnih regulatora (Zelevnik i sar., 2003; Wayne i sar., 2007), dok faktori koji se oslobađaju iz oocite, kao na primer članovi familije morfogenetskih proteina kosti predstavljaju negativne regulatore stvaranja progesterona (Otsuka i sar., 2001). Balans pozitivnih i negativnih regulatora sprečava produkciju većih količina progesterona tokom rane diferencijacije granuloza ćelija. Naši rezultati pokazuju da ATR utiče na pozitivne regulatore sinteze progesterona putem stimulacije fosforilacije Akt i CREB, kao i povećane ekspresije C/EBP $\beta$  tokom stimulacije nezrelih granuloza ćelija sa FSH. U prilog uključenosti ovih signalnih puteva u delovanju ATR govori i podatak da tretman ćelija sa farmakološkim inhibitorima aktivacije Akt (vortmanin) i ERK1/2 (U0126), sprečava stimulatorno delovanje ATR na stvaranje progesterona i ekspresiju StAR i dezmolaze. Moguće je da je isti sinergistički mehanizam preko kojeg ATR deluje na nivo iRNK za aromatazu i LHR operativan i kod poremećaja u produkciji progesterona. Ekspimirani C/EBP $\beta$  se kod granuloza ćelija tretiranih sa ATR i FSH aktivira delovanjem ERK1/2 signalnog puta, što dovodi do promena u ekspresiji lutealnih markera. Pored toga, rezultati ovih istraživanja su pokazali da se povećanje nivoa C/EBP $\beta$  od strane ATR ostvaruje aktivacijom cAMP/PKA signalnog puta. Pokazano je da promotor C/EBP $\beta$  poseduje

dva nepotpuna CREB-vezujuća mesta koja doprinose bazalnoj i PKA-stimulisanoj transkripciji ovog gena (Niehof i sar., 1997). Na primer, pokazano je da endokrini ometač TCDD u embrionskim ćelijama miša dovodi do povećanja nivoa cAMP preko aktivacije PKA, što zatim indukuje ekspresiju C/EBP $\beta$  (Vogel i sar., 2004). Međutim, naši rezultati su pokazali da ATR nije doveo do promena u nivou cAMP u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH, kada su merenja nivoa cAMP rađena 48 h nakon tretmana. S obzirom da cAMP signalni put u granulosa ćelijama pokazuje ranu aktivaciju nakon stimulacije sa FSH, potrebno je izvršiti merenja nivoa cAMP u više različitih vremenskih intervala, kako bi se stekao pravi uvid o efektima ATR na ovaj signalni put. U prilog pretpostavci da ATR utiče na cAMP signalni put svedoče i rezultati ovog rada koji pokazuju da ATR dovodi do povećanja fosforilacije CREB i Akt proteina. Naime, pokazano je da CREB i Akt predstavljaju nizvodna mesta delovanja cAMP signalnog puta u granulosa ćelijama (Hunzicker-Dunn i sar., 2012), te svaka promena u fosforilaciji ova dva proteina može da ukaže na promene u stvaranju cAMP. Osim toga, ATR povećava nivo iRNK za StAR i dezmolazu i stvaranje progesterona kod ćelija koje su tretirane aktivatorom cAMP signalnog puta, forskolinom.

Uticao ATR na cAMP signalni put u granulosa ćelijama se najverovatnije ostvaruje putem njegovog delovanja na PDE. Naime, pokazano je da ATR ima sposobnost da deluje kao kompetitivni inhibitor PDE (Roberge i sar., 2004). U Lajdigovim ćelijama i ćelijama hipofize pacova ATR je stimulisao stvaranje prolaktina i testosterona putem inhibicije specifične PDE4 (Pogrmic i sar., 2009; Kucka i sar., 2012). Osim toga, u folikulima miševa kojima je genetskim manipulacijama uklonjena PDE4D dolazi do prevremene luteinizacije, dok oocite ostaju zarobljene u folikulima (Park i sar., 2003; Vezzosi and Bertherat, 2011). U cilju dobijanja odgovora na pitanje da li ATR deluje na PDE u granulosa ćelijama, blokirali smo aktivnost svih PDE (IBMX), kao i PDE4 (rolipram). Samostalni tretman granulosa ćelija inhibitorom aktivacije svih PDE doveo je do sličnih promena u granulosa ćelijama kao i tretman sa ATR. IBMX je doveo do povećanja fosforilacije Akt, ekspresije C/EBP $\beta$  proteina, kao i iRNK za StAR u ćelijama stimulisanim sa FSH. Pored toga, dodatak roliprama na ćelije tretirane sa ATR

i FSH nije doveo do promena u nivou iRNK za StAR i C/EBP $\beta$  proteine, kao ni do promena u fosforilaciji Akt u odnosu na ćelije tretirane sa ATR i FSH. Ovi rezultati ukazuju da PDE4 predstavlja potencijalno mesto delovanja ATR u granulosa ćelijama.

### 5.1.2. *In vivo* efekat ATR

Prethodni rezultati ukazuju da tokom *in vitro* tretmana sa ATR dolazi do poremećaja u stvaranju estradiola i progesterona u uslovima stimulacije sa FSH, kao i do promena u ekspresiji gena za LHR, aromatazu, StAR i dezmolazu. Narušavanje navedenih procesa ima za posledicu smanjenje ovulacionog kapaciteta granulosa ćelija u *in vitro* uslovima. Međutim, korišćenjem *in vitro* pristupa teško je definisati posledice negativnog uticaja ATR na sam proces ovulacije kod životinja.

Kako bismo potvrdili rezultate o efektima ATR dobijene korišćenjem *in vitro* pristupa, ispitali smo uticaj ATR na ovulaciju nakon *in vivo* tretmana kod nezrelih ženki pacova tretiranih gonadotropinima. Ranije studije su pokazale da visoke koncentracije ATR dovode do blokade ovulacije, s obzirom da ATR inhibira oslobađanje LH talasa iz hipofize (Shibayama i sar., 2009; Foradori i sar., 2014). Da bismo ispitali da li ATR deluje direktno na nivou ovarijuma, nezrele ženke pacova su istovremeno tretirane gonadotropinima i ATR. Koncentracija ATR od 50 mg/kg telesne mase odabrana je jer je inhibirala oslobađanje LH iz hipofize (Foradori i sar., 2014), dok aplikacija manjih koncentracija ATR (<50 mg/kg telesne mase) nije ispoljila negativne efekte na reproduktivni sistem pacova (Shibayama i sar., 2009; Foradori i sar., 2014). Iz tog razloga, tretman ATR u koncentraciji od 50 mg/kg telesne mase, dva, odnosno, tri puta u razmacima od 24 h predstavlja pogodan metod za ispitivanje direktnog efekta ATR na granulosa ćelije ovarijuma. Pored toga, ATR je u ovom radu apliciran intraperitonealno, jer je ovaj način administracije ranije korišćen u *in vivo* eksperimentima (Rodríguez i sar., 2013; Jin i sar., 2014), a takođe je sličan oralnoj administraciji, s obzirom da se supstanca apsorbuje od strane mezenteričnih sudova koji se ulivaju u portalnu venu jetre, nakon čega dospeva do ovog organa (Turner i sar., 2011).

Rezultati su pokazali da *in vivo* tretman sa ATR takođe sprečava stvaranje estradiola i relativnu ekspresiju gena za aromatazu i LHR u uslovima stimulacije sa eCG, što ima za posledicu neadekvatan odgovor granulosa ćelija na ovulacionu dozu hCG, u smislu indukcije relativne ekspresije gena za EREG i PGR koji učestvuju u regulaciji ovulacije. Zahvaljujući tome, u potpunosti je blokirano oslobađanje oocita kod nezrelih ženki pacova tretiranih gonadotropinima i ATR.

