

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Isidora M. Starovlah

**Mitohondrijalna biogeneza kao mehanizam  
adaptacije specifičnih tipova ćelija reproduktivne  
osovine**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Isidora M. Starovlah

**Mitochondrial biogenesis as a mechanism of  
adaptation of specific cell types of the  
reproductive axis**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

**MENTORI:**

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

dr Bato Korać, vanredni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

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

dr Aleksandra Korać, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Sonja Kaišarević, redovni profesor  
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

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

Datum odbrane:

## **Zahvalnica**

*Hvala mojoj mentorki, prof. dr Silvani Andrić, na prilici i ukazanom poverenju da ovu doktorsku disertaciju uradim u jednom novom i izazovnom "okruženju". Hvala na svojoj pomoći, savetima i razumevanju. Neka sreća nastavi da prati hrabre.*

*Hvala prof. dr Tatjani Kostić na svim savetima, sugestijama i idejama. Hvala na ukazanom poverenju da učestvujem u gotovo svim ogledima Laboratorije za hronobiologiju i starenje.*

*Hvala prof. dr Bati Koraću na pomoći i savetima.*

*Hvala svim bivšim i sadašnjim kolegama katedre za Fiziologiju životinja na savetima i lakim dogovorima.*

*Hvala svim zaposlenima na Departmanu za biologiju i ekologiju na saradnji.*

*Hvala kolegama iz Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu na svojoj pomoći, pozajmicama i lepom druženju.*

*Hvala svim mojim prijateljima na velikom razumevanju i podršci.*

*Veliko hvala mojoj porodici, mami Biljani i tati Milutinu, sestri Teodori i bratu Stefanu na podršci, razumevanju i ljubavi. Hvala vam što ste uvek verovali u mene i bili mi uvek sigurna luka.*

*Veliko hvala Strahinji, na veri, podršci, pomoći, razumevanju i ljubavi. Ovu doktorsku disertaciju posvećujem Strahinji.*

*Isidora*



## **Mitochondrijalna biogeneza kao mehanizam adaptacije specifičnih tipova ćelija reproduktivne osovine**

**Sažetak:** U potrazi za ulogom markera mitohondrijalne dinamike u adaptaciji ćelija reproduktivne osovine, sa posebnim fokusom na spermatozoide, dizajnirani su različiti *in vivo* pristupi koji mimikriraju situacije vezane za poremećenu homeostazu cirkulišućih androgena (stres, hipogonadizam) u adultnoj humanoj populaciji. Rezultati pokazuju da ponavljani psihofizički stres povećava transkripciju 82% ispitivanih markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti, kao i 73% transkripata za markere cAMP i MAPK signalinga koji regulišu homeostazu spermatozoida i mitohondrijalnu dinamiku/funkcionalnost u spermatozoidima. Oporavak organizma od akutnog psihofizičkog stresa dovodi do promene transkripcije 91% markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti, kao i 91% markera cAMP i MAPK signalinga. Ponavljani psihofizički stres primenjen u različitim vremenskim tačkama u toku dana menja transkripciju 91% markera mitohondrijalne dinamike/funkcionalnosti, kao i 86% transkripata za elemente cAMP i MAPK signalinga. Hipogonadizam menja transkripciju 61% markera mitobiogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija, kao i 59% transkripata za elemente cAMP i MAPK signalinga. Starenje u kombinaciji sa Sildenafilom menja ekspresiju 56% markera mitobiogeneze, fuzije/arhitekture i mitofunkcionalnosti, i ekspresiju 29% transkripata za elemente cAMP i MAPK signalinga. Starenje u kombinaciji sa Metforminom menja ekspresiju 75% markera mitobiogeneze, fuzije/arhitekture i mitofunkcionalnosti, i ekspresiju 77% markera cAMP i MAPK signalinga. Fiziološki značaj se ogleda u promeni funkcionalnosti spermatozoida. Sumirano, promena ekspresije markera mitohondrijalne dinamike može biti jedan od adaptacionih mehanizma spermatozoida za očuvanje funkcionalnosti u uslovima poremećene homeostaze cirkulišućih androgena.

**Ključne reči:** mitohondrijalna dinamika, mitohondrijalna biogeneza, mitofuzija, mitofisija, mitofagija, cirkulišući androgeni, spermatozoidi, Lajdigove ćelije, hipotalamus, adenohipofiza.

**Naučna oblast:** biologija

**Uža naučna oblast:** fiziologija životinja

## **Mitochondrial biogenesis as a mechanism of adaptation of specific cell types of the reproductive axis**

**Abstract:** In search of the role of mitochondrial dynamics markers in the adaptation of reproductive axis cells, with a special focus on spermatozoa, various *in vivo* approaches have been designed related to impaired circulating androgen homeostasis (stress, hypogonadism) that mimic situations in the adult human population. The results show that repeated psychophysical stress increases the transcription of 82% of the examined markers for the mitochondrial dynamics and functionality, as well as 73% of transcripts for markers of cAMP and MAPK signaling that regulate spermatozoa homeostasis and mitochondrial dynamics/functionality in spermatozoa. Recovery of the organism from acute psychophysical stress leads to a change in the transcription of 91% of mitochondrial dynamics and functionality markers, as well as 91% of markers of cAMP and MAPK signaling. Repeated psychophysical stress applied at different time points during the day alters 91% of transcripts of mitochondrial dynamics/functionality markers, as well as 86% of transcripts for cAMP and MAPK signaling elements. Hypogonadism alters the transcription of 61% of mitobiogenesis, fusion/architecture markers, and mitochondrial functionality markers, as well as 59% of transcripts for cAMP and MAPK signaling elements. Ageing in combination with Sildenafil alters the expression of 56% of mitobiogenesis, fusion/architecture and mitofunctionality markers, as well as the expression of 29% of transcripts for cAMP and MAPK signaling elements. Ageing in combination with Metformin alters the expression of 75% of mitobiogenesis, fusion/architecture, and mitofunctionality markers, and the expression of 77% of cAMP and MAPK signaling markers. Physiological significance is reflected in the changes in spermatozoa function. In summary, the change in the expression of mitochondrial dynamics markers may be one of the adaptive mechanisms of spermatozoa for the preservation of the functionality in the conditions of disturbed homeostasis of circulating androgens.

**Key words:** mitochondrial dynamics, mitochondrial biogenesis, mitofusion, mitofision, mitophagy, circulating androgens, spermatozoa, Leydig cells, hypothalamus, adenohipophys.

**Scientific field:** biology.

**Scientific subfield:** animal physiology.

## Spisak radova u kojima je prikazan deo rezultata doktorske disertacije

- (1) Starovlah, I.M., Sava, R.M., Marinovic, M.A., Kostic, T.S., Andric, S.A. (2017) Psychophysical stress disturbs expression of mitochondrial biogenesis markers in hypothalamus and adenohipophysis. *Biol Serbica* 39: 43–51. <https://doi.org/10.5281/zenodo.827157>. M51
- (2) Starovlah, I.M., Radovic Pletikosic, S.M., Kostic, T.S., Andric, S.A. (2020) Reduced spermatozoa functionality during stress is the consequence of adrenergic-mediated disturbance of mitochondrial dynamics markers. *Sci Rep* 10: 16813. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73630-y>. M21, IF=4.380
- (3) Starovlah, I.M., Radovic Pletikosic, S.M., Kostic, T.S., Andric, S.A. (2021) Mitochondrial dynamics markers and related signaling molecules are important regulators of spermatozoa number and Functionality. *Int J Mol Sci* 22, 5693. <https://doi.org/10.3390/ijms22115693>. M21, IF=5.924
- (4) Starovlah, I.M., Radovic Pletikosic, S.M., Tomanic, T.M., Medar, M.L.J., Kostic, T.S., Andric, S.A. (2022) Spermatozoal mitochondrial dynamics markers and other functionality-related signaling molecules exert circadian-like response to repeated stress of whole organism. *Cells* 11, 993. <https://doi.org/10.3390/cells11060993>. M21, IF=6.600
- (5) Starovlah, I.M., Radovic Pletikosic, S.M., Tomanic, T.M., Medar, M.L.J., Kostic, T.S., Andric, S.A. (2022) Spermatozoa develop molecular machinery to recover from the acute stress. - Rad je u procesu recenzije (*Front. Endocrinol*).
- (6) Starovlah, I.M., Radovic Pletikosic, S.M., Tomanic, T.M., Medar, M.L.J., Kostic, T.S., Andric, S.A. (2022) Profiles of spermatozoal mitochondrial dynamics markers and other functionality-related signaling molecules are disturbed in hypogonadism and modified with Metformin and Viagra - Rad je u pripremi.

## Spisak projekata kojima je finansirana izrada doktorske disertacije

- (1) ON173057 i Ev.br. 451-03-9/2021-14/200125 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: “*Molekularni mehanizmi i putevi signalne transdukcije uključeni u regulaciju steroidogeneze i adaptaciju Leydig-ovih ćelija na poremećenu homeostazu*“ (rukovodilac: prof. dr Tatjana Kostić).
- (2) APV2708 Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj Vojvodine: „*Da li način života može uzrokovati smanjenje muške fertilitnosti?*“ (rukovodilac: prof. dr Tatjana Kostić).
- (3) APV2856 Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj Vojvodine: “*Da li su reproduktivni hormoni karika koja povezuje stres, metabolički sindrom i starenje*“ (rukovodilac: prof. dr Silvana Andrić).
- (4) APV970 Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj Vojvodine: “*Signalni putevi i molekularni mehanizmi uključeni u održavanje homeostaze seksualnih steroida*” (rukovodilac: prof. dr Silvana Andrić).
- (5) SCOPES #IZ73Z0-128070 Švajcarske nacionalne fondacije: “*Investigating the role of the insulin receptor family in regulating testicular steroidogenesis*” (rukovodioci: prof. dr Serge Nef, prof. dr Silvana Andrić).
- (6) EUTech4PoC Projekat Evropske Unije: “*Mito-Fert-Signature: a new prognostic/diagnostic tool to detect male (in) fertility using mitochondrial markers in spermatozoa*” (rukovodilac: prof. dr Silvana Andrić).

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature.....	3
2.1. Funkcionalna organizacija hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine.....	4
2.2. Funkcionalna organizacija hipotalamo-hipofizno-gonadalne osovine.....	6
2.3. Spermatogeneza, građa i funkcija spermatozoida.....	9
2.3.1. Kapacitacija i akrozomska reakcija spermatozoida.....	11
2.3.2. Regulacija kontrolnih tačaka spermatogeneze testosteronom i androgenim receptorom .....	14
2.4. Mitohondrije i njihov značaj u spermatozoidima.....	14
2.4.1. Mitohondrijalna biogeneza – transkripcioni faktori uključeni u mitohondrijalnu biogenezu kao i molekularni putevi koji je regulišu.....	15
2.4.2. Mitohondrijalna fuzija i fisija - transkripcion faktori uključeni u mitofuziju i mitofisiju kao i molekularni putevi koji ih regulišu.....	17
2.4.3. Mitohondrijalna autofagija - transkripcioni faktori uključeni u mitofagiju kao i molekularni putevi koji je regulišu.....	20
2.4.4. Mitohondrije u spermatozoidima.....	21
2.4.5. Signalni putevi uključeni u regulaciju mitohondrijalne dinamike kao i funkcionalnosti spermatozoida – cAMP i MAPK signalni putevi.....	23
3. Ciljevi istraživanja.....	25
4. Materijal i metode.....	29
4.1. Hemikalije.....	30
4.2. Eksperimentalne životinje.....	32
4.3. Eksperimentalni modeli koji mimikriraju situacije u adultnoj humanoj populaciji.....	32
4.3.1. Prirodni eksperimentalni <i>in vivo</i> modeli.....	33
4.3.1.1. Model psihofizičkog stresa.....	33
4.3.1.2. Model akutnog psihofizičkog stresa sa periodom oporavka.....	35
4.3.1.3. Model ponavljalog psihofizičkog stresa u različitim vremenskim tačkama u toku dana.....	36
4.3.1.4. Model starenja.....	37
4.3.2. Eksperimentalni <i>in vivo</i> modeli sa farmakološkom intervencijom.....	38
4.3.2.1. Hipogonadotropni hipogonadizam.....	38
4.3.2.2. Starenje u kombinaciji sa oralnom primenom Sildenafil (Viagra®).....	39
4.3.2.3. Starenje u kombinaciji sa oralnom primenom Metformina.....	41

4.3.3. Eksperimentalni <i>in vivo</i> modeli zasnovani na funkcionalnoj genomici .....	42
4.3.4. Eksperimentalni <i>ex vivo</i> modeli.....	43
4.3.4.1. Manipulacija signalnih puteva <i>ex vivo</i> primenom hormona stresa, adrenalina i hidrokortizona, samih ili u kombinaciji sa blokatorima $\alpha$ 1- i $\beta$ -adrenergičkih receptora, kao i blokatora glukokortikoidnih receptora.....	44
4.3.4.2. Manipulacija signalnih puteva <i>ex vivo</i> primenom Sildenafil (Viagra).....	46
4.3.4.3. Manipulacija signalnih puteva <i>ex vivo</i> primenom Metformina, leka za dijabetes tip 2. ....	47
4.4. Genotipizacija miševa, klasična PCR reakcija i gel elektroforeza.....	48
4.5. Određivanje koncentracije hormona u serumu.....	48
4.6. Priprema primarne kulture Lajdigovih ćelija .....	49
4.7. Izolacija spermatozoida.....	50
4.8. Kapacitacija, akrozomska reakcija i priprema trajnih mikroskopskih preparata spermatozoida.....	50
4.9. Imunofluorescentna analiza spermatozoida .....	51
4.10. Određivanje nivoa cikličnog guanozin monofosfata u uzorcima tkiva hipotalamusa, adenohipofize i nadbubrega, kao i u uzorcima spermatozoida kaudalnog epididimisa .....	53
4.11. Određivanje nivoa nitrata u ćelijskom medijumu i talogu spermatozoida .....	53
4.12. Određivanje koncentracije ATP-a u spermatozoidima .....	54
4.13. Relativna kvantifikacija ekspresije transkriptata u primarnim kulturama Lajdigovih ćelija i spermatozoida, kao i u primarnim kulturama tkiva hipotalamusa, adenohipofize i nadbubrega .....	54
4.13.1. Izolacija ukupne RNK i tretman DNazom I. ....	54
4.13.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) u reakciji reverzne transkripcije .....	55
4.13.3. Relativna kvantifikacija ekspresije transkripta lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (real-time PCR) .....	55
4.14. Kvantifikacija ekspresije proteina u uzorcima primarne kulture tkiva hipotalamusa, adenohipofize, nadbubrega, kao i u primarnoj ćelijskoj kulturi spermatozoida. ....	61
4.14.1. Izolacija i kvantifikacija koncentracije proteina.....	61
4.14.2. Razdvajanje ukupnih proteina SDS-PAGE elektroforezom i transfer razdvojenih proteina sa gela na membranu .....	61
4.14.3. Western blot analiza .....	62
4.15. Statistička analiza.....	63
5. Rezultati .....	64

5.1. Karakterizacija molekularnih profila mitohondrijalne biogeneze koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije specifičnih tipova ćelija reproduktivne osovine stresiranih mužjaka pacova.....	65
5.1.1. Imobilizacioni stres u trajanju od dva sata remeti nivoe hormona stresa, testosterona i LH u cirkulaciji.....	65
5.1.2. Psihofizički stres imobilizacijom u trajanju od dva sata remeti ekspresiju markera mitohondrijalne biogeneze u hipotalamusu, adenohipofizi i nadbubrežnoj žlezdi .....	66
5.1.3. Efekat <i>ex vivo</i> primene hormona stresa hidrokortizona, samog ili u kombinaciji sa blokatorom glukokortikoidnih receptora na molekularne profile ekspresije transkripata za markere mitohondrijalne biogeneze kao i funkcionalnosti mitohondrija u Lajdigovim ćelijama.....	72
5.1.4. Ponavljani psihofizički stres u trajanju od 3 sata povećava nivo hormona stresa u cirkulaciji, ali smanjuje nivo androgena kao i funkcionalnost, nivo ATP i broj spermatozoida .....	73
5.1.5. Efekat <i>ex vivo</i> primene hormona stresa adrenalina i hidrokortizona na funkcionalnost spermatozoida.....	75
5.1.6. Lokalizacija glavnih markera mitohondrijalne dinamike kao i signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku u spermatozoidima .....	76
5.1.7. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti značajno su promenjeni u spermatozoidima stresiranih pacova. ....	78
5.1.8. Efekat <i>ex vivo</i> primene hormona stresa adrenalina i hidrokortizona na ekspresiju markera mitohondrijalne dinamike u spermatozoidima .....	80
5.1.9. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost kao i broj i funkcionalnost spermatozoida, promenjeni su u spermatozoidima stresiranih pacova.....	84
5.1.10. Stres hormon adrenalin remeti transkripcione profile adrenergičkih receptora kao i kinaza adrenergičkih receptora i signaling od beta adrenergičkih receptora u spermatozoidima.....	87
5.2. Karakterizacija molekularnih profila mitohondrijalne dinamike koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije spermatozoida tokom oporavka organizma od akutnog stresa u različitim cirkadijalnim vremenima, najčešćeg tipa stresa u humanoj populaciji.....	88
5.2.1. Broj spermatozoida kao i funkcionalnost spermatozoida nakon akutnog tročasovnog stresa sa periodima oporavka od 0, 8, 14 i 20 sati. ....	88
5.2.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti značajno su promenjeni u spermatozoidima akutno stresiranih pacova čak i nakon 20 sati oporavka	89
5.2.3. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji reglišu broj i funkcionalnost spermatozoida, kao i mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost, značajno su promenjeni u spermatozoidima akutno stresiranih pacova i 20 sati nakon oporavka .....	94

5.3. Karakterizacija molekularnih profila mitohondrijalne dinamike koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije spermatozoida tokom ponavljano­g stresa organizma u različitim cirkadijalnim vremenima.....	101
5.3.1. Ponavljani imobilizacioni stres u različitim periodima u toku 24 sata smanjuje broj i funkcionalnost spermatozoida.....	101
5.3.2. Ponavljani imobilizacioni stres u različitim periodima u toku 24 sata remeti transkripcione profile markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima.....	102
5.3.3. Ponavljani imobilizacioni stres u različitom periodu u toku 24 sata remeti transkripcione profile odabranih markera cAMP i MAPK signalnih puteva. ....	106
5.4. Efekat poremećene homeostaze testosterona starih mužjaka pacova na molekularne profile markera biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija kao i markere signalnih puteva koji ih regulišu u spermatozoidima .....	112
5.4.1. Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa, koncentracija nitrita i nivo cGMP u spermatozoidima starih pacova.....	112
5.4.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija promenjeni su u spermatozoidima starih pacova .....	113
5.4.3. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promenjeni su u spermatozoidima starih pacova.....	115
5.5. Efekat poremećene homeostaze testosterona hipogonadalnih mužjaka pacova na molekularne profile markera biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija kao i markere signalnih puteva koji ih regulišu u spermatozoidima.....	117
5.5.1. Hipogonadizam remeti koncentraciju nitrita i nivo cGMP u spermatozoidima izolovanih iz kaudalnih epididimisa .....	117
5.5.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija promenjeni su u spermatozoidima hipogonadalnih pacova .	117
5.5.3. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promenjeni su u spermatozoidima hipogonadalnih životinja ..	119
5.6. Efekat hipogonadizma adultnih miševa koji je prouzrokovan kondicionalnom delecijom <i>Insr</i> i <i>Igflr</i> gena u steroidogenim tkivima na broj i funkcionalnost spermatozoida .....	120
5.7. Efekat <i>in vivo</i> tretmana inhibitorom PDE5, Sildenafilom, starih mužjaka pacova na broj spermatozoida kao i molekularne profile ekspresije transkripata za markere biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija kao i markere signalnih puteva koji ih regulišu u spermatozoidima .....	121
5.7.1. Ponavljani <i>in vivo</i> tretman Sildenafilom starih mužjaka pacova povećava broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa.....	121



5.7.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija promjenjeni su u spermatozoidima starih pacova akutno tretiranih inhibitorom PDE5 Sildenafilom <i>per os</i> .....	122
5.7.3. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima starih pacova akutno tretiranih inhibitorom PDE5 Sildenafilom <i>per os</i> .....	123
5.7.4. Ponavljani <i>in vivo</i> tretman inhibitorom PDE5 Sildenafilom menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima starih pacova.....	124
5.7.5. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima starih pacova ponavljano tretiranih inhibitorom PDE5 Sildenafilom <i>per os</i> .....	125
5.7.6. Efekat <i>ex vivo</i> primene inhibitora PDE5, Sildenafil, na koncentraciju nitrita u sadržaju spermatozoida kao i u ćelijskom medijumu.....	126
5.8. Efekat <i>in vivo</i> aktivacije AMPK tretmanom Metforminom, lekom za dijabetes tip 2, na profile ekspresije transkripata za markere biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija kao i markere signalnih puteva koji ih regulišu u spermatozoidima.....	128
5.8.1. Koncentracija nitrita i nivo cGMP promjenjeni su u spermatozoidima pacova nakon tromesečnog tretmana lekom za dijabetes tip 2, Metforminom <i>per os</i> .....	129
5.8.2. Tromesečni tretman Metforminom <i>per os</i> menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima pacova starih šest i osamnaest meseci.....	130
5.8.3. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima šest i osamnaest meseci starih pacova tretiranih tokom tri meseca aktivatorom AMPK, Metforminom <i>per os</i> .....	132
5.8.4. Šestomesečni <i>in vivo</i> tretman aktivacije AMPK Metforminom menja broj i funkcionalnost spermatozoida .....	134
5.8.6. Ponavljani tretman Metforminom <i>per os</i> u trajanju od šest meseci menja transkripcione profile markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima starih pacova.....	136
5.8.7. Efekat <i>ex vivo</i> primene Metformina na koncentraciju nitrita u ćelijskom medijumu adultnih spermatozoida .....	137
6. Diskusija .....	138
6.1. Stres menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze u hipotalamusu, adenohipofizi, nadbubrežnoj žlezdi kao i spermatozoidima adultnih pacova.....	139
6.1.1. Akutni i ponavljani imobilizacioni stres menjaju transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze u hipotalamusu, adenohipofizi i nadbubrežnoj žlezdi adultnih pacova.....	139

6.1.2. Akutni i deset puta ponavljani imobilizacioni stres menjaju transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima adultnih pacova.....	142
6.1.3. Hormon stresa adrenalin smanjuje funkcionalnost spermatozoida i menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija u spermatozoidima.....	144
6.2. Akutni stres sa različitim periodima oporavka menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima adultnih pacova.....	147
6.3. Ponavljani imobilizacioni stres u različitim periodima u toku dana menja transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima adultnih pacova .....	151
Hipogonadizam menja transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima .....	154
6.4. Starački hipogonadizam menja transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima.....	154
6.5. Hipogonadotropni hipogonadizam menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima .....	156
6.6. Akutni i ponavljani <i>in vivo</i> tretmani Sildenafilom menjaju transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima starih pacova .....	158
6.7. Ponavljani <i>in vivo</i> tretman Metforminom menja transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima adultnih i starih pacova.....	160
6.8. Pravci budućih istraživanja, translacioni aspekt i inovativni potencijal rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji.....	163
7. Zaključci .....	164
8. Literatura.....	171

# **1. Uvod**

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, sveukupna stopa infertilnosti je visoka, nepoznata kod muškaraca, podcjenjena i nije evidentno smanjenje nivoa u poslednjih 20 godina. Brojne studije ukazale su na povećanje broja neobjašnjenih slučajeva infertilnosti kod mlađih muškaraca kao i smanjenje stope fertiliteta u grupi muškaraca mlađih od 30 godina. Ovo je od velike važnosti obzirom da su kvalitet sperme i muški fertilitet važni kao osnovni pokazatelji, odnosno markeri ne samo reproduktivnog zdravlja nego i fundamentalni biomarkeri opšteg zdravlja organizma. Zbog toga, Svetska zdravstvena organizacija ističe važnost istraživanja mehanizama muške infertilnosti. Sa druge strane, uloga mitohondrija u fertilitetu muškaraca ne može se zanemariti. Fundamentalna je ne samo za pokretljivost spermatozoida već i za njihovu kapacitaciju, hiperaktivaciju i akrozomsku reakciju i oplodnju. Stoga se novije studije, na temu fiziologije spermatozida, fokusiraju na ovu važnu organelu kao biomarker zdravlja i fertiliteta spermatozoida. Homeostaza mitohondrijalne mreže održava se dobro koordinisanim, intrigantnim, procesima mitohondrijalne dinamike koji uključuju kompleksnu mašineriju importa proteina u mitohondrije (mitohondrijalni transduktor), kretanje mitohondrija radi njihovog strateškog pozicioniranja u ćeliji, mitohondrijalnu biogenezu, mitofuziju, mitofiziju i mitofagiju. Svi oni predstavljaju molekularne događaje neophodne za obnavljanje, adaptaciju i širenje mitohondrijalne mreže u ćeliji tokom epizoda oštećenja ili perioda velike potražnje za energijom. Procesi mitohondrijalne dinamike kontrolisani su intrigantnom i kompleksnom mrežom signalnih puteva u ćeliji koji prenose različite sredinske signale: stres, temperaturu, nedostatak energije, dostupnost nutrijenata, i faktora rasta. Takođe je važno istaći da su svi signalni putevi koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku uključeni i u regulaciju funkcije spermatozoida.

Brojne publikovane kliničke studije ukazuju da je poremećena homeostaza seksualnih steroida, a posebno androgena i kod muškaraca i žena, veliki faktor rizika u savremenom svetu, da prouzrokuje poremećaj reproduktivne i drugih funkcija, razvoj kardiovaskularnih bolesti, gojaznost i metabolički sindrom kao i da vodi ubrzanom starenju. Rezultati takođe pokazuju povezanost između niskog nivoa testosterona i insulin-rezistentnog stanja kao što je tip-2-dijabetes-melitus i metabolički sindrom. Pokazano je da mitohondrijalna DNK poseduje sekvence za vezivanje androgenih receptora u regionu gena ribozomalne subjedinice kao i u regionima strukturnih gena. Činjenica da mitohondrijalni genom, koji kodira proteine od velike važnosti za funkcionisanje ove organele a time i ćelije, poseduje mesta za vezivanje ovih receptora, pokazuje da je dejstvo steroidnih hormona veoma važno za funkciju mitohondrija.

Poremećena homeostaza seksualnih steroida i mitohondrija je veliki faktor rizika u savremenom svetu, a nedostaju nalazi o mitohondrijalnoj biogenezi i kao i preciznim mehanizmima koji je regulišu tokom stresa, starenja, kao i hipogonadizma koji vodi metaboličkom sindromu ili je uzrokovan insulinskom rezistencijom. Imajući u vidu sve navedeno, a posebno važnost za zdravlje individue i za očuvanje vrste, istraživanja u ovom radu usmerena su na karakterizaciju molekularnih profila mitohondrijalne biogeneze i njihovih regulatornih molekula kao mehanizama adaptacije specifičnih ćelijskih tipova reproduktivne osovine, sa posebnim fokusom na spermatozoide stresiranih, starih i hipogonadnih životinja.

## **2. Pregled literature**

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, muška infertilnost izaziva globalnu zabrinutost, zbog sve većeg trenda prevalencije, nepoznavanja uzroka nastanka kao i zbog činjenice da nije ispoljila smanjenje nivoa u poslednjih 20 godina. Fertilitet mužjaka, stoga i njihov reproduktivni potencijal, rezultat je kompleksne i precizno regulisane neuroendokrine kontrole. Reproductivna funkcija adultnih mužjaka je pod kontrolom gonadotropina i androgena putem negativne povratne sprege (Chimento i sar., 2014). Sa druge strane, hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina (*engl.* Hypothalamic–pituitary–adrenal, HPA) kontrolisana je preciznim regulatornim mehanizmima koji su pod uticajem cirkulišućih hormona gonada i nadbubrežne žlezde. Pravilna bazalna i stresom indukovana funkcija HPA osovine je od velike važnosti za zdravlje organizma (Sheng i sar. 2021; van Bodegom i sar., 2017).

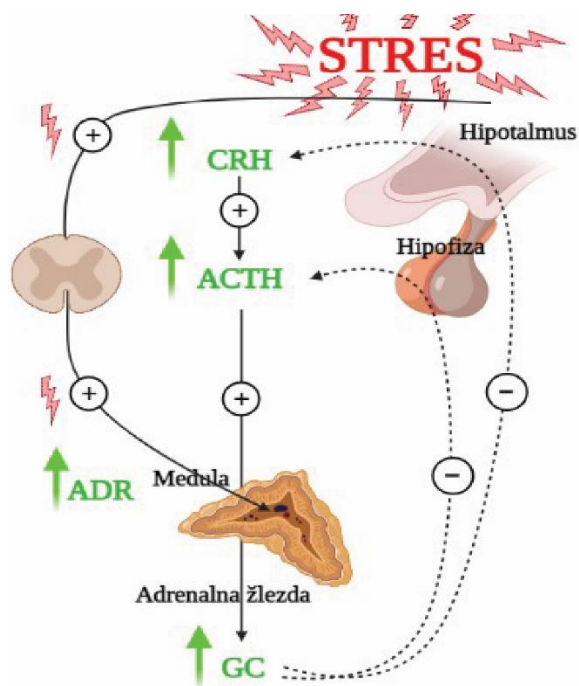
## 2.1. Funkcionalna organizacija hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine

Neuroendokrini odgovor na stres izuzetno je važan za adekvatan odgovor i kasniji oporavak od spoljašnjih uticaja koji remete ili prete da poremete homeostazu organizma. Aktivacija HPA osovine obezbeđuje metaboličku podršku u odgovoru na stres, mobilizujući energetske rezerve, inhibišući imuni odgovor, i potencirajući brojne efekte simpatičkog nervnog sistema (van Bodegom i sar., 2017). HPA osovina je neuroendokrini osovina koju čine tri primarne strukture, omogućujući osovini da pravilno odreaguje na stresne situacije. Nju čine paraventrikularni nukleus hipotalamusa (*engl.* Paraventricular nucleus, PVN), adenohipofiza i nadbubrežna (adrenalna) žlezda. U svojoj osnovi PVN prima i integriše neuralne i humoralne signale da bi aktivirao specializovane grupe ćelija koje sintetišu i sekretuju kortikotropin-oslobađajući hormon (*engl.* corticotropin-releasing hormone, CRH). CRH je peptid sačinjen od 41 aminokiseline, koji na nivou adenohipofize stimuliše sintezu i oslobađanje adrenokortikotropnog hormona (*engl.* adrenocorticotrophic hormone, ACTH) u cirkulaciju (Oyola i Handa, 2017). CRH deluje prvenstveno preko CRH receptora 1 (CRHR1), koji je ekspresovan u prednjem režnju hipofize, kao i u prefrontalnom korteksu, hipokampusu, PVN i bazolateralnoj amigdali, svim regionima uključenim u posredovanje i regulisanje bihevioralnog i neuroendokrinog odgovora na stres. CRH se u manjoj meri vezuje i za CRHR2, koji je dominantno ekspresovan u ventromedijalnom hipotalamusu i medijalnoj amigdali, dalje stimulišući CRH potentnost u modulaciji moždanih funkcija. Dalje, ACTH dospevanjem do korteksa adrenalne žlezde signalizira sintezu glukokortikoida (Sheng i sar. 2021; van Bodegom i sar., 2017) (Slika 2.1.1).

Adrenalna žlezda izgrađena je od dva anatomski i funkcionalno odvojena regiona, korteksa i medule. Medula adrenalne žlezde sadrži hromafinske ćelije i ima glavnu ulogu u sintezi kateholamina i simpatičkom odgovoru na stres, dok korteks adrenalne žlezde sadrži steroidogene ćelije odgovorne za adrenalnu ulogu u endokrinom sistemu. Korteks adrenalne žlezde dalje je podeljen u zone koje su kod ljudi funkcionalno i morfološki različite: zona glomeruloza, zona fascikulata i zona retikularis. Zona glomeruloza nalazi se odmah ispod kapsule adrenalne žlezde, i funkcioniše kao deo renin-angiotenzin-aldosteron endokrine ose i doprinosi balansu elektrolita organizma. Ultrastrukturno, ćelije zone glomeruloze sadrže brojne mitohondrije sa lamelarnim kristama i malo lipidnih kapi u citoplazmi. Sledeći sloj čini zona fascikulata, odgovorna za sintezu glukokortikoida. Ćelije ove zone učestvuju u hipotalamo-hipofizno-adrenalnoj endokrinoj osovini i ogovaraju na hipofizni ACTH hormon preko ACTH receptora (M2CR) i njegovog aksesornog proteina, melanokortin 2 receptor aksesorni protein (MRAP). Ultrastrukturno, ove ćelije takođe sadrže brojne mitohondrije čije kriste zauzimaju tubulovezikularnu formu. Ćelije zone fascikulate, u skladu sa njihovim kapacitetom sintetišu glukokortikoide. Sadrže upadljiv glatki endoplazmatični retikulum i veliki broj lipidnih kapi.

Sloj korteksa koji naleže na sloj medule adrenalne žlezde, zona retikularis, nije deo dobro definisane endokrine osovine, ali sekretuje značajnu količinu androgendehidroepiandrosterona (DHEA). Čelije ove zone podsećaju na čelije zone fascikulate po ultrastrukturi, mada sadrže relativno manji broj lipidnih kapi, sa većim brojem lizozoma (Bassi i sar., 2021; Midzak i Papadopoulos, 2016).

Kao što je tipično za sve steroidne hormone, odmah nakon njihove sinteze u ćelijama korteksa nadbubrega, glukokortikoidni hormoni se oslobađaju u cirkulaciju. Primarni glukokortikoidi su kortizol kod čoveka i kortikosteron kod pacova i miševa (Oyola i Handa, 2017). Kortikosteroidi lako prolaze krvno-moždanu barijeru i utiču na funkcije mozga vezujući se za dva tipa receptora koji se razlikuju po distribuciji kao i afinitetu za ligand: glukokortikoidni receptor (GR) i mineralnokortikoidni receptor (MR). Ekspresija glukokortikoidnog receptora najveća je u hipotalamičnim CRH neuronima i kortikotrofima adenohipofize. Sa druge strane, ekspresija mineralokortikoidnog receptora uglavnom je ograničena na limbičku regiju, sa pikom ekspresije u hipokampusu. Najbolje proučeni signani put kojim deluju kortikosteroidi uključuje njihovo vezivanje za intracelularne receptore, koji se nakon vezivanja liganda translociraju u jedro i utiču na transkripciju gena direktno, vezivanjem njegovih homo/heterodimera za glukokortikoidne-respons elemente u DNK molekulu i regrutacijom korepresora ili koaktivatora, ili indirektno, interagujući sa drugim stres-indukovanim transkripcionim faktorima smanjujući njihovu aktivnost. Stoga, vezivanje kortikosteroida za njihove receptore može da dovede do aktivacije ili inhibicije transkripcije preko 200 gena koji su uključeni u brojne ćelijske procese. Intracelularno-lokalizovani mineralokortikoidni receptori imaju 10 puta veći afinitet za kortikosteroidne u poređenju sa GR. Smatra se da su MR primarno uključeni u prenos informacija i kontrolu senzitivnosti organizma u odgovoru na stres. Dugo se smatralo da su intracelularni GR glavni u odgovoru na stres, posredujući u kontroli negativne povratne sprege, normalizujući neuralnu aktivnost nakon izlaganja stresu, i pomažući organizmu da savlada, da se adaptira i oporavi od stresa. Osim intracelularnih receptora, GR i MR mogu da budu locirani i na membrani ćelije. Pokazano je da vezivanje kortikosteroida za ove membranske receptore indukuje brze promene u neuralnoj ekscitabilnosti i aktivnosti preko negenomskih efekata, i time doprinoseći akutnom stanju uzbuđenja i budnosti (van Bodegom i sar., 2017). Iako je ovo najviše adaptivni odgovor, veliko oslobađanje kortikosteroida kao posledica ekstremnog ili hroničnog izlaganja stresu, može biti veoma štetno po organizam i uticati na razvoj patofizioloških promena. Veliki broj dokaza ukazuje na poremećenu funkciju HPA osovine kod mentalnih poremećaja povezanih sa stresom (Faravelli i sar., 2012; Varghese i Brown, 2001), sugerišući da je pravilna bazalna i stresom indukovana funkcija HPA osovine od velikog značaja za zdravlje organizma (van Bodegom i sar., 2017).



**Slika 2.1.1. Šematski prikaz uticaja stresa na hipotalamo-hipofizno-adrenalnu osovinu.**  
Šema kreirana u BioRender.com

## 2.2. Funkcionalna organizacija hipotalamo-hipofizno-gonadalne osovine

Reproduktivna funkcija značajno se menja tokom života čoveka. Koordinacija hipotalamo-hipofizno-gonadalne osovine neophodna je za normalnu funkciju testisa kod muškaraca, uključujući normalnu produkciju testosterona i mušku fertilitnost. Pulsativna sekrecija gonadotropin-oslobađajućeg hormona (*engl.* Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) od strane hipotalamusa stimuliše biosintezu hipofiznih gonadotropina, luteinizirajućeg hormona (LH) i folikulostimulirajućeg hormona (FSH), koji zauzvrat održavaju intragonadnalnu produkciju testosterona i spermatogenezu. Mehanizam negativne povratne sprege, kontrolisan dovoljno povećanom količinom testosterona, odgovoran je za smanjenje sekrecije GnRH od strane hipotalamusa i oslobađanje gonadotropina u cirkulaciju, od strane hipofize (Corradi i sar., 2016; Zirkin i Papadopoulos, 2018) (Slika 2.2.1).

Sekrecija hipofiznih gonadotropina regulisana je hipotalamičnim dekaeptidnim hormonom, GnRH, koji se vezuje za membranske receptore na gonadotrofima hipofize, stimulišući sintezu i sekreciju FSH i LH. Sekrecija GnRH je pod kontrolom kispeptin-GPR54 sistema. Kispeptin je produkt *KISS1* gena, lociranog na hromozomu 1q32.1. Produkt *KISS1* gena je 145-aminokiselina dugačak peptid, koji je daljim procesovanjem skraćen na 54-aminokiseline dug peptid poznat kao kispeptin-54. Neuron koji ekspresuje kispeptin lokalizovan su u antroventalnom periventrikularnom nukleusu, paraventrikularnom nukleusu, anterodorzalnom preoptičkom nukleusu kao i u arkuatnom nukleusu. Kispeptin stimuliše sekreciju gonadotropina putem interakcije sa svojim receptorom GPR54 lociranom na površini GnH-sekretujućih neurona. Stoga je kispeptin-GPR54 sistem esencijalan za inicijaciju sekrecije gonadotropina u pubertetu, kao i održavanje normalne androgenizacije u adultnoj dobi. Kod muškaraca, glavni hormon koji kontroliše sekreciju GnRH hormona je testosteron, koji inhibiše sekreciju

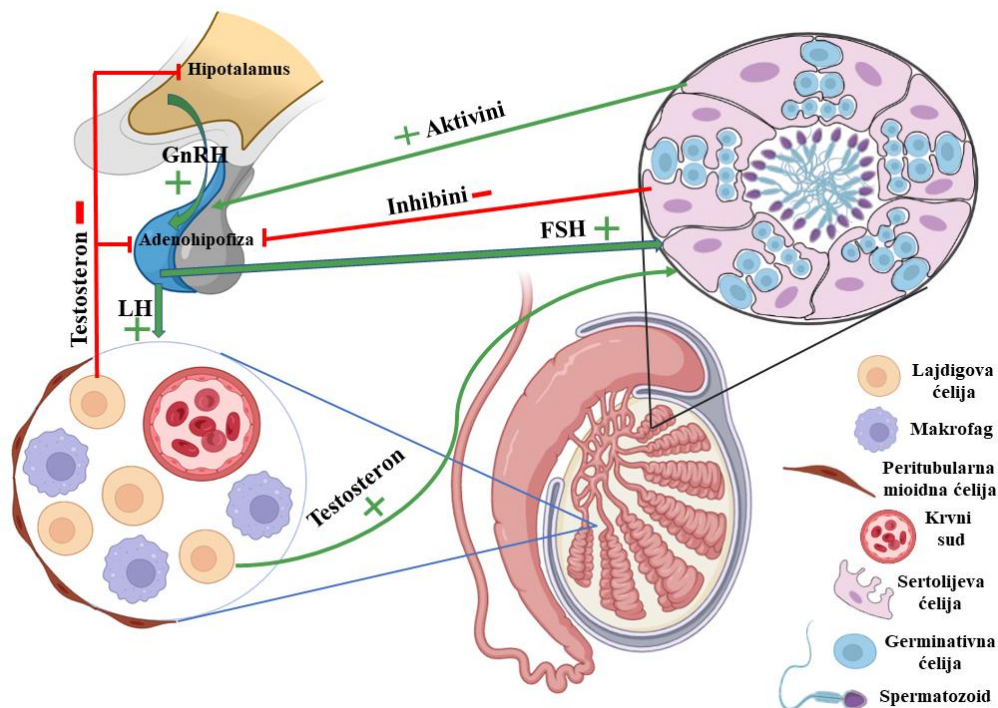


gonadotropina putem negativne povratne sprege na nivou hipotalamusa kao i na nivou hipofize (Weinbauer i sar., 2010). U određenim fiziološkim stanjima, broj GnRH receptora varira i uglavnom je u direktnoj korelaciji sa kapacitetom sekrecije gonadotropina od strane hipofiznih gonadotrofa. Bez obzira na broj GnRH receptora, pulsatilni režim GnRH-a neophodan je za preciznu signalizaciju hipofiznih gonadotropina. Pulsativnost GnRH-a suštinska je funkcija ćelija hipotalamusa i zavisna je od kalcijuma. Studije su pokazale da sekvencijalan odgovor sekrecije gonadotropina nakon egzogene administracije GnRH hormona u GnRH-deficitne miševе dovodi do trenutnog i trajnog povećanja koncentracije FSH u plazmi tokom perioda GnRH injekcija, dok sekrecija LH zahteva produženu i pulsatilnu terapiju GnRH hormonom, pre nego što je moguće detektovati LH u cirkulaciji. Ovi rezultati pokazuju da FSH biva sintetisan i čuvan čak i u odsustvu konstantne GnRH administracije, ali je kontinuirana GnRH stimulacija neophodna za sintezu LH (Corradi i sar., 2016). GnRH svoje funkcije ispoljava interakcijom sa specifičnim receptorom. GnRH receptor pripada familiji receptora vezanih za G-proteine. Izgrađen od 328 aminokiselina i pripada grupi najmanjih receptora vezanih za G-proteine, sa kratkim ekstracelularnim domenom. Intracelularni C-kraj ovog receptora skoro da ne postoji i transdukcija signala obavlja se najverovatnije putem intracitoplazmatskih petlji koje povezuju sedam transmembranskih segmenata. Nakon GnRH hormon-receptor interakcije, formira se hormon-receptor kompleks. Ovo rezultuje interakcijom sa Gq proteinom, hidrolizom fosfoinozitida i stvaranjem diacilglicerola i inozitol trifosfata, što dalje vodi mobilizaciji kalcijuma iz unutarćelijskih skladišta i influksu vanćelijskog kalcijuma u ćeliju. Diacilglicerol i kalcijum dalje aktiviraju protein kinazu C (PKC), indukujući fosforilaciju proteina i dalju aktivaciju kalcijumovih kanala. Povećanje intracelularnog kalcijuma rezultuje brzim oslobađanjem gonadotropina egzocitozom, i vremenom daljom sintezom i sekrecijom gonadotropina (Weinbauer i sar., 2010).

Gonadotropini, FSH i LH su heterodimeri sa mnogim strukturnim sličnostima. Oba se sastoje od  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice peptidnog lanca, produkovanih u hipofizi i muškaraca i žena. Subjedinica  $\alpha$  identična je kod oba hormona, ali  $\beta$  subjedinica obezbeđuje strukturne i biohemijske specifičnosti za interakciju sa receptorom, a takođe obezbeđuje i biološku specifičnost hormona. Steroidna regulacija ekspresije gonadotropinskih gena, njihova sinteza i sekrecija, veoma je kompleksna i pokazuje mnogo različitih aspekata u zavisnosti od eksperimentalnog modela. Poznato je da gonadalni steroidi ispoljavaju svoj efekat negativne kontrole gonadotropina na nivou hipotalamusa, inhibišući oslobađanje GnRH hormona preko kispeptin/GPR54 sistema. Gonadalni steroidi ispoljavaju efekat kontrole negativnom povratnom spregom i na nivou hipofize, gde je navedeni efekat izuzetno kompleksan. LH i FSH ispoljavaju svoje efekte vezujući se za specifične receptore (Simoni i sar., 1997). Receptori gonadotropina takođe pripadaju familiji receptora vezanih za G-proteine i karakterisani su velikim ekstracelularnim domenom za vezivanje hormona, uobičajenim transmembranskim domenom od 7 hidrofobnih segmenata povezanih sa tri ekstracelularne i tri intracelularne petlje, kao i intracelularnim karboksiterminalnim domenom. Nakon vezivanja, FSH prolazi složene konformacione promene koje utiču na isturene petlje uključene u aktivaciju receptora. FSH-FSH receptor kompleks formira dimere u kristalnoj strukturi, koji su važni za dalji prenos signala, koji rezultuje aktivacijom G-proteina, produkcijom cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) i aktivacijom protein kinaze A. Gonadotropini deluju uglavnom preko stimulacije intracelularnog cAMP. Pokazano je da LH i FSH mogu indukovati povećanje influksa  $Ca^{2+}$  u ciljne ćelije (Corradi i sar., 2016; Weinbauer i sar., 2010). Receptor luteinizirajućeg hormona (LHR) primarno je ekspresovan u gonadama, ali je takođe pronađen i u negonadalnim i kancerogenim tkivima. Luteinizirajući hormon deluje preko membranskog LH/humani horionski

gonadotropin (*engl.* human chorionic gonadotrophin, hCG) receptor na Lajdigovim ćelijama, da bi održao osnovne metaboličke procese i steroidogene enzime koji regulišu produkciju androgena. U testisima LH receptori su ekspresovani tokom fetalnog života, postnatalno, u pubertetu i tokom adultnog života. hCG strukturno je sličan LH, ima duži polu-život i vezuje se za LHR sa većim afinitetom od LH. Ekspresija LHR indukovana je hCG-om tokom fetalnog života, i FSH i LH postnatalno (Payne i Hady, 2007).

FSH je neophodan za determinaciju broja Sertolijevih ćelija testisa kao i za stimulaciju i održavanje spermatogeneze. Aktiviranjem FSH receptora, FSH ima specifičnu funkciju u Sertolijevim ćelijama, rezultujući povećanjem cAMP, i time dalje aktivirajući cAMP zavisnu protein kinazu. Ovo povećanje dalje povećava sintezu proteina, androgen-vezujućeg proteina (*engl.* Sex hormone-binding globulin SHBG) i enzima aromataze CYP19, koji prevodi testosteron u estradiol. Steroidogeneza, koja je pod uticajem LH koji deluje preko specifičnih receptora na Lajdigovim ćelijama, stimuliše enzimsku konverziju prekursora holesterola do testosterona. Sekretija testosterona od strane Lajdigovih ćelija stvara visoku lokalnu koncentraciju ovog hormona u testisima. Testisi sekretuju od 3 do 10 mg/d testosterona i učestvuju u više od 95% ukupnog testosterona u cirkulaciji postpubertalnih muškaraca (Payne i Hady, 2007). Testostron sintetisan u Lajdigovim ćelijama transportuje se u cirkulaciji niz koncentracijski gradijent, gde se nalazi u dve faze, vezan za protein (98%) ili slobodan hormon (2%). Frakcija slobodnog hormona smatra se biološki aktivnom formom testosterona. Većina protein-vezanog hormona (oko 54% ukupnog testosterona) vezana je za nisko-afinitetne, visoko zastupljene proteine (kao što je albumin), dok je ostatak protein-vezanog testosterona (oko 44% ukupnog testosterona) vezan za visoko-afinitetne, slabo zastupljene glikoprotein-polni-hormon-vezujuće globuline. Slobodan testosteron difunduje iz intravaskularnog prostora u intersticijum i dalje do ciljnih tkiva. U ciljnim ćelijama, testosteron može direktno da utiče na genomske promene vezujući se za androgeni receptor (AR), ili negenomske promene, koje uključuju ili AR ili signalne puteve drugih sekundarnih glasnika. Alternativno, testosteron može da ispolji svoje aktivnosti na ciljnim ćelijama i konverzijom u druge aktivne steroidne hormone. To mogu biti  $5\alpha$ -dihidrotestosteron ( $5\alpha$ -DHT) katalizovan enzimom  $5\alpha$ -reduktazom, ili  $17\beta$ -estradiol (E2) katalizovan enzimom aromatazom. Takođe, testosteron može biti inaktivisan njegovom oksidacijom do androstendiona ili njegovom  $5\beta$ -redukcijom do DHT (Corradi i sar., 2016; Payne i Hady, 2007; Weinbauer i sar., 2010).

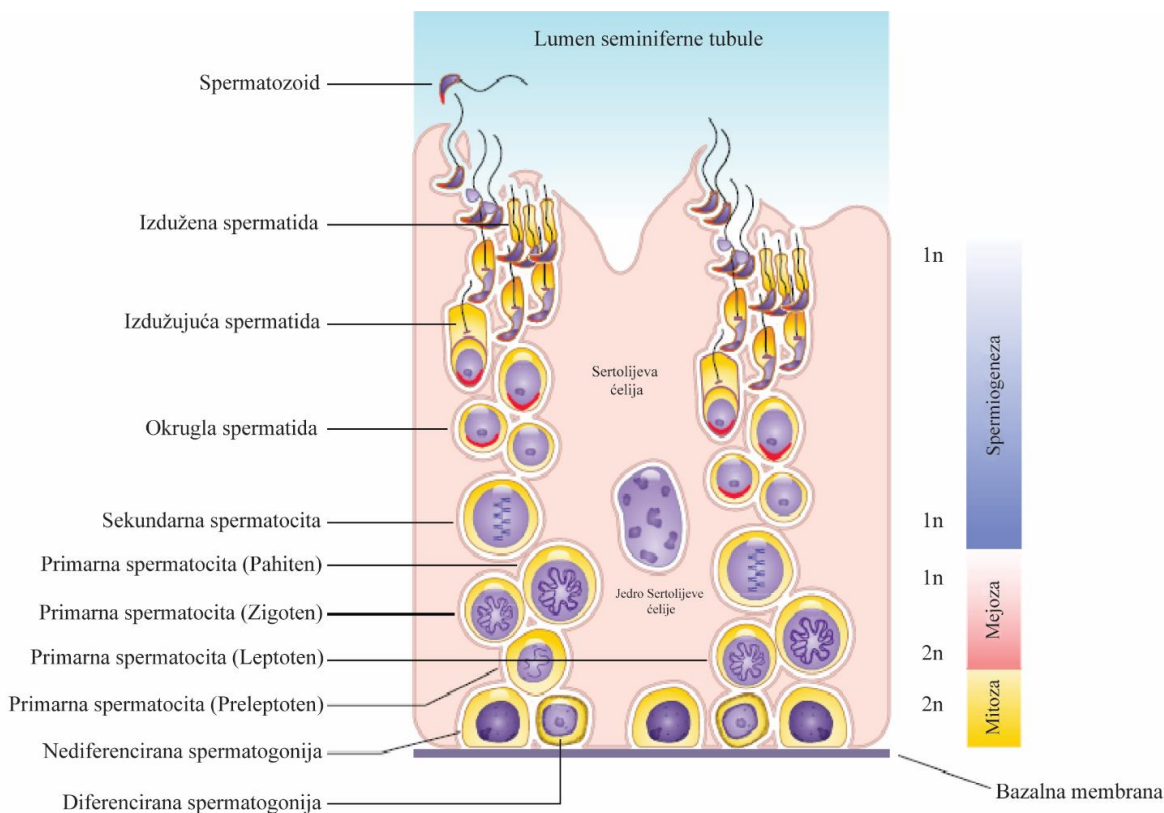


**Slika 2.2.1. Šematski prikaz hipotalamo-hipofizno-gonadalne osovine.**  
Šema kreirana u BioRender.com

### 2.3. Spermatogeneza, građa i funkcija spermatozoida

Spermatogeneza, koja kod ljudi traje 74 dana, dok kod pacova traje 54 dana (Perrard i sar., 2016), predstavlja proces koji je neophodan za finalnu diferencijaciju spermatogonija u spermatozoide i uključuje tri različite funkcionalne faze koje se dešavaju u seminiferim tubulama testisa: mitozu, mejozu i spermiogenezu. Visoko kompleksna serija molekularnih događaja tokom spermatogeneze zahteva odgovarajuću interakciju između Sertolijevih ćelija, germinativnih ćelija, tubularnih ćelija epitela, i integritet krvno-testikularne barijere. Spermatogonije su u seminiferim tubulama locirane u blizini lamine proprije i u bliskom su kontaktu sa Sertolijevim ćelijama. Kod primata, prisutne su tri morfološki-različite subpopulacije spermatogonija: Ad spermatogonija (*engl.*  $A_{\text{dark}}$  spermatogonia, Ad), Ap spermatogonija (*engl.*  $A_{\text{pale}}$  spermatogonia, Ap) i B spermatogonija. Kod čoveka, Ad i Ap spermatogonije predstavljaju nediferencirane stem ćelije dok B ćelije predstavljaju diferencirane spermatogonije. Ad spermatogonije se u normalnim uslovima funkcionisanja testisa ne dele dok se Ap spermatogonije dele mitotičkom deobom da bi održale sopstvenu populaciju ćelija, i od svake nastaju dve spermatogonije tip B. Nediferencirane spermatogonije razlikuju se od spermatogonija koje su diferencirane na osnovu ekspresije tzv. “samoobnavljajućih” gena i tzv. “proliferatornih” gena. FSH-indukovani faktori rasta poreklom od Sertolijevih ćelija stimulišu diferencijaciju spermatogonija. Diferencirane spermatogonije karakteriše inhibicija “samoobnavljajućih” gena i stimulacija gena povezanih sa diferencijacijom. Spermatogonije tip B dalje daju preleptoten-spermatocite, koje zahtevaju bliski kontakt sa Sertolijevim ćelijama i integritet epitela da bi se diferencirale u leptoten-, zigoten- i pahiten-spermatocite. Preleptoten-spermatocite prolaze kroz mejotičku deobu da bi se diferencirale u sekundarne spermatocite. Sekundarne spermatocite prolaze kroz II mejotičku deobu, tokom koje se sestrinske hromatide

dele, da bi nastale haploidne spermatide. Poslednja faza, spermiogeneza, esencijalna je za diferencijaciju spermatozoida. Tokom spermiogeneze, haploidne okrugle spermatide prolaze strukturne i funkcionalne promene. Spermatide nemaju sposobnost deobe i njihova progresivna transformacija traje 23 dana kod čoveka, 22 dana kod pacova i 14 dana kod miševa. Transformacija spermatida uključuje procese morfološke i funkcionalne diferencijacije uključujući formiranje akrozoma, kondenzaciju hromatina i eliminaciju viška citoplazme. Postoje dva tipa ovih ćelija: okrugle i izdužene spermatide. Diferencijacija spermatida u spermatozoide podrazumeva brojne događaje kao što su pakovanje DNK sa protaminima, formiranje akrozoma i vratnog dela kao i formiranje repa (Cannarella i sar., 2020; Parvinen i Ventelä, 1999; Teves i Roldan, 2022).

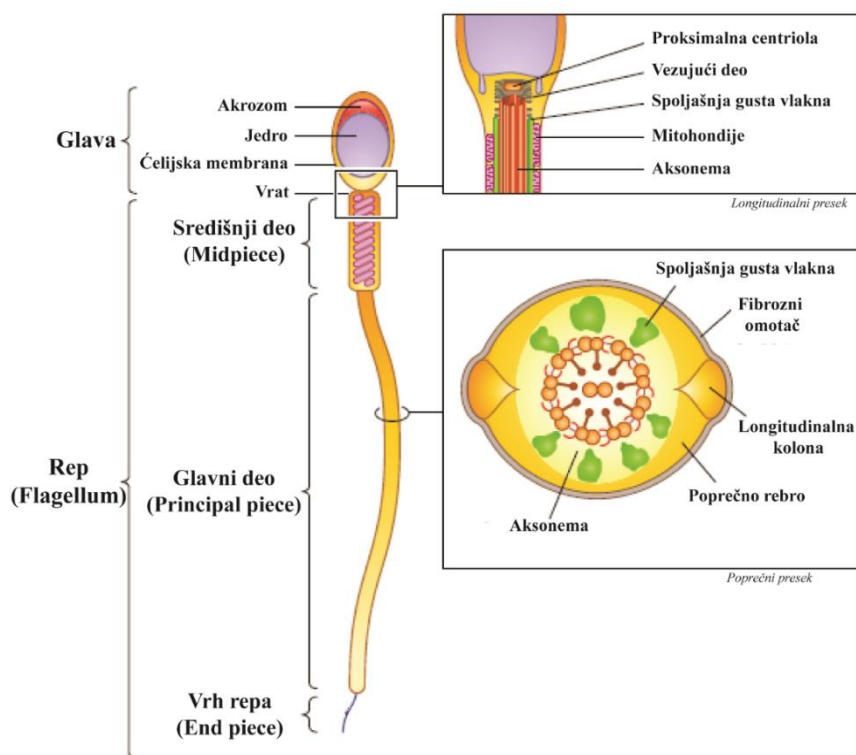


**Slika 2.3.1. Šematski prikaz procesa spermatogeneze miša.**

Preuzeto iz Teves i Roldan 2022, uz manje modifikacije.

Spermatozoid čine dva glavna odeljka, glava i rep. Morfološke osobine spermatozoida, uključujući oblik glave i dužinu repa, raznoliki su kod sisara. Uglavnom širina i dužina glave spermatozoida variraju zbog varijacija u veličini i organizaciji akrozoma i jedra. Glava spermatozoida sadrži haploidni nukleus, sa gustom spakovanim hromatinom koji nosi nasledne informacije u molekulu DNK, akrozom i egzocitične granule sa enzimima koji obezbeđuju penetraciju spermatozoida do jajne ćelije. Ekstranuklearni i ekstra-akrozomalni regioni prisutni su u glavenom regionu spermatozoida. Takođe, prisutni su i citoplazmatski odeljci definisani membranom akrozoma, jedarnom membranom i ćelijskom membranom. Sa druge strane, rep spermatozoida (*engl.* Flagellum) sa glavenim regionom povezan je vratnim delom (*engl.* Connecting piece) i može biti podeljen u tri segmenta: središnji deo (*engl.* Midpiece), glavni deo (*engl.* Principal piece) i vrh repa (*engl.* End piece). Vratni deo je najbliži glavi i sadrži

degenerisane centriole, koje imaju manje strukturnih karakteristika i sadrže manje proteina u odnosu na tipične centriole u somatskim ćelijama. Osim toga vratni deo sadrži prelazne strukture povezane sa unutrašnjim strukturama središnjeg dela. Središnji deo definisan je citoskeletnim strukturama okruženim mitohondrijama (Teves i Roldan, 2022). Mitohondrijalni omotač (*engl.* Mitochondrial sheath, MS) definiše region središnjeg dela i okružuje spoljašnji gusti omotač i aksoneme. Različiti broj mitohondrija ulazi u sastav MS, i one su izduženog oblika raspoređene u obliku spirale. Glavni deo repa spermatozoida sadrži fibrozni omotač koji okružuje citoskelet. Vrh spermatozoida predstavlja završni deo i nastavak je glavnog dela bez ikakvih dodatnih struktura. Dužina vratnog dela i završnog dela repa je najčešće jako mala, dok dužine središnjeg i glavnog dela variraju kod različitih vrsta sisara. Mitohondrije, kao izvor ATP-a, koje se u spermatozoidima nalaze u središnjem delu repa, produkuju i transportuju energiju do aksonema u glavnom delu, što stvara pokretačku snagu spermatozoida. Stoga, dužine središnjeg i glavnog dela mogu imati važnu ulogu u brzini plivanja spermatozoida a time delimično i u brzini oplodnje (Gu i sar., 2019; Teves i Roldan, 2022).



**Slika 2.3.2. Šematski prikaz strukture spermatozoida.**

Preuzeto iz Teves i Roldan 2022, uz manje modifikacije.

### 2.3.1. Kapacitacija i akrozomska reakcija spermatozoida

Oplodnja predstavlja specifični događaj koji je rezultat kompleksnog seta molekularnih procesa. Da bi oplodili jajnu ćeliju, spermatozoidi prolaze kroz brojne promene tokom formiranja i razvoja u testisima (spermatogeneza), sazrevanja u epididimisu i kapacitacije u ženskom reproduktivnom traktu. Poslednji korak predstavlja važan korak koji prethodi interakciji kapacitiranog spermatozoida sa jajnom ćelijom, nakon čega sledi egzocitoza akrozoma i oplodnja jajne ćelije. Spermatozoidi u ejakulatu nemaju odmah sposobnost oplodjenja

jajne ćelije. Da bi za to bili sposobni potrebno je da određeni period provedu u ženskom reproduktivnom traktu. Prolaskom kroz ženski reproduktivni trakt spermatozoidi prolaze kroz brojne biohemijske i fiziološke modifikacije koje se zajednički nazivaju kapacitacijom. Svi spermatozoidi sisara, koji su do sada istraživani, prolaze kroz proces kapacitacije nakon provođenja određenog perioda u ženskom reproduktivnom traktu. Osim toga, spermatozoidi sisara mogu biti kapacitirani i *in vitro*, inkubacijom ejakuliranih ili spermatozoida kaudalnih epididimisa u medijumu obogaćenom izvorima energije, elektrolitima i akceptorima holesterola, najčešće albuminom. Krajnji ishod *in vivo/in vitro* kapacitacije je hiperaktiviran spermatozoid sposoban za kontakt sa jajnom ćelijom i prolazak kroz akrozomsku reakciju na mestu kontakta. Događaj egzocitoze smatra se još jednim važnim događajem koji obezbeđuje da akrozom-reaktivni (i hiperaktivirani) spermatozoidi oplode jajnu ćeliju (Abou-haila i Tulsiani, 2009; Felix, 2005; Stival i sar., 2016; Teves i Roldan, 2022). Ejakulirani spermatozoidi ili spermatozoidi izolovani iz kaudalnog dela epididimisa mogu biti kapacitirani u *in vitro* uslovima inkubacijom u medijumu obogaćenom goveđim serum albuminom (*engl.* Bovine serum albumin, BSA) ili tzv. “energetskim” supstancama kao što su glukoza i piruvat, kao i elektrolitima. Albumin je glavni protein sekretovan u ženskom reproduktivnom traktu i važna je komponenta *in vivo/in vitro* kapacitacije. Smatra se da ovaj protein inicira kapacitaciju olakšavajući efluks sterola (najviše holesterola) iz ćelijske membrane spermatozoida. Ovaj efluks holesterola dovodi do poremećaja membranskog potencijala, povećanja propustljivosti i fluidnosti membrane koji dalje olakšavaju influx katjona  $Ca^{2+}$ ,  $K^{+}$ ,  $Na^{+}$  i  $H^{+}$  kao i anjona  $HCO_3^{-}$  i  $Cl^{-}$ , i posledično produkciju sekundarnih glasnika (Abou-haila i Tulsiani, 2009; Felix, 2005; Stival i sar., 2016; Teves i Roldan, 2022). Jonsko okruženje i protok jona kroz ćelijsku membranu veoma su važni tokom procesa kapacitacije. Pokazano je da je tokom kapacitacije povećana koncentracija intracelularnog  $Ca^{2+}$ . Ovo može biti rezultat smanjenog efluksa  $Ca^{2+}$  zbog inhibicije  $Ca^{2+}$  ATP-azne pumpe, povećanog curenja  $Ca^{2+}$  kroz membranu zbog nestabilnosti izazvane uklanjanjem holesterola, i/ili povećanog influxa  $Ca^{2+}$  aktivacijom različitih kanala (Felix, 2005). Influx jona pokreće kaskadu signalnih događaja koja uključuje: a) aktivaciju ADCY i produkciju cikličnog adenozin monofosfata; b) stimulaciju PRKA i mnogih drugih kinaza; c) fosforilaciju tirozinskih ostataka brojnih molekula. Identifikacija brojnih tirozin-fosforilisanih molekula kapacitiranih spermatozoida kod brojnih vrsta sisara ukazuje na važnost ovog događaja u putevima signalne transdukcije koji regulišu fiziologiju spermatozoida. Važno je podsetiti da samo kapacitirani spermatozoidi mogu da se vežu za receptore na jajnoj ćeliji i prođu akrozomsku reakciju (Abou-haila i Tulsiani, 2009; Teves i Roldan, 2022).

Razvijeni akrozom vrećaste je strukture sa unutrašnjom i spoljašnjom akrozomalnom membranom koja pokriva anteriorni deo jedra. Kod sisara, veličina i oblik akrozoma varira od vrste do vrste i zavisi od morfologije glave spermatozoida. Oblik akrozoma uglavnom se može podeliti u dve kategorije: srpasti oblik prisutan kod glodara i ovalan oblik (oblik lopatice ili vesla) prisutan kod većih sisara uključujući i čoveka. Akrozom spermatozoida je Goldži-izvedena sekretorna organela koja u mnogome podseća na lizosome ćelija, međutim akrozom se smatra analogom sekretornih granula. Kod miševa, i mnogih drugih vrsta, signal koji inicira akrozomsku reakciju je vezivanje kapacitiranog spermatozoida za zona pellucida (ZP) receptore u ligand- receptor maniru (Hirohashi i Yanagimachi, 2018; Stival i sar., 2016). Brojni receptori ili vezujući proteini na površini spermatozoia kao i njihovi odgovarajući ligandi na zoni pelucidi imaju važnu ulogu u kontaktu spermatozoida i jajne ćelije. Važno je napomenuti da je nivo  $Ca^{2+}$  u spermatozoidu nizak pre vezivanja ZP za receptore, dok je koncentracija dvovalentnih katjona mnogo viša u ekstracelularnoj tečnosti. Ireverzibilno interakcija spermatozoida i jajne ćelije uzrokuje kontinuirano povećanje  $Ca^{2+}$  između ćelijske membrane i spoljašnje membrane



akrozoma kapacitiranog spermatozoida. Kontakt između spermatozoida i jajne ćelije aktivira  $\text{Ca}^{2+}$  kanale koji uzrokuju kontinuirano povećanje dvovalentnih anjona i drugih sekundarnih glasnika, kao što su cAMP i  $\text{IP}_3$  (*engl.* Inositol triphosphate,  $\text{IP}_3$ ). Povećanje koncentracije cAMP dalje uzrokuje aktivaciju protein kinaza kao što su cAMP-zavisna kinaza i  $\text{Ca}^{2+}$ - i fosfolipid-zavisne kinaze. Prolazno povećanje  $\text{Ca}^{2+}$  i drugih sekundarnih glasnika takođe pokreće kaskadu signalnih događaja koji povećavaju pH spermatozoida i pokreću fuziju ćelijske membrane spermatozoida i spoljašnje membrane akrozoma na mnogim mestima, a dalje i egzocitozu sadržaja akrozoma na mestu kontakta spermatozoida i jajne ćelije (Abou-haila i Tulsiani, 2009). Morfološki, egzocitoza sadržaja akrozoma ili indukcija akrozomske reakcije dešava se kroz nekoliko koraka. Najpre dolazi do fuzije ćelijske membrane i spoljašnje membrane akrozoma spermatozoida na više mesta. Fuzija se dešava postepeno na različitim regionima akrozoma, i nije sve-ili-ništa fenomen. Dalje, fuzija membrana dovodi do formiranja hibridnih vezikula i otpuštanja sadržaja akrozoma u vremenski-zavisnom maniru. Sam proces je spor i može biti regulisan promenama membrane spermatozoida kao i elemenata citoskeleta prisutnih između ćelijske membrane i spoljašnje membrane akrozoma koji mogu pomoći spermatozoidu da postepeno prolazi kroz zonu pelucidu. Na kraju, sledi nestajanje sadržaja akrozoma i vezikula koje drži na okupu matriks akrozoma. Jako delovanje hidrolitičkih enzima (proteinaza, glikohidrolaza itd.) oslobođenih na površini ZP obezbeđuje da hiperaktivirani spermatozoid prođe do jajne ćelije i olodi je (Abou-haila i Tulsiani, 2009; Hirohashi i Yanagimachi, 2018; Stival i sar., 2016).

Iako je dobro poznato da ZP obezbeđuje primarna mesta za vezivanje liganda i receptora prisutnih na anteriornom delu glave kapacitiranog spermatozoida, brojne fiziološke i nefiziološke supstance takođe mogu da indukuju akrozomsku reakciju spermatozoida kaudalnog epididimisa kao i ejakuliranih spermatozoida. Fiziološki poketači su supstance sa kojima se spermatozoidi susreću tokom *in vivo* fertilizacije (Abou-haila i Tulsiani, 2009; Hirohashi i Yanagimachi, 2018; Stival i sar., 2016). Brzi efekti steroida na spermatozoide pokazani su prvi put pre skoro tri decenije. Progesteron, koji je prisutan u ženskom reproduktivnom traktu sa pikom nivoa u kumulusnom matriksu koji okružuje jajnu ćeliju, stimuliše nekoliko funkcija spermatozoida *in vitro* uključujući kapacitaciju, hiperaktivaciju, hemotaksiju i akrozomsku reakciju. Pored povećanja intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$ , progesteron aktivira i druge signalne puteve u spermatozoidima uključujući fosforilaciju tirozina nekoliko proteina spermatozoida. Svi ovi efekti su posredovani vanjedarnim signalnim putevima većinom uključujući interakcije sa molekulima koji su prisutni na površini spermatozoida. Povećanje intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  u spermatozoidima čoveka i nekoliko drugih vrsta sisara posredovano je sperm-specifičnim kalcijumovim kanalima CatSper, čija ekspresija i funkcija su neophodne za hiperaktivnost spermatozoida. Progesteronom-posredovana aktivacija CatSper je uključena u stimulaciju hiperaktivacije spermatozoida. U humanim spermatozoidima, odgovor na progesteron u maniru povećanja intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  i akrozomske reakcije, blisko je povezan sa sposobnošću spermatozoida za *in vitro* fertilizaciju, sugerišući da je ovaj steroidni hormon fiziološki stimulator akrozomske reakcije tokom *in vitro* kao i *in vivo* fertilizacije (Tamburrino i sar., 2020).

### 2.3.2. Regulacija kontrolnih tačaka spermatogeneze testosteronom i androgenim receptorom

Studije deprivacije testosterona sprovedene kod glodara pokazale su je testosteron potreban za napredak germinativnih ćelija nakon mejoze I, dalje za prelazak okruglih u izdužene spermatide kao i za krajnje stupnjeve spermiogeneze (Sharpe 1994). Takođe, pokazano je da testosteron može delovati indirektno na završetak mejotičke deobe germinativnih ćelija. Ukidanje testosterona ili izbacivanje (tzv. “knock-out”) androgenog receptora u Sertolijevim ćelijama dovodi do 3 velika poremećaja fertiliteta. Prvo, integritet krvno-testikularne barijere je kompromitovan, što dovodi do izlaganja post mejotičkih germinativnih ćelija, ranije u izdvojenom specijalizovanom okruženju, autoimunom napadu citotoksičnih faktora. Drugo, postoji zastoj u konverziji okruglih spermatida u izdužene spermatide zbog defekta u ćelijskom povezivanju koje uzrokuje prerano odvajanje okruglih spermatida od Sertolijevih ćelija. Treće, zreli spermatozoidi ne mogu biti oslobođeni od Sertolijevih ćelija i germinativne ćelije bivaju fagocitirane od strane Sertolijevih ćelija. Korišćenjem Cre-Lox kondicionalne knock-out tehnike za stvaranje miševa koji nemaju AR u Sertolijevim ćelijama obezbeđeno je bolje razumevanje efekta testosterona na Sertolijeve ćelije. Studije su pokazale da sa nedostatkom AR u Sertolijevim ćelijama, spermatogeneza miševa ne napreduje posle pahiten ili diplotene faze mejotičke deobe, i da integritet kompleksa povezivanja koji nadoknađuje krvno-testikularnu barijeru nije održan (Meng i sar., 2005). Pokazano je da androgeni regulišu ekspresiju proteina tesnih veza krvno-testikularne barijere kao i njihovu lokalizaciju (Willems i sar., 2010).

### 2.4. Mitohondrije i njihov značaj u spermatozoidima

Mitohondrije su anatomski definisane kao organele sa dvostrukom membranom: spoljašnja mitohondrijalna membrana koja okružuje unutrašnju membranu, između kojih se nalazi međumembranski prostor. Spoljašnja mitohondrijalna membrana (*engl.* Outer mitochondrial membrane, OMM) poseduje nespecifične proteinske pore, porine, koje obezbeđuju prolazak jona i metabolita manjih od 10 kDa. Unutrašnja membrana mitohondrija (*engl.* Inner mitochondrial membrane, IMM) mesto je produkcije ATP-a, kontrole transporta jona i metabolita kao i oksidativnog statusa ćelije. IMM okružuje gusti, proteinom bogati matriks, sa brojnim kristama i invaginacijama koje povećavaju površinu unutrašnje membrane važne za produkciju energije. Za pravilno funkcionisanje mitohondrija, IMM mora biti intaktna i nepropusna (Spinelli i Haigis, 2018; Yu i sar., 2020). Mitohondrijalni membranski potencijal objašnjava se protonskim gradijentom koji se formira prolaskom elektrona kroz komponente elektron-transportnog lanca, koji se dalje koristi za stvaranje ATP-a od strane ATP sintaze. Smanjen membranski potencijal mitohondrija, ili depolarizacija, ukazuje na oštećenja mitohondrija i poteškoće ćelije da zadovolji svoje energetske potrebe. Dok sa druge strane, neregulisana hiperpolarizacija može dovesti do povećanog stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (*engl.* reactive oxygen species, ROS) i oštećenja ćelije. Oksidativna fosforilacija (OXPHOS) je glavni put stvaranja energije u ćeliji, i odvija se u mitohondrijama. Kompleks respiratornih enzima elektron-transportnog lanca nalazi se na unutrašnjoj membrani mitohondrija i uključuje NADH-dehidrogenazu (Kompleks I), sukcinat dehidrogenazu (Kompleks II), citohrom  $bc_1$  (Kompleks III) i citohrom oksidazu (Kompleks IV). Svi respiratorni kompleksi, sa izuzetkom Kompleksa II, prenose protone duž IMM, doprinoseći protonskom gradijentu. Kiseonik se redukuje do vode na nivou Kompleksa IV što predstavlja glavni korak potrošnje kiseonika u ćelijskom disanju. Merenje potrošnje kiseonika na ovom koraku predstavlja pozitivan indikator zdravlja mitohondrija. Na kraju, kompleks V, ili ATP sintaza, odgovoran je za sintezu ATP-a



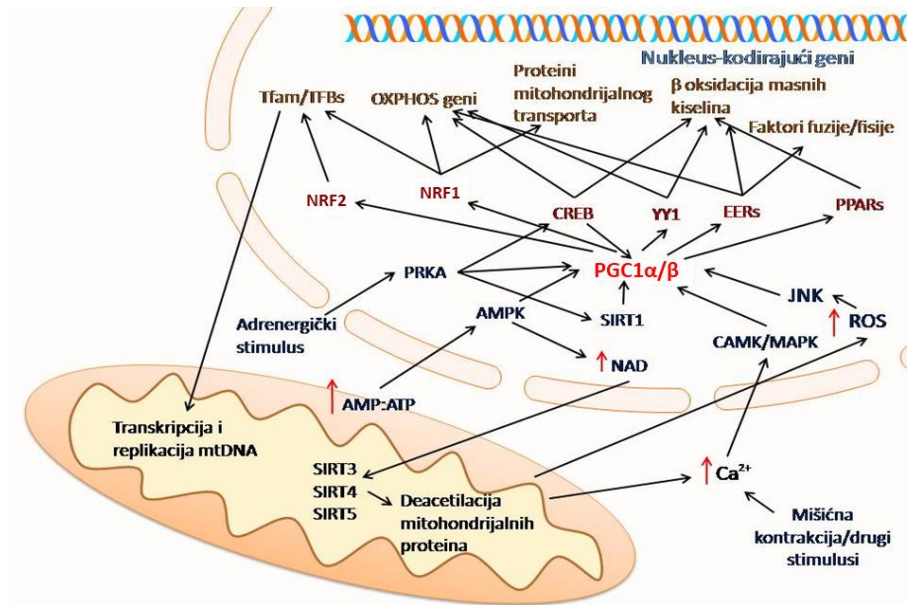
koristeći energiju pumpanja protona kroz IMM. Zbog toga se tradicionalno smatraju ćelijskim energetskim fabrikama. Dodatno, mitohondrije imaju važnu ulogu u skladištenju i signalizaciji kalcijuma kao i apoptozi. Pravilna regulacija mitohondrijalne mase, distribucija i aktivnost mitohondrija glavni su aspekti održavanja ćelijske homeostaze (Palikaras i Tavernarakis, 2014; Spinelli i Haigis, 2018; Yu i sar., 2020). Homeostazu mitohondrijalne mreže održavaju dobro koordinisani, procesi mitohondrijalne dinamike uključujući složenu mitohondrialnu mašineriju za unos proteina (mitohondrijalni transduceom), kretanje mitohondrija do određenih mesta u ćeliji, mitohondrijalnu biogenezu, mitofuziju, mitofisiju i mitofagiju (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Scarpulla, 2008; Scarpulla i sar., 2012). Mitohondrijalna biogeneza i mitohondrijalna autofagija (mitofagija) regulišu ćelijsku adaptaciju u odgovoru na nepravilno funkcionisanje mitohondrija. Stoga su procesi stvaranja novih, zdravih mitohondrija i eliminacija oštećenih mitohondrija visoko regulisani procesi koji utiču kako na homeostazu mitohondrija, tako i na ćelijsku homeostazu. Značaj koordinacije između ova dva procesa potkrepljen je dokazima koji pokazuju da je povećan sadržaj mitohondrija često povezan sa ozbiljnim patološkim stanjima. Sličan proces progresivnog nakupljanja mitohondrija primećen je tokom starenja u mnogim ćelijskim tipovima različitih organizama od kvasaca do sisara. Međutim, molekularni mehanizmi koji doprinose povećanju mase mitohondrija i poremećaju homeostaze mitohondrija ostaju uglavnom nedostižni (Palikaras i Tavernarakis, 2014).