U cilju dalje identifikacije mehanizama preko kojih ATR ispoljava efekte na steroidogenezu i ovulaciju ispitivani su enzimi koji učestvuju u prvoj i drugoj fazi metabolizma ksenobiotika. Rezultati ovog rada su pokazali da kratkotrajni tretman sa ATR ne dovodi do promena u aktivaciji GST enzima, ali dovodi do povećanja relativne ekspresije gena za CYP1B1. Moguće je da povećanje ekspresije gena za ovaj enzim koji pripada prvoj fazi metabolizma ksenobiotika ima ključnu ulogu u delovanju ATR na ovulacioni proces. CYP1B1 katalizuje konverziju estradiola u 4-hidroksiestradiol (Badawi i sar., 2001), te se može pretpostaviti da povećanje nivoa iRNK za ovaj enzim ima ulogu u smanjenju nivoa estradiola nakon tretmana ženki pacova sa ATR. Međutim, s obzirom da nije merena koncentracija metabolita estradiola, ne može se sa potpunom sigurnošću zaključiti da je isključivo katabolizam estradiola odgovoran za niži nivo ovog steroida u serumu tretiranih pacova. Osim što povećava ekspresiju enzima koji kataboliše estradiol, ATR smanjuje ekspresiju aromataze, enzima koji ga stvara, što takođe doprinosi smanjenju nivoa ovog hormona. Nizak nivo estradiola najverovatnije je uzrok manjeg nivoa iRNK za LHR u granulosa ćelijama izolovanim iz životinja tretiranih sa eCG i ATR u poređenju sa životinjama tretiranim sa eCG. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima *in vitro* eksperimenata, gde je takođe pokazano povećanje nivoa iRNK za CYP1B1 u granulosa ćelijama tretiranim sa FSH i ATR. Ekspresija CYP1B1 enzima u granulosa ćelijama je visoka i u bazalnim uslovima, ali se može i indukovati vezivanjem egzogenih liganda od kojih je najpoznatiji TCDD (Dasmahapatra i sar., 2002). Osim toga, povećanje ekspresije CYP1B1 može da ukaže na moguću aktivaciju AHR signalnog puta u ovarijumima ženki tretiranih sa ATR. Međutim, dodatna istraživanja su neophodna kako bi se sa sigurnošću utvrdilo da li je



AHR signalni put jedan od glavnih medijatora toksičnog delovanja ATR u *in vivo* uslovima. U *in vitro* eksperimentima definisano je nekoliko različitih signalnih puteva, uključujući cAMP, Akt i ERK1/2, koji mogu da budu promenjeni i tokom *in vivo* tretmana sa ATR. Njihova uloga u smanjenju produkcije estradiola i nivoa iRNK za aromatazu i LHR u granulosa ćelijama nezrelih ženki pacova tretiranih sa eCG takođe treba da bude ispitana.

Za razliku od rezultata dobijenih u *in vitro* eksperimentima, gde je ATR doveo do prevremene luteinizacije granulosa ćelija, *in vivo* tretman nije proizveo iste efekte. Nakon *in vivo* tretmana, relativna ekspresija gena za StAR u uslovima eCG stimulacije u granulosa ćelijama je ostala nepromenjena, dok je nivo iRNK za dezmolazu smanjen kod životinja tretiranih sa ATR. Sposobnost ATR da dovede do povećanja sinteze progesterona dokumentovana je u studiji gde su pacovi rase SD stari 6 nedelja tretirani sa 300 mg/kg telesne mase ATR jednom dnevno u trajanju od 2 nedelje (Taketa i sar., 2011). Moguće je da su razlike u osetljivosti estradiolskog i progesteronskog biosintetskog puta na delovanje ATR posledica korišćene koncentracije ATR, dužine trajanja tretmana, starosti i/ili rase pacova tretiranih sa ATR.

*In vivo* istraživanja delovanja ATR na steroidogenezu i ovulaciju su značajna jer je ATR detektovan u folikularnoj tečnosti kod žena (Wagner i sar., 1990). Pored toga, kod pacova koji su oralno tretirani sa 200 mg/kg telesne mase ATR svakodnevno tokom dve nedelje ovaj pesticid je detektovan u ovarijumima u koncentraciji od 0.5  $\mu\text{M}$  (Quignot i sar., 2012c). Kod ovih ženki je došlo do smanjenja funkcije ovarijuma regulisane od strane LHR i estradiola, kao što su veličina ovarijuma, razvoj i održavanje žutog tela i estrusni ciklus. Međutim, ne može se zanemariti i činjenica da se tokom *in vivo* aplikacije ATR metaboliše u organizmu, pri čemu može doći do formiranja metabolita ATR koji mogu da ispoljavaju iste ili čak toksičnije efekte u odnosu na sam ATR (Stoker i sar., 2002; Jin i sar., 2014). S obzirom da u ovom radu, kao i u prethodno navedenoj studiji Quignot i saradnika (2012c), nije određivano prisustvo metabolita ATR u ovarijumima, ne može se izvesti zaključak da li su

detektovani efekti ATR na steroidogenezu i ovulaciju posledica delovanja ATR ili nekog od njegovih metabolita.

## **5.2. Efekat BPA na steroidogeni potencijal granuloza ćelija**

Pored ATR, u ovoj tezi ispitivan je efekat još jednog endokrinog ometača, BPA. Negativni efekti BPA na steroidogenezu u ovarijumima su dokumentovani velikim brojem istraživanja. Tako je pokazano da BPA menja produkciju estradiola i progesterona od strane animalnih (Zhou i sar., 2008; Grasselli i sar., 2010; Peretz i sar., 2011; Peretz and Flaws, 2013), ali i humanih (Kwintkiewicz i sar., 2010; Mansur i sar., 2017) granuloza ćelija. Ove studije su takođe pokazale da su promene u produkciji polnih hormona nastale delovanjem BPA najčešće posledica promena u ekspresiji ili aktivnosti ključnih enzima koji učestvuju u sintezi hormona. U humanim granuloza ćelijama, smanjenje produkcije estradiola i progesterona nakon tretmana sa BPA je posledica smanjene ekspresije aromataze (Kwintkiewicz i sar., 2010), odnosno, dezmolaze i  $3\beta$ -HSD (Mansur i sar., 2017), što dovodi do niže produkcije hormona. U ovom radu, pokazano je da BPA dovodi do smanjenja nivoa progesterona, ali ovaj efekat nije posledica niže ekspresije ključnih enzima koji učestvuju u procesu biosinteze progesterona. Naši rezultati su pokazali da je relativna ekspresija gena za StAR, dezmolazu i  $3\beta$ -HSD povećana u granuloza ćelijama tretiranim sa BPA. Slično našim rezultatima, Zhou i saradnici (2008) su pokazali da kratkotrajno izlaganje nezrelih granuloza ćelija visokim koncentracijama BPA dovodi do smanjenja sinteze progesterona, dok istovremeno dolazi do povećane relativne ekspresije gena za StAR. Međutim, treba istaći da, iako je relativna ekspresija gena koji kodiraju ove proteine povećana, smanjenje njihove aktivnosti može dovesti do nižeg nivoa progesterona u granuloza ćelijama. U ovom radu nije određivana aktivnost StAR, dezmolaze i  $3\beta$ -HSD, te stoga ne možemo sa sigurnošću tvrditi da smanjenje progesterona nije rezultat poremećaja u aktivnosti StAR proteina i steroidogenih enzima.

U cilju identifikacije mehanizma preko kojeg BPA ispoljava inhibitorni efekat na stvaranje progesterona u nezrelim granuloza ćelijama, ispitan je uticaj BPA na

biosintezu i metabolizam holesterola. Holesterol predstavlja početni supstrat za sintezu steroidnih hormona, te svaki poremećaj u njegovoj homeostazi može direktno uticati na akumulaciju progesterona u ćelijama. Naši rezultati su pokazali da BPA narušava homeostazu holesterola u nezrelim granulosa ćelijama putem sekvenciranja holesterola u perinukleusnom prostoru, što može biti jedan od razloga za smanjeno stvaranje progesterona u granulosa ćelijama. Naime, tokom steroidogeneze, do mitohondrija dospeva velika količina holesterola koja potiče iz drugih ćelijskih struktura, uglavnom iz endoplazmatskog retikuluma, kao i nakon hidrolize holesterol estara deponovanih u lipidnim kapima. Sekvenciranje holesterola u perinukleusnom regionu granulosa ćelija nakon tretmana sa BPA čini holesterol nedostupnim za mitohondrije, što se ogleda u smanjenom stvaranju progesterona od strane ovih ćelija. U prilog navedenim rezultatima ide i činjenica da je smanjenje nivoa progesterona nakon tretmana sa BPA delimično onemogućeno nakon istovremenog tretmana granulosa ćelija sa holesterolom i BPA.

Potom smo analizirali relativnu ekspresiju gena za ABCA1, proteina koji učestvuje u reverznom transportu holesterola, kao i SREBP-1, proteina koji učestvuje u regulaciji biosinteze holesterola. Naši rezultati su pokazali da pored povećanja proteina za transport holesterola (StAR), BPA smanjuje relativnu ekspresiju gena za ABCA1 i povećava ekspresiju SREBP-1 proteina, što ukazuje da ovaj endokrini ometač narušava homeostazu holesterola u nezrelim granulosa ćelijama. Ekspresija StAR, ABCA1 i SREBP-1 regulisana je transkripcionim faktorom LXR (engl. *nuclear liver X receptor*), koji funkcioniše kao senzor holesterola u ćelijama, putem regulacije ekspresije velikog broja proteina koji učestvuju u homeostazi holesterola (Grasselli i sar., 2010). U ovarijumima primata, LXR kontroliše balans između steroidogeneze, homeostaze holesterola (Drouineaud i sar., 2007) i luteolize (Bogan and Hennebold, 2010). Smanjena ekspresija LXR dovodi do povećane ekspresije StAR i smanjene ekspresije ABCA1, što ima za posledicu povećanu produkciju progesterona u luteinskim granulosa ćelijama (Puttabyatappa i sar., 2010). Moguće je da u granulosa ćelijama tretiranim sa BPA dolazi do smanjenog izbacivanja holesterola iz ćelije, uz

istovremeno povećanje njegove sinteze (SREBP-1) i transporta do mitohondrija (StAR), u cilju povećanja produkcije progesterona kao odgovor na sekvestraciju holesterola u granulosa ćelijama. U prilog ovoj pretpostavci idu i rezultati prikazani u ovom radu koji pokazuju da dodatak holesterola sprečava povećanje ekspresije StAR, smanjenje nivoa mRNA za ABCA1, ali i delimično sprečava smanjenje produkcije progesterona nakon tretmana granulosa ćelija sa BPA. Osim toga, kada su ćelije tretirane sa 22-OH holesterolom ili pregnenolonom, metabolitima holesterola, BPA nije doveo do pada u stvaranju progesterona u granulosa ćelijama. Ovi rezultati zajedno ukazuju da BPA smanjuje sintezu progesterona u bazalnim uslovima, kao i tokom stimulacije sa FSH, putem narušavanja homeostaze holesterola u nezrelim granulosa ćelijama, što ukazuje na potencijalni mehanizam delovanja BPA na steroidogeni potencijal ovih ćelija.

Fokus istraživanja ove disertacije je stavljen na otkrivanje mehanizama delovanja ATR i BPA na steroidogenezu u granulosa ćelijama. Iz tog razloga korišćene su mikromolarne doze ovih endokrinih ometača. Doze ATR su odabrane na osnovu literaturnih podataka (Sanderson i sar., 2002; Tinfo i sar., 2011; Quignot i sar., 2012b), međutim, u radu Park i sar. (2016) pokazano je da ATR ispoljava negativne efekte i u pikomolarnim i nanomolarnim koncentracijama u humanim granulosa i endometrijskim ćelijama. Koncentracije BPA koje ispoljavaju efekat na steroidogenu funkciju granulosa ćelija, takođe, pripadaju suprafiziološkim dozama. U nekoliko radova gde je ispitivan dozno-zavisni, akutni efekat BPA na steroidogenezu, pokazano je da ovaj endokrini ometač ispoljava dejstvo samo pri dozama između 10 i 100  $\mu\text{M}$  (Kwintkiewicz i sar., 2010; Mansur i sar., 2017). Takođe, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su efekti različitih doza BPA na steroidogenezu, pri čemu je pokazano da samo doze od 50 i 100  $\mu\text{M}$  ispoljavaju efekat na steroidogenezu tokom akutnog izlaganja. Relevantniji pristup za ispitivanje efekta endokrinih ometača na biološke sisteme je korišćenje malih doza hemikalija koje se nalaze u prirodi. Efekti malih doza endokrinih ometača od posebnog su značaja, ne samo zbog toga što ovakve doze oponašaju koncentracije koje se nalaze u prirodi, već mogu da utiču na krivu

dozno-zavisnog odgovora ćelija na izlaganje ovim hemikalijama. Naime, sve više literaturnih podataka ukazuje da endokrini ometači mogu dovesti do ne-monotonog odgovora ćelija (engl. *nonmonotonic dose response*). Pri ovom odgovoru, male ili srednje doze endokrinih ometača ispoljavaju efekte, dok primena većih koncentracija ne uzrokuje značajan odgovor ćelija (Welshons i sar., 2003). Treba istaći da je rad o efektima malih doza ATR objavljen 2016. godine, kada su završeni eksperimenti prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, a vezani su za mehanizme delovanja ATR na steroidogenezu granulosa ćelija. Stoga bi u budućim istraživanjima bilo značajno ispitati i efekte i mehanizme delovanja pikomolarnih i nanomolarnih koncentracija ATR i BPA na steroidogenezu granulosa ćelija pacova. Međutim, u tom slučaju je neophodno korišćenje hroničnih tretmana, koji pored svojih prednosti imaju i nekoliko nedostataka, između ostalih nemogućnost identifikacije samih mehanizama delovanja. Upoznavanje mehanizama delovanja endokrinih ometača je od važnosti ne samo za bolje razumevanje njihove toksičnosti, nego i za bolje sagledavanje posledica delovanja smeše hemikalija kojima su ljudi izloženi u malim koncentracijama. Stoga, akutni tretmani visokim dozama predstavljaju jedan od korišćenih pristupa za upoznavanje mehanizma delovanja endokrinih ometača.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovu analize dobijenih rezultata i diskusije literaturnih podataka možemo zaključiti da ispitivani endokrini ometači, atrazin i bisfenol A, ispoljavaju negativne efekte na steroidogenu funkciju granulosa ćelija ovarijuma ženki pacova. Dobijeni rezultati ukazuju na nove mehanizme preko kojih atrazin i bisfenol A utiču na funkciju granulosa ćelija ovarijuma, kao i na potencijalnu vezu između izlaganja ovim endokrinim ometačima i razvoja bolesti ovarijuma.

- *In vitro* tretman atrazinom negativno utiče na steroidogenezu u granulosa ćelijama stimulisanim sa FSH, što se ogleda u sprečavanju sinteze estradiola i povećanju stvaranja progesterona. Promene u sintezi ova dva steroidna hormona su posledica smanjenja relativne ekspresije gena koji učestvuju u sintezi estradiola (aromataza), odnosno, povećanja relativne ekspresije gena koji kodiraju proteine uključene u put biosinteze progesterona (StAR i dezmolaza). Disbalans u stvaranju steroidnih hormona prouzrokovan delovanjem atrazina tokom stimulacije granulosa ćelija sa FSH ukazuje na proces prevremene lutenizacije. Osim toga, atrazin negativno deluje na ovulacioni kapacitet granulosa ćelija, tako što smanjuje ekspresiju LHR stimulisanu delovanjem FSH i time sprečava hCG da indukuje relativnu ekspresiju gena za proteine uključene u kontrolu procesa ovulacije, AREG, EREG i PGR. Efekat na put biosinteze estradiola i progesterona, kao i na relativnu ekspresiju gena za LHR, ATR ostvaruje preko aktivacije cAMP/PKA, ERK1/2 i Akt signalnih puteva i povećanja relativne ekspresije gena za CYP11B1.
- *In vivo* tretman atrazinom nezrelih ženki pacova stimulisanih gonadotropinima doveo je do potpune blokade ovulacije, što je posledica inhibitornog delovanja atrazina na relativnu ekspresiju gena za LHR indukovanu eCG, koja onemogućava hCG da indukuje relativnu ekspresiju gena za proteine uključene u kontrolu procesa ovulacije, EREG i PGR. Smanjena relativna ekspresija gena za LHR kod nezrelih ženki pacova tretiranih sa atrazinom posledica je smanjenog nivoa estradiola koja se javlja kao posledica poremećaja u metabolizmu ovog steroida: smanjenja sinteze estradiola (inhibicija relativne ekspresije gena za

aromatazu), kao i povećanja katabolizma estradiola (stimulacija relativne ekspresije gena za CYP1B1).