#### **2.4.1. Mitohondrijalna biogeneza – transkripcioni faktori uključeni u mitohondrijalnu biogenezu kao i molekularni putevi koji je regulišu**

Mitohondrije su semi-autonomne organele koje poseduju sopstveni cirkularni genom. mtDNK kodira 13 proteina koji su važni za funkcionisanje kompleksa respiratornog lanca, 22 transportne RNK (tRNK) i dve ribozomalne RNK (rRNK). Većina mitohondrijalnih proteina kodirani su nuklearnim genima, sintetisani su u citoplazmi i nakon toga transportovani u mitohondrije. Mitohondrijalna biogeneza je sofisticirani proces sa velikim brojem koraka, uključujući transkripciju i translaciju mtDNK, translaciju transkriptata poreklom od jedarne DNK, regrutovanje novosintetisanih proteina i lipida, transport u mitohondrije i uklapanje mitohondrijalnih i jedarnih produkata u prošireni retikulum mitohondrija (Palikaras i Tavernarakis, 2014; Popov, 2020; Scarpulla i sar., 2012). Prostorno i vremenski regulisana mitohondrijalna biogeneza ostvarena je aktivacijom nekoliko transkripcionih faktora, u odgovoru na različite stimuluse, kao što su dostupnost nutrijenata, hormoni, faktori rasta, promene temperature i drugi. Među tim transkripcionim faktorima su nuklearni transkripcioni faktori 1 i 2 (*engl.* Nuclear respiratory factor, NRF) receptori povezan sa estrogenom (*engl.* Estrogen-related receptor, ERR), ERR $\alpha$ , ERR $\beta$ , ERR $\gamma$ , kao i glavni regulator mitohondrijalne biogeneze PGC1 $\alpha$  (*engl.* peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha, PGC1 $\alpha$ ). Takođe, mitohondrijalna biogeneza regulisana je i na posttranskripcionom nivou. Pokazano je da je translokaza spoljašnje membrane (*engl.* Translocase of outer membrane, TOM) fosforilisana od strane citosolnih kinaza, kao što su kazein kinaze 1 i 2 i protein kinaza A (PRKA), stimuliše ili inhibiraše import u mitohondrije i mitohondrijalnu biogenezu (Palikaras i Tavernarakis, 2014; Scarpulla i sar., 2012). NRF1 i NRF2 upravljaju ekspresijom brojnih proteina važnih za mitohondrije. Transkripciona aktivnost NRF1 je povezana sa ekspresijom brojnih subjedinica respiratornog kompleksa mitohondrija, enzima biosinteze hema, proteina važnih za transportnu mašineriju na membrani mitohondrija, mitohondrijalnih ribozomalnih proteina i sintaza tRNK kodiranih genima jedarne DNK. Osim toga, i NRF1 i NRF2 regulišu transkripciju mitohondrijalnog transkripcionog faktora A (*engl.* mitochondrial transcription factor A, TFAM) i transkripcionog faktora B (*engl.* Transcription factor B, TFB), koji su važni regulatori

transkripcije i replikacije mtDNK.  $ERR\alpha$ ,  $ERR\beta$  i  $ERR\gamma$  su receptori članovi porodice nuklearnih receptora i stimulišu mitohondrijalnu biogenezu u odgovoru na stimulaciju hormonima. Poznato je da  $ERR\alpha$  reguliše ekspresiju jedarnih gena koji kodiraju faktore važne za funkcionisanje mitohondrija, kao što su faktori uključeni u oksidativnu fosforilaciju, oksidaciju masnih kiselina, Krebsov ciklus i mitohondrijalnu fuziju i fisiju. Kompleksnija regulacija mitohondrijalne biogeneze postignuta je kroz familiju koaktivatora receptora aktiviranih proliferatorom peroksisoma (*engl.* Peroxisome proliferator activated receptors, PPARs). Najbolje proučen član ove porodice,  $PGC1\alpha$ , funkcioniše kao transkripcioni koaktivator i upravlja aktivnosti različitih transkripcionih faktora uključenih u mitohondrijalnu proliferaciju, uključujući NRF i  $ERR$  transkripcione faktore. Povećanje ekspresije  $PGC1\alpha$  rezultuje povećanom mitohondrijalnom biogenezi uključujući povećanu mitohondrijalnu masu, komplekse importa proteina, kapacitet ćelijskog disanja i oksidacije masnih kiselina. Studije koje ispituju bolesti mitohondrija koristeći miševske kao eksperimentalne modele, pokazuju da prekomerna ekspresija  $PGC1\alpha$  ublažava mitohondrijalne defekte i stimuliše proliferaciju mitohondrija. Dodatno, studije na humanim ćelijama sa deficitom Kompleksa III ili Kompleksa IV pokazuju da ekspresija  $PGC1\alpha$  i/ili njegovog homologa  $PGC1\beta$ , poboljšava ćelijsko disanje. Stoga je  $PGC1\alpha$  okarakterisan kao master regulator mitohondrijalne biogeneze i funkcije (Dominy i Puigserver, 2013; Palikaras i Tavernarakis, 2014; Popov, 2020).

Mitohondrijalna homeostaza je takođe regulisana signalnim putevima koji na kraju konvergiraju do gorepomenutih transkripcionih koaktivatora. Smanjenje ATP-a ili preko poremećene ATP sinteze ili povećane potrošnje ATP-a, dovodi do povećanja unutarćelijskog nivoa AMP/ATP odnosa, što povećava enzimsku aktivnost AMP-aktivirane protein kinaze (*engl.* AMP-activated protein kinase, AMPK). AMPK funkcioniše kao ćelijski energetski biosenzor koji je aktiviran u situacijama koje zahtevaju visok nivo energije. Aktivacija AMPK stimuliše mitohondrijalnu biogenezu kroz transkripcionu regulaciju nekoliko gena kodiranih nuklearnim genomom. Studije su pokazale da AMPK direktno fosforiliše  $PGC1\alpha$  i indukuje mitohondrijalnu biogenezu. Ona takođe stimuliše Sirtuin 1 (SIRT1) aktivnost povećavajući ćelijski nivo  $NAD^+$ . Dalje, SIRT1 vrši deacetilaciju  $PGC1\alpha$ , što dalje stimuliše oksidativni metabolizam i povećanje broja mitohondrija. Takođe, promene u koncentraciji ćelijskog kalcijuma utiču na fiziologiju mitohondrija kroz aktivaciju p38 mitogen-aktivirane kinaze i kalcijum/kalmodulin-zavisne kinaze (*engl.* calcium/calmodulin-dependent kinase, CaMK), koja direktno menja aktivnost  $PGC1\alpha$ . Zajedno sa aktivacijom AMPK i CaMK, kinaza mTOR (*engl.* mammalian target of rapamycin, mTOR) moduliše mitohondrijalnu biogenezu i bioenergetiku kroz transkripciono-zavisne i -nezavisne molekularne mehanizme (Dominy i Puigserver, 2013; Palikaras i Tavernarakis, 2014; Popov, 2020).



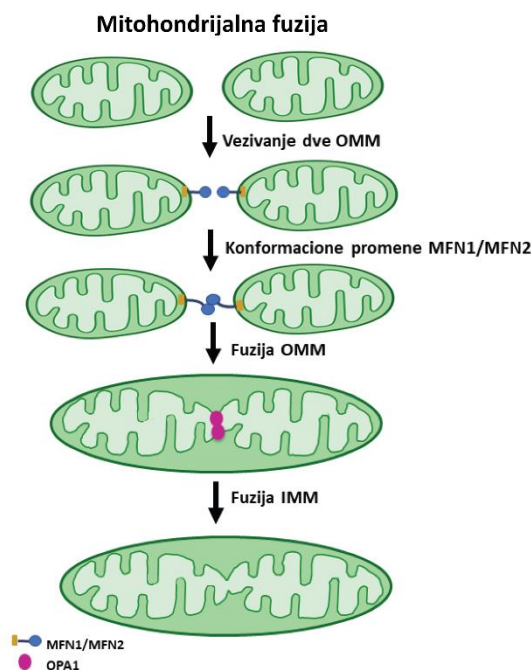
**Slika 2.4.1. Šematski prikaz transkripcijskih kompleksa i signalnih puteva koji regulišu ekspresiju gena uključenih u regulaciju funkcije mitohondrija**  
(modifikovano iz rada Dominy i Puigserver 2013).

## 2.4.2. Mitohondrijalna fuzija i fisija - transkripcioni faktori uključeni u mitofuziju i mitofisiju kao i molekularni putevi koji ih regulišu.

Pored njihove esencijalne metaboličke funkcije, mitohondrije su i glavni izvori ROS. Eukariotske ćelije evolucijom su razvile nekoliko mehanizama kontrole njihovog kvaliteta da bi očuvale homeostazu mitohondrija i sprečile ćelijska oštećenja. Mitohondrije poseduju sopstveni proteolitički sistem za praćenje i degradaciju pogrešno savijenih proteina ili nesavijenih proteina unutar kompartmana mitohondrija. Pored toga, sistem proteozoma uključen je u eliminaciju oštećenih mitohondrijalnih proteina kao i proteina koji nisu uspešno uneti u mitohondrije. Pored mitohondrijalnog proteolitičkog sistema i proteozoma, dokazi ukazuju da vezikule poreklom iz mitohondrija nose sadržaj određenih mitohondrija i dostavljaju ga lizozoma i peroksizomima za degradaciju (Palikaras i Tavernarakis, 2014). Mitohondrije su veoma dinamične organele i stalno menjaju svoj oblik kroz procese fuzije i fisije. Balans između fuzije i fisije kontrolisan je velikim brojem proteina koji oblikuju mitohondrije a kodirani su genima jedarnog genoma. Osim morfologije mitohondrija, procesi mitohondrijalne dinamike regulišu i veličinu, broj, distribuciju, kontrolu kvaliteta, i transport mitohondrija u ćeliji. Aktivacijom fisije i/ili inhibicijom fuzije može doći do fragmentacije mitohondrija, dok u obrnutom slučaju aktivacije fuzije i/ili inhibicije fisije može doći do izduživanja mitohondrijalne mase. Veliki broj dokaza pokazuje da loša regulacija mitohondrijalne dinamike uzrokuje disfunkciju mitohondrija, utičući dalje na razvoj mnogih bolesti u humanoju populaciji (Palikaras i Tavernarakis, 2014; Yu i sar., 2020).

U sisarskim ćelijama, postoje tri ključna dinaminu-srodna proteina koji kontrolišu mitohondrijalnu fuziju, mitofuzin 1 (MFN1), mitofuzin 2 (MFN2) i OPA1 (*engl.* Optic atrophy 1, OPA1). Svi oni predstavljaju dinaminu-srodne GTPaze i njihova aktivacija dešava se kroz tri

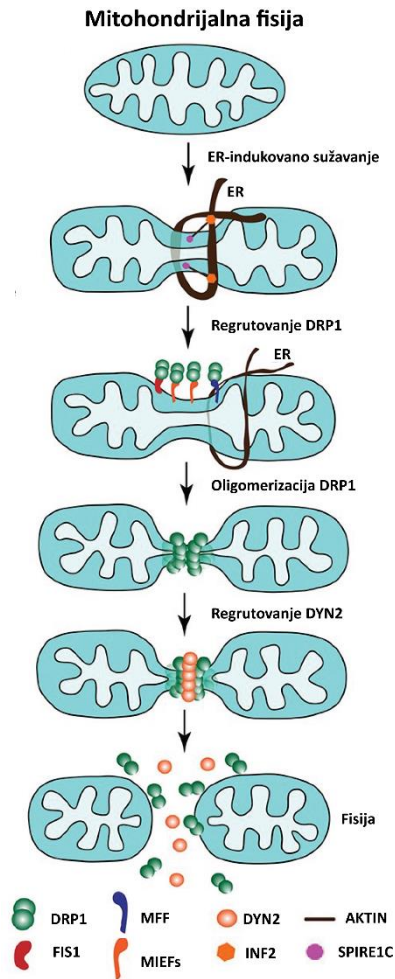
koraka u procesu mitohondrijalne fuzije. Dve mitohondrije se povezuju i formiraju strukturu priključnog prstena oko kontaktnih tačka između spoljašnjih membrana. Zatim, se dve spoljašnje membrane spajaju međusobno potpomognute hidrolizom guanozin trifosfata (GTP), nakon čega sledi završno spajanje dve unutrašnje membrane. Oba proteina, i MFN1 i MFN2 nalaze se na spoljašnjoj membrani mitohondrija. Studije kristalne strukture ovih proteina pokazale su da MFN1 i MFN2 mogu formirati stabilne homodimere preko njihovih GTPaznih domena, koji su izuzetno važni za fuziju spoljašnje membrane mitohondrija (Li i sar., 2019). MFN1 i MFN2 takođe mogu formirati i heterodimere preko njihovih GTPaznih domena. Prekomerna ekspresija MFN1 ili MFN2 može dovesti do perinuklearnog mitohondrijalnog klasteringa dok ćelije koje imaju deficit MFN1/2 sadrže prekomerno fragmentisane mitohondrije. Iako su oba proteina izuzetno važna za održavanje morfologije mitohondrija, MFN1 ima značajno veću GTP-aznu aktivnost od MFN2. Osim u kontroli mitohondrijalne morfologije, MFN2 ima i druge specifične funkcije koje nisu primećene kod MFN1. Na primer, MFN2 je uključen u povezivanje mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma, energetski metabolizam i insulinski signaling, mitofagiju i apoptozu. OPA1 protein je takođe dinaminu-srodna GTPaza lokaliovana na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani i esencijalan je za fuziju unutrašnje membrane mitohondrija. Procesovanje OPA1 može biti afektovano promenom mitohondrijalnog membranskog potencijala i proapoptotičnim stimulusima. Kaspaza 3 može dovesti do isecanja N-terminalnog dela OPA1 što rezultuje fragmentacijom mitohondrija. Pokazano je da smanjena ekspresija OPA1 utiče na fragmentaciju mitohondrija dok povećana ekspresija OPA1 stimuliše izduživanje mitohondrija (Palikaras i Tavernarakis, 2014; Yu i sar., 2020).



**Slika 2.4.2. Šematski prikaz procesa mitohondrijalne fuzije.**  
 Preuzeto iz Yu i sar. 2020, uz manje modifikacije. Šema kreirana u BioRender.com

Strukturne analize pokazale su da dinaminu-sličan protein 1 (*engl.* Dynamin related protein 1, DRP1) postoji u dinamičkoj ravnoteži između mnogobrojnih oligomernih stanja u ćeliji, i minimalnih funkcionalnih stanja u obliku dimera. DRP1 je zapravo glavni regulator i ima centralnu ulogu u mitohondrijalnoj fisiji. U ćeliji DRP1 je najčešće prisutan u citoplazmi, ali regrutovanjem preko njegovih mitohondrijalnih receptora dolazi do površine mitohondrija, gde formira komplekse koji okružuju površinu mitohondrija i okidaju mitohondrijalnu fisiju preko njegove GTPazne aktivnosti. Regrutovanje DRP1 do mitohondrija posredovano je sa četiri proteina usidrena na spoljašnjoj membrane mitohondrija: protein fisije 1 (*engl.* Fission protein 1, FIS1), faktor mitohondrijalne fisije (*engl.* Mitochondrial fission factor, MFF), mitohondrijalni faktor elongacije 1 (*engl.* Mitochondrial elongation factor 1, MIEF1/MiD51), mitohondrijalni faktor elongacije 2 (*engl.* Mitochondrial elongation factor 2, MIEF2/MiD49). Stoga, DRP1 i njegova četiri receptora FIS1, MFF, MIEF1 i MIEF2 čine glavne komponente kanonske mašinerije mitohondrijalne fisije kod sisara (Palikaras i Tavernarakis, 2014; Yu i sar., 2020).

Protein kinaza A, jedna od najbolje proučenih citosolnih kinaza, nalazi se na površini mitohondrija ima regulatornu ulogu u održavanju mitohondrijalne aktivnosti. Takođe, DRP1 protein menahizmom hidrolize GTP-a formira prstenastu strukturu koje obezbeđuju skupljanje i „urezivanje“ u mitohondrije. Fosforilacija na Serinu 656 DRP1 proteina glavno je mesto aktivnosti PRKA u PC12 ćelijama pacova, i ovakva fosforilacija inhibira fisiju mitohondrija i smanjuje ćelijsku osetljivost na apoptotičke stimulse. Iako je navedeno mesto fosforilacije (Ser656) blizu efekorskog domena, nema značajne promene u hidrolizi GTP među varijantama Ser656 (Cribbs i Strack, 2007). Sa druge strane, u HeLa ćelijama, PRKA fosforiliše DRP1 protein na mestu Ser637, što može favorizovati inaktivaciju GTPaze i lokalizaciju Drp1 u citoplazmu, a ne regrutovanje u mitohondrije, prigušujući fisiju mitohondrija (Yu i sar., 2020). Ovakvi rezultati sugerišu da cAMP/PRKA regulišu mitohondrijalnu fisiju uglavnom preko modulacije DRP1, i njihov efekat na mitohondrijalnu fisiju zavisi od mesta fosforilacije i transporta DRP1 (Ren i sar., 2020). Najbolje okarakterisana MAPK sa potvrđenim regulatornim efektima na procese mitohondrijalne dinamike je ERK1/2. Aktivirana ERK2 kinaza fosforiliše DRP1 protein na mestu Ser616, rezultujući povećanjem fragmentacije mitohondrija. ERK kinaza takođe inhibiše mitohondrijalnu fuziju fosforilišući MFN1 (Thr562), ukazujući na značajnu ulogu ove kinaze u modulaciji morfologije mitohondrija (Ren i sar., 2020).



**Slika 2.4.3. Šematski prikaz procesa mitohondrijalne fisije.**

Preuzeto iz Yu i sar. 2020, uz manje modifikacije.

### 2.4.3. Mitohondrijalna autofagija - transkripcioni faktori uključeni u mitofagiju kao i molekularni putevi koji je regulišu

Citosolna E3 ubikvitin ligaza Parkin i kinaza PINK1 (*engl.* mitochondrial phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced kinase 1, PINK1) koje su povezane sa autozomno recesivnom formom parkinsonizma, uključene su u proces mitofagije. U odgovoru na oštećenja mitohondrija, PINK1 biva stabilizovana na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani i dalje regrutuje Parkin ligazu. Nakon traslokacije, Parkin vrši ubikvitinaciju nekoliko proteina spoljašnje membrane mitohondrija, što rezultuje fragmentacijom i izolacijom oštećenih mitohondrija iz pula zdravih mitohondrija. Sve to dovodi do prepoznavanja oštećenih mitohondrija i njihovoj degradaciji od strane mašinerije autofagozoma. Postavlja se pitanje, kako akumulacija PINK1 na membrani mitohondrija stimuliše regrutaciju Parkin proteina. Istraživanja na kardiomiocitima pokazala su da mitohondrijalni proteini fuzije mitofuzin 1 i 2 (MFN1 i MFN2) uključeni u proces mitofagije mnogo više nego što se ranije smatralo. Ova istraživanja pokazuju da PINK1 fosforiliše MFN2, koji dalje služi kao stimulisani receptor koji regrutuje Parkin do nefunkcionalnih mitohondrija (Chen i Dorn, 2013; Pallanck, 2013). Dalje, Parkin

stimuliše eliminaciju mitohondrija preko proteina autofagije sa kojima je povezan, ne menjajući njihov status ubikvitinacije. Nakon depolarizacije mitohondrija protein stimulator autofagije, biva regrutovan od strane Parkin proteina, u mitohondrije i stimuliše uklanjanje mitohondrija. Ambra 1 stimuliše autofagiju i uklanjanje mitohondrija stimulišući formiranje nove fagofore (Palikaras i Tavernarakis, 2014).

#### 2.4.4. Mitohondrije u spermatozoidima

Uloga mitohondrija u fertilitetu muškaraca ne može se zanemariti: fundamentalna je ne samo za pokretljivost spermatozoida već i za njihovu hiperaktivaciju, kapacitaciju i akrozomsku reakciju i oplodnju. Stoga se novije studije, na temu fiziologije spermatozida, fokusiraju na ovu važnu organelu kao biomarker zdravlja i fertiliteta spermatozoida. Disfunkcija mitohondrija spermatozoida takođe je povezana patogenezom seminalnog oksidativnog stresa, glavnog elementa odgovornog za mnoge slučajve idiopatske neplodnosti muškaraca (Barbagallo i sar., 2020; Moraes i Meyers, 2018). Pokazano je da spermatozoidi uglavnom poseduju od 50 do 70 mitohondrija. Mitohondrije spermatozoida pokazuju posebne karakteristike. One su isključivo ograničene na vratni deo (*engl.* mid-piece), usko umotane oko aksoneme. Tokom spermiogeneze, mitohondrije se poređaju u liniju i spiralno se obmotaju oko repa (*engl.* flagellum) da bi formirale debeo mitohondrijalni omotač, odmah ispod plazma membrane ćelije. Mitohondrijalna kapsula je stoga oblikovana mnogobrojnim disulfidnim mostovima formiranim između cisteina i prolinom-bogatih selenoproteina. Dodatno, ovakva mitohondrijalna struktura u spermatozoidima takođe obezbeđuje dodatnu strukturnu potporu repu, povećavajući njegovu čvrstinu, a takođe i štiti mitohondrije od hipoosmotskog stresa (Moraes i Meyers, 2018). Ova zamršena veza sa valkastim omotačem čini mitohondrije spermatozoida posebno teške za izolaciju standardnim separacionim metodama. Štaviše, mnogi proteini i enzimi kao što su subjednica IVb citohrom oksidaze, E1 piruvat dekarboksilaza i kreatin kinaza (*engl.* Creatine kinase, CK) su izoforme koje su prisutne samo u mitohondrijama spermatozoida (Barbagallo i sar., 2020; Ramalho-Santos i Amaral, 2013). Čvrst raspored mitohondrija oko sredine spermatozoida često se koristi kao primer strategije za koncentrisanje proizvodnje ATP-a za određenu funkciju, u ovom slučaju kretanje spermatozoida. Zapravo, mitohondrijalni parametri (mitohondrijalni membranski potencijal, aktivnost kompleksa elektron-transportnog lanca) pozitivno koreliraju sa funkcijom spermatozoida. Takođe, pokazano je da sposobnost mitohondrija spermatozoida da akumuliraju kalcijum ima važnu ulogu u signalnim putevima u spermatozoidima (Ramalho-Santos i Amaral, 2013).

Mnoge studije na temu bioenergetike mitohondrija spermatozoida skoncentrisane su na sledeće pitanje: koji je glavni biohemijski put koji obezbeđuje energiju za pokretljivost spermatozoida, glikoliza ili oksidativna fosforilacija (OXPHOS)? Koncept koji je proizašao iz brojnih studija je da procesi glikoliza i OXPHOS nisu međusobno isključivi i da spermatozoidi pokazuju veliku prilagodljivost u njihovom metabolizmu koristeći samo glikolizu, samo oksidativnu fosforilaciju ili kombinaciju oba metabolička puta za stvaranje energije, spram dostupnih supstrata u ženskom genitalnom traktu (Ruiz-Pesini i sar 2007). Konkretno, Zhu i saradnici su skoro pokazali da je mitohondrijalna oksidativna fosforilacija aktivirana da sa ciljem stvaranja ATPa u uslovima niske koncentracije glukoze. Oni su inkubirajući spermatozoide nerastova sa različitim dozama glukoze zaključili da se progresivna pokretljivost spermatozoida značajno povećava sa smanjenjem koncentracije glukoze u medijumu. Takođe su pokazali i da se u prisustvu mitohondrijalnog translacionog inhibitora d-hloramfenikola, sintza mitohondrijalnih proteina, mitohondrijalna aktivnost i nivo ATP-a smanjuju, i kao posledica toga smanjuje se i brzina linearne pokretljivosti spermatozoida. Ovi rezultati ukazuju da obrazac pokretljivosti



spermatozoida zavisi od dostupnih supstrata i dalje aktiviranih biohemijskih puteva. Iako je glikoliza važna za hiperaktiviranu pokretljivost, linearna pokretljivost velike brzine indukovana je aktivacijom mitohondrija u uslovima niskog nivoa glukoze (Barbagallo i sar., 2020).

Novija istraživanja ukazuju na potencijal mitohondrijalne DNK kao neinvazivni biomarker za kvalitet spermatozoida (Zhang i sar 2016). Sisarske mitohondrije sadrže sopstveni genom nasleđen od majke, koji predstavlja cirkularni genom veličine 16 kilobaza, dvolančani DNK molekul koji uključuje 37 gena koji kodiraju 13 peptida, 22 transportne RNK i dve ribozomalne RNK. 13 subjedinica peptida kodirano mitohondrijalnom DNK (mtDNK) važne su komponente kompleksa elektron-transportnog lanca. Bez obzira na to, nije poznato da li mtDNK ima funkcionalnu ulogu u spermatozoidima nakon spermatogeneze obzirom da ona nije očinski nasledna. Svaka mitohondrija sadrži između 0 i 11 kopija mtDNK, i broj kopija se smatra pouzdanim neinvazivnim markerom kvaliteta spermatozoida i njegovog potencijala za oplodnju. Broj kopija mitohondrijalne DNK u spermatozoidima određena je kod nekoliko vrsta uključujući ljude, pse i konje, kao važan dokaz da povećan broj kopija ukazuje na smanjen kvalitet spermatozoida. Broj kopija mtDNK u humanim spermatozoidima varira od nula do 226 kopija po spermatozoidu, gde je povećan broj kopija povezan sa abnormalnim parametrima speme kao što su smanjena ili odustvo pokretljivosti. Interesantno je da u drugim tipovima tkiva, smanjenje mtDNK se smatra ozbiljnim patološkim poremećajem, karakterisanim ekstremnim smanjenjem mtDNK u tkivno-specifičnom maniru. Ovo ukazuje na jedinstvenost spermatozoida koji imaju tendenciju za relativno malim brojem mtDNK ali potpuno funkcionalnim mitohondrijama. Nadalje, broj kopija nije uvek bio dosledan među genima u studijama koje su ispitivale više od jednog gena, ukazujući na fragmentaciju mitohondrijalnog genoma tokom spermatogeneze. Fragmentisani genomi bi najverovatnije prolazili dalje degradacione procese u mitohondrijama, što se smatra jednim od mehanizama sprečavanja nasleđivanja očinske mtDNK. Drugi mehanizam sprečavanja nasleđivanja očinske mtDNK je smanjenje replikacija mtDNK tokom spermatogeneze. Ovaj mehanizam nije potpuno opisan, ali se smatra da uključuje smanjenja mitohondrijalnog transkripcionog faktora A, koji je važan za početak DNK replikacije, i mitohondrijalne DNK polimeraze gama, koja je odgovorna za replikaciju i popravku mtDNA. Kod nekih vrsta, mnoge mitohondrije uključujući mtDNK, bivaju uklonjene tokom elongacione faze spermiogeneze u rezidualnim telima ili citoplazmatskim kapima. Post-fertilizaciona autofagija mitohondrija spermatozoida je još jedan od pretpostavljenih mehanizama sprečavanja prenosa očinskih mitohondrija. Mitohondrije oca koje zaostanu nakon oplodnje prolaze ubrzo kroz proces uikvitinacije u citoplazmi oocite. U najvećem broju slučajeva, mitohondrije spermatozoida u oociti bivaju eliminisane pre aktivacije genoma embriona kod određenih vrsta. U koliko ne bude uklonjena ili degradirana, očinska mtDNK biva veoma razblažena u oociti, obzirom da oocita sadrži više od 200,000 kopija mtDNK, time limitirajuću opšti uticaj očinske mtDNK. S svim navedenim strategijama za sprečavanje prenosa očinske mtDNK, jasno je da povećan broj kopija ne bi bio poželjan i stoga predstavlja neki nivo disfunkcije spermatozoida. Zbog fizičke blizine mtDNK komponentama elektron-transportnog lanca i stalnog stvaranja ROS tokom normalnog metabolizma mitohondrija, moglo bi da dođe do povećang oštećenja mtDNK. Takođe je poznato da je mtDNK 10 do 100 puta više podložna oksidativnim oštećenjima u odnosu na jedarnu DNK zbog nezaštićene prirode ove DNK molekule, koja nije zaštićena vezivanjem protamina kao jedarna DNK. Obzirom da su spermatozoidi krajnje ćelije, nije poznato da li oštećenja i delecije mtDNK imaju iste posledice kao i ćelije koje aktivo prolaze kroz proces mitohondrijalne biogeneze. Velike delecije (4.9 kb i 7.4 kb) koje su uobičajene za druge ćelijske tipove i koje imaju štetne efekte, primećene su u nekim uzorcima neplodnih



muškaraca, ali nije poznato da li su ove delecije uzrok štetnih efekata na spermatozoide (Barbagallo i sar., 2020; Moraes i Meyers, 2018; Ramalho-Santos i Amaral, 2013).

#### 2.4.5. Signalni putevi uključeni u regulaciju mitohondrijalne dinamike kao i funkcionalnosti spermatozoida – cAMP i MAPK signalni putevi

Mnogi signalni putevi detaljno su istraživani u somatskim ćelijama, dok su informacije o karakterizaciji ovih signalnih puteva u germinativnim ćelijama veoma ograničene. Poslednjih godina neke studije ukazale su da hormoni, citokini i faktori rasta regulišu procese kao što su spermatogeneza i pokretljivost spermatozoida i da se njihov nivo razlikuje u sekretima genitalnog trakta fertilnih i infertilnih muškaraca. Nekoliko signalnih puteva koji su opisani u somatskim ćelijama takođe su dokumentovani i u spermatozoidima: apoptoza, mitogenom-aktivirana protein kinaza (MAPK) i cAMP/PRKA signalni put, između ostalih. Pored brojnih napora, nije dostupno mnogo informacija o biološkoj značajnosti specifičnih signalnih puteva u humanim spermatozoidima ili njihove moguće uloge u muškoj infertilnosti (Silva i sar., 2015).

Pokazano je da je ciklični guanozin monofosfat (cGMP) esencijalan za događaje koji se dešavaju tokom kapacitacije, uključujući aktivaciju pokretljivosti, hiperaktivaciju i sposobnost da prođu akrozomsku reakciju. Jasni su dokazi da se mnogi efekti cAMP-a ispoljavaju aktivacijom protein kinaze A. Međutim, i drugi cAMP-vezujući proteini imaju ulogu u nekim od navedenih procesa. Dodatno, cAMP i njegovi ciljni molekuli regulišu različite kapacitacijom-izazvane signalne događaje uključujući: 1) remodelovanje lipida membrane, 2) hiperpolarizacija plazma membrane spermatozoida, 3) povećanje unutarćelijskog pH, 4) povećanje unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  i 5) povećanje fosforilacije tirozinskih ostataka proteina (Buffone i sar., 2014; Wertheimer i sar., 2013). Kapacitacija može biti stimulisana *in vitro* u ćelijskim medijumima koji sadrže  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , izvore energije i holesterol. Jedan od prvih signalnih događaja nakon izlaganja spermatozoida medijumom za izazivanje kapacitacije, je povećanje nivoa cAMP-a. Interesantno je da je ovo inicijalno povećanje nivoa cAMP brzo redukovano. Smanjenje nivoa cAMP-a može biti pripisano hidrolizi fosfodiesterazama ili izbacivanju cAMP-a specifičnim transporterima. Povećanje nivoa cAMP odmah aktivira PRKA. Kod svih ispitivanih vrsta sisara, primećeno je da je PRKA na maksimalnom nivou za manje od jednog minuta od izlaganja uslovima kapacitacije. Ova brza regulacija cAMP signalnog puta indukovana je od strane  $\text{HCO}_3^-$  (u medijumu za kapacitaciju), ukazujući da je ova regulacija posredovana solubilnom ADCY (Buffone i sar., 2014). Pokazano je da su miševi kojima nedostaje subjedinica specifična za spermatozoide, katalitička subjedinica  $\alpha 2$  ( $\text{Ca}2$ ), sterilni, i da njihovi spermatozoidi nemaju mogućnost hiperaktivacije. Kod kičmenjaka, cAMP sintetisan je od strane dva tipa adenilil ciklaza: sveprisutna familija transmembranskih adenilil ciklaza (*engl.* Transmembrane adenylyl cyclases, tmACs) sa devet članova (ADCY1-9) i solubilna adenilil ciklaza kodirana jednim genom (*Adcy10*). Ranije se smatralo da je ova adenilil ciklaza (sADCY) ograničena samo na testis i spermatozoide (Braun i Dods, 1975), ali danas je poznato da je prisutna i u drugim tipovima ćelija. Suprotno tmACs, ADCY10 neosetljiva je na heterotrimerni G protein, ali je za razliku od toga regulisana  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{Ca}^{2+}$  jonima. Farmakološke i genetičke studije pokazale su da je ADCY10 neophodna za fertilitet muškaraca, specifično za pokretljivost i proces kapacitacije. Suprotno tome, uloga i prisustvo tmACs u spermatozoidima je predmet polemike. Iako su mnoge studije zaključile prisustvo tmACs u spermatozoidima sisara, jednako veliki broj studija nije mogao naći dokaze za prisustvo tmACs u ovim ćelijama. Definišuće svojstvo tmACs je da su regulisane članovima familije heterotrimernih G proteina. Ovi kompleksi su sačinjeni od tri subjedinice ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ), od kojih svaka pripada drugoj podfamiliji (Wertheimer i sar., 2013).

Poznato je da signalni put mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK) ima važnu ulogu u prenosu signala mnogih ćelijskih procesa. U testisima, uključen je u procese ćelijskog ciklusa i diferencijaciju germinativnih ćelija, apoptoze ćelija, dinamike krvno-testikularne barijere i povezivanju Sertolijevih ćelija i germinativnih ćelija. Srž MAPK signalnog puta uključuje rednu fosforilaciju i aktivaciju tri protein kinaze: MAP kinaze kinaza (MAP2K) i MAP kinaze kinaze kinaza (MAP3K). U uslovima sresa ili aktivacijom stimulusima kao što su citokini i faktori rasta, MAP3K je aktivirana od strane MAP kinaze kinaze kinaze kinaza (MAP4K), koja interaguje sa malim G proteinima. Fosforilisana MAP3K aktiviraće MAP2K. Nakon aktivacije od strane MAP3K, dualno specifična MAP2K će dalje aktivirati MAPK direktno fosforilacijom i Tyr i Ser ili Thr ostataka. "Nizvodna" MAPK kaskada sadrži tri velike familije protein kinaza, uključujući p38 MAPK ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ), ekstracelularnim signalom-regulisana kinaza  $\frac{1}{2}$  (ERK1/2) i c-Jun N terminalna kinaza 1-3 (JNK1-3). P38 MAPK i JNK kinaze poznate su i kao stresom-aktivirane protein kinaze. Postoje i druge MAPK, kao što su ERK3, ERK5 i ERK7, koje imaju različite funkcije i drugačije su regulisane. Aktivirane MAPK dalje će fosforilisati efektore kao što su membranski proteini, citoplazmatski proteini i jedarni proteini. Krajnji rezultati ovih događaja utiču na diferencijaciju ćelijskog ciklusa, ćelijsku smrt, kretanje ćelija, status citoskeleta i unutarćelijski saobraćaj (Li i sar., 2009).

ERK1/2 i p38MAPK, ali ne i JNK1/2 detektovani su u repu spermatozoida iz ejakulata muškaraca (Almog i Naor, 2008). Postoje mnoge studije o ulozi ERK u pokretljivosti spermatozoida, ali zbog oprečnih rezultata ostaje neizvesno da li ERK stimuliše ili inhibiše pokretljivost povezanu sa kapacitacijom (Almog i Naor, 2008). Studija je pokazala ulogu ERK1/2 i p38 MAPK u regulaciji pokretljivosti spermatozoida (Almog i sar., 2008). U ovoj studiji (Almog i sar., 2008), pokazano je da ERK postaje fosforilisan da bi stimulusao pokretljivost, dok p38 MAPK biva fosforilisana da bi inhibisala pokretljivost spermatozoida. Ista studija ukazuje na pozitivnu ulogu ERK i p38 MAPK u akrozomskoj reakciji. Ovakvi rezultati naizgled pokazuju da je MAPK signalni put uključen u regulaciju kapacitacije i akrozomske reakcije (Li i sar., 2009).

Uzimajući u obzir sve prethodno navedeno, može se uvideti važnost funkcionalnosti mitohondrijalne mreže za održavanje homeostaze svih tipova ćelija, a posebno ćelija koje sintetišu steroidne hormone i učestvuju u reprodukciji. Međutim, nedostaju podaci o mitohondrijalnoj biogenezi u specifičnim ćelijama reproduktivne osovine. Stoga je predmet ove doktorske disertacije karakterizacija mitohondrijalne biogeneze i signala koji je regulišu, a kao mehanizama adaptacije specifičnih ćelijskih tipova reproduktivne osovine mužjaka, sa posebnim fokusom na spermatozoide. Karakterizacija molekularnih markera mitohondrijalne biogeneze kao i regulatornih signalnih molekula u spermatozoidima ostvarena je korišćenjem animalnih modela koji mimikriraju situacije u adultnoj humanoju populaciji kao što su stres, starenje, korišćenje Metformina ili Viagre, hipogonadalni-hipogonadizam, ćelijska insulinska rezistencija koja vodi hipogonadizmu. Zajednička karakteristika svih animalnih modela je poremećen nivo cirkulišućeg testosterona. Ovo je voma značajno jer je dobro poznata uloga testosterona u spermatogenezi i održavanju muške fertilitnosti, a nepostoje podaci o biogenezi mitohondrija steroidogenih ćelija niti spermatozoida.

# **3. Ciljevi istraživanja**

Uzimajuću u obzir značajnu ulogu mitohondrija u održanju homeostaze ćelija i čitavog organizma, opšti cilj istraživanja je karakterizacija molekularnih profila markera mitohondrijalne dinamike i regulatornih signalnih molekula kao mehanizama adaptacije specifičnih ćelijskih tipova reproduktivne osovine, sa posebnim fokusom na spermatozoide, a u uslovima poremećene homeostaze cirkulišućih androgena.

Specifični ciljevi istraživanja su vezani za različite *in vivo* modele koji mimikriraju situacije u adultnoj humanoju populaciji, a odnose se na poremećenu homeostazu cirkulišućih androgena.

(1) Karakterizacija molekularnih profila markera mitohondrijalne dinamike koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije specifičnih tipova ćelija reproduktivne osovine u uslovima akutnog i ponavljanoj psihofizičkog stresa.

Ispod su navedeni parametri koji su praćeni.

- (1.1) Nivoi stres hormona, adrenalina i kortikosterona, kao i nivoi androgena i LH u cirkulaciji.
- (1.2) Relativna ekspresija molekularnih markera mitohondrijalne biogeneze u hipotalamusu, adenohipofizi i nadbubrežnoj žlezdi.
- (1.3) Relativna ekspresija transkripata markera mitohondrijalne biogeneze u Lajdigovim ćelijama adultnih neuznemiravanih mužjaka *ex vivo* tretiranih hormonom stresa (hidrokortizonom) samim ili u kombinaciji sa antagonistom njegovih ciljnih receptora.
- (1.4) Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (1.5) Funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (1.6) Funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) *ex vivo* tretiranih hormonima stresa (adrenalinom i hidrokortizonom).
- (1.7) Koncentracija ATP-a u spermatozoidima.
- (1.8) Relativna ekspresija transkripata markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima.
- (1.9) Relativna ekspresija transkripata markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima adultnih neuznemiravanih mužjaka *ex vivo* tretiranih hormonima stresa (adrenalinom i hidrokortizonom) samih ili u kombinaciji sa antagonistima njihovih ciljnih receptora.
- (1.10) Relativna ekspresija transkripata za signalne molekule/elemente cAMP i MAPK signalnih puteva koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost kao i broj i funkcionalnost spermatozoida.

(2) Karakterizacija molekularnih profila markera mitohondrijalne dinamike koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije spermatozoida tokom oporavka organizma od akutnog psihofizičkog stresa (najčešćeg tipa stresa u humanoju populaciji) u različitim cirkadijalnim vremenima.

Ispod su navedeni parametri koji su praćeni.

- (2.1) Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (2.2) Funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (2.3) Relativna ekspresija transkripata markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima.

- (2.4) Relativna ekspresija transkripata za signalne molekule/elemente cAMP i MAPK signalnih puteva koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost kao i broj i funkcionalnost spermatozoida.

(3) Karakterizacija molekularnih profila markera mitohondrijalne dinamike koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije spermatozoida tokom ponavljano psihofizičkog stresa organizma primenjenog u različitim vremenskim tačkama u toku dana.

Ispod su navedeni parametri koji su praćeni.

- (3.1) Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (3.2) Funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (3.3) Relativna ekspresija transkripata markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima.
- (3.4) Relativna ekspresija transkripata za signalne molekule/elemente cAMP i MAPK signalnih puteva koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost kao i broj i funkcionalnost spermatozoida.

(4) Karakterizacija molekularnih profila markera mitohondrijalne biogeneze koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije spermatozoida starih mužjaka pacova.

Ispod su navedeni parametri koji su praćeni.

- (4.1) Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (4.2) Koncentracija nitrita i nivo cGMP-a u spermatozoidima.
- (4.3) Relativna ekspresija transkripata markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u spermatozoidima.
- (4.4) Relativna ekspresija transkripata za signalne molekule/elemente cAMP i MAPK signalnih puteva koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost kao i broj i funkcionalnost spermatozoida.

(5) Karakterizacija molekularnih profila markera mitohondrijalne biogeneze koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije spermatozoida hipogonadnih mužjaka pacova.

Ispod su navedeni parametri koji su praćeni.

- (5.1) Koncentracija nitrita i nivo cGMP-a u spermatozoidima.
- (5.2) Relativna ekspresija transkripata markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u spermatozoidima.
- (5.3) Relativna ekspresija transkripata za signalne molekule/elemente cAMP i MAPK signalnih puteva koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost kao i broj i funkcionalnost spermatozoida.

(6) Karakterizacija uticaja hipogonadizma adultnih miševa kod kojih je hipogonadizam prouzrokovan kondicionalnom delecijom gena za insulinski i IGF1 receptor u steroidogenim ćelijama na broj i funkcionalnost spermatozoida.

Ispod su navedeni parametri koji su praćeni.

- (6.1) Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (6.2) Funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) izolovanih iz kaudalnog epididimisa.

(7) Karakterizacija molekularnih profila markera mitohondrijalne biogeneze koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije spermatozoida starih mužjaka pacova akutno i ponavljano *in vivo* tretiranih Sildenafilom.

Ispod su navedeni parametri koji su praćeni.

- (7.1) Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (7.2) Relativna ekspresija transkripata markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u spermatozoidima.
- (7.3) Relativna ekspresija transkripata za signalne molekule/elemente cAMP i MAPK signalnih puteva koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost kao i broj i funkcionalnost spermatozoida.
- (7.4) Koncentracija nitrita u ćelijskom medijumu i sadržaju spermatozoida adultnih i starih neuznemiravanih mužjaka *ex vivo* tretiranih različitim dozama Sildenafilom.

(8) Karakterizacija molekularnih profila markera mitohondrijalne biogeneze koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije spermatozoida adultnih i starih mužjaka pacova *in vivo* tretiranih lekom za dijabetes tip 2, Metforminom.

Ispod su navedeni parametri koji su praćeni.

- (8.1) Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (8.2) Funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- (8.3) Koncentracija nitrita i nivo cGMP-a u spermatozoidima.
- (8.4) Relativna ekspresija transkripata markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u spermatozoidima.
- (8.5) Relativna ekspresija transkripata za signalne molekule/elemente cAMP i MAPK signalnih puteva koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost kao i broj i funkcionalnost spermatozoida.
- (8.6) Koncentracija nitrita u ćelijskom medijumu spermatozoida adultnih neuznemiravanih mužjaka *ex vivo* tretiranih različitim dozama Metformina.

# **4. Materijal i metode**

Svi ogledi izvedeni su u Laboratoriji za Reproductivnu endokrinologiju i signaling i Laboratoriji za Hronobiologiju i starenje, Departmana za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu (<http://wwwold.dbe.pmf.uns.ac.rs/en/nauka-eng/lares>) i odobreni su od strane lokalnog Etičkog komiteta Univerziteta u Novom Sadu (broj odobrenja: I-2011-02, III-2011-04, 01-201/3, II-2020-01-02) i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije – Uprava za veterinu (broj rešenja: 323-07-0-00345/2020-05).

Ekperimentalni modeli i metode korišćene u ovom radu verifikovani su od strane naučne javnosti (za reference videti (Starovlah i sar., 2022, 2021, 2020, 2017))

#### 4.1. Hemikalije

Hemikalije za genotipizaciju miševa. Direct PCR Lysis (Tail) Reagent kupljen je od kompanije Viagen Biotech Inc ([www.viagenbiotech.com](http://www.viagenbiotech.com)), dok je Proteinaza K, liofilizovani prah koncentracije 30 U/mg, nabavljen od kompanije od Promega ([www.promega.com](http://www.promega.com)). Klasični PCR miks sa dodatkom boje za lodiranje Platinum® Blue PCR SuperMix, Agarosa visokog procenta čistoće i Etidijum bromid kupljeni su od kompanije Invitrogen – Thermo Fisher Scientific ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Hemikalije za određivanje nivoa hormona. Anti-testosteron-11-BSA serum No. 250 dobijen je ljubaznošću Gordon D. Niswender (Colorado State University, Fort Collins, CO). [1,2,6,7-3H(N)]testosteron, kupljen je od Perkin Elmer Life Sciences ([www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)). Dekstran T-70 i aktivni ugalj – Norit A kupljeni su od Serva ([www.serva.de](http://www.serva.de)). Merenje koncentracije LH rađeno je RIA metodom. Antitelo i standardi za LH esej nabavljeni su od ALPCO Diagnostic-LH (Rat) RIA, ([www.alpco.com](http://www.alpco.com)). Komercijalni EIA komplet za merenje nivoa kortikosterona kupljen je od Cayman Chemicals ([www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)), dok je komercijalni ELISA komplet za merenje nivoa adrenalina kupljen od kompanije Labor Diagnostica Nord ([www.ldn.de](http://www.ldn.de)).

Hemikalije za izolaciju primarne kulture tkiva hipotalamusa, adenohipofize i nadbubrežne žlezde kao i Lajdigovih ćelija iz intersticijuma testisa. Medijum M199 (*engl.* Medium 199 with Earle's Salts and L- glutamine), medijum DMEM-F12 (*engl.* DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham With L-glutamine), HEPES, goveđi serum albumin (*engl.* Bovine serum albumin-BSA), kolagenaza (*engl.* Collagenase, Type IA, from Clostridium histolyticum), perkol, dimetil sulfoksid (DMSO), prazosin-hidrohlodid, propranolol, izoproterenol-hidrohlodid, RU-486 i hidrokortizon kupljeni su od kompanije Sigma Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). Adrenalin HCl 1:1000 kupljen je od Jugoremedija A.D. Zrenjanin ([www.jugoremedija.rs](http://www.jugoremedija.rs)). 0.4 % rastvor tripan plavog (*engl.* Trypan blue) kupljen je od LONZA BioWhittaker ([www.pr.vwr.com](http://www.pr.vwr.com)).

Hemikalije za izolaciju spermatozoida, procese kapacitacije i akorzomske reakcije. Medijum M199, HBSS (*engl.* Hanks' Balanced Salts, Modified, without phenol red and sodium bicarbonate, powder, suitable for cell culture), HEPES, glukoza, piruvat (pirogroždana kiselina), amonijum acetat, BSA, Commassie Brilliant Blue G-250 i progesteron kupljeni su od kompanije Sigma Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). Supstance NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i laktat (mlečna kiselina) kupljeni su od kompanije Centrohem ([www.centrohem.co.rs](http://www.centrohem.co.rs)). Formaldehid 36-38% je kupljen od kompanije Lachner ([www.lach-ner.cz](http://www.lach-ner.cz)), dok su metanol i sirćetna kiselina kupljeni od kompanije Zorka Pharma-Hemija (<http://www.zorkapharma.rs>).



Hemikalije za imunofluorescentnu analizu. Rastvor 2% paraformaldehida dobijen je rastvaranjem paraformaldehida u destilovanoj vodi sa dodatkom NaOH i 10xPBS rastvora. Paraformaldehyd kao i Triron X-100 i BSA kupljeni su od Sigma Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). Antitela korišćena za navedenu analizu koja vezuju proteine PGC1 (sc-13067), NRF1 (sc-33771), AMPK $\alpha$ 1/2 (sc-74461) i ACTIN (sc-1616) kupljeni su od Santa Cruz Biotechnology Inc ([www.scbt.com](http://www.scbt.com)). Antitela koja vezuju proteine PRKAc (#610980) i PRKAr (#p53620) kupljeni su od BD Transduction Laboratories ([wwwbdbiosciences.com](http://wwwbdbiosciences.com)), dok su antitela koja vezuju PRKCQ (#9377S), p38MAPK (#9212) i pp38MAPK (#9211S) kupljeni od Cell Signaling Technology ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)). Antitelo koje vezuje GR (#MA1-510) nabavljeno je od Thermo Fisher Scientific ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Sekundarna imunofluorescentna antitela Alexa Fluor 555 (ab150078 i ab150114) i Alexa Fluor 488 (ab150077 i ab150113), Fluoroshield Mounting medijumom sa DAPI bojom (ab104139) kupljeni su od kompanije Abcam ([www.abcam.com](http://www.abcam.com)).

Hemikalije za određivanje nivoa cikličnog guanozin monofosfata. 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX,  $\geq 99\%$  (HPLC), powder) kupljen je od Sigma Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). Komercijalni EIA komplet za merenje nivoa cGMP-a kupljeni od Cayman Chemicals ([www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)).

Hemikalije za određivanje koncentracije nitrita. Natrijum nitrit kupljen je od kompanije Alexis Biochemicals ([www.enzolifesciences.com](http://www.enzolifesciences.com)). Sulfanilamid  $\geq 98\%$  i NEDA (N-(1-naftiletildiamin) kupljeni su od kompanije Sigma Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

Hemikalije za određivanje koncentracije ATP-a. Za određivanje koncentracije ATP-a korišćen je ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II kupljen od kompanije Roche ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

Hemikalije za izolaciju RNK, sintezu cDNK i real-time PCR. Za izolaciju RNK korišćeni su Rneasy kit za izolaciju ukupne RNK kupljen od Qiagen-a ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)), dok je GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit kupljen od Sigma Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). TRIzol reagent kupljen je od kompanije Invitrogen ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). High Capacity Kit za pripremu komplementarne DNK i Power SYBR® Green PCR Master Mix nabavljeni su od Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Prajmeri za real-time PCR kupljeni su od kompanije Invitrogen ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Hemikalije za izolaciju proteina, određivanje njihove koncentracije, SDS-PAGE elektroforezu i Western blot analizu. Acrylamide/N,N'-bis-methylene-acrylamide, SDS (*engl.* Sodium dodecyl sulfate), Tris-HCl, TEMED (N,N,N,N'-tetrametiletildiamin), amonijum persulfat, glicin, EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina), deterdžent za denaturaciju ćelijskih membrana Niaproof Type 4, TWEEN® 20, aprotinin, leupeptin i Commassie Brilliant Blue G-250 boja za proteine kupljeni su od kompanije Sigma ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). Proteinski marker za SDS-PAGE elektroforezu (PageRuler Prestained Protein Ladder), supstrati za detekciju kompleksa antigena, primarnog i sekundarnog antitela, Super Signal™ West Femto Maximal Sensitivity Substrate i SuperSignal™ West Dura Chemiluminescent Substrate, nabavljeni su od Thermo Fisher Scientific ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). DTT (ditiotritol) i inhibitor proteinaza AEBSF kupljeni su od MP Biomedicals ([www.mpbio.com](http://www.mpbio.com)), dok je inhibitor fosfatasa, PhosSTOP easy pack, nabavljen od kompanije Roche ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

## 4.2. Eksperimentalne životinje

**Mušjaci pacova soja *Wistar*.** U eksperimentalnim modelima korišćenim u izradi doktorske disertacije korišćeni su mušjaci belih pacova soja *Wistar*, različitih uzrasnih kategorija. Adultni (starosti 3 do 4 meseca) i stari (12, 18 i 21 mesec) telesne mase od 260 do 350 g. Životinje su uzgajane u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, pri standardnim laboratorijskim uslovima kontrolisanog osvetljenja (14 sati svetlo i 10 sati mrak, pri čemu se svetlo palilo u 7.00 časova ujutru) i kontrolisane temperature od  $21 \pm 1$  °C. Hranjene su standardnom paletiziranom laboratorijskom hranom za pacove (Veterinarski zavod, Subotica), a vodu su uzimale po potrebi.

**Mušjaci C57BL/6J knockout miševa.** U okviru eksperimentalniog *in vivo* modela zasnovanog na funkcionalnoj genomici korišćeni su genetski modifikovani tj. transgeni miševi (tzv. knockout miševi). Eksperimenti su urađeni na C57BL/6J knockout miševima sa kondicionalnom delecijom gena za *Insr* i/ili *Igf1r* u steroidogenim tkivima. Miševi su obezbeđeni u okviru SCOPES projekta Švajcarske nacionalne fondacije (2009-2012, #IZ73ZO-128070), a napravljeni su u Laboratoriji prof. dr Serđa Nefa (Departman za genetičku medicinu i razvoj, Univerzitet u Ženevi, Švajcarska; <https://www.unige.ch/medecine/nef/>). Miševi su gajeni u kontrolisanim laboratorijskim uslovima u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta sa fotoperiodom od 12 sati svetla i 12 sati mraka (pri čemu se svetlo palilo u 6.00 časova ujutru) i temperaturom  $21 \pm 1$  °C. Hranjene su standardnom paletiziranom laboratorijskom hranom za miševe (Veterinarski zavod, Subotica), a vodu su uzimale po potrebi. Miševi su obeležavani 21. postnatalnog dana metodom bušenja ušiju.

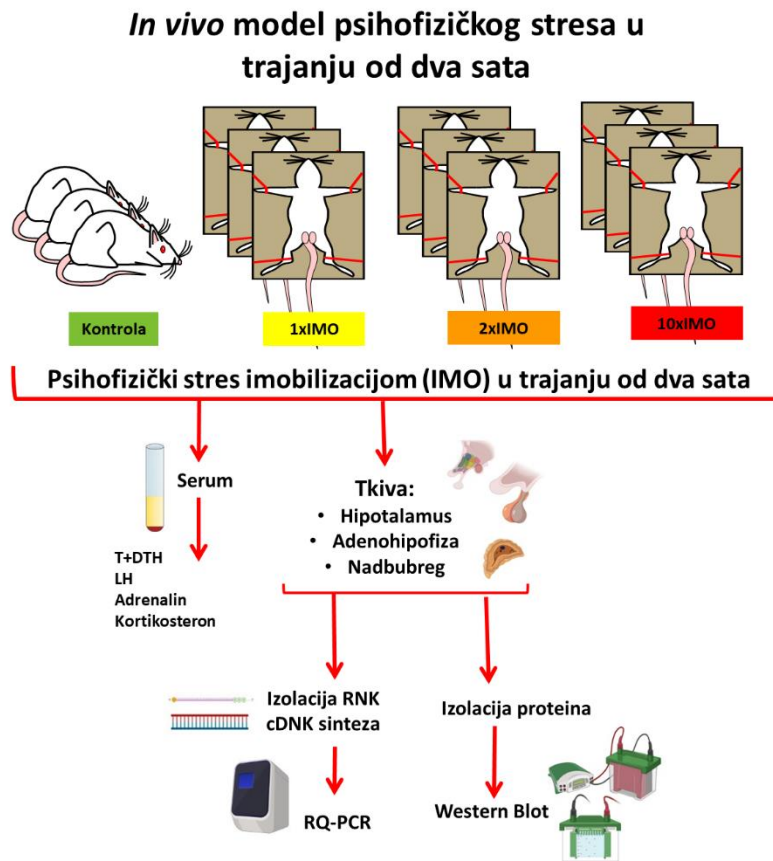
## 4.3. Eksperimentalni modeli koji mimikriraju situacije u adultnoj humanoj populaciji

U cilju karakterizacije molekularnih obrazaca mitohondrijalne biogeneze kao mehanizma adaptacije specifičnih ćelijskih tipova reproduktivne osovine na poremećenu homeostazu, istraživanja su izvedena na sledećim eksperimentalnim modelima:

- 4.3.1. Prirodni eksperimentalni *in vivo* modeli: model psihofizičkog stresa imobilizacijom i model starenja.
- 4.3.2. Eksperimentalni *in vivo* modeli sa farmakološkom intervencijom: hipogonadotropni hipogonadizam, starenje u kombinaciji sa oralnom primenom Sildenafilila (Viagra®), starenje u kombinaciji sa oralnom primenom Metformina (lek za dijabetes tip 2).
- 4.3.3. Eksperimentalni *in vivo* modeli zasnovani na funkcionalnoj genomici: korišćenjem genetski modifikovanih tj. transgenih miševa (tzv. *knock-out* miševi).
- 4.3.4. Eksperimentalni *ex vivo* modeli kojima se vrši manipulacija signalnih puteva: *ex vivo* primena hormona stresa, adrenalina i hidrokortizona, samih ili u kombinaciji sa blokatorima  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -adrenergičkih receptora, kao i blokatora glukokortikoidnih receptora; *ex vivo* primena Sildenafilila i Metformina.

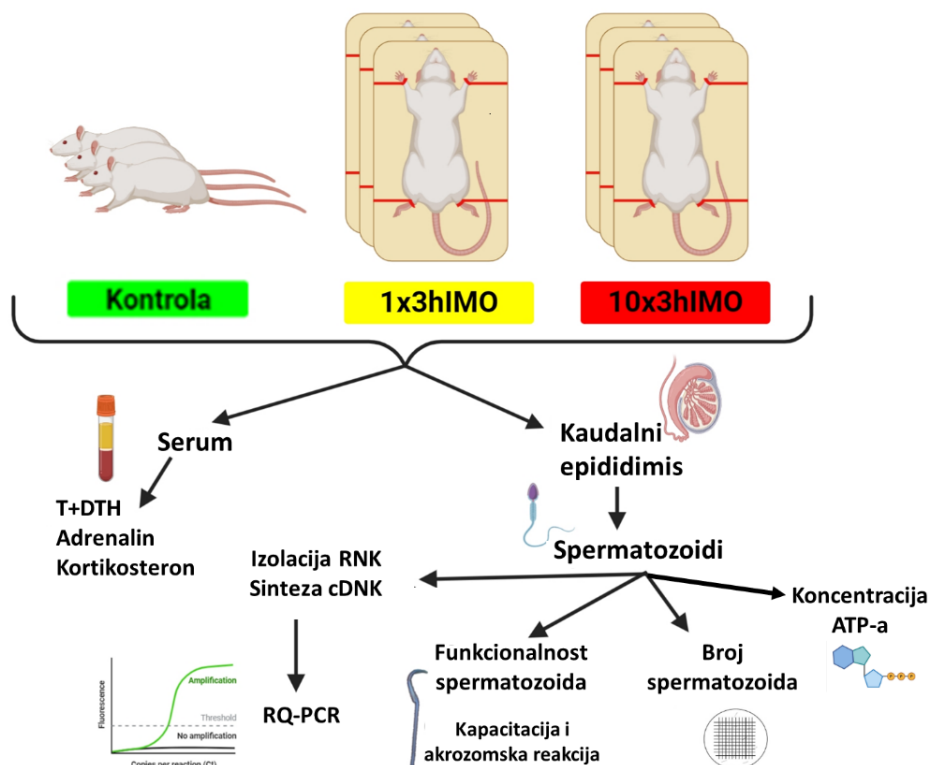
### 4.3.1. Prirodni eksperimentalni *in vivo* modeli

#### 4.3.1.1. Model psihofizičkog stresa



**Slika 4.3.1.** Šematski prikaz eksperimentalnog modela psihofizičkog stresa u trajanju od dva sata. Adultni mužjaci pacova su izlagani akutnom (1xIMO) i ponavljanom (2xIMO i 10xIMO) imobilizacionom stresu u trajanju od 2 sata u jutarnjim časovima (od 8.00 do 10.00 časova). Kontrolnu grupu sačinjavale su slobono pokretljive, neuznemiravane životinje. Serumi životinja korišćeni su za merenje nivoa hormona. Tkiva hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlezde korišćeni su za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije transkripata i proteina.

### In vivo model psihofizičkog stresa u trajanju od tri sata

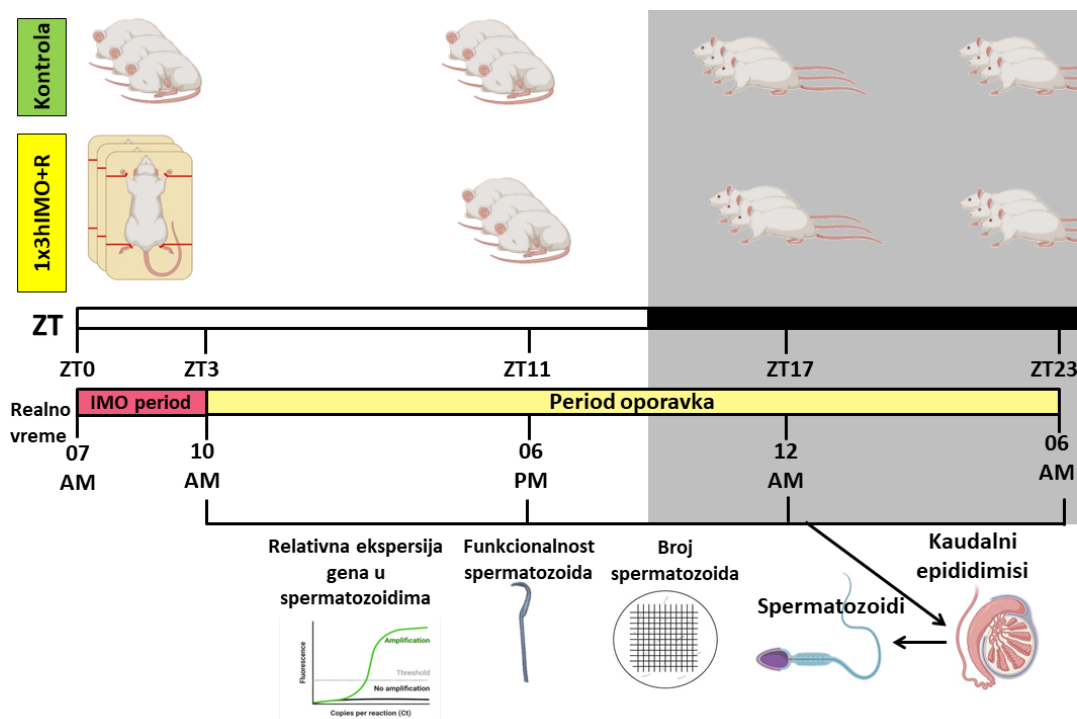


**Slika 4.3.2. Šematski prikaz eksperimentalnog modela psihofizičkog stresa u trajanju od tri sata.** Adultni mužjaci pacova su izlagani akutnom (1x3hIMO) i ponavljanom (10x3hIMO) imobilizacionom stresu u trajanju od 3 sata u jutarnjim časovima (od 7.00 do 10.00 časova). Kontrolnu grupu sačinjavale su slobodno pokretljive, neuznemiravane životinje. Serum životinja korišćeni su za merenje nivoa hormona. Izolacija spermatozoida rađena je iz kaudalnog dela epididimisa, nakon čega je određen broj i funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju nakon stimulacije progesteronom). Spermatozoidi su korišćeni za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije transkripata i koncentracije ATP-a.

Jedan od prirodnih eksperimetalnih *in vivo* modela koji je korišćen u ovom radu je model psihofizičkog stresa imobilizacijom (IMO) po Kvetnanskom (Kvetňanský i Mikulaj, 1970) uz manje modifikacije verifikovane od strane naučne javnosti (za reference videti (Andric i sar., 2013; Gak i sar., 2015; Kostic i sar., 2010, 2008, 2000, 1999; Starovlah i sar., 2021; Stojkov i sar., 2014, 2013, 2012)). Model podrazumeva fiksaciju životinje dorzalno na drvenu ploču, pri čemu su ekstremiteti vezani kanapom i nalaze se u ekstenziji, dok je glava slobodno pokretljiva. Adultni mužjaci pacova su izlagani akutnom imobilizacionom stresu u trajanju od 2 sata (1xIMO) ili 3 sata (1x3hIMO), kao i ponavljanom imobilizacionom stresu u trajanju od dva (2xIMO) i deset (10xIMO i 10x3hIMO) uzastopnih dana. (Slika 4.3.1 i Slika 4.3.2). Imobilizacija životinja vršena je u jutarnjim časovima (sa početkom perioda imobilizacije u 8.00 časova za grupe stresirane u trajanju od 2 sata, ili 7.00 časova za grupe stresirane u trajanju od 3 sata). Kontrolnu grupu sačinjavale su slobodno pokretljive životinje koje nisu uznemiravane tokom trajanja eksperimenata. Svaka eksperimetalna grupa sadržala je od 4 do 6 životinja. Eksperimenti su ponovljeni tri puta. Po isteku IMO perioda, kontrolne i stresirane životinje žrtvovane su dekapitovanjem, bez primene anestezije, i sakupljena je puna krv za pripremu

uzoraka seruma. Uzorci seruma skladišteni su na temperaturi od -80 °C do momenta merenja nivoa androgena (T+DHT), LH, adrenalina i kortikosterona (CORT).

#### 4.3.1.2. Model akutnog psihofizičkog stresa sa periodom oporavka



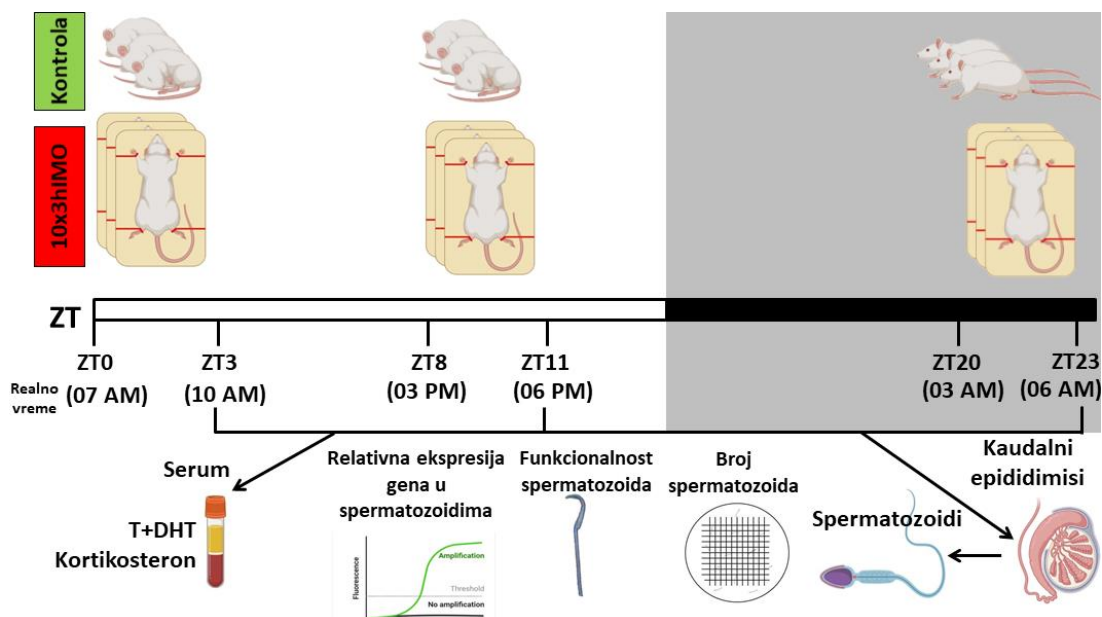
**Slika 4.3.3. Šematski prikaz eksperimentalnog modela akutnog psihofizičkog stresa u trajanju od tri sata sa periodom oporavka.** Adultni mužjaci pacova su izlagani akutnom imobilizacionom stresu u trajanju od 3 sata (1x3hIMO) u periodu od 7 do 10 časova ujutru (ZT0 do ZT3; ZT0 predstavlja vreme paljenja svetla u gajilištu i odgovara vremenu od 7 časova ujutru) sa periodom oporavka od 0, 8, 14 i 20 časova nakon akutnog stresa (ZT3, ZT11, ZT17 i ZT23). Kontrolnu grupu sačinjavale su slobono pokretljive, neuznemiravane životinje. Izolacija spermatozoida rađena je iz kaudalnog dela epididimisa, nakon čega je određen broj i funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju nakon stimulacije progesteronom). Spermatozoidi su korišćeni za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije transkripata.

U okviru prirodnih eksperimetalnih *in vivo* modela stresa korišćen je model akutnog imobilizacionog stresa sa periodom oporavka (Slika 4.3.3). Navedeni model predstavlja model psihofizičkog stresa imobilizacijom (3hIMO) po Kvetnanskom (Kvetňanský i Mikulaj, 1970) uz manje modifikacije verifikovane od strane naučne javnosti (za reference videti (Andric i sar., 2013; Gak i sar., 2015; Kostic i sar., 1999, 2000, 2008, 2010; Medar i sar., 2021; Starovlah i sar., 2021; Stojkov i sar., 2012, 2013, 2014). Adultni mužjaci pacova su izlagani akutnom imobilizacionom stresu u trajanju od 3 sata (1x3hIMO) u periodu od 7 do 10 časova ujutru (ZT0 do ZT3; ZT0 predstavlja vreme paljenja svetla u gajilištu i odgovara vremenu od 7 časova ujutru) sa periodom oporavka od 0, 8, 14 i 20 časova nakon akutnog stresa (ZT3, ZT11, ZT17 i ZT23), ZT - „zeitgeber“ (u originalu reč nemačkog jezika, bukvalni prevod na engleski jezik „timegiver“). Kontrolnu grupu sačinjavale su slobono pokretljive životinje koje nisu uznemiravane tokom trajanja eksperimenata. Sve aktivnosti tokom tamne faze, odnosno u periodu mraka, rađene su pod crvenim svetlom. Svaka eksperimetalna grupa sadržala je od 3 do



6 životinja u svakoj vremenskoj tački. Eksperimenti su ponovljeni dva puta. Po isteku IMO perioda sa oporavkom (3hIMO+R), kontrolne i stresirane životinje žrtvovane su dekapitovanjem, bez primene anestezije. U svakom eksperimentu kontrolne i eksperimentalne životinje podeljene su u četiri „vremenske“ grupe nasumičnim odabirom.

#### 4.3.1.3. Model ponavljanog psihofizičkog stresa u različitim vremenskim tačkama u toku dana

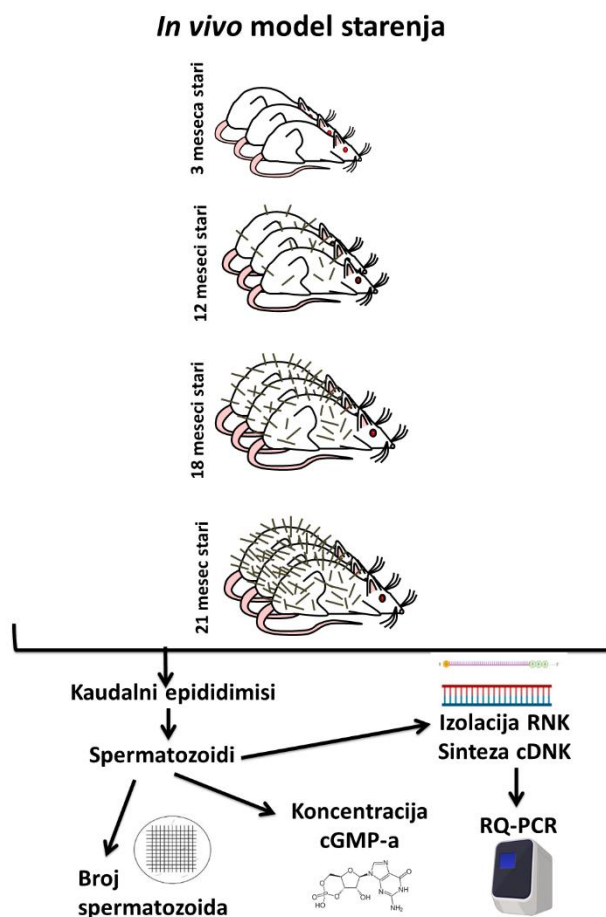


**Slika 4.3.4.** Šematski prikaz eksperimentalnog modela ponavljanog psihofizičkog stresa u trajanju od tri sata u različitim periodima u toku 24 časa. Adultni mužjaci pacova su izlagani ponavljanom imobilizacionom stresu u trajanju od 3 sata (10x3hIMO) tokom deset uzastopnih dana u sledećim periodima u toku dana: od 7 do 10 časova ujutru (ZT0 do ZT3; ZT0 predstavlja vreme paljenja svetla u gajilištu i odgovara vremenu od 7 časova ujutru), od 15 do 18 časova (ZT8 do ZT11) i od 3 do 6 časova ujutru (ZT20 do ZT23). Kontrolnu grupu sačinjavale su slobono pokretljive, neuznemiravane životinje. Serumi životinja korišćeni su za merenje nivoa hormona. Izolacija spermatozoida rađena je iz kaudalnog dela epididimisa, nakon čega je određen broj i funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju nakon stimulacije progesteronom). Spermatozoidi su korišćeni za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije transkripata.