- *In vitro* tretman sa bisfenolom A negativno utiče na put biosinteze progesterona u nezrelim granulosa ćelijama, što se ogleda u smanjenju produkcije progesterona u bazalnim uslovima, kao i nakon stimulacije sa FSH, ali i povećanju nivoa mRNA za StAR, dezmolazu i 3 $\beta$ -HSD. Smanjeno stvaranje progesterona nakon tretmana granulosa ćelija sa bisfenolom A je posledica poremećaja u homeostazi holesterola, što je rezultat sekvestracije holesterola u perinukleusnom prostoru, a ogleda se u smanjenoj relativnoj ekspresiji gena za ABCA1 (uključenog u efluks holesterola), povećanoj ekspresiji StAR (uključenog u transport holesterola) i SREBP-1 proteina (uključenog u sintezu holesterola).



## **7. LITERATURA**

- Abel, E.L., Opp, S.M., Verlinde, C.L., Bammler, T.K., Eaton, D.L., 2004. Characterization of atrazine biotransformation by human and murine glutathione S-transferases. *Toxicol Sci.* 80(2):230-238.
- Adams, N.H., Levi, P.E., Hodgson, E., 1990. In vitro studies of the metabolism of atrazine, simazine, and terbutryn in several vertebrate species. *J. Agric. Food Chem.* 38(6): 1411-1417.
- Adewale, H.B., Jefferson, W.N., Newbold, R.R., Patisaul, H.B., 2009. Neonatal bisphenol-A exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol. Reprod.* 81 (4):690-699.
- Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R., Hardy, M.P., 2004. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat leydig cells. *Endocrinology* 145(2):592-603.
- Albanito, L., Lappano, R., Madeo, A., Chimento, A., Prossnitz, E.R., Cappello, A.R., Dolce, V., Abonante, S., Pezzi, V., Maggiolini, M., 2015. Effects of atrazine on estrogen receptor  $\alpha$ - and G protein-coupled receptor 30-mediated signaling and proliferation in cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environ. Health Perspect.* 123(5):493-499.
- Andersen, H.R., Andersson, A.M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jørgensen, E.B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Møller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 107 Suppl 1:89-108.
- Andric, N., Ascoli, M., 2006. A delayed gonadotropin-dependent and growth factor-mediated activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade negatively regulates aromatase expression in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 20(12):3308-3320.

- Aschengrau, A., Coogan, P.F., Quinn, M., Cashins, L.J., 1998. Occupational exposure to estrogenic chemicals and the occurrence of breast cancer: an exploratory analysis. *Am. J. Ind. Med.* 34(1):6-14.
- Badawi, A.F., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., 2001. Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16-alpha-hydroxylation of 17beta -estradiol. *Metabolism* 50(9):1001-1003.
- Bae, S., Kim, J.H., Lim, Y.-H., Park, H.Y., Hong, Y.-C., 2012. Associations of bisphenol A exposure with heart rate variability and blood pressure. *Hypertension* 60 (3 ):786-793.
- Baumgarten, S.C., Convissar, S.M., Fierro, M.A., Winston, N.J., Scoccia, B., Stocco, C., 2014. IGF1R signaling is necessary for FSH-induced activation of AKT and differentiation of human cumulus granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99(8):2995-3004.
- Berger, R.G., Shaw, J., deCatanzaro, D., 2008. Impact of acute bisphenol-A exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17 $\beta$ -estradiol. *Reprod. Toxicol.* 26(2):94-99.
- Bergman, A., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A., Zoeller, R.T., World Health Organization, United Nations Environment Programme, 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012: an assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO.
- Biedermann, S., Tschudin, P., Grob, K., 2010. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal. Bioanal. Chem.* 398(1): 571-576.
- Bodin, J., Bølling, A.K., Samuelson, M., Becher, R., Løvik, M., Nygaard, U.C., 2013. Long-term bisphenol A exposure accelerates insulinitis development in diabetes-prone NOD mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35(3):349-358.
- Bogan, R.L., Hennebold, J.D., 2010. The reverse cholesterol transport system as a potential mediator of luteolysis in the primate corpus luteum. *Reproduction* 139(1):163-176.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.

- Britt, K.L., Findlay, J.K., 2003. Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen. *Mol. Cell. Endocrinol.* 202(1-2):11-17.
- Buck Louis, G.M., Sundaram, R., Sweeney, A.M., Schisterman, E.F., Maisog, J., Kannan, K., 2014. Urinary bisphenol A, phthalates, and couple fecundity: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment (LIFE) Study. *Fertil. Steril.* 101(5):1359-1366.
- Calafat, A.M., Weuve, J., Ye, X., Jia, L.T., Hu, H., Ringer, S., Huttner, K., Hauser, R., 2009. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ. Health Perspect.* 117(4):639-644.
- Campbell, K.L., 1979. Ovarian granulosa cells isolated with EGTA and hypertonic sucrose: cellular integrity and function. *Biol. Reprod.* 21(4): 773-786.
- Cantonwine, D.E., Ferguson, K.K., Mukherjee, B., McElrath, T.F., Meeker, J.D., 2015. Urinary bisphenol A levels during pregnancy and risk of preterm birth. *Environ. Health Perspect.* 123(9):895-901.
- Casati, L., Sendra, R., Sibilio, V., Celotti, F., 2015. Endocrine disruptors: the new players able to affect the epigenome. *Front. Cell Dev. Biol.* 3:37.
- Chang, T.-Y., Li, B.-L., Chang, C.C.Y., Urano, Y., 2009. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297(1):E1-9.
- Chao, H.-H., Zhang, X.-F., Chen, B., Pan, B., Zhang, L.-J., Li, L., Sun, X.-F., Shi, Q.-H., Shen, W., 2012. Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway. *Histochem. Cell Biol.* 137(2):249-259.
- Chen, S., Liu, X., Segaloff, D.L., 2000. A novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive element involved in the transcriptional regulation of the lutropin receptor gene in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 14(9):1498-1508.
- Cobellis, L., Colacurci, N., Trabucco, E., Carpentiero, C., Grumetto, L., 2009. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomed. Chromatogr.* 23(11):1186-1190.
- Conneely, O.M., 2010. Progesterone receptors and ovulation, in: *Handbook of experimental pharmacology.* pp. 37-44.

- Connor, K., Howell, J., Chen, I., Liu, H., Berhane, K., Sciarretta, C., Safe, S., Zacharewski, T., 1996. Failure of chloro-S-triazine-derived compounds to induce estrogen receptor-mediated responses in vivo and in vitro. *Fundam. Appl. Toxicol.* 30(1):93–101.
- Conti, M., Andersen, C.B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S.Y., Horner, K., Jin, C., Tsafiriri, A., 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187(1-2):153–159.
- Cooper, R.L., Stoker, T.E., Goldman, J.M., Parrish, M.B., Tyrey, L., 1996. Effect of atrazine on ovarian function in the rat. *Reprod. Toxicol.* 10(4):257–264.
- Cooper, R.L., Stoker, T.E., Tyrey, L., Goldman, J.M., McElroy, W.K., 2000. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol. Sci.* 53(2):297–307.
- Couse, J.F., Yates, M.M., Deroo, B.J., Korach, K.S., 2005. Estrogen receptor- $\beta$  is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology* 146(8):3247–3262.
- Cragin, L.A., Kesner, J.S., Bachand, A.M., Barr, D.B., Meadows, J.W., Krieg, E.F., Reif, J.S., 2011. Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. *Environ. Res.* 111(8):1293–1301.
- Cummings, A.M., Rhodes, B.E., Cooper, R.L., 2000. Effect of atrazine on implantation and early pregnancy in 4 strains of rats. *Toxicol. Sci.* 58(1):135–43.
- Das, P.C., McElroy, W.K., Cooper, R.L., 2000. Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro. *Toxicol. Sci.* 56(2):324–331.
- Dasmahapatra, A.K., Trewin, A.L., Hutz, R.J., 2002. Estrous cycle-regulated expression of CYP1B1 mRNA in the rat ovary. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 133(1):127–134.
- de la Casa-Resino, I., Navas, J.M., Fernández-Cruz, M.L., 2014. Chlorotriazines do not activate the aryl hydrocarbon receptor, the oestrogen receptor or the thyroid receptor in in vitro assays. *Altern. Lab. Anim.* 42(1):25–30.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30(4):293–342.

- Diaz, F.J., Wigglesworth, K., Eppig J.J., 2007. Oocytes are required for the preantral granulosa cells to cumulus cell transition in mice. *Dev Biol.* 305(1):300-311.
- Dong, S., Terasaka, S., Kiyama, R., 2011. Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environ. Pollut.* 159(1):212-218.
- Drouineaud, V., Sagot, P., Garrido, C., Logette, E., Deckert, V., Gambert, P., Jimenez, C., Staels, B., Lagrost, L., Masson, D., 2007. Inhibition of progesterone production in human luteinized granulosa cells treated with LXR agonists. *Mol. Hum. Reprod.* 13(6):373-379.
- Dufau, M.L., Liao, M., Zhang, Y., 2010. Participation of signaling pathways in the derepression of luteinizing hormone receptor transcription. *Mol. Cell. Endocrinol.* 314(2):221-227.
- Dunkel, L., Tilly, J.L., Shikone, T., Nishimori, K., Hsueh, A.J.W., 1994. Follicle-stimulating hormone receptor expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factors beta and alpha. *Biol. Reprod.* 50(4):940-948.
- Edson, M.A., Nagaraja, A.K., Matzuk, M.M., 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr. Rev.* 30(6):624-712.
- Eldridge, J.C., Wetzel, L.T., Stevens, J.T., Simpkins, J.W., 1999. The mammary tumor response in triazine-treated female rats: a threshold-mediated interaction with strain and species-specific reproductive senescence. *Steroids* 64(9):672-678.
- Eppig, J.J., Wigglesworth, K., Pendola, F., Hirao, Y., 1997. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol. Reprod.* 56(4):976-984.
- Erickson, G.F., 2009. Follicle growth and development. *Glob. Libr. Women's Med.*
- Fan, H.-Y., Liu, Z., Johnson, P.F., Richards, J.S., 2011. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)- $\alpha$  and - $\beta$  are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol. Endocrinol.* 25(2):253-268.
- Fan, H.-Y., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P.F., Hedrick, S.M., Richards, J.S., 2009. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 324(5929):938-941.

- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Komatsu, T., Morohashi, K.-I., Hayes, T.B., Takayanagi, R., Nawata, H., 2007. Atrazine-induced aromatase expression is sf-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ. Health Perspect.* 115(5):720–727.
- Farr, S.L., Cooper, G.S., Cai, J., Savitz, D.A., Sandler, D.P., 2004. Pesticide use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the agricultural health study. *Am J Epidemiol* *Am. J. Epidemiol.* 160(12):1194–1204.
- Fernández, M., Bianchi, M., Lux-Lantos, V., Libertun, C., 2009. Neonatal exposure to bisphenol A alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environ. Health Perspect.* 117(5):757–762.
- Fernández, M., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., Libertun, C., 2010. Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environ. Health Perspect.* 118(9):1217–1222.
- Foradori, C.D., Hinds, L.R., Hanneman, W.H., Handa, R.J., 2009b. Effects of atrazine and its withdrawal on gonadotropin-releasing hormone neuroendocrine function in the adult female Wistar rat. *81(6):199-1105.*
- Foradori, C.D., Hinds, L.R., Hanneman, W.H., Legare, M.E., Clay, C.M., Handa, R.J., 2009a. Atrazine inhibits pulsatile luteinizing hormone release without altering pituitary sensitivity to a gonadotropin-releasing hormone receptor agonist in female Wistar rats. *Biol. Reprod.* 81(1):40-45.
- Foradori, C.D., Sawhney Coder, P., Tisdell, M., Yi, K.D., Simpkins, J.W., Handa, R.J., Breckenridge, C.B., 2014. The effect of atrazine administered by gavage or in diet on the LH surge and reproductive performance in intact female Sprague-Dawley and Long Evans rats. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 101(3)262–275.
- Foradori, C.D., Zimmerman, A.D., Hinds, L.R., Zuloaga, K.L., Breckenridge, C.B., Handa, R.J., 2013. Atrazine inhibits pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release without altering GnRH messenger RNA or protein levels in the female rat. *88(1):9.*

- Gerona, R.R., Woodruff, T.J., Dickenson, C.A., Pan, J., Schwartz, J.M., Sen, S., Friesen, M.W., Fujimoto, V.Y., Hunt, P.A., 2013. Bisphenol-A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestation umbilical cord serum in a northern and central california population. *Environ. Sci. Technol.* 47(21):12477–12485.
- Glisic, B., Hrubik, J., Fa, S., Dopudj, N., Kovacevic, R., Andric, N., 2016. Transcriptional profiles of glutathione- S -Transferase isoforms, Cyp, and AOE genes in atrazine-exposed zebrafish embryos. *Environ. Toxicol.* 31(2):233–244.
- Gojmerac, T., Kartal, B., Curić, S., Zurić, M., Kusević, S., Cvetnić, Z., 1996. Serum biochemical changes associated with cystic ovarian degeneration in pigs after atrazine treatment. *Toxicol. Lett.* 85(1):9–15.
- Gonzalez-Robayna, I.J., Falender, A.E., Ochsner, S., Firestone, G.L., Richards, J.S., 2000. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 14(8):1283–1300.
- Gore, A.C., Crews, D., Doan, L.L., La Merrill, M., Patisaul, H., Zota, A., 2014. Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs) – a guide for public interest organizations and policy-makers. *Endocrine Society*.
- Grasselli, F., Baratta, L., Baioni, L., Bussolati, S., Ramoni, R., Grolli, S., Basini, G., 2010. Bisphenol A disrupts granulosa cell function. *Domest. Anim. Endocrinol.* 39(1)34–39.
- Gros, T.S., Rauschenberger, R.H., 2006. Triazines. In: *Endocrine Disruption. Biological bases for health effects in wildlife and humans.* (D.O. Norris, J.A. Carr, Eds.) pp. 424-449. Oxford, University Press.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249(22):7130–7139.
- Hampton, R.Y., 2002. Proteolysis and sterol regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:345–78.
- Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., Ando, M., 1999. In vitro metabolism of chlorotriazines: characterization of simazine, atrazine, and propazine metabolism using liver microsomes from rats treated with various cytochrome P450 inducers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156(3):195–205.



- Hannon, P.R., Flaws, J.A., 2015. The Effects of Phthalates on the Ovary. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6:8.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A., 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99(8):5476-80.
- Hirakawa, T., Minegishi, T., Abe, K., Kishi, H., Ibuki, Y., Miyamoto, K., 2000. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression of luteinizing hormone receptors during cell differentiation in cultured granulosa cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 375(2):371-376.
- Hopenhayn-Rich, M. L. Stump, S. R., C., Stump, M.L., Browning, S.R., 2002. Regional assessment of atrazine exposure and incidence of breast and ovarian cancers in Kentucky. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42(1):127-136.
- Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D.C., Threadgill, D.W., Conti, M., 2007. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Mol. Cell. Biol.* 27(5)1914-1924.
- 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.
- Hunzicker-Dunn, M., Maizels, E.T., 2006. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: Branching out from protein kinase A. *Cell. Signal.* 18(9):1351-1359.
- Hunzicker-Dunn, M.E., Lopez-Biladeau, B., Law, N.C., Fiedler, S.E., Carr, D.W., Maizels, E.T., 2012. PKA and GAB2 play central roles in the FSH signaling pathway to PI3K and AKT in ovarian granulosa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(44):E2979-2988.
- Jin, Y., Wang, L., Chen, G., Lin, X., Miao, W., Fu, Z., 2014. Exposure of mice to atrazine and its metabolite diaminochlorotriazine elicits oxidative stress and endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37(2):782-790.
- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40(1):241-258.
- Kaminski, W.E., Piehler, A., Wenzel, J.J., 2006. ABC A-subfamily transporters: Structure, function and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1762(5):510-524.