Drugi aspekt u okviru prirodnih eksperimetalnih *in vivo* modela stresa predstavlja model ponavljanog imobilizacionog stresa u različitim periodima u toku 24 časovnog ciklusa (Slika 4.3.4). Navedeni model predstavlja model psihofizičkog stresa imobilizacijom (3hIMO) po Kvetnanskom (Kvetňanský i Mikulaj, 1970) uz manje modifikacije verifikovane od strane naučne javnosti (za reference videti (Andric i sar., 2013; Gak i sar., 2015; Kostic i sar., 2010, 2008, 2000, 1999; Starovlah i sar., 2022, 2021; Stojkov i sar., 2014, 2013, 2012)). Adultni mužjaci pacova su izlagani ponavljanom imobilizacionom stresu u trajanju od 3 sata (10x3hIMO) tokom deset uzastopnih dana u sledećim periodima u toku dana: od 7 do 10 časova ujutru (ZT0 do ZT3; ZT0 predstavlja vreme paljenja svetla u gajilištu i odgovara vremenu od 7 časova ujutru), od 15 do 18 časova (ZT8 do ZT11) i od 3 do 6 časova ujutru (ZT20 do ZT23). Kontrolnu grupu sačinjavale su slobono pokretljive životinje koje nisu uznemiravane tokom trajanja eksperimenata. Sve aktivnosti tokom tamne faze, odnosno u periodu mraka, rađene su pod crvenim svetlom. Svaka eksperimetalna grupa sadržala je od 4 do 6 životinja po

eksperimentalnoj grupi u svakoj vremenskoj tački. Eksperimenti su ponovljeni dva puta. Po isteku IMO perioda (10x3hIMO), kontrolne i stresirane životinje žrtvovane su dekapitovanjem, bez primene anestezije, i sakupljena je puna krv za pripremu uzoraka seruma. Uzorci seruma skladišteni su na temperaturi od -80 °C do momenta merenja nivoa androgena (T+DHT) i kortikosterona (CORT). U svakom eksperimentu kontrolne i eksperimentalne životinje podeljene su u tri „vremenske“ grupe nasumičnim odabirom.

#### 4.3.1.4. Model starenja



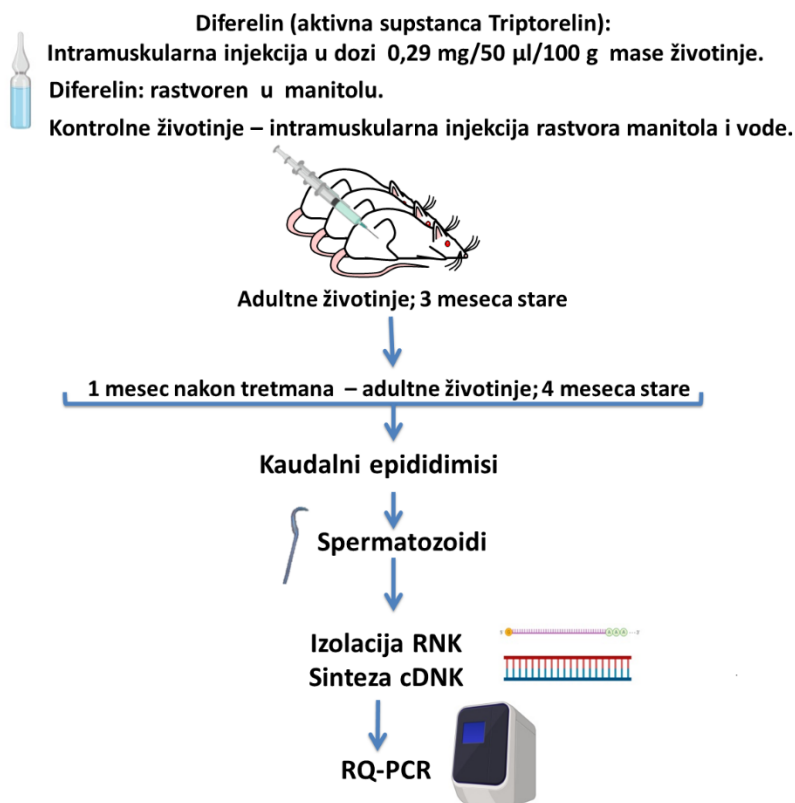
**Slika 4.3.5. Šematski prikaz eksperimentalnog modela starenja.** Životinje koje su predstavljale eksperimentalnu grupu u ovom modelu su starosti 12, 18 i 21 mesec, dok su kontrolnu grupu sačinjavale adultne životinje starosti 3 meseca. Izolacija spermatozoida rađena je iz kaudalnog dela epididimisa, nakon čega je određen broj spermatozoida. Spermatozoidi su korišćeni za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije transkripata i određivanje koncentracije cGMP-a.

U okviru ispitivanja molekularnih obrazaca mitohondrijalne biogeneze kao mehanizama adaptacije spermatozoida na poremećenu homeostazu korišćen je *in vivo* eksperimentalni model starenja (Slika 4.3.5). Životinje koje su predstavljale eksperimentalnu grupu u ovom modelu su starosti 12, 18 i 21 mesec. Kontrolnu grupu sačinjavale su adultne životinje starosti 3 meseca. Svaka eksperimentalna i kontrolna grupa, odnosno starosna kategorija, sadržala je 3 do 5 životinja. Eksperimenti su ponovljeni dva puta.

## 4.3.2. Eksperimentalni *in vivo* modeli sa farmakološkom intervencijom

### 4.3.2.1. Hipogonadotropni hipogonadizam

#### ***In vivo* model hipogonadalnog hipogonadizma**



#### **Slika 4.3.6. Šematski prikaz eksperimentalnog modela hipogonadotropnog hipogonadizma.**

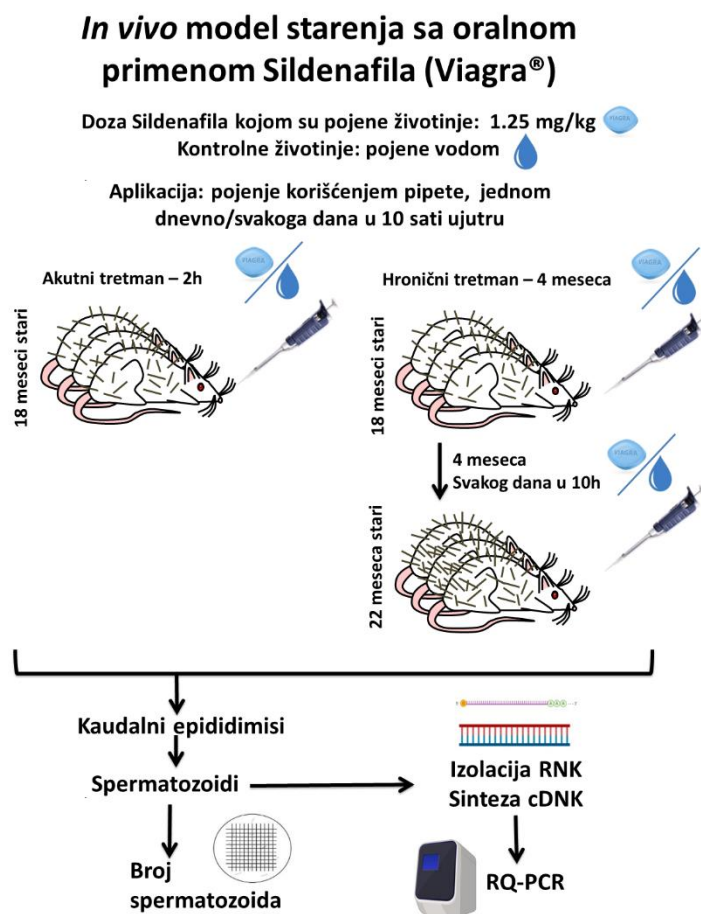
Hipogonadotropni hipogonadizam je izazvan intramuskularnim injektovanjem GnRH analoga sa dugotrajnim dejstvom, Triptorelina, koji sadrži aktivnu komponentu Diferelin. Mesec dana nakon tretmana životinja, kada je poznato da su životinje postale hipogonadalne, sve životinje su žrtvovane u 7.00 časova ujutru. Izolacija spermatozoida rađena je iz kaudalnog dela epididimisa, nakon čega su spermatozoidi korišćeni za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije transkriptata.

Model hipogonadotropnog hipogonadizma (Slika 4.3.6) je model koji je korišćen sa ciljem ispitivanja molekularnih obrazaca mitohondrijalne biogeneze kao mehanizama adaptacije spermatozoida na poremećenu homeostazu, odnosno u ovom slučaju smanjenu LH-cAMP signalizaciju. Hipogonadotropni hipogonadizam poznat je još i kao sekundarni hipogonadizam jer nastaje kao posledica poremećenog rada HPT osovine i niskog nivoa LH hormona. U okviru ovog eksperimentalnog modela hipogonadotropni hipogonadizam je izazvan intramuskularnim injektovanjem GnRH analoga sa dugotrajnim dejstvom, Triptorelina, koji sadrži aktivnu komponentu Diferelin (PharmaSwiss, Beograd, <http://pharmaswiss.rs/>). U ogledu su korišćeni adultni mužjaci pacova starosti 3 meseca, koji su podeljeni u dve grupe, kontrolnu i eksperimentalnu grupu tretiranu Diferelinom. Kontrolna grupa je primila intramuskularnu injekciju smeše vode i manitola, rastvarača za Diferelin koji je dobijen kupovinom leka. Eksperimentalna grupa je istog dana primila intramuskularnu injekciju Diferelina rastvorenom u



manitolu u dozi 0.29 mg/50  $\mu$ l/100 g telesne mase životinje. Intramuskularne injekcije date su u 7.00 časova ujutru. Mesec dana nakon tretmana životinja, kada je poznato da su životinje postale hipogonadalne (Medar i sar., 2021a) sve životinje su žrtvovane u 7.00 časova ujutru. Svaka grupa u ovom eksperimentalnom modelu sadržala je od 2 do 4 životinje.

#### 4.3.2.2. Starenje u kombinaciji sa oralnom primenom Sildenafilila (Viagra®)



**Slika 4.3.7. Šematski prikaz eksperimentalnog modela starenja u kombinaciji sa oralnom primenom Sildenafilila (Viagra®).** Oglеди su rađeni korišćenjem 18 meseci starih mužijaka pacova uz *in vivo* primenu Sildenafilila sa ciljem akutne i hronične inhibicije fosfodiesteraze 5 (PDE5). Osamnaest meseci stari mužjaci podvrgnuti su akutnom tretmanu Sildenafililom. Eksperimentalna grupa pojena je rastvorom Sildenafilila u dozi 0.125 mg/ 50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase životinje, dok je kontrolna grupa u isto vreme pojena vodom (50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase). Pojenje životinja vršeno je u 7.00 časova ujutru, dok je žrtvovanje životinja izvedeno 2 sata nakon tretmana. Ponavljani tretman Sildenafililom podrazumevao je tretman 18 meseci starih mužjaka. Eksperimentalna grupa pojena je rastvorom Sildenafilila, u dozi 0.125 mg/50  $\mu$ l/100 g telesne mase životinje, svakog dana u 10.00 časova ujutru, u periodu od četiri meseca. U istom periodu, kontrolna grupa životinja pojena je vodom (50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase). Nakon četvoromesečnog tretmana životinje su žrtvovane u 9.00 časova ujutru. Izolacija spermatozoida rađena je iz kaudalnog dela epididimisa, nakon čega je određen broj spermatozoida, i oni su dalje korišćeni za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije transkriptata.

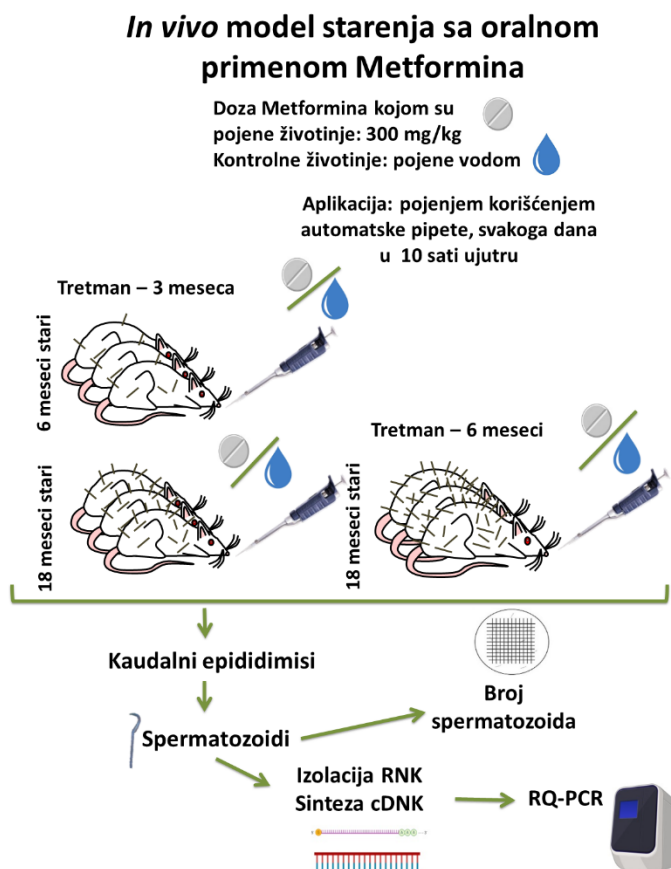
U okviru eksperimentalnih *in vivo* modela sa farmakološkom intervencijom rađeni su oglеди na starim mužjacima pacova uz *in vivo* primenu Sildenafilila sa ciljem akutne i hronične

inhibicije fosfodiesteraze 5 (PDE5) (Slika 4.3.7). Tablete Sildenafil citrata (Viagra®) kupljene su od Pfizer Inc. ([www.pfizer.com](http://www.pfizer.com)).

U okviru prve grupe oglada životinje stare 18 meseci podvrgnute su akutnom tretmanu Viagrom. Eksperimentalna grupa pojena je rastvorom Sildenafil u dozi 0.125 mg/ 50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase životinje, dok je kontrolna grupa u isto vreme pojena vodom (50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase). Pojenje životinja vršeno je u 7.00 časova ujutru, dok je žrtvovanje životinja izvedeno 2 sata nakon tretmana.

Druga grupa oglada podrazumevala je ponavljani (hronični) tretman Sildenafilom. U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova stari 18 meseci koji su podeljeni u dve grupe, kontrolnu i eksperimentalnu grupu. Eksperimentalna grupa pojena je rastvorom Sildenafil, u dozi 0.125 mg/50  $\mu$ l/100 g telesne mase životinje, svakog dana u 10.00 časova ujutru, u periodu od četiri meseca. U istom periodu, kontrolna grupa životinja pojena je vodom (50  $\mu$ l/ 100 g telesne mase). Nakon četvoromesečnog tretmana životinje su žrtvovane u 9.00 časova ujutru. U svim navedenim ogledima korišćeno je od 3 do 5 životinja u svakoj grupi. Eksperimenti su ponovljeni dva puta.

### 4.3.2.3. Starenje u kombinaciji sa oralnom primenom Metformina



**Slika 4.3.8. Šematski prikaz eksperimentalnog modela starenja u kombinaciji sa oralnom primenom Metformina.** Ponavljani tretmani lekom za dijabetes tip 2, Metforminom, podrazumevali su korišćenje dve uzrasne kategorije mužjaka pacova pojene lekom tokom 3 meseca (mužjaci na kraju tretmana starosti 6 i 18 meseci), i jednu uzrasnu kategoriju starh mužjaka pacova pojenih lekom tokom 6 meseci (mužjaci na kraju tretmana starosti 18 meseci). Životinje u obe serije ogleđa podeljene su u dve grupe, kontrolnu i eksperimentalnu. Eksperimentalna grupa životinja pojena je Metforminom u koncentraciji 300 mg/kg telesne mase životinje (lek Glucophage rastvoren je u vodi), dok je kontrolna grupa životinja u istom vremenskom periodu pojena vodom. Životinje su pojene svakog dana u 10 časova ujutru. Nakon tretmana životinje su žrtvovane u 9.00 časova ujutru. Izolacija spermatozoida rađena je iz kaudalnog dela epididimisa, nakon čega je određen broj spermatozoida, i oni su dalje korišćeni za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije transkripata.

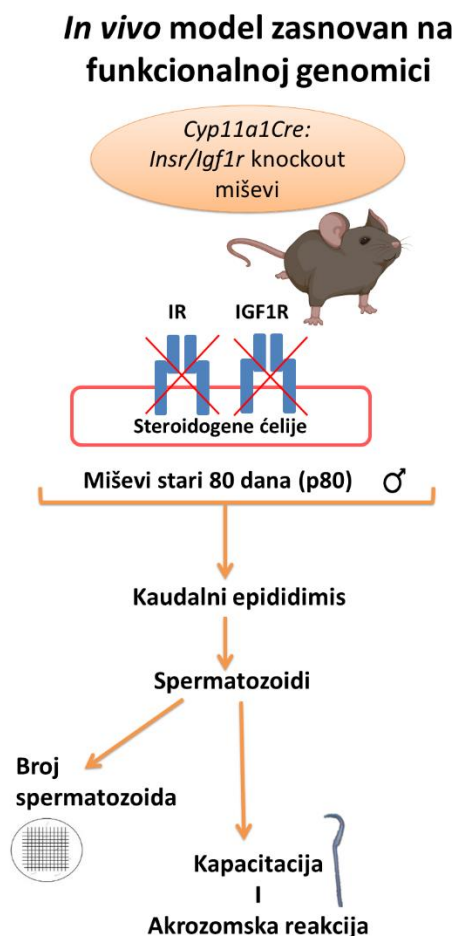
Druga grupa ogleđa u okviru eksperimentalnih *in vivo* modela sa farmakološkom intervencijom podrazumevala je ponavljani tretman Metforminom, lekom za dijabetes tip 2. Cilj navedenih ogleđa bio je da se ispita uticaj AMPK na spermatozoide pacova. Metformin koji je korišćen u ogleđima kupljen je u obliku tablete Glucophage, kompanije Merck Serono ([www.merckgroup.com](http://www.merckgroup.com)). U ovom eksperimentalnom modelu rađene su dve serije ogleđa (Slika 4.3.8.).

Prva serija ogleđa podrazumevala je korišćenje dve uzrasne kategorije životinja kao i tretman Metforminom u trajanju od tri meseca. Na početku ogleđa životinje su bile starosti 3 meseca i 15 meseci. Obe uzrasne kategorije podeljene su u dve grupe, kontrolnu i eksperimentalnu. Eksperimentalna grupa životinja oba uzrasta pojena je Metforminom u koncentraciji 300 mg/kg telesne mase životinje (lek Glucophage rastvoren je u vodi), dok je

kontrolna grupa životinja u istom vremenskom periodu pojena vodom. Životinje su pojene svakog dana u 10 časova ujutru tokom tri meseca. Po isteku tromesečnog tretmana, sve životinje žrtvovane su u 9 časova ujutru. Svaka grupa i starosna kategorija sadržala je od 5 do 8 životinja.

U okviru druge serije oglada korišćene su životinje koje su na početku oglada bile stare 12 meseci. Životinje su kao i u prethodnom ogledu podeljene u dve grupe, kontrolnu i eksperimentalnu. Eksperimentalna grupa pojena je Metforminom u koncentraciji 300 mg/kg telesne mase životinje (lek Glucophage rastvoren je u vodi), dok je kontrolna grupa životinja u istom vremenskom periodu pojena vodom. Sve životinje su pojene svakog dana u 10 časova ujutru tokom šest meseci. Po isteku šestomesečnog tretmana, sve životinje žrtvovane su u 9 časova ujutru. Svaka grupa sadržala je od 4 do 8 životinja. Urađena su dva eksperimenta.

#### 4.3.3. Eksperimentalni *in vivo* modeli zasnovani na funkcionalnoj genomici



**Slika 4.3.9. Šematski prikaz eksperimentalnog modela zasnovanog na funkcionalnoj genomici.** Eksperimentalni model podrazumevao je korišćenje C57BL/6J tzv. knockout miševia sa kondicionalnom delecijom gena za *Insr* i/ili *Igf1r* u steroidogenim tkivima. Korišćeni su mužjaci starosti 80 dana. Izolacija spermatozoida rađena je iz kaudalnog dela epididimisa, nakon čega je određen broj i funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju nakon stimulacije progesteronom).

Grupe oglada u okviru eksperimentalnog *in vivo* modela zasnovanog na funkcionalnoj genomici podrazumevale su korišćenje C57BL/6J tzv. knockout miševa sa kondicionalnom delecijom gena za *Insr* i/ili *Igf1r* u steroidogenim tkivima (Slika 4.3.9). Miševi su obezbeđeni u okviru SCOPES projekta Švajcarske nacionalne fondacije (2009-2012, #IZ73Z0-128070), a

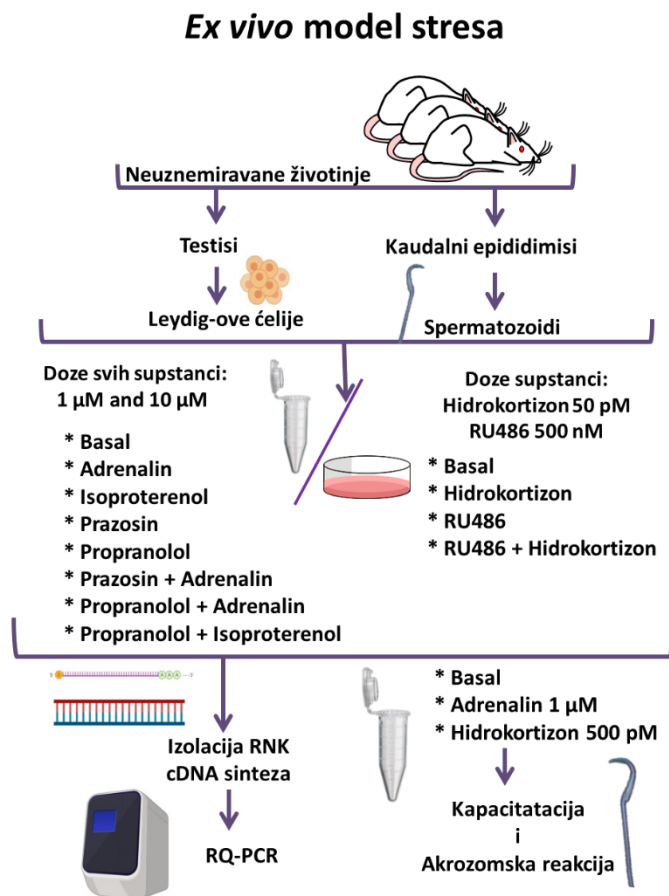
nastali su u Laboratoriji prof. Dr Serđa Nefa (Departman za genetičku medicinu i razvoj, Univerzitet u Ženevi, Švajcarska; <https://www.unige.ch/medecine/nef/>). U okviru *in vivo* eksperimentalnog modela korišćeni su miševi dobijeni Cre-loxP tehnologijom (Neirijnck i sar., 2018). Miševi kod kojih je sekvenca za CRE rekombinazu povezana sa enzimom Cyp11a1 (*engl.* Cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc) obezbeđeni su od strane Meng-Chun Hu (Liu i sar., 1993; Taniguchi i sar., 2006; Wu i sar., 2007), dok su miševi koji imaju loxP sekvence vezane sa genima za *Insr* i *Igf1r* napravljeni od strane R. Kahn, A. Efstratiadis, K.L. Parker. Dobijanje tzv. knockout životinja sa kondicionalnom delecijom gena za *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim tkivima, vršeno je ukrštanjem ova dva soja miševa. Dobijanje željene transgene kombinacije postignuto je ukrštanjem miševa koji u genomu sadrže gene za *Insr* i *Igf1r* sa prisutnim loxP sekvencama (tzv. floksirani geni) sa miševima koji ekspresuju Cre rekombinazu pod kontrolom promotorske sekvence za gen *Cyp11a1* a heterozigoti su za *Insr* i *Igf1r* (imaju tzv. wild type odnosno nepromenjeni alel i floksirani alel za oba pomenuta gena). Ukrštanjem pomenutih životinja dobijeni su genotipovi koji su korišćeni u izradi ovog rada. Životinje koje su korišćene u ogleđima u okviru ovog eksperimentalnog modela mogu se podeliti u tri grupe: (1) kontrolna grupa – miševi koji su imali funkcionalne INSR i IGF1R (*Cyp11a1Cre<sup>-/-</sup>Insr<sup>wt/fx</sup>Igf1r<sup>fx/fx</sup>* i *Cyp11a1Cre<sup>-/-</sup>Insr<sup>fx/fx</sup>Igf1r<sup>fx/fx</sup>*); SKO grupa – tzv. single knockout miševi sa delecijom *Igf1r* (*Cyp11a1Cre<sup>+</sup>Insr<sup>wt/fx</sup>Igf1r<sup>fx/fx</sup>*); DKO grupa – tzv. double knockout miševi sa delecijom *Insr* i *Igf1r* (*Cyp11a1Cre<sup>+</sup>Insr<sup>fx/fx</sup>Igf1r<sup>fx/fx</sup>*). U ovom radu korišćeni su mužjaci starosti 80 dana (80. posnatalni dan). Eksperimenti su ponovljeni osam puta.

#### 4.3.4. Eksperimentalni *ex vivo* modeli

Pored *in vivo* pristupa, u izradi ove doktorske disertacije korišćeni su i *ex vivo* eksperimentalni modeli radi ispitivanja uticaja manipulacije različitih signalnih puteva na molekularne obrasce mitohondrijalne biogeneze i signalizacije u spermatozoidima. Pored manipulacije signalnih puteva hormonima stresa, a sa aspekta široko zastupljene upotrebe, u okviru *ex vivo* modela praćeni su efekti Metformina (leka za dijabetes tip 2) i Viagre (leka za pulmonarnu hipertenziju i erektilnu disfunkciju) na navedene molekularne obrasce u spermatozoidima. *Ex vivo* eksperimentalni modeli podeljeni su u tri grupe:

- 4.3.4.1. Manipulacija signalnih puteva *ex vivo* primenom hormona stresa, adrenalina i hidrokortizona, samih ili u kombinaciji sa blokatorima  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -adrenergičkih receptora, kao i blokatora glukokortikoidnih receptora;
- 4.3.4.2. Manipulacija signalnih puteva *ex vivo* primenom Sildenafilila (Viagra), leka za pulmonarnu hipertenziju i erektilnu disfunkciju;
- 4.3.4.3. Manipulacija signalnih puteva *ex vivo* primenom Metformina, leka za dijabetes tip 2.

**4.3.4.1. Manipulacija signalnih puteva *ex vivo* primenom hormona stresa, adrenalina i hidrokortizona, samih ili u kombinaciji sa blokatorima  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -adrenergičkih receptora, kao i blokatora glukokortikoidnih receptora**



**Slika 4.3.10. Šematski prikaz eksperimentalnog modela *ex vivo* primene hormona stresa, adrenalina i hidrokortizona, samih ili u kombinaciji sa blokatorima  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -adrenergičkih receptora, kao i blokatora glukokortikoidnih receptora.** Adultni neuznemiravani mužjaci pacova korišćeni su za izolaciju primarne kulture Lajdigovih ćelija i spermatozoida. Primarna kultura Lajdigovih ćelija tretirana je hormonom stresa hidrokortizonom, samim ili u kombinaciji sa blokatorom glukokortikoidnog receptora, nakon čega je dalje korišćena za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije transkripata. Primarna kultura spermatozoida izolovana iz kaudalnog epididimisa tretirana je hormonima stresa adrenalinom i hidrokortizonom, samih ili u kombinaciji sa blokatorima  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -adrenergičkih receptora, kao i blokatora glukokortikoidnih receptora, nakon čega je dalje korišćena za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije transkripata. Spermatozoidi tretirani samo hormonima stresa adrenalinom i hidrokortizonom korišćeni su za određivanje funkcionalnosti spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju nakon stimulacije progesteronom).

Prva grupa *ex vivo* eksperimenata podrazumevala je upotrebu hormona stresa, adrenalina i hidrokortizona, samih ili u kombinaciji sa blokatorima  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -adrenergičkih receptora, kao i blokatora glukokortikoidnih receptora (Slika 4.3.10). Navedena grupa eksperimenata može se podeliti u dve serije, u zavisnosti od ćelija koje su tretirane.

(I) Prva serija eksperimenata podrazumevala je *ex vivo* tretmane primarne kulture Lajdigovih ćelija hormonom stresa hidrokortizonom, samim ili u kombinaciji sa antagonistom glukokortikoidnih receptora RU486. Za izvođenje ove serije eksperimenata korišćena je primarna

kultura Lajdigovih ćelija izolovana iz adultnih mužjaka pacova starosti od 3 do 4 meseca. Nakon izolacije kulture Lajdigovih ćelija,  $3 \times 10^6$  ćelija je posađeno u Petri ploče prečnika 55 mm u 3 ml DMEM/F12 medijuma. Ćelije su nakon toga ostavljene 2 sata u inkubatoru na temperaturi od 35 °C, da se oporave od procesa izolacije i zalepe za podlogu. Nakon 2 sata, ćelijama je odliven medijum u kom su bile, i na njih je odat svež DMEM/F12 medijum sa dodatkom 10% FBS, nakon čega su inkubirane 5 sati u inkubatoru na temperaturi od 35 °C. Po isteku navedenog perioda ćelije su najpre stimulisane samo blokatorom RU486, u grupama u kojima postoji blokator, dok su netretirana grupa (Basal) i grupa tretirana hidrokortizonom inkubirane u čistom DMEM/F12 medijumu. Period inkubacije samo sa blokatorom (period prestimulacije) trajao je 30 minuta na 35 °C u kontrolisanim uslovima inkubatora (5% CO<sub>2</sub> sa kontrolisanom vlažnošću vazduha). Po isteku preinkubacionog perioda, u grupe Lajdigovih ćelija tretirane hidrokortizonom i kombinacijom hidrokortizona i RU486, dodat je hidrokortizon rastvoren u DMEM/F12 medijumu. Ćelije su nakon toga inkubirane 24 sata na 35 °C u kontrolisanim uslovima inkubatora. Finalna koncentracija antagoniste glukokortikoidnog receptora (RU486) korišćena u navedenim ogledima bila je 500 nM, dok je finalna koncentracija hidrokortizona bila 50 pM. Po isteku inkubacionog perioda medijum iz ploča je sakupljen dok su ćelije isprane rastvorom 1xPBS i nakon toga zamrzute na -70 °C.

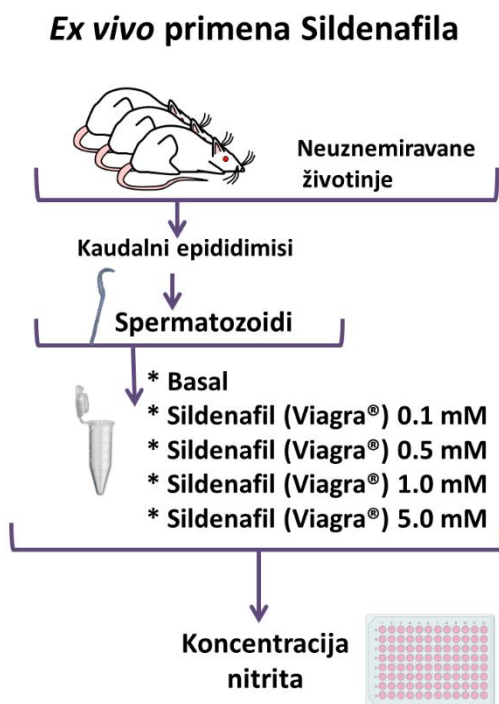
(II) Druga serija eksperimenata podrazumevala je *ex vivo* tretmane primarne kulture spermatozoida izolovanih iz kaudalnog dela epididimisa, hormonima stresa, adrenalinom i hidrokortizonom, samih ili u kombinaciji sa blokatorima  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -adrenergičkih receptora, kao i blokatorima glukokortikoidnih receptora. Nakon izolacije iz kaudalnog epididimisa spermatozoidi su resuspendovani u DMEM/F12 medijumu i raspoređeni po  $10 \times 10^6$  spermatozoida po tubici od 1.5 ml. U okviru svakog eksperimenta postojale su grupe netretiranih uzoraka, odnosno kontrolni uzorci (Basal), kao i eksperimentalne grupe uzoraka. Kontrolna grupa uzoraka predstavlja spermatozoide inkubirane u čistom medijumu DMEM/F12 u istom maniru kao i eksperimentalne grupe uzoraka. Eksperimentalne grupe uzoraka koji predstavljaju deo eksperimenata u kojima je ispitivan uticaj stres hormona adrenalina samog ili u kombinaciji sa blokatorima  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -adrenergičkih receptora, podrazumevale su tretmane sledećim supstancama: adrenalin (agonista  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergičkih receptora), izoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenergičkih receptora), prazosin (antagonista  $\alpha$ 1-adrenergičkih receptora), propranolol (neselektivni antagonista  $\beta$ -adrenergičkih receptora). Ovaj eksperimentalni pristup podrazumevao je tretmane spermatozoida pojedinačnim supstancama, ali i kombinaciju antagoniste i agoniste. Navdeni *ex vivo* eksperimenti podrazumevali su sledeće grupe: Basal (netretirana, kontrolna grupa), adrenalin, izoproterenol, prazosin, propranolol, prazosin i adrenalin, propranolol i adrenalin, izoproterenol i propranolol. Spermatozoidi su nakon izolacije najpre stimulisani antagonistima, u periodu od 30 minuta, a nakon toga su dodati agonisti i inkubacija je trajala 6 sati u inkubatoru na 37 °C uz blago mešanje na adaptiranom šejkeru. Koncentracije svih korišćenih supstanci u ovoj grupi ogleđa bile su 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M. Po isteku inkubacionog vremena, svi uzorci su centrifugirani 7 minuta pri brzini od 1000xg. Supernatant je prebačen u nove tubice, dok je talog zamrznut na -70 °C. Da bi se ispitaio efekat hormona stresa hidrokortizona na spermatozoide adultnih mužjaka pacova, korišćena je supstanca hidrokortizon, sama ili u kombinaciji sa antagonistom glukokortikoidnih receptora RU486. Kao i u prethodnim ogledima kontrolna grupa uzoraka predstavlja spermatozoide inkubirane u čistom medijumu DMEM/F12 u istom maniru kao i eksperimentalne grupe uzoraka. U okviru ove grupe *ex vivo* eksperimenata uzorci spermatozoida podeljeni su u sledeće grupe: Basal (netretirana, kontrolna grupa), RU486 (antagonista glukokortikoidnog receptora), hidrokortizon (agonista glukokortikoidnog receptora), RU486 i hidrokortizon. Spermatozoidi su nakon izolacije najpre



stimulisani antagonistima, u periodu od 30 minuta, a nakon toga su dodati agonisti i inkubacija je trajala 6 sati u inkubatoru na 37 °C uz blago mešanje na adaptiranom šejkeru. Finalna koncentracija antagoniste glukokortikoidnog receptora (RU486) korišćena u navedenim ogledima bila je 500 nM, dok je finalna koncentracija hidrokortizona bila 50 pM. Po isteku inkubacionog vremena, svi uzorci su centrifugirani 7 minuta pri brzini od 1000xg. Supernatant je prebačen u nove tubice, dok je talog zamrznut na -70 °C.

Ispitivanje uticaja hormona stresa adrenalina i hidrokortizona na funkcionalnost spermatozoida rađena je u grupi *ex vivo* eksperimenata u kojima su korišćeni samo navedeni hormoni stresa, uz prisustvo netretiranih uzoraka (Basal). Priprema uzoraka bila je ista kao i u prethodno objašnjenim ogledima, dok su korišćene doze adrenalina bile 10 µM i 100 µM, a hidrokortizona 50 pM i 500 pM. Inkubacija spermatozoida sa hormonima stresa trajala je 30 minuta u inkubatoru na 37 °C uz blago mešanje na adaptiranom šejkeru. Po isteku inkubacionog vremena, uzorci su podvrgnuti proceduri *ex vivo* stimulacije procesa kapacitacije i akrozomske reakcije spermatozoida. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

#### 4.3.4.2. Manipulacija signalnih puteva *ex vivo* primenom Sildenafilila (Viagra)



**Slika 4.3.11. Šematski prikaz eksperimentalnog modela *ex vivo* primene Sildenafilila (Viagra®).** Spermatozoidi adultnih (3 meseca starih), 12 i 18 meseci starih mužjaka pacova, izolovani iz kaudalnog epididimisa, tretirani su inhibitorom PDE5, Sildenafililom, tokom 6 sati, nakon čega je u ćelijskom medijumu kao i u talogu ćelija određena koncentracija nitrita.

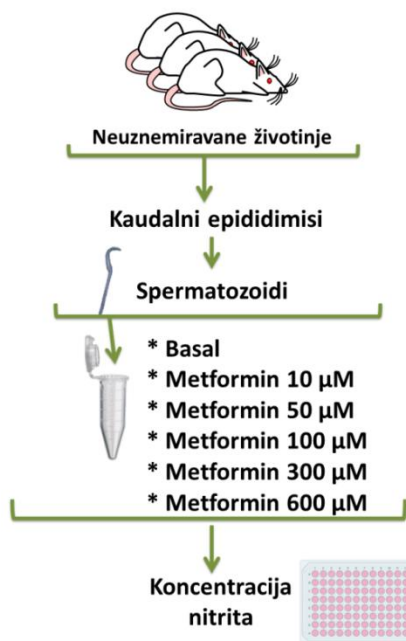
Druga grupa *ex vivo* eksperimenata obuhvatala je eksperimente u kojima su spermatozoidi adultnih mužjaka pacova, kao i mužjaka starih 12 i 18 meseci, tretirani inhibitorom PDE5, Sildenafililom (Viagra®) (Slika 4.3.11). Tretman Sildenafililom porazumevao je korišćenje različitih doza ove supstance uz prisustvo netretiranih uzoraka (Basal). Kao i u gore opisanim *ex vivo* ogledima, spermatozoidi izolovani iz kaudalnog epididimisa pacova u DMEM/F12 medijumu raspoređeni su u tubice po  $10 \times 10^6$  spermatozoida. Spermatozoidi su



tretirani sledećim dozama Sildenafil: 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM i 5 mM. Inkubacija uzoraka trajala je 6 sati u inkubatoru na 37 °C uz blago mešanje na adaptiranom šejkeru. Po isteku inkubacionog vremena, svi uzorci su centrifugirani 7 minuta pri brzini od 1000xg. Supernatant je prebačen u nove tubice, dok je talog zamrznut na -70 °C. Eksperiment je ponovljen tri puta.

#### 4.3.4.3. Manipulacija signalnih puteva *ex vivo* primenom Metformina, leka za dijabetes tip 2.

##### Ex vivo primena Metformina (lek za dijabetes tip 2)



**Slika 4.3.12.** Šematski prikaz eksperimentalnog modela *ex vivo* primene Metformina. Spermatozoidi adultnih, neuznemiravanih, mužjaka pacova izolovanih iz kaudalnog dela epididimisa, tretirani su tokom 6 sati različitim koncentracijama Metformina, leka za dijabetes tip 2. Po isteku inkubacionog perioda, u ćelijskom medijumu je određena koncentracija nitrita.

U okviru treće grupe *ex vivo* eksperimenata spermatozoidi adultnih mužjaka pacova tretirani su Metforminom, lekom za dijabetes tip 2 (Slika 4.3.12.). U eksperimentima su korišćene sledeće doze Metformina: 10 μM, 50 μM, 100 μM, 300 μM i 600 μM. U svim ogleđima bili su prisutni i netretirani uzorci spermatozoida (Basal). U ogleđima su korišćeni spermatozoidi izolovani iz kaudalnog epididimisa adultnih pacova, starosti 3 meseca, koji su resuspendovani u DMEM/F12 medijumu i raspoređeni u tubice po  $10 \times 10^6$  spermatozoida. Inkubacija uzoraka trajala je 6 sati u inkubatoru na 37 °C uz blago mešanje na adaptiranom šejkeru. Po isteku inkubacionog vremena, svi uzorci su centrifugirani 7 minuta pri brzini od 1000xg. Supernatant je prebačen u nove tubice, dok je talog zamrznut na -70 °C. Eksperiment je ponovljen tri puta.

#### 4.4. Genotipizacija miševa, klasična PCR reakcija i gel elektroforeza

Da bi se utvrdio genotip knock-out miševa korišćenih u eksperimentima, pre 21. postnatalnog (p21) dana životinje su obeležavane bušenjem ušiju. Tkivo dobijeno tokom obeležavanja miševa korišćeno je za izolaciju DNK i klasičnu lančanu reakciju polimeraze (PCR) u prisustvu prajmera za Cre rekombinazu, *Insr* i *Igflr* (Radovic Pletikosic i sar., 2021a; Sava M Radovic i sar., 2019). Izolacija DNK iz tkiva rađena je pomoću Direct PCR (Tail) Lysis reagensa (Viagen Biotech Inc) sa dodatkom 0.2 mg/ml proteinaze K (Promega). Liziranje tkiva ušiju rađeno je na temperaturi od 56 °C uz mešanje (500 rpm) tokom noći (Thermomixer comfort, Eppendorf). Inaktivacija Proteinaze K rađena je inkubacijom lizata na 85 °C/ 500 rpm u trajanju od 45 minuta. Lizati su nakon toga korišćeni za klasičnu reakciju PCR koja je rađena pomoću komercijalnog kompleta Ready Platinum® Blue PCR Super Mix (Promega) uz prisustvo prajmera prikazanih u tabeli 4.4.1. PCR reakcija rađena je prema uputstvu proizvođača ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)) u aparatu Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) prema sledećem programu: (1) 94 °C/4 min; (2) 94 °C/30 sec; (3) 60 °C/30 sec (-1 °C/po ciklusu); (4) 67 °C/1 min; (5) 10 puta koraci od 2 do 4; (6) 94 °C/30 sec; (7) 52 °C/30 sec; (8) 67 °C/1 min (+1 °C/po ciklusu); (9) 30x ponavljanje koraka 6 do 8; (10) 67 °C/ 5 min; (11) 4 °C. Razdvajanje produkata PCR reakcije rađeno je horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu sa dodatkom 0.5 µg/ml etidijum-bromida, u 1xTAE puferu pri naponu od 100V tokom jednog sata. Nakon razdvajanja produkti su vizuelizovani pod UV lampom u aparatu za slikanje gelova myECL Imager (ThermoFisher Scientific).

**Tabela 4.4.1. Sekvence prajmera korišćenih za genotipizaciju.**

Gen	Pristupni kod	Sekvenca prajmera	Dužina prajmera	Veličina produkta
<i>Sex</i>	NC_000086.7	F: 5'-GATGATTTGAGTGGAAATGTGAGGTA -3' R: 5'-CTTATGTTTATAGGCATGCACCATGTA -3'	26 bp 27 bp	300 bp
<i>Cyp11a1</i> <i>Cre</i>	Hu-Shui i sar., Genesis 2007; 45:59-65	F: 5'-GGAGGAAGGACGTGAACAT -3' R: 5'-TCTGCACACAGACAGGAGCAT -3'	19 bp 21 bp	318 bp
<i>Insr</i>	NC_000074.6	F: 5'-CTGAATAGCTGAGACCCACAG -3' R: 5'-CACACACACACGCCTACAC -3' R: 5'-TCTCCCTACACCCACTCACA -3'	20bp 19 bp 20 bp	wt alel 300 bp flox alel 450 bp Δ alel 250 bp
<i>Igflr</i>	NC_000073.6	F: 5'-TGAGACGCGAGATTGCTGTA -3' F: 5'-CTTCCCAGCTTGCTACTCTAGG -3' R: 5'-CAGGCTTGCAATGAGACATGGG-3'	20 bp 22 bp 22 bp	wt alel 200 bp flox alel 240 bp Δ alel 280 bp

Prajmeri su dizajnirani u Laboratoriji za molekularnu i biologiju razvoja pola prof. Serđa Nefa (Departman za genetičku medicinu i razvoj, Univerzitet u Ženevi, Švajcarska, <http://www.unige.ch/medecine/nef/>). Za reference pogledati Pitetti i sar. 2009, 2013a, 2013b. F - direktni prajmer (*engl.* forward); R - reverzni prajmer (*engl.* reverse).

#### 4.5. Određivanje koncentracije hormona u serumu

Merenje koncentracije androgena (T+DHT) vršeno je RIA metodom, korišćenjem anti-testosteron seruma №250 koji pokazuje 100% unakrsnu reaktivnost sa dihidrottestosteronom, tako da se izmerena koncentracija odnosi na testosteron i dihidrottestosteron, T+DHT (za reference pogledati Starovlah i sar., 2021, 2020). Svi uzorci mereni su u duplikatu. Senzitivnost eseja iznosila je 6 pg po epruveti, dok je intra-esejski koeficijent varijacije iznosio 5-8%. Merenje koncentracije LH vršeno je RIA metodom prema uputstvu proizvođača (ALPCO

Diagnostic-LH (Rat) RIA, [www.alpco.com](http://www.alpco.com)) u kojoj je detekcioni limit bio 0.14 ng/ml. Senzitivnost eseja iznosila je 1 ng/ml, dok je intra-esejski koeficijent varijacije iznosio 4.2%. Koncentracija kortikosterona (CORT) u serumu određena je pomoću komercijalnog kompleta za enzimoimunološku analizu (EIA) po uputstvu proizvođača ([www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)) u kom je detekcioni limit bio 30 pg/ml. Standardna inhibiciona kriva bila je raspona 8.2-5000 pg/ml. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 420 nm pomoću fotometra Multiskan EX Plate Reader (Thermo-Labsystems). Koncentracija adrenalina u serumu određena je korišćenjem komercijalnog kompleta (Adrenaline Research ELISA) po uputstvu proizvođača ([www.ldn.de](http://www.ldn.de)). Standardna kriva bila je raspona 0.45-45 ng/ml, dok je limit detekcije iznosio 3.9 pg/ml. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 450 nm pomoću fotometra Multiskan EX Plate Reader (Thermo-Labsystems).

#### 4.6. Priprema primarne kulture Lajdigovih ćelija

Primarna kultura Lajdigovih ćelija dobijena je izolacijom intersticijalnih ćelija testisa, iz kojih je gradijentnim centrifugiranjem izdvojena populacija Lajdigovih ćelija (za reference pogledati (Gak i sar., 2015)). Nakon žrtvovanja životinja izvađeni su testisi, dekapulirani i izvađen je glavni krvni sud. Testisi jedne životinje stavljeni su u epruvetu zapremine 50 ml koja je sadržala 3 ml medijuma M199 obogaćenog sa 20 mM HEPES, 1.2 mg/ml kolagenaze i 1.5% BSA. Enzimaska disagregacija tkiva testisa kolagenazom rađena je u vodenom kupatilu na temperaturi od 34 °C i 120 ciklusa u minuti, u trajanju od 15 minuta. Reakcija enzimske disagregacije tkiva prkinuta je dodavanjem 20 ml hladnog medijuma M199 obogaćenog sa 0.5% BSA. Odvajanje seminiferne tubule od intersticijuma testisa vršeno je filtriranjem kroz najlonsku mrežicu (Mesh No.100, Sigma Aldrich) u novu epruvetu zapremine 50 ml, i dodatnim ispiranjem epruvete sa još 5 ml ovog medijuma. Intersticijalne ćelije centrifugirane su 5 minuta na 160xg sa ciljem ispiranja zaostalog enzima kolagenaze. Intersticijalne ćelije u talogu resuspendovane su u 8 ml DMEM/F12 medijuma. Dobijena primarna kultura intersticijalnih ćelija korišćena je za dalju izolaciju primarne kulture Lajdigovih ćelija metodom gradijentnog centrifugiranja tokom kog se Lajdigove ćelije pozicioniraju na sloju koji najviše odgovara njihovoj specifičnoj gustini (Klinefelter i sar., 1987). Gradijenti Perkola naslojavani su u epruvete zapremine 12 ml i sastojali su se od tri sloja različite specifične gustine: 1.080 g/ml (zapremine 3 ml), 1.065 g/ml (zapremine 2 ml), 1.045 g/ml (zapremine 2 ml). Da bi se dobile navedene gustine Perkolnih gradijenata, rastvor Perkola mešan je sa odgovarajućom zapreminom 10x koncentrovanog medijuma DMEM/F12 obogaćenog sa 3% BSA i destilovanom vodom. Nakon toga je na najmanju gustinu Perkola (1.045 g/ml) dodato 4 ml suspenzije intersticijalnih ćelija. Epruvete sa Perkolnim gradijentima i intersticijalnim ćelijama centrifugirane su 28 minuta na 1100xg, na sobnoj temperaturi. Po završetku centrifugiranja Lajdigove ćelije sakupljene su u graničnim delovima slojeva 1.045/1.065 g/ml i 1.065/1.080 g/ml u epruvetu zapremine 50 ml. Primarna kultura Lajdigovih ćelija isprana je od Perkola dopunjavanjem epruvete do 50 ml sa medijumom M199 obogaćenim 0.1% BSA, i centrifugiranjem 5 minuta na 200xg. Talog ćelija resuspendovan je u 5 ml medijuma DMEM/F12. Broj i vijabilnost Lajdigovih ćelija određeni su Tripan blue testom (*engl.* Tripan blue exclusion test), pri čemu je 50 µl ćelijske suspenzije pomešano sa 0.4% Tripan blue boje u odnosu 1:1. Vijabilnost ćelija prilikom svake izolacije bila je veća od 90%. Procenat Lajdigovih ćelija prisutnih u primarnoj kulturi određen je ispitivanjem aktivnosti HSD3B enzima, i iznosio je  $95.3 \pm 1.5\%$ . Dobijena primarna kultura Lajdigovih ćelija korišćena je za *ex vivo* tretmane agonistima i antagonistima  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -adrenergičkih receptora, kao i agonistima i antagonistima glukokortikoidnih receptora, ili su ćelije nakon *in vivo* eksperimenata odmah nakon izolacije zamrznute na -80 °C sa ciljem dalje izolaciju RNK i proteina.

#### 4.7. Izolacija spermatozoida

Spermatozoidi su izolovani iz kaudalnih epididimisa prema proceduri propisanoj od strane Svetske zdravstvene organizacije uz modifikacije za izolaciju spermatozoida pacova (<https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>). Kaudalni epididimisi su nakon žrtvovanja životinje brzo izvađeni, stavljeni na filter papir i okolno masno tkivo je uklonjeno. Tako očišćeni epididimisi su stavljeni u petri posude sa 4 ml medijuma za izolaciju i prezervaciju spermatozoida (1% M199 u HBSS sa dodatkom 20 mM HEPES buffer i 5% BSA) i bockani su iglom (25G) da bi omogućili spermatozoidima da se oslobode u medijum tokom inkubacije od 10 minuta na 37 °C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije, spermatozoidi koji su oslobodjeni u medijum sakupljeni su u epruvetu zapremine 12 ml. Suspenzija sakupljenih spermatozoida je centrifugirana 5 minuta/700xg na sobnoj temperaturi. Supernatant je uklonjen a talog spermatozoida je resuspendovan u odgovarajućem medijumu, u zavisnosti od daljeg tretmana. Koncentracija spermatozoida je izračunata korišćenjem Maklerove komore (Sefi-Medical Instruments, ltd).

#### 4.8. Kapacitacija, akrozomska reakcija i priprema trajnih mikroskopskih preparata spermatozoida

Ispitivanje funkcionalnosti spermatozoida, određivanjem % spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju nakon stimulacije progesteronom, vršeno je nakon *in vivo* i *ex vivo* eksperimenata. Primarna kultura u koncentraciji od  $1.5 \times 10^5$  spermatozoida u WH medijumu u zapremini od 50  $\mu$ l pomešana je sa 350  $\mu$ l WH+ medijuma (WH medijum sa dodatkom 10 mg/ml BSA i 20 mM of  $\text{NaHCO}_3$ ) da bi se stimulisao proces kapacitacije. Medijum koji obezbeđuje uslove za kapacitaciju spermatozoida u *ex vivo* uslovima sadrži albumine koji obezbeđuju uklanjanje holesterola iz membrane spermatozoida, dok dodatak bikarbonata omogućava ulazak ovih anjona u spermatozoide, povećanje intracelularnog pH kao i aktivaciju solubilne adenili ciklaze. U uzorke je dodata i kap mineralnog ulja, da bi se sprečilo isparavanje tečnosti tokom procesa inkubacije. Period inkubacije uzoraka trajao je 1 sat na 37 °C (5%  $\text{CO}_2$ ). Po isteku inkubacionog perioda, 50  $\mu$ l kapacitiranih spermatozoida prebačeno je u po dve nove tubice (1.5 ml). U jednu seriju tubica dodati su 1  $\mu$ l progesterona (finalne koncentracije 15  $\mu$ M) dok je druga serija tubica svakog uzorka inkubirana bez prisustva progesterona. Progesteron u tubicama u kojim je prisutan dovodi do stimulacije akrozomske reakcije, dok su tubice bez progesterona prisutne kao kontrola procesa akrozomske reakcije. Kap mineralnog ulja dodata je u svaki uzorak, a period inkubacije trajao je 30 minuta na 37 °C (5%  $\text{CO}_2$ ). Nakon perioda inkubacije 20  $\mu$ l svakog uzorka prebačeno je u novu tubicu i pomešano sa 100  $\mu$ l rastvora za fiksiranje (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl i 7.5% formaldehid). Uzorci su fiksirani 20 minuta na sobnoj temperaturi, sa zatvorenim poklopcima. Nakon fiksiranja, uzorci su centrifugirani 1 minut/12000xg. Supernatant je odliven a talog je ispran sa 50  $\mu$ l rastvora 100 mM ammonium acetata, pH 9. Od fiksiranih uzoraka spermatozoida napravljeni su razmazi na mikroskopskim pločicama i ostavljeni su da se osuše na sobnoj temperaturi. Osušeni razmazi bojeni su rastvorom za bojenje spermatozoida (0.04% Coomassie Blue – G250, 50% metanol i 10% sirćetna kiselina) u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Višak boje ispran je korišćenjem destilovane vode, a pločice su nakon bojenja ostavljene da se osuše na sobnoj temperaturi. Pripremljeni mikroskopski preparati posmatrani su pod mikroskopom Leica DMLB 100T (Leica, Germany, [www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)), pod uvećanjem od 1000x. Deset do petnaest fotografija na svakoj pločici napravljeno je kamerom Leica MC190 (Leica, Germany, [www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)) i

obrađeno u LAS Ver 4.8.0 softveru. Do 100 spermatozoida po svakoj pločici analizirao je sa ciljem utvrđivanja statusa akrozoma spermatozoida. Plavo obojeni region duž cele akrozomske kape ukazivao je na intaktni akrozom, dok su spermatozoidi koji u regionu akrozomske kape nisu imali plavo obojen akrozom čitavom dužinom, smatrani za spermatozoide koji su prošli akrozomsku reakciju. Rezultati su predstavljeni kao procenat spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju, u odnosu na ukupan broj spermatozoida.

#### 4.9. Imunofluorescentna analiza spermatozoida

Lokalizacija glavnih mitohondrijalnih markera i signalnih proteina koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku određena je korišćenjem metode imunofluorescencije prethodno objašnjene (Matamoros-Volante i sar., 2018), uz određene modifikacije (Starovlah i sar., 2020). Pet kontrolnih (neuznemiravanih) životinja korišćeno je u eksperimentu. Nakon izolacije spermatozoida iz kaudalnog dela epididimisa po proceduri opisanoj ranije, određen je njihov broj i  $90 \times 10^6$  (u zapremini od 12 ml u epruveti od 50 ml) spermatozoida resuspendovanih u WH medijumu korišćeno je za dalju proceduru imunoflorescentnog bojenja. Spermatozoidi su zatim inkubirani 1 sat na 37 °C (5% CO<sub>2</sub>). Po isteku inkubacionog vremena, spermatozoidi su centrifugirani 5 min/800xg, supernatant je odliven dok su spermatozoidi u talogu isprani rastvorom 1xPBS i ponovo centrifugirani 5 min/800xg. Nakon ispiranja, spermatozoidi su fiksirani u 2% (v/v) rastvoru paraformaldehida u 1xPBS, u trajanju od 20 minuta. Spermatozoidi su dalje centrifugirani 5 min/800xg, isprani sa 1xPBS rasvorom, centrifugirani 5 min/800xg i resuspendovani u 2 ml rastvora za permeabilizaciju koji se sastoji od 0.05% (v/v) Triton X-100 u 1xPBS rastvoru. Čelije su permeabilizovane 15 minuta na sobnoj temperaturi. Dalje, spermatozoidi su isprani 1xPBS rastvorom i centrifugirani 5 min/4000xg. Nakon ispiranja, usledio je korak blokiranja spermatozoida nakon permeabilizacije, u periodu od 2 sata u 3% BSA u 1xPBS rastvoru na sobnoj temperaturi. Blokirani spermatozoidi su dalje podeljeni u tubice zapremine 1.5 ml, po  $1.8 \times 10^6$  spermatozoida po tubici u volumenu od 300 µl, i dalje inkubirani sa primarnim antitelom tokom noći na 4 °C. Antitela koja vezuju proteine PGC1 (sc-13067), NRF1 (sc-33771), AMPK $\alpha$ 1/2 (sc-74461) i ACTIN (sc-1616) kupljeni su od Santa Cruz Biotechnology Inc ([www.scbt.com](http://www.scbt.com)). Antitela koja vezuju proteine PRKAc (#610980) i PRKAr (#p53620) kupljeni su od BD Transduction Laboratories ([www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)), dok su antitela koja vezuju PRKCQ (#9377S), p38MAPK (#9212) i pp38MAPK (#9211S) kupljeni od Cell Signaling Technology ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)). Antitelo koje vezuje GR (#MA1-510) nabavljeno je od Thermo Fisher Scientific ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Po isteku inkubacionog vremena sa primarnim antetielima, spermatozoidi su isprani 1xPBS rastvorom i centrifugirani 5 min/4000xg. Talog ispranih spermatozoida resuspendovan je u odgovarajućem sekundarnom imunofluorescentnom antitelu Alexa Fluor 555 (Abcam, ab150078 ili ab150114) i Alexa Fluor 488 (Abcam, ab150077 ili ab150113) u zapremini od 300 µl tokom jednog sata u mraku. Korišćena antitela kao i tačna razblaženja prikazani su u tabeli 4.10.1. Po isteku inkubacionog vremena uzorci su centrifugirani 5 min/4000xg, supernatant je odliven a talog resuspendovan u poslednjoj kapi 1xPBS rastvora koja se zadrži na zidu tubice. Na predmetnim pločicama napravljena su po dva razmaza svakog uzorka koja su zatim montirana Fluoroshield Mounting medijumon sa DAPI bojom (Abcam, ab104139). Uzorci su analizirani na mikroskopu Leica DMLB100T (Leica, Germany, [www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)), dok su fotografije napravljene pomoću kamere Leica MC 190 HD (Leica, Germany, [www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)).



**Tabela 4.9.1. Karakteristike antitela korišćenih za imunofluorescentnu analizu.**

	Naziv antitela	Sekvenca antigena	Proizvođač i kataloški broj	Mono- ili poliklonalno	Razblaženje
<b>PGC1</b>	Epitope mapping at amino acids 1-300 mapping near the N-terminus of PGC-1 of human origin	PGC-1 (H-300) Peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1	Santa Cruz Biotech. Inc sc-13067 MW (PGC1) =90kDa	Rabbit polyclonal IgG	1:50
<b>NRF1</b>	Epitope mapping amino acids 204-503 mapping at the C-terminus of human origin	NRF-1 (H-300) Nuclear respiratory factor 1	Santa Cruz Biotech. Inc sc-33771 MW (NRF1) = 68 kDa	Rabbit polyclonal IgG	1:50
<b>AMPK<math>\alpha</math>1/2</b>	Amino acids 251-550 mapping at the C-terminus of AMPK1 $\alpha$ of human origin	AMPK $\alpha$ 1/2 (D-6) 5'-AMP/activated protein kinase	Santa Cruz Biotech. Inc sc-74461 MW (AMPK $\alpha$ 1/2) = 63 kDa	Mouse monoclonal IgG2a	1:50
<b>PRKCQ</b>	Phospho-PKC $\theta$ (Thr538) Antibody	Phospho-PKC $\theta$ (Thr538)	Cell Signaling Technology #9377S MW (PRKCQ) = 70 kDa	Rabbit polyclonal	1:500
<b>PRKAc</b>	Generated from human PRKAC $\alpha$ subunit	Anti-Protein Kinase A catalitic subunit antibody	BD Transduction Laboratories #610980 MW (PRKAc) = 40 kDa	Mouse monoclonal IgG2b	1:500
<b>PRKAr</b>	Generated from human PKA [RI $\alpha$ ] aa. 1-381	Anti-PKA [RI $\alpha$ ]	BD Transduction Laboratories #p53620 MW (PRKAr) = 49 kDa	Mouse monoclonal IgG1	1:500
<b>p38MAPK</b>	p38 MAP Kinase Antibody detects endogenous levels of total p38 $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ MAPK protein	P38 MAPK Antibody	Cell Signaling Technology #9212 MW (p38MAPK) = 43 kDa	Rabbit polyclonal	1:500
<b>pp38MAPK</b>	Synthetic phosphopeptide corresponding to residues around Thr180/Tyr182 of human p38	Phospho-P38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody	Cell Signaling Technology #9211S MW (pp38MAPK) = 43 kDa	Rabbit polyclonal IgG	1:500
<b>GR</b>	Glucocorticoid receptor Monoclonal Antibody (BuGR2)	Glucocorticoid receptor (BuGR2)	Thermo Fisher Scientific #MA1-510 MW (GR) = 97 kDa	Mouse monoclonal IgG2	1:500
<b>ACTIN</b>	Epitope mapping at the Cterminus of ACTIN of human origin	ACTIN (I-19)	Santa Cruz Biotechnology Inc sc-1616 MW (ACTIN) = 43 kDa	Goat polyclonal IgG	1:50

#### **4.10. Određivanje nivoa cikličnog guanozin monofosfata u uzorcima tkiva hipotalamusa, adenohipofize i nadbubrega, kao i u uzorcima spermatozoida kaudalnog epididimisa**

Koncentracija cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) u uzorcima tkiva hipotalamusa, adenohipofize i nadbubrega, kao i u spermatozoidima, određena je upotrebom komercijalnog kompleta Cyclic GMP ELISA kit (Cayman chemical) prema uputstvu proizvođača.

Uzorci spermatozoida pripremljeni su prema uputstvu proizvođača, i do trenutka merenja cikličnog guanozin monofosfata čuvani su u tubicama zapremine 1.5 ml na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Spermatozoidi su lizirani u 0.5 ml hladnog etanola pomoću špatulica za liziranje. Nakon liziranja uzorci su centrifugirani 3 minuta na  $1500\times g$ , supernatant je odliven u nove tubice i ostavljen u digestor radi uparavanja alkohola. Nakon što je sav alkohol iz uzorka ispario, na uzorke je dodat rastvor 1xPBS sa dodatkom 0.1% BSA i 1 mM IBMX. IBMX je korišćen sa ciljem inhibicije fosfodiesteraza. Uzorci su resuspendovani po standardnoj proceduri mešanja na vorteksu u trajanju od 30 sekundi i inkubacije na sobnoj temperaturi 5 minuta. Ovakav postupak rastvaranja taloga ponovljen je 2 puta, nakon čega su uzorci čuvani 1 sat na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a nakon toga u zamrzivaču na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , do procesa acetilacije i merenja koncentracije cikličnih nukleotida.

Tkivo hipotalamusa, adenohipofize i nadbubrega pripremljeno je prema proceduri preporučenoj od strane proizvođača. Uzorci tkiva su nakon ogleđa brzo zamrznuti i čuvani na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mase tkiva su najpre izmerene a zatim je dodato 10 volumena 5% trihlorsirćetne kiseline. Nakon dodavanja 5% TCA, uzorci su homogenizovani na ledu, korišćenjem homogenizera. Homogenizovani uzorci centrifugirani su 10 minuta na  $1500\times g$ , i supernatant je prenet u nove tubice. Uklanjanje TCA iz uzoraka vršeno je dodavanjem vodom-zasićenog etra. Da bi se dobio vodom-zasićeni etar, voda je dodata u etar, rastvor je promešan i ostavljen da se slojevi razdvoje. Nakon razdvajanja slojeva, gornji sloj vodom-zasićenog etra korišćen je u nastavku procedure. U supernatante uzoraka dodata je 5 puta veća zapremina vodom-zasićenog etra u odnosu na zapreminu supernatanta, sve je promešano 10 sekundi, nakon čega dozvoljeno razdvajanje organske i vodene faze. Gornja faza u kojoj se nalazi etar, je uklonjena i postupak je ponovljen još dva puta. Zaostali etar iz vodene faze uklonjen je zagrevanjem uzoraka na  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  tokom 5 minuta.

Određivanje cGMP u sadržaju spermatozoida kao i tkiva hipotalamusa, adenohipofize i nadbubrega vršeno je pomoću kompleta za enzimsko-imunološku analizu za merenje koncentracije cGMP (Stojkov i sar., 2013). Princip analize je baziran na kompetitivnom vezivanju cGMP iz uzorka i konjugata cGMP-acetilholin esteraze za ograničen broj mesta za vezivanje na monoklonalnom antitelu. Priprema uzoraka, acetilacija i kompletna analiza je izvođena prema protokolima proizvođača (<https://www.caymanchem.com>). Opseg inhibicione krive bio je od 0.23 do 30 pmol/ml a senzitivnost 0.1 pmol/ml (80% B/B0). Za merenje apsorbanci korišćen je fotometar Multiscan EX Plate Reader (Thermo-Labsystems).

#### **4.11. Određivanje nivoa nitrita u ćelijskom medijumu i talogu spermatozoida**

Merenje nivoa nitrita u ćelijskom medijumu i talogu spermatozoida rađeno je metodom po Griess-u (Green i sar., 1982), sa manjim modifikacijama. Standardna kriva je formirana upotrebom standardnog rastvora natrijum nitrita ( $\text{NaNO}_2$ ), raspona od  $0.195\text{ }\mu\text{M}$  do  $100\text{ }\mu\text{M}$ . Tačkama standardne krive i alikvotima uzoraka u zapremini od  $100\text{ }\mu\text{l}$  dodat je rastvor Griess-ovog reagensa (0.5 % sulfanilamid i 0.05 % NEDA u 2.5 % fosfornoj kiselini) u odnosu 1:1. Nakon inkubacije u mraku, na sobnoj temperaturi u periodu od 10 minuta, izmerena je apsorbancia na talasnoj dužini od  $546\text{ nm}$  pomoću fotometra Multiscan EX Plate Reader (Thermo-Labsystems).

#### 4.12. Određivanje koncentracije ATP-a u spermatozoidima

Određivanje koncentracije molekula ATP-a u spermatozoidima rađeno je korišćenjem komercijalnog kompleta ATP Bioluminescence Assay CLS II prema uputstvu proizvođača ([www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)). Metoda određivanja koncentracije ATP zasniva se na reakciji ATP i luciferaze pri čemu se emituje luminiscentni signal čiji je intenzitet direktno proporcionalan količini ATP-a u uzorku. Koncentracija ATP u uzorcima spermatozoida rađena je očitavanjem luminiscencije uzoraka i tačaka standardne krive. Raspon standardne krive u ovom kompletu bio je od  $10^{-5}$  M do  $10^{-10}$  M). Prilikom određivanja nivoa ATP, 50  $\mu$ l standarda odnosno uzorka mešano je sa 50  $\mu$ l luciferaze. Luminiscenca je očitavana na aparatu Fluorocan Ascent FL (ThermoLabsystems). Svi uzorci mereni su u duplikatu u jednom eseju, dok je kao slepa proba korišćena destilovana voda.

Priprema uzoraka za merenje koncentracije ATP-a rađena je prema uputstvu proizvođača. Uzorci spermatozoida nakon *in vivo* ogleda imobilizacionog stresa čuvani su u tubicama na  $-80$  °C do trenutka liziranja ćelija sa ciljem merenja koncentracije ATP. Liziranje spermatozoida ( $1 \times 10^6$ ) rađeno je u destilovanoj vodi uz dodatak ključalog rastvora Tris-EDTA u odnosu 1:9 (v:v=1:9). Lizat je nakon toga inkubiran 2 minuta na  $100$  °C, u ključaloj vodi. Uzorci su nakon toga centrifugirani 1 min/  $1200 \times g$  na sobnoj temperaturi.

#### 4.13. Relativna kvantifikacija ekspresije transkriptata u primarnim kulturama Lajdigovih ćelija i spermatozoida, kao i u primarnim kulturama tkiva hipotalamusa, adenohipofize i nadbubrega

U cilju kvantifikacije relativne ekspresije transkriptata u primarnim kulturama Lajdigovih ćelija i spermatozoida, kao i u primarnim kulturama tkiva hipotalamusa, adenohipofize i nadbubrega, primarne kulture ćelija i tkiva su nakon izolacije i/ili tretmana zamrznuti na  $-80$  °C pre procesa izolacije RNK. Izolovana RNK je kao matrica služila u reakciji reverzne transkripcije, u kojoj je dobijena komplementarna DNK (cDNK) koja je korišćena u PCR analizi.

##### 4.13.1. Izolacija ukupne RNK i tretman DNazom I.

Izolacija ukupne RNK iz tkiva hipotalamusa, adenohipofize, nadbubrega i primarne kulture Lajdigovih ćelija rađena je pomoću RNeasy Mini Kit (Qiagen) komercijalnog kompleta za izolaciju ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) ili pomoću TRIzol reagensa (Invitrogen) ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)) prema protokolu proizvođača. Za izolaciju RNK iz primarne kulture spermatozoida korišćen je GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma) komplet po uputstvu proizvođača ([www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)). U osnovni komercijalnih kompleta korišćenih za izolaciju ukupne RNK, je selektivno vezivanje molekula RNK za silika-gel membranu. Ovom koraku prethodi liziranje uzoraka ćelija i tkiva puferima koji sadrže  $\beta$ -merkaptotanol, a nakon toga i homogenizacija lizata pomoću kolona za homogenizaciju.

Izolacija RNK pomoću TRIzol reagensa, koji predstavlja rastvor fenola i guanidin-izotiocianata, rađena je prema preporukama proizvođača. Funkcija TRIzol reagensa je da obezbedi liziranje tkiva i ćelija, denaturaciju proteina i odvajanje RNK od ribozomalnih proteina. Nakon tretmana uzoraka ćelija i tkiva TRIzolom, taloženje proteina vršeno je dodavanjem hloroforma (Lach-Ner.s.r.o, Neratovice, Czech Republic) dok je taloženje RNK vršeno dodavanjem izopropil alkohola (Lach-Ner.s.r.o, Neratovice, Czech Republic), a dodatno ispiranje RNK vršeno je 70% etanolom. Koncentracija i čistoća izolovane ukupne RNK u svim slučajevima određivana je pomoću BioSpec-nano, Shimadzu, aparata ([www.ssi.shimadzu.com](http://www.ssi.shimadzu.com)).



U osnovi ovog vida merenja je spektrofotometrijska analiza koja se zasniva na sposobnosti nukleinskih kiselina da apsorbuju svetlost talasne dužine 260 nm. Da bi se odredila čistoća uzoraka RNK, određeni su i odnosi apsorbanci 260/280 nm (koja govori o prisustvu proteina) i 260/230 nm (koja govori o mogućoj kontaminaciji solima, EDTA itd.) (za reference pogledati Gak i sar., 2015; Starovlah i sar., 2021, 2020, 2017).

U cilju eliminacije eventualno zaostale genomske DNK, uzorci ukupne RNK tretirani su DNazom I u prisustvu DNazeI-reakcionog pufera, nakon čega je dodat rastvor EDTA sa ciljem inhibicije prethodno dodatog enzima. Procedura je izvođena prema uputstvu proizvođača ([www.neb.com](http://www.neb.com)).

#### **4.13.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) u reakciji reverzne transkripcije**

Komplementarna DNK (cDNK) sintetisana je korišćenjem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kompleta za reverznu transkripciju, prema uputstvu proizvođača ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Opseg koncentracija korišćen u reakcijama bio je između 200 ng i 1 µg ukupne RNK. Svaki set reakcija sadržao je negativnu kontrolu, odnosno miks komponenti kompleta bez prisustva RNK. Reakcije reverzne transkripcije izvođene su u Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) aparatu (za reference pogledati Gak i sar., 2015; Starovlah i sar., 2021, 2020, 2017)).

#### **4.13.3. Relativna kvantifikacija ekspresije transkripta lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (real-time PCR)**

Relativna kvantifikacija ekspresije transkripata vršena je korišćenjem Power SYBR<sup>®</sup>Green Master Mix-a (Applied Biosystems) prema uputstvu proizvođača ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Svaka PCR reakcija sadržala je 2.5 µl cDNK (raspona koncentracije 10-20 ng) i 10 µl miksa koji je sadržao pored Power SYBR<sup>®</sup>Green Master Mix-a i specifične prajmere (direktne i reverzne) u koncentraciji od 500 nM. Reakcije real-time PCR-a izvođene su u aparatu Eppendorf Master Cycler RealPlex 4 (Eppendorf), dok je za obradu dobijenih podataka korišćen Mastercycler<sup>®</sup> eprealplex Software (Eppendorf). Podaci vezani za sekvence prajmera, pristupni kod za GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) kao i Ct vrednosti u ispitivanim ćelijama i tkivima prikazani su u Tabelema od 4.16.1. do 4.16.7. U svim uzorcima je praćena ekspresija gena *Gapdh* (*engl.* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), koji je služio kao endogena kontrola, kao i gen na osnovu kog je rađena korekcija varijacija u koncentraciji cDNK među uzorcima. Relativna kvantifikacija ekspresije svakog gena rađena je u duplikatu.

**Tabela 4.13.1. Sekvence prajmera korišćene u analizi genske ekspresije molekularnih markera mitohondrijalne biogeneze.**

Gen	Pristupni kod	Sekvence prajmera	Dužina prajmera	Dužina produkta	Ct LCs	Ct sperm	Ct HT	Ct AHF	Ct NB
<i>Ppargc1a</i>	NM_031347	F: 5'-AGCCGTAGGCCCAGGTATGACA-3' R: 5'-TGCTTGGCCCTTTCAGACTCCC-3'	22 bp 22 bp	107 bp	31.54	30.54	24.30	27.25	28.37
<i>Ppargc1b</i>	NM_176075	F: 5'-ACCTTCCGGTGTTCGGAGCATG-3' R: 5'-GTGGAAGGAGGGGCTCATTGCGT-3'	22 bp 22 bp	81 bp	28.79	28.71	26.72	26.83	29.17
<i>Tfam</i>	NM_031326	F: 5'-TATAGTCGTCGGCCCCGAGGGAT-3' R: 5'-AAGGCTGACAGGCGAGGGTATG-3'	22 bp 22 bp	125 bp	24.67	28.13	26.26	24.80	26.31
<i>Nrf1</i>	NM_001100708	F: 5'-GACCATCCAGACGACGCAAGCA-3' R: 5'-ATGGGCGGCAGCTTCACTGTT-3'	22 bp 21 bp	136 bp	24.10	27.89	25.94	23.92	26.39
<i>Nrf2a</i>	NM_001108841	F: 5'-AGCGGAACTGAACCGCTTGGT-3' R: 5'-GTGACTGGCTGAGCAATCCCGT-3'	21 bp 22 bp	84 bp	23.45	27.59	25.39	23.48	24.28
<i>Ppara</i>	NM_013196	F: 5'-GTCCTGGAAGTGAAGCGACGCT-3' R: 5'-TTACGCCCAAATGCACCACGC-3'	22 bp 21 bp	110 bp	26.39	28.71			
<i>Ppard</i>	NM_013141	F: 5'-ACGGTAAAGCGGTCCATCTGC-3' R: 5'-TCCTCCTGTGGCTGTTCCATGAC-3'	22 bp 23 bp	109 bp	25.59	26.38			
<i>mt-Nd1</i>		F: 5'-GCGTGGGAGGAGCATCAGGG-3' R: 5'-GCGAATGGTCCCTGCGGCGTA-3'	20 bp 20 bp	271bp	20.12	18.20	19.76	19.75	17.37
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	25 bp 20 bp	110 bp	18.69	20.72	18.03	18.35	19.96

Prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) i kompletnih genskih sekvenci iz Banke gena dobijenih preko NCBI Entrez Nucleotide database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). F - direktni prajmer; R - reverzni prajmer. LCs - Lajdigove ćelije, sperm-spermatozoidi, HT-hipotalamus, AHF - adenohipofiza, NB - nadbubreg.