- Keri, R.A., Ho, S.-M., Hunt, P.A., Knudsen, K.E., Soto, A.M., Prins, G.S., 2007. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* 24(2):240–252.
- Kim, J.W., Peng, N., Rainey, W.E., Carr, B.R., Attia, G.R., 2004. Liver receptor homolog-1 regulates the expression of steroidogenic acute regulatory protein in human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(6):3042–3047.
- Kim, J.Y., Han, E.H., Kim, H.G., Oh, K.N., Kim, S.K., Lee, K.Y., Jeong, H.G., 2010. Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular Leydig cells. *Toxicol. Lett.* 193(2):200–208.
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, A.H., Peng, B., 2000b. Cytogenetic studies of three triazine herbicides: II. In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 471(1-2):107–112.
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, A.H., Zucker, R.M., 2000a. Cytogenetic studies of three triazine herbicides I. In vitro studies. *Mutat. Res.* 465(1-2):53–59.
- Krishnan, A. V, Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132(6):2279–2286.
- Kucka, M., Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., Stojilkovic, S.S., Kovacevic, R., 2012a. Atrazine acts as an endocrine disrupter by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase-4. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 265(1):19–26.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology* 139(10):4252–4263.
- Kurosawa, T., Hiroi, H., Tsutsumi, O., Ishikawa, T., Osuga, Y., Fujiwara, T., Inoue, S., Muramatsu, M., Momoeda, M., Taketani, Y., 2002. The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. *Endocr. J.* 49(4):465–471.
- Kwintkiewicz, J., Nishi, Y., Yanase, T., Giudice, L.C., 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. *Environ. Health Perspect.* 118(3):400–406.

- Kyrou, D., Al-Azemi, M., Papanikolaou, E.G., Donoso, P., Tziomalos, K., Devroey, P., Fatemi, H.M., 2012. The relationship of premature progesterone rise with serum estradiol levels and number of follicles in GnRH antagonist/recombinant FSH-stimulated cycles. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 162(2):165–168.
- Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfrey, N., Casellas, C., Porcher, J.-M., Ait-Aïssa, S., 2006. Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology* 228(1):98–108.
- Lazić, S.D., Šunjka, D.B., Pucarević, M.M., Grahovac, N.L., Vuković, S.M., Indić, D. V, Jakšić, S.P., 2013. Monitoring atrazina i njegovih metabolita u podzemnim vodama Republike Srbije. *Hem. Ind.* 67(3):513–523.
- LeBaron, H.M., McFarland, J.E., Burnside, O., 2008. *The triazine herbicides : 50 years revolutionizing agriculture.* San Diego, USA: Elsevier.
- Lee, S.G., Kim, J.Y., Chung, J.-Y., Kim, Y.-J., Park, J.-E., Oh, S., Yoon, Y.-D., Yoo, K.S., Yoo, Y.H., Kim, J.-M., 2013. Bisphenol A exposure during adulthood causes augmentation of follicular atresia and luteal regression by decreasing 17 $\beta$ -estradiol synthesis via downregulation of aromatase in rat ovary. *Environ. Health Perspect.* 121(6):663–669.
- Lee, Y.-K., Choi, Y.-H., Chua, S., Park, Y.J., Moore, D.D., 2006. Phosphorylation of the hinge domain of the nuclear hormone receptor LRH-1 stimulates transactivation. *J. Biol. Chem.* 281(12):7850–7855.
- Li, X., Zhang, S., Safe, S., 2006. Activation of kinase pathways in MCF-7 cells by 17 $\beta$ -estradiol and structurally diverse estrogenic compounds. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 98(2-3):122–132.
- Louvet, J.P., Vaitukaitis, J.L., 1976. Induction of follicle-stimulating hormone (FSH) receptors in rat ovaries by estrogen priming. *Endocrinology* 99(3):758–764.
- Maggiolini, M., Picard, D., 2010. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J. Endocrinol.* 204(2):105–14.
- Mansur, A., Israel, A., Combelles, C.M.H., Adir, M., Racowsky, C., Hauser, R., Baccarelli, A.A., Machtinger, R., 2017. Bisphenol-A exposure and gene expression in human luteinized membrana granulosa cells *in vitro*. *Hum. Reprod.* 32(2):409–417.
- Markey, C.M., Michaelson, C.L., Veson, E.C., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2001. The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 109(1):55–60.

- Matthews, J.B., Twomey, K., Zacharewski, T.R., 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14(2):149–57.
- McGee, E.A., Hsueh, A.J.W., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21(2):200–214.
- Melzer, D., Rice, N.E., Lewis, C., Henley, W.E., Galloway, T.S., 2010. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 5(1):e8673.
- Menon, K.M.J., Menon, B., 2012. Structure, function and regulation of gonadotropin receptors – A perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356(1-2):88–97.
- Miao, M., Yuan, W., Zhu, G., He, X., Li, D.-K., 2011. In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring. *Reprod. Toxicol.* 32(1):64–68.
- Michałowicz, J., 2014. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37(2):738–758.
- Mikołajewska, K., Stragierowicz, J., Gromadzińska, J., 2015. Bisphenol A – Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 28(2):209-241.
- Miller, W.L., Bose, H.S., 2011. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J. Lipid Res.* 52(12):2111–2135.
- Milošević, N., Jakšić, V., Sudji, J., Vuković, B., Ičin, T., Milić, N., Medić Stojanoska, M., 2016. Possible influence of the environmental pollutant bisphenol A on the cardiometabolic risk factors. *Int. J. Environ. Health Res.* 27(1):1–16.
- Monje, L., Varayoud, J., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E.H., Ramos, J.G., 2010. Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nuclei controlling estrous cyclicity. *Reprod. Toxicol.* 30(4):625–634.
- Murphy, M.B., Hecker, M., Coady, K.K., Tompsett, A.R., Higley, E.B., Jones, P.D., Du Preez, L.H., Solomon, K.R., Carr, J.A., Smith, E.E., Kendall, R.J., Van Der Kraak, G., Giesy, J.P., 2006. Plasma steroid hormone concentrations, aromatase activities and GSI in ranid frogs collected from agricultural and non-agricultural sites in Michigan (USA). *Aquat. Toxicol.* 77(2):153–166.

- Nah, W.H., Park, M.J., Gye, M.C., 2011. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 38(2):75–81.
- Narotsky, M.G., Best, D.S., Guidici, D.L., Cooper, R.L., 2001. Strain comparisons of atrazine-induced pregnancy loss in the rat. *Reprod. Toxicol.* 15(1):61–9.
- Niehof, M., Manns, M.P., Trautwein, C., 1997. CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17(7):3600–3613.
- Otsuka, F., Moore, R.K., Shimasaki, S., 2001. Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J. Biol. Chem.* 276(35):32889–32895.
- Ozçakir, H.T., Levi, R., Tavmergen, E., Göker, E.N.T., 2004. Premature luteinization defined as progesterone estradiol ratio >1 on hCG administration day seems to adversely affect clinical outcome in long gonadotropin-releasing hormone agonist cycles. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 30(2):100–4.
- Pangas, S.A., Li, X., Robertson, E.J., Matzuk, M.M., 2006. Premature luteinization and cumulus cell defects in ovarian-specific Smad4 knockout mice. *Mol. Endocrinol.* 20(6): 1406–1422.
- Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L., Conti, M., 2008. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Mol. Endocrinol.* 22(4):924–936.
- Pant, J., Deshpande, S.B., 2012. Acute toxicity of bisphenol A in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 50(6): 425–9.
- Park, J.Y., Richard, F., Chun, S.Y., Park, J.H., Law, E., Horner, K., Jin, S.L.C., Conti, M., 2003. Phosphodiesterase regulation is critical for the differentiation and pattern of gene expression in granulosa cells of the ovarian follicle. *Mol. Endocrinol.* 17(6):1117–1130.
- Park, J.Y., Su, Y.Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S.L.C., Conti, M., 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303(5658):682–684.
- Park, S.E., Lim, S.R., Choi, H., Bae, J., 2016. Triazine herbicides inhibit relaxin signaling and disrupt nitric oxide homeostasis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 307:10–18.
- Pathak, R.K., Dikshit, A.K., 2012. Atrazine and human health. *Int. J. Ecosyst.* 1(1):14–23.

- Peretz, J., Flaws, J.A., 2013. Bisphenol A down-regulates rate-limiting Cyp11a1 to acutely inhibit steroidogenesis in cultured mouse antral follicles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 271(2):249–256.
- Peretz, J., Gupta, R.K., Singh, J., Hernandez-Ochoa, I., Flaws, J.A., 2011. Bisphenol A impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway. *Toxicol. Sci.* 119(1):209–217.
- Podda, M.V., Deriu, F., Solinas, A., Piera Demontis, M., Varoni, M.V., Spissu, A., Anania, V., Tolu, E., 1997. Effect of atrazine administration on spontaneous and evoked cerebellar activity in the rat. *Pharmacol.* 36(3):199-202.
- Pogrmic, K., Fa, S., Dakic, V., Kaisarevic, S., Kovacevic, R., 2009. Atrazine oral exposure of peripubertal male rats downregulates steroidogenesis gene expression in Leydig cells. *Toxicol. Sci.* 111(1):189–197.
- Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., Dakic, V., Kaisarevic, S., Kovacevic, R., 2010. Upregulation of peripubertal rat leydig cell steroidogenesis following 24 h in vitro and in vivo exposure to atrazine. *Toxicol. Sci.* 118(1)52–60.
- Pogrmic-Majkic, K., Kaisarevic, S., Fa, S., Dakic, V., Glisic, B., Hrubik, J., Kovacevic, R., 2012. Atrazine effects on antioxidant status and xenobiotic metabolizing enzymes after oral administration in peripubertal male rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34(2):495–501.
- Pupo, M., Maggiolini, M., Musti, A.M., 2016. GPER mediates non-genomic effects of estrogen. *1366*:471–488.
- Puttabyatappa, M., VandeVoort, C.A., Chaffin, C.L., 2010. hCG-induced down-regulation of PPAR $\gamma$  and Liver X Receptors promotes periovulatory progesterone synthesis by macaque granulosa cells. *Endocrinology* 151(12):5865–5872.
- Quignot, N., Arnaud, M., Robidel, F., Lecomte, A., Tournier, M., Cren-Olivé, C., Barouki, R., Lemazurier, E., 2012a. Characterization of endocrine-disrupting chemicals based on hormonal balance disruption in male and female adult rats. *Reprod. Toxicol.* 33(3):339–352.
- Quignot, N., Desmots, S., Barouki, R., Lemazurier, E., 2012b. A comparison of two human cell lines and two rat gonadal cell primary cultures as in vitro screening tools for aromatase modulation. *Toxicol. Vitro.* 26(1):107–118.

- Quignot, N., Tournier, M., Pouech, C., Cren-Olivé, C., Barouki, R., Lemazurier, E., 2012c. Quantification of steroids and endocrine disrupting chemicals in rat ovaries by LC-MS/MS for reproductive toxicology assessment. *Anal. Bioanal. Chem.* 403(6):1629–1640.
- Rae, M.C., Midgley, A.R., Richards, J.S., 1978. Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. *Cell* 14(1):71–78.
- Rayner, J.L., Enoch, R.R., Fenton, S.E., 2005. Adverse effects of prenatal exposure to atrazine during a critical period of mammary gland growth. *Toxicol. Sci.* 87(1):255–266.
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., vom Saal, F.S., 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol.* 24(2):199–224.
- Rinsky, J.L., Hopenhayn, C., Golla, V., Browning, S., Bush, H.M., 2012. Atrazine exposure in public drinking water and preterm birth. *Public Health Rep.* 127(1):72–80.
- Roberge, M., Hakk, H., Larsen, G., 2004. Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicol. Lett.* 154(1-2):61–68.
- Robker, R., Akison, L.K., Russell, D.L., 2009. Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression. *Nucl. Recept. Signal.* 7:e012.
- Rodríguez, V.M., Limón-Pacheco, J.H., Mendoza-Trejo, M.S., González-Gallardo, A., Hernández-Plata, I., Giordano, M., 2013. Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. *Neurotoxicology* 34:82–94.
- Roos, P.H., Tschirbs, S., Welge, P., Hack, A., Theegarten, D., Mogilevski, G., Wilhelm, M., 2002. Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Arch. Toxicol.* 76(5-6):326–34.
- Rusiecki, J.A., De Roos, A., Lee, W.J., Dosemeci, M., Lubin, J.H., Hoppin, J.A., Blair, A., Alavanja, M.C.R., 2004. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to atrazine in the Agricultural Health Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 96(18):1375–1382.
- Russell, D.L., Robker, R.L., 2007. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *13(3):289–312.*

- Sajiki, J., Takahashi, K., Yonekubo, J., 1999. Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 736(1-2):255–261.
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., van den Berg, M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182(1):44–54.
- Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P., van den Berg, M., 2000. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54(1):121–127.
- Sass, J.B., Colangelo, A., 2006. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *Int. J. Occup. Environ. Health* 12(3):260–267.
- Sathiakumar, N., MacLennan, P.A., Mandel, J., Delzell, E., 2011. A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer. *Crit. Rev. Toxicol.* 41 Suppl 1:1–34.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9(7):671–675.
- Shankar, A., Teppala, S., 2011. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96(12):3822–3826.
- Shibayama, H., Kotera, T., Shinoda, Y., Hanada, T., Kajihara, T., Ueda, M., Tamura, H., Ishibashi, S., Yamashita, Y., Ochi, S., 2009. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 14) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of atrazine in female rats. *J. Toxicol. Sci.* 34 Suppl 1: SP147-155.
- Shimada, M., Yamashita, Y., 2011. The key signaling cascades in granulosa cells during follicular development and ovulation process. *J. Mamm. Ova Res.* 28:25–31.
- Shimada, T., Sugie, A., Shindo, M., Nakajima, T., Azuma, E., Hashimoto, M., Inoue, K., 2003. Tissue-specific induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in engineered C57BL/6J mice of arylhydrocarbon receptor gene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187(1):1-10.
- Simoneau, C., Valzacchi, S., Morkunas, V., Van den Eede, L., 2011. Comparison of migration from polyethersulphone and polycarbonate baby bottles. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 28(12):1763–1768.



- Skakkebaek, N.E., Toppari, J., Söder, O., Gordon, C.M., Divall, S., Draznin, M., 2011. The exposure of fetuses and children to endocrine disrupting chemicals: a European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) and Pediatric Endocrine Society (PES) Call to Action Statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96(10):3056–3058.
- Smerdova, L., Smerdova, J., Kabatkova, M., Kohoutek, J., Blažek, D., Machala, M., Vondraček, J., 2014. Upregulation of CYP1B1 expression by inflammatory cytokines is mediated by the p38 MAP kinase signal transduction pathway. *Carcinogenesis.* 35(11):2534-2543.
- Solomon, K.R., Giesy, J.P., La Point, T.W., Giddings, J.M., Richards, R.P., 2013. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 32(1):10–11.
- Soto, A.M., Brisken, C., Schaeberle, C., Sonnenschein, C., 2013. Does cancer start in the womb? Altered mammary gland development and predisposition to breast cancer due to in utero exposure to endocrine disruptors. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18(2):199–208.
- Sterneck, E., Tessarollo, L., Johnson, P.F., 1997. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev.* 11(17):2153–2162.
- Stocco, C., 2008. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *73(5):473-487.*
- Stoker, T.E., Guidici, D.L., Laws, S.C., Cooper, R.L., 2002. The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male wistar rat. *Toxicol. Sci.* 67(2):198–206.
- Stoker, T.E., Laws, S.C., Guidici, D.L., Cooper, R.L., 2000. The effect of atrazine on puberty in male wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *Toxicol. Sci.* 58(1):50–59.
- Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S., Makino, T., Suzumori, K., 2005. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 20(8):2325–2329.
- Suzawa, M., Ingraham, H.A., 2008. The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells. *PLoS One* 3(5):e2117.
- Swedenborg, E., Rüegg, J., Mäkelä, S., Pongratz, I., 2009. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *J. Mol. Endocrinol.* 43(1):1–10.