**Tabela 4.13.2 Sekvence prajmera korišćene u analizi genske ekspresije molekularnih markera fuzije mitohondrija**

Gen	Pristupni kod	Sekvence prajmera	Dužina prajmera	Dužina produkta	Ct sperm
<i>Mfn1</i>	NM_138976.1	F: 5'-CCTTGTACATCGATTCCCTGGGTTC-3' R: 5'-CCTGGGCTGCATTATCTGGTG-3'	24 bp 21 bp	143 bp	28.91
<i>Mfn2</i>	NM_130894.4	F: 5'-TCAAGCGCCAGTTTGTGGAG-3' R: 5'-CACAGATGAGCAAATGTCCAG-3'	20 bp 23 bp	118 bp	27.18
<i>Opa1</i>	NM_133585.3	F: 5'-AAAAGCCCTTCCCAGTTCAGA-3' R: 5'-TACCCGAGTGAAGAAATCCTT-3'	21 bp 22 bp	101 bp	26.18
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	25 bp 20 bp	110 bp	20.69

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

**Tabela 4.13.3. Sekvence prajmera korišćene u analizi genske ekspresije molekularnih markera mitofisije.**

Gen	Pristupni kod	Sekvence prajmera	Dužina prajmera	Dužina produkta	Ct sperm
<i>Fis1</i>	NM_001105919.1	F: 5'-ACGCCTGCCGTTACTTCTTC-3' R: 5'-GCAACCCTGCAATCCTTCAC-3'	20 bp 20 bp	108 bp	28.89
<i>Drp1</i>	NM_053655.3	F: 5'-AGGTTGCCCGTGACAAATGA -3' R: 5'-CACAGGCATCAGCAAAGTCG -3'	20 bp 20 bp	94 bp	28.85
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	25 bp 20 bp	110 bp	22.44

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

**Tabela 4.13.4. Sekvence prajmera korišćene u analizi genske ekspresije molekularnih markera mitofagije.**

Gen	Pristupni kod	Sekvence prajmera	Dužina prajmera	Dužina produkta	Ct sperm
<i>Pink1</i>	NM_001106694.1	F: 5'-CAAGCAAGTGTCTGACCCAC-3' R: 5'-GCTTCATACACAGCGGCATT-3'	20 bp 20 bp	111 bp	26.23
<i>Prkn</i>	NM_020093.1	F: 5'-CTTCCAGCTCAAGGAAGTGG-3' R: 5'-CAGAGGCATTTGTTTCGTGA-3'	20 bp 20 bp	182 bp	32.47
<i>Tfeb</i>	NM_001025707.1	F: 5'-CGACAACATTATGCGCCTGG-3' R: 5'-CTGTACACGTTTCAGGTGGCT-3'	20 bp 20 bp	102 bp	28.53
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	25 bp 20 bp	110 bp	21.45

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

**Tabela 4.13.5. Sekvence prajmera korišćene u analizi genske ekspresije molekularnih markera funkcionalnosti mitohondrija.**

Gen	Pristupni kod	Sekvence prajmera	Dužina prajmera	Dužina produkta	Ct LCs	Ct sperm	Ct HT	Ct HF	Ct NB
<i>Cox4i1</i>	NM_017202	F: 5'-CGCTGAGATGAACAAGGGCACC-3' R: 5'-TCCCAGATCAGCACAAGCGCA-3'	22 bp 21 bp	93 bp	20.08	22.15	21.90	20.08	21.55
<i>Cox4i2</i>	NM_053472	F: 5'-CACAGCCCAGGAAGTGCTGCTA-3' R: 5'-TGTGCAGTAAGGCTCATCCGGC-3'	22 bp 22 bp	105 bp	30.19	31.39	29.23	27.20	27.24
<i>CytC</i>	NM_012839	F:5'-GCAAGCATAAAGACTGGACCAAA-3' R:5'-TTGTTGGCATCTGTGTAAGAGAATC-3'	22 bp 25 bp	88 bp	21.13	23.52	20.62	20.90	21.87
<i>Ucp1</i>	NM_012682	F: 5'-TCAGCTCTTGTGCGCCGGGTTT-3' R: 5'-TGCACAGCTGGGTACACTTGGG-3'	21 bp 22 bp	114 bp	31.99	29.73			30.36
<i>Ucp2</i>	NM_019354	F: 5'-ACGACCTCCCTTGCCACTTCAC-3' R: 5'-GGTACTGGCCCAAGGCAGAGTT-3'	22 bp 22 bp	117 bp	20.04	22.65	22.61	17.89	18.65
<i>Ucp3</i>	NM_013167	F: 5'-TGCTCAACCCACGGATGTGGT-3' R: 5'-CCTGGCGATGGTTCTGTAGGCA-3'	21 bp 22 bp	112 bp	30.40	29.24			26.23
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	25 bp 20 bp	110 bp	18.69	21.01	18.03	18.35	19.96

Prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) i kompletnih genskih sekvenci iz Banke gena dobijenih preko NCBI Entrez Nucleotide database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). F - direktni prajmer; R – reverzni prajmer. LCs – Lajdigove ćelije, sperm-spermatozoidi, HT-hipotalamus, AHF – adenohipofiza, NB – nadbubreg. Sperm-spermatozoidi.

**Tabela 4.13.6. Sekvence prajmera korišćene u analizi genske ekspresije adrenergičkih receptora i kinaza adrenergičkih receptora.**

Gen	Pristupni kod	Sekvence prajmera	Dužina prajmera	Dužina produkta	Ct sperm
<i>Adra1d</i>	NM_024483	F: 5'-GAAGGTGATGGGTTATGGTG-3' R: 5'-GAAGCCATAGCTGAAGCCT-3'	20 bp 19 bp	152 bp	34.34
<i>Adrb1</i>	NM_012701	F: 5'-TGCCCATCCTCATGCACTGGTG-3' R: 5'-GTAGGCCCGGTTGGTGACGAAA-3'	22 bp 22 bp	98 bp	32.96
<i>Adrb2</i>	NM_012492	F: 5'-CGCCCTTCAAGTACCAGAGCCT-3' R: 5'-TTGCTTGTGGGTGGCACGGT-3'	22 bp 20 bp	131 bp	26.57
<i>Adrbk1 (Grk2)</i>	NM_012776	F: 5'-GCAGCGAGTGCCCAAGATGAAG-3' R: 5'-CACTGCCACGCTGAATCAGTGG-3'	22 bp 22 bp	83 bp	27.82
<i>Adrbk2 (Grk3)</i>	NM_012897	F: 5'-GAGCTGACGTGCACCTTCAACG-3' R: 5'-GATGGCGGCACGTGGTTTGT-3'	22 bp 20 bp	81 bp	28.52
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	25 bp 20 bp	110 bp	22.17

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

**Tabela 4.13.7. Sekvence prajmera korišćene u analizi genske ekspresije komponenti cAMP signalnog puta**

Gen	Pristupni kod	Sekvence prajmera	Dužina prajmera	Dužina produkta	Ct sperm
<i>Adcy3</i>	NM_130779	F: 5'-GCATCGAAACCTACCTCATCA-3' R: 5'-TGGGCTCCTTGGTCTCA ATAA -3'	21 bp 21 bp	141 bp	31.87
<i>Adcy5</i>	NM_022600	F: 5'-AACCAGGTGAACGCATGTCA-3' R: 5'-CTCTGGGAAGTTGCAGTTGGA-3'	20 bp 21 bp	105 bp	30.13
<i>Adcy6</i>	NM_012821	F: 5'-CTGCCTCAGCCTGCTTATGTG-3' R: 5'-GGAGTCCTGGCGGAAGCT-3'	21 bp 18 bp	99 bp	27.46
<i>Adcy7</i>	NM_053396	F: 5'-TTCCGTGCGTGTAACCCGCT-3' R: 5'-GCCTTCTGCCTCCGTCGGT-3'	20 bp 20 bp	123 bp	27.54
<i>Adcy8</i>	NM_017142	F: 5'-ATTGCCTCAGTGGTGACTA-3' R: 5'-CAAACCTCTCCTCGGGCT-3'	19 bp 17 bp	113 bp	29.21
<i>Adcy9</i>	NM_001106980	F: 5'-TCACCAAGCTGTACGCCCGG-3' R: 5'-GGGCTGTCAACACGTCCCGA-3'	20 bp 20 bp	124 bp	30.45
<i>Adcy10</i>	NM_021684	F: 5'-CCAGGCATCGTGACCTGCGA-3' R: 5'-ACTGGTCCGGGATCCGCAAC-3'	20 bp 20 bp	113 bp	30.83
<i>Prkaca</i>	NM_001100922.1	F: 5'-TCAGTGAGCCCCACGCCCGTT-3' R: 5'-TCTCGGGCTTCAGGTCCCGG-3'	21 bp 20 bp	99 bp	27.51
<i>Prkach</i>	NM_001077645	F: 5'-GGGTCATGGGGAACACGGCG-3' R: 5'-CCAGCATTACTCGGGGGAGGGT-3'	20 bp 22 bp	124 bp	28.76
<i>Prkar1a</i>	NM_013181	F: 5'-TGTGCTGCAGCGTCGGTCAG-3' R: 5'-AGTGGCAGCCCCGAGGACGAT-3'	20 bp 20 bp	112 bp	25.94
<i>Prkar2a</i>	NM_019264	F: 5'-GCCCCACCTCGTGCCTTCG-3' R: 5'-TCCTGCGCGTGAAAGGTCGT-3'	20 bp 20 bp	108 bp	27.71
<i>Prkar2b</i>	NM_001030020	F: 5'-CCCATGCGCTCCGATTCCGA-3' R: 5'-GCACATACCGAGGCACGCCT-3'	20 bp 20 bp	107 bp	31.51
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	25 bp 20 bp	110 bp	21.85

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

**Tabela 4.13.8. Sekvence prajmera korišćene u analizi genske ekspresije komponenti MAPK signalnog puta**

Gen	Pristupni kod	Sekvence prajmera	Dužina prajmera	Dužina produkta	Ct sperm
<i>Mapk1</i>	NM_053842.1	F: 5'-GTTCTGCACCGTGACCTCAAG-3' R: 5'-GCAAGGCCAAAGTCACAGATC-3'	21 bp 21 bp	80 bp	27.98
<i>Mapk3</i>	NM_017347.2	F: 5'-TCCCTCTCAAGCTGCCACAT-3' R: 5'-ACATCCAATCACCCACACACA-3'	20 bp 21 bp	60 bp	27.56
<i>Mapk6</i>	NM_031622.2	F: 5'-CATTTGAACTGGCATGTCGTTT-3' R: 5'-CCTGCACTGCATTGTTTTGC-3'	22 bp 20 bp	62 bp	27.80
<i>Mapk7</i>	NM_001191547.1	F: 5'-GCCCTTCCACTAGCCTTTT-3' R: 5'-GAACCAGGCAACCCACTAGGT-3'	20 bp 21 bp	62 bp	28.83
<i>Mapk8</i>	NM_053829.2	F: 5'-TCAACGTCTGGTATGATCCTTCA-3' R: 5'-CTGCTTGT CAGGGATCTTTGG-3'	23 bp 21 bp	62 bp	29.11
<i>Mapk9</i>	NM_017322.1 NM_001270544.1 NM_001270545.1	F: 5'-GGAAGGCTGCCGATGAAA-3' R: 5'-AGCCAGAGTCCTTCACAGACAAG-3'	18 bp 23 bp	57 bp	28.65
<i>Mapk11</i>	NM_001109532.2	F: 5'-GGGCGCTGACCTGAATAACA-3' R: 5'-GCAGCAGCTGGTAGACAAGGA-3'	20 bp 21 bp	80 bp	30.43
<i>Mapk12</i>	NM_021746.1	F: 5'-GGATGTGTTCACTCCCGATGA-3' R: 5'-CCAGGTCAGTGCCCATGAAT-3'	21 bp 20 bp	80 bp	28.89
<i>Mapk13</i>	NM_019231.2	F: 5'-CTGGTCTGTTGGCTGCATCA-3' R: 5'-TCAGCTGGTCCAGGTAGTCCTT-3'	20 bp 22 bp	80 bp	28.28
<i>Mapk14</i>	NM_031020.2	F: 5'-GCTGTCGACCTGCTGGAAAA-3' R: 5'-TAGGCATGCGCAAGAGCTT-3'	20 bp 19 bp	80 bp	27.19
<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	25 bp 20 bp	110 bp	21.93

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

#### **4.14. Kvantifikacija ekspresije proteina u uzorcima primarne kulture tkiva hipotalamusa, adenohipofize, nadbubrega, kao i u primarnoj ćelijskoj kulturi spermatozoida.**

Relativna kvantifikacija ekspresije proteina praćena je u uzorcima primarne kulture tkiva hipotalamusa, adenohipofize, nadbubrega, kao i u primarnoj ćelijskoj kulturi spermatozoida. Razdvajanje proteina vršeno je denaturišućom SDS-PAGE, nakon koje je praćena ekspresija proteina od interesa Western blot metodom, uz upotrebu specifićnih primarnih antitela.

##### **4.14.1. Izolacija i kvantifikacija koncentracije proteina**

Izolacija proteina raćena je iz tkiva hipotalamusa, adenohipofize, kao i iz primarne kulture spermatozoida. Proteini su iz navedenih tkiva i ćelija reproduktivne osovine izolovani na prethodno opisan naćin (Gak i sar., 2015; Starovlah i sar., 2017) korišćenjem pufera za liziranje sledećeg sastava: 20 mM HEPES, 10 mM EDTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM β-glicerofosfat, 1 mM ditiotritol (DTT), 1 % Niaproof 4, 0.5 mM AEBSF, 1 μM aprotinin, 2 μM leupeptin i koktel inhibitora fosfataza. Nakon liziranja tkiva i ćelija u navedenom puferu, lizati su centrifugirani 5 minuta/1000xg/4 °C. Supernatant sa oslobodjenim proteinima korišćen je najpre za odrećivanje koncentracije proteina u uzorcima. Odrećivanje koncentracije proteina vršeno je Bradfordovom metodom (Bradford, 1976). Metoda podrazumeva korišćenje kalibracione krive koja je dobijena rastvorom standarda govećeg albumina koncentracije 10 g/dl (Sigma Diagnostics, ST. Louis, USA), i opsega od 0 μg/ml do 60 μg/ml. Merenje koncentracije proteina vršeno je dodavanjem Bradford-ovog reagensa (50 mg Commassie Brilliant Blue G-250, 25 ml 95% etanol, 50 ml 85% fosforne kiseline i 425 ml destilovane vode) u velove standardnog rastvora proteina i proteinske lizate korišćenih uzoraka. ApSORbanca je merena na talasnoj dućini od 595 nm pomoću fotometra Multiskan EX Plate Reader (Thermo-Labsystems). Koncentracije proteina u uzorcima su ujednaćene, a nakon toga su uzorci pripremljeni za SDS-PAGE elektroforezu. Uzorci ujednaćenih koncentracija proteina pomešani su sa 5x ili 2x koncentrovanom bojom za lodiranje sa redukujućim agensima (62.5 mM Tris-base, 12 % SDS, 40 % glycerol, 50 mM DTT, 30 % β-merkaptotanol, 25.4 mM EDTA, 0.1 % bromofenol plavo, pH=6.8), a zatim je smeša kuvana 5 minuta/100 °C, nakon ćega su uzorci centrifugirani 3 minuta/10000xg.

##### **4.14.2. Razdvajanje ukupnih proteina SDS-PAGE elektroforezom i transfer razdvojenih proteina sa gela na membranu**

Pripremljeni uzorci ujednaćenih koncentracija proteina razdvojeni su na osnovu njihove molekulske mase jednodimenzionalnom denaturišućom SDS-PAGE elektroforezom. Kao matriks za razdvajanje proteina korišćen je 12% gel sledećeg sastava: 30% akrilamid/N'N'-bis-metilen-akrilamid, 10% SDS, 1.5 M Tris-HCl (pH=8.8), 10% amonijumpersulfat i TEMED. U svaki vel gela dodato je oko 1.5 μg/μl proteina. Pored uzoraka, u velove gela dodat je i proteinski marker PageRuler Prestained Protein Ladder, radi praćenja specifićne pozicije proteina na gelu i membrani. Razdvajanje je trajalo 2 sata pri naponu od 100 V u 1x koncentrovanom puferu za elektroforezu (25 mM Tris, 0.192 M glicin i 0.1 % SDS). Prenos proteina sa gela na poliviniliden difluorid (PVDF) membranu (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) raćen je postupkom mokrog elektrotransfera pri naponu od 40 V, tokom noći na 4 °C, u puferu za transfer (25 mM Tris i 0.19 M glicin). Aparatura korišćena za elektroforezu i transfer je proizvoćaća Bio-Rad (Herkjuliz, Kalifornija, SAD). Kvalitet transfera, odnosno zadrćavanje proteina na gelu proveravano je bojenjem gela u rastvoru 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R250 boje u metanolu, dH<sub>2</sub>O i glacijalnoj sirćetnoj kiselinu. Obezbojavanje gelova vršeno je u rastvoru metanola, glacijalne sirćetne kiseline i dH<sub>2</sub>O u razmeri 1:1:1, pri ćemu se boja na gelu zadrćava samo na mestima na kojima su prisutni proteini.

#### 4.14.3. Western blot analiza

Analiza relativne ekspresije proteina Western blot metodom urađena je prema prethodno opisanom postupku (za reference videti (Gak i sar., 2015; Starovlah i sar., 2017). Po završenom transferu proteina sa gela na membranu, membrane su blokirane 2 sata na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje koji je sadržao 3% rastvor BSA u 1xTBS puferu sa dodatkom 0.1% Tween (1 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.1 % Tween). Inkubacija membrana sa primarnim antitelom vršena je na 4 °C preko noći na orbitalnom šejkeru, dok je inkubacija sa sekundarnim antitelom trajala 1 sat na sobnoj temperaturi. Primarna i sekundarna antitela razblaživana su u puferu za blokiranje. Karakteristike antitela kao i korišćena razblaženja prikazana su u Tabeli 4.17.1.

**Tabela 4.14.1. Karakteristike antitela korišćenih u Western blot analizi.**

Target	Sekvenca antigena	Naziv antitela	Proizvođač i kataloški broj	Tip Ig	Razblaženje
<b>PGC1</b>	Epitop u blizini C-kraja PGC-1 humanog porekla	PGC-1 (K-15) Peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1	Santa Cruz Biotech. Inc sc-5816 MW (PGC1) = 91 kDa	Kozije poliklonalno IgG	1 : 500
<b>NRF1</b>	Sintetički polipeptid koji odgovara amino-kiselinskoj sekvenci 204-503 na C-kraju humanog NRF1	NRF-1 (H-300) Nuklearni respiratorni faktor 1	Santa Cruz Biotechnology sc-33771 MW (NRF1) = 68 kDa	Zečije poliklonalno IgG	1:500 - 1:1000
<b>NRF2</b>	Peptide mapping at the C-terminus of Nrf2 of human origin	NRF2 (C-20) Nuclear respiratory factor 2	Santa Cruz Biotech. Inc sc-722 MW (NRF2) = 57/100 kDa	Rabbit polyclonal	1:100
<b>pP38MAPK</b>	Sintetički polipeptid koji odgovara amino-kiselinskoj sekvenci koja okružuje Thr180/Tyr182 humanog p38	Phospho-P38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody	Cell Signaling Technology #9211S MW (pP38MAPK) = 43 kDa	Zečije poliklonalno IgG	1 : 1000
<b>mtTFA</b>	Amino-kiseline 44-246 humanog mtTFA	mtTFA (H-203) Mitohondrijalni transkripcioni faktor 1	Santa Cruz Biotechnology sc-28200 MW (mtTFA) = 25 kDa	Zečiji poliklonalni IgG	1:100 - 1:250
<b>TFB1M</b>	Sintetički polipeptid unutrašnjeg regiona humanog TFB1M	TFB1M (D-13) Mitohondrijalni transkripcioni faktor B1	Santa Cruz Biotechnology sc-169583 MW (TFB1M) = 40 kDa	Kozije poliklonalno IgG	1:200
<b>COX4</b>	Sintetički polipeptid u blizini C-terminusa mišijeg COX4	COX4 (K20) Citohrom c oksidaza kompleks IV	Santa Cruz Biotechnology sc-69361 MW (COX4) = 17 kDa	Kozije poliklonalno IgG	1:200-1:500
<b>ACTIN</b>	Sintetički polipeptid na C-terminusu humanog ACTIN	ACTIN (I-19)	Santa Cruz Biotechnology sc-1616 MW (ACTIN) = 43 kDa	Koziji poliklonalni IgG	1:500 - 1:1000
<b>GAPDH</b>	Amino kiseline 1-335 koje predstavljaju potpunu dužinu GAPDH humanog porekla	Anti GAPDH (FL-335) antibody	Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-25778 Mw (GAPDH) = 37 kDa	Zečije poliklonalno	1:150



#### 4.15. Statistička analiza

Statistička analiza podataka urađena je korišćenjem programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Za *in vivo* eksperimente rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ispitivanih eksperimentalnih grupa  $\pm$  SEM individualnih varijacija (3 do 6 životinja/grupi/eksperimentu). Za *ex vivo* merenja rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM iz tri do osam nezavisnih replikata. Rezultati svakog eksperimenta analizirani *two-tailed* Mann-Whitney neparametarskim testom (za eksperimente sa dva ispitivana eksperimentalna podatka), dok je za poređenja među eksperimentalnim grupama korišćena je one-way ANOVA, praćena Post-hoc analizom korišćenjem Student-Newman-Keuls testa. Za sve statističke analize kao kriterijum statističke značajnosti razlika uzeta je granica verovatnoće  $p < 0.05$ .

# **5. Rezultati**

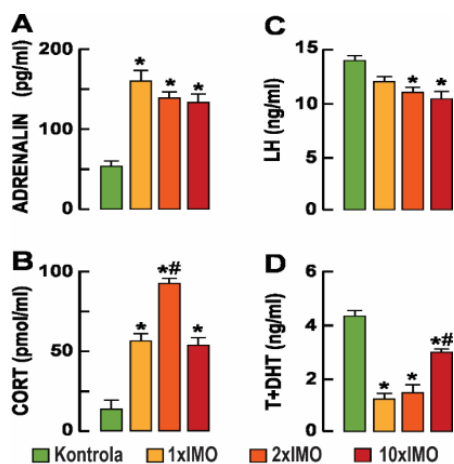
Obzirom na značajnu ulogu mitohondrija u održanju homeostaze ćelija reproduktivne osovine ali i čitavog organizma, istraživanja su usmerena na karakterizaciju molekularnih profila markera mitohondrijalne biogeneze i regulatornih signalnih molekula kao mehanizama adaptacije specifičnih ćelijskih tipova reproduktivne osovine, sa posebnim fokusom na spermatozoide, korišćenjem različitih animalnih modela. Animalni modeli korišćeni u istraživanjima mimikriraju situacije u adultnoj humanoju populaciji kao što su stres, starenje, korišćenje Metformina ili Vijagre, hipogonadotroni hipogonadizam, ćelijska insulinska rezistencija koja vodi hipogonadizmu, a odnose se na poremećenu funkciju cirkulišućih androgena. Ovo je voma značajno jer je dobro poznata uloga testosterona u spermatogenezi i održavanju muške fertlnosti, a nisu evidentirani podaci o dinamici mitohondrija steroidogenih ćelija niti spermatozoida. Stoga rezultati ove doktorske disertacije imaju za cilj karakterizaciju molekularnih profila markera mitohondrijalne biogeneze i regulatornih signalnih molekula kao mehanizama adaptacije specifičnih ćelijskih tipova reproduktivne osovine, sa posebnim fokusom na spermatozoide, a u uslovima poremećene homeostaze cirkulišućih androgena (Starovlah i sar., 2017. *BiolSerb*; Starovlah i sar., 2020. *SciRep*; Starovlah i sar., 2021. *IJMS*; Starovlah i sar., 2022. *Cells*).

### **5.1. Karakterizacija molekularnih profila mitohondrijalne biogeneze koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije specifičnih tipova ćelija reproduktivne osovine stresiranih mužjaka pacova**

U cilju karakterizacije molekularnih profila mitohondrijalne biogeneze kao i njenih regulatornih molekula kao mehanizama adaptacije specifičnih ćelijskih tipova reproduktivne osovine dizajnirani su *in vivo* eksperimentalni modeli koji oponašaju situacije u humanoju populaciji, gde su ljudi izloženi akutnom i ponavljanom psihološkom stresu. Psihološki stres je najčešći tip stresa u ljudskom društvu. U ovim eksperimentalnim modelima korišćen je imobilitacini stres (IMO) u trajanju od 2 ili 3 sata, jednom (1xIMO – stres u trajanju od 2 sata; ili 1x3hIMO – stres u trajanju od 3 sata), 2 uzastopna dana (2xIMO - stres u trajanju od 2 sata) ili 10 uzastopnih dana (10xIMO - stres u trajanju od 2 sata; 1x3hIMO – stres u trajanju od 3 sata). U svim eksperimentima korišćeni su adultni mužjaci pacova.

#### **5.1.1. Imobilizacioni stres u trajanju od dva sata remeti nivoe hormona stresa, testosterona i LH u cirkulaciji**

Da bi imitirali psihofizički stres, adultni mužjaci pacova izloženi su imobilizacionom stresu u trajanju od dva sata. Da bi se potvrdila uspešnost tretmana koji je korišćen u ovoj studiji, merena je koncentracija hormona stresa (kortikosterona i adrenalina), kao i LH i androgena (T+DHT) u serumu prikupljenom od neuznemiravanih (kontrolnih) i životinja pod stresom. U skladu sa prethodnim studijama (Stojkov i sar., 2013, 2012) IMO je bio efikasan kao stresor (Slika 5.1.1), podižući nivo adrenalina (Slika 5.1.1.A) i CORT (Slika 5.1.1.B) u serumu životinja svih stresnih grupa, u poređenju sa neuznemiravanim kontrolnim životinjama. Serumski LH je smanjen kod pacova izloženih ponavljanom stresu (Slika 5.1.1.C), dok su androgeni (T+DHT) smanjeni kod svih stresiranih pacova a delimični oporavak primećen je nakon 10xIMO (Slika 5.1.1.D).



**Slika 5.1.1. Imobilizacioni stres u trajanju od dva sata ometa nivo cirkulišućih hormona stresa (adrenalina i kortikosterona), LH i androgena.**

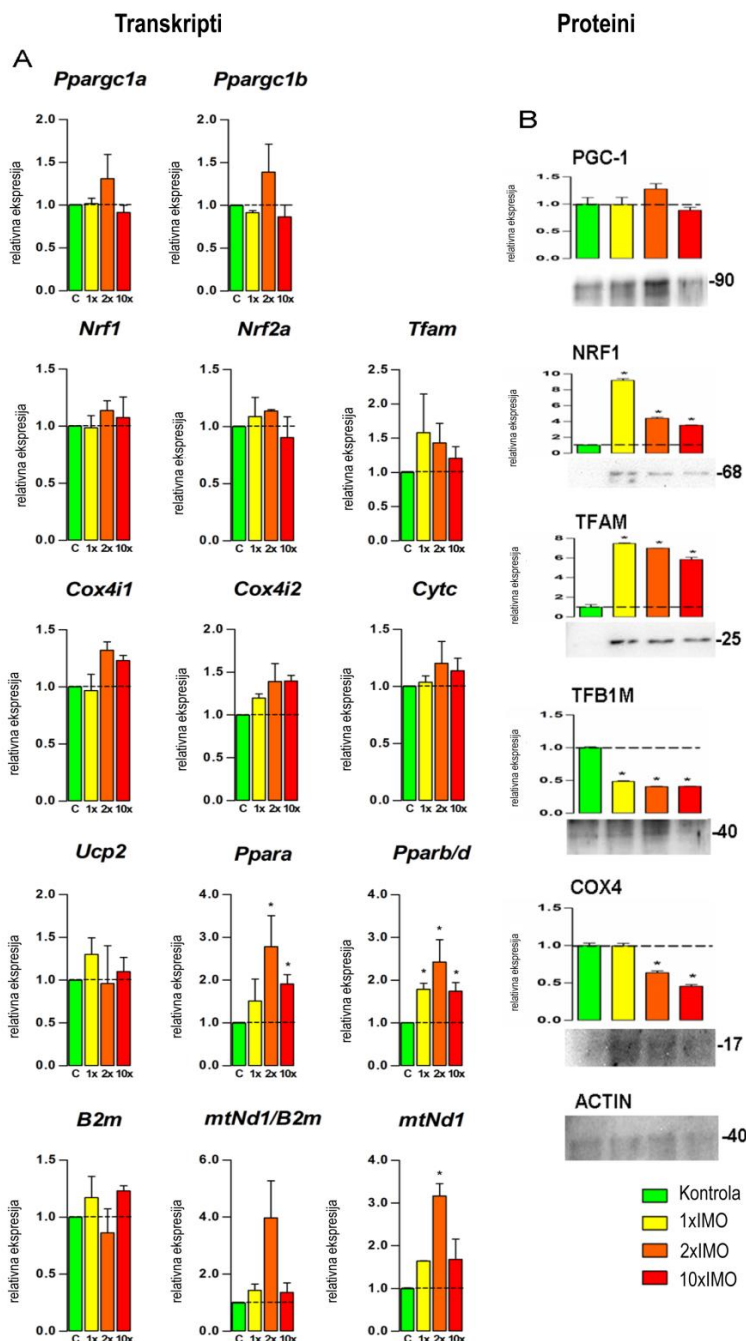
Povećanje nivoa adrenalina (A) i kortikosterona (B) izazvanog stresom bilo je praćeno smanjenjem nivoa LH (C) i androgena (T+DHT) (D). Na slici se može primetiti razlika u profilu nivoa LH i androgena nakon 1xIMO i 10xIMO.

Nivoi androgena (T+DHT) i LH određeni su RIA metodom, dok su nivoi adrenalina i kortikosterona određeni EIA metodom. Stubići predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SEM vrednosti, pet do sedam nezavisnih *in vivo* eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu; # u odnosu na 1xIMO grupu.

### 5.1.2. Psihofizički stres imobilizacijom u trajanju od dva sata remeti ekspresiju markera mitohondrijalne biogeneze u hipotalamusu, adenohipofizi i nadbubrežnoj žlezdi

Da bi se utvrdilo da li se profil ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze menja u hipotalamusu stresnih pacova, ispitivana je ekspresija transkripata i proteina za nekoliko glavnih markera biogeneze mitohondrija u hipotalamusu kontrolnih kao i stresiranih mužjaka pacova. Rezultati pokazuju (Slika 5.1.2) da je psihofizički stres imobilizacijom promenio profil ekspresije transkripata (Slika 5.1.2.A), kao i proteina (Slika 5.1.2.B) za glavne markere biogeneze i funkcionalnosti mitohondrija u hipotalamusu. Analizom ekspresije transkripata u hipotalamusu (Slika 5.1.2.A), rezultati pokazuju da je samo ponavljani imobilizacioni stres značajno povećao ekspresiju *Ppara*, dok je nivo *Ppard* povećan nezavisno od tipa stresa. Pored toga, zabeleženo je značajno povećanje transkripta *mtNdl* u hipotalamusima izolovanim iz životinja 2xIMO grupe. Iako su promene u profilu ekspresije transkripata za markere mitohondrijalne biogeneze evidentne, nema statistički značajnih promena na nivou transkripata za *Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Nrf1*, *Nrf2a*, *Tfam*, niti za transkripte gena koji kodiraju druge markere mitohondrijalne funkcionalnosti *Cox4i1*, *Cox4i2*, *Cytc* i *Ucp2*. Analiza ekspresije proteina u hipotalamusu (Slika 5.1.2.B) pokazala je da ne postoji značajna promena ekspresije PGC1 proteina u hipotalamusima stresiranih životinja u odnosu na kontrolne životinje. PGC1 je master regulator uključen u transkripcionu kontrolu svih procesa vezanih za mitohondrijalnu homeostazu kao i integrator signala iz spoljašnje sredine (Dominy i Puigserver, 2013). Međutim, svi tipovi imobilizacionog stresa značajno su povećali ekspresiju NRF1 (nuklearni transkripcioni faktor 1) u hipotalamusu. NRF1 predstavlja ciljni protein za PGC1 koji deluje na gene koji kodiraju subjedinice oksidativne fosforilacije (OXPHOS), i kodiran je jedarnim genomom (Dominy i Puigserver, 2013; Palikaras i Tavernarakis, 2014). Paralelno navedenim rezultatima, rezultati pokazuju povećanu ekspresiju TFAM (mitohondrijalnog transkripcionog faktora A), ciljnog proteina za NRF1, esencijalnog faktora za replikaciju mitohondrijalne DNK. U istim uzorcima životinja izlaganim imobilizacionom stresu, rezultati pokazuju smanjenje ekspresije TFB1M proteina, dok je nivo COX4 (mitohondrijalni kompleks IV citohrom C oksidaza) proteina smanjen samo u hipotalamusima izolovanim iz životinja izlaganih ponavljanom imobilizacionom stresu.

## Hipotalamus

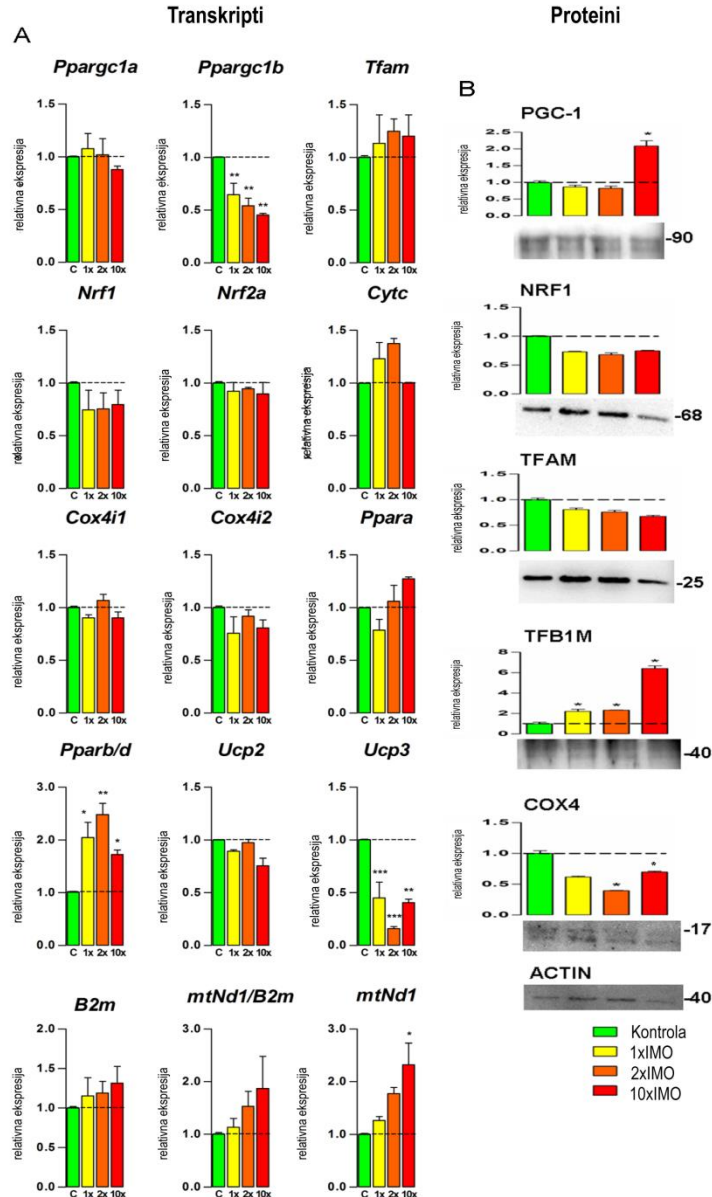


### Slika 5.1.2. Psihofizički stres imobilizacijom remeti profile ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze u hipotalamusu.

Praćena je ekspresija transkripata (A) i proteina (B) glavnih markera mitohondrijalne biogeneze u hipotalamusu kontrolnih kao i životinja podvrgnutim tretmanu akutnog i ponovljenog IMO. Relativna kvantifikacija ekspresije transkripata praćena je RQ-PCR metodom korišćenjem specifičnih prajmera. Relativna ekspresija proteina određena je western blot metodom. Prikazane su reprezentativne fotografije dobijenih specifičnih imuno-reaktivnih traka, dok su podaci dobijeni merenjem optičke gutine traka normalizovani na ACTB kao internu kontrolu i predstavljani su kao stubići iznad fotografija. Specifične imuno-reaktivne trake su, kao dvodimenzionalne slike, analizirane pomoću ImageJ programa (verzija 1.48). Normalizovane vrednosti prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti triplikata nezavisnih eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu.

Da bi se ispitalo efekat stresa na profil ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze u adenohipofizi praćeni su profili ekspresije transkripata i proteina kontrolnih i stresiranih životinja. Rezultati pokazuju (Slika 5.1.3) da psihofizički stres imobilizacijom remeti ekspresione profile transkripata (Slika 5.1.3.A) kao i proteina (Slika 5.1.3.B) glavnih markera biogeneze i funkcionalnosti mitohondrija u adenohipofizi. Svi tipovi imobilizacionog stresa, i akutni i ponavljani, smanjuju ekspresiju transkripta *Ppargc1b*. *Ppargc1b* kodira PGC1 $\beta$  protein, koji ima važnu ulogu u regulaciji jedarnih transkripcionih događaja uključujući konstitutivnu ne-adrenergički-posredovanu mitohondrijalnu biogenezu (Dominy i Puigserver, 2013; Palikaras i Tavernarakis, 2014; Scarpulla, 2008; Scarpulla i sar., 2012). Takođe, u istim uzorcima dolazi do značajnog smanjenja nivoa ekspresije *Ucp3*, koji kodira regulisani protonski kanal ili transporter, koji takođe reguliše i produkciju superoksidnog i drugih kiseoničnih radikala (Krauss i sar., 2005). Suprotno tome, značajno povećanje ekspresije transkripta *Ppard* detektovano je u adenohipofizama stresiranih životinja svih grupa (1xIMO, 2xIMO i 10xIMO) u odnosu na kontrolne životinje, dok je statistički značajno povećanje ekspresije *mtNdl* detektovano samo u adenohipofizama 10xIMO grupe životinja. Drugi markeri mitohondrijalne biogeneze kao i funkcionalnosti mitohondrija kao što su *Ppargc1a*, *Nrf1*, *Nrf2a*, *Tfam*, *Cox4i1*, *Cox4i2*, *Cytc*, *Ppara*, *Ucp2* ostali su nepromenjeni bez obzira na tip stresa (Slika 5.1.4.A). Analizom ekspresije proteina u adenohipofizama detektovano je povećanje ekspresije PGC1 proteina u grupi uzoraka 10xIMO životinja, dok su svi tipovi imobilizacionog stresa značajno smanjili nivo TFB1M proteina. U istim uzorcima adenohipofiza, nivoi NRF1 i TFAM proteina nisu bili promenjeni bez obzira na tip stresa. Kao i u uzorcima hipotalamusa, nivo COX4 proteina smanjen je u adenohipofizama izolovanim iz životinja podvrgnutim ponavljanom imobilizacionom stresu.

## Adenohipofiza

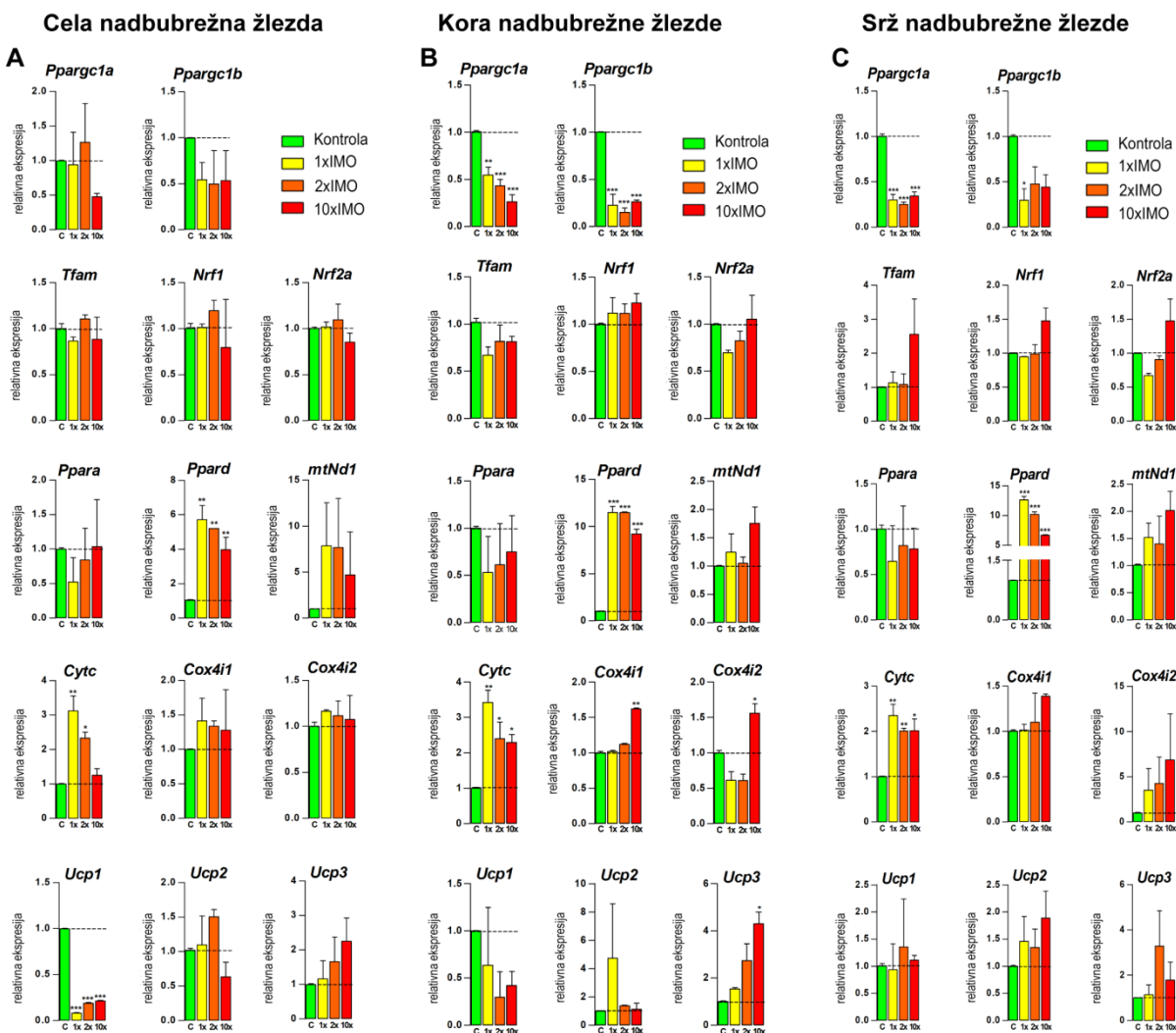


### Slika 5.1.3. Psihofizički stres imobilizacijom remeti profile ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze u adenohipofizi.

Praćena je ekspresija transkripata (A) i proteina (B) glavnih markera mitohondrijalne biogeneze u adenohipofizi kontrolnih kao i životinja podvrgnutim tretmanu akutnog i ponavljano IMO. Relativna kvantifikacija ekspresije transkripata praćena je RQ-PCR metodom korišćenjem specifičnih prajmera. Relativna ekspresija proteina urađena je Western blot metodom. Prikazane su reprezentativne fotografije dobijenih specifičnih imuno-reaktivnih traka, dok su podaci dobijeni merenjem optičke gutine traka normalizovani na ACTB kao internu kontrolu i predstavljeni su kao stubići iznad fotografija. Specifične imuno-reaktivne trake su, kao dvodimenzionalne slike, analizirane pomoću ImageJ programa (verzija 1.48). Normalizovane vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti triplikata nezavisnih eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu.

Efekat imobilizacionog stresa, kao tipa psihofizičkog stresa, na transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze i funkcionalnosti, osim u hipotalamusu i adenohipofizi, ispitivan je i u nadbubrežnoj žlezdi. Nakon eksperimentalnog perioda iz stresiranih i kontrolnih životinja izolovana je nadbubrežna žlezda, koja je dalje podeljena tako da je od svake životinje osim cele nabubrežne žlezde, uzet i po jedan komadić kore nadbubrežne žlezde kao i srži nadbubrežne žlezde. Sva tri tipa uzoraka korišćeni su za dalju analizu ekspresije transkripata RQ-PCR metodom. Rezultati pokazuju da psihofizički stres remeti nivo transkripata mitohondrijalne biogeneze i funkcionalnosti u celoj nadbubrežnoj žlezdi (Slika 5.1.4.A), kori (Slika 5.1.4.B) i srži nadbubrežne žlezde (Slika 5.1.4.C). Nivo ekspresije transkripta *Pparg1a*, glavnog transkripcionog koaktivatora mitohondrijalne biogeneze, smanjen je u uzorcima kore i srži nabubrega svih stresiranih grupa životinja (1xIMO, 2xIMO, 10xIMO) u odnosu na kontrolnu grupu. Dok je sa druge strane u tkivu cele nadbubrežne žlezde, nivo navedenog transkripta nepromenjen u svim eksperimentalnim grupama. Relativna ekspresija transkripta *Pparg1b* smanjena je u kori nadbubrežne žlezde stresiranih životinja svih eksperimentalnih grupa, dok je u tkivu medule nivo navedenog transkripta statistički značajno smanjen samo posle akutnog imobilizacionog stresa. Međutim, nivo *Pparg1b* transkripta nije statistički značajno promenjen u tkivu cele nadbubrežne žlezde svih eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu grupu. Bez obzira na tip tkiva u kom je analiziran nivo ekspresije (cela nadbubrežna žlezda, kora nadbubrežne žlezde i srž nadbubrežne žlezde), nivoi transkripata *Tfam*, *Nrf1*, *Nrf2a*, *Ppara* i *mtNdl* nisu statistički značajno promenjeni ni u jednoj eksperimentalnoj grupi. Sa druge strane, i akutni (1xIMO) i ponavljani (2xIMO i 10xIMO) stres povećavaju relativnu ekspresiju transkripta *Ppard* u celoj nadbubrežnoj žlezdi, kao i u kori i srži nadbubrežne žlezde pojedinačno. Relativna ekspresija transkripata *Cox4i1* i *Cox4i2* povećana je samo u kori nadbubrežne žlezde životinja izlaganih ponavljanom 10xIMO stresu. Dok je kod ostalih eksperimentalnih grupa, u srži nadbubrežne žlezde kao i celoj nadbubrežnoj žlezi, nivo ekspresije ovog transkripta nepromenjen. Analizom relativne ekspresije transkripta *Cytc* može se primetiti ujednačen efekat povećanja ekspresije nakon akutnog i ponavljanoog stresa u kori kao i u srži nadbubrežne žlezde, dok su samo akutni (1xIMO) i 2xIMO stres povećali nivo ekspresije ovog transkripta u celoj nadbubrežnoj žlezdi. Svi tipovi imobilizacionog stresa imali su efekat na smanjenje ekspresije transkripta *Ucp1* u celoj nadbubrežnoj žlezdi, dok je nivo ovog transkripta ostao nepromenjen u tkivima kore i srži nadbubrežne žlezde pojedinačno. Suprotno tome, deset puta ponovljeni dvočasovni stres povećao je nivo ekspresije *Ucp3* samo u tkivu kore nadbubrežne žlezde.





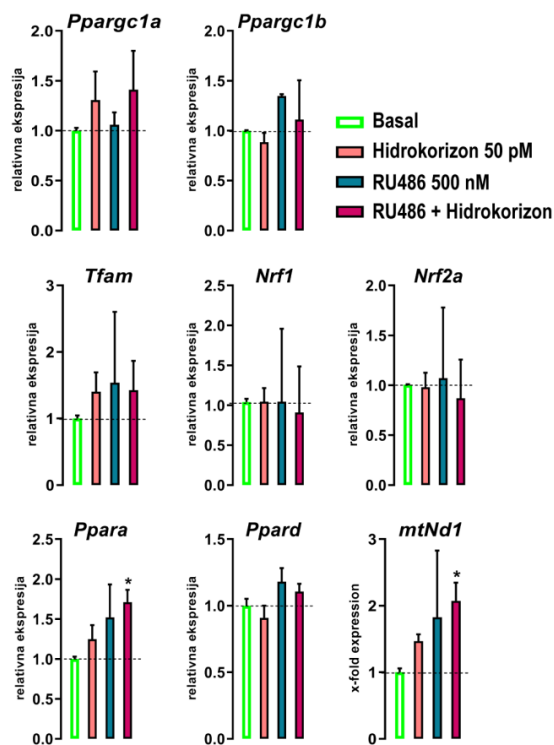
**Slika 5.1.4. Psihofizički stres remeti transkripcione profile ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze u nadbubrežnoj žlezdi.**

Praćena je ekspresija transkripata glavnih markera mitohondrijalne biogeneze u celoj nadbubrežnoj žlezdi (A), kori nadbubrežne žlezde (B) kao i srži nadbubrežne žlezde (C), kontrolnih kao i životinja podvrgnutih tretmanu akutnog (1xIMO) i ponavljano imobilizacionog stresa (2xIMO i 10xIMO). Relativna kvantifikacija ekspresije transkripata praćena je RQ-PCR metodom korišćenjem specifičnih prajmera. Stubići predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna eksperimenata. Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu.

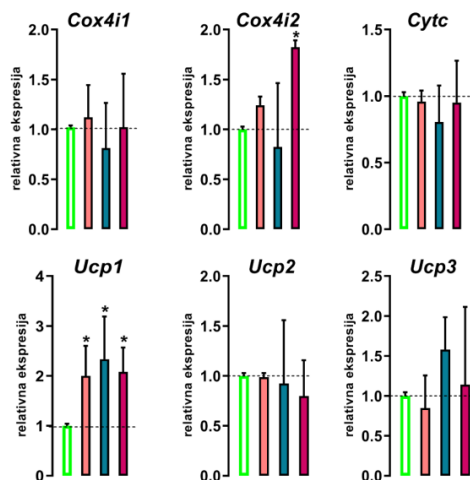
### **5.1.3. Efekat *ex vivo* primene hormona stresa hidrokortizona, samog ili u kombinaciji sa blokatorom glukokortikoidnih receptora na molekularne profile ekspresije transkripata za markere mitohondrijalne biogeneze kao i funkcionalnosti mitohondrija u Lajdigovim ćelijama**

Ispitivanje uticaja stresa na molekularne markere mitohondrijalne biogeneze i funkcionalnosti koje je započeto na *in vivo* modelu psihofizičkog stresa (Gak i sar., 2015) nastavljeno je upotrebom pojedinačnih hormona stresa samih ili u kombinaciji sa blokatorima receptora koje aktiviraju. U tom maniru, Lajdigove ćelije inkubirane su u prisustvu stres hormona hidrokortizona koncentracije 50 pM, samog ili u kombinaciji sa blokatorom glukokortikoidnog receptora RU486 koncentracije 500 nM. Rezultati pokazuju da stres hormon hidrokortizon ne menja nivo ekspresije većine ispitivanih markera mitohondrijalne biogeneze i funkcionalnosti (Slika 5.1.5). Nivo ekspresije transkripta *Ucp1* povećan je stimulacijom navedenim hormonom, i nivo povećane ekspresije zadržava se i nakon stimulacije ćelija blokatorom RU486 kao i kombinacijom hidrokortizona i RU486 (Slika 5.1.5). Sa druge strane, stimulacija Lajdigovih ćelija kombinacijom stres hormona hidrokortizona i blokatora glukokortikoidnog receptora (RU486) u trajanju od 24 sata, povećala je nivo ekspresije transkripata *Ppara*, *mtNdl* i *Cox4i2*. Nivoi ekspresije ostalih ispitivanih markera mitohondrijalne biogeneze i funkcionalnosti nisu statistički značajno promenjeni u Lajdigovim ćelijama ni jedne tretirane grupe u odnosu na Basal (*Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Tfam*, *Nrf1*, *Nrf2a*, *Ppard*, *Cox4i1*, *Cytc*, *Ucp2* i *Ucp3*).

**A** Glavni markeri mitohondrijalne biogeneze u Lajdigovim ćelijama



**B** Glavni markeri funkcionalnosti mitohondrija u Lajdigovim ćelijama



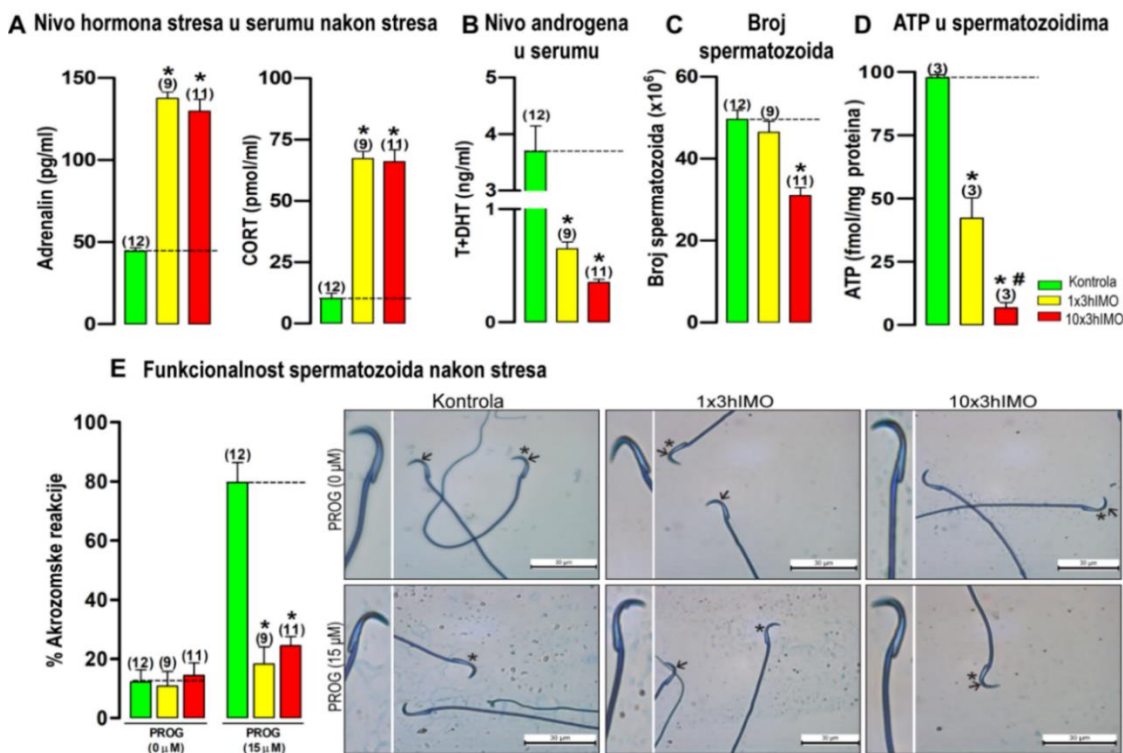
**Slika 5.1.5.** Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze i funkcionalnosti mitohondrija, promjenjeni su u adultnim Lajdigovim ćelijama *ex vivo* tretiranim hormonom stresa hidrokortizonom samim ili u kombinaciji sa blokatorom glukokortikoidnih receptora RU486.

RNK je izolovana iz adultnih Lajdigovih ćelija tretiranih tokom 24 sata hormonom stresa hidrokortizonom samim ili u kombinaciji sa blokatorom glukokortikoidnih receptora RU486, kao i netretiranih ćelija (Basal), i dalje korišćena za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze (A) i mitohondrijalne funkcionalnosti (B). Dobjijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na Basal.

**5.1.4. Ponavljani psihofizički stres u trajanju od 3 sata povećava nivo hormona stresa u cirkulaciji, ali smanjuje nivo androgena kao i funkcionalnost, nivo ATP i broj spermatozoida**

Efekat akutnog (1x3hIMO) kao i ponavljano (1x3hIMO) tročasovnog stresa je u saglasnosti sa prethodnim studijama (Gak i sar., 2015; Starovlah i sar., 2020, 2017) pokazujući da je IMO bio efikasan stresor (Slika 5.1.6.A) povećavajući serumski adrenalin kod akutno (3.1x) i ponavljano (2.9x) stresiranih životinja. Sličan efekat može se primetiti i na nivou kortikosterona, gde je akutni stres (1x3hIMO) povećao nivo ovog hormona 6.1x, dok je ponavljani stres (10x3hIMO) povećao nivo 6.4x

(Slika 5.1.6.A). Suprotno, cirkulišući androgeni (T+DHT) bili su smanjeni u serumu svih stresiranih životinja (1x3hIMO->5.5x, 10x3hIMO->10.5x) (Slika 5.1.6.B). Ponavljani stres (10x3hIMO) značajno je smanjio (1.9x) broj spermatozoida, dok su oba tipa stresa značajno smanjili funkcionalnost spermatozoida (1x3hIMO->4.4x, 10x3hIMO->3.3x) kao i produkciju ATP-a u spermatozoidima (1x3hIMO->2.3x, 10x3hIMO->14.5x).

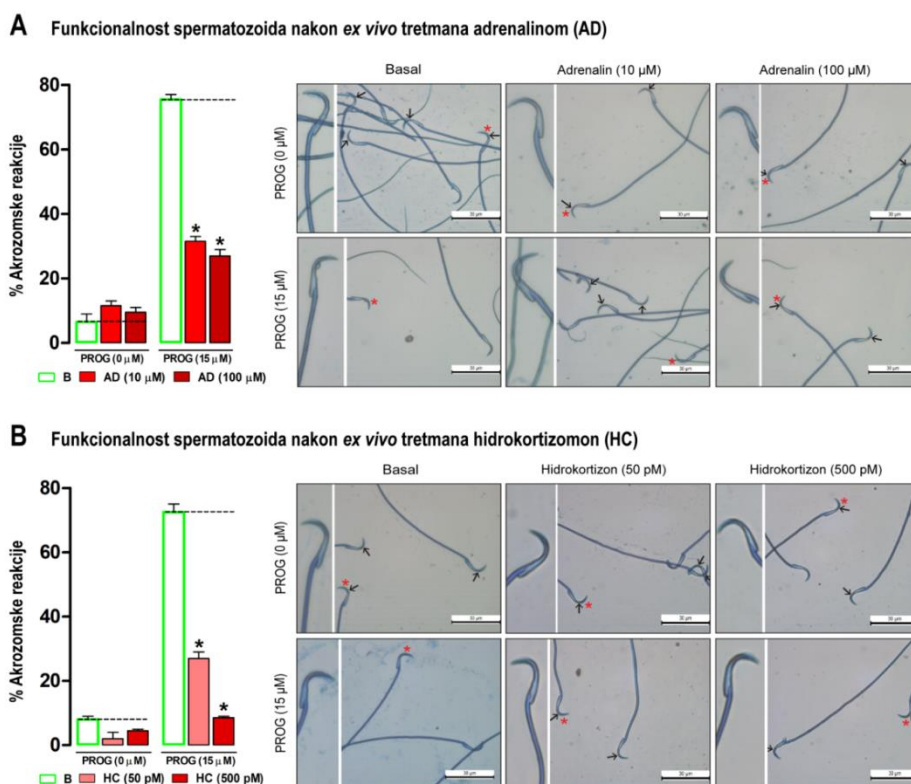


**Slika 5.1.6. Ponavljani psihofizički stres povećava nivo hormona stresa u cirkulaciji, ali smanjuje nivo androgena, kao i broj spermatozoida, njihovu funkcionalnost i nivo ATP-a.**

Cirkulišuće nivo hormona stresa (A) adrenalina i kortizona, kao i (B) androgena (testosterona + dihidrotestosterona, T + DHT) nakon tročasovnog psihofizičkog stresa imobilizacijom. (C) Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa nestresiranih životinja (kontrola) i životinja podvrgnutim tročasovnom imobilizacionom stresu jednom (1x3hIMO) ili deset uzastopnih dana (10x3hIMO). (D) Nivo ATP u spermatozoidima izolovanim iz kontrolnih životinja, akutno (1x3hIMO) ili ponovljeno (10x3hIMO) stresiranih životinja. (E) Funkcionalnost spermatozoida (% akrozomske reakcije) izolovanih iz kontrolnih, akutno i ponovljeno stresiranih životinja. Kapacitirani spermatozoidi stimulisani su progesteronom (PROG 15 μM) paralelno sa kapacitiranim spermatozoidima koji nisu stimulisani progesteronom (PROG 0 μM). Plavo bojenje u regionu akrozoma u glavenom delu spermatozoida ukazuje na intaktan akrozom, dok su spermatozoidi bez plavog bojenja u regionu akrozoma smatrani za akrozom-reaktivne spermatozoide tj. spermatozoide koji su prošli akrozomsku reakciju. Streljice pokazuju spermatozoide sa intaktnom akrozomskom kapom. Skala na fotografijama je 30 μm. Zvezdicama su obeleženi spermatozoidi uvećani na desnoj strani panela. Normalizovane vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje ± SEM vrednosti iz tri nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo P <0,05: \* u odnosu na kontrolnu grupu; # u odnosu na 1x3hIMO grupu.

### 5.1.5. Efekat *ex vivo* primene hormona stresa adrenalina i hidrokortizona na funkcionalnost spermatozoida

Tretman spermatozoida *ex vivo* hormonima stresa adrenalinom i hidrokortizonom oponaša efekat imobilizacionog stresa na funkcionalnost spermatozoida (Slika 5.1.7.). Rezultati pokazuju da hormon stresa adrenalin u obe korišćene koncentracije (10  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ ) smanjuje funkcionalnost spermatozoida (Slika 5.1.7.A). Tridesetominutni tretman spermatozoida adrenalinom koncentracije 10  $\mu\text{M}$  smanjuje % spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju nakon stimulacije progesteronom 2.4 puta u odnosu na netretirane spermatozoide (Basal), dok je smanjenje od 2.8 puta zabeleženo nakon stimulacije adrenalinom koncentracije 100  $\mu\text{M}$ . Tretman spermatozoida adultnih životinja stres hormonom hidrokortizonom u obe korišćene koncentracije (50 pM i 500 pM) dovodi do smanjenja funkcionalnosti spermatozoida (Slika 5.1.7.B). Tretman adultnih spermatozoida tokom trideset minuta hormonom stresa hidrokortizonom, koncentracije 50 pM, smanjio je funkcionalnost spermatozoida 2.7 puta, dok je isti hormon koncentracije 500 pM takođe smanjio funkcionalnost spermatozoida čak 8.5 puta, u odnosu na netretirane spermatozoide (Basal).



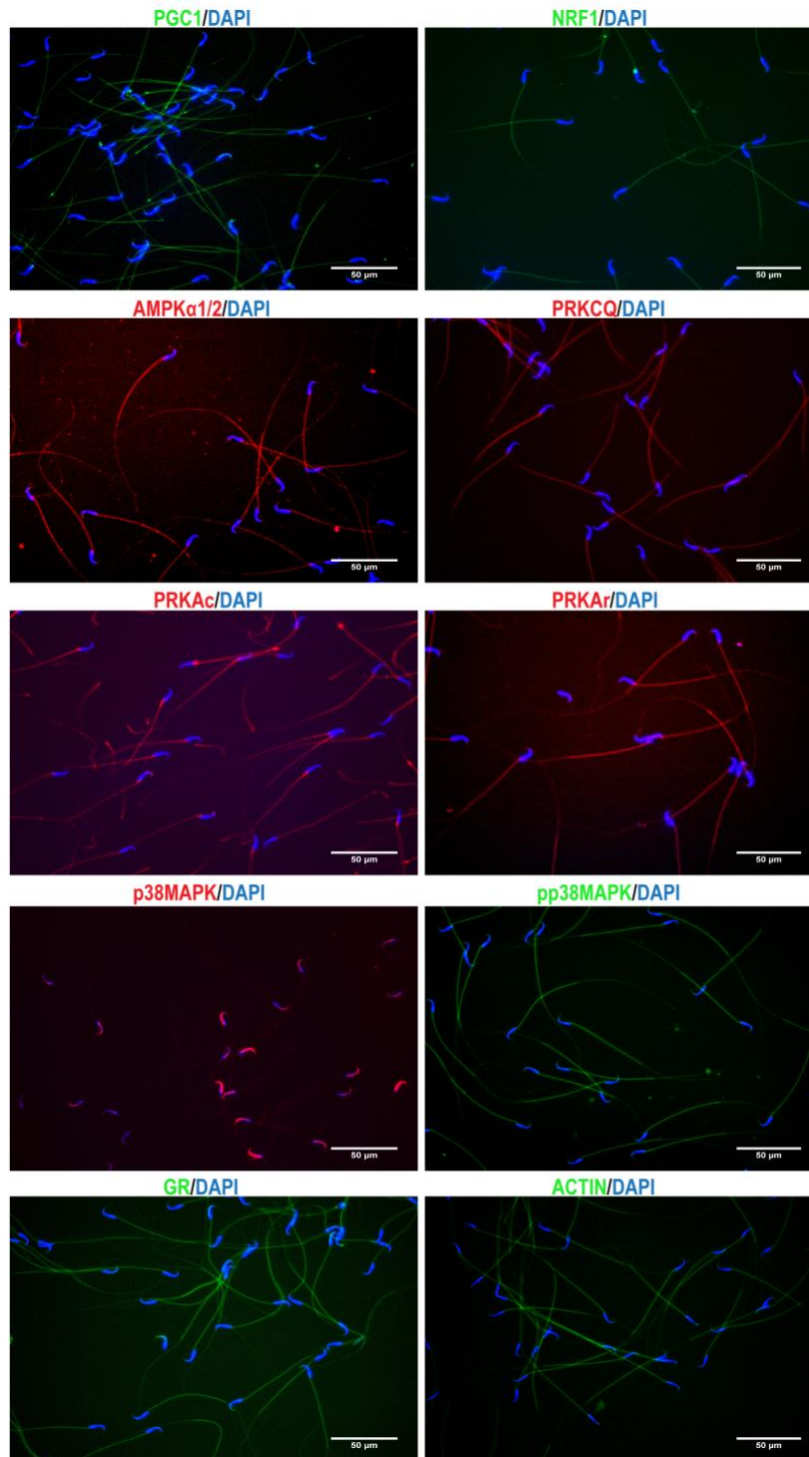
**Slika 5.1.7. *Ex vivo* tretman spermatozoida hormonima stresa adrenalinom i hidrokortizonom smanjuje funkcionalnost spermatozoida.**

Funkcionalnost spermatozoida (% akrozomske reakcije) tretiranih *ex vivo* hormonima stresa adrenalinom (A) i hidrokortizonom (B) u trajanju od 30 minuta. Kapacitirani spermatozoidi stimulisani su progesteronom (PROG 15  $\mu\text{M}$ ) paralelno sa kapacitiranim spermatozoidima koji nisu stimulisani progesteronom (PROG 0  $\mu\text{M}$ ). Plavo bojenje u regionu akrozoma u glavenom delu spermatozoida ukazuje na intaktan akrozom, dok su spermatozoidi bez plavog bojenja u regionu akrozoma smatrani za akrozom-reaktivne spermatozoide tj. spermatozoide koji su prošli akrozomsku reakciju. Strelice pokazuju spermatozoide sa intaktnom akrozomskom kapom. Skala na fotografijama je 30  $\mu\text{m}$ . Zvezdicama su obeleženi spermatozoidi uvećani na desnoj strani panela. Normalizovane vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna *ex vivo* eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na Basal grupu.

### 5.1.6. Lokalizacija glavnih markera mitohondrijalne dinamike kao i signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku u spermatozoidima

Da bismo identifikovali prisustvo i odredili lokalizaciju glavnih markera mitohondrijalne dinamike kao i signalnih proteina koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku korišćena je metoda imunofluorescentnog bojenja. Fiksirani spermatozoidi adultnih neuznemiravanih mužjaka pacova podvrgnuti su proceduri permeabilizacije, blokiranja i inkubacije sa primarnim antitelom koje prepoznaje sledeće proteine: PGC1, NRF1, AMPK $\alpha$ 1/2, PRKCQ, PRKAc, PRKAr, p38MAPK, pp38MAPK, GR i ACTIN. Sekundarna imunofluorescentna antitela korišćena su za vizuelizaciju navedenih proteina u spermatozoidima. Rezultati pokazuju da je lokalizacija većine ispitivanih proteina u središnjem delu (*engl.* Midpiece) spermatozoida (Slika 5.1.8). Na odabranim fotografijama dobijenim na fluorescentnom mikroskopu može se primetiti da je lokalizacija glavnog regulatora mitohondrijalne biogeneze PGC1 (Domini i Puigserver 2013, Markaki i Tavernarakis 2020) u središnjem regionu spermatozoida. Takođe, lokalizacija proteina NRF1, AMPK $\alpha$ 1/2, ACTIN i PRKCQ je u središnjem regionu spermatozoida. Lokalizacija regulatorne i katalitičke subjedinice protein kinaze A takođe je u središnjem regionu, ali rezultati pokazuju da je katalitička subjedinica PRKA u velikoj meri zastupljena i u vratnom regionu spermatozoida. Analizom lokalizacije nefosforilisane i fosforilisane forme p38MAPK rezultati pokazuju da je nefosforilisana forma p38MAPK lokalizovana u glavenom regionu spermatozoida, dok je fosforilisana forma ove kinaze (pp38MAPK) detektovana u središnjem delu spermatozoida. Rezultati takođe pokazuju da je glukokortikoidni receptor (GR) najviše zastupljen u središnjem regionu spermatozoida, dok je u određenom broju spermatozoida prisutan i u glavenom regionu.





**Slika 5.1.8. Lokalizacija glavnih markera mitohondrijalne dinamike kao i signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost spermatozoida korišćenjem imunofluorescentnog bojenja adultnih spermatozoida.**

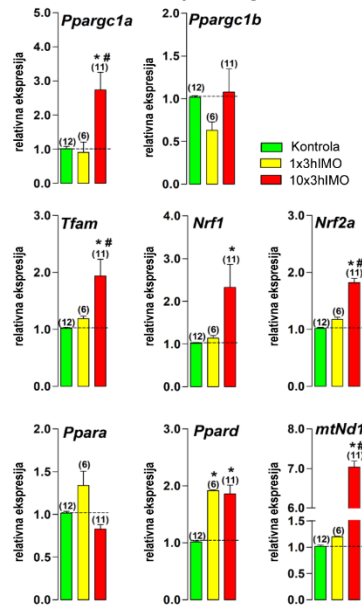
Identifikacija prisustva i lokalizacije glavnih markera mitohondrijalne dinamike i signalnih proteina koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku rađenja je korišćenjem imunofluorescentne metode. Fiksirani spermatozoidi su daljim procedurama permeabilizovani, blokirani i inkubirani sa primarnim antitelima koja prepoznaju PGC1, NRF1, AMPK $\alpha$ 1/2, PRKCQ, PRKAc, PRKAr, p38MAPK, pp38MAPK, GR i ACTIN. Sekunarna imunofluorescentna antitela koja su korišćena za vizuelizaciju su Alexa Fluor 555 i Alexa Fluor 488, bojenje jezra rađeno je rastvorom Fluoroshield Mounting medijuma sa dodatkom DAPI boje. Skala na fotografijama je 50  $\mu$ m.

### 5.1.7. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti značajno su promjenjeni u spermatozoidima stresiranih pacova.

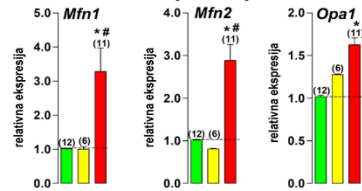
Markeri mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima pod velikim su uticajem hormona stresa obzirom da je transkripcioni nivo 18 od 22 (82%) ispitivana markera promjenjen (Slika 5.1.9). Nivo 6 od 8 (75%) ispitivanih transkripata, markera mitohondrijalne biogeneze, povećan je u spermatozoidima stresiranih pacova (Tabela 5.1.1). Akutni stres (1x3hIMO) značajno je povećao nivo *Ppard* (1.9x), dok je efekat ponavljanog stresa (10x3hIMO) mnogo upadljiviji obzirom da je transkripcija 75% ispitivanih markera povećana. Nivo *Pparg1a* koji kodira PGC1, master regulator uključen u transkripcionu kontrolu svih procesa vezanih za homeostazu mitohondrija i integrator spoljašnjih signala (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020), značajno je povećan (2.7x) u spermatozoidima životinja izloženih ponavljanom IMO. Ovo povećanje praćeno je i povećanjem transkripcije njegovih target molekula koji deluju na gene subjedinic oksidativne fosforilacije (OXPHOS): *Nrf1* (2.3x), *Nrf2a* (1.8x), *Tfam* (1.9x), *mtNd1* (7x) i *Ppard* (1.8x) (Slika 5.1.9.A). Nivoi transkripata za sve analizirane markere mitofuzije povećani su u spermatozoidima pacova podvrgnutim ponavljanom psihofizičkom stresu (Slika 5.1.9.B). Ponavljeni stres značajno je povećao transkripciju markera mitofuzije i arhitekture mitohondrija: *Mfn1* (3.3x), *Mfn2* (2.9x) i *Opal* (1.6x). Nivo transkripta za marker mitohondrijalne fisije, *Drp1* (3.2x), takođe je povećan u spermatozoidima nakon ponavljanog stresa, dok je nivo markera *Fis1* ostao nepromjenjen (Slika 5.1.9.C). Ponavljeni psihofizički stres povećao je i ekspresiju markera mitohondrijalne autofagije: *Pink1* (2.3x), *Prkn* (1.45x) i *Tfeb* (2.6x) (Slika 5.1.9.D). Ispitujući markere mitohondrijalne funkcionalnosti rezultati pokazuju da stres remeti nivo transkripcije 5 od 6 markera ispitivanih u ovoj studiji (Slika 5.1.9.E). U istim uzorcima pomentutim ranije, detektovane su promene transkripcionih profila markera mitohondrijalne funkcionalnosti kao i targetnih molekula proteina NRF1/NFR2 kao što su CytC, COX4 i UCP u spermatozoidima pacova nakon ponavljanog stresa imobilizacijom. Ponavljeni stres značajno je povećao transkripcioni profil *Ucp2* (3.2x), najbolje ekspresovanog UCP gena. Dok je sa druge strane, ponavljeni psihofizički stres smanjio nivo *Ucp3* (5.1x) transkripta u spermatozoidima i nije uticao na ekspresiju *Ucp1* transkripta u istim uzorcima.



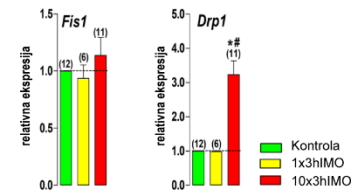
### A Markeri mitohondrijalne biogeneze



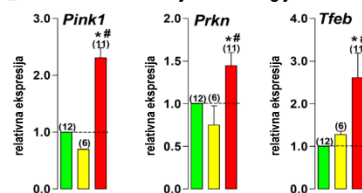
### B Markeri mitohondrijalne fuzije i arhitekture



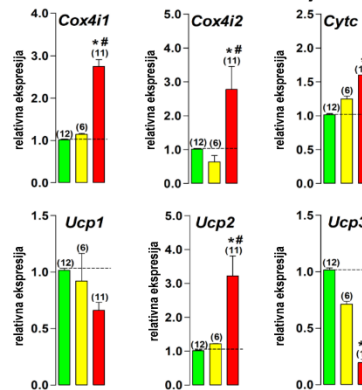
### C Markeri mitohondrijalne fisije



### D Markeri mitohondrijalne autofagije



### E Markeri funkcionalnosti mitohondrija



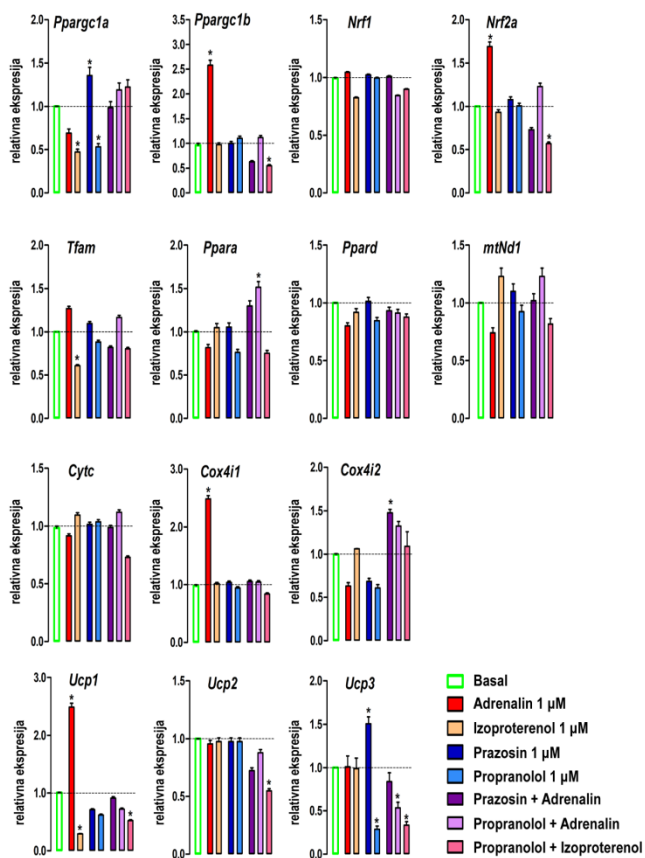
**Slika 5.1.9. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti značajno su promenjeni u spermatozoidima pacova izlaganih ponavljanom imobilizacionom stresu.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih i stresiranih životinja, i korišćena je za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze (A), mitohondrijalne fuzije i arhitekture (B), mitohondrijalne fisije (C), mitohondrijalne autofagije (D) i mitohondrijalne funkcionalnosti (E). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu; # u odnosu na 1x3hIMO grupu.

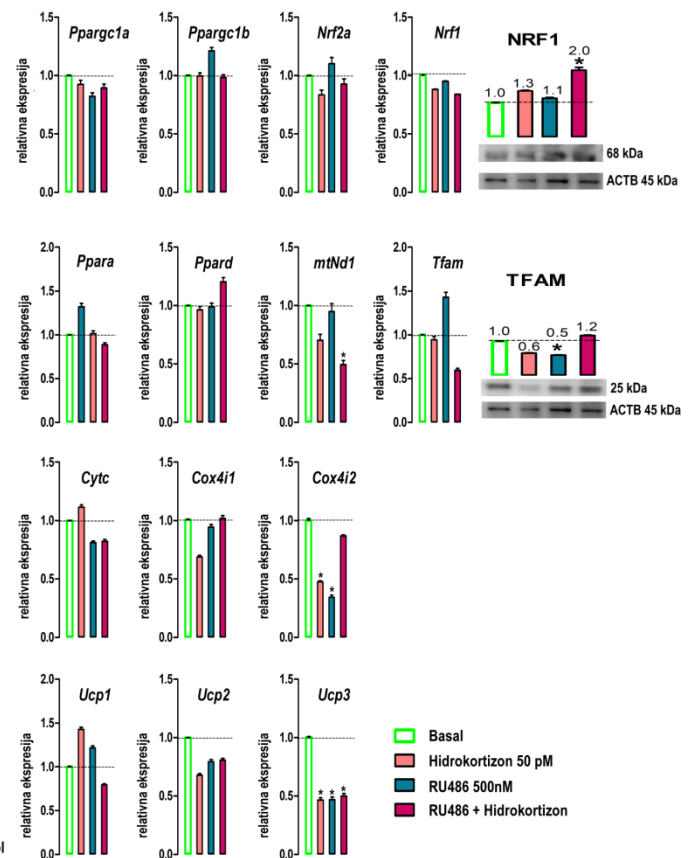
### 5.1.8. Efekat *ex vivo* primene hormona stresa adrenalina i hidrokortizona na ekspresiju markera mitohondrijalne dinamike u spermatozoidima

Stres hormoni adrenalin i hidrokortizon menjaju transkripcioni profil 11 od 14 markera miohondrijalne biogeneze u spermatozoidima (Slika 5.1.10). Transkripcija PGC1, master regulatora uključenog u transkripcionu kontrolu svih procesa vezanih za mitohondrijalnu homeostazu (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020), promenjena je u spermatozoidima *ex vivo* tretiranih stres hormonima. Nivo *Pparg1a* smanjen je (2.1x) u spermatozoidima inkubiranim sa izoproterenolom,  $\beta$ -ADR agonistom, a takođe i u spermatozoidima inkubiranim sa propranololom (1.9x),  $\beta$ -ADR antagonistom, i oba efekta poništena su kombinacijom (propranolol + izoproterenol), što ukazuje na ulogu  $\beta$  adrenergičkih receptora u regulaciji transkripcije ovog markera. Suprotno tome, transkripcija *Pparg1b* u spermatozoidima značajno je povećana (2.6x) nakon tretmana adrenalinom, a ovaj efekat potpuno je poništen i  $\alpha$ 1-ADR antagonistom i  $\beta$ -ADR antagonistom, sugerišući na ulogu oba tipa receptora u regulaciji transkripcije *Pparg1b*. Pored toga, nivo transkripcije *Pparg1b* smanjen je nakon tretmana kombinacijom  $\beta$ -ADR agonistom/antagonistom (propranolol + izoproterenol; 1.8x). U istim uzorcima spermatozoida, transkripcioni profili *Nrf1* i *Nrf2a* različito su regulisani. Nivo ekspresije transkripta *Nrf1* ostao je nepromenjen bez obzira na tip tretmana agonistima/antagonistima dok je nivo ekspresije proteina NRF1 povećan kombinacijom RU486 + hidrokortizon (2x). Sa druge strane, nivo transkripta *Nrf2a* povećan je (1.7x) nakon tretmana spermatozoida adrenalinom, dok je kombinacija propranolol + izoproterenol smanjila (1.8x) nivo ekspresije ovog transkripta. Efekat adrenalina na ekspresiju *Nrf2a* potpuno je poništen nakon tretmana sa oba tipa antagonista, i  $\alpha$ 1-ADR antagonistom i  $\beta$ -ADR antagonistom. Nivo ekspresije *Tfam* smanjen je (1.6x) agonistom  $\beta$ -ADR, izoproterenolom, i ovaj efekat je poništen dodavanjem  $\beta$ -ADR agoniste-propranolola, ukazujući na mogući uticaj  $\beta$ -ADR na ekspresiju *Tfam* u spermatozoidima. Nivo ekspresije transkripta *Tfam* nije promenjen tretmanom agonistom/antagonistom glukokortikoidnog receptora, dok je nivo ekspresije proteina TFAM smanjen (2x) u spermatozoidima tretiranim antagonistom glukokortikoidnog receptora, RU486. Ekspresija transkripta *Ppara* u spermatozoidima značajno je povećana (1.5x) kombinovanim tretmanom propranolola i adrenalina, dok je transkripcioni profil *Ppard* u spermatozoidima ostao nepromenjen bez obzira na tip primenjenog tretmana. Ekspresija svih gorepomenutih markera ostala je nepromenjena nakon tretmana i glukokortikoidnog-receptora (GR) agonistom (hidrokortizonom) i GR-antagonistom (RU486). Međutim, nivo ekspresije *mtNd1* značajno je smanjen (2x) u spermatozoidima tretiranih kombinacijom RU486+hidrokortizon. Dalje, transkripcioni profil *Cytc* u spermatozoidima ostao je nepromenjen bez obzira na tip tretmana ADR agonistom i/ili antagonistom. Nivo ekspresije *Cox4i1* transkripta u spermatozoidima povećan je (2.5x) nakon stimulacije adrenalinom i ovaj efekat potpuno je poništen i  $\alpha$ 1-ADR antagonistom i  $\beta$ -ADR antagonistom. Ekspresija *Cox4i2* transkripta u spermatozoidima povećana je (1.5x) nakon inkubacije kombinacijom prazosin+adrenalin, ali je smanjena u spermatozoidima inkubiranim sa hidrokortizonom (2.1x) i RU486 (2.9x). Takođe, stres-signalizacija značajno je promenila transkripcione profile gena (*Ucp1*, *Ucp2* i *Ucp3*) za proteine medijatore regulisanog protoka protona i regulatore produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (Kraus i sar., 2005). Nivo ekspresije *Ucp1* transkripta značajno je povećan (2.5x) u spermatozoidima inkubiranim u prisustvu adrenalina i ovaj efekat poništen je dodavanjem  $\alpha$ 1-ADR antagoniste i  $\beta$ -ADR antagonistom. Suprotno tome, inkubacija spermatozoida u prisustvu  $\beta$ -ADR agoniste (izoproterenola) ili kombinacije (propranolol + izoproterenol) smanjila je nivo ekspresije ovog transkripta (3.4x i 1.9x, redom). Ista kombinacija takođe je smanjila (1.8x) nivo ekspresije *Ucp2*. Ekspresija transkripta *Ucp3* značajno je smanjena u spermatozoidima inkubiranim u prisustvu: propranolola (3.5x); propranolola + adrenalina (1.9x); propranolola + izoproterenola (3x) kao i hidrokortizona (2.2x); RU486 (2.1x) i kombinacije RU486 + hidrokortizon (2x).

### A Glavni markeri mitohondrijalne biogeneze u spermatozoidima stimulisanim agonistom i antagonistom $\alpha$ 1- i $\beta$ -ADR



### B Glavni markeri mitohondrijalne biogeneze u spermatozoidima stimulisanim agonistom i antagonistom glukokortikoidnih receptora

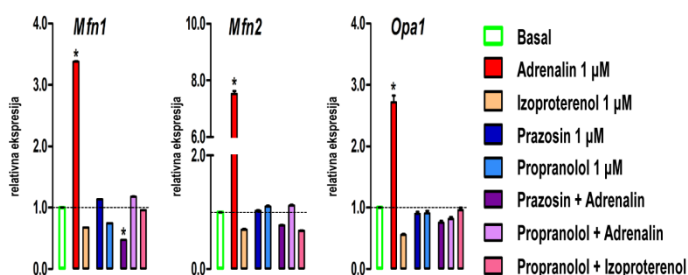


## Slika 5.1.10. Hormoni stresa menjaju transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze u spermatozoidima.

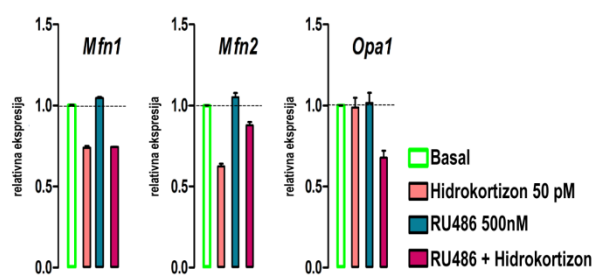
Spermatozoidi izolovani iz neuznemiranih adultnih životinja tretirani su *ex vivo*, tokom 6 sati, ili adrenergičkih receptora (ADR) agonistima (adrenalin i izoproterenol) i/ili antagonistima ( $\alpha$ 1-ADR antagonista prazosin;  $\beta$ -ADR antagonista propranolol) ili glukokortikoidnog receptora (GR) agonistom (hidrokortizon) i/ili antagonistom (RU486). Relativna ekspresija transkripata glavnih markera mitohondrijalne biogeneze praćena je RQ-PCR metodom (A,B). Relativna ekspresija proteina markera markera mitohondrijalne biogeneze praćena je Western blot metodom i prikazane su reprezentativne fotografije dobijenih specifičnih imuno-reaktivnih traka, dok su podaci dobijeni merenjem optičke gutine traka normalizovani na ACTB kao internu kontrolu i predstavljeni su kao stubići iznad fotografija (B). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na Basal grupu.

Uzimajući u obzir važnost mitohondrijalne arhitekture i fuzije za homeostazu mitohondrijalne funkcije i održanje mitohondrijalne mreže (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015) praćeni su glavni markeri (*Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*) mitohondrijalne fuzije i arhitekture u spermatozoidima. Rezultati pokazuju da je transkripcioni profil svih ispitivanih markera (Figura 5.1.11.A i 5.1.11.B) značajno povećan nakon tretmana spermatozoida hormonom adrenalinom (*Mfn1*-3.4x, *Mfn2*-7.5x, *Opa1*-2.7x). Ovi efekti adrenalina potpuno su poništeni sa oba tipa korišćenih antagonista, i  $\alpha$ 1-ADR antagonistom i  $\beta$ -ADR antagonistom, što ukazuje na uključenost oba tipa adrenergičkih receptora. Takođe, nivo ekspresija *Mfn1* transkripta statistički je značajno smanjena (2.1x) u spermatozoidima inkubiranim kombinacijom prazosin+adrenalin, sugerišući da  $\alpha$ 1-ADR može da promoviše više stimulatorni efekat. Nivo ekspresije svih navedenih markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture nisu statistički značajno promenjeni inkubacijom spermatozoida glukokortikoidnog-receptora (GR) agonistom (hidrokortizonom) samim ili u kombinaciji sa GR-antagonistom (RU486).

**A** Glavni markeri mitohondrijalne fuzije i arhitekture u spermatozoidima stimulisanim agonistom i antagonistom  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -ADR



**B** Glavni markeri mitohondrijalne fuzije i arhitekture u spermatozoidima stimulisanim agonistom i antagonistom glukokortikoidnih receptora

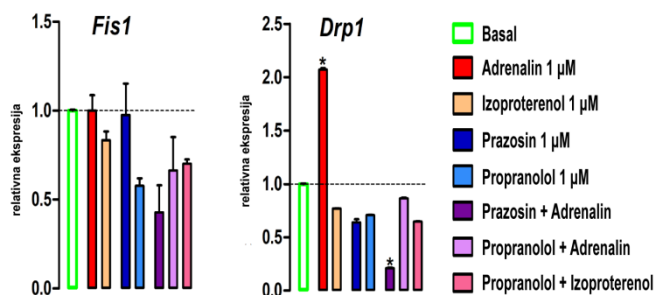


### Slika 5.1.11. Hormoni stresa menjaju transkripcione profile markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture u spermatozoidima.

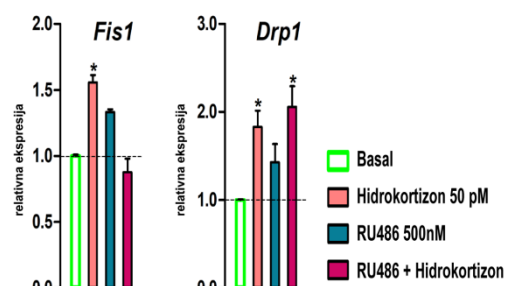
Spermatozoidi izolovani iz neuznemiravanih adultnih životinja tretirani su *ex vivo*, tokom 6 sati, ili adrenergičkih receptora (ADR) agonistima (adrenalin i izoproterenol) i/ili antagonistima ( $\alpha$ 1-ADR antagonista prazosin;  $\beta$ -ADR antagonista propranolol) (A) ili glukokortikoidnog receptora (GR) agonistom (hidrokortizon) i/ili antagonistom (RU486) (B). Relativna ekspresija transkriptata glavnih markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture praćena je RQ-PCR metodom. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na Basal grupu.

Obzirom da je proces mitohondrijalne fisije neophodan za homeostazu mitohondrijalne mreže kao i funkcije mitohondrija (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015) praćena je ekspresija glavnih markera mitohondrijalne fisije, *Fis1* i *Drp1* (Slika 5.1.12.A i 5.1.12.B). Rezultati pokazuju da je nivo ekspresije *Fis1* transkripta u spermatozoidima značajno povećan (1.6x) nakon tretmana hidrokortizonom. Ovo povećanje potpuno je poništeno u prisustvu specifičnog antagonistice GR, RU486. Transkripcioni profil *Drp1* značajno je povećan nakon tretmana spermatozoida sa oba stres mimetika. Adrenalin je značajno povećao (2.1x) ekspresiju *Drp1* transkripta, dok je ovaj efekat potpuno poništen u prisustvu oba tipa korišćenih antagonista, i  $\alpha$ 1-ADR antagoniste i  $\beta$ -ADR antagoniste, ukazujući na učešće oba tipa ADR receptora. Kombinacija adrenalina sa  $\alpha$ 1-ADR antagonistom prazosinom, nije samo poništila efekat adrenalina, već je dovela i do značajnog smanjenja (4.7x) ekspresije ovog markera u poređenju sa netretiranim uzorcima (Basal), ukazujući na značajan efekat  $\alpha$ 1-adrenergičkih receptora. Agonista glukokortikoidnog receptora, hidrokortizon, značajno je povećao (1.8x) ekspresiju transkripta *Drp1*, i ovo povećanje (2.1x) održano je i u prisustvu kombinacije agoniste sa antagonistom GR, RU486.

**A** Glavni markeri mitohondrijalne fisije u spermatozoidima stimulisanim agonistom i antagonistom  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -ADR



**B** Glavni markeri mitohondrijalne fisije u spermatozoidima stimulisanim agonistom i antagonistom glukokortikoidnih receptora

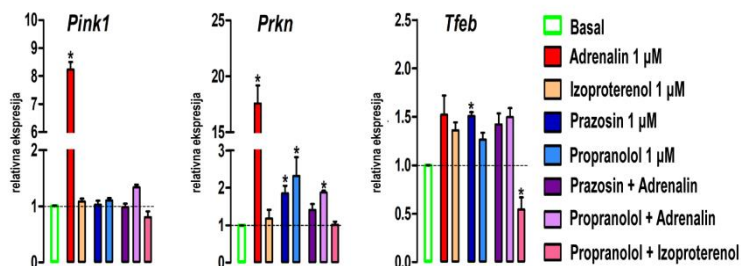


### Slika 5.1.12. Hormoni stresa menjaju transkripcione profile markera mitohondrijalne fisije u spermatozoidima.

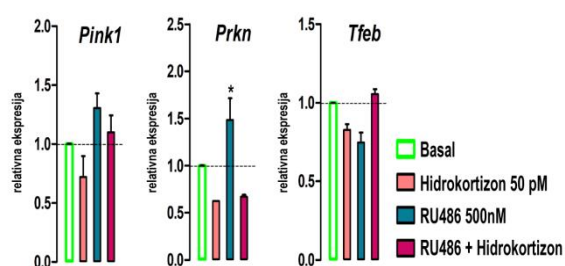
Spermatozoidi izolovani iz neuznemiranih adultnih životinja tretirani su *ex vivo*, tokom 6 sati, ili adrenergičkih receptora (ADR) agonistima (adrenalin i izoproterenol) i/ili antagonistima ( $\alpha$ 1-ADR antagonista prazosin;  $\beta$ -ADR antagonista propranolol) (A) ili glukokortikoidnog receptora (GR) agonistom (hidrokortizon) i/ili antagonistom (RU486) (B). Relativna ekspresija transkripata glavnih markera mitohondrijalne fisije praćena je RQ-PCR metodom. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na Basal grupu.

Pored svih gore pomenutih procesa mitohondrijalne dinamike, proces mitofagije je takođe od izuzetne važnosti za homeostazu mitohondrija kao i održavanje funkcionalne mitohondrijalne mreže u ćelijama (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015). Shodno tome, praćena je ekspresija glavnih markera mitohondrijalne autofagije (*Pink1*, *Prkn* i *Tfeb*) u spermatozoidima (Slika 5.1.13). Rezultati pokazuju da adrenalin značajno povećava nivo ekspresije *Pink1* transkripta (8.2x) u spermatozoidima, a ovaj efekat adrenalina je potpuno poništen nakon dodatka oba tipa antagonista, i  $\alpha$ 1-ADR antagoniste i  $\beta$ -ADR antagoniste, ukazujući na učešće oba tipa ADR receptora (Slika 5.1.13.A). Značajnije povećanje primećeno je analizom ekspresije *Prkn* transkripta (17.6x) nakon inkubacije spermatozoida hormonom stresa adrenalinom. Ovaj efekat adrenalina potpuno je poništen samo nakon dodatka  $\alpha$ 1-ADR antagoniste, dok je  $\beta$ -ADR antagonista samo umanjio efekat adrenalina, ukazujući da je  $\alpha$ 1-ADR više uključen u adrenalinom-posredovanu stimulaciju ekspresije navedenog transkripta. Pored toga, blokada  $\alpha$ 1-ADR i  $\beta$ -ADR značajno je povećala nivo ekspresije transkripta *Prkn* (prazosin–1.9x, propranolol–2.3x). Adrenalin je takođe poništio efekat prazosina, ali je i smanjio efekat propranolola (1.9x u poređenju sa 2.3x), dok je agonista  $\beta$ -ADR, izoproterenol, potpuno poništio efekat propranolola. Antagonista GR, RU486 značajno je povećao nivo ekspresije transkripta *Prkn* (1.5x), i ovaj efekat potpuno je poništen agonistom GR, hidrokortizonom (Slika 5.1.13.B). Nivo ekspresije transkripta *Tfeb* statistički je značajno povećan u spermatozoidima nakon inkubacije sa  $\alpha$ 1-ADR antagonistom, prazosinom (1.5x) i ovaj efekat je poništen kombinacijom  $\alpha$ 1-ADR antagoniste i adrenalina. Sa druge strane, kombinacija  $\beta$ -ADR antagoniste i agoniste, propranolol + izoproterenol, značajno je smanjila ekspresiju ovog transkripta u spermatozoidima (1.9x), ukazujući na kompleksnu regulaciju transkripcije *Tfeb* u spermatozoidima.

**A** Glavni markeri mitofagije u spermatozoidima stimulisanim agonistom i antagonistom  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -ADR



**B** Glavni markeri mitofagije u spermatozoidima stimulisanim agonistom i antagonistom glukokortikoidnih receptora



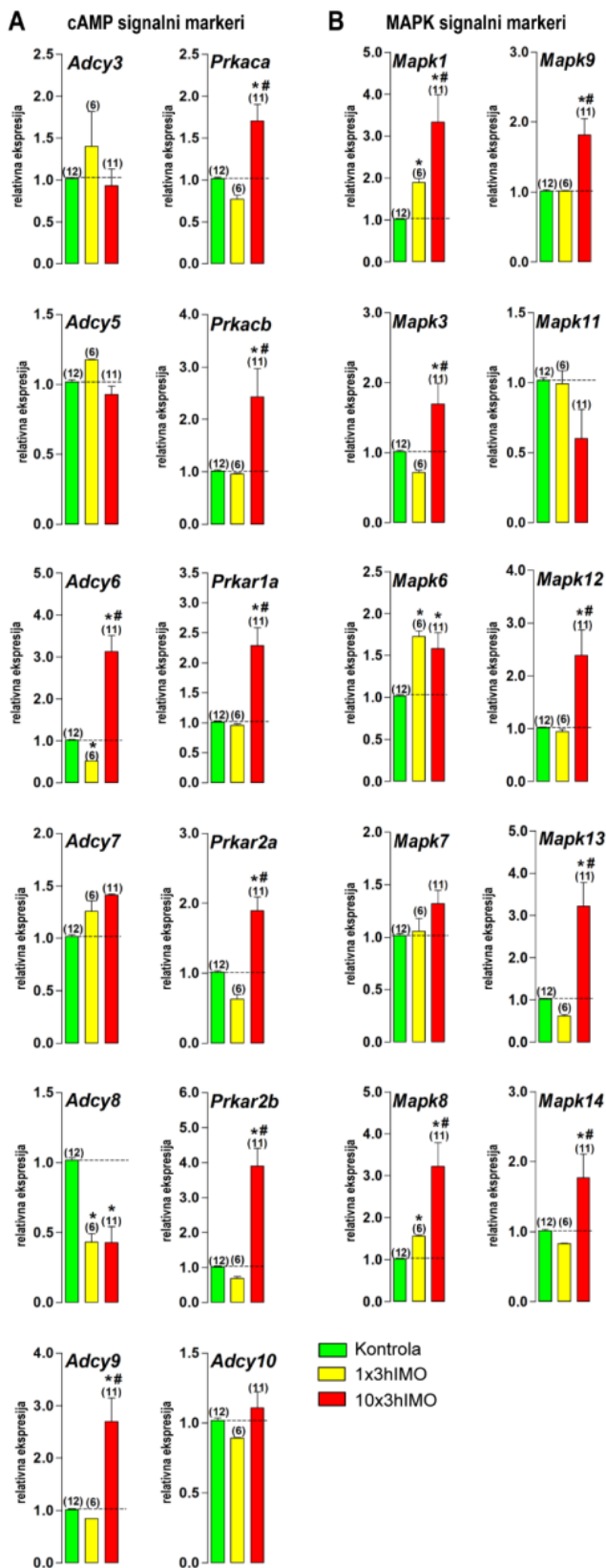
### Slika 5.1.13. Hormoni stresa menjaju transkripcione profile markera mitofagije u spermatozoidima.

Spermatozoidi izolovani iz neuznemiranih adultnih životinja tretirani su *ex vivo*, tokom 6 sati, ili adrenergičkih receptora (ADR) agonistima (adrenalin i izoproterenol) i/ili antagonistima ( $\alpha$ 1-ADR antagonista prazosin;  $\beta$ -ADR antagonista propranolol) (A) ili glukokortikoidnog receptora (GR) agonistom (hidrokortizon) i/ili antagonistom (RU486) (B). Relativna ekspresija transkripata glavnih markera mitofagije praćena je RQ-PCR metodom. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na Basal grupu.

### 5.1.9. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost kao i broj i funkcionalnost spermatozoida, promenjeni su u spermatozoidima stresiranih pacova

Ekspresija signalnih molekula koje regulišu kako mitohondrijalnu funkcionalnost i dinamiku tako i broj i funkcionalnost spermatozoida, pod značajnim je uticajem stres hormona obzirom da je transkripcioni nivo 16 od 22 ispitivana markera poromenjen u spermatozoidima stresiranih životinja u odnosu na kontrolne (Slika 5.1.14). Nivoi transkripcije za 8 od 12 ispitivanih markera cAMP signalnih markera promenjena je u spermatozoidima stresiranih životinja (5.1.14.A). Akutni stres (1x3hIMO) značajno je smanjio transkripciju *Adcy6* (1.9x) i *Adcy8* (2.3x) u spermatozoidima. Ponavljani stres (10x3hIMO) ispoljio je suprotan efekat, odnosno povećanje ekspresije *Adcy6* (3.1x) ali i smanjenje nivoa relativne ekspresije *Adcy8* (2.3x). U istim uzorcima spermatozoida, nivo transkripta *Adcy9* povećan je 2.7x. Paralelno sa navedenim rezultatima, ponavljani stres značajno je povećao ekspresiju transkripata za gene koji kodiraju katalitičke i regulatorne subjednice PRKA: *Prkaca* (1.7x), *Prkacb* (2.4x), *Prkar1a* (2.3x), *Prkar2a* (1.9x) i *Prkar2b* (3.9x). Nivoi ekspresije transkripata za 8 od 10 ispitivanih markera a MAPK signalnog puta povećano je u spermatozoidima stresiranih pacova (Slika 5.1.14.B). Akutni stres značajno je povećao transkripciju *Mapk1* (1.9x), *Mapk6* (1.7x) i *Mapk8* (1.6x) u spermatozoidima. Dok je ponavljani stres značajno povećao nivoe relativne ekspresije transkripata za *Mapk1* (3.3x), *Mapk3* (1.7x), *Mapk6* (1.6x), *Mapk8* (3.2x), *Mapk9* (1.8x), *Mapk12* (2.4x), *Mapk13* (3.2x) i *Mapk14* (1.8x).





**Slika 5.1.14. Transkripcioni profili signalnih molekula koje regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost kao i broj i funkcionalnost spermatozoida, promjenjeni su u spermatozoidima stresiranih pacova.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih i stresiranih životinja, i korišćena je za analizu transkripcionih profila signalnih molekula cAMP signalnog puta (A) i MAPK signalnog puta (B). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu; # u odnosu na 1x3hIMO grupu.

**Tabela 5.1.1.** Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti i signalnih molekula koji regulišu dinamiku i funkcionalnost mitohondrija, kao i broj i funkcionalnost spermatozoida značajno su promjenjeni u spermatozoidima odraslih pacova koji su stalno pod stresom. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SEM vrednosti tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost na nivou P<0,05: \* u odnosu na kontrolnu grupu; # naspram 1k3hIMO grupe.

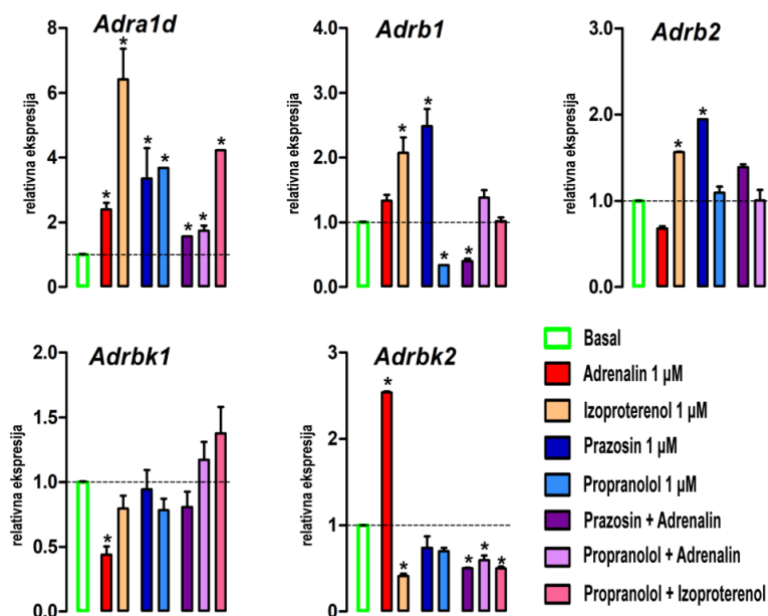
Groupa Transkript	Kontrola	1x3hIMO	10x3hIMO
<i>Pparg1a</i>	1.0 ±0.07	0.91 ±0.30	2.74* <sup>#</sup> ±0.52 ↑
<i>Tfam</i>	1.0 ±0.02	1.19 ±0.04	1.94* <sup>#</sup> ±0.29 ↑
<i>Nrf1</i>	1.0 ±0.02	1.14 ±0.06	2.33* ±0.54 ↑
<i>Nrf2a</i>	1.0 ±0.06	1.18 ±0.04	1.82* <sup>#</sup> ±0.08 ↑
<i>Ppard</i>	1.0 ±0.01	1.92* ±0.01 ↑	1.86* ±0.15 ↑
<i>mtNd1</i>	1.0 ±0.02	1.20 ±0.01	7.03* <sup>#</sup> ±0.16 ↑
<i>Mfn1</i>	1.0 ±0.01	1.00 ±0.08	3.28* <sup>#</sup> ±0.69 ↑
<i>Mfn2</i>	1.0 ±0.04	0.81 ±0.01	2.88* <sup>#</sup> ±0.37 ↑
<i>Opa1</i>	1.0 ±0.06	1.27 ±0.01	1.63* ±0.08 ↑
<i>Drp1</i>	1.0 ±0.01	0.98 ±0.03	3.23* <sup>#</sup> ±0.39 ↑
<i>Pink1</i>	1.0 ±0.00	0.70 ±0.01	2.31* <sup>#</sup> ±0.18 ↑
<i>Prkn</i>	1.0 ±0.05	0.75 ±0.23	1.45* <sup>#</sup> ±0.15 ↑
<i>Tfeb</i>	1.0 ±0.01	1.28 ±0.08	2.61* <sup>#</sup> ±0.59 ↑
<i>Cox4i1</i>	1.0 ±0.02	1.15 ±0.02	2.75* <sup>#</sup> ±0.17 ↑
<i>Cox4i2</i>	1.0 ±0.02	0.64 ±0.19	2.78* <sup>#</sup> ±0.68 ↑
<i>Cytc</i>	1.0 ±0.01	1.25 ±0.04	1.60* ±0.08 ↑
<i>Ucp2</i>	1.0 ±0.02	1.23 ±0.01	3.22* <sup>#</sup> ±0.59 ↑
<i>Ucp3</i>	1.0 ±0.06	0.71 ±0.03	0.20* <sup>#</sup> ±0.02 ↓
<i>Adcy6</i>	1.0 ±0.02	0.52* ±0.01 ↓	3.13* <sup>#</sup> ±0.38 ↑
<i>Adcy8</i>	1.0 ±0.01	0.43* ±0.06 ↓	0.43* ±0.11 ↓
<i>Adcy9</i>	1.0 ±0.01	0.85 ±0.00	2.70* <sup>#</sup> ±0.45 ↑
<i>Prkaca</i>	1.0 ±0.02	0.77 ±0.05	1.70* <sup>#</sup> ±0.19 ↑
<i>Prkacb</i>	1.0 ±0.02	0.96 ±0.02	2.43* <sup>#</sup> ±0.54 ↑
<i>Prkar1a</i>	1.0 ±0.01	0.96 ±0.02	2.29* <sup>#</sup> ±0.30 ↑
<i>Prkar2a</i>	1.0 ±0.02	0.63 ±0.06	1.89* <sup>#</sup> ±0.20 ↑
<i>Prkar2b</i>	1.0 ±0.02	0.68 ±0.05	3.90* <sup>#</sup> ±0.51 ↑
<i>Mapk1</i>	1.0 ±0.01	1.89* ±0.09 ↑	3.33* <sup>#</sup> ±0.65 ↑
<i>Mapk3</i>	1.0 ±0.02	0.72 ±0.04	1.70* <sup>#</sup> ±0.29 ↑
<i>Mapk6</i>	1.0 ±0.02	1.72* ±0.06 ↑	1.58* ±0.19 ↑
<i>Mapk8</i>	1.0 ±0.01	1.56* ±0.03 ↑	3.22* <sup>#</sup> ±0.56 ↑
<i>Mapk9</i>	1.0 ±0.02	1.02 ±0.01	1.82* <sup>#</sup> ±0.23 ↑
<i>Mapk12</i>	1.0 ±0.01	0.95 ±0.05	2.39* <sup>#</sup> ±0.48 ↑
<i>Mapk13</i>	1.0 ±0.02	0.61 ±0.04	3.25* <sup>#</sup> ±0.56 ↑
<i>Mapk14</i>	1.0 ±0.01	0.83 ±0.01	1.77* <sup>#</sup> ±0.34 ↑



### 5.1.10. Stres hormon adrenalin remeti transkripcione profile adrenergičkih receptora kao i kinaza adrenergičkih receptora i signaling od beta adrenergičkih receptora u spermatozoidima.

Na osnovu dobijenih rezultata analize markera mitohondrijalne dinamike nakon stimulacije spermatozoida hormonima stresa kao i antagonistima njihovih receptora, hormon stresa adrenalin pokazuje izraženije efekte delovanja na nivou transkripcije analiziranih gena. Iz tog razloga dalje su analizirani transkripcioni profili adrenergičkih receptora kao i kinaza adrenergičkih receptora i signaling od beta adrenergičkih receptora u spermatozoidima. Rezultati pokazuju da je transkripcioni profil ADR i njihovih kinaza pod značajnim uticajem adrenergičkog signalinga (Slika 5.1.15). Nivo ekspresije *Adra1d* transkripta značajno je povećan u spermatozoidima inkubiranim sa adrenalinom (2.4x), izoproterenolom (6.4x), prazosinom (3.4x), propranololom (3.7x), kombinacijama prazosina i adrenalina (1.6x), propranolola i adrenalina (1.7x), propranolola i izoproterenola (4.2x). U istim uzorcima, nivo ekspresije transkripta *Adrb1* povećan je nakon inkubacije spermatozoida izoproterenolom (2.1x) kao i prazosinom (2.5x), dok je nivo ekspresije smanjen nakon tretmana propranololom (2.9x) i kombinacijom prazosin + adrenalin (2.5x). Takođe, nivo ekspresije najviše ekspresovanog ADR, *Adrb2*, značajno je povećana izoproterenolom (1.6x) i prazosinom (1.9x). Transkripcioni profil kinaza asociраних sa ADR signalingom takođe je poremećen. Nivo ekspresije transkripta *Adrbk1* značajno je smanjen (2.3x) u spermatozoidima inkubiranim u prisustvu adrenalina, i ovaj efekat potpuno je poništen dodatkom oba tipa antagonista, i  $\alpha$ 1-ADR antagoniste i  $\beta$ -ADR antagoniste, ukazujući na učešće oba tipa ADR. Relativna ekspresija *Adrbk2* transkripta povećana je nakon inkubacije spermatozoida stres hormonom adrenalinom (2.5x) i ovaj efekat nije samo potpuno poništen  $\alpha$ 1-ADR antagonistom/  $\beta$ -ADR antagonistom, već je doveo do smanjenja (prazosin+adrenalin 2x, propranolol+adrenalin 1.7x). Suprotno tome, nivo ekspresije *Adrbk2* transkripta značajno je smanjen (2.4x) u spermatozoidima inkubiranim u prisustvu  $\beta$ -ADR agoniste, izoproterenolola i ovaj efekat (2x) zadržao se i u prisustvu  $\beta$ -ADR antagoniste (propranolol + izoproterenol).

Adrenergički receptori i beta adrenergičkih-receptora kinaza u spermatozoidima stimulisanim agonistom i antagonistom  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -ADR



Slika 5.1.15. Stres hormon adrenalin remeti transkripcione profile adrenergičkih receptora kao i kinaza adrenergičkih receptora i signaling od  $\beta$ -adrenergičkih receptora u spermatozoidima.

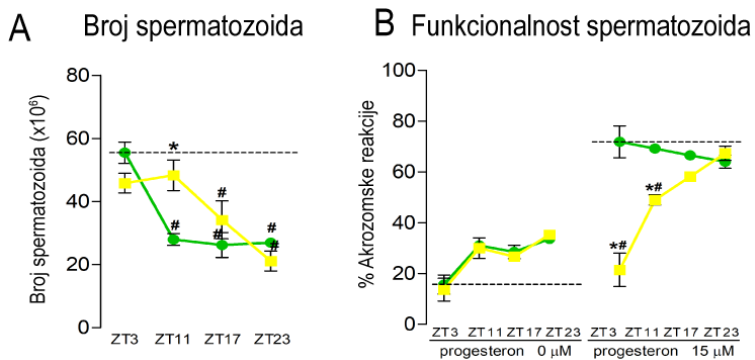
Spermatozoidi izolovani iz neuznemiranih adultnih životinja tretirani su *ex vivo*, tokom 6 sati, ili adrenergičkih receptora (ADR) agonistima (adrenalin i izoproterenol) i/ili antagonistima ( $\alpha$ 1-ADR antagonista prazosin;  $\beta$ -ADR antagonista propranolol). Relativna ekspresija transkripta glavnih markera adrenergičkih receptora kao i kinaza adrenergičkih receptora i signaling od beta adrenergičkih receptora praćen je RQ-PCR metodom. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na Basal grupu.

## **5.2. Karakterizacija molekularnih profila mitohondrijalne dinamike koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije spermatozoida tokom oporavka organizma od akutnog stresa u različitim cirkadijalnim vremenima, najčešćeg tipa stresa u humanoju populaciji.**

U cilju karakterizacije molekularnih profila mitohondrijalne dinamike kao i njenih regulatornih molekula kao mehanizama adaptacije spermatozoida dizajniran je *in vivo* eksperimentalni model koji oponaša situacije u humanoju populaciji, gde su ljudi izloženi akutnom psihološkom stresu. Psihološki stres je najčešći tip stresa u ljudskom društvu. U ovom eksperimentalnom modelu adultni mužjaci pacova izlagani su akutnom imobilizacionom stresu u trajanju od 3 sata (1x3hIMO) u periodu od 7 do 10 časova ujutru (ZT0 do ZT3; ZT0 predstavlja vreme paljenja svetla u gajilištu i odgovara vremenu od 7 časova ujutru) sa periodom oporavka od 0, 8, 14 i 20 časova nakon akutnog stresa (ZT3, ZT11, ZT17 i ZT23), ZT - „zeitgeber” (u originalu reč nemačkog jezika, bukvalni prevod na engleski jezik „timegiver”). Kontrolnu grupu sačinjavale su slobono pokretljive životinje koje nisu uznemiravane tokom trajanja eksperimenata.

### **5.2.1. Broj spermatozoida kao i funkcionalnost spermatozoida nakon akutnog tročasovnog stresa sa periodima oporavka od 0, 8, 14 i 20 sati.**

Ispitivanje uticaja akutnog tročasovnog stresa na spermatozoide pacova rađeno je i korišćenjem eksperimentalnog *in vivo* modela akutnog stresa sa periodom oporavka od 0, 8, 14 i 20 sati. Rezultati pokazuju da je akutni stres (1x3hIMO) bio efikasan stresor obzirom da je odmah nakon stresa (ZT3) povećao nivo kortikosterona u cirkulaciji, u poređenju sa kontrolnim uzorcima u istoj vremenskoj tački (Medar i sar., 2021). Tokom perioda oporavka, nivoi kortikosterona ostali su nepromenjeni (Medar i sar., 2021). Cirkadijalni profil serumskih androgena (T+DHT) očigledan je u grupi neuznemiranih životinja (Kontrola): povećanje u kontrolnoj grupi ZT11 u odnosu na kontrolnu grupu ZT3, dok je statistički značajno smanjenje detektovano u kontrolnoj grupi ZT17 i ZT23 u odnosu na kontrolnu grupu ZT3 vremenske tačke (Medar i sar., 2021). Pored dobro poznatog smanjenja nivoa androgena u cirkulaciji nakon akutnog stresa (smanjenje u grupi 1x3hIMO+R u poređenju sa kontrolom u istoj vremenskoj tački, ZT3), smanjen nivo androgena ostao je i nakon 8, 14 i 20 sati nakon akutnog stresa, u poređenju sa ZT3-kontrolom ili odgovarajućom ZT-kontrolom (Medar i sar., 2021). Takođe, rezultati pokazuju i smanjenje nivoa androgena kod akutno stresiranih pacova sa različitim periodom oporavka (Medar i sar., 2021). Dalje, rezultati broja spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa (Figura 5.2.1.A) pokazuju smanjenje sa produžetkom perioda oporavka, odnosno u vremenskoj tački ZT17 i ZT23. Broj spermatozoida grupe 1x3hIMO+R u tački ZT17 smanjen je 1.5x u poređenju sa ZT17-kontrolom i 1.6x u poređenju sa ZT3-kontrolom. Takođe, broj spermatozoida grupe 1x3hIMO+R u tački ZT23 smanjen je 2.9x u poređenju sa ZT23-kontrolom i 2.6x u poređenju sa ZT3-kontrolom. Suprotno tome, funkcionalnost spermatozoida (Slika 5.2.1.B) smanjena je u grupama sa kraćim periodom oporavka, odnosno u vremenskim tačkama ZT3 i ZT11. Funkcionalnost spermatozoida grupe 1x3hIMO+R u tački ZT3 smanjen je 3.6x u poređenju sa ZT3-kontrolom, dok je funkcionalnost spermatozoida grupe 1x3hIMO+R u tački ZT11 smanjen je 1.4x u poređenju sa ZT11-kontrolom i 1.5x u poređenju sa ZT3-kontrolom.



**Slika 5.2.1. Akutni psihofizički stres imobilizacijom smanjuje broj i funkcionalnost spermatozoida u različitim vremenskim tačkama nakon IMO stresa.**

Broj spermatozoida izolovan iz kaudalnog epididimisa nestresiranih životinja (kontrolne) i pacova podvrgnutih tretmanu akutnog imobilizacionog stresa, tokom 3 sata (1x3hIMO) sa periodom oporavka od 0, 8, 14 i 20 sati (A). Funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida

koji su prošli akrozomsku reakciju) izolovanih iz kontrolnih i akutno stresiranih životinja (B). Kapacitirani spermatozoidi stimulirani su progesteronom (PROG 15 μM) paralelno sa kapacitiranim spermatozoidima koji nisu stimulirani progesteronom (PROG 0 μM). Plavo bojenje u regionu akrozoma u glavenom delu spermatozoida ukazuje na intaktan akrozom, dok su spermatozoidi bez plavog bojenja u regionu akrozoma smatrani za akrozom-reaktivne spermatozoide tj. spermatozoide koji su prošli akrozomsku reakciju. Skala na fotografijama je 30 μm. Normalizovane vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje ± SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo P < 0,05: \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke; # u odnosu na kontrolnu grupu ZT3 vremenske tačke.

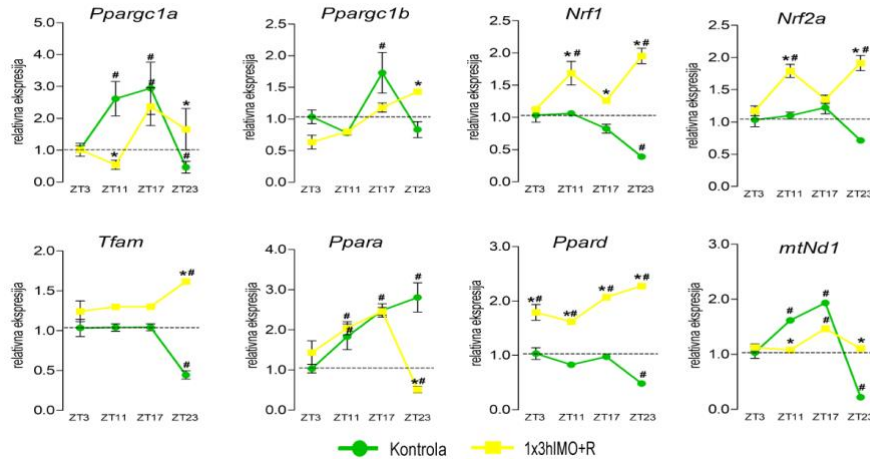
**5.2.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti značajno su promenjeni u spermatozoidima akutno stresiranih pacova čak i nakon 20 sati oporavka**

U potrazi za mogućim mehanizmima koji stoje iza efekata akutnog imobilizacionog stresa sa periodima oporavka, praćeni su transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike kao i signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i broj i funkcionalnost spermatozoida. Rezultati pokazuju da stres dramatično remeti ekspresiju transkriptata za markere mitohondrijalne dinamike kao i signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i broj i funkcionalnost spermatozoida (Tabela 5.2.1). Nivoi ekspresije 20 od 22 ispitivana markera (91%) promenjeni su u poređenju sa ZT3-kontrolom kao kalibratorom ili sa odgovarajućom kontrolom iz date ZT-vremenske tačke (Slika 5.2.2, Slika 5.2.3., Slika 5.2.4., Slika 5.2.5., Slika 5.2.6. i Slika 5.2.9).

Nivoi ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze promenjeni su kod 8 od 8 ispitivanih markera (100%) (Slika 5.2.2.). Relativna ekspresija transkriptata za gene koji kodiraju PGC1 (*Ppargc1a* i *Ppargc1b*), dobro poznati master regulator uključen u transkripcionu kontrolu svih procesa vezanih za homeostazu mitohondrija (Dominy i Puigserver, 2013; Puigserver i Spiegelman, 2003) promenjena je nakon akutnog imobilizacionog stresa sa periodima oporavka. Poređenjem ekspresije *Ppargc1a* transkripta kontrolnih uzoraka različitih vremenskih tačaka sa ZT3-kontrolom primećuje se različit stepen ekspresije u zavisnosti od vremenske tačke uzorkovanja: povećanje u spermatozoidima grupa ZT11-kontrolne (2.6x) i ZT17-kontrolne (2.9x) u poređenju sa ZT3-kontrolnom grupom, dok je suprotan efekat smanjenja ekspresije istog transkripta detektovan u spermatozoidima ZT23-kontrolne (2.1x). Promene na nivou ekspresije transkripta *Ppargc1a* detektovane su i u spermatozoidima izolovanim iz akutno stresiranih životinja sa različitim periodima oporavka: smanjenje ekspresije u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT11 (4.8x) u odnosu na ZT11-kontrolu, ali povećanje ekspresije u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT17 (2.4x) u odnosu na ZT3-kontrolu kao i povećanje u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT23 (3.6x) u odnosu na ZT23-kontrolu. Manje istaknut efekat primećen je na nivou transkripcije *Ppargc1b*: povećanje nivoa ekspresije u spermatozoidima izolovanim iz kontrolne grupe ZT17 (1.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu kao i povećanje nivoa ekspresije u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23 (1.4x) u odnosu na ZT23-kontrolu. Dalje, transkripcioni profili PGC1-ciljnih molekula (*Nrf1*, *Nrf2a*, *Tfam*, *mtNd1* i *Ppard*) koji regulišu gene za subjediničice OXPHOS, takođe su promenjeni. Transkripcija *Tfam* promenjena je samo u vremenskoj tački ZT23: smanjenje u spermatozoidima ZT23-kontrolne grupe (2.3x) u odnosu na

ZT3-kontrolu, ali povećanje nivoa ekspresije detektovano je u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT23 (3.7x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (1.6x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Nivo ekspresije transkripta *Nrf1* smanjen je u spermatozoidima kontrolnih uzoraka vremenske tačke ZT23 (2.6x) u odnosu na ZT3-kontrolu, dok je nivo ekspresije povećan u svim vremenskim tačkama grupe akutno stresiranih životinja sa periodima oporavka: 1x3hIMO+R grupa vremenske tačke ZT11 (1.5x) u odnosu na ZT11-kontrolu i (1.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu, takođe 1x3hIMO+R grupa vremenske tačke ZT23 (4.9x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (2.0x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Rezultati pokazuju da je nivo ekspresije transkripta *Nrf2a* povećan u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT11 (1.6x) u odnosu na ZT11-kontrolu i (1.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu, kao i u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT23 (2.7x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (1.9x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Relativna ekspresija transkripta *Ppara* povećana je u spermatozoidima kontrolnih životinja u svim vremenskim tačkama u odnosu na kontrolnu grupu vremenske tačke ZT3: povećanje od 1.8x u grupi ZT11-kontrole, 2.5x u grupi ZT17-kontrole i 2.8x u grupi ZT23-kontrole. U spermatozoidima stresiranih životinja povećanje nivoa ekspresije *Ppara* detektovano je u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT11 (2.0x) u odnosu na ZT3-kontrolu, kao i 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT17 (2.5x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Sa druge strane smanjenje transkripcije *Ppara* detektovane je u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT23 (5.5x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (2.0x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Dalje, nivo ekspresije *Ppard* smanjen je u spermatozoidima kontrolne grupe ZT23 vremenske tačke (2.1x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Povećanje nivoa ekspresije detektovano je u spermatozoidima akutno stresiranih životinja sa različitim periodima oporavka: u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT3 (1.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu; u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT11 (2.0x) u odnosu na ZT11-kontrolu i (1.6x) u odnosu na ZT3-kontrolu; u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT23 (4.7x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (2.3x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Profil ekspresije transkripta *mtNdl* sličan je profilu *Ppargc1a* ekspresije. Povećanje nivoa *mtNdl* ekspresije detektovano je u spermatozoidima kontrolnih uzoraka ZT11 vremenske tačke (1.6x) kao i ZT17-kontrole (1.9x) u odnosu na ZT3-kontrolne uzorke, dok je smanjenje nivoa *mtNdl* detektovano u kontrolnim uzorcima ZT23 vremenske tačke (4.5x). Promene nivoa ekspresije *mtNdl* detektovane su i u spermatozoidima akutno stresiranih životinja sa različitim periodom oporavka: smanjen nivo ekspresije u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT11 (1.5x) u odnosu na ZT11-kontrolu, dok je sa druge strane detektovan povećan nivo ekspresije ovog transkripta u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT17 (1.5x) u odnosu na ZT3-kontrolu i u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT23 (5.0x) u odnosu na ZT23-kontrolu.

### Markeri mitohondrijalne biogeneze

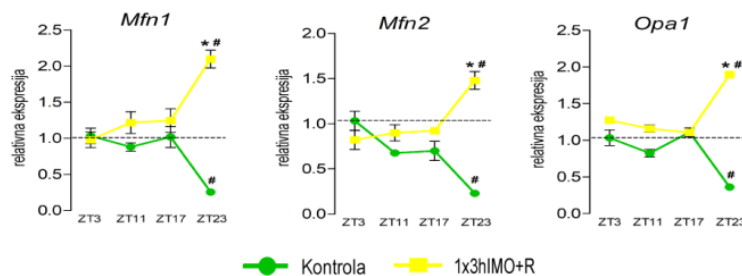


**Slika 5.2.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze značajno su promenjeni u spermatozoidima akutno stresiranih životinja sa različitim periodom oporavka.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i stresiranih životinja (1x3hIMO+R), i korišćena je za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze. Dobijene vrednosti su prikazane tačkama i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke; # u odnosu na kontrolnu grupu ZT3 vremenske tačke.

Nivoi ekspresije markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture promenjeni su kod 3 od 3 ispitivana markera (100%) (Slika 5.2.3). Transkripcija *Mfn1* markera smanjena je u spermatozoidima kontrolne grupe ZT23 vremenske tačke (3.9x) u odnosu na ZT3-kontrolu, ali je povećana u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT23 (8.1x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (2.1x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Nivo relativne ekspresije *Mfn2* smanjen je u spermatozoidima kontrolne grupe ZT23 vremenske tačke (4.3x) u odnosu na ZT3-kontrolu, ali je povećan u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT23 (6.4x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (1.5x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Relativna ekspresija *Opa1* transkripta značajno je smanjena u spermatozoidima kontrolne grupe ZT23 vremenske tačke (2.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu, ali je povećana u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT23 (5.3x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (1.9x) u odnosu na ZT3-kontrolu.

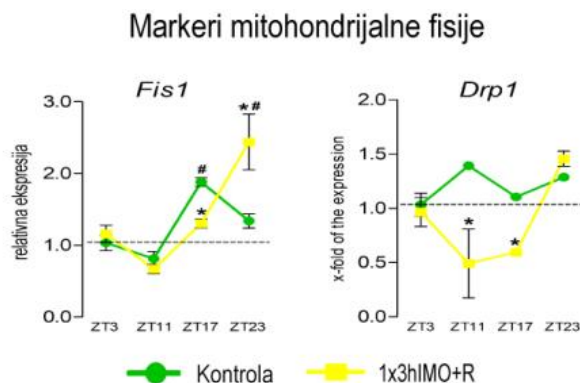
### Markeri mitohondrijalne fuzije i arhitekture



**Slika 5.2.3. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture značajno su promenjeni u spermatozoidima akutno stresiranih životinja sa različitim periodom oporavka.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i stresiranih životinja (1x3hIMO+R), i korišćena je za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture. Dobijene vrednosti su prikazane tačkama i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke; # u odnosu na kontrolnu grupu ZT3 vremenske tačke.

Analiza nivoa ekspresije transkripata za markere mitohondrijalne fisije pokazala je da su 2 od 2 ispitivana markera (100%) promenjena u spermatozoidima akutno stresiranih pacova sa različitim periodima oporavka (Slika 5.2.4.). Nivo ekspresije transkripta *Fis1* povećan je u spermatozoidima ZT17-kontrolne grupe (1.9x) u odnosu na ZT-3 kontrolu. U spermatozoidima stresiranih životinja smanjenje nivoa ekspresije navedenog transkripta detektovano je u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT17 (1.5x) u odnosu na ZT11-kontrolu, dok je suprotan efekat, odnosno povećane nivoa ekspresije detektovano u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT23 (1.8x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (2.4x) u odnosu na ZT2-kontrolu. Nivo ekspresije transkripta *Drp1* smanjen je u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT11 (2.8x) u odnosu na ZT11-kontrolu, kao i u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT17 (1.8x) u odnosu na ZT17-kontrolu.



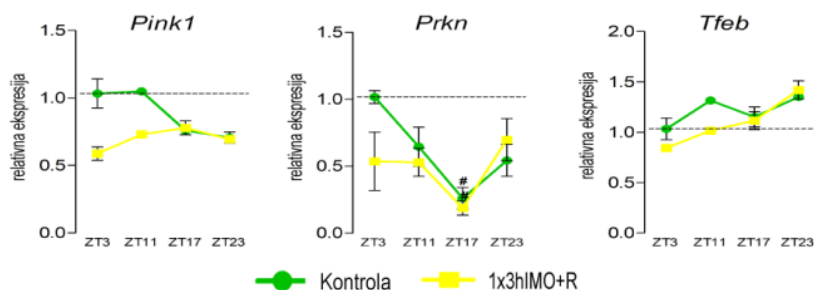
**Slika 5.2.4. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne fisije značajno su promenjeni u spermatozoidima akutno stresiranih životinja sa različitim periodom oporavka.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i stresiranih životinja (1x3hIMO+R), i korišćena je za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne fisije. Dobijene vrednosti su prikazane tačkama i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke; # u odnosu na kontrolnu grupu ZT3 vremenske tačke.

Nivoi ekspresije transkripata za markere mitohondrijalne autofagije promenjeni su kod 1 od 3 ispitivana markera (33%) (Slika 5.2.5). Statistički značajna promena ekspresije detektovana je na nivou *Prkn* transkripta: smanjenje nivoa ekspresije detektovano je u spermatozoidima kontrolnih životinja vremenske tačke ZT17 (3.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu, kao i u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT17 (5.3x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Transkripcioni profili ostalih ispitivanih markera, *Pink1* i *Tfeb* ostali su nepromenjeni.



### Markeri mitohondrijalne autofagije

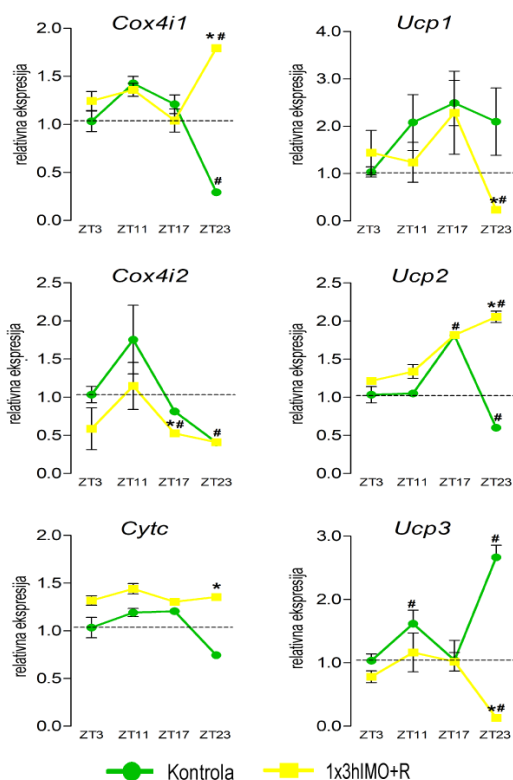


#### Slika 5.2.5. Transkripcijski profili markera mitohondrijalne autofagije značajno su promenjeni u spermatozoidima akutno stresiranih životinja sa različitim periodom oporavka.

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i stresiranih životinja (1x3hIMO+R), i korišćena je za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne autofagije. Dobijene vrednosti su prikazane tačkama i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke; # u odnosu na kontrolnu grupu ZT3 vremenske tačke.

Analiza nivoa ekspresije transkriptata za markere mitohondrijalne funkcionalnosti pokazala je da su 6 od 6 ispitivanih markera (100%) promenjena u spermatozoidima akutno stresiranih pacova sa različitim periodima oporavka (Slika 5.2.6). Ekspresija transkripta *Cox4i1* statistički je značajno povećana u spermatozoidima kontrolnih životinja vremenske tačke ZT23 (3.4x) u odnosu na nivo ekspresije navedenog transkripta u spermatozoidima kontrolne grupe vremenske tačke ZT3. Povećanje ekspresije *Cox4i1* transkripta detektovano je i u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT23 (6.1x) u odnosu na ZT23-kontrolu, kao i (1.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Rezultati pokazuju da je nivo ekspresije transkripta *Cox4i2* statistički značajno smanjen u spermatozoidima kontrolnih životinja vremenske tačke ZT23 (2.4x) u odnosu na ZT3-kontrolu, kao i u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT17 (1.6x) u odnosu na ZT17-kontrolu i (1.9x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Isti profil promene, odnosno smanjenje ekspresije *Cox4i2* transkripta detektovano je u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT23 (2.4x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Povećanje nivoa ekspresije *Cytc* transkripta detektovano je u spermatozoidima pacova grupe 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23 (1.8x) u odnosu na ZT23-kontrolu. Nivo ekspresije *Ucp1* transkripta statistički je značajno smanjen u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT23 (8.9x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (4.3x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Rezultati pokazuju da je nivo ekspresije *Ucp2* transkripta statistički značajno povećan u spermatozoidima kontrolnih životinja vremenske tačke ZT17 (1.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu, dok je smanjen u spermatozoidima kontrolnih životinja vremenske tačke ZT23 (3.4x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (2.0x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Relativna ekspresija *Ucp3* povećana je u spermatozoidima kontrolnih životinja ZT11 vremenske tačke (1.6x) u odnosu na ZT3-kontrolu, kao i u kontrolnim uzorcima ZT23 vremenske tačke (2.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Suprotno tome, smanjenje nivoa ekspresije transkripta *Ucp3* detektovano je u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT23 (20.8x) u odnosu na ZT23-kontrolu, kao i (7.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu.

### Markeri funkcionalnosti mitohondrija



**Slika 5.2.6. Transkripcijski profili markera funkcionalnosti mitohondrija značajno su promenjeni u spermatozoidima akutno stresiranih životinja sa različitim periodom oporavka.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i stresiranih životinja (1x3hIMO+R), i korišćena je za analizu transkripcionih profila markera funkcionalnosti mitohondrija. Dobijene vrednosti su prikazane tačkama i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke; # u odnosu na kontrolnu grupu ZT3 vremenske tačke.

### 5.2.3. Transkripcijski profili markera signalnih puteva koji reglišu broj i funkcionalnost spermatozoida, kao i mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost, značajno su promenjeni u spermatozoidima akutno stresiranih pacova i 20 sati nakon oporavka

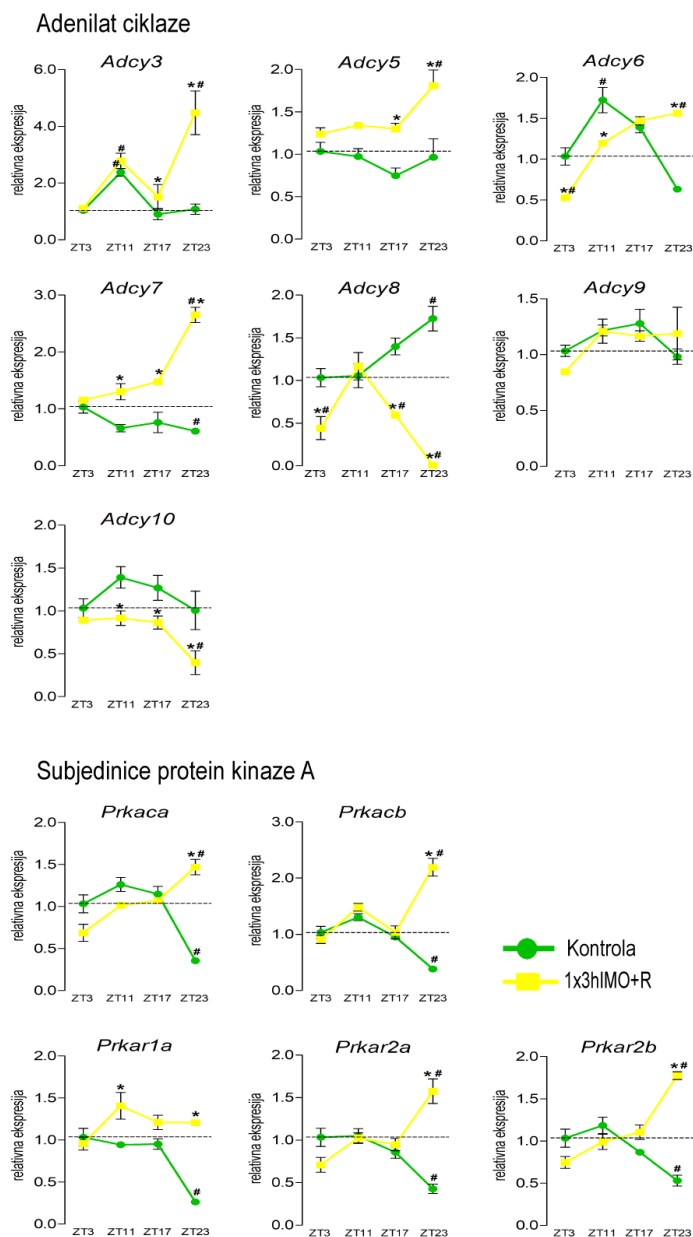
Obzirom da su cAMP i MAPK signalni putevi veoma važni za regulaciju broja i funkcionalnosti spermatozoida, kao i za regulaciju mitohondrijalne funkcionalnosti i dinamike (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015) praćeni su profili relativne ekspresije njihovih glavnih molekularnih markera (Slika 5.2.7 i Slika 5.2.8). Transkripcijski nivoi 20 od 22 ispitivana markera (91%) promenjeni su u spermatozoidima akutno stresiranih pacova sa različitim periodom oporavka.

Većina promena transkripcionog profila cAMP-signalnih-markera tokom perioda oporavka od akutnog imobilizacionog stresa detektovana je u vidu povećanja ekspresije transkriptata većine adenilil ciklaza (*Adcy3*, *Adcy5*, *Adcy6* i *Adcy7*) osim *Adcy8* i *Adcy10* (kod kojih je detektovano smanjenje ekspresije). U istim uzorcima spermatozoida, nivoi transkriptata su povećani za sve ispitivane gene koji kodiraju katalitičke i regulatorne subjedinice protein kinaze A (*Prkaca*, *Prkacb*, *Prkar1a*, *Prkar2a*, *Prkar2b*) (Slika 5.2.7). Relativna ekspresija transkripta *Adcy3* povećana je u spermatozoidima izolovanim iz kontrolnih životinja vremenske tačke ZT11 (2.4x) u odnosu na ZT3-kontrolu kao i u spermatozoidima kontrolnih životinja vremenske tačke ZT17 (2.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu. U spermatozoidima stresiranih životinja detektovano je povećanje ekspresije navedenog transkripta u: grupi 1x3hIMO+R u vremenskoj tački ZT11 (2.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu; grupi 1x3hIMO+R u vremenskoj tački ZT17 (1.5x) u odnosu na ZT3-kontrolu; grupi 1x3hIMO+R u vremenskoj tački ZT23 (4.5x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (4.5x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Transkripcijski profil *Adcy5* povećan je u spermatozoidima stresiranih životinja sa periodom oporavka od 14 i 20 sati: u grupi



1x3hIMO+R u vremenskoj tački ZT17 (1.7x) u odnosu na ZT17-kontrolu kao i u grupi 1x3hIMO+R u vremenskoj tački ZT23 (1.9x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (1.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Relativna ekspresija transkripta *Adcy6* povećana je u spermatozoidima izolovanim iz kontrolnih životinja vremenske tačke ZT11 (1.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu, kao i u spermatozoidima stresirane grupe životinja (1x3hIMO+R) vremenske tačke ZT23 (2.5x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (1.6x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Suprotno tome, smanjenje nivoa ekspresije *Adcy6* detektovano je u 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT3 (1.9x) u odnosu na ZT3-kontrolu, kao i u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT11 (1.4x) u odnosu na ZT11-kontrolu. Smanjenje nivoa ekspresije *Adcy7* transkripta detektovano je u spermatozoidima kontrolnih životinja ZT23 vremenske tačke (1.6x) u odnosu na ZT3-kontrolu, dok je povećanje nivoa ekspresije detektovano u stresiranoj grupi životinja svih ispitivanih vremenskih tačaka: u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT11 (2.0x) u odnosu na ZT11-kontrolu; u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT17 (2.1x) u odnosu na ZT17-kontrolu; u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23 (4.3x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (2.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Rezultati takođe pokazuju da je nivo ekspresije transkripta *Adcy8* povećan u spermatozoidima izolovanim iz kontrolnih životinja vremenske tačke ZT23 (1.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu. U spermatozoidima akutno stresiranih životinja smanjenje ekspresije ovog transkripta detektovano je u: 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT3 (2.3x) u odnosu na ZT3-kontrolu; 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT17 (2.4x) u odnosu na ZT17-kontrolu i (1.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu; 1x3hIMO+R grupi vremenske tačke ZT23 (188.9x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (111.1x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Analiza relativne ekspresije *Adcy10* transkripta pokazuje da je nivo ovog transkripta smanjen u spermatozoidima akutno stresiranih životinja sa različitim periodima oporavka: u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT11 (1.5x) u odnosu na ZT11-kontrolu; u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT17 (1.4x) u odnosu na ZT17-kontrolu; u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23 (2.5x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (2.5x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Nivo ekspresije transkripta *Prkaca* u spermatozoidima promenjen je samo u ZT23 vremenskoj tački: smanjen je u spermatozoidima izolovanim iz kontrolnih životinja ZT23 vremenske tačke (2.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu, dok je povećanje nivoa ekspresije detektovano u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT23 (4.1x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (1.5x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Dalje, nivo ekspresije *Prkar1a* transkripta u spermatozoidima kontrolnih životinja vremenske tačke ZT23 smanjen je 3.8x u odnosu na ZT3-kontrolu. Suprotno tome, ekspresija *Prkar1a* u spermatozoidima stresiranih životinja vremenske tačke ZT11 (ZT11-1x3hIMO+R) povećana je 1.5x u odnosu na odgovarajuću kontrolu (ZT11-kontrolu), kao i u spermatozoidima grupe 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23 (4.6x) u odnosu na ZT23-kontrolu. Rezultati takođe pokazuju da je nivo transkripcije *Prkar2a* smanjen u spermatozoidima ZT23-kontrole (2.3x) u odnosu na ZT3-kontrolu, dok je suprotan efekat povećanja ekspresije detektovan u spermatozoidima akutno stresiranih životinja (1x3hIMO+R) vremenske tačke ZT23 (3.7x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (1.6x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Sličan profil ekspresije detektovan je i za transkript *Prkar2b*. Nivo ekspresije transkripta *Prkar2b* smanjen je u spermatozoidima kontrolnih životinja ZT23 vremenske tačke (1.9x) u odnosu na ZT3-kontrolu, ali je povećan u spermatozoidima 1x3hIMO+R grupe vremenske tačke ZT23 (3.3x) u odnosu na ZT23-kontrolu kao i (1.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu.

## Markeri cAMP signalnog puta



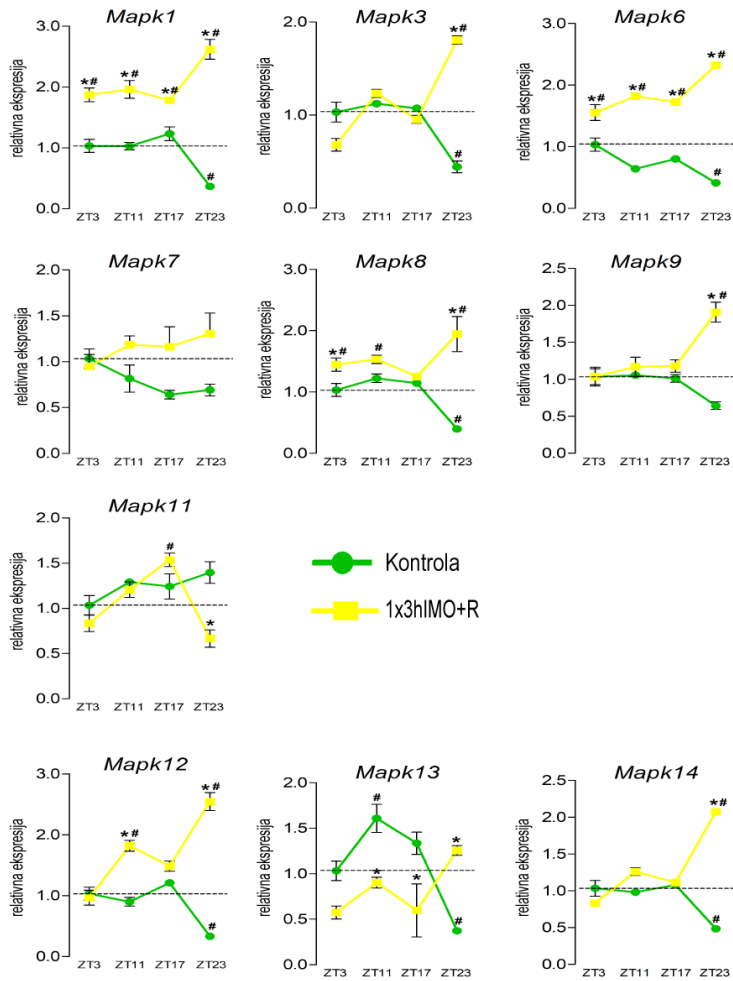
**Slika 5.2.7. Transkripcioni profili signalnih molekula cAMP signalnog puta promjenjeni su u spermatozoidima akutno stresiranih pacova sa različitim periodom oporavka.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i stresiranih životinja (1x3hIMO+R), i korišćena je za analizu transkripcionih profila signalnih molekula cAMP signalnog puta. Dobijene vrednosti su prikazane tačkama i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke; # u odnosu na kontrolnu grupu ZT3 vremenske tačke.

Analiza ekspresije transkripata molekularnih markera MAPK signalnog puta pokazuje da je 9 od 10 ispitivanih markera (90%) promjenjeno u spermatozoidima akutno stresiranih pacova sa različitim periodom oporavka. Molekularni markeri MAPK signalnog puta (*Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk6*, *Mapk7*, *Mapk8*, *Mapk9*, *Mapk11*, *Mapk12*, *Mapk13* i *Mapk14*) afektovani su u svim ispitivanim vremenskim tačkama. Transkripti svih pomenutih markera statistički su značajno povećani u spermatozoidima izolovanim iz pacova podvrgnutih akutnom imobilizacionom stresu u trajanju od 3 sata sa periodom oporavka od 20 sati (Slika 5.2.8). Nivo ekspresije *Mapk1* transkripta značajno je smanjen u spermatozoidima izolovanih iz kontrolnih životinja vremenske tačke ZT23 (2.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Povećanje nivoa relativne ekspresije detektovano je u spermatozoidima strisiranih životinja sa različitim periodima oporavka u svim vremenskim tačkama: u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT3 (1.9x) u odnosu na ZT3-kontrolu; u grupi 1x3hIMO+R u vremenskoj tački ZT11 (2.0x) u odnosu na ZT11-kontrolu i (2.0x) u odnosu na ZT3-kontrolu; u grupi 1x3hIMO+R u vremenskoj tački ZT23 (7.2x) u odnosu na ZT23 kontrolu i (2.6x) u odnosu na ZT3-kontrolu.