- Takao, T., Nanamiya, W., Nagano, I., Asaba, K., Kawabata, K., Hashimoto, K., 1999. Exposure with the environmental estrogen bisphenol A disrupts the male reproductive tract in young mice. *Life Sci.* 65(22):2351–2357.
- Taketa, Y., Yoshida, M., Inoue, K., Takahashi, M., Sakamoto, Y., Watanabe, G., Taya, K., Yamate, J., Nishikawa, A., 2011. Differential stimulation pathways of progesterone secretion from newly formed corpora lutea in rats treated with ethylene glycol monomethyl ether, sulphuride, or atrazine. *Toxicol. Sci.* 121(2):267–278.
- Tan, W., Huang, H., Wang, Y., Wong, T.Y., Wang, C.C., Leung, L.K., 2013. Bisphenol A differentially activates protein kinase C isoforms in murine placental tissue. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 269(2):163–168.
- Tarapore, P., Ying, J., Ouyang, B., Burke, B., Bracken, B., Ho, S.-M., 2014. Exposure to bisphenol A correlates with early-onset prostate cancer and promotes centrosome amplification and anchorage-independent growth in vitro. *PLoS One* 9(3):e90332.
- Telfer, E., Gosden, R.G., Faddy, M.J., 1991. Impact of exogenous progesterone on ovarian follicular dynamics and function in mice. *J. Reprod. Fertil.* 93(2):263–269.
- Thomas, P., Dong, J., 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102(1-5):175–179.
- Thorne, A.M., Jackson, T.A., Willis, V.C., Bradford, A.P., 2013. Protein kinase C  $\alpha$  modulates estrogen-receptor-dependent transcription and proliferation in endometrial cancer cells. *Obstet. Gynecol. Int.* 2013:537479.
- Tillitt, D.E., Papoulias, D.M., Whyte, J.J., Richter, C.A., 2010. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 99(2):149–159.
- Tinfo, N.S., Hotchkiss, M.G., Buckalew, A.R., Zorrilla, L.M., Cooper, R.L., Laws, S.C., 2011. Understanding the effects of atrazine on steroidogenesis in rat granulosa and H295R adrenal cortical carcinoma cells. *Reprod. Toxicol.* 31(2):184–193.
- Toxicological Profile for Atrazine, 2003. ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry Tox FAQs Chemical Fact Sheets, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp153c2.pdf>

- Trasande, L., Attina, T.M., Blustein, J., 2012. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA* 308(11):1113-11121.
- Turner, P. V, Brabb, T., Pekow, C., Vasbinder, M.A., 2011. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 50(5):600–613.
- U.S. EPA, 2001. Revised preliminary human health risk assessment: atrazine. Memorandum from Catherine Eiden, Health Effects Division. Case #0062. [http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/atrazine/revsd\\_pra.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/atrazine/revsd_pra.pdf)
- U.S. EPA, 2012. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories (EPA 822-S 12001). <https://www.epa.gov/sites/production/files/201509/documents/dwstandards2012.pdf>
- U.S. Geological Survey, 2015. Annual Pesticide Use Maps: 1992–2013. Pesticide National Synthesis Project. <https://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps/>.
- Val, P., Lefrançois-Martinez, A.-M., Veyssi re, G., Martinez, A., Tamura, M., Fang, Z., Suzuki, T., Sasano, H., Bulun, S., Jaffray, E., 2003. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl. Recept.* 1(1):8.
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W. V, 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 24(2):139–77.
- Vezzosi, D., Bertherat, J., 2011. Phosphodiesterases in endocrine physiology and disease. *Eur. J. Endocrinol.* 165(2):177–188.
- Vogel, C.F.A., Sciallo, E., Park, S., Liedtke, C., Trautwein, C., Matsumura, F., 2004. Dioxin increases C/EBPbeta transcription by activating cAMP/protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 279(10):8886–8894.
- V lkel, W., Colnot, T., Csan dy, G.A., Filser, J.G., Dekant, W., 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* 15(10):1281–1287.
- Wagner, U., Schlebusch, H., Ven, K. van der, Ven, H. van der, Diedrich, K., Krebs, D., 1990. Detection of phosphate ester pesticides and the triazine herbicide atrazine in human milk, cervical mucus, follicular and sperm fluid. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 337(1):77–78.

- Wang, T., Li, M., Chen, B., Xu, M., Xu, Y., Huang, Y., Lu, J., Chen, Y., Wang, W., Li, X., Liu, Y., Bi, Y., Lai, S., Ning, G., 2012. Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97(2):E223-7.
- Watson, C.S., Jeng, Y.-J., Hu, G., Wozniak, A., Bulayeva, N., Guptarak, J., 2012. Estrogen- and xenoestrogen-induced ERK signaling in pituitary tumor cells involves estrogen receptor- $\alpha$  interactions with G protein- $\alpha$ i and caveolin I. *Steroids* 77(5):424-432.
- Wayne, C.M., Fan, H.-Y., Cheng, X., Richards, J.S., 2007. Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol. Endocrinol.* 21(8):1940-1957.
- Weber, L.-W., Boll, M., Stampfl, A., 2004. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J. Gastroenterol.* 10(21):3081-7.
- Welshons, W. V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., vom Saal, F.S., 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ. Health Perspect.* 111(8):994-1006.
- Wetzel, L.T., Luempert, L.G., Breckenridge, C.B., Tisdell, M.O., Stevens, J.T., Thakur, A.K., Extrom, P.J., Eldridge, J.C., 1994. Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 43(2):169-182.
- Xi, W., Lee, C.K.F., Yeung, W.S.B., Giesy, J.P., Wong, M.H., Zhang, X., Hecker, M., Wong, C.K.C., 2011. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod. Toxicol.* 31(4):409-417.
- Xing, H., Zhang, Z., Yao, H., Liu, T., Wang, L., Xu, S., Li, S., 2014. Effects of atrazine and chlorpyrifos on cytochrome P450 in common carp liver. *Chemosphere* 104:244-250.
- Yang, M., Ryu, J.-H., Jeon, R., Kang, D., Yoo, K.-Y., 2009. Effects of bisphenol A on breast cancer and its risk factors. *Arch. Toxicol.* 83(3):281-285.
- Yang, O., Kim, H.L., Weon, J.-I., Seo, Y.R., 2015. Endocrine-disrupting chemicals: review of toxicological mechanisms using molecular pathway analysis. *J. cancer Prev.* 20(1):12-24.

- Ye, X., Pierik, F.H., Angerer, J., Meltzer, H.M., Jaddoe, V.W.V., Tiemeier, H., Hoppin, J.A., Longnecker, M.P., 2009. Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212(5):481–491.
- Zachow, R., Uzumcu, M., 2006. The methoxychlor metabolite, 2,2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane, inhibits steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Reprod. Toxicol.* 22(4):659–665.
- Zeleznik, A.J., Saxena, D., Little-Ihrig, L., 2003. Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 144(9):3985–3994.
- Zheng, W., Brake, P.B., Bhattacharyya, K.K., Zhang, L., Zhao, D., Jefcoate, C.R., 2003. Cell selective cAMP induction of rat CYP1B1 in adrenal and testis cells. Identification of a novel cAMP-responsive far upstream enhancer and a second Ah receptor-dependent mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 416:53–67.
- Zhou, W., Liu, J., Liao, L., Han, S., Liu, J., 2008. Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 283(1-2):12–8.
- Ziv-Gal, A., Craig, Z.R., Wang, W., Flaws, J.A., 2013. Bisphenol A inhibits cultured mouse ovarian follicle growth partially via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Reprod. Toxicol.* 42:58–67.

## BIOGRAFIJA

Dragana Samardžija Nenadov je rođena 26. avgusta 1987. godine u Novom Sadu gde je završila osnovnu i srednju školu. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog-molekularni biolog, upisuje 2006., a završava 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,60. Master studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog-master, molekularni biolog završava 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,94. Master rad pod naslovom: „Supresivni efekat atrazina na ekspresiju ovulatornih gena u granulosa ćelijama u in vitro uslovima“ uradila je pod mentorstvom prof. dr Radmile Kovačević.

Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija upisala je 2011. godine. Od 2012. do 2013. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a od 2013. godine je zaposlena na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, u zvanju istraživač-saradnik. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je pod mentorstvom doc. dr Nebojše Andrića, u okviru projekta „Ksenobiotici sa hormonskom aktivnošću: reproduktivni, metabolički, razvojni odgovori i mehanizam dejstva kod odabranih model organizama i ćelijskih linija“ (br. projekta 173037), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Radmile Kovačević, profesora emeritusa, i projekta „EcoSignal: Environmental Signaling and Ovarian Diseases Susceptibility“, (br. projekta 321745), MarieCurie CIG (FP7-2012), pod rukovodstvom doc. dr Nebojše Andrića.

Dragana Samardžija Nenadov je do sada objavila 8 radova u časopisima međunarodnog značaja (1 kao prvi autor) i veći broj saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Драгана Д. Самарџија Ненадов \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ Б3029/2011 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај атразина и бисфенола А на функцију гранулоза ћелија оваријума пацова”

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Драгана Д. Самарџија Ненадов \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3029/2011 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија, Анимална и хумана физиологија \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Утицај атразина и бисфенола А на функцију гранулоза  
ћелија оваријума пацова \_\_\_\_\_

Ментор

\_\_\_\_\_ доц. др Небојша Андрић и проф. др Небојша Јаснић \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_

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:

Утицај атразина и бисфенола А на функцију гранулоза ћелија оваријума пацова

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (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 - Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.