Relativna ekspresija markera *Mapk3* smanjena je u spermatozoidima kontrolnih životinja ZT23 vremenske tačke (2.3x) u odnosu na ZT3-kontrolu, ali je povećana u spermatozoidima grupe 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23 (4.1x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (1.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Analizom rezultata primećuje se sličan transkripcioni profil i *Mapk6* markera. Smanjenje nivoa *Mapk6* detektovano je u spermatozoidima kontrolnih životinja ZT23 vremenske tačke (2.4x) u odnosu na ZT3 kontrolu. Statistički značajno povećanje nivoa ekspresije detektovano je u spermatozoidima stresiranih životinja u svim vremenskim tačkama oporavka: u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT3 (1.6x) u odnosu na ZT3-kontrolu; u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT11 (2.8x) u odnosu na ZT11-kontrolu i (1.8x) u odnosu na ZT3-kontrolu; u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23 (5.6x) u odnosu na ZT23-kontrolu i (2.3x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Transkripcioni profil *Mapk8* sličan je profilu ekspresije *Mapk1* i *Mapk6*, ali efekat izostaje kod ZT17 vremenske tačke. Smanjen nivo ekspresije *Mapk8* transkripta evidentan je u spermatozoidima kontrolnih uzoraka ZT23 vremenske tačke (2.5x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Statistički značajno povećanje ekspresije navedenog transkripta u spermatozoidima detektovano je u: grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT3 (1.4x) u odnosu na ZT3-kontrolu; grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT11 (1.5x) u odnosu na ZT11-kontrolu; grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23 (4.9x) u odnosu na ZT23-kontrolu kao i (1.9x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Nivo ekspresije *Mapk9* transkripta povećan je u spermatozoidima stresiranih pacova sa periodom oporavka od 20 sati (1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23) 3x u odnosu na odgovarajuću kontrolu (ZT23-kontrolu) kao i 1.9x u odnosu na kontrolne uzorke vremenske tačke ZT3. Relativna ekspresija *Mapk11* transkripta povećana je u spermatozoidima stresiranih životinja sa periodom oporavka od 14 i 20 sati: u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT17 (1.5x) u odnosu na ZT3-kontrolu, i u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23 (2.1x) u odnosu na ZT23-kontrolu. Dalje, analizom relativne ekspresije *Mapk12* transkripta rezultati pokazuju da je nivo ekspresije ovog transkripta u spermatozoidima kontrolnih životinja vremenske tačke ZT23 značajno povećan (3.3x) u odnosu na ZT3-kontrolne uzorke. U spermatozoidima stresiranih životinja detektovano je povećanje nivoa ekspresije ovog transkripta u vremenskoj tački ZT11 (ZT11-1x3hIMO+R) u odnosu na ZT11-kontrolu (2.0x) i u odnosu na ZT3-kontrolu (1.8x). Takođe, povećanje nivoa transkripcije *Mapk12* detektovano je u spermatozoidima stresiranih pacova sa periodom oporavka od 20 sati (ZT23-1x3hIMO+R) u odnosu na ZT23-kontrolu (7.7x) kao i u odnosu na ZT3-kontrolu (2.5x). Relativna ekspresija transkripta *Mapk13* značajno je smanjena u spermatozoidima kontrolnih životinja vremenske tačke ZT23 (2.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu. Suprotno tome, značajno povećanje detektovano je u spermatozoidima stresiranih životinja sa različitim periodom oporavka: u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT11 (1.7x) u odnosu na ZT11-kontrolu, kao i (1.6x) u odnosu na ZT3 kontrolu; u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT17 (1.7x) u odnosu na ZT17-kontrolu; u grupi 1x3hIMO+R vremenske tačke ZT23 (3.4x) u odnosu na ZT23-kontrolu. Analiza relativne ekspresije *Mapk14* markera značajno je promenjena samo u vremenskoj tački ZT23: smanjenje nivoa ekspresije u spermatozoidima kontrolnih životinja (2.1x) u odnosu na ZT3-kontrolu, ali povećanje nivoa ekspresije u spermatozoidima stresiranih životinja (1x3hIMO+R) 20 sati nakon izlaganja stresu (4.3x) u odnosu na ZT23-kontrolu kao i (2.1x) u odnosu na ZT3-kontrolu.

## Markeri MAPK signalnog puta



**Slika 5.2.8. Transkripcioni profili signalnih molekula MAPK signalnog puta promjenjeni su u spermatozoidima akutno stresiranih pacova sa različitim periodom oporavka.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i stresiranih životinja (1x3hIMO+R), i korišćena je za analizu transkripcionih profila signalnih molekula MAPK signalnog puta. Dobijene vrednosti su prikazane tačkama i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna eksperimenata. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke; # u odnosu na kontrolnu grupu ZT3 vremenske tačke.

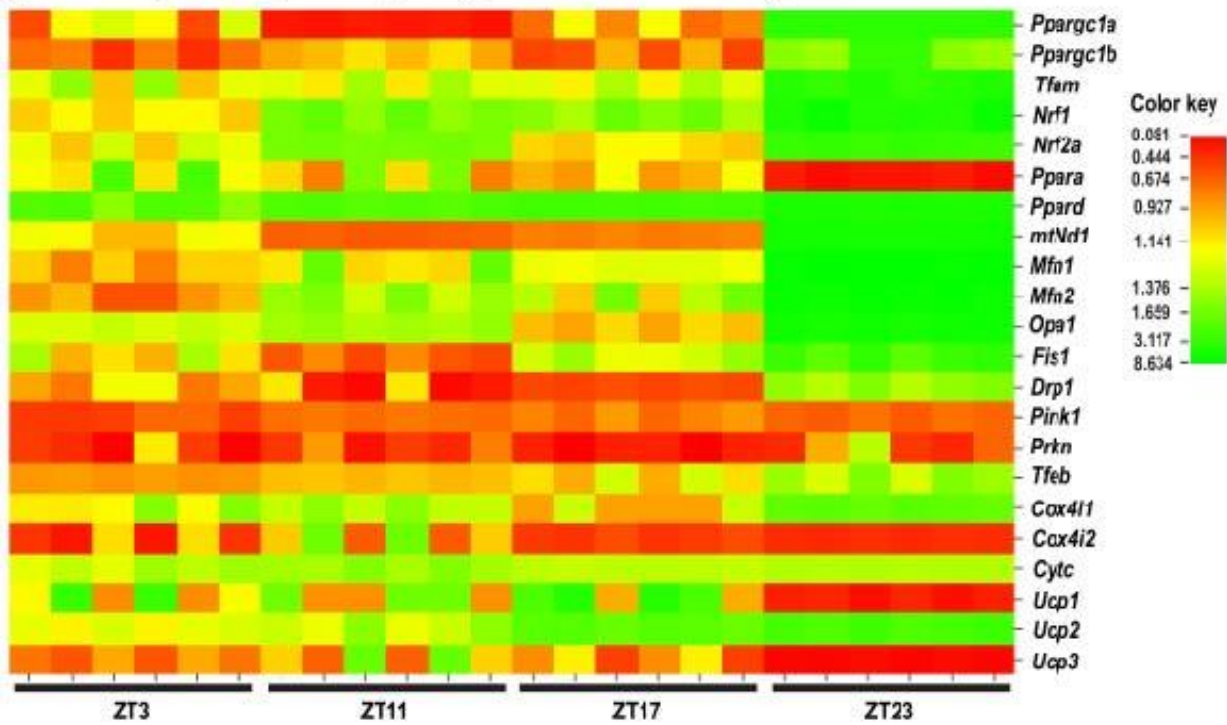
**Tabela 5.2.1. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti i signalnih molekula koji regulišu dinamiku i funkcionalnost mitohondrija, kao i broj i funkcionalnost spermatozoida značajno su promenjeni u spermatozoidima akutno stresiranih pacova sa različitim periodima oporavka.**

Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM vrednosti tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost na nivou  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu; # naspram 1k3hIMO grupe.

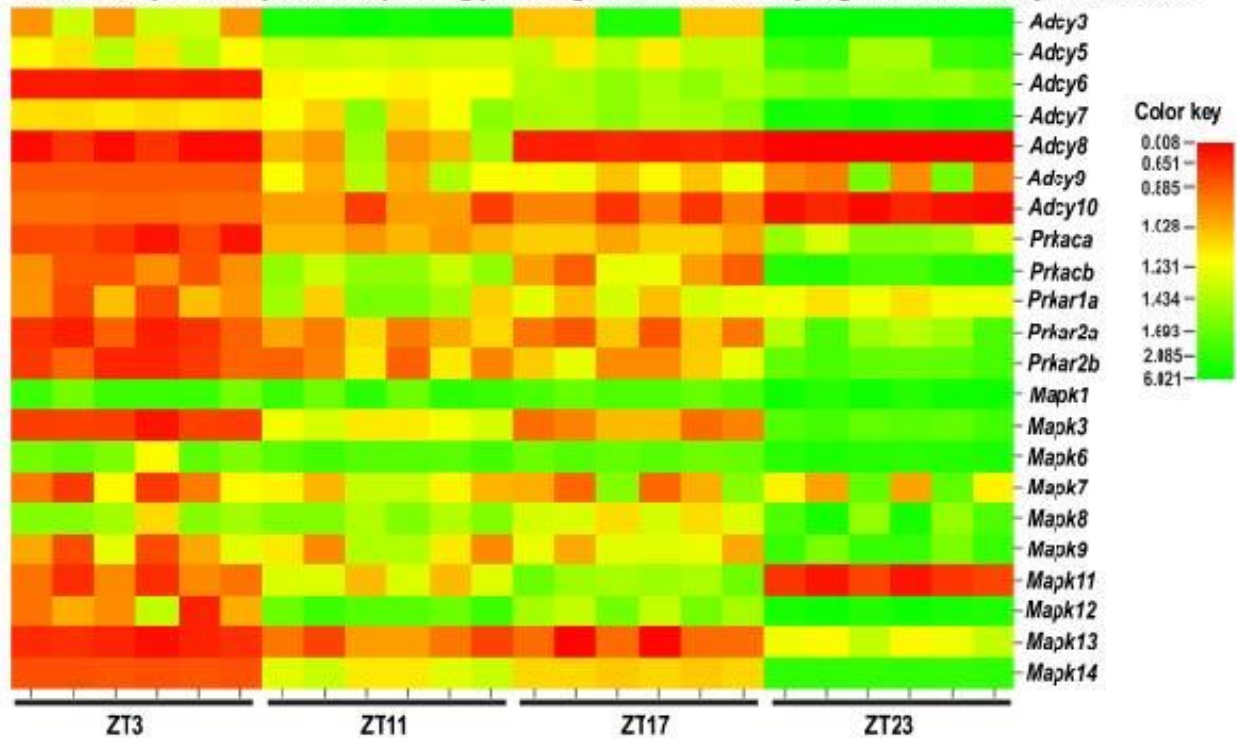
Transkript	Groupa	Vremenske tačke							
		ZT3		ZT11		ZT17		ZT23	
		Kontrola	1x3hIMO	Kontrola	1x3hIMO	Kontrola	1x3hIMO	Kontrola	1x3hIMO
<i>Ppargc1a</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.0 $\pm$ 0.20	2.6 <sup>#</sup> $\pm$ 0.54 $\uparrow$	0.5* $\pm$ 0.14 $\downarrow$	2.9 <sup>#</sup> $\pm$ 0.82 $\uparrow$	2.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.59 $\uparrow$	0.5 <sup>#</sup> $\pm$ 0.18 $\downarrow$	1.7* $\pm$ 0.65 $\uparrow$	
<i>Ppargc1b</i>	1.0 $\pm$ 0.11	0.6 $\pm$ 0.11	0.8 $\pm$ 0.01	0.8 $\pm$ 0.05	1.7 <sup>#</sup> $\pm$ 0.32 $\uparrow$	1.2 $\pm$ 0.07	0.8 $\pm$ 0.13	1.4* $\pm$ 0.03 $\uparrow$	
<i>Tfam</i>	1.0 $\pm$ 0.10	1.2 $\pm$ 0.13	1.0 $\pm$ 0.05	1.3 $\pm$ 0.02	1.0 $\pm$ 0.04	1.3 $\pm$ 0.01	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.05 $\downarrow$	1.6* <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\uparrow$	
<i>Nrf1</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.1 $\pm$ 0.02	1.1 $\pm$ 0.04	1.7* <sup>#</sup> $\pm$ 0.18 $\uparrow$	0.8 $\pm$ 0.07	1.3* $\pm$ 0.03 $\uparrow$	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\downarrow$	2.0* <sup>#</sup> $\pm$ 0.12 $\uparrow$	
<i>Nrf2a</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.2 $\pm$ 0.07	1.1 $\pm$ 0.05	1.8* <sup>#</sup> $\pm$ 0.10 $\uparrow$	1.2 $\pm$ 0.09	1.4 $\pm$ 0.06	0.7 $\pm$ 0.03	1.9* <sup>#</sup> $\pm$ 0.12 $\uparrow$	
<i>Ppara</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.4 $\pm$ 0.29	1.8 <sup>#</sup> $\pm$ 0.32 $\uparrow$	2.0 <sup>#</sup> $\pm$ 0.16 $\uparrow$	2.5 <sup>#</sup> $\pm$ 0.17 $\uparrow$	2.5 <sup>#</sup> $\pm$ 0.10 $\uparrow$	2.8 <sup>#</sup> $\pm$ 0.36 $\uparrow$	0.5* <sup>#</sup> $\pm$ 0.08 $\downarrow$	
<i>Ppard</i>	1.0 $\pm$ 0.12	1.8* <sup>#</sup> $\pm$ 0.14 $\uparrow$	0.8 $\pm$ 0.04	1.6* <sup>#</sup> $\pm$ 0.03 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.02	2.1* <sup>#</sup> $\pm$ 0.00 $\uparrow$	0.5 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\downarrow$	2.3* <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\uparrow$	
<i>mtNd1</i>	1.0 $\pm$ 0.12	1.1 $\pm$ 0.06	1.6 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01	1.1* $\pm$ 0.02 $\downarrow$	1.9 <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\uparrow$	1.5 <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\uparrow$	0.2 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\downarrow$	1.1* $\pm$ 0.03 $\uparrow$	
<i>Mfn1</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.0 $\pm$ 0.11	0.9 $\pm$ 0.06	1.2 $\pm$ 0.15	1.0 $\pm$ 0.15	1.3 $\pm$ 0.16	0.3 <sup>#</sup> $\pm$ 0.02 $\downarrow$	2.1* <sup>#</sup> $\pm$ 0.12 $\uparrow$	
<i>Mfn2</i>	1.0 $\pm$ 0.11	0.8 $\pm$ 0.11	0.7 $\pm$ 0.02	0.9 $\pm$ 0.09	0.7 $\pm$ 0.11	0.9 $\pm$ 0.03	0.2 <sup>#</sup> $\pm$ 0.03 $\downarrow$	1.5* <sup>#</sup> $\pm$ 0.10 $\uparrow$	
<i>Opa1</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.3 $\pm$ 0.01	0.8 $\pm$ 0.05	1.2 $\pm$ 0.05	1.1 $\pm$ 0.01	1.1 $\pm$ 0.06	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.02 $\downarrow$	1.9* <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\uparrow$	
<i>Fis1</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.2 $\pm$ 0.12	0.8 $\pm$ 0.10	0.7 $\pm$ 0.06	1.9 <sup>#</sup> $\pm$ 0.06 $\uparrow$	1.3* $\pm$ 0.06 $\uparrow$	1.3 $\pm$ 0.10	2.4* <sup>#</sup> $\pm$ 0.39 $\uparrow$	
<i>Drp1</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.0 $\pm$ 0.13	1.4 $\pm$ 0.04	0.5* $\pm$ 0.32 $\downarrow$	1.1 $\pm$ 0.01	0.6* $\pm$ 0.02 $\downarrow$	1.3 $\pm$ 0.03	1.5 $\pm$ 0.07	
<i>Prkn</i>	1.0 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.22	0.65 $\pm$ 0.15	0.6 $\pm$ 0.10	0.3 <sup>#</sup> $\pm$ 0.09 $\downarrow$	0.2 <sup>#</sup> $\pm$ 0.05 $\downarrow$	0.5 $\pm$ 0.12	0.7 $\pm$ 0.16	
<i>Cox4i1</i>	1.0 $\pm$ 0.12	1.3 $\pm$ 0.10	1.4 $\pm$ 0.07	1.4 $\pm$ 0.07	1.2 $\pm$ 0.10	1.0 $\pm$ 0.12	0.3 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\downarrow$	1.8* <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\uparrow$	
<i>Cox4i2</i>	1.0 $\pm$ 0.12	0.6 $\pm$ 0.27	1.8 $\pm$ 0.45	1.2 $\pm$ 0.31	0.8 $\pm$ 0.01	0.5* <sup>#</sup> $\pm$ 0.05 $\downarrow$	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.03 $\downarrow$	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.02 $\downarrow$	
<i>Cytc</i>	1.0 $\pm$ 0.12	1.3 $\pm$ 0.05	1.2 $\pm$ 0.04	1.4 $\pm$ 0.05	1.2 $\pm$ 0.02	1.3 $\pm$ 0.01	0.7 $\pm$ 0.01	1.4* $\pm$ 0.01 $\uparrow$	
<i>Ucp1</i>	1.0 $\pm$ 0.12	1.4 $\pm$ 0.47	2.1 $\pm$ 0.59	1.2 $\pm$ 0.42	2.5 <sup>#</sup> $\pm$ 0.48 $\uparrow$	2.3 <sup>#</sup> $\pm$ 0.88 $\uparrow$	2.1 <sup>#</sup> $\pm$ 0.71 $\uparrow$	0.2* <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\downarrow$	
<i>Ucp2</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.2 $\pm$ 0.03	1.1 $\pm$ 0.04	1.3 $\pm$ 0.09	1.8 <sup>#</sup> $\pm$ 0.02 $\uparrow$	1.8 <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\uparrow$	0.6 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\downarrow$	2.1* <sup>#</sup> $\pm$ 0.07 $\uparrow$	
<i>Ucp3</i>	1.0 $\pm$ 0.11	0.8 $\pm$ 0.09	1.6 <sup>#</sup> $\pm$ 0.21 $\uparrow$	1.2 $\pm$ 0.31	1.0 $\pm$ 0.31	1.0 $\pm$ 0.15	2.7 <sup>#</sup> $\pm$ 0.19 $\uparrow$	0.1* <sup>#</sup> $\pm$ 0.02 $\downarrow$	
<i>Adcy3</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.1 $\pm$ 0.12	2.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.13 $\uparrow$	2.8 <sup>#</sup> $\pm$ 0.27 $\uparrow$	0.9 $\pm$ 0.20	1.5* $\pm$ 0.43 $\uparrow$	1.1 $\pm$ 0.18	4.5* <sup>#</sup> $\pm$ 0.77 $\uparrow$	
<i>Adcy5</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.3 $\pm$ 0.07	1.0 $\pm$ 0.09	1.3 $\pm$ 0.01	0.8 $\pm$ 0.09	1.3 $\pm$ 0.07	1.0 $\pm$ 0.22	1.8 $\pm$ 0.18	
<i>Adcy6</i>	1.0 $\pm$ 0.11	0.5 $\pm$ 0.01	1.7 <sup>#</sup> $\pm$ 0.16 $\uparrow$	1.2 $\pm$ 0.01	1.4 $\pm$ 0.07	1.5 $\pm$ 0.05	0.6 $\pm$ 0.01	1.6* <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\uparrow$	
<i>Adcy7</i>	1.0 $\pm$ 0.10	1.2 $\pm$ 0.01	0.7 $\pm$ 0.07 $\uparrow$	1.3* $\pm$ 0.14 $\uparrow$	0.8 $\pm$ 0.18	1.5* $\pm$ 0.05 $\uparrow$	0.6 <sup>#</sup> $\pm$ 0.03 $\downarrow$	2.7* <sup>#</sup> $\pm$ 0.13 $\uparrow$	
<i>Adcy8</i>	1.0 $\pm$ 0.11	0.4* $\pm$ 0.13 $\downarrow$	1.1 $\pm$ 0.14	1.2 $\pm$ 0.16	1.4 $\pm$ 0.10	0.6* <sup>#</sup> $\pm$ 0.03 $\downarrow$	1.7 <sup>#</sup> $\pm$ 0.14 $\uparrow$	0.01* <sup>#</sup> $\pm$ 0.0 $\downarrow$	
<i>Adcy10</i>	1.0 $\pm$ 0.12	0.9 $\pm$ 0.01	1.4 $\pm$ 0.13	0.9* $\pm$ 0.08 $\downarrow$	1.3 $\pm$ 0.15	0.9* $\pm$ 0.08 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.22	0.4* <sup>#</sup> $\pm$ 0.14 $\downarrow$	
<i>Prkaca</i>	1.0 $\pm$ 0.11	0.7 $\pm$ 0.10	1.3 $\pm$ 0.08	1.0 $\pm$ 0.01	1.2 $\pm$ 0.09	1.1 $\pm$ 0.03	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.03 $\downarrow$	1.5* <sup>#</sup> $\pm$ 0.09 $\uparrow$	
<i>Prkacb</i>	1.0 $\pm$ 0.18	0.9 $\pm$ 0.07	1.3 $\pm$ 0.06	1.5 $\pm$ 0.07	1.0 $\pm$ 0.03	1.0 $\pm$ 0.12	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\downarrow$	2.2* <sup>#</sup> $\pm$ 0.2 $\uparrow$	
<i>Prkar1a</i>	1.0 $\pm$ 0.10	1.0 $\pm$ 0.08	0.9 $\pm$ 0.04	1.4* $\pm$ 0.16 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.06	1.2 $\pm$ 0.09	0.3 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\downarrow$	1.2* $\pm$ 0.02 $\uparrow$	
<i>Prkar2a</i>	1.0 $\pm$ 0.13	0.7 $\pm$ 0.09	1.1 $\pm$ 0.09	1.0 $\pm$ 0.06	0.9 $\pm$ 0.07	0.9 $\pm$ 0.07	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.05 $\downarrow$	1.6* <sup>#</sup> $\pm$ 0.14 $\uparrow$	
<i>Prkar2b</i>	1.0 $\pm$ 0.09	0.7 $\pm$ 0.07	1.2 $\pm$ 0.10	1.0 $\pm$ 0.09	0.9 $\pm$ 0.01	1.1 $\pm$ 0.09	0.5 <sup>#</sup> $\pm$ 0.06 $\downarrow$	1.8* <sup>#</sup> $\pm$ 0.05 $\uparrow$	
<i>Mapk1</i>	1.0 $\pm$ 0.07	1.9* <sup>#</sup> $\pm$ 0.11 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.06	2.0* <sup>#</sup> $\pm$ 0.15 $\uparrow$	1.2 $\pm$ 0.11	1.8* <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\uparrow$	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\downarrow$	2.6* <sup>#</sup> $\pm$ 0.16 $\uparrow$	
<i>Mapk3</i>	1.0 $\pm$ 0.10	0.7 $\pm$ 0.07	1.1 $\pm$ 0.03	1.2 $\pm$ 0.04	1.1 $\pm$ 0.04	1.0 $\pm$ 0.04	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.06 $\downarrow$	1.8* <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\uparrow$	
<i>Mapk6</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.6* <sup>#</sup> $\pm$ 0.13 $\uparrow$	0.6 $\pm$ 0.02	1.8* <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\uparrow$	0.8 $\pm$ 0.05	1.7* <sup>#</sup> $\pm$ 0.03 $\uparrow$	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\downarrow$	2.3* <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\uparrow$	
<i>Mapk8</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.4* <sup>#</sup> $\pm$ 0.11 $\uparrow$	1.2 $\pm$ 0.07	1.5 <sup>#</sup> $\pm$ 0.07 $\uparrow$	1.1 $\pm$ 0.04	1.3 $\pm$ 0.05	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.05 $\downarrow$	1.9* <sup>#</sup> $\pm$ 0.29 $\uparrow$	
<i>Mapk9</i>	1.0 $\pm$ 0.17	1.0 $\pm$ 0.13	1.1 $\pm$ 0.05	1.2 $\pm$ 0.13	1.0 $\pm$ 0.05	1.2 $\pm$ 0.08	0.6 $\pm$ 0.05	1.9* <sup>#</sup> $\pm$ 0.14 $\uparrow$	
<i>Mapk11</i>	1.0 $\pm$ 0.10	0.8 $\pm$ 0.09	1.3 $\pm$ 0.03	1.2 $\pm$ 0.09	1.2 $\pm$ 0.14	1.5 <sup>#</sup> $\pm$ 0.07 $\uparrow$	1.4 $\pm$ 0.12	0.7* $\pm$ 0.10 $\downarrow$	
<i>Mapk12</i>	1.0 $\pm$ 0.11	1.0 $\pm$ 0.12	0.9 $\pm$ 0.07	1.8* <sup>#</sup> $\pm$ 0.09 $\uparrow$	1.2 $\pm$ 0.03	1.4 $\pm$ 0.09	0.3 <sup>#</sup> $\pm$ 0.04 $\downarrow$	2.5* <sup>#</sup> $\pm$ 0.15 $\uparrow$	
<i>Mapk13</i>	1.0 $\pm$ 0.11	0.6 $\pm$ 0.07	1.6 <sup>#</sup> $\pm$ 0.16 $\uparrow$	0.9* $\pm$ 0.06 $\downarrow$	1.3 $\pm$ 0.12	0.6* $\pm$ 0.29 $\downarrow$	0.4 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\downarrow$	1.3* $\pm$ 0.05 $\uparrow$	
<i>Mapk14</i>	1.0 $\pm$ 0.12	0.8 $\pm$ 0.01	1.0 $\pm$ 0.02	1.3 $\pm$ 0.05	1.1 $\pm$ 0.01	1.1 $\pm$ 0.01	0.5 <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\downarrow$	2.1* <sup>#</sup> $\pm$ 0.01 $\uparrow$	



**A** Analiza toplotne mape transkripcionog profila markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti



**B** Analiza toplotne mape transkripcionog profila signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku



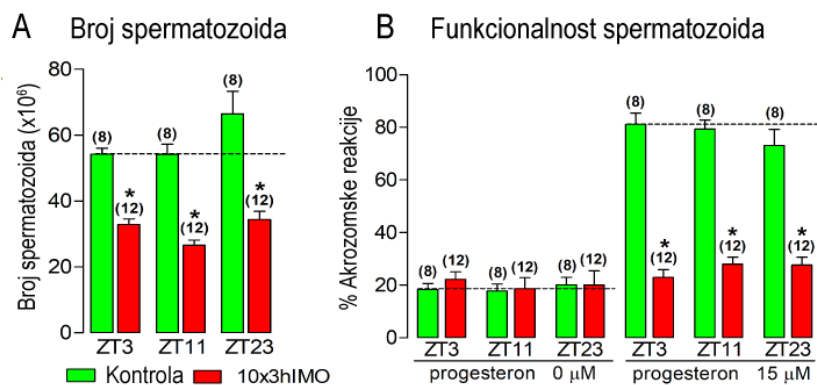
**Slika 5.2.9.** Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti (A) i signalnih molekula koji regulišu dinamiku i funkcionalnost mitohondrija (B) u spermatozoidima akutno stresiranih pacova sa različitim periodom oporavka.

### 5.3. Karakterizacija molekularnih profila mitohondrijalne dinamike koji se razvijaju kao mehanizam adaptacije spermatozoida tokom ponavljalog stresa organizma u različitim cirkadijalnim vremenima

Da bismo ispitali povezanost između ponavljalog imobilizacionog stresa u različitim vremenskim tačkama u toku 24 časa i muškog (in/sub)fertiliteta, dizajniran je eksperimentalni model imobilizacionog stresa u trajanju od 3 sata tokom 10 uzastopnih dana. U okviru navedenog eksperimentalnog modela korišćeni su adultni mužjaci pacova koji su tokom deset uzastopnih dana izlagani psihofizičkom stresu imobilizacijom u trajanju od 3 sata. Životinje su izlagane ponavljalom stresu u periodima od ZT0 do ZT3, od ZT8 do ZT11 i od ZT20 do ZT23. ZT0 označava vreme kada se pali svetlo u gajilištu, dok se svetlo nakon dnevnog perioda u gajilištu gasilo u ZT14. Nakon isteka imobilizacionog perioda desetog dana eksperimenta, životinje su žrtvovane brzom dekapitacijom u vremenskim tačkama ZT3, ZT11 i ZT23. Izolacija spermatozoida rađena je iz kaudalnog dela epididimisa, određen je broj spermatozoida kao i funkcionalnost spermatozoida, dok je ostatak ćelija zamrznut na -80 °C radi izolacije RNK i praćenja relativne ekspresije transkriptata i proteina.

#### 5.3.1. Ponavljani imobilizacioni stres u različitim periodima u toku 24 sata smanjuje broj i funkcionalnost spermatozoida

Rezultati pokazuju da je ponavljani imobilizacioni stres (10x3hIMO) smanjio broj i funkcionalnost spermatozoida u svim ispitivanim vremenskim tačkama. Broj izolovanih kaudalnih spermatozoida (Slika 5.3.1.A) smanjen je kod pacova izolovanih 10x3hIMO stresu u svim ZT vremenskim tačkama: ZT3-10x3hIMO (1.7x), ZT11-10x3hIMO (2.0x) kao i ZT23-10x3hIMO (1.9x), u odnosu na odgovarajuću ZT-kontrolu. Takođe, rezultati pokazuju da je funkcionalnost spermatozoida smanjena u svim eksperimentalnim grupama: ZT3-10x3hIMO (3.5x), ZT11-10x3hIMO (2.8x) i ZT23-10x3hIMO (2.7x) u odnosu na odgovarajuću kontrolu svake vremenske tačke (Slika 5.3.1.B).



**Slika 5.3.1. Ponavljani psihofizički stres u različitim periodima u toku 24 sata smanjuje broj i funkcionalnost spermatozoida.**

Broj spermatozoida izolovan iz kaudalnog epididimisa nestresiranih životinja (kontrola) i 10x3hIMO pacova (B). Funkcionalnost spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) izolovanih iz kontrolnih i akutno stresiranih životinja (B). Kapacitirani spermatozoidi

stimulisani su progesteronom (PROG 15 μM) paralelno sa kapacitiranim spermatozoidima koji nisu stimulisani progesteronom (PROG 0 μM). Plavo bojenje u regionu akrozoma u glavenom delu spermatozoida ukazuje na intaktan akrozom, dok su spermatozoidi bez plavog bojenja u regionu akrozoma smatrani za akrozom-reaktivne spermatozoide tj. spermatozoide koji su prošli akrozomsku reakciju. Skala na fotografijama je 30 μm. Normalizovane vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje ± SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo P <0,05: \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke.

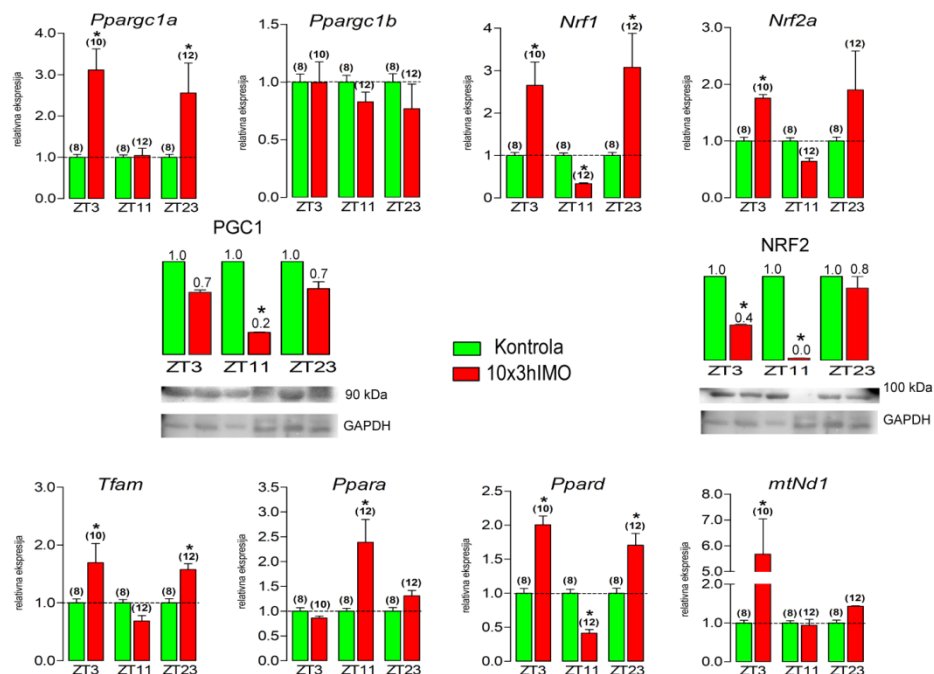
### 5.3.2. Ponavljani imobilizacioni stres u različitim periodima u toku 24 sata remeti transkripcione profile markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima

Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima poremećeni su nakon 10x3hIMO stresa obzirom da je transkripcioni nivo 20 od 22 ispitivana markera (90.9%) promenjen (Slika 5.3.2., Slika 5.3.3., Slika 5.3.4., Slika 5.3.5., Slika 5.3.6, Tabela 5.3.1, Slika 5.3.9.A).

Analiza dobijenih rezultata pokazala je da je 7 od 8 ispitivanih markera (87.5%) mitohondrijalne biogeneze promenjeno u spermatozoidima 10x3hIMO grupe (Slika 5.3.2). Nivo ekspresije gena koji kodira PGC1 (*Ppargc1a*), dobro poznati master regulator uključen u transkripcionu kontrolu procesa mitohondrijalne homeostaze i integrator signala iz spoljašnje sredine (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015), poremećen je ponavljanim imobilizacionim stresom. Rezultati pokazuju da je nivo transkripcije *Ppargc1a* povećan u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenskih tačaka ZT3 (3.1x) i ZT23 (2.6x) u odnosu na spermatozoide neuznemiravanih (kontrolnih) životinja odgovarajuće vremenske tačke. Sa druge strane ponavljani imobilizacioni stres ZT11 vremenske tačke nije promenio nivo ekspresije ovog transkripta u spermatozoidima, u odnosu na ZT11-kontrolu, ali je promenio nivo ekspresije proteina PGC1 u istim uzorcima. Takođe, nivo ekspresije *Ppargc1b* nije promenjen u spermatozoidima nakon 10x3hIMO stresa ni u jednoj vremenskoj tački, u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Nivo ekspresije *Tfam* markera mitohondrijalne biogeneze smanjen je u vremenskim tačkama ZT3 i ZT23: u grupi 10x3hIMO smanjenje je 1.7x u odnosu na ZT3-kontrolu, dok je u grupi 10x3hIMO vremenske tačke ZT23 smanjenje 1.6x u odnosu na ZT23-kontrolu. Rezultati pokazuju da je ekspresija transkripta *Nrf1* povećana u ZT3-10x3hIMO grupi (2.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu, kao i u ZT23-10x3hIMO grupi (3.1x) u odnosu na ZT23-kontrolu, dok je ekspresija smanjena u ZT11-10x3hIMO grupi (3.0x) u odnosu na ZT11-kontrolu. Sličan obrazac transkripcije primećen je i na nivou relativne ekspresije *Nrf2a* transkripta. Ponavljani imobilizacioni stres (10x3hIMO) povećao je nivo ekspresije *Nrf2a* u spermatozoidima ZT3 vremenske tačke (1.8x) u odnosu na odgovarajuću kontrolu, dok je smanjio nivo ekspresije NRF2 proteina u istim uzorcima spermatozoida. Takođe, 10x3hIMO povećao je nivo ekspresije *Nrf2a* i u spermatozoidima ZT23 vremenske tačke (1.9x) u odnosu na ZT23-kontrolu. Suprotno, u spermatozoidima 10x3hIMO grupe ZT11 vremenske tačke, *Nrf2a* transkripcija je smanjena 1.6x dok je nivo ekspresije NRF2 proteina takođe dramatično smanjen u odnosu na odgovarajuću (ZT11) kontrolu. Transkripcioni profil *Ppara* markera povećan je samo u spermatozoidima grupe 10x3hIMO u vremenskoj tački ZT11 (2.4x), dok je u ZT3-10x3hIMO i ZT23-10x3hIMO grupama ostao nepromenjen u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Relativna ekspresija *Ppard* transkripta povećana je u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT3 (2.0x) i vremenske tačke ZT23 (1.7x), dok je u grupi ZT11-10x3hIMO nivo ekspresije ovog markera smanjen (2.4x) u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Nivo ekspresije *mtNdl* transkripta povećan je samo u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT3 (5.7x), dok je u ostalim vremenskim tačkama nivo ekspresije ovog transkripta na nivou njegove ekspresije u spermatozoidima kontrolnih životinja odgovarajuće vremenske tačke.



### Markeri mitohondrijalne biogeneze

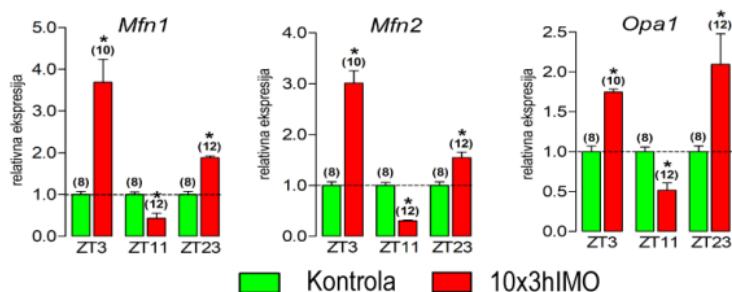


**Slika 5.3.2. Transkripcijski profili markera mitohondrijalne biogeneze značajno su promenjeni u spermatozoidima adultnih mužjaka ponavljano stresiranih imobilizacionim stresom u različitim periodima u toku dana.**

RNA je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i ponavljano stresiranih životinja (10x3hIMO) u različitim periodima u toku dana (ZT0-ZT3, ZT08- ZT11, ZT20-ZT23), i korišćena je za analizu ekspresionih profila transkriptata i proteina markera mitohondrijalne biogeneze. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje ± SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke.

Analiza relativne ekspresije transkriptata za molekularne markere mitohondrijalne fuzije i arhitekture pokazala je da ponavljani stres menja 3 od 3 ispitivana markera (100%) u spermatozoidima (Slika 5.3.3.). Nivo ekspresije *Mfn1* transkripta značajno je povećan u spermatozoidima izolovanim iz ponavljano stresiranih životinja vremenske tačke ZT3 (3.7x) kao i vremenske tačke ZT23 (1.9x), dok je u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT11 nivo ovog transkripta statistički značajno smanjen (2.3x) u odnosu na odgovarajuće kontrolne uzorke. Sličan obrazac ekspresije detekovan je i na nivou ekspresije *Mfn2*. Povećanje nivoa ekspresije *Mfn2* detektovano je u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT3 (3.0x) kao i u istoj (10x3hIMO) grupi vremenske tačke ZT23 (1.5x) u odnosu na njihovu odgovarajuću kontrolu. Suprotno tome, smanjenje relativne ekspresije *Mfn2* detektovano je u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT11 (3.3x) u odnosu na ZT11-kontrolu. Dalje, isti obrazac ekspresije detektovan je i na nivou *Opal* transkripta. Povećanje nivoa ekspresije *Opal* detektovano je u grupi 10x3hIMO vremenske tačke ZT3 (1.7x) i ZT23 (2.1x), dok je smanjenje relativne ekspresije ovog transkripta detektovano u grupi 10x3hIMO u vremenskoj tački ZT11 (1.9x), u odnosu na odgovarajuću ZT-kontrolu.

### Markeri mitohondrijalne fuzije i arhitekture

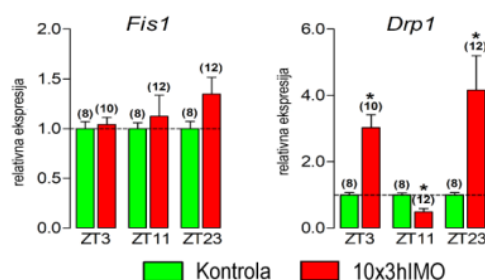


**Slika 5.3.3. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture značajno su promenjeni u spermatozoidima adultnih mužjaka ponavljano stresiranih imobilizacionim stresom u različitim periodima u toku dana.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i ponavljano stresiranih životinja (10x3hIMO) u različitim periodima u toku dana (ZT0-ZT3, ZT08- ZT11, ZT20-ZT23), i korišćena je za analizu ekspresionih profila transkripata markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke.

Relativna ekspresija transkripata za markere mitohondrijalne fisije ispitivana je na nivou 2 molekularna markera, kod kojih ponavljani stres menja nivo ekspresije jednog od dva ispitivana markera (50%). Relativna ekspresija *Drp1* značajno je promenjena u spermatozoidima ponavljano stresiranih životinja, dok nivo ekspresije *Fis1* u istim uzorcima ostaje nepromenjen (Slika 5.3.4). Detaljnije, transkripcioni nivo *Drp1* značajno je povećan u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT3 (3.0x) i vremenske tačke ZT23 (4.2x), dok je relativna ekspresija ovog markera u spermatozoidima smanjena u 10x3hIMO grupi vremenske tačke ZT11, u odnosu na odgovarajuću ZT-kontrolu.

### Markeri mitohondrijalne fisije

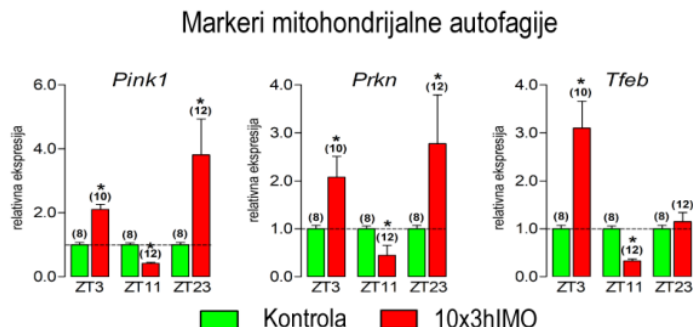


**Slika 5.3.4. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne fisije značajno su promenjeni u spermatozoidima adultnih mužjaka ponavljano stresiranih imobilizacionim stresom u različitim periodima u toku dana.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i ponavljano stresiranih životinja (10x3hIMO) u različitim periodima u toku dana (ZT0-ZT3, ZT08- ZT11, ZT20-ZT23), i korišćena je za analizu ekspresionih profila transkripata markera mitohondrijalne fisije. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke.

Rezultati pokazuju da ponavljani psihofizički stres u trajanju od 3 sata u različitim periodima (ZT0-ZT3, ZT08-ZT11 i ZT20-ZT23) remeti 3 od 3 ispitivana markera (100%) mitohondrijalne

autofagije u spermatozoidima (Slika 5.3.5.). Nivo ekspresije *Pink1* transkripta statistički je značajno povećan u spermatozoidima stresiranih pacova (10x3hIMO) vremenskih tačaka ZT3 (2.1x) i ZT23 (3.8x), dok je nivo u istoj eksperimentalnoj grupi 10x3hIMO vremenske tačke ZT11 značajno smanjen (2.4x) u odnosu na odgovarajuću ZT-kontrolu. Isti obrazac ekspresije detektovan je i za *Prkn* transkript, gde je nivo ovog transkripta statistički značajno povećan u spermatozoidima stresiranih životinja (10x3hIMO) vremenskih tačaka ZT3 (2.1x) i ZT23 (2.8x), dok je u vremenskoj tački ZT11 iste eksperimentalne grupe (10x3hIMO) nivo ovog transkripta značajno smanjen (2.2x) u odnosu na odgovarajuću ZT-kontrolu. Nivo ekspresije transkripta *Tfeb* povećan je u 10x3hIMO grupi vremenske tačke ZT3 (3.1x) dok je u istoj grupi vremenske tačke ZT11 nivo ovog transkripta značajno smanjen (3.0x) u odnosu na odgovarajuću ZT-kontrolu.

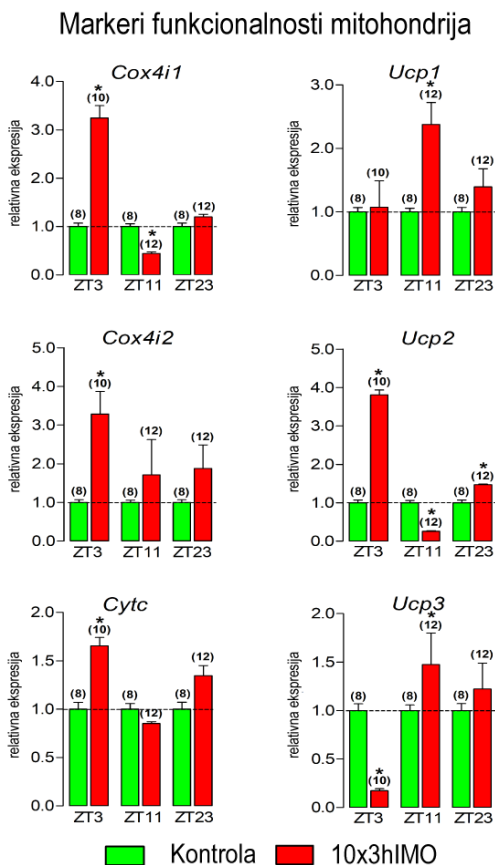


**Slika 5.3.5. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne autofagije značajno su promenjeni u spermatozoidima adultnih mužjaka ponavljano stresiranih imobilizacionim stresom u različitim periodima u toku dana.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i ponavljano stresiranih životinja (10x3hIMO) u različitim periodima u toku dana (ZT0-ZT3, ZT08- ZT11, ZT20-ZT23), i korišćena je za analizu ekspresionih profila transkripta markera mitohondrijalne autofagije. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke.

Relativna ekspresija transkripta za molekularne markere mitohondrijalne funkcionalnosti ispitivana je u spermatozoidima ponavljano stresiranih životinja u različitim periodima u toku dana. Rezultati pokazuju da je nivo ekspresije 6 od 6 ispitivanih markera (100%) izmenjen (Slika 5.3.6). Nivo ekspresije *Cox4i1* transkripta statistički je značajno povećan u 10x3hIMO grupi vremenske tačke ZT3 (3.2x), dok je nivo ekspresije u 10x3hIMO grupi vremenske tačke ZT11 značajno smanjen, u odnosu na odgovarajuću ZT-kontrolu. Sa druge strane, nivo ekspresije navedenog transkripta nije promenjen u spermatozoidima stresiranih životinja (10x3hIMO) u vremenskoj tački ZT23. Nivo ekspresije transkripta *Cox4i2* statistički je značajno povećan u spermatozoidima 10x3hIMO grupe u svim ispitivanim vremenskim tačkama, u odnosu na odgovarajuću ZT-kontrolu: ZT3-10x3hIMO (3.3x), ZT11-10x3hIMO (1.7x), ZT23-10x3hIMO (1.9x). Sa druge strane, nivo ekspresije transkripta *Cytc* statistički je značajno povećan samo u eksperimentalnoj (10x3hIMO) grupi vremenske tačke ZT3 (1.7x) u odnosu na ZT3-kontrolu, dok je nivo ekspresije *Ucp1* transkripta statistički značajno smanjen samo u eksperimentalnoj grupi (10x3hIMO) vremenske tačke ZT11 (2.4x) u odnosu na ZT11-kontrolu. Rezultati takođe pokazuju da je nivo ekspresije *Ucp2* transkripta statistički značajno povećan u spermatozoidima 10x3hIMO životinja vremenskih tačaka ZT3 (3.8x) i ZT23 (1.5x) dok je nivo ekspresije navedenog transkripta značajno smanjen u eksperimentalnoj grupi vremenske tačke ZT11 (3.9x) u odnosu na njihovu odgovarajuću ZT-kontrolu. Suprotno ovom obrascu, nivo ekspresije *Ucp3* transkripta statistički je značajno smanjen u spermatozoidima eksperimentalne grupe (10x3hIMO) vremenske tačke ZT3 (5.8x), ali je povećan u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke

ZT11 (1.5x) u odnosu na njihove odgovarajuće ZT-kontrole. Nivo ekspresije navedenog transkripta u ZT23 vremenskoj tački ostao je nepromenjen u spermatozoidima 10x3hIMO grupe u odnosu na ZT23-kontrolu.



**Slika 5.3.6. Transkripcioni profili markera funkcionalnosti mitohondrija značajno su promenjeni u spermatozoidima adultnih mužjaka ponavljano stresiranih imobilizacionim stresom u različitim periodima u toku dana.**

RNA je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i ponavljano stresiranih životinja (10x3hIMO) u različitim periodima u toku dana (ZT0-ZT3, ZT08- ZT11, ZT20-ZT23), i korišćena je za analizu ekspresionih profila transkriptata markera funkcionalnosti mitohondrija. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke.

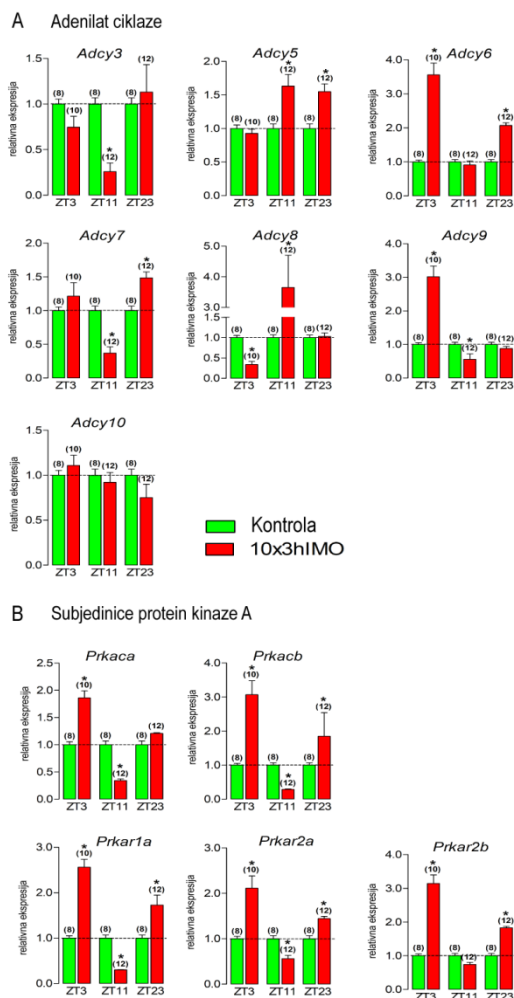
### 5.3.3. Ponavljani imobilizacioni stres u različitom periodu u toku 24 sata remeti transkripcione profile odabranih markera cAMP i MAPK signalnih puteva.

Obzirom da su cAMP i MAPK signalni putevi veoma važni, ne samo za regulaciju broja i funkcionalnosti mitohondrija (Silva i sar., 2015), već i za regulaciju mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015), transkripcioni profili navedenih markera praćeni su u spermatozoidima ponavljano stresiranih životinja u različitim periodima u toku dana (ZT0-ZT3, ZT08-ZT11, ZT20-ZT23). Ekspresija markera navedenih signalnih puteva značajno je promenjena u spermatozoidima svih ispitivanih vremenskih tačaka. Transkripcioni nivo 20 od 22 ispitivana markera (91%) izmenjen je u spermatozoidima eksperimentalne grupe (10x3hIMO) i većina promena je cirkadijalnog karaktera (Tabela 5.3.1, Slika 5.3.9.B).

Rezultati pokazuju da su profili ekspresije transkriptata za 11 od 12 ispitivanih markera cAMP signalnog puta (92%) izmenjen u spermatozoidima 10x3hIMO grupe u odnosu na odgovarajuću ZT-kontrolu (Slika 5.3.7.). Nivo ekspresije transkripta *Adcy3* statistički je značajno smanjen u 10x3hIMO grupi vremenske tačke ZT11 (3.8x) u odnosu na ZT11-kontrolu, dok u ostalim vremenskim tačkama (ZT3 i ZT23) nivo ekspresije nije promenjen. Transkripcioni nivo *Adcy5* statistički je značajno povećan u spermatozoidima eksperimentalne grupe (10x3hIMO) vremenskih tačaka ZT11 (1.6x) i ZT23 (1.5x) u odnosu na njihovu ZT-kontrolu. U spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT3 nije detektovana promena ekspresije navedenog transkripta u odnosu na ZT3-kontrolu. Dalje, nivo

ekspresije *Adcy6* transkripta statistički je značajno povećan u spermatozoidima eksperimentalne grupe (10x3hIMO) u dve vremenske tačke, ZT3 (3.6x) i ZT23 (2.1x) u odnosu na njihove ZT-kontrole. Nivo ekspresije *Adcy7* transkripta povećan je u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT23 (1.5x), dok je u spermatozoidima eksperimentalne grupe ZT11 vremenske tačke detektovano smanjenje nivoa ekspresije navedenog transkripta, u odnosu na odgovarajuću ZT-kontrolu. Relativni nivo ekspresije *Adcy8* transkripta značajno je povećan u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT11 (3.6x u odnosu na ZT3-kontrolu) ali je statistički značajno smanjen u spermatozoidima eksperimentalne grupe vremenske tačke ZT3 (2.9x u odnosu na ZT3-kontrolu). Suprotno obrascu ekspresije *Adcy8*, nivo ekspresije *Adcy9* statistički je značajno povećan u spermatozoidima ZT3-10x3hIMO grupe (3.0x u odnosu na ZT3-kontrolu), dok je detektovano statistički značajno smanjenje u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT11 (1.8x u odnosu na ZT11-kontrolu). Nivo ekspresije *Prkaca* transkripta značajno je povećan u spermatozoidima 10x3hIMO grupe ZT3 vremenske tačke (1.9x u odnosu na ZT3-kontrolu), dok je sa druge strane u eksperimentalnoj grupi vremenske tačke ZT11 statistički značajno smanjena ekspresija navedenog transkripta (2.9x u odnosu na ZT11-kontrolu). Analiza rezultata relativne ekspresije *Prkacb* transkripta pokazala je da je nivo ekspresije ovog transkripta izmenjen u svim posmatranim vremenskim tačkama: transkripcioni nivo je povećan u spermatozoidima izolovanim iz ZT3-10x3hIMO grupe (3.1x u odnosu na ZT3-kontrolu) i ZT23-10x3hIMO grupe (1.8x u odnosu na ZT23-kontrolu), ali je smanjen u spermatozoidima ZT11-10x3hIMO grupe (3.6x u odnosu na ZT11-kontrolu). Takođe, nivo ekspresije *Prkar1a* transkripta izmenjen je u svim posmatranim vremenskim tačkama: transkripcioni nivo je povećan u spermatozoidima izolovanim iz ZT3-10x3hIMO grupe (2.6x u odnosu na ZT3-kontrolu) i ZT23-10x3hIMO grupe (1.7x u odnosu na ZT23-kontrolu), ali je smanjen u spermatozoidima ZT11-10x3hIMO grupe (3.3x u odnosu na ZT11-kontrolu). Isti obrazac relativne ekspresije detektovan je i na nivou ekspresije *Prkar2a* transkripta: transkripcioni nivo je povećan u spermatozoidima izolovanim iz ZT3-10x3hIMO grupe (2.1x u odnosu na ZT3-kontrolu) i ZT23-10x3hIMO grupe (1.4x u odnosu na ZT23-kontrolu), ali je smanjen u spermatozoidima ZT11-10x3hIMO grupe (1.8x u odnosu na ZT11-kontrolu). Takođe, kao i kod transkripcije *Prkar1a*, obrazac relativne ekspresije *Prkar2b* izmenjen je u svim ispitivanim vremenskim tačkama: transkripcioni nivo je povećan u spermatozoidima izolovanim iz ZT3-10x3hIMO grupe (3.1x u odnosu na ZT3-kontrolu) i ZT23-10x3hIMO grupe (1.8x u odnosu na ZT23-kontrolu), dok nivo ekspresije navedenog transkripta nije promenjen u spermatozoidima ZT11-10x3hIMO grupe u odnosu na ZT11-kontrolu.

### Markeri cAMP signalnog puta



**Slika 5.3.7. Transkripcijski profili signalnih molekula cAMP signalnog puta promjenjeni u spermatozoidima ponavljano stresiranih životinja u različitim periodima u toku dana.**

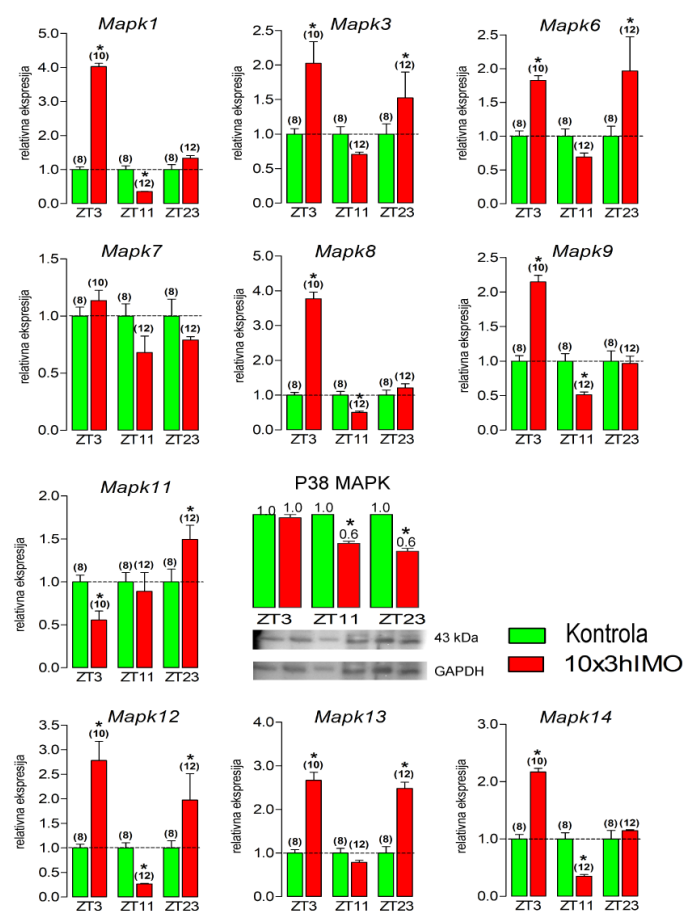
RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i ponavljano stresiranih životinja (10x3hIMO) u različitim periodima u toku dana (ZT0-ZT3, ZT08-ZT11, ZT20-ZT23), i korišćena je za analizu transkripcijskih profila signalnih molekula cAMP signalnog puta. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke.

Analiza rezultata pokazala je da su profili ekspresije transkripata za 9 od 10 ispitivanih markera (90%) MAPK signalnog puta izmenjeno (Slika 5.3.8.). Nivo ekspresije *Mapk1* transkripta povećan je u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT3 (4.0x u odnosu na ZT3-kontrolu), dok je u nivo ekspresije navedenog transkripta smanjen u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT11 (2.8x u odnosu na ZT11-kontrolu) i nepromenjen u spermatozoidima ZT23-10x3hIMO grupe (u odnosu na ZT23-kontrolu). Rezultati relativne ekspresije *Mapk3* transkripta pokazuju povećanje ekspresije u spermatozoidima ZT3-10x3hIMO grupe (2.0x u odnosu na ZT3-kontrolu) kao i u spermatozoidima ZT23-10x3hIMO grupe (1.5x u odnosu na ZT23-kontrolu). Relativna ekspresija *Mapk6* transkripta statistički je značajno povećana u spermatozoidima dve vremenske tačke, ZT3-10x3hIMO grupe (1.8x u odnosu na ZT3-kontrolu) i ZT23-10x3hIMO grupe (2.0x u odnosu na ZT23-kontrolu), dok u vremenskoj tački ZT11 nije detektovana statistički značajna promena ekspresije navedenog transkripta u spermatozoidima 10x3hIMO grupe u odnosu na ZT11-kontrolu. Transkripcijski profili *Mapk8* i *Mapk9* transkripata slični su profilu *Mapk1* transkripta. Ekspresija *Mapk8* povećana je u spermatozoidima ZT3-10x3hIMO grupe (3.8x u odnosu na ZT3-kontrolu) i smanjena u spermatozoidima ZT11-10x3hIMO grupe (2.0x u odnosu na ZT11-kontrolu). Dalje, ekspresija *Mapk9* povećana je u spermatozoidima ZT3-10x3hIMO grupe (2.1x u odnosu na ZT3-kontrolu) i smanjena u spermatozoidima ZT11-10x3hIMO grupe (1.9x u odnosu na ZT11-kontrolu).



Nivoi ekspresije *Mapk8* i *Mapk9* transkripata nisu izmenjeni u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT23, u odnosu na ZT23-kontrolu. Nivo relativne ekspresije *Mapk11* transkripta smanjen je u spermatozoidima ZT3-10x3hIMO grupe (1.8x u odnosu na ZT3-kontrolu), povećan u spermatozoidima ZT23-10x3hIMO grupe (1.5x u odnosu na ZT23-kontrolu), dok nivo navedenog transkripta nije statistički značajno promenjen u spermatozoidima 10x3hIMO grupe vremenske tačke ZT11, u odnosu na ZT11-kontrolu. Sa druge strane, nivo ekspresije proteina p38MAPK smanjen je u vremenskim tačkama ZT11 i ZT23. Dalje, nivo relativne ekspresije *Mapk12* statistički je značajno promenjen u svim ispitivanim vremenskim tačkama: transkripcioni nivo povećan je u spermatozoidima ZT3-10x3hIMO grupe (2.8x u odnosu na ZT3-kontrolu) i ZT23-10x3hIMO grupe (2.0x u odnosu na ZT23-kontrolu), ali je statistički značajno smanjen u spermatozoidima ZT11-10x3hIMO grupe (3.7x u odnosu na ZT11-kontrolu). Relativna ekspresija *Mapk13* transkripta statistički je značajno povećana u spermatozoidima ZT3-10x3hIMO grupe (2.7x u odnosu na ZT3-kontrolu) i ZT23-10x3hIMO grupe (2.5x u odnosu na ZT23-kontrolu), ali nije statistički značajno promenjena u spermatozoidima ZT11-10x3hIMO grupe, u odnosu na ZT11-kontrolu. Nivo relativne ekspresije *Mapk14* transkripta, kao i nivoi *Mapk1*, *Mapk8* i *Mapk9* transkripata, povećan je u spermatozoidima ZT3-10x3hIMO grupe (2.2x u odnosu na ZT3-kontrolu) i smanjen u spermatozoidima ZT11-10x3hIMO grupe (2.9x u odnosu na ZT11-kontrolu), dok sa druge strane nivo ekspresije navedenog transkripta nije promenjen u grupi ZT23-10x3hIMO u odnosu na ZT23-kontrolu.

Markeri MAPK signalnog puta



**Slika 5.3.8. Transkripcioni profili signalnih molekula MAPK signalnog puta promenjeni u spermatozoidima ponavljano stresiranih životinja u različitim periodima u toku dana.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz neuznemiranih (kontrolnih) i ponavljano stresiranih životinja (10x3hIMO) u različitim periodima u toku dana (ZT0-ZT3, ZT08-ZT11, ZT20-ZT23), i korišćena je za analizu ekspresije transkripata i proteina profila signalnih molekula MAPK signalnog puta. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće vremenske tačke.

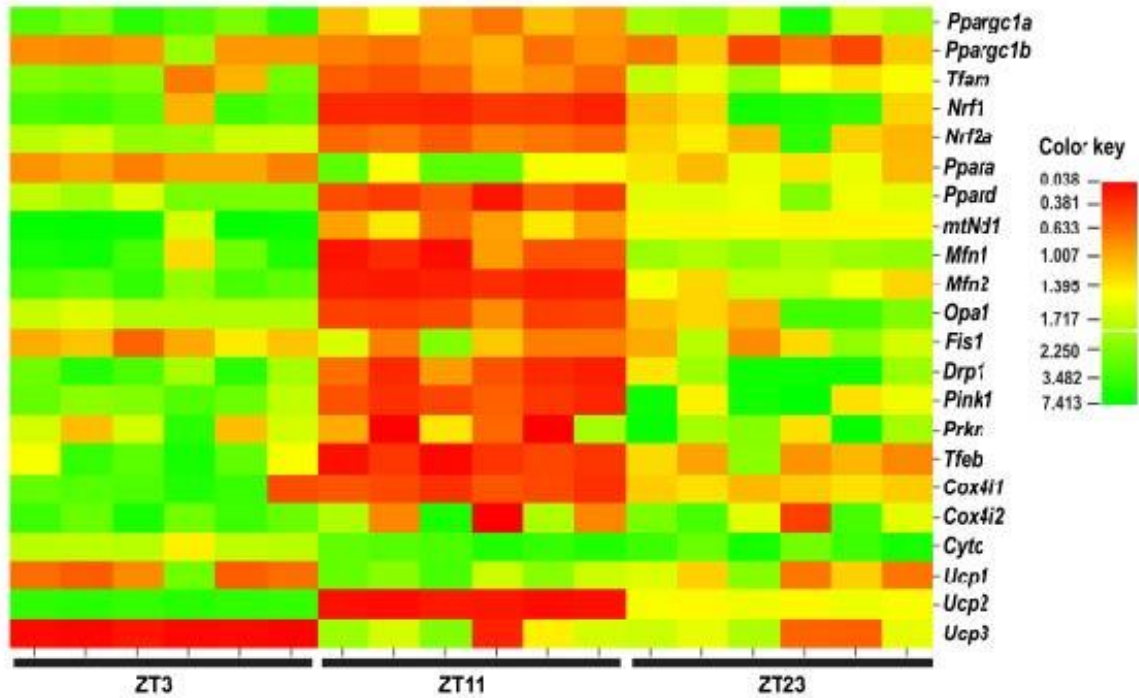
**Tabela 5.3.1. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti i signalnih molekula koji regulišu dinamiku i funkcionalnost mitohondrija, kao i broj i funkcionalnost spermatozoida u spermatozoidima ponavljano stresiranih životinja u različitim periodima u toku dana.**

Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM vrednosti dva nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost na nivou  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu svake vremenske tačke.

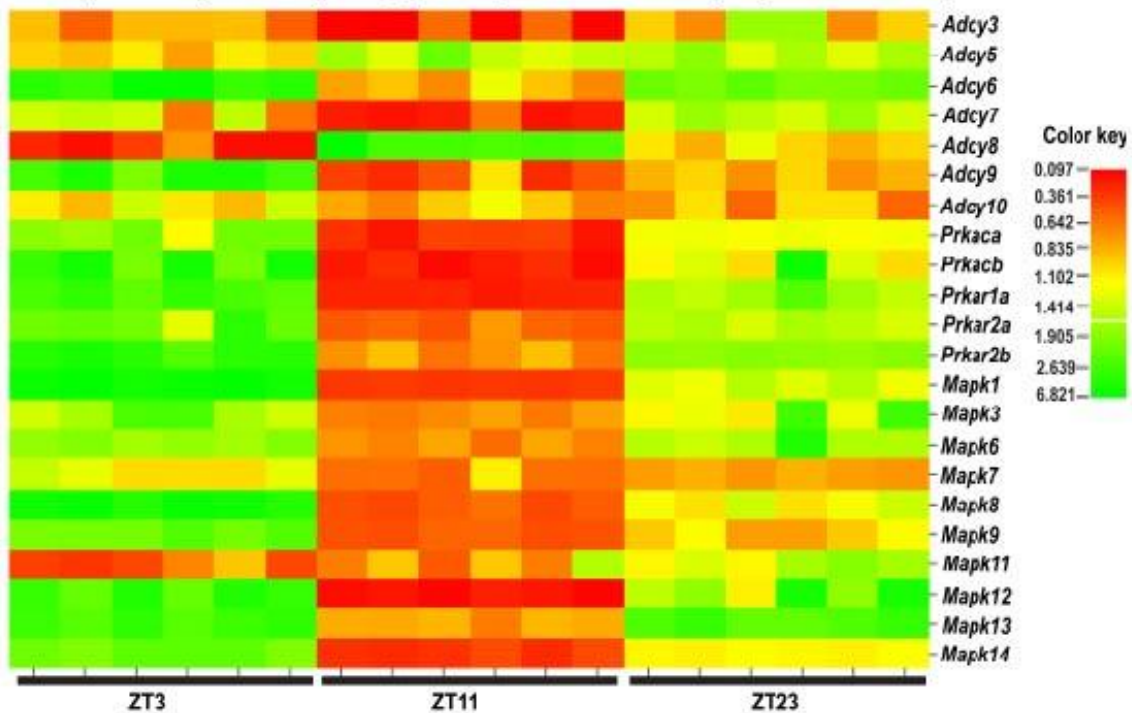
Groupa Transkript	Vremenske tačke					
	ZT3		ZT11		ZT23	
	Kontrola	1x3hIMO	Kontrola	1x3hIMO	Kontrola	1x3hIMO
<i>Ppargc1a</i>	1.0 $\pm$ 0.07	3.1* $\pm$ 0.51 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.06	1.0 $\pm$ 0.17	1.0 $\pm$ 0.07	2.6* $\pm$ 0.72 $\uparrow$
<i>Tfam</i>	1.0 $\pm$ 0.07	1.7* $\pm$ 0.33 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.05	0.7 $\pm$ 0.09	1.0 $\pm$ 0.07	1.6* $\pm$ 0.10 $\uparrow$
<i>Nrf1</i>	1.0 $\pm$ 0.09	2.7* $\pm$ 0.54 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.07	0.3* $\pm$ 0.02 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	3.1* $\pm$ 0.80 $\uparrow$
<i>Nrf2a</i>	1.0 $\pm$ 0.06	1.8* $\pm$ 0.06 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.05	0.6 $\pm$ 0.06	1.0 $\pm$ 0.06	1.9* $\pm$ 0.68 $\uparrow$
<i>Ppara</i>	1.0 $\pm$ 0.07	0.9 $\pm$ 0.04	1.0 $\pm$ 0.05	2.4* $\pm$ 0.46 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.07	1.3 $\pm$ 0.11
<i>Ppard</i>	1.0 $\pm$ 0.06	2.0* $\pm$ 0.13 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.06	0.4* $\pm$ 0.05 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	1.7* $\pm$ 0.17 $\uparrow$
<i>mtNd1</i>	1.0 $\pm$ 0.07	5.7* $\pm$ 1.36 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.07	0.9 $\pm$ 0.15	1.0 $\pm$ 0.08	1.4 $\pm$ 0.01
<i>Mfn1</i>	1.0 $\pm$ 0.08	3.7* $\pm$ 0.55 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.05	0.4* $\pm$ 0.12 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	1.9* $\pm$ 0.04 $\uparrow$
<i>Mfn2</i>	1.0 $\pm$ 0.06	3.0* $\pm$ 0.24 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.05	0.3* $\pm$ 0.01 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	1.6* $\pm$ 0.11 $\uparrow$
<i>Opal</i>	1.0 $\pm$ 0.09	1.7* $\pm$ 0.04 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.06	0.5* $\pm$ 0.09 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.09	2.1* $\pm$ 0.38 $\uparrow$
<i>Drp1</i>	1.0 $\pm$ 0.04	3.0* $\pm$ 0.39 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.04	0.5* $\pm$ 0.10 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	4.2* $\pm$ 1.05 $\uparrow$
<i>Pink1</i>	1.0 $\pm$ 0.06	2.1* $\pm$ 0.15 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.05	0.4* $\pm$ 0.04 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	3.8* $\pm$ 1.12 $\uparrow$
<i>Prkn</i>	1.0 $\pm$ 0.05	2.1* $\pm$ 0.43 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.07	0.4* $\pm$ 0.21 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.04	2.8* $\pm$ 1.02 $\uparrow$
<i>Tfeb</i>	1.0 $\pm$ 0.06	3.1* $\pm$ 0.56 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.05	0.3* $\pm$ 0.04 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.08	1.2 $\pm$ 0.19
<i>Cox4i1</i>	1.0 $\pm$ 0.07	3.2* $\pm$ 0.25 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.06	0.4* $\pm$ 0.03 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	1.2 $\pm$ 0.05
<i>Cox4i2</i>	1.0 $\pm$ 0.06	3.3* $\pm$ 0.58 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.05	1.7* $\pm$ 0.91 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.01	1.9* $\pm$ 0.61 $\uparrow$
<i>Cytc</i>	1.0 $\pm$ 0.09	1.7* $\pm$ 0.09 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.06	0.9 $\pm$ 0.02	1.0 $\pm$ 0.07	1.3 $\pm$ 0.11
<i>Ucp1</i>	1.0 $\pm$ 0.06	1.1 $\pm$ 0.42	1.0 $\pm$ 0.07	2.4* $\pm$ 0.35 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.07	1.4 $\pm$ 0.29
<i>Ucp2</i>	1.0 $\pm$ 0.06	3.8* $\pm$ 0.13 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.05	0.3* $\pm$ 0.02 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.05	1.5* $\pm$ 0.01 $\uparrow$
<i>Ucp3</i>	1.0 $\pm$ 0.04	0.2* $\pm$ 0.02 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.03	1.5* $\pm$ 0.32 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.07	1.2 $\pm$ 0.27
<i>Adcy3</i>	1.0 $\pm$ 0.05	0.7 $\pm$ 0.12	1.0 $\pm$ 0.06	0.3* $\pm$ 0.09 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	1.1 $\pm$ 0.30
<i>Adcy5</i>	1.0 $\pm$ 0.05	0.9 $\pm$ 0.06	1.0 $\pm$ 0.07	1.6* $\pm$ 0.17 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.06	1.5* $\pm$ 0.12 $\uparrow$
<i>Adcy6</i>	1.0 $\pm$ 0.03	3.6* $\pm$ 0.34 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.06	0.9 $\pm$ 0.12	1.0 $\pm$ 0.07	2.1* $\pm$ 0.08 $\uparrow$
<i>Adcy7</i>	1.0 $\pm$ 0.02	1.2 $\pm$ 0.20	1.0 $\pm$ 0.05	0.4* $\pm$ 0.09 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	1.5* $\pm$ 0.09 $\uparrow$
<i>Adcy8</i>	1.0 $\pm$ 0.05	0.3* $\pm$ 0.07 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	3.6* $\pm$ 1.00 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.08	1.0 $\pm$ 0.09
<i>Adcy9</i>	1.0 $\pm$ 0.05	3.0* $\pm$ 0.32 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.09	0.6 $\pm$ 0.17	1.0 $\pm$ 0.07	0.9 $\pm$ 0.06
<i>Prkaca</i>	1.0 $\pm$ 0.04	1.9* $\pm$ 0.13 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.07	0.3* $\pm$ 0.03 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.07	1.2 $\pm$ 0.01
<i>Prkacb</i>	1.0 $\pm$ 0.03	3.1* $\pm$ 0.41 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.05	0.3* $\pm$ 0.01 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.05	1.8* $\pm$ 0.69 $\uparrow$
<i>Prkar1a</i>	1.0 $\pm$ 0.05	2.6* $\pm$ 0.17 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.06	0.3* $\pm$ 0.01 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.08	1.7* $\pm$ 0.22 $\uparrow$
<i>Prkar2a</i>	1.0 $\pm$ 0.04	2.1* $\pm$ 0.27 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.08	0.6 $\pm$ 0.07	1.0 $\pm$ 0.06	1.4 $\pm$ 0.05
<i>Prkar2b</i>	1.0 $\pm$ 0.06	3.1* $\pm$ 0.25 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.07	0.7 $\pm$ 0.06	1.0 $\pm$ 0.07	1.8* $\pm$ 0.04 $\uparrow$
<i>Mapk1</i>	1.0 $\pm$ 0.08	4.0* $\pm$ 0.09 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.11	0.4* $\pm$ 0.01 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.15	1.3 $\pm$ 0.07
<i>Mapk3</i>	1.0 $\pm$ 0.07	2.0* $\pm$ 0.32 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.10	0.7 $\pm$ 0.03	1.0 $\pm$ 0.14	1.5* $\pm$ 0.37 $\uparrow$
<i>Mapk6</i>	1.0 $\pm$ 0.06	1.8* $\pm$ 0.07 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.09	0.7 $\pm$ 0.06	1.0 $\pm$ 0.15	2.0* $\pm$ 0.51 $\uparrow$
<i>Mapk8</i>	1.0 $\pm$ 0.07	3.8* $\pm$ 0.19 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.11	0.5* $\pm$ 0.04 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.15	1.2 $\pm$ 0.11
<i>Mapk9</i>	1.0 $\pm$ 0.04	2.1* $\pm$ 0.09 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.10	0.5* $\pm$ 0.04 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.14	1.0 $\pm$ 0.11
<i>Mapk11</i>	1.0 $\pm$ 0.08	0.6* $\pm$ 0.11 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.08	0.9 $\pm$ 0.22	1.0 $\pm$ 0.15	1.5* $\pm$ 0.16 $\uparrow$
<i>Mapk12</i>	1.0 $\pm$ 0.07	2.8* $\pm$ 0.39 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.12	0.3* $\pm$ 0.01 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.12	2.0* $\pm$ 0.54 $\uparrow$
<i>Mapk13</i>	1.0 $\pm$ 0.05	2.7* $\pm$ 0.18 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.11	0.8 $\pm$ 0.04	1.0 $\pm$ 0.15	2.5* $\pm$ 0.14 $\uparrow$
<i>Mapk14</i>	1.0 $\pm$ 0.08	2.2* $\pm$ 0.06 $\uparrow$	1.0 $\pm$ 0.08	0.3* $\pm$ 0.03 $\downarrow$	1.0 $\pm$ 0.10	1.1 $\pm$ 0.02



**A** Analiza toplotne mape transkripcionog profila markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti



**B** Analiza toplotne mape transkripcionog profila signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku



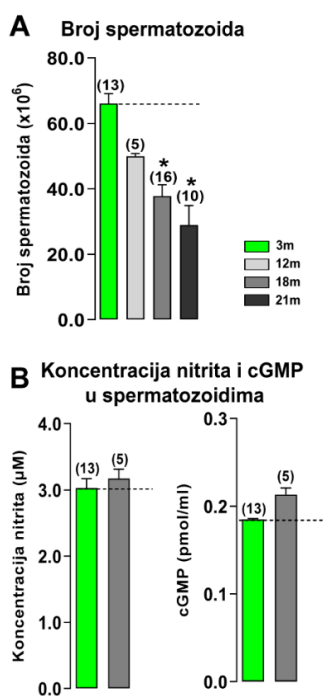
**Slika 5.3.9.** Transkripcioni profili markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti (A) i signalnih molekula koji regulišu dinamiku i funkcionalnost mitohondrija (B) u spermatozoidima ponavljano stresiranih pacova u različitim periodima u toku dana.

## 5.4. Efekat poremećene homeostaze testosterona starih mužjaka pacova na molekularne profile markera biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija kao i markere signalnih puteva koji ih regulišu u spermatozoidima

U cilju karakterizacije molekularnih profila mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture, kao i njihovih regulatornih molekula kao mehanizama adaptacije spermatozoida na poremećenu homeostazu androgena u cirkulaciji, dizajnirani su *in vivo* eksperimenti na starim mužjacima pacova. Životinje koje su predstavljale eksperimentalnu grupu u ovom modelu su starosti 12, 18 i 21. mesec. Kontrolnu grupu sačinjavale su adultne životinje starosti 3 meseca. Ranija istraživanja (Sokanovic i sar., 2014) pokazala su da je nivo androgena (T+DHT) u serumu mužjaka pacova starosti 12 meseci smanjen za 21.7% u odnosu na nivo androgena adultnih mužjaka pacova, dok je nivo androgena u serumu 24 meseca starih pacova smanjen za 51.8% u odnosu na adultne mužjake. Imajući u vidu navedene rezultate, eksperimenti su dizajnirani sa ciljem ispitivanja transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture, kao i markera cAMP i MAPK signalnih puteva u spermatozoidima starih pacova.

### 5.4.1. Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa, koncentracija nitrita i nivo cGMP u spermatozoidima starih pacova

Poznato je da sa starenjem dolazi do smanjenja nivoa cirkulišućih androgena kod mužjaka pacova (Sokanovic i sar., 2014), gde se statistički značajno smanjenje nivoa kod mužjaka pacova javlja nakon 12 meseci starosti, a nakon 18 meseci dolazi do smanjenja od 51.8% koje se zadržava na sličnom nivou i do 24 meseca starosti. Da bi se ispitaio efekat smanjenja nivoa cirkulišućih androgena u serumu na spermatozoide pacova dizajnirani su *in vivo* ogledi na mužjacima pacova starosti 12, 18 i 21 mesec. Rezultati pokazuju da se broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog dela epididimisa statistički značajno smanjuje u grupama životinja starosti 18 i 21 mesec (Slika 5.4.1.A). Dalje analize izolovanih spermatozoida podrazumevale su određivanje nivoa nitrita i cGMP u sadržaju spermatozoida. Rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji nitrita i cGMP-a u spermatozoidima pacova starih 18 meseci u odnosu na spermatozoide adultnih mužjaka pacova (Slika 5.4.1.B).



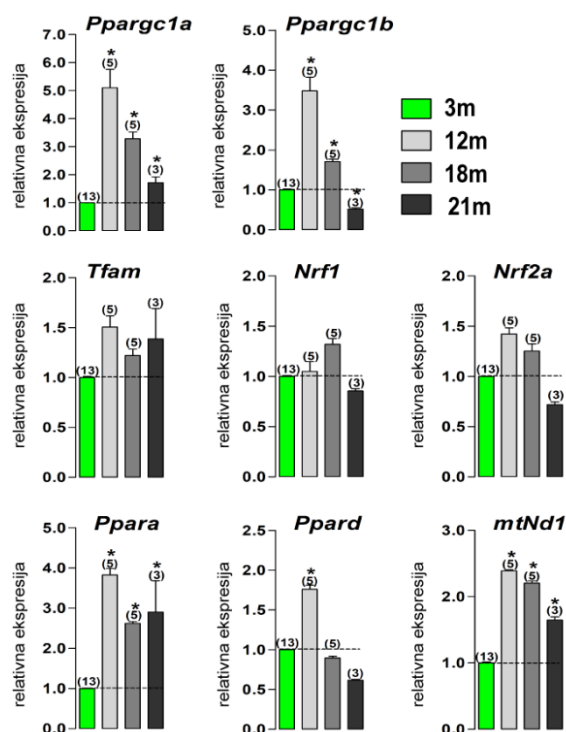
### 5.4.1. Broj spermatozoida, koncentracija nitrita i cGMP u spermatozoidima adultnih i starih pacova.

Broj spermatozoida (A) i koncentracija nitrita i cGMP (B) u spermatozoidima izolovanih iz kaudalnih epididimisa adultnih (3m) i životinja starih 12 meseci (12m), 18 meseci (18m) i 21 mesec (21m). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu (3 meseca stare životinje, adulti).

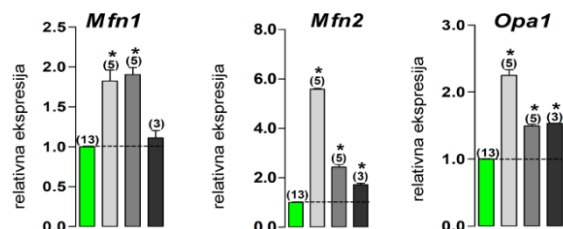
#### 5.4.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija promjenjeni su u spermatozoidima starih pacova

Da bismo ispitali efekat smanjenog nivoa androgenih hormona na ekspresiju transkripata za markere mitohondrijalne dinamike u spermatozoidima pacova, korišćen je *in vivo* model starenja. Naime, rezultati ranijih istraživanja ovog *in vivo* eksperimentalnog modela pokazala su da u svim ispitivanim eksperimentalnim uzrastima (12, 18 i 21 mesec) dolazi do značajnog smanjenja nivoa androgena u cirkulaciji (Sokanovic i sar., 2014). Na osnovu ovih rezultata, dizajnirani su eksperimenti korišćeni u ovoj disertaciji, sa ciljem ispitivanja nivoa ekspresije transkripata molekularnih markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija. Rezultati pokazuju da u spermatozoidima starih pacova dolazi do promena na nivou ekspresije glavnih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture mitohondrija kao i glavnih markera mitohondrijalne funkcionalnosti, u odnosu na adultne mužjake pacova stare tri meseca (Slika 5.4.2). Ispitivanjem nivoa ekspresije glavnih markera mitohondrijalne biogeneze u spermatozoidima (Slika 5.4.2.A) može se primetiti značajno povećanje nivoa ekspresije master regulatora mitohondrijalne biogeneze *Ppargc1a* u svim ispitivanim starosnim kategorijama (12, 18 i 21 mesec starosti) u odnosu na adultne životinje (3 meseca starosti). Isti obrazac ekspresije transkripta za *Ppargc1b* detektovan je u spermatozoidima 12 i 18 meseci starih životinja, dok je nivo ekspresije istog transkripta smanjen u spermatozoidima 21 mesec starih pacova. Nivoi ekspresije transkripata *Tfam*, *Nrf1* i *Nrf2a* su nepromenjeni bez obzira na ispitivanu uzrasnu kategoriju. Dalje, nivoi ekspresije transkripata *Ppara* i *Ppard* povećani su u spermatozoidima 12 meseci starih životinja. Nivo ekspresije *Ppara* transkripta povećan je i u drugim ispitivanim uzrasnim kategorijama dok ekspresija transkripta za *Ppard* ostaje nepromenjena u spermatozoidima 18 meseci i 21 mesec starih životinja. Rezultati pokazuju da je nivo ekspresije *mtNdl* statistički značajno povećan u spermatozoidima svih eksperimentalnih grupa starih pacova (12, 18 i 21 mesec) u odnosu na nivo ekspresije u spermatozoidima adultnih pacova starih 3 meseca. Analizom rezultata relativne ekspresije glavnih markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture (Slika 5.4.2.B) primećuje se značajno povećanje ekspresije svih ispitivanih transkripata, *Mfn1*, *Mfn2* i *Opal*, u spermatozoidima životinja starih 12 i 18 meseci, dok se obrazac povećane ekspresije zadržava i u uzrasnoj kategoriji pacova starih 21 mesec za transkripte *Mfn2* i *Opal*. Ispitivanjem ekspresije transkripata glavnih markera mitohondrijalne funkcionalnosti (Slika 5.4.2.C) dobijeni rezultati pokazuju povećanje nivoa ekspresije *Cox4i1* i *Cytc* u spermatozoidima 12 i 18 meseci starih pacova, dok nivo *Cytc* transkripta ostaje povećan i u spermatozoidima 21 mesec starih životinja. Sa druge strane, nivo ekspresije transkripta *Cox4i2* smanjen je u spermatozoidima 21 mesec starih pacova. Ekspresija transkripata *Ucp1* i *Ucp3* povećana je samo u spermatozoidima 12 meseci starih životinja, dok je suprotan trend nivoa ekspresije *Ucp2* zabeležen u spermatozoidima 12, 18 i 21 mesec starih životinja, gde je nivo ovog transkripta statistički značajno smanjen.

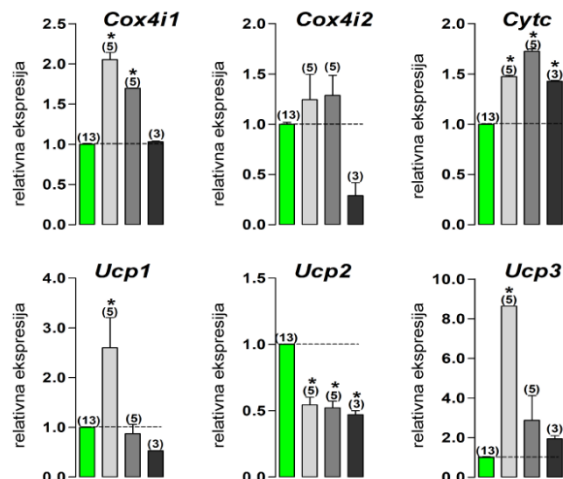
## A Glavni markeri mitohondrijalne biogeneze



## B Glavni markeri mitohondrijalne arhitekture i fuzije



## C Glavni markeri funkcionalnosti mitohondrija

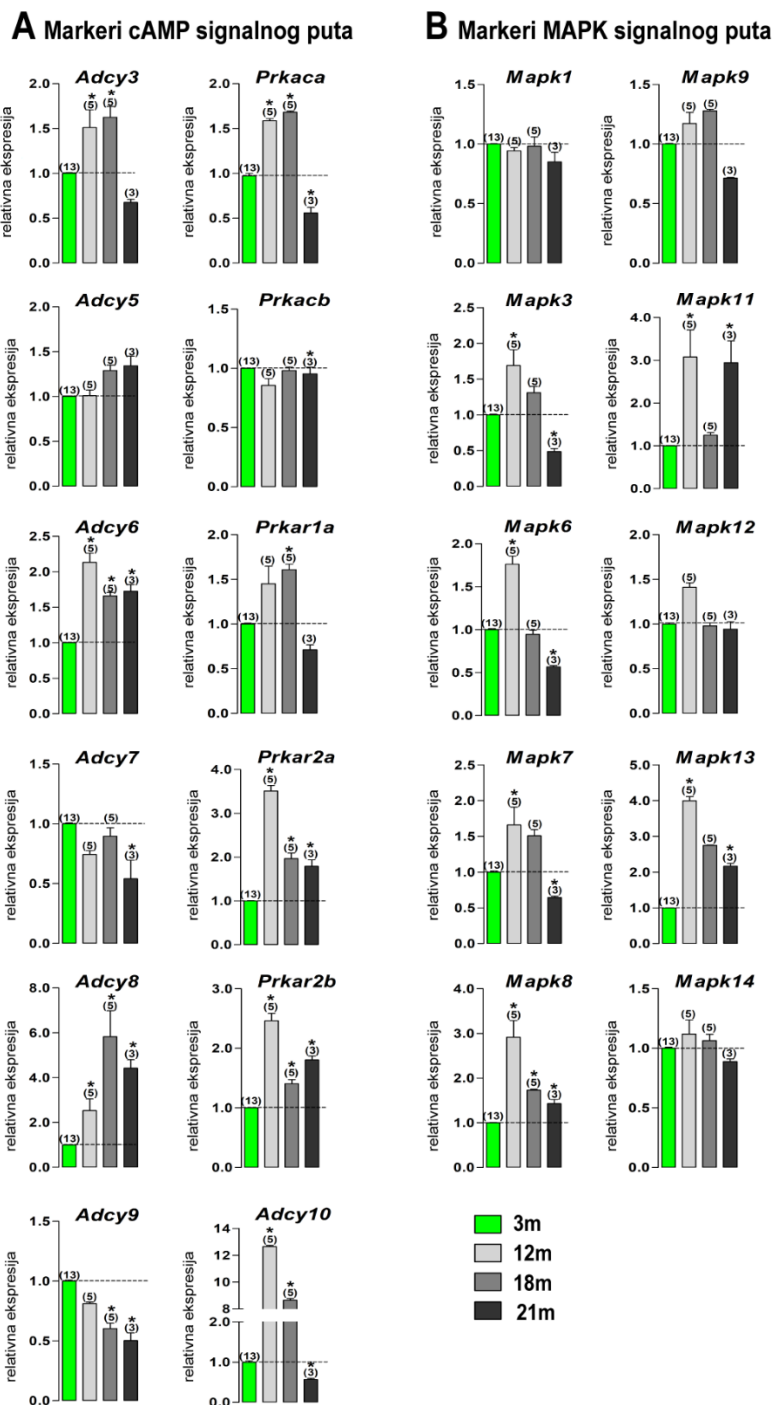


### Slika 5.4.2. Transkripcijski profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija, promjenjeni su u spermatozoidima starih pacova.

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz životinja starih 12 meseci (12m), 18 meseci (18m), 21 mesec (21m) kao i kontrolnih životinja starih 3 meseca (3m), i korišćena je za analizu transkripcijskih profila markera mitohondrijalne biogeneze (A), mitohondrijalne fuzije i arhitekture (B) i mitohondrijalne funkcionalnosti (C). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu.

### 5.4.3. Transkripcijski profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima starih pacova

Ekspresija transkripata za signalne molekule koje regulišu kako mitohondrijalnu funkcionalnost i dinamiku tako i broj i funkcionalnost spermatozoida, značajno se menja sa starenjem obzirom da je transkripcijski nivo 17 od 22 ispitivanih markera poromenjen u spermatozoidima starih životinja u odnosu na kontrolne, adultne životinje (Slika 5.4.3). Nivoi transkripcije 10 od 12 ispitivanih cAMP signalnih markera promjenjeni su u spermatozoidima starih životinja (5.4.3.A). Nivo ekspresije transkripta *Adcy3* povećan je u spermatozoidima pacova starih 12 i 18 meseci, dok je nivo ekspresije *Adcy5* nepromenjen u svim starosnim kategorijama u odnosu na kontrolne, adultne životinje. Ekspresija transkripata *Adcy6* i *Adcy8* povećana je u svim ispitivanim uzrasnim kategorijama (12m, 18m i 21m) u odnosu na kontrolnu grupu, 3 meseca starih pacova. Suprotno tome, nivo ekspresije transkripta *Adcy7* smanjen je u spermatozoidima pacova starih 21 mesec, dok je smanjenje ekspresije *Adcy9* primećeno u spermatozoidima pacova starih 18 i 21 mesec. Dalje, isti obrazac ekspresije dobijen je za transkripte *Adcy10* i *Prkaca* gde je nivo ekspresije povećan u spermatozoidima 12 i 18 meseci starih životinja, dok je nivo ekspresije istih transkripata smanjen u spermatozoidima 21 mesec starih životinja. Ekspresija transkripata za regulatorne subjedinice protein kinaze A promjenjena je u spermatozoidima starih životinja. Nivo ekspresije transkripta *Prkar1a* povećan je samo u spermatozoidima 18 meseci starih životinja, dok su nivoi ekspresije transkripata *Prkar2a* i *Prkar2b* povećani u spermatozoidima svih starosnih kategorija (12m, 18m, 21m) u odnosu na spermatozoide adultnih životinja (3m). Nivoi transkripcije 7 od 10 ispitivanih markera MAPK signalnog puta promjenjeni su u spermatozoidima starih pacova u odnosu na adultne životinje (Slika 5.4.3.B). U spermatozoidima životinja starih 12 meseci povećan je nivo ekspresije *Mapk3*, *Mapk6* i *Mapk7* dok je nivo ekspresije istih transkripata statistički značajno smanjen u spermatozoidima 21 mesec starih životinja. Relativna ekspresija transkripta *Mapk8* povećana je u spermatozoidima svih grupa starih životinja (12m, 18m, 21m) u odnosu na spermatozoide pacova starih 3 meseca, dok je nivo ekspresije *Mapk1* i *Mapk9* nepromenjen u svim uzrasnim kategorijama. Povećanje ekspresije transkripata *Mapk11*, *Mapk12* i *Mapk13* primećeno je u spermatozoidima pacova starih 12 meseci, dok je povećanje ekspresije *Mapk11* i *Mapk13* zabeleženo i u spermatozoidima 21 mesec starih životinja. Nivo ekspresije *Mapk13* povećan je i u spermatozoidima pacova starih 18 meseci, dok nivo ekspresije *Mapk14* nije promenjen ni u jednoj starosnoj kategoriji.



**Slika 5.4.3. Transkripcijski profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima starih pacova.**

RNA je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz životinja starih 12 meseci (12m), 18 meseci (18m), 21 mesec (21m) kao i kontrolnih životinja starih 3 meseca (3m), i korišćena je za analizu transkripcijskih profila markera cAMP signalnog puta (A), MAPK signalnog puta (B). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu.

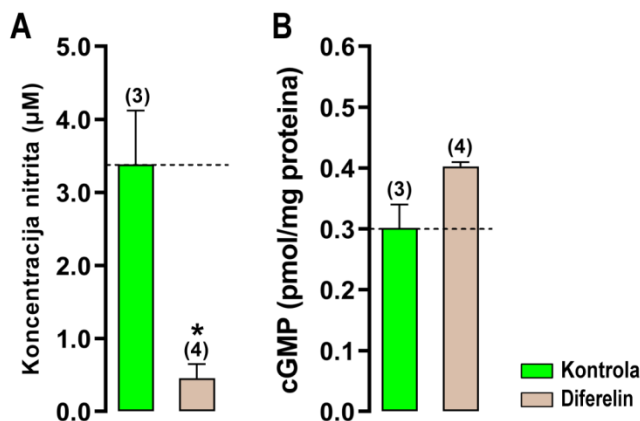


## 5.5. Efekat poremećene homeostaze testosterona hipogonadalnih mužjaka pacova na molekularne profile markera biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija kao i markere signalnih puteva koji ih regulišu u spermatozoidima

Da bismo ispitali efekat poremećene homeostaze androgena na molekularne profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture, i funkcionalnosti mitohondrija kao i markera koji ih regulišu dizajniran je *in vivo* eksperimentalni model hipogonadotropnog hipogonadizma. U ovom eksperimentalnom modelu hipogonadotropni hipogonadizam je izazvan intramuskularnim injektovanjem GnRH analoga sa dugotrajnim dejstvom, Triptorelina, koji sadrži aktivnu komponentu Diferelin. Potvrda tretmana urađena je merenjem nivoa androgena u cirkulaciji gde publikovani rezultati (Medar i sar., 2021a) pokazuju da navedeni tretman dovodi do smanjenja nivoa androgena u serumu. Po završetku tretmana, osim merenja androgena u serumu, iz kontrolnih i eksperimentalnih životinja izolovani su spermatozoidi sa ciljem merenja nivoa nitrita, koncentracije cGMP-a, kao i analize ekspresije transkriptata gore pomenutih molekularnih markera.

### 5.5.1. Hipogonadizam remeti koncentraciju nitrita i nivo cGMP u spermatozoidima izolovanih iz kaudalnih epididimisa

Model hipogonadotropnog hipogonadizma izazvan je tretmanom adultnih životinja supstancom Diferelin. Mesec dana nakon davanja leka životinje su žrtvovane i iz kaudalnog epididimisa izolovani su spermatozoidi. Nakon izolacije spermatozoidi su korišćeni za određivanje koncentracije nitrita kao i koncentracije cikličnog nukleotida, cGMP-a, u ćelijskom sadržaju. Rezultati prikazani na slici 5.5.1. pokazuju da u spermatozoidima hipogonadalnih životinja dolazi do smanjenja koncentracije nitrita u odnosu na koncentraciju izmerenu kod kontrolnih životinja (Slika 5.5.1.A). Sa druge strane, koncentracija sekundarnog glasnika cGMP-a nije statistički značajno promenjena u spermatozoidima hipogonadalnih životinja u odnosu na kontrolne (Slika 5.5.1.B).



#### 5.5.1. Hipogonadizam menja koncentraciju nitrita i cGMP u spermatozoidima.

Koncentracija nitrita (A) i cGMP-a (B) u spermatozoidima izolovanih iz kaudalnih epididimisa kontrolnih (netretiranih životinja) i hipogonadalnih životinja tretiranih Diferelinom. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu.

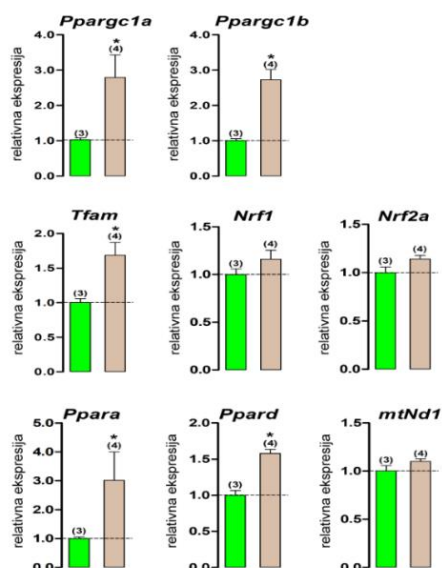
### 5.5.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija promenjeni su u spermatozoidima hipogonadalnih pacova

Uticaj poremećenog nivoa androgena u serumu na transkripcioni profil ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti rađen je korišćenjem *in vivo*

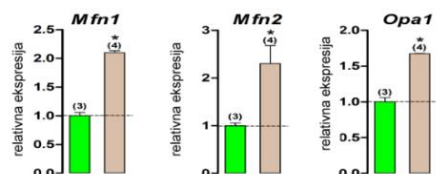


eksperimentalnog modela hipogonadotropnog hipogonadizma. Hipogonadalne životinje dobijene su mesec dana nakon davanja supstance Diferelin. Po završetku tretmana izolovani su spermatozoidi iz kaudalnog dela epididimisa koji su korišćeni za dalju analizu ekspresije pomenutih transkriptata. Rezultati pokazuju da Diferelin remeti transkripcioni profil markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti (Slika 5.5.2). Nivoi ekspresije transkriptata *Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Tfam*, *Ppara* i *Ppard* povećani su u spermatozoidima hipogonadalnih životinja u odnosu na kontrolne, netretirane životinje. Dok sa druge strane, relativna ekspresija transkriptata *Nrf1*, *Nrf2a* i *mtNd1* nije promenjena kod hipogonadalnih životinja u odnosu na netretirane (Slika 5.5.2.A). Analizom relativne ekspresije markera fuzije i arhitekture mitohondrija dobijeni rezultati pokazuju da u spermatozoidima hipogonadalnih životinja dolazi do povećanja nivoa ekspresije svih ispitivanih markera: *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1* (Slika 5.5.2.B). Relativna ekspresija markera mitohondrijalne funkcionalnosti smanjena je samo na nivou transkripcije *Cox4i2* u spermatozoidima hipogonadalnih životinja, dok je kod ostalih ispitivanih markera (*Cox4i1*, *Cytc*, *Ucp1* i *Ucp2*) nivo relativne ekspresije u spermatozoidima hipogonadalnih jednak nivou kod netretiranih (kontrolnih) životinja (Slika 5.5.2.C).

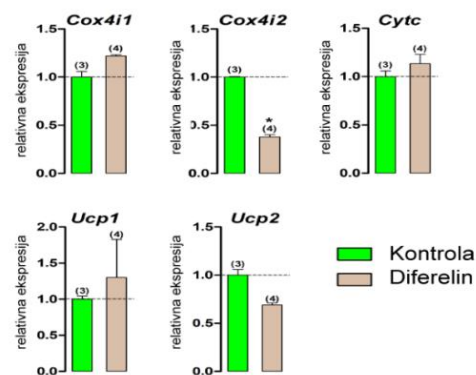
### A Glavni markeri mitohondrijalne biogeneze



### B Glavni markeri fuzije i arhitekture mitohondrija



### C Glavni markeri funkcionalnosti mitohondrija



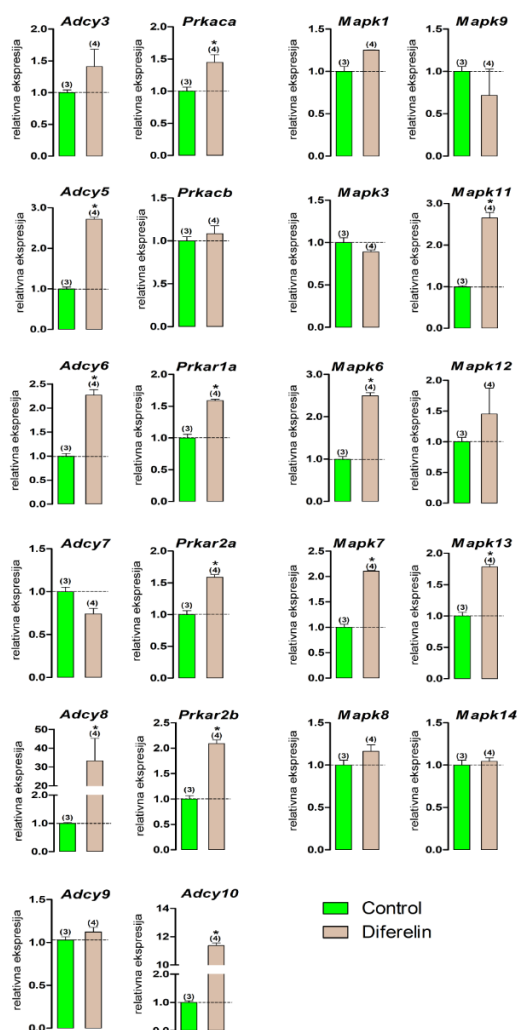
**Slika 5.5.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija, promenjeni su u spermatozoidima hipogonadalnih pacova.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz hipogonadalnih životinja tretiranih supstancom Diferelin i kontrolnih (netretiranih) životinja, i korišćena je za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze (A), mitohondrijalne fuzije i arhitekture (B) i mitohondrijalne funkcionalnosti (C). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu.

### 5.5.3. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima hipogonadalnih životinja

Relativna ekspresija transkripata za glavne markere cAMP i MAPK signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjena je u spermatozoidima hipogonadalnih životinja u odnosu na netretirane, kontrolne životinje (Slika 5.5.3). Rezultati pokazuju da hipogonadotropni hipogonadizam mužjaka pacova dovodi do povećanja ekspresije 12 od 22 ispitivana markera signalnih molekula koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima. Nivoi ekspresije transkripata za neke od ispitivanih adenilat ciklaza, *Adcy5*, *Adcy6*, *Adcy8* i *Adcy10*, povećani su u spermatozoidima hipogonadalnih životinja u odnosu na kontrolne životinje (Slika 5.5.3.A). Dok su nivoi ekspresije transkripata *Adcy3*, *Adcy7* i *Adcy9* nepromenjeni u spermatozoidima hipogonadalnih životinja u odnosu na kontrolne životinje. Relativna ekspresija transkripata za glavne katalitičke i regulatorne subjedinice protein kinaze A povećana je u spermatozoidima hipogonadalnih životinja: *Prkaca*, *Prkar1a*, *Prkar2a* i *Prkar2b*. Nivoi ekspresije markera MAPK signalnog puta promjenjeni su kod 4 od 10 ispitivanih markera (Slika 5.5.3.B). Hipogonadotropni hipogonadizam povećava nivo ekspresije transkripata *Mapk6*, *Mapk7*, *Mapk11* i *Mapk13*, dok nivoi ekspresije *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk8*, *Mapk9*, *Mapk12* i *Mapk14* ostaju nepromenjeni u odnosu na kontrolu (netretirane životinje).

#### A Markeri cAMP signalnog puta    B Markeri MAPK signalnog puta



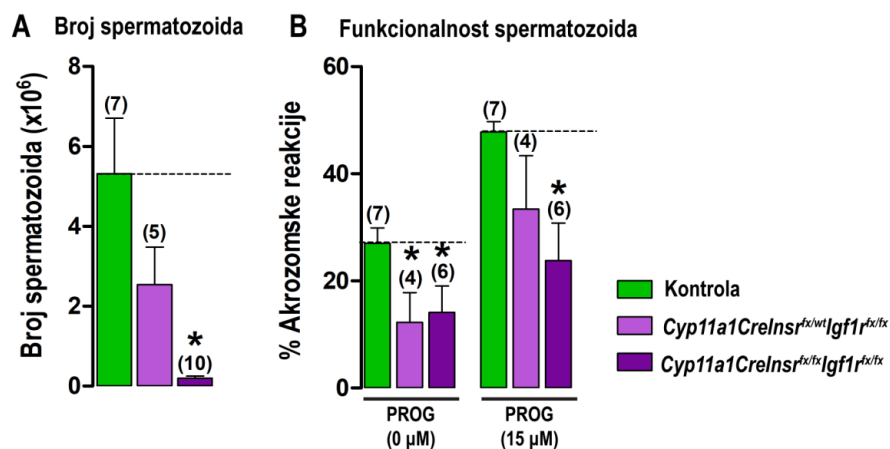
**Slika 5.5.3. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima hipogonadalnih pacova.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz hipogonadalnih životinja tretiranih supstancom Diferelin i kontrolnih (netretiranih) životinja, i korišćena je za analizu transkripcionih profila markera cAMP signalnog puta (A) i MAPK signalnog puta (B). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu.

## 5.6. Efekat hipogonadizma adultnih miševa koji je prouzrokovan kondicionalnom delecijom *Insr* i *Igflr* gena u steroidogenim tkivima na broj i funkcionalnost spermatozoida

Da bismo ispitali efekat poremećene homeostaze androgena u cirkulaciji na broj i funkcionalnost spermatozoida korišćen je *in vivo* model zasnovan na funkcionalnoj genomici. Oglledi su podrazumevali korišćenje C57BL/6J tzv. knockout miševa sa kondicionalnom delecijom gena za *Insr* i/ili *Igflr* u steroidogenim tkivima. Životinje koje su korišćene u ogleđima u okviru ovog eksperimentalnog modela mogu se podeliti u tri grupe: (1) kontrolna grupa – miševi koji su imali funkcionalne INSR i IGF1R (*Cyp11a1Cre<sup>-/-</sup> Insr<sup>wt/fx</sup> Igflr<sup>fx/fx</sup>* i *Cyp11a1Cre<sup>-/-</sup> Insr<sup>fx/fx</sup> Igflr<sup>fx/fx</sup>*); SKO grupa – tzv. single knockout miševi sa delecijom *Igflr* (*Cyp11a1Cre<sup>+</sup> Insr<sup>wt/fx</sup> Igflr<sup>fx/fx</sup>*); DKO grupa – tzv. Double knockout miševi sa delecijom *Insr* i *Igflr* (*Cyp11a1Cre<sup>+</sup> Insr<sup>fx/fx</sup> Igflr<sup>fx/fx</sup>*). U ovom radu korišćeni su mužjaci starosti 80 dana (80. postnatalni dan). Rezultati ranijih istraživanja pokazali su da je nivo androgena u cirkulaciji statistički značajno smanjen kod *Insr/Igflr*-DKO dok je trend smanjenja primećen i u *Igflr*-SKO grupi (Radovic Pletikosic i sar., 2021; Radovic i sar., 2019).

Mušjaci pacova korišćeni u navedenim ogleđima žrtvovani su 80. postnatalnog dana i iz kaudalnih epididimisa izolovani su spermatozoidi. Rezltati pokazuju da delecija *Insr* i *Igflr* u steroidogenim tkivima utiče na broj spermatozoida u kaudalnom epididimisu (Slika 5.6.1.A). Statistički značajno smanjenje broja spermatozoida pokazano je kod *Insr/Igflr*-DKO miševa, dok je trend smanjenja broja spermatozoida primećen i kod *Igflr*-SKO miševa, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na broj spermatozoida izolovan iz kaudalnih epididimisa kontrolnih životinja. Dalja ispitivanja funkcionalnosti izolovanih spermatozoida rađena su *ex vivo* stimulacijom akrozomske reakcije progesteronom (Slika 5.6.1.B). Rezultati pokazuju da nakon stimulacije 15  $\mu$ M progesteronom spermatozoidi izolovani iz *Insr/Igflr*-DKO miševa u manjem procentu prolaze proces akrozomske reakcije, odnosno funkcionalnost spermatozoida *Insr/Igflr*-DKO miševa je statistički značajno manja u odnosu na kontrolu. Statistički značajno smanjenje % akrozomske reakcije u netretiranoj grupi uzoraka (PROG 0  $\mu$ M) primećeno kod obe eksperimentalne grupe, *Igflr*-SKO i *Insr/Igflr*-DKO, u odnosu na kontrolu. Rezultati ukazuju da delecije *Insr* i *igflr*, kao i samo *Igflr* dovode do smanjenja spontane akrozomske reakcije spermatozoida.



**Slika 5.6.1. Kondicionalna delecija *Insr* i *Igflr* gena u steroidogenim tkivima utiče na broj i funkcionalnost spermatozoida adultnih (P80) miševa.**

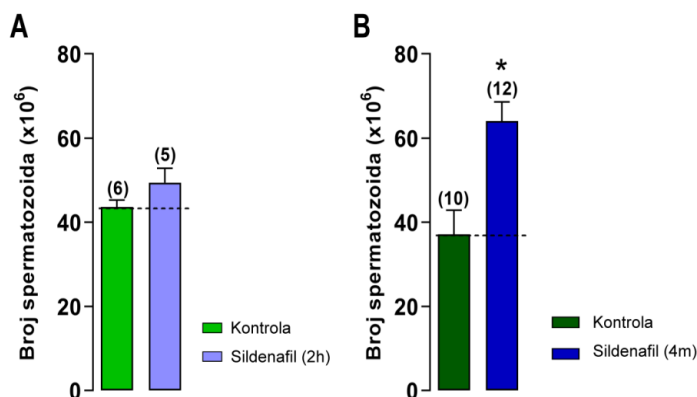
Broj (A) i funkcionalnost spermatozoida (B) promenjeni su kod SKO grupe – tzv. single knockout miševi sa delecijom *Igflr* (*Cyp11a1Cre<sup>+</sup> Insr<sup>wt/fx</sup> Igflr<sup>fx/fx</sup>*) i DKO grupe – tzv. Double knockout miševi sa delecijom *Insr* i *Igflr* (*Cyp11a1Cre<sup>+</sup> Insr<sup>fx/fx</sup> Igflr<sup>fx/fx</sup>*), u odnosu na kontrolne životinje. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz osam nezavisnih eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolu.

## 5.7. Efekat *in vivo* tretmana inhibitorom PDE5, Sildenafilom, starih mužjaka pacova na broj spermatozoida kao i molekularne profile ekspresije transkriptata za markere biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija kao i markere signalnih puteva koji ih regulišu u spermatozoidima

U cilju karakterizacije molekularnih profila mitohondrijalne biogeneze kao i njenih regulatornih molekula kao mehanizama adaptacije spermatozoida na poremećenu homeostazu androgenih hormona u cirkulaciji, dizajnirani su *in vivo* modeli sa farmakološkom intervencijom na starim mužjacima pacova uz primenu Sildenafilila. Cilj ovih ogleda bio je akutna i hronična inhibicija fosfodiesteraze 5 (PDE5) *per os* tretmanom Sildenafil citratom (Viagra®). U prvoj grupi ogleda životinje stare 18 meseci podvrgnute su akutnom tretmanu Sildenafilom, gde su životinje žrtvovane 2 sata nakon tretmana. Druga grupa ogleda podrazumevala je ponavljani tretman Sildenafilom, u kom su životinje stare 18 meseci (na početku tretmana) pojene Sildenafilom svakog dana u periodu od četiri meseca. Obe grupe eksperimenata sadržale su i kontrolnu grupu životinja koje su pojene vodom u istom periodu kao i eksperimentalne životinje. Ranija istraživanja na modelu akutne inhibicije PDE5 (Sokanovic i sar., 2021) pokazala su da akutni tretman Sildenafilom (u trajanju od 2 sata) povećava nivo androgena u serumu životinja starih 18 meseci. Takođe, hroničan tretman Sildenafilom (u trajanju od 6 meseci) povećava nivo androgena u serumu starih pacova (Sokanovic i sar., 2021, 2018). Imajući u vidu navedene rezultate, eksperimenti su dizajnirani sa ciljem ispitivanja broja spermatozoida, transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture, kao i markera cAMP i MAPK signalnih puteva u spermatozoidima starih pacova tretiranih akutno ili ponavljano inhibitorom PDE, Sildenafilom.

### 5.7.1. Ponavljani *in vivo* tretman Sildenafilom starih mužjaka pacova povećava broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa

Na osnovu rezultata ranijih istraživanja (Sokanovic i sar., 2021, 2018) poznato je da akutni i ponavljani tretman, starih mužjaka pacova, inhibitorom PDE5 Sildenafilom, dovodi do povećanja nivoa cirkulišućih androgena. Da bi se ispitao efekat povećanja nivoa cirkulišućih androgena na spermatozoide pacova dizajnirani su *in vivo* ogledi na starim mužjacima pacova (18m) koji su akutno ili ponavljano pojeni inhibitorom PDE5 Sildenafilom. Rezultati pokazuju da ponavljani tretman Sildenafilom u trajanju od 4 meseca povećava broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa pacova (Slika 5.7.1.B). Sa druge strane, akutni tretman Sildenafilom ne utiče na broj spermatozoida kaudalnih epididimisa pacova, ali se može primetiti blagi trend povećanja broja spermatozoida (Slika 5.7.1.A).



**Slika 5.7.1. Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa starih pacova akutno i ponavljano tretiranih Sildenafilom *per os*.**

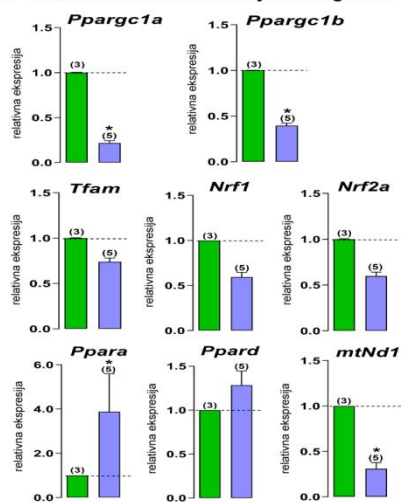
Broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa starih pacova akutno (A) i ponavljano tretiranih (B) inhibitorom PDE5 Sildenafilom. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu (netretirane životinje).

## 5.7.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija promjenjeni su u spermatozoidima starih pacova akutno tretiranih inhibitorom PDE5 Sildenafilom *per os*

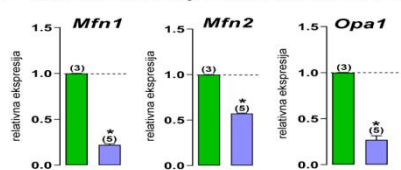
Uticaj poremećenog nivoa androgena u serumu na transkripcioni profil ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti praćen je korišćenjem *in vivo* eksperimentalnog modela na starim mužjacima pacova tretiranim inhibitorom PDE5 Sildenafilom *per os* u trajanju od 2 sata. Ranija istraživanja pokazala su da akutni tretman Sildenafilom starih mužjaka pacova (18m) dovodi do povećanja nivoa cirkulišućih androgena (Sokanovic i sar., 2021, 2018). Rezultati pokazani na Slici 5.7.2. ukazuju da povećanje nivoa testosterona u cirkulaciji utiče na nivo ekspresije glavnih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima. Relativna ekspresija transkripta master regulatora mitohondrijalne biogeneze *Ppargc1a* smanjena je u spermatozoidima pacova akutno tretiranih Sildenafilom (Slika 5.7.2.A). Akutni tretman inhibicije PDE5 smanjio je takođe i ekspresiju transkripata *Ppagrc1b* i *mtNd1*. Sa druge strane, akutni tretman Sildenafilom nije imao efekta na ekspresiju transkripata *Tfam*, *Nrf1*, *Nrf2a* i *Ppard*. Ekspresija transkripata glavnih markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture, *Mfn1*, *Mfn2* i *Opa1*, značajno je smanjena u spermatozoidima pacova akutno tretiranih Sildenafilom

(Slika 5.7.2.B). Nivoi ekspresije transkripata za glavne markere mitohondrijalne funkcionalnosti smanjen je za transkripte *Ucp2* i *Ucp3* u spermatozoidima akutno tretiranih životinja, dok je nivo ekspresije *Cox4i1*, *Cox4i2* i *Cytc* nepromenjen tretmanom (Slika 5.7.2.C).

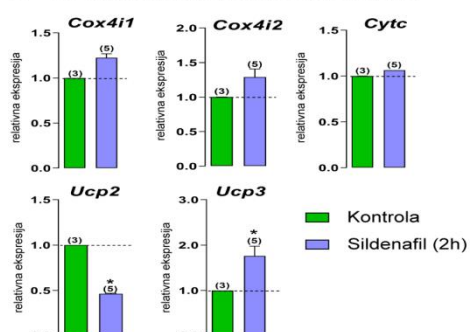
### A Glavni markeri mitohondrijalne biogeneze



### B Glavni markeri fuzije i arhitekture mitohondrija



### C Glavni markeri funkcionalnosti mitohondrija



**Slika 5.7.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija, promjenjeni su u spermatozoidima pacova akutno tretiranih inhibitorom PDE5 Sildenafilom *per os*.**

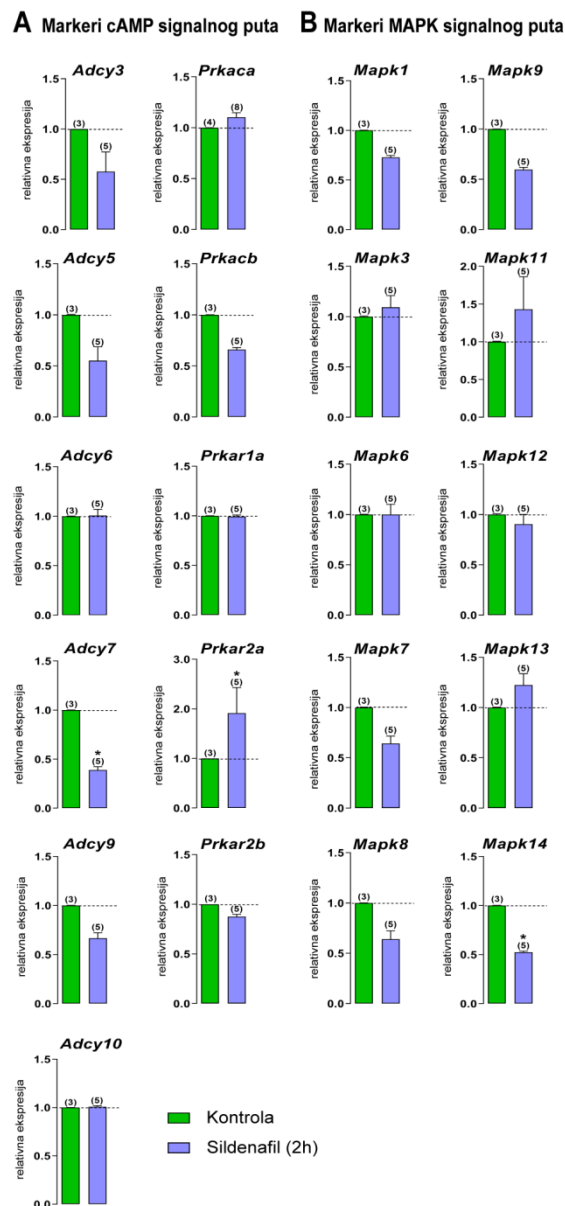
RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz životinja akutno tretiranih inhibitorom PDE5, Sildenafilom, i kontrolnih (netretiranih) životinja, i dalje korišćena za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze (A), mitohondrijalne fuzije i arhitekture (B) i mitohondrijalne funkcionalnosti (C). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu.



### 5.7.3. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima starih pacova akutno tretiranih inhibitorom PDE5 Sildenafilom *per os*

Relativna ekspresija transkripata za glavne markere cAMP i MAPK signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjena je u spermatozoidima životinja akutno tretiranih inhibitorom PDE5 Sildenafilom, u odnosu na netretirane, kontrolne životinje (Slika 5.7.3). Rezultati pokazuju da akutni tretman mužjaka pacova Sildenafilom, dovodi do povećanja ekspresije transkripata za 3 od 22 ispitivana markera signalnih molekula koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima. Nivoi ekspresije markera cAMP signalnog puta promjenjeni su samo na nivou transkripcije *Adcy7* i *Prkar2a* (Slika 5.7.3.A). Rezultati pokazuju da akutni tretman inhibitorom PDE5 u spermatozoidima starih mužjaka pacova dovodi do smanjenja nivoa transkripcije *Adcy7*, dok sa druge strane povećava nivo transkripcije *Prkar2a*. Relativna ekspresija ostalih ispitivanih transkripata nije statistički značajno promjenjena: *Adcy3*, *Adcy5*, *Adcy6*, *Adcy9*, *Adcy10*, *Prkaca*, *Prkacb*, *Prkar1a*, *Prkar2b*. Sa druge strane, nivo ekspresije markera

MAPK signalnog puta promjenjen je, u spermatozoidima životinja akutno tretiranih Sildenafilom, samo za transkript *Mapk14* (Slika 5.7.3.B). Nivoi transkripcije ostalih ispitivanih markera nisu promjenjeni akutnim tretmanom Sildenafilom: *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk6*, *Mapk7*, *Mapk8*, *Mapk9*, *Mapk11*, *Mapk12* i *Mapk13*.



**Slika 5.7.3. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima pacova akutno tretiranih inhibitorom PDE5 Sildenafilom *per os*.**

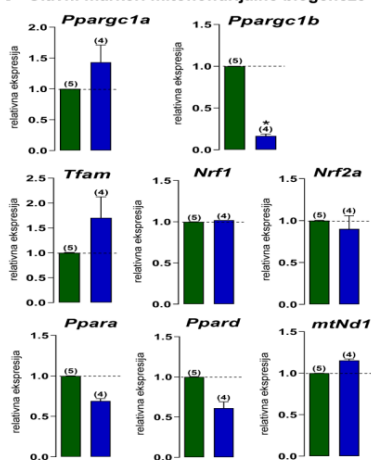
RNK je izolovana iz spermatozoa dobijenih iz životinja akutno tretiranih inhibitorom PDE5, Sildenafilom, i kontrolnih (netretiranih) životinja, i korišćena je za analizu transkripcionih profila markera cAMP signalnog puta (A) i MAPK signalnog puta (B). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu.

### 5.7.4. Ponavljani *in vivo* tretman inhibitorom PDE5 Sildenafilom menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima starih pacova

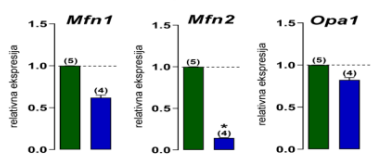
Ispitivanje uticaja poremećenog nivoa androgena u serumu na transkripcioni profil ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti rađeno je korišćenjem *in vivo* eksperimentalnog modela na starim mužjacima pacova tretiranih inhibitorom PDE5 Sildenafilom svakodnevno tokom 4 meseca. Rezultati ranijih istraživanja pokazali su da hronični tretman Sildenafilom starih mužjaka pacova (18m) dovodi do povećanja nivoa cirkulišućih androgena (Sokanovic i sar., 2021, 2018). Rezultati prikazani na Slici 5.7.4. ukazuju da hronični tretman inhibicije PDE5 utiče na nivo ekspresije glavnih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima. Relativna ekspresija glavnih markera mitohondrijalne biogeneze promenjena je nakon ponavljanog tretmana Sildenafilom samo na nivou ekspresije *Ppargc1b*, gde je tretman uzrokovao statistički značajno smanjenje ekspresije ovog transkripta u spermatozoidima (Slika 5.7.4.A). Nivoi ekspresije ostalih markera, *Ppargc1a*, *Tfam*, *Nrf1*, *Nrf2a*, *Ppara*, *Ppard* i *mtNd1*, nisu statistički značajno promenjeni ponavljanim tretmanom Sildenafilom, u odnosu na kontrolne (netretirane) životinje. Relativna ekspresija markera mitofuzije *Mfn2* smanjena je u spermatozoidima životinja koje su 4 meseca tretirane Sildenafilom u odnosu na kontrolne životinje, dok je relativna ekspresija drugih ispitivanih markera mitofuzije (*Mfn1* i *Opa1*) ostala nepromenjena nakon tretmana (Slika 5.7.4.B).

Analiza ekspresije transkripata za markere funkcionalnosti mitohondrija pokazala je da tretman Sildenafilom u trajanju od 4 meseca smanjuje nivo ekspresije *Cox4i2* u spermatozoidima, dok ne utiče na promenu ekspresije ostalih ispitivanih markera u spermatozoidima: *Cox4i1*, *Cytc* i *Ucp2* (Slika 5.7.4.C).

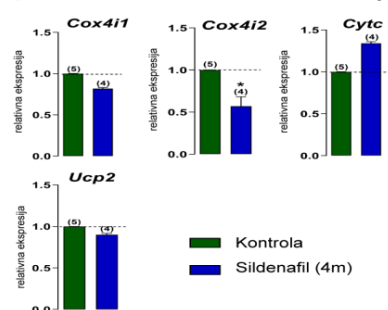
#### A Glavni markeri mitohondrijalne biogeneze



#### B Glavni markeri fuzije i arhitekture mitohondrija



#### C Glavni markeri funkcionalnosti mitohondrija



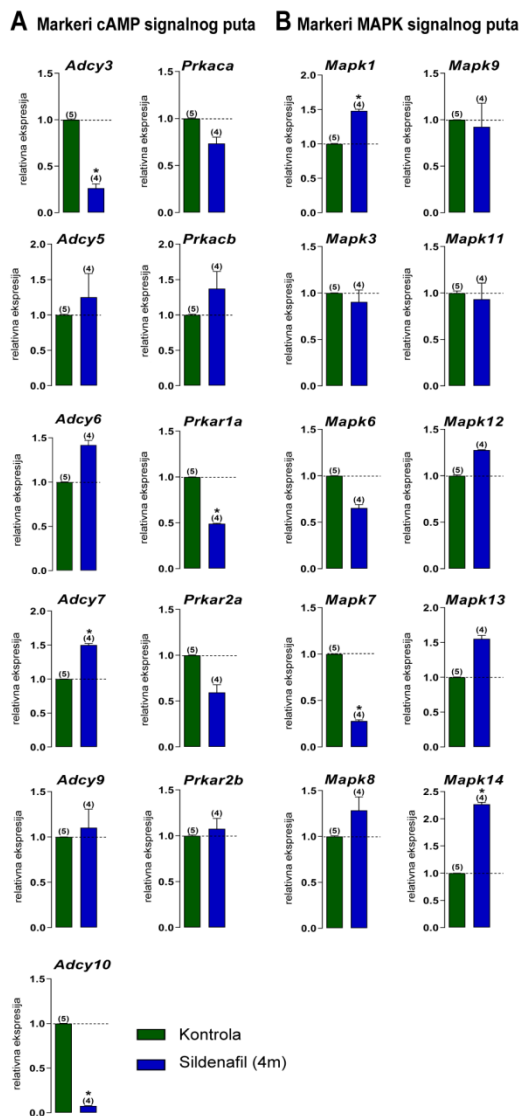
**Slika 5.7.4. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija, promenjeni su u spermatozoidima pacova tretiranih tokom 4 meseca inhibitorom PDE5 Sildenafilom *per os*.**

RNA je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz životinja tretiranih tokom 4 meseca inhibitorom PDE5, Sildenafilom, i kontrolnih (netretiranih) životinja, i dalje korišćena za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze (A), mitohondrijalne fuzije i arhitekture (B) i mitohondrijalne funkcionalnosti (C). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu.



### 5.7.5. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promenjeni su u spermatozoidima starih pacova ponavljano tretiranih inhibitorom PDE5 Sildenafilom *per os*

Analiza relativne ekspresije transkripata za molekularne markere signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti, kao i funkcionalnosti spermatozoida, pokazuje da su promenjeni nivoi ekspresije transkripata za 6 od 21 ispitivani marker u spermatozoidima starih pacova pojenih tokom 4 meseca inhibitorom PDE5 Sildenafilom (Slika 5.7.5). Relativna ekspresija transkripata, markera cAMP signalnog puta, *Adcy3* i *Adcy10* statistički je značajno smanjena u spermatozoidima životinja ponavljano tretiranih Sildenafilom u odnosu na kontrolu. Sa druge strane, u istoj grupi uzoraka hronični tretman Sildenafilom značajno je povećao ekspresiju *Adcy7* u spermatozoidima, dok nije uticao na ekspresiju ostalih ispitivanih markera (*Adcy5*, *Adcy6* i *Adcy9*). Analiza relativne ekspresije transkripata subjedinica PRKA rezultati pokazuju da je četvoromesečni tretman Sildenafilom značajno smanjio nivo ekspresije *Prkar1a* transkripta, dok nije uticao na ekspresiju *Prkaca*, *Prkacb*, *Prkar2a* i *Prkar2b* (Slika 5.7.5.A). Nivoi ekspresije transkripata MAPK singalnog puta promenjeni su nakon ponavljanog tretmana Sildenafilom u trajanju od 4 meseca. Tretman Sildenafilom statistički je značajno povećao nivo ekspresije *Mapk1* i *Mapk14* dok je smanjio nivo ekspresije *Mapk7* u spermatozoidima (Slika 5.7.5.B). Sa druge strane, nivoi ekspresije ostalih ispitivanih markera nisu značajno promenjeni u spermatozoidima tretiranih životinja u odnosu na kontrolne: *Mapk3*, *Mapk6*, *Mapk8*, *Mapk9*, *Mapk11*, *Mapk12* i *Mapk13*.

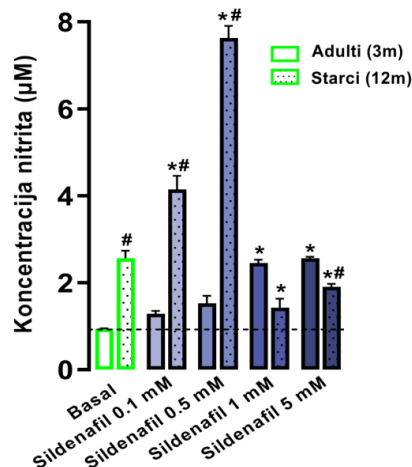
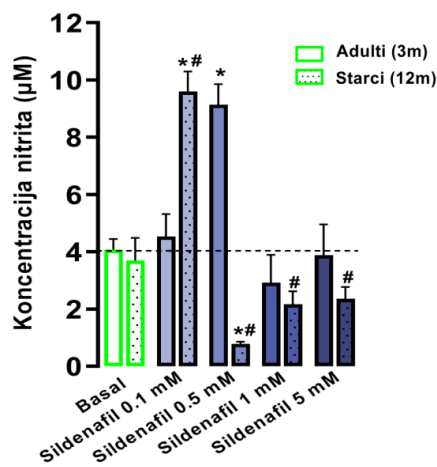


**Slika 5.7.5. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promenjeni su u spermatozoidima pacova tretiranih tokom 4 meseca inhibitorom PDE5 Sildenafilom *per os*.**

RNA je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz životinja akutno tretiranih inhibitorom PDE5, Sildenafilom, i kontrolnih (netretiranih) životinja, i korišćena je za analizu transkripcionih profila markera cAMP signalnog puta (A) i MAPK signalnog puta (B). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolnu grupu.

### 5.7.6. Efekat *ex vivo* primene inhibitora PDE5, Sildenafil, na koncentraciju nitrita u sadržaju spermatozoida kao i u ćelijskom medijumu

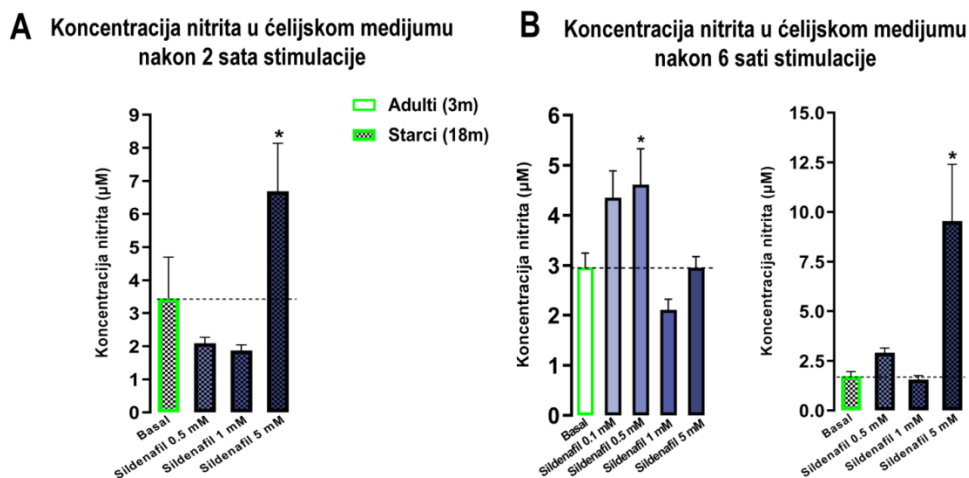
Da bismo ispitali efekat inhibitora PDE5, Sildenafil (Viagra®), pored *in vivo* eksperimentalnih modela urađeni su i eksperimenti u kojima je navedeni inhibitor korišćen *ex vivo*. Ovaj *ex vivo* eksperimentalni pristup podrazumevao je eksperimente u kojima su spermatozoidi adultnih i starih (12 i 18 meseci) mužjaka pacova tretirani inhibitorom PDE5, Sildenafilom. Tretman Sildenafilom porazumevao je korišćenje različitih doza ove supstance uz prisustvo netretiranih uzoraka (Basal). Spermatozoidi su tretirani sledećim dozama Sildenafil: 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM i 5 mM. Inkubacija spermatozoida adultnih (3m) i 12 meseci starih (12m) mužjaka pacova trajala je 6 sati, dok je inkubacija spermatozoida 18 meseci starih pacova trajala 2 sata i 6 sati, u inkubatoru na 37 °C uz blago mešanje. Rezultati pokazuju da *ex vivo* tretman spermatozoida Sildenafilom utiče na koncentraciju nitrita u ćelijskom sadržaju kao i u ćelijskom medijumu adultnih i 12 meseci starih pacova (Slika 5.7.6). Rezultati pokazuju da je koncentracija nitrita u sadržaju spermatozoida 12 meseci starih pacova (12m) statistički značajno veća u odnosu na koncentraciju u ćelijskom sadržaju adultnih pacova u grupama netretiranih uzoraka (Basal) (Slika 5.7.6.A). Posmatrajući *ex vivo* efekat Sildenafil na koncentraciju nitrita u spermatozoidima adultnih pacova (3m), može se primetiti da veće koncentracije Sildenafil (1 mM i 5 mM) statistički značajno povećavaju koncentraciju nitrita, dok deset puta manje koncentracije Sildenafil ne utiču značajno za koncentraciju nitrita u adultnim spermatozoidima. Sa druge strane, doze Sildenafil od 0.1 mM i 0.5 mM statistički značajno povećavaju koncentraciju nitrita u spermatozoidima, u poređenju sa netretiranim uzorcima (Basal), 12 meseci starih pacova. Suprotno tome, doze Sildenafil od 1 mM i 5 mM statistički značajno smanjuju koncentraciju nitrita u spermatozoidima, u poređenju sa netretiranim uzorcima (Basal), 12 meseci starih pacova. Takođe, *ex vivo* tretman Sildenafilom u dozama 0.1 mM, 0.5 mM i 5 mM statistički značajno povećava koncentraciju nitrita u spermatozoidima 12 meseci starih pacova u odnosu na netretiranu grupu spermatozoida (Basal) adultnih mužjaka pacova. Pored analize koncentracije nitrita u ćelijskom sadržaju spermatozoida adultnih i 12 meseci starih pacova, analizirana je koncentracija nitrita u ćelijskom medijumu nakon tretmana inhibitorom PDE5, Sildenafilom u različitim dozama (Slika 5.7.6.B). Rezultati pokazuju da *ex vivo* tretman Sildenafilom u dozi 0.5 mM dovodi do statistički značajnog povećanja koncentracije nitrita u ćelijskom medijumu u odnosu na netretirane uzorke (Basal) adultnih spermatozoida. Sa druge strane, *ex vivo* tretman Sildenafilom spermatozoida 12 meseci starih mužjaka pacova u dozi od 0.1 mM statistički značajno povećava koncentraciju nitrita u ćelijskom medijumu, dok Sildenafil u dozi od 0.5 mM statistički značajno smanjuje koncentraciju nitrita u ćelijskom medijumu u odnosu na netretiran uzorak (Basal). Poređenjem rezultata tretmana spermatozoida starih (12m) mužjaka pacova sa netretiranim adultnim spermatozoidima, rezultati pokazuju statistički značajno povećanje koncentracije nitrita u ćelijskom medijumu nakon tretmana dozom Sildenafil 0.1 mM, dok tretman Sildenafilom dozama 0.5 mM, 1 mM i 5 mM smanjuje koncentraciju nitrita u ćelijskom medijumu.

**A** Koncentracija nitrita u ćelijskom sadržaju**B** Koncentracija nitrita u ćelijskom medijumu

**Slika 5.7.6. Koncentracija nitrita u sadržaju spermatozoida kao i u ćelijskom medijumu nakon inkubacije adultnih i starih spermatozoida sa inhibitorom PDE5, Sildenafilom.**

Koncentracija nitrita u ćelijskom sadržaju (A) i ćelijskom medijumu (B) spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa adultnih (3m) i 12 meseci starih (12m) životinja i dalje tretiranih Sildenafilom u dozama 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM i 5 mM tokom 6 sati u kontrolisanim uslovima. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna *ex vivo* eksperimenta. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na netretiranu (Basal) grupu odgovarajuće starosne kategorije; # u odnosu na netretiranu (Basal) adultnu (3m) grupu.

Ispitivanje efekata inhibitora PDE5, Sildenafil (Viagra®), je takođe podrazumevalo eksperimente u kojima su spermatozoidi adultnih i 18 meseci starih mužjaka pacova tretirani Sildenafilom u trajanju od dva ili šest časova. Tretman Sildenafilom porazumevao je korišćenje različitih doza ove supstance uz prisustvo netretiranih uzoraka (Basal). Spermatozoidi su tretirani sledećim dozama Sildenafil: 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM i 5 mM. Inkubacija spermatozoida adultnih (3m) mužjaka pacova trajala je 6 sati, dok je inkubacija spermatozoida 18 meseci (18m) starih pacova trajala 2 sata i 6 sati, u inkubatoru na 37 °C uz blago mešanje. Rezultati pokazuju da *ex vivo* tretman spermatozoida Sildenafilom utiče na koncentraciju nitrita u ćelijskom medijumu adultnih i 18 meseci starih pacova (Slika 5.7.7). Inkubacija spermatozoida 18 meseci starih pacova u prisustvu Sildenafil koncentracije 5 mM dovela je do povećanja koncentracije nitrita u ćelijskom medijumu (Slika 5.7.7.A), dok ostale doze Sildenafil (0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM) nisu statistički značajno promenile koncentraciju nitrita u medijumu u odnosu na netretirane uzorke (Basal). Isti obrazac promene koncentracije nitrita kod pomenutih uzoraka primećen je i nakon 6 sati inkubacije (Slika 5.7.7.B) spermatozoida 18 meseci starih životinja u prisustvu 5 mM Sildenafil. Povećanje koncentracije nitrita u ćelijskom medijumu detektovano je i nakon šestočasovne inkubacije adultnih spermatozoida Sildenafilom u koncentraciji 0.5 mM.



### Slika 5.7.7. Koncentracija nitrita u ćelijskom medijumu nakon inkubacije adultnih i starih spermatozoida inhibitorom PDE5, Sildenafilom u trajanju od dva i šest sati.

Koncentracija nitrita u ćelijskom medijumu nakon dva sata stimulacije (A) i ćelijskom medijumu nakon šest sati stimulacije (B) spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa adultnih (3m) i 18 meseci starih (18m) životinja i dalje tretiranih Sildenafilom u dozama 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM i 5 mM u kontrolisanim uslovima. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna *ex vivo* eksperimenta. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na netretiranu (Basal) grupu odgovarajuće starosne kategorije.

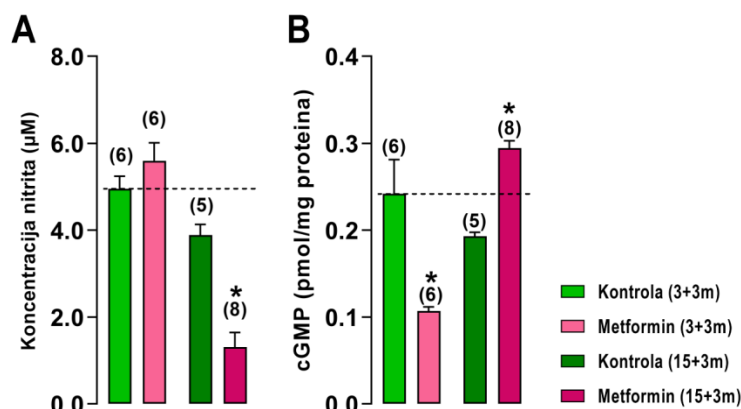
## 5.8. Efekat *in vivo* aktivacije AMPK tretmanom Metforminom, lekom za dijabetes tip 2, na profile ekspresije transkriptata za markere biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija kao i markere signalnih puteva koji ih regulišu u spermatozoidima

Da bismo ispitali efekat *in vivo* aktivacije AMPK na profile ekspresije transkriptata za markere mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i markera signalnih molekula koji ih regulišu u spermatozoidima korišćen je lek Metformin. Metformin predstavlja najčešće korišćen lek za dijabetes tip 2 obzirom na njegove sposobnosti da smanji nivo glukoze u plazmi. Metformin deluje inhibitory na mitohondrijalni kompleks I, koji dovodi do aktivacije AMPK (*engl.* adenosine 5'-monophosphate—activated protein kinase, AMPK). Kao rezultat, dolazi do smanjenja produkcije ATP-a i povećanja unutarćelijskog ADP-a. Posledično, ćelijski nivo AMP-a se povećava aktivirajući AMPK (Lv i Guo, 2020). U cilju karakterizacije profila ekspresije navedenih transkriptata u spermatozoidima starih mužjaka pacova tretiranih Metforminom dizajnirana su dva eksperimentalna pristupa. Obzirom da su u navedenim eksperimentima korišćeni neuznemiravani pacovi, kojima nije utvrđeno postojanje bilo kog oblika dijabetesa, eksperimenti su dizajnirani sa ciljem ispitivanja uticaja Metformina, koji opisanim mehanizmima utiče na aktivaciju AMPK, na broj i funkcionalnost spermatozoida kao i transkripciju markera biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija, kao i signalnih molekula koji ih regulišu, u spermatozoidima. Dva eksperimentalna pristupa podrazumevaju korišćenje iste doze Metformina (300 mg/kg) sa različitim starosnim uzrastom pacova kao i različitim periodom tretmana. Prva serija ogleada podrazumevala je korišćenje dve uzrasne kategorije životinja kao i tretman Metforminom u trajanju od tri meseca. Na početku ogleada životinje su bile starosti 3 meseca i 15 meseci. Obe uzrasne kategorije podeljene su u dve grupe, kontrolnu i eksperimentalnu. Eksperimentalna grupa životinja oba uzrasta pojena je Metforminom u koncentraciji 300 mg/kg telesne mase životinje (lek Glucophage rastvoren je u vodi), dok je kontrolna grupa životinja u istom vremenskom periodu pojena vodom. Životinje su pojene svakog dana u prepodnevnom časovima tokom tri meseca. U okviru druge serije ogleada korišćene su životinje koje su na početku ogleada bile stare 12 meseci. Životinje su kao i u prethodnom ogledu podeljene u dve grupe, kontrolnu i

eksperimentalnu. Eksperimentalna grupa pojena je Metforminom u koncentraciji 300 mg/kg telesne mase životinje, dok je kontrolna grupa životinja pojena vodom. Sve životinje su pojene svakog dana u prepodnevnim časovima tokom šest meseci.

### 5.8.1. Koncentracija nitrita i nivo cGMP promenjeni su u spermatozoidima pacova nakon tromesečnog tretmana lekom za dijabetes tip 2, Metforminom *per os*

Da bi se ispitaio efekat Metformina, najčešće korišćenog leka za dijabetes tip 2, koji deluje inhibitorno na mitohondrijalni kompleks I, i dovodi do aktivacije AMPK (Lv i Guo, 2020) dizajnirani su ogledi na dve uzrasne kategorije zdravih pacova, 3 meseca i 15 meseci stari, koji su tokom tri meseca pojeni Metforminom (3+3m i 15+3m). Kontrolne životinje su u istom periodu pojene vodom. Po isteku tromesečnog tretmana, obe uzrasne kategorije (3+3m i 15+3m) su žrtvovane i izolovani su spermatozoidi iz kaudalnog epididimisa. Nakon izolacije, spermatozoidi su korišćeni za merenje nivoa nitrita i cGMP u ćelijskom sadržaju. Rezultati pokazuju da tromesečni tretman Metforminom životinja starih 18 meseci (15+3m) dovodi do smanjenja nivoa nitrita u spermatozoidima u odnosu na netretirane životinje (Slika 5.8.1.A). Isti tip tretmana šest meseci starih životinja (3+3m) ne dovodi do statistički značajne promene koncentracije nitrita u spermatozoidima. Analizom koncentracije cGMP-a u spermatozoidima izolovanim iz kaudalnog epididimisa primećuje se smanjenje nivoa ovog sekundarnog glasnika u spermatozoidima eksperimentalne grupe 3+3m, dok isti tip tromesečnog tretmana povećava nivo cGMP u spermatozoidima grupe 15+3m u odnosu na netretirane kontrolne životinje (Slika 5.8.1.B).



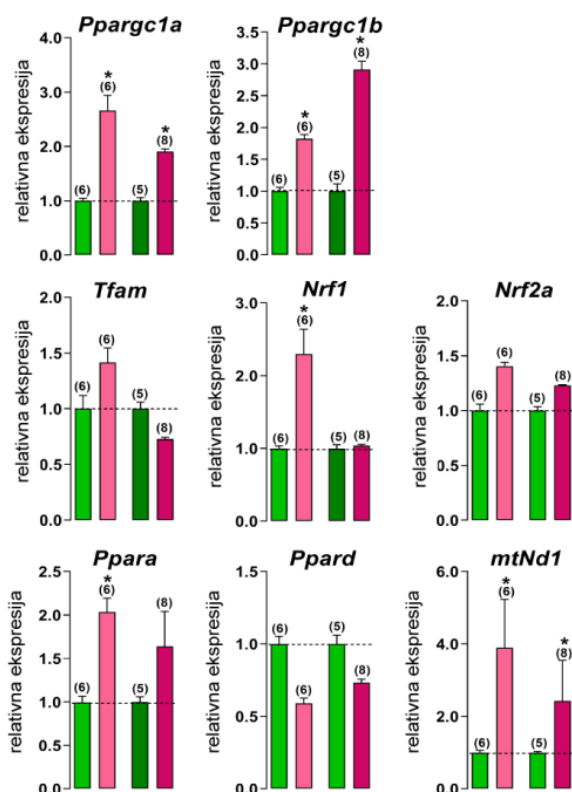
#### Slika 5.8.1. Tromesečni tretman Metforminom *per os* menja koncentraciju nitrita i cGMP u spermatozoidima.

Koncentracija nitrita (A) i cGMP-a (B) u spermatozoidima izolovanih iz kaudalnih epididimisa kontrolnih (netretiranih životinja) i životinja tretiranih tokom tri meseca Metforminom u dve uzrasne kategorije na početku tretmana, 3 meseca (3+3m) i 15 meseci (15+3m). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna *in vivo* eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu.

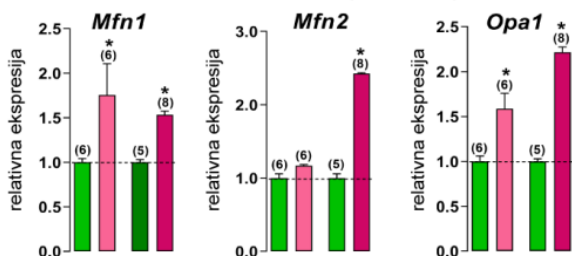
### **5.8.2. Tromesečni tretman Metforminom *per os* menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima pacova starih šest i osamnaest meseci**

Ispitivanje uticaja aktivacije AMPK na transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti rađeno je korišćenjem *in vivo* eksperimentalnog modela tromesečnog tretmana Metforminom. U eksperimentu su korišćene dve uzrasne kategorije životinja, jedna kategorija je na početku tretmana bila starosti 3 meseca dok je druga bila 15 meseci stara. Rezultati prikazani na Slici 5.8.2. ukazuju da aktivacija AMPK korišćenjem supstance Metformin *per os* utiče na nivo ekspresije glavnih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima. Relativna ekspresija transkripata glavnih markera mitohondrijalne biogeneze *Ppargc1a* i *Ppargc1b* povećana je u obe ispitivane uzrasne kategorije tretirane metforminom, 3+3m i 15+3m, u odnosu na netretirane kontrolne životinje svake kategorije. Tretman Metforminom šest meseci starih životinja (3+3m) statistički je značajno povećao nivo ekspresije transkripata *Nrf1*, *Ppara* i *mtNdl* u spermatozoidima, dok je kod osamnaest meseci starih životinja (15+3m) značajno povećanje primećeno samo na nivou ekspresije *mtNdl* transkripta. Nivoi ekspresije transkripata *Tfam*, *Nrf2a* i *Ppard* nisu promenjeni tretmanom Metforminom u spermatozoidima obe ispitivane uzrasne kategorije (Slika 5.8.2.A). Aktivacija AMPK lekom Metformin u trajanju od tri meseca, statistički je značajno povećala nivoe ekspresije transkripata glavnih markera mitofuzije *Mfn1* i *Opal* u spermatozoidima obe ispitivane uzrasne kategorije (3+3m i 15+3m) dok je ekspresija transkripta *Mfn2* povećana samo u tretiranoj grupi osamnaest meseci starih životinja (Slika 5.8.2.B). Rezultati pokazuju da tromesečni tretman Metforminom utiče na ekspresiju glavnih markera funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima (Slika 5.8.2.C) povećavajući nivo ekspresije transkripata *Cox4i2*, *Cytc* i *Ucp2* kod šest meseci starih životinja (3+3m). Sa druge strane, tretman Metforminom statistički značajno smanjuje nivo ekspresije transkripta *Ucp1* u spermatozoidima šest (3+3m) i osamnaest (15+3m) meseci starih životinja u odnosu na kontrolne (netretirane) životinje.

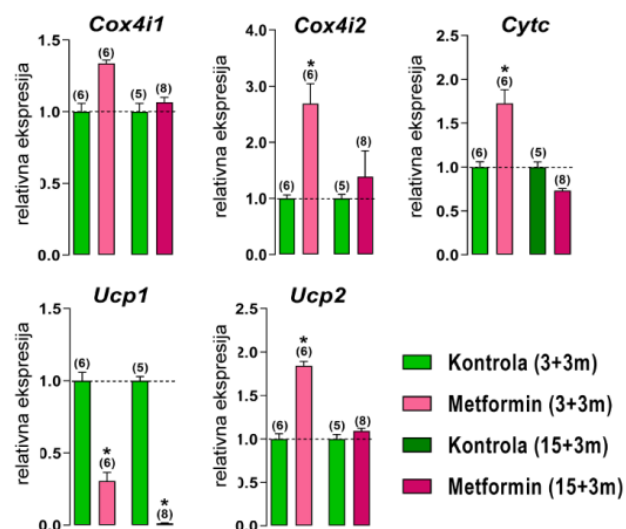
## A Glavni markeri mitohondrijalne biogeneze



## B Glavni markeri mitohondrijalne fuzije i arhitekture



## C Glavni markeri funkcionalnosti mitohondrija



**Slika 5.8.2. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija, promenjeni su u spermatozoidima šest i osamnaest meseci starih pacova tretiranih tokom 3 meseca aktivatorom AMPK, Meftorminom *per os*.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz šest (3+3m) i osamnaest (15+3m) meseci starih životinja tretiranih tokom 3 meseca aktivatorom AMPK, Metforminom *per os*, i kontrolnih (netretiranih) životinja, i dalje korišćena za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze (A), mitohondrijalne fuzije i arhitekture (B) i mitohondrijalne funkcionalnosti (C). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo P < 0.05: \* u odnosu na kontrolnu grupu svake uzrasne kategorije.

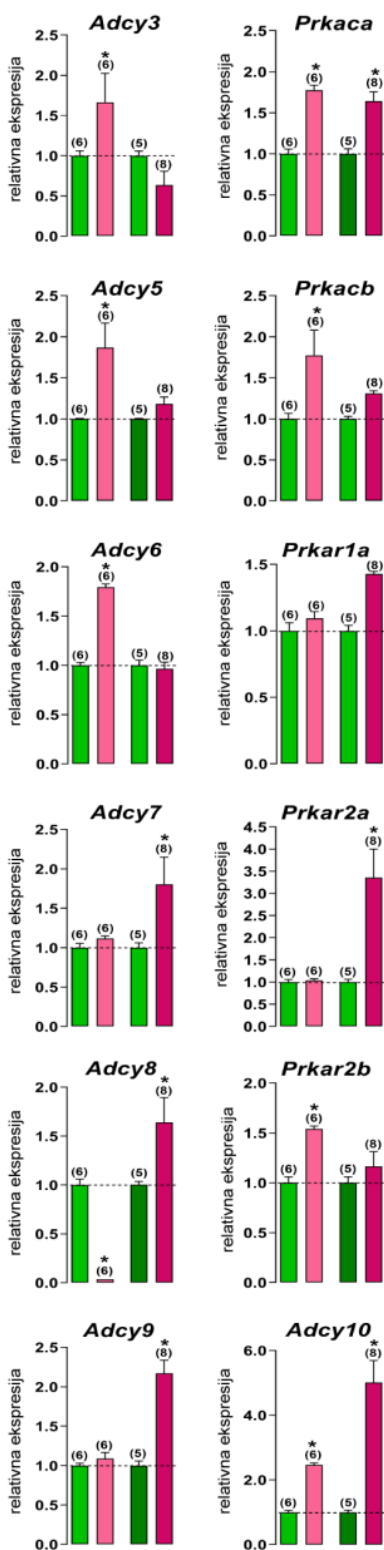


### **5.8.3. Transkripcijski profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima šest i osamnaest meseci starih pacova tretiranih tokom tri meseca aktivatorom AMPK, Metforminom *per os***

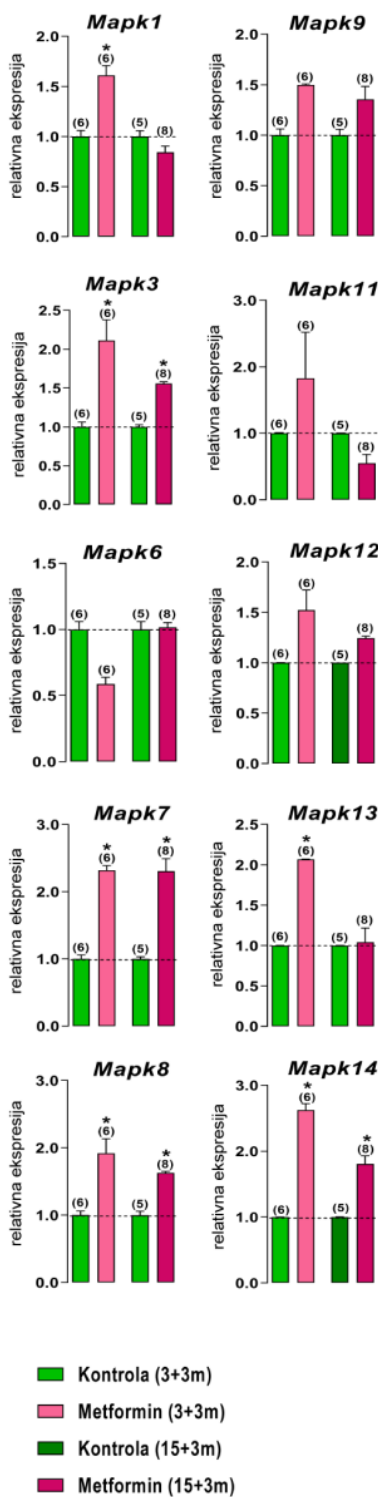
Ispitivanjem relativne ekspresije transkripata molekularnih markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti, kao i funkcionalnosti spermatozoida, rezultati pokazuju da tromesečni tretman Metforminom *per os*, menja nivo ekspresije 17 od 22 ispitivana markera u spermatozoidima šest i osamnaest meseci starih pacova (Slika 5.8.3). Relativna ekspresija markera cAMP signalnog puta promjenjena je kod 11 od 12 ispitivanih markera (Slika 5.8.3.A). Nivoi ekspresije transkripata *Adcy3*, *Adcy5*, *Adcy6* i *Adcy10* povećani su u spermatozoidima šest meseci starih životinja pojenih Metforminom u trajanju od tri meseca (3+3m), dok je nivo ekspresije *Adcy8* smanjen u spermatozoidima iste grupe životinja (3+3m) u odnosu na netretirane životinje. Tretman metforminom u trajanju od tri meseca povećao je nivo ekspresije transkripata *Adcy7*, *Adcy8*, *Adcy9* i *Adcy10* u spermatozoidima osamnaest meseci starih životinja (15+3m). Ispitivanjem nivoa ekspresije regulatornih i katalitičkih subjedinica PRKA rezultati pokazuju da Metformin povećava nivo ekspresije *Prkaca*, *Prkacb* i *Prkar2b* u spermatozoidima šest meseci starih životinja (3+3m). Takođe isti tretman Metforminom osamnaest meseci starih pacova (15+3m) povećava nivo ekspresije transkripata *Prkaca* i *Prkar2a* u spermatozoidima. Tromesečni tretman Metforminom obe uzrasne kategorije (3+3m i 15+3m) ne menja nivo ekspresije *Prkar1a* transkripta u spermatozoidima.

Relativna ekspresija transkripata markera MAPK signalnog puta promjenjena je kod 6 od 10 ispitivanih markera u spermatozoidima Metforminom tretiranih životinja u odnosu na kontrolne (Slika 5.8.3.B). Tretman metforminom u trajanju od 3 meseca statistički je značajno povećao nivo ekspresije transkripata *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk7*, *Mapk8*, *Mapk13* i *Mapk14* u spermatozoidima šest meseci starih životinja (3+3m) u odnosu na netretirane životinje. Takođe, isti tip tretmana na osamnaest meseci starim životinjama (15+3m) statistički je značajno povećao ekspresiju transkripata *Mapk3*, *Mapk7*, *Mapk8* i *Mapk14* u spermatozoidima. Nivoi ekspresije transkripata *Mapk6*, *Mapk9*, *Mapk11* i *Mapk12* u spermatozoidima nisu promjenjeni tretmanom Metforminom ni u jednoj od ispitivanih uzrasnih kategorija.

### A Markeri cAMP signalnog puta



### B Markeri MAPK signalnog puta

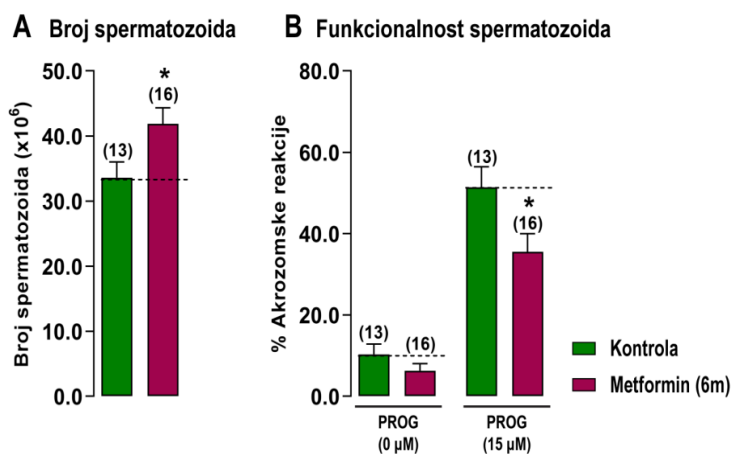


**Slika 5.8.3. Transkripcijski profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promjenjeni su u spermatozoidima šest i osamnaest meseci starih pacova tretiranih tokom 3 meseca aktivatorom AMPK, Meftorminom *per os*.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz šest (3+3m) i osamnaest (15+3m) meseci starih životinja tretiranih tokom 3 meseca aktivatorom AMPK, Metforminom, i kontrolnih (netretiranih) životinja, i dalje korišćena za analizu transkripcijskih profila markera cAMP signalnog puta (A) i MAPK signalnog puta (B). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolnu grupu svake uzrasne kategorije.

#### 5.8.4. Šestomesečni *in vivo* tretman aktivacije AMPK Metforminom menja broj i funkcionalnost spermatozoida

Ispitivanje uticaja aktivacije AMPK na transkripcioni profil ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti rađeno je korišćenjem *in vivo* eksperimentalnog modela šestomesečnog tretmana Metforminom. U okviru ove serije ogleđa korišćene su životinje koje su na početku tretmana bile stare 12 meseci. Životinje su podeljene u dve grupe, kontrolnu i eksperimentalnu. Eksperimentalna grupa pojena je Metforminom u koncentraciji 300 mg/kg telesne mase životinje, dok je kontrolna grupa životinja u istom vremenskom periodu pojena vodom. Sve životinje su pojene svakog dana u prepodnevnim časovima tokom šest meseci. Po završetku šestomesečnog tretmana životinje su žrtvovane i iz kaudalnih epididimisa izolovani su spermatozoidi. Nakon izolacije određen je broj spermatozoida, kao i funkcionalnost spermatozoida *ex vivo* stimulacijom kapacitacije i akrozomske reakcije. Rezultati pokazuju da šestomesečni tretman osamnaest meseci starih životinja lekom za dijabetes tip2 Metforminom *per os* povećava broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa (Slika 5.8.4.A), dok suprotno tome, smanjuje funkcionalnost spermatozoida (Slika 5.8.4.B) smanjujući % spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju nakon *ex vivo* stimulacije progesteronom.



#### Slika 5.8.4. Tretman Metforminom starih pacova u trajanju od šest meseci menja broj i funkcionalnost spermatozoida.

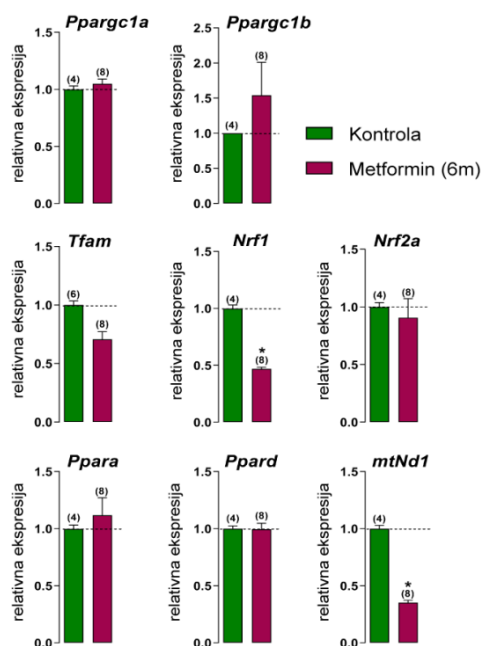
Broj (A) i funkcionalnost spermatozoida (B) promenjeni su kod 18 meseci starih životinja pojenih lekom za dijabetes tip 2, Metforminom *per os*, tokom šest meseci, u odnosu na kontrolne životinje. Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolu.

#### 5.8.5. Ponavljani *in vivo* tretman Metforminom u trajanju od šest meseci menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima starih pacova

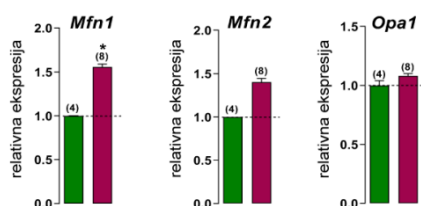
Da bismo ispitali uticaj aktivacije AMPK na transkripcioni profil ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti dizajniran je *in vivo* eksperimentalni model šestomesečnog tretmana Metforminom. U eksperimentu su korišćeni stari mužjaci pacova stari 18 meseci, koji su tretman počeli sa 12 meseci starosti. Rezultati prikazani na Slici 5.8.5. ukazuju da aktivacija AMPK tretmanom Metforminom *per os* utiče na nivo ekspresije glavnih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture kao i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima. Šestomesečni tretman starih mužjaka pacova Metforminom smanjuje nivo ekspresije transkripata *Nrf1* i *mtNdl* u spermatozoidima, dok nije uočena promena ekspresije transkripata *Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Tfam*, *Nrf2a*, *Ppara* i *Ppard* u spermatozoidima tretiranih životinja u odnosu na kontrolne (Slika 5.8.5.A). Nivoi ekspresije transkripata za glavne markere mitofuzije promenjeni su samo na nivou ekspresije *Mfn1* transkripta, gde je tretman Metforminom u trajanju od 6 meseci

povećao ekspresiju ovog transkripta, dok su nivoi ekspresije ostalih ispitivanih markera, *Mfn2* i *Opa1*, nepromenjeni tretmanom (Slika 5.8.5.B). Relativna ekspresija transkripata glavnih markera funkcionalnosti mitohondrija promenjena je u spermatozoidima starih pacova tretiranih Metforminom u trajanju od 6 meseci (Slika 5.8.5.C). Rezultati pokazuju da Metformin povećava nivo *Cox4i2* i *Ucp3* transkripcije, dok sa druge strane smanjuje nivo ekspresije transkripata *Ucp1* i *Ucp2* u spermatozoidima. Nivoi ekspresije transkripata *Cox4i1* i *Cytc* u spermatozoidima tretiranih životinja nisu statistički značajno promenjeni u odnosu na nivo ekspresije u spermatozoidima kontrolnih životinja.

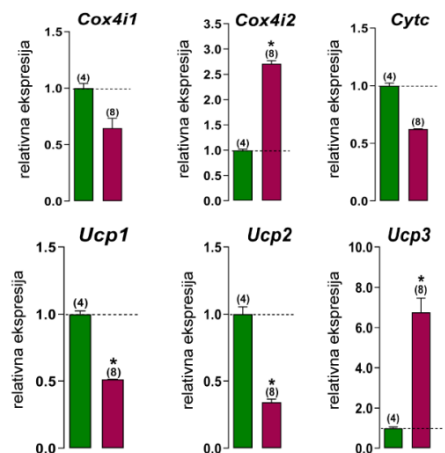
### A Glavni markeri mitohondrijalne biogeneze



### B Glavni markeri fuzije i arhitekture mitohondrija



### C Glavni markeri funkcionalnosti mitohondrija



### Slika 5.8.5. Transkripcioni profili markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija, promenjeni su u spermatozoidima starih pacova tretiranih tokom 6 meseci aktivatorom AMPK, Meftorminom *per os*.

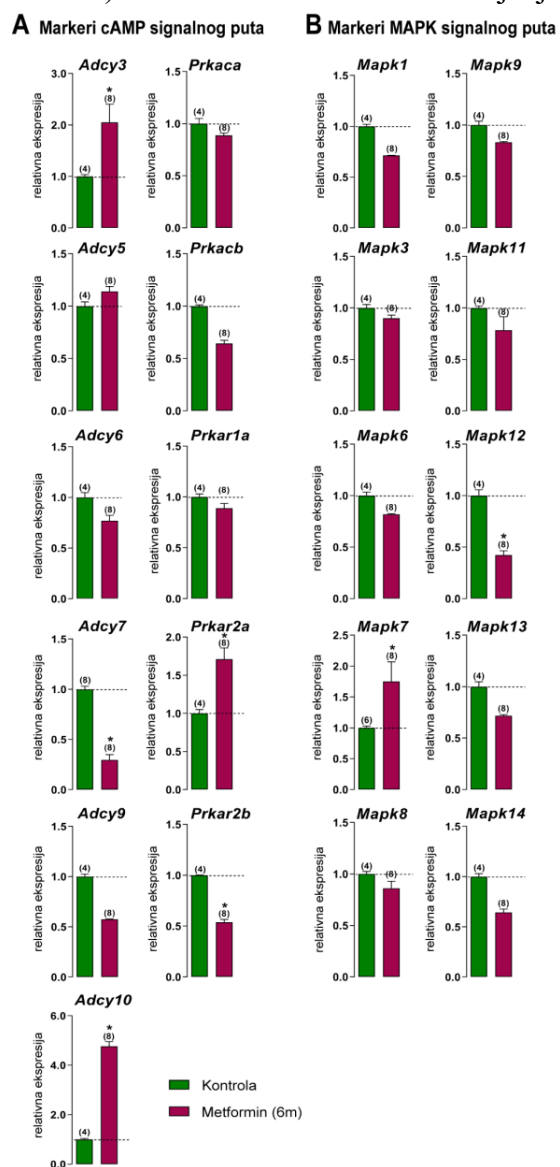
RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz osamnaest meseci starih životinja tretiranih tokom 6 meseci aktivatorom AMPK, Metforminom *per os*, i kontrolnih (netretiranih) životinja, i dalje korišćena za analizu transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze (A), mitohondrijalne fuzije i arhitekture (B) i mitohondrijalne funkcionalnosti (C). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na kontrolu.

### 5.8.6. Ponavljani tretman Metforminom *per os* u trajanju od šest meseci menja transkripcione profile markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima starih pacova

Relativna ekspresija transkripata molekularnih markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti, kao i funkcionalnosti spermatozoida, promenjena je kod 7 od 21 ispitivani marker u spermatozoidima starih pacova tretiranih tokom 6 meseci lekom za dijabetes tip 2, Metforminom (Slika 5.8.6). Relativna ekspresija transkripata markera cAMP signalnog puta promenjena je kod 5 od 11 ispitivanih markera (Slika 5.8.6.A). Nivoi ekspresije transkripata *Adcy3*, *Adcy10* i *Prkar2a* povećani su u spermatozoidima starih pacova tretiranih tokom 6 meseci supstancom Metformin *per os*, dok je navedeni tretman doveo do smanjenja nivoa ekspresije *Adcy7* i *Prkar2b* transkripata u odnosu na kontrolu. Nivoi ekspresije ostalih ispitivanih markera cAMP signalnog puta u spermatozoidima ostali su nepromenjeni nakon šestomesečnog tretmana Metforminom *per os*: *Adcy5*, *Adcy6*, *Adcy9*, *Prkaca*, *Prkacb* i *Prkar1a*.

Relativna ekspresija transkripata markera MAPK signalnog puta promenjena je kod 2 od 10 ispitivanih markera u spermatozoidima Metforminom tretiranih životinja u odnosu na kontrolne (Slika 5.8.6.B). Tretman Metforminom u trajanju od 6 meseci statistički je značajno povećao nivo ekspresije

transkripta *Mapk7*, dok je sa druge strane smanjio nivo ekspresije transkripta *Mapk12* u spermatozoidima, u odnosu na kontrolu. Nivoi ekspresije ostalih ispitivanih markera MAPK signalnog puta ostali su nepromenjeni nakon šestomesečnog tretmana Metforminom *per os*: *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk6*, *Mapk8*, *Mapk9*, *Mapk11*, *Mapk13* i *Mapk14*.



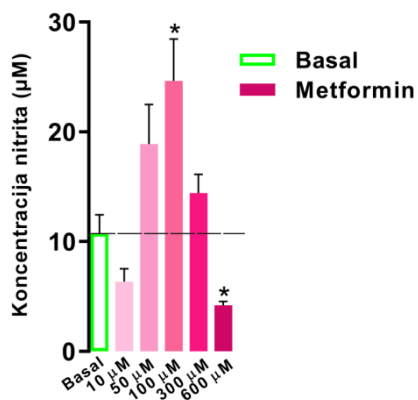
**Slika 5.8.6. Transkripcioni profili markera signalnih puteva koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti promenjeni su u spermatozoidima osamnaest meseci starih pacova tretiranih tokom 6 meseci aktivatorom AMPK, Metforminom *per os*.**

RNK je izolovana iz spermatozoida dobijenih iz osamnaest meseci starih životinja tretiranih tokom 6 meseci aktivatorom AMPK, Metforminom *per os*, i kontrolnih (netretiranih) životinja, i dalje korišćena za analizu transkripcionih profila markera cAMP signalnog puta (A) i MAPK signalnog puta (B). Dobijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz dva nezavisna eksperimenata. Brojevi u zagradi iznad stubića označavaju broj analiziranih životinja. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ ; \* u odnosu na kontrolu.

### 5.8.7. Efekat *ex vivo* primene Metformina na koncentraciju nitrita u ćelijskom medijumu adultnih spermatozoida

Da bi se ispitaio efekat Metformina, najčešće korišćenog leka za dijabetes tip 2, koji deluje inhibitorno na mitohondrijalni kompleks I, i dovodi do aktivacije AMPK (Lv i Guo, 2020) dizajniran je *ex vivo* eksperimentalni pristup. U okviru navedene grupe *ex vivo* eksperimenata spermatozoidi adultnih mužjaka pacova tretirani su sledećim dozama Metformina: 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  i 600  $\mu\text{M}$ . U svim ogledima bili su prisutni i netretirani uzorci spermatozoida (Basal). U ogledima su korišćeni spermatozoidi izolovani iz kaudalnog epididimisa adultnih pacova. Inkubacija uzoraka trajala je 6 sati u inkubatoru na 37 °C uz blago mešanje. Rezultati pokazuju da šestočasovni tretman adultnih spermatozoida dovodi do povećanja koncentracije nitrita u ćelijskom medijumu nakon inkubacije Metforminom doze 100  $\mu\text{M}$ , dok sa druge strane Metformin u dozi 600  $\mu\text{M}$  dovodi do statistički značajnog smanjenja koncentracije nitrita u medijumu u odnosu na netretirane uzorke (Basal) (Slika 5.10.1).

#### Koncentracija nitrita u ćelijskom medijumu



**Slika 5.8.7. Koncentracija nitrita u ćelijskom medijumu nakon inkubacije adultnih spermatozoida Metforminom, lekom za dijabetes tip 2, u trajanju od šest sati.**

Koncentracija nitrita u ćelijskom medijumu nakon šest stimulacije spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa adultnih (3m) životinja i dalje tretiranih Metforminom u dozama 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  i 600  $\mu\text{M}$  u kontrolisanim uslovima. Dobjijene vrednosti su prikazane stubićima i predstavljaju srednje  $\pm$  SEM vrednosti iz tri nezavisna *ex vivo* eksperimenta. Statistička značajnost je postavljena na nivo  $P < 0,05$ : \* u odnosu na netretiranu (Basal) grupu.

# **6. Diskusija**



## **6.1. Stres menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze u hipotalamusu, adenohipofizi, nadbubrežnoj žlezdi kao i spermatozoidima adultnih pacova**

Reakcija “borba ili beg” je univerzalan mehanizam od izuzetne fiziološke i patofiziološke važnosti. Odgovor organizma na stres je kompleksan, multifaktorijalan proces koji uključuje razrađenu neuroendokrinu, ćelijsku i molekularnu mrežu (Chrousos, 2009; Manoli i sar., 2007; Pacák i Palkovits, 2001; Picard i sar., 2018; Pitman i sar., 2012; Sapolsky, 2005). Uzimajući u obzir važnu ulogu mitohondrija u fiziologiji ćelije, očigledno je da su ove organele među prvima u liniji odgovora na različite tipove stresora koji pokušavaju da naruše homeostazu ćelija i organizma (Chrousos, 2009; Manoli i sar., 2007). Mitohondrije predstavljaju veoma dinamične organele koje često i brzo prolaze procese fuzije i fisije, kao i mitohondrijalne biogeneze i mitofagije, da bi održale veoma dobro organizovanu mrežu u odgovoru na zahteve ćelije i informacija iz okruženja (Archer, 2013; Palikaras i Tavernarakis, 2014; Villa i sar., 2017). Forma i pravilno funkcionisanje mitohondrijalne mreže održano je bidirekcionim odnosima samih mitohondrija ali i odnosima sa drugim organelama uključujući jedro i endoplazmatični retikulum (Archer, 2013; St-Pierre i sar., 2006). Međutim, geni i mehanizmi koji posreduju organizaciji nekih od procesa mitohondrijalne dinamike u periodima stresa i dalje su nedovoljno poznati. Stoga je u istraživanju opisanom u ovoj doktorskoj disertaciji, primarna kultura hipotalamusa, adenohipofize, adrenalne žlezde, kao i Lajdigovih ćelija i spermatozoida, korišćena za praćenje transkripcionog profila markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture kao i markera silgnalnih puteva koji ih regulišu.

### **6.1.1. Akutni i ponavljani imobilizacioni stres menjaju transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze u hipotalamusu, adenohipofizi i nadbubrežnoj žlezdi adultnih pacova**

Fiziološki odgovor koji je pokrenut psihofizičkim stresorom, kako kod ljudi tako i kod životinja, varira u prirodi i veličini. Odgovor “borbe ili bega” predstavlja univerzalni mehanizam od izvanredne fiziološke i patofiziološke značajnosti. U cilju odgovora na stres, organizam podleže kompleksnim, multifaktorijalnim procesima koji uključuju razrađenu neuroendokrinu, ćelijsku i molekularnu infrastrukturu (Chrousos, 2009; Manoli i sar., 2007; Pacák i Palkovits, 2001; Picard i sar., 2018; Pitman i sar., 2012; Sapolsky, 2005). Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put pokazuju profile ekspresije transkriptata i proteina koji predstavljaju glavne markere mitohondrijalne biogeneze u hipotalamusu, adenohipofizi i nadbubrežnoj žlezdi stresiranih mužjaka pacova. Ovakvim scenarijom ekspresije molekularnih markera mitohondrijalne biogeneze, moguće je da hipotalamus, adenohipofiza kao i nadbubrežna žlezda pokušavaju da očuvaju i održe bazalne funkcije tokom perioda stresa.

Uzimajući u obzir važnu ulogu mitohondrija u fiziologiji ćelije, očigledno je da su ove organele među prvima u liniji odgovora na različite tipove stresora koji pokušavaju da naruše homeostazu ćelija i organizma (Chrousos, 2009; Manoli i sar., 2007). Mitohondrije su veoma dinamične organele koje često i brzo prolaze procese fuzije i fisije, kao i mitohondrijalne biogeneze i mitofagije, da bi održale veoma dobro organizovanu mrežu u odgovoru na zahteve ćelije i informacije iz okruženja (Archer, 2013; Palikaras i Tavernarakis, 2014; Villa i sar., 2017). Forma i pravilno funkcionisanje mitohondrijalne mreže održava se bidirekcionim odnosima samih mitohondrija, ali i odnosima sa drugim organelama uključujući jedro i endoplazmatični retikulum. Nekoliko važnih procesa kojima se održava homeostaza mitohondrijalne mreže uključuju transport mitohondrija, fuziju, fisiju, biogenezu, autofagiju, odnos sa endoplazmatičnim retikulumom i odnos sa jedrom (Archer, 2013; St-Pierre i sar., 2006). Takođe, jasno je pokazano da mitohondrije mogu da regulišu kompleksne, fiziološke odgovore na nivou kako ćelije tako i organizma. Rezultati ove doktorske disertacije na adultnim mužjacima pacova, pokazuju da su markeri mitohondrijalne biogeneze, uključeni u integrisani odgovor na psihofizički stres. Da bi se zadovoljile energetske potrebe ćelije i kompenzovala oštećenja, PGC1 koaktivator je kao master regulator uključen u transkripcionu kontrolu svih procesa povezanih sa

homeostazom mitohondrija; integrator signala spoljašnje sredine (Dominy i Puigserver, 2013; Scarpulla, 2008; Scarpulla i sar., 2012); regulator medijatora mitohondrijalne fuzije (Archer, 2013; Palikaras i Tavernarakis, 2014; Villa i sar., 2017). Rezultati ove disertacije (Slika 5.1.2. i Slika 5.1.3) pokazuju da je ekspresija PGC1 značajno povećana u adenohipofizi 10xIMO životinja, ali ne i u hipotalamusu stresiranih životinja. Iako, prema našim poslednjim saznanjima, ne postoje publikovani dokazi o efektu psihofizičkog stresa na ekspresiju PGC1 u hipotalamusu ili adenohipofizi, pokazano je da je PGC1 uključen u regulaciju brojnih procesa (Bouchez i Devin, 2019; St-Pierre i sar., 2006), da pojačano vežbanje povećava mitohondrijalnu biogenezu u mozgu (Steiner i sar., 2011) i da su mitohondrijalna biogeneza i PGC1 $\alpha$  regulisani ćelijskim stresom (Wenz, 2013). Takođe, PGC1 $\beta$  koordiniše mitohondrijalnu funkciju u mozgu, a uklanjanje PGC1 $\beta$  sprečava mTOR zavistan odgovor na stres endoplazmatskog retikuluma u nervnim ćelijama (Camacho i sar., 2012). Obzirom da je pokazano da je PGC1 $\alpha$  neophodan za pokretanje mnogih ROS-detoksifikacijskih enzima (Bouchez i Devin, 2019; St-Pierre i sar., 2006), moguće je da u hipotalamusu i adenohipofizi PGC1 funkcioniše na sličan način. Aktivirani PGC1 $\alpha/\beta$  vezuju se za transkripcione faktore (uključujući NRF1, NRF2, TFAM) sa ciljem regulacije mitohondrijalnih proteina kodiranih jedarnim genomom. Nakon transkripcije i translacije novosintetisani mitohondrijalni proteini bivaju importovani u mitohondrije preko translokaze kompleksa spoljašnje i unutrašnje membrane. Dalje, importovani mitohondrijalni proteini bivaju ugrađeni u OXPHOS enzimske komplekse (Dominy i Puigserver, 2013; Palikaras i Tavernarakis, 2014). Moguće je i da PGC1 takođe povećava transkripciju dodatnih mitohondrijalnih proteina kao što su transporteri holesterola i OXPHOS kompleksi enzima. Pokazano je da su PRKA, CREB i PGC1 $\alpha$  uključeni u regulaciju OXPHOS u ćelijskoj tranziciji od replikacije do stanja mirovanja (Signorile i sar., 2014). Rezultati ove disertacije pokazuju povećanje ekspresije NRF1, TFAM u hipotalamusu i TFB1M u adenohipofizi stresiranih životinja (Slika 5.1.2.B i Slika 5.1.3.B), što je u saglasnosti sa činjenicom da glukokortikoidi stimulišu mitohondrijalnu biogenezu u skeletnim mišićima (Weber i sar., 2002). Dalje, rezultati pokazuju da akutni kao i ponavljani stres značajno povećavaju ekspresiju *Ppard* transkripta u hipotalamusu i adenohipofizi, što je u saglasnosti sa činjenicom da stres stimuliše PPAR $\gamma$  u mozgu (García-Bueno i sar., 2008). Navedeni podaci ukazuju da aktivacija PPAR- $\beta/\delta$  ima potencijalnu neuroprotektivnu ulogu u ishemijskom šoku (García-Bueno i sar., 2008), tako da povećana transkripcija *Ppard* u hipotalamusu i adenohipofizi stresiranih pacova može biti adaptivni odgovor na stres. Aktivacija hipotalamo-hipofizno-adrenalne stres osovine indukuje ćelijski oksidativni stres (Spiers i sar., 2015). Sa druge strane, disfunkcije mitohondrija menjaju hipotalamo-hipofizno-adrenalnu osovinu, simpatiko-adrenalno-medularnu aktivaciju i nivo kateholamina, kao i cirkulišućih metabolita i ekspresiju hipokampalnih gena u odgovoru na stres (Picard i sar., 2018). Pokazano je da su mitohondrijalni energetske i redoks balans modulatori glavnih patofizioloških poremećaja povezanih sa različitim bolestima (Picard i sar., 2018). Takođe, neke bolesti centralnog nervnog sistema povezane su sa oštećenjima bioenergetike mitohondrija a često i poremećajima dinamike mitohondrija (Simmons i sar., 2020). Shodno tome, moguće je da akutni stres aktivira takozvani „program energetske čišćenja“ obzirom da PGC1, protein neophodan za stvaranje novih mitohondrija, takođe štiti od oksidativnih oštećenja (Finkel, 2006). Moguće je da detektujući unutarćelijski energetske status, funkcionalnost mitohondrija i produkcija ROS regulišu mitohondrijalnu biogenezu u hipotalamusu i adenohipofizi koordinišući informacije različitih signalnih puteva.

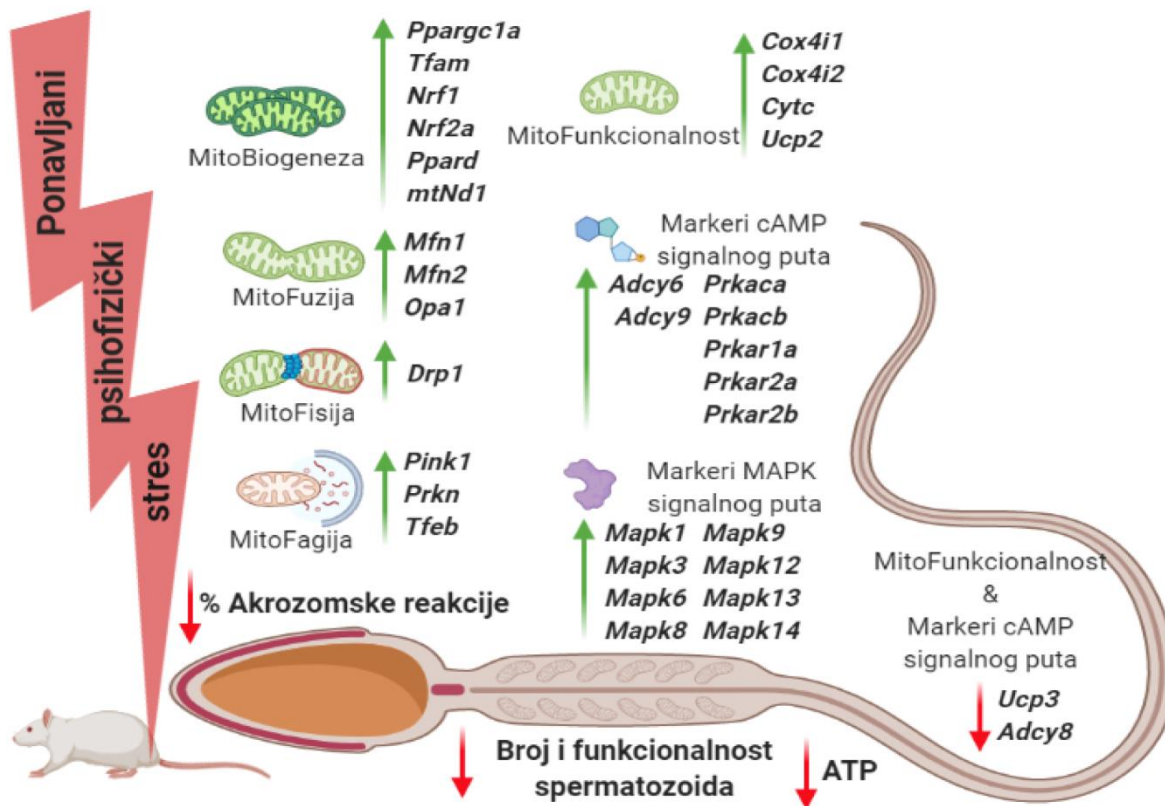
Sa druge strane, prve faze u biosintezi steroidnih hormona dešavaju se u mitohondrijama, za koje je poznato da prolaze procese dinamičkih promena. Stoga je verovatno da će ćelijske i molekularne promene u mitohondrijama uticati na steroidogenu. Mnoge studije su pokazale da su promene mitohondrijalne dinamike blisko povezane sa biosintezom steroidnih hormona u steroidogenim ćelijama (Bassi i sar., 2021). Takođe, korelacija između mitohondrijalne strukture i stanja diferencijacije steroidogenih ćelija implicira da i steroidogeni enzimi u mitohondrijama mogu

imati ulogu u kontroli strukture i funkcije mitohondrija (Chien i sar., 2017). Rezultati ove doktorske disertacije (Slika 5.1.4.) po prvi put pokazuju uticaj akutnog i ponavljanoog stresa na ekspresiju markera mitohondrijalne biogeneze u celoj adrenalnoj žlezdi, kao i pojedinačno u korteksu i meduli adrenalne žlezde. Ekspresija transkripta koji kodira PGC1, master regulator mitohondrijalne biogeneze (Dominy i Puigserver, 2013), *Ppargc1a* smanjena je u korteksu kao i u meduli adrenalne žlezde svih stresiranih grupa životinja (1xIMO, 2xIMO i 10xIMO). Takođe, nivo ekspresije *Ppargc1b* smanjen je u korteksu adrenalne žlezde akutno i ponavljano stresiranih životinja. Iako prema poslednjim saznanjima ne postoje publikovani dokazi o efektu psihofizičkog stresa na ekspresiju PGC1 u korteksu ili meduli adrenalne žlezde, pokazan je smanjen nivo ekspresije PGC1 $\alpha$  u ćelijama miokardijuma miševa sa hroničnom bolešću bubrega (Huang i sar., 2020). Suprotno obrascu ekspresije transkripata koji kodiraju PGC1, rezultati pokazuju da su akutni (1xIMO) i ponavljani (2xIMO i 10xIMO) stres povećali nivo ekspresije *Cytc* transkripta, dok je samo deset puta ponavljani imobilizacioni stres povećao nivo ekspresije *Cox4i1* u ćelijama korteksa adrenalne žlezde. Rezultati pokazuju da u uzorku cele adrenalne žlezde nema statistički značajne promene na nivou ekspresije transkripata *Cox4i1* i *Cox4i2* u svim stresiranim grupama (Slika 5.1.4.A), što je u saglasnosti sa činjenicom da stres izazvan promenom temperature tokom jednog sata u periodu od četrnaest dana nije uticao na ekspresiju proteina COX-IV u adrenalnoj žlezdi (Prasad i sar., 2016). Dalje, rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da akutni kao i ponavljani stres značajno povećavaju ekspresiju *Ppard* transkripta u celoj adrenalnoj žlezdi, kao i pojedinačno u korteksu i meduli adrenalne žlezde, što se može dovesti u vezu sa oksidativnim stresom koji je verovatno prisutan u ćelijama ove žlezde, obzirom da je pokazano da antioksidativna suplementacija smanjuje ekspresiju PPAR $\gamma$  u adrenalnoj žlezdi (Ventura i sar., 2020). Rezultati ove disertacije pokazuju smanjenje ekspresije *Ucp1* u celoj adrenalnoj žlezdi stresiranih životinja, što je u saglasnosti sa činjenicom da temperaturni stres u trajanju od 24 sata ne povećava ekspresiju UCP1 proteina u adrenalnoj žlezdi miševa (Fujita i sar., 2021), kao i da kortikosteron smanjuje ekspresiju *Ucp1* u ćelijama braon masnog tkiva (van den Beukel i sar., 2014).

Uzimajući u obzir sve navedeno, moguće je da su stresom indukovane ekspresije i jedarnih i mitohondrijalnih gena učestvovala u ekspanziji mreže ove organele, kao i u olakšavanju procesa stresom-regulisane mitohondrijalne biogeneze kao mehanizma koji učestvuje u adaptivnom odgovoru sa ciljem održanja homeostaze i sprečavanja gubitka funkcije. Obzirom na važnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine, kao i uloge mitohondrija u odgovoru na stres i metabolički sindrom, dobijeni rezultati ove doktorske disertacije mogu poslužiti kao osnova za dalja istraživanja procesa mitohondrijalne biogeneze i u drugim tkivima kao što su mrko i belo masno tkivo, kao i kardiovaskularni sistem stresiranih organizama. Ovakve studije su veoma važne obzirom da je stres konstantan faktor u životu i da je postao jedan od veoma važnih uzročnika zdravstvenih problema modernog društva (Chrousos, 2009; Manoli i sar., 2007; Pitman i sar., 2012; Sapolsky, 2005). Takođe, stres i emocionalne mreže mozga neguju ponašanja u ishrani koja mogu dovesti do gojaznosti i aktiviranja mreže neuralnog-stres-ponašanja, povećanja emocionalne aktivnosti i smanjenih izvršnih funkcija (Dallman, 2010). Sa druge strane, nekoliko dokaza potkrepljuje činjenicu da su oštećenja mitohondrija povezana sa patofiziološkim stres-povezanim bolestima (Archer, 2013; Chrousos, 2009; Manoli i sar., 2007; Palikaras i Tavernarakis, 2014; Picard i sar., 2018; Pitman i sar., 2012; Villa i sar., 2017). Obzirom da su oštećenja mehanizama kontrole kvaliteta mitohondrija povezana sa različitim bolestima razvoj terapijskih strategija je usmeren na održavanje i/ili oporavak homeostaze mitohondrija i povezanih ćelijskih procesa. Specifično, farmakološka indukcija mitohondrijalne biogeneze, stvaranje novih, funkcionalnih mitohondrija, predstavlja obećavajući terapeutik za različite akutne i hronične bolesti karakterisane oštećenjima mitohondrija (Simmons i sar., 2020).

### **6.1.2. Akutni i deset puta ponavljani imobilizacioni stres menjaju transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima adultnih pacova**

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji po prvi put pokazuju da stres pokreće promene transkripcionog profila markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti kao i signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku kao i broj i funkcionalnost spermatozoida. Obzirom da većina efekata (91%) na nivou ekspresije transkripata predstavlja značajno povećanje (Slika 6.1.1), moguće je da ovakav obrazac ekspresije predstavlja adaptivni mehanizam koji održava funkcionalnost spermatozoida. Sa promenama transkripcionih profila, spermatozoidi možda pokušavaju da sačuvaju homeostazu mitohondrijalne mreže kao i sopstvenu aktivnost obzirom da oba tipa stresa značajno smanjuju produkciju ATP-a u spermatozoidima. Važno je napomenuti da su afektovane molekule veoma važne za funkcionalnost spermatozoida a posledično i za fertilitet jedinke. Nekoliko dokaza potvrđuje gorepomenuto. 1) Ponavljani psihofizički stres smanjuje broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa. 2) Oba tipa stresa, akutni i ponavljani stres, značajno smanjuju funkcionalnost spermatozoida kao i nivo ATP-a u spermatozoidima. 3) Stres značajno smanjuje transkripciju 77% ispitivanih markera dinamike i funkcionalnosti mitohondrija. Sve pomenute signalne molekule poznate su kao esencijalni regulatori broja i funkcionalnosti spermatozoida (Silva i sar., 2015), a takođe su poznate i kao regulatori markera mitohondrijalne dinamike (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020), i stoga su veoma važne za (in)fertilitet jedinke. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji u saglasnosti su sa radovima u kojima je pokazano da hronični isprekidani stres smanjuje broj spermatozoida (Nirupama i sar., 2013), broj spermatogenih ćelija (Hou i sar., 2014), pokretljivost spermatozoida (Mehfooz i sar., 2018) i kvalitet spermatozoida (Demirci i Sahin, 2019) mužjaka pacova. Inhibitorna uloga hormona stresa na funkcionalnost spermatozoida u saglasnosti je sa poremećenom spermatogenezom indukovanom stres-signalizacijom putem glukokortikoidnog receptora (Zou i sar., 2019)), kao i smanjenjem nivoa testosterona i pokretljivosti spermatozoida kod muških trkača (De Souza i sar., 1994). Osim toga, fertilitet i spermatogeneza poremećeni su kod mužjaka 1-ADR knockout miševa (Mhaouty-Kodja i sar., 2007). Kod ljudi, stres je povezan sa smanjenjem procenta progresivno pokretnih spermatozoida (Fenster i sar., 1997), i pokazano je da pacijenti sa posttraumatskim stres poremećajem imaju viši sekundarni infertilitet (Elezaj i sar., 2015). Stoga sve navedeno ukazuje na važnost i kompleksnost učešća stres signalizacije u homeostazi spermatozoida i fertiliteta.



**Slika 6.1.1. Ponavljani psihofizički stres remeti transkripcijski profil markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti, kao i markera signalnih puteva koji ih regulišu, vodeći ka smanjenju broja i funkcionalnosti spermatozoida.**

Rezultati jasno pokazuju (Slika 5.1.9.) da ponavljani stres dramatično menja transkripcijske profile ekspresije markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti, kao i signalnih molekula koji regulišu homeostazu mitohondrija i fertilitet jedinki, povećavajući nivo transkripcije 30 od 32 (94%) ispitivanih markera. Ovakvo povećanje mogući je adaptivni mehanizam koji održava energetska stabilnost i čuva sposobnost za fertilizaciju. Teško je porediti dobijene rezultate obzirom da ne postoji veliki broj dokaza drugih autora. Ipak, pokazano je da su *PPARGC1A* i *PRKARIA* promijenjeni u spermatozoidima pacijenata sa tip 2 dijabetesom (Chen i sar., 2020). Osim toga, povećanje ekspresije *Nrf2* smanjuje testikularnu inflamaciju (Gawish i sar., 2020), dok ekspresija gena za TFAM pozitivno korelira sa abnormalnim formama, fragmentacijom DNK spermatozoida i brojem kopija mitohondrijalne DNK (Borges i sar., 2019; Faja i sar., 2019). TFAM esencijalan je za transkripciju mtDNK kod životinja i čoveka. Pokazano je da testis-specifičnoj izoformi TFAM miša nedostaje mitohondrijalna target sekvenca kao i da je prisutna samo u jedru spermatocita i izduženih spermatida (Larsson i sar., 1996). Rezultati ove doktorske disertacije (Slika 5.1.9. i Slika 5.1.10), koji pokazuju značajno povećanje nivoa *Ucp2* u spermatozoidima i stresiranih i adrenalinom stimuliranih spermatozoida, mogu biti moguće objašnjenje za rezultate drugih autora koji pokazuju da prisustvo UCP2 ublažava gubitak pokretljivosti humanih spermatozoida (Wang i sar., 2018). Obzirom da su transkripti glavnih markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture (*Mfn1*, *Mfn2* i *Opa1*), koji su važni za homeostazu mitohondrijalne mreže kao i funkcionalnosti (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015), dramatično povećani u spermatozoidima stresiranih životinja, ovi rezultati možda mogu objasniti rezultate drugih autora koji su pokazali pozitivnu korelaciju ekspresionog nivoa MFN2 sa pokretljivošću i krioprotektivnim potencijalom humanih

spermatozoida (Fang i sar., 2018), kao i mitofuzinima-posredovanu promociju OXPHOS (Varuzhanyan i sar., 2019). Takođe je pokazano da je nivo *Cox4i1* (gen koji kodira terminalni enzim u mitohondrijalnom respiratornom lancu kao i transkript koji je značajno povećan u spermatozoidima stresiranih pacova) značajno povećan u spermatozoidima gojaznih miševa (Binder i sar., 2015) i može biti važan u tretmanu infertiliteta muškaraca (An i sar., 2014). Dodatno, rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da ponavljani stres povećava *Cytc* što se može povezati sa činjenicom da poremećeno oslobađanje *Cytc* iz mitohondrija humanih spermatozoida može biti prepoznatljiva molekularna odlika oligozoospermije i astenozoospermije (Zhang i sar., 2019). Rezultati ovde disertacije takođe pokazuju da psihofizički stres značajno remeti transkripciju elemenata cAMP i MAPK signalnih puteva, koji regulišu kako mitohondrijalnu dinamiku tako i broj i funkcionalnost spermatozoida (Slika 5.1.14). Sve pomenute signalne molekule dobro su poznate kao veoma važni regulatori broja i funkcionalnosti spermatozoida (Silva i sar., 2015), kao i regulatori PGC1, biogeneze OXPHOS, mitofuzije, mitofisije i mitofagije (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015), a takođe su važni i za fertilitet. Veoma je teško definisati tačan mehanizam obzirom da je dobro poznato da je signalna mreža u spermatozoidima izuzetno kompleksna i veoma precizno regulisana da bi obezbedila homeostazu fertilizacije (Finkelstein i sar., 2020). Pored toga, ne postoji mnogo publikovanih rezultata u ovoj oblasti istraživanja. Ipak, rezultati prikazani u ovoj disertaciji koji pokazuju povećanje nivoa transkripcije većine adenilil ciklaza (ADCY), kao i subjedinica PRKA, u saglasnosti su sa rezultatima drugih autora koji pokazuju da analozi adenozina i kateholamina aktiviraju pokretljivost spermatozoida mehanizmima koji zahtevaju atipične ADCY i PRKACA spermatozoida (Schuh i sar., 2006). Takođe, rezultati drugih autora pokazuju da su cAMP signalni putevi u spermatozoidima kompartmentalizovani, sa ADCY1-9 lokalizovanim u glavenom regionu dok su ADCY10 i PRKA lokalizovani u repnom regionu (Wertheimer i sar., 2013). Dalje, rezultati Capkova i sar., 2016 pokazuju da smanjenje PRKAR2A u spermatozoidima pacijenata sa dijagnozom astenozoospermije verovatno smanjuje kvalitet sperme, dok je *Prkar2b* potencijalna toplotno-senzitivna „meta“ u germinativnim ćelijama (Yadav i sar., 2018). Sve navedeno veoma je važno obzirom da su CatSperm kanali regulisani sa PRKA (Orta i sar., 2018). Takođe, rezultati ove doktorske disertacije (Slika 5.1.10., Slika 5.1.11., Slika 5.1.12., Slika 5.1.13) pokazuju da *ex vivo* manipulacija stres-signalizacije u spermatozoidima menja transkripcioni profil 84% ispitivanih markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti, kao i da je većina navedenih efekata posredovana  $\alpha 1$ -i/ili $\beta$ -adrenergičkim receptorima, koji su poznati aktivatori ADCY-cAMP-PRKA signalnog puta (Hara i sar., 2011). Dalje, rezultati ovde doktorske disertacije pokazuju povećanje nivoa transkripcije 80% ispitivanih markera MAPK signalnog puta, što se može uporediti sa istraživanjima koja pokazuju da testikularna hipertermija indukuje MAPK1/3 i MAPK14 (Jia i sar., 2009) kao i da MEK1/2 i ERK2 regulišu polimerizaciju aktina povezanu sa kapacitacijom spermatozoida (Salgado-Lucio i sar., 2020). Ispitivanje uticaja stresa je od važnosti obzirom da je pokazano da jedinke koje vode stresan život, kao što je „život na vrhu“ alfa mužjaka, imaju povećan nivo kortikosterona u odnosu na beta mužjake (Gesquiere i sar., 2011). Dalje, funkcionalnost spermatozoida i fertilitet mužjaka važni su ne samo kao fundamentalni markeri reproduktivnog zdravlja, već i kao važni biomarkeri opšteg zdravlja (Bräuner i sar., 2020; Choy i Eisenberg, 2018).

### **6.1.3. Hormon stresa adrenalin smanjuje funkcionalnost spermatozoida i menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija u spermatozoidima**

Za sada ne postoji niti jedan sveobuhvatni biomarker reproduktivnog kapaciteta kod muškaraca i/ili biomarkeri opasnosti po reproduktivno zdravlje muškaraca. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju važnost markera mitohondrijalne biogeneze i markera fuzije/arhitekture u

spermatozoidima, obzirom da je manipulacija signalizacije od stres hormona promenila transkripcione nivoe 11 od 14 markera. Stres-hormonima-pokrenute promene u profilu ekspresije molekula odgovornih za mitohondrijalnu biogenezu i fuziju/arhitekturu u spermatozoidima, ne samo da koreliraju sa funkcionalnošću spermatozoida, već takođe predstavljaju adaptivni mehanizam esencijalan za funkcionalnost spermatozoida. Ovakav transkripcioni scenario možda predstavlja situaciju u kojoj spermatozoidi pokušavaju da održe basalnu mitohondrijalnu i sopstvenu aktivnost. Nekoliko dokaza pokazuje da stres remeti signalne puteve i molekule odgovorne za proces mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u spermatozoidima. 1) Ponavljani psihofizički stres imobilizacijom smanjuje broj spermatozoida. 2) Oba tipa stresa, akutni i ponavljani stres, značajno smanjuju funkcionalnost spermatozoida. 3) *Ex vivo* administracija stres hormona adrenalina i hidrokortizona oponaša efekte stresa na funkcionalnost spermatozoida. 4) Hormoni stresa značajno remete transkripcioni profil 16 od 19 ispitivanih markera mitohondrijalne biogeneze, mitofuzije/mitoarhitekture, mitofisije i mitofagije, a neki od efekata specifični su samo za jedan tip adrenergičkih receptora, dok su neki efekti regulisani sa nekoliko tipova adrenergičkih receptora. 5) Manipulacija signalizacije od ADR u spermatozoidima korišćenjem agonista i/ili antagonista otkriva kompleksnu regulaciju transkripcije glavnih adrenergičkih receptora i kinaza adrenergičkih receptora u spermatozoidima.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji u saglasnosti su sa rezultatima drugih autora koji pokazuju da hronični naizmenični stres ireverzibilno smanjuje broj spermatozoida (Nirupama i sar., 2013), značajno povećava apoptozu germinativnih ćelija i smanjuje broj spermatogenih ćelija (Hou i sar., 2014), značajno smanjuje pokretljivost spermatozoida, vijabilnost spermatozoida (Mehfooz i sar., 2018) i kvalitet spermatozoida mužjaka pacova (Demirci i Sahin, 2019). Kod ljudi, pokazano je da je stres uzrokovan sa smrću bliskog člana porodice povezan sa smanjenjem procenta progresivno pokretnih spermatozoida (Fenster i sar., 1997). Pored toga, sekundarni infertilitet značajno je veći kod pacijenata sa posttraumatskim stres poremećajem (Elezaj i sar., 2015). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji (Slika 5.1.7) koji pokazuju inhibitornu ulogu stres hormona na funkcionalnost spermatozoida podržani su rezultatima drugih istraživača koji su pokazali da stres signalizacija indukovana GR remeti spermatogenezu (Zou i sar., 2019), kao i da je kod muških trkača pokazano smanjenje testosterona i pokretljivosti spermatozoida (De Souza i sar., 1994). Suprotno tome, kod mužjaka miševa sa delecijom gena za  $\alpha 1$ -ADRs dolazi do poremećaja fertiliteta i spermatogeneze (Mhaouty-Kodja i sar., 2007), ukazujući na važnost i kompleksnost učešća signalizacije od adrenergičkog receptora u spermatogenezi i fertilitetu. Uzimajući u obzir važnu ulogu mitohondrijal u fiziologiji ćelije, jasno je da su ove organele među prvima u odgovoru na različite stresore koji utiču na homeostazu ćelije i organizma (Chrousos, 2009; Manoli i sar., 2007). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji (Slika 5.1.10., Slika 5.1.11., Slika 5.1.12., Slika 5.1.13) po prvi put pokazuju važnost markera mitohondrijalne dinamike u spermatozoidima, obzirom da je transkripcioni profil 16 od 19 ispitivanih markera poremećen manipulacijom signalizacije stres hormona. Nivo ekspresije transkripta *Ppargc1a* značajno je smanjen u spermatozoidima inkubiranim sa izoproterenolom, agonistom  $\beta$ -ADRs, ali takođe i u spermatozoidima inkubiranim sa propranololom, antagonistom  $\beta$ -ADRs, i oba efekta poništena su kombinacijom navedenih agonista i antagonista, ukazujući na ulogu  $\beta$ -ADRs u spermatozoidima. Suprotno tome, transkripcija *Ppargc1b*, *Cox4il* i *Ucp1* statistički je značajno povećana nakon stimulacije adrenalinom, i ovi efekti potpuno su poništeni sa  $\alpha 1$ -ADR i  $\beta$ -ADR antagonistima, ukazujući na uključenost oba tipa ADR na transkripciju navedenih gena u spermatozoidima. Povećan nivo *Ppargc1a* i *Ucp3* u prisustvu  $\alpha 1$ -ADR antagonista prazosina, može biti objašnjenje za pozitivan efekat alfa blokatora kod oligozoospermčnih muškaraca, obzirom da su dve placebo-kontrolisane, dvostruko-maskirane kliničke studije zaključile da su alfa blokatori korisne supstance u lečenju idiopatske umerene oligozoospermije (Gregoriou i sar., 1997; Yamamoto i sar., 1995). Dodatno, fertilitet i spermatogeneza poremećeni su kod mužjaka miševa sa delecijom gena za



$\alpha$ 1-ADRs (Hara i sar., 2011). Rezultati ove disertacije pokazuju da se nivo transkripta za *Tfam* smanjuje inkubacijom sa  $\beta$ -ADR agonistom izoproterenolom dok  $\beta$ -ADR antagonista propranolol dovodi do poništavanja ovakvog efekta agoniste. Ovakav rezultat u saglasnosti je sa otkrićem da je TFAM asociran sa smanjenjem sadržaja mtDNK humanih spermatozoida (Amaral i sar., 2007) i da ekspresija gena za TFAM pozitivno korelira sa abnormalnim formama, fragmentacijom DNK i brojem kopija mtDNK spermatozoida (Borges i sar., 2019; Faja i sar., 2019). Rezultati pokazuju da kombinacija  $\beta$ -ADR antagoniste propranolol i  $\beta$ -ADR agoniste izoproterenola značajno smanjuje nivo *Ucp2* (Slika 5.1.10), što ukazuje na pozitivnu umešanost  $\beta$ -ADR u *Ucp2* regulaciju i može biti moguće objašnjenje za otkriće da UCP2 ublažava gubitak pokretljivosti humanih spermatozoida. Efekat  $\beta$ -ADR agoniste izoproterenola nije uvek paralelan sa efektima adrenalina posredovanim  $\beta$ -ADR i  $\beta$ -ADR antagonista propranolol nije uvek poništio efekat izoproterenola. Moguće objašnjenje može biti doza izoproterenola, obzirom da su u dva naučna časopisa objavljeni rezultati dobijeni korišćenjem nižih doza (0.2  $\mu$ M) izoproterenola, i u kojima je pokazano da izoproterenol (0.2  $\mu$ M) ubrzava pokrete repa sisarskih spermatozoida mehanizmima koji nisu posredovani receptorima (Schuh i sar., 2006). Transkripti glavnih markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture (*Mfn1*, *Mfn2* i *Opal*), važnih za homeostazu mitohondrijalne mreže i funkcije (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015), dramatično su povećani adrenalinom (*Mfn1*-3.4x; *Mfn2*-7.5x; *Opal*-2.7x) i ovi efekti potpuno su poništeni sa oba tipa antagonista ( $\alpha$ 1-ADR i  $\beta$ -ADR), ukazujući na ulogu oba tipa adrenergičkih receptora u regulaciji ekspresije navedenih transkripata. Takođe, nivo ekspresije *Mfn1* značajno je smanjen (2.1x) u spermatozoidima inkubiranih kombinacijom prazosin+adrenalin, ukazujući da  $\alpha$ 1-ADR mogu posredovati stimulatornim efektima. Ovi rezultati mogu objasniti vezu između nivoa MFN2 i pokretljivosti i krioprotektivnog potencijala humanih spermatozoida (Fang i sar., 2018). Povećan nivo ekspresije transkripata za sve markere mitohondrijalne fuzije i arhitekture može takođe biti i adaptivni mehanizam preživljavanja takve poremećene homeostaze. Naime, proces mitofuzije obezbeđuje okruženje za razmenu biomolekula između mitohondrija, dok kondenzovane kriste predstavljaju markere visoke produkcije ATP-a. Štaviše, najistaknutije povećanje (7.5x) nivoa transkripcije *Mfn2* može voditi i povećanju u nivou MFN2 proteina i može obezbediti jaču vezu mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma, što posledično vodi povežanju razmene  $Ca^{2+}$ , sekundarnog glasnika važnog za sve mehanizme presudne za funkcionalnost spermatozoida.

Paralelno sa promenama transkripcionog profila markera mitofuzije, sličan efekat detektovan je i na nivou transkripcionih profila markera mitofuzije. Nivo ekspresije transkripta *Fis1* povećan je (1.6x) u prisustvu hidrokortizona, dok je takav efekat potpuno poništen u prisustvu GR-specifičnog antagoniste RU486. Sa druge strane, nivo ekspresije navedenog transkripta nije promenjen adrenergičkom signalizacijom, ukazujući na jedinstvenu ulogu signalizacije od GR u regulaciji transkripcije *Fis1* gena. Međutim, suprotno tome, transkripcija *Drp1* povećana je u prisustvu oba korišćena stres mimetika. Efekat adrenalina potpuno je poništen u prisustvu blokatora, dok je efekat GR agoniste prisutan čak i u prisustvu blokatora GR, ukazujući ili na jedinstvenu ulogu adrenergičkih receptora, ili na neodgovarajuću koncentraciju blokatora GR.

Transkripcija glavnih markera mitofagije (*Pink1* i *Prkn*) takođe je dramatično povećana (*Pink1*-8.2x; *Prkn*-17.6x). Efekat adrenalina na nivo transkripcije *Pink1* potpuno je poništen u prisustvu oba,  $\alpha$ 1-ADR antagoniste i  $\beta$ -ADR antagoniste, ukazujući na ulogu oba tipa ispitivanih adrenergičkih receptora. Jače izraženo povećanje nivoa ekspresije *Prkn* transkripta potpuno je poništeno samo u prisustvu  $\alpha$ 1-ADR antagoniste, dok je  $\beta$ -ADR antagonista samo umanjio efekat adrenalina, ukazujući na veće učesće  $\alpha$ 1 adrenergičkih receptora u adrenalinom posredovanoj stimulaciji. Štaviše, blokatori  $\alpha$ 1-ADR i  $\beta$ -ADR značajno povećavaju nivo *Prkn* transkripcije (prazosin-1.9x; propranolol-2.3x). Prisustvo adrenalina poništilo je efekat prazosina, ali je umanjilo efekat propranolola (1.9x vs. 2.3x), dok je prisustvo  $\beta$ -ADR agoniste izoproterenola potpuno poništilo efekat propranolola, ukazujući na kompleksnu i specifičnu regulaciju *Prkn* transkripcije adrenergičkom signalizacijom. Suprotno tome,

GR signalizacija negativno je uključena u regulaciju *Prkn* transkripcije, obzirom da je povećanje nivoa transkripcije *Prkn* zavisno do GR antagoniste (1.5x) potpuno poništeno u prisustvu agoniste GR hidrokortizona. Nivo ekspresije *Tfeb* transkripta značajno je povećan sa  $\alpha 1$ -ADR antagonistom prazosinom (1.5x) i ovaj efekat poništen je kombinacijom sa adrenalinom, dok je kombinacija  $\beta$ -ADR agoniste i antagoniste (propranolol+izoproterenol) značajno smanjila (1.9x) nivo ekspresije *Tfeb*, ukazujući na kompleksnu regulaciju navedenog transkripta. Prema tome, manipulacija stres signalizacije u spermatozoidima korišćenjem agonista i/ili antagonista adrenergičkog receptora ili glukokortikoidnog receptora otkriva da je većina ovih efekata posredovana  $\alpha 1$ -ADR i/ili  $\beta$ -ADR.

Dalje, rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da signalizacija od ADR remeti transkripcione profile ADRs kao i njihovih kinaza, i da je njihova regulacija intrigantna i kompleksna, uključujući oba tipa receptora, i  $\alpha 1$ - i  $\beta$ -ADRs. Veoma je teško objasniti precizne mehanizme obzirom da je poznato da adrenergički receptori međusobno komuniciraju u regulaciji njihove ekspresije u zdravom i bolesnom organizmu (Hara i sar., 2011). Međutim, jasno je da je transkripcija *Adrbk2* značajno povećana adrenalinom i da je ovaj efekat potpuno poništen sa oba tipa antagonista, i  $\alpha 1$ -ADR i  $\beta$ -ADR antagonistima, ukazujući na ulogu oba tipa navedenih ADRs. Fiziološka važnost je jasna, obzirom da je pokazano da  $\beta$ -ADR stimulišu produkciju cAMP-a aktivirajući membranske adenilil ciklaze (Adeoya-Osiguwa i sar., 2006).

## **6.2. Akutni stres sa različitim periodima oporavka menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima adultnih pacova**

Dobro je poznato da život počinje fertilizacijom. Ovaj proces zahteva visoko energisane i funkcionalne spermatozoide. Nažalost, brojne publikacije ukazuju na povećanu incidencu neobjašnjenih slučajeva infertilnosti muškaraca kao i smanjenje nivoa fertiliteta muškaraca mlađih od 30 godina (Agarwal i sar., 2021; Barbagallo i sar., 2020; Bräuner i sar., 2020). Kvalitet sperme i fertilitet važni su kao fundamentalni markeri ne samo reproduktivnog zdravlja nego i kao biomarkeri opšteg zdravlja (Barbagallo i sar., 2020; Nordkap i sar., 2016). Takođe, Svetska zdravstvena organizacija ukazuje da je sveukupni teret muške infertilnosti visok, nepoznat i podcenjen, i nje ispoljio trend smanjenja u poslednjih 20 godina. Stoga Svetska zdravstvena organizacija poziva na hitna istraživanja mehanizama infertilnosti (<https://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/perspective/en/>).

U potrazi za mogućim mehanizmima koji prouzrokuju infertilnost, kao i povezanosti stresa i muške infertilnosti, primenjen je model akutnog psihofizičkog stresa, najčešćeg tipa stresa u humanoj populaciji, na adultnim mužjacima pacova sa različitim periodima oporavka. U okviru ovog eksperimentalnog modela istraživanja su rađena u četiri vremenske tačke, dve vremenske tačke u toku svetle/neaktivne faze i dve tačke u toku tamne/aktivne faze dvadesetčetvoročasovnog ciklusa. Imobilizacioni stres u trajanju od 3 sata, primenjen je na samom početku svetle faze, od ZT0 do ZT3, i jedna grupa životinja žrtvovana je u ovoj vremenskoj tački. Sledeće gupe žrtvovane su 8 (ZT11), 14, (ZT17) i 20 (ZT23) sati nakon imobilizacionog stresa. Praćeni su broj i funkcionalnost spermatozoida, kao i transkripcioni profili 22 markera mitohondrijalne dinamike/funkcionalnosti i 22 markera odgovarajućih signalnih molekula. Rezultati pokazuju da je akutni stres izazvao efekte koji su bili postojani čak i 20 časova nakon perioda stresa (Slika 6.1.2). Smanjenje broja izolovanih spermatozoida detektovano je u vremenskim tačkama ZT17 i ZT23, dok je smanjena funkcionalnost spermatozoida detektovana u vremenskim tačkama ZT3 i ZT11, ali se oporavak funkcionalnosti spermatozoida primećuje u vremenskim tačkama ZT17 i ZT23. Transkripcioni profili 20 od 22 (91%) ispitivana markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti i 20 od 22 ispitivana markera (91%) signalnih

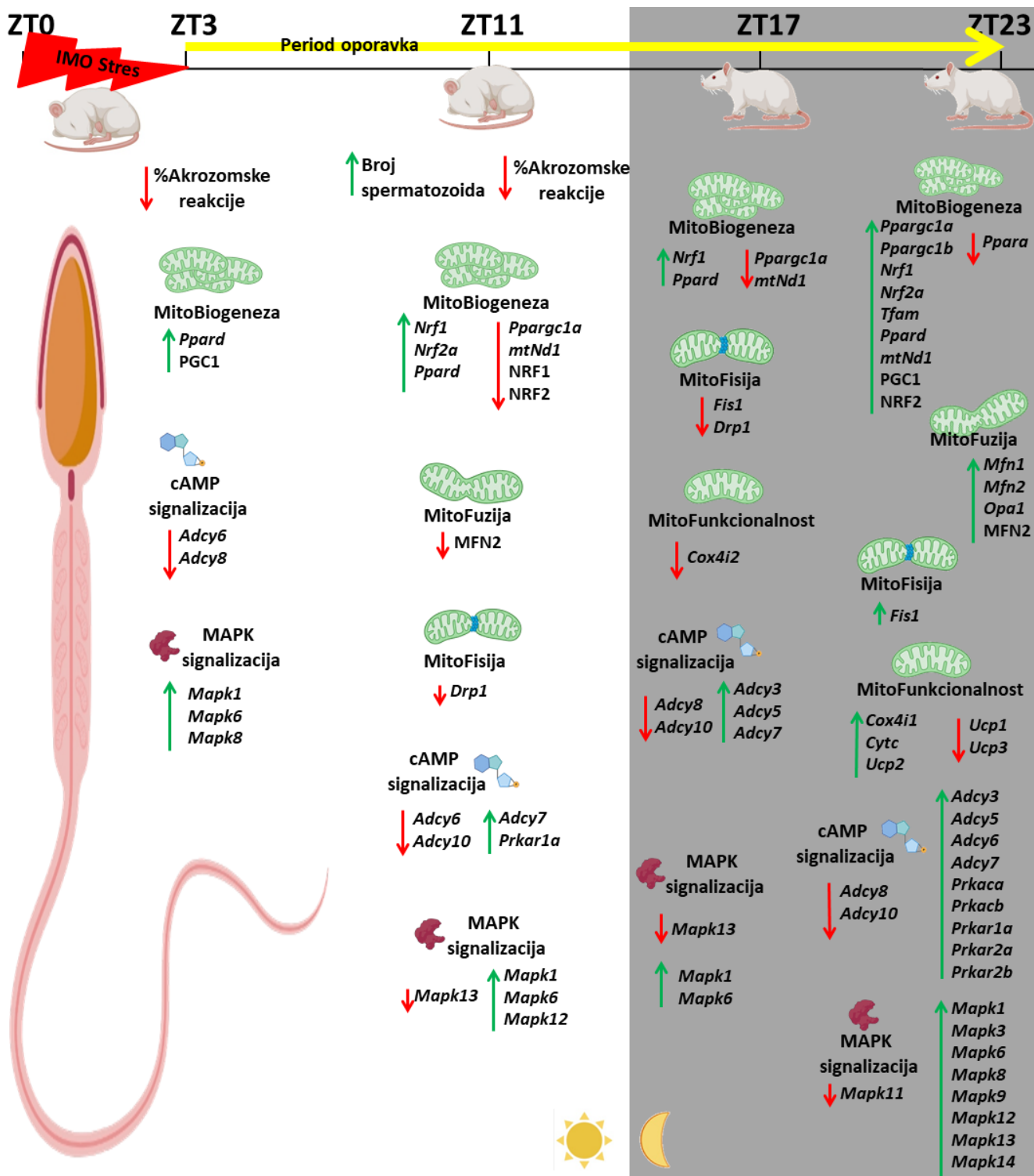
molekula koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike, poremećeni su u spermatozoidima nakon akutnog psihofizičkog stresa sa različitim periodima oporavka (Slika 5.2.9).

Dobro je poznato da je stres signalizacija uključena u regulaciju spermatogeneze i fertilizacije u veoma kompleksnom i intrigantnom maniru. Hronični isprekidani stres ireverzibilno smanjuje broj spermatozoida (Hou i sar., 2014; Nirupama i sar., 2013; Zou i sar., 2019), kao i pokretljivost (Mehfooz i sar., 2018) i kvalitet spermatozoida (Demirci i Sahin, 2019). Smanjenje progresivno pokretnih spermatozoida kod ljudi povezano je sa stresom (Fenster i sar., 1997). Takođe, sekundarni infertilitet značajno je viši kod pacijenata sa postraumatskim stres sindromom (Elezaj i sar., 2015). Ipak, još uvek nema publikovanih rezultata o efektu oporavka od akutnog psihofizičkog stresa na broj i funkcionalnost spermatozoida kao i na signalne puteve koji su u vezi sa navedenim procesima. Rezultati ove disertacije pokazuju da broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa opada 14 i 20 sati nakon akutnog psihofizičkog stresa. Precizno objašnjenje za ovakav rezultat teško je dati, ali jedan od mogućih razloga može biti taj da mehanizam koji dovodi do smanjenja broja spermatozoida počinje u ranijim vremenskim tačkama, možda kao posledica aktivacije signalnih puteva posredovanih stres hormonima, ali su njihovi rezultati vidljivi tek u vremenskim tačkama ZT17 i ZT23. Takođe, može se pretpostaviti i da je ovakav broj spermatozoida posledica perzistentnog povećanja nivoa cirkulišućeg kortizola (Medar i sar., 2021a).

Obzirom da su mitohondrije od izuzetne važnosti za mnoge energetske zavisne procese uključujući funkcionalnost spermatozoida, fertilizaciju kao i odgovor na stres, u ovoj disertaciji praćen je transkripcioni profil markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti, kao i signalnih molekula koje regulišu homeostazu mitohondrija i funkcionalnost spermatozoida. Rezultati transkripcione analize jasno pokazuju da su efekti akutnog stresa vidljivi i do 20 sati nakon imobilizacionog stresa, kao i da je većina efekata detektovana u vremenskoj tački ZT23. Svi ispitivani molekuli veoma su važni za funkcionalnost spermatozoida. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju cirkadijalnom profilu sličnu transkripciju *Ppargc1a*/PGC1 u spermatozoidima stresiranih kao i nestresiranih (kontrolnih) životinja. Iako slične studije do sada nisu urađene, pokazano je da je ekspresija PPARGC1A promenjena u spermatozoidima pacijenata obolelih od dijabetesa tip 2 (Chen i sar., 2020), kao i da je povećanje ekspresije *Nrf2* umanjilo testikularnu inflamaciju (Gawish i sar., 2020). Pored toga, ekspresija gena za TFAM korelira sa DNK fragmentacijom spermatozoida kao i brojem kopija mtDNK (Borges i sar., 2019; Faja i sar., 2019). Analiza (*engl.* Heat map) koja prikazuje transkripcioni profil markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti (Slika 5.2.9) jasno ukazuje da tokom perioda oporavka od akutnog imobilizacionog stresa spermatozoidi najviše ekspresuju glavne markere mitohondrijalne fuzije (*Mfn1*, *Mfn2* i *Opa1*). Ovakav obrazac ekspresije je od izuzetne važnosti za održanje integriteta mitohondrijalne mreže i energetske ravnoteže. Navedeni rezultat mogao bi objasniti nalaze drugih naučnika koji pokazuju vezu između nivoa ekspresije MFN2 i pokretljivosti i krioprotektivnog potencijala humanih spermatozoida (Fang i sar., 2018; Varuzhanyan i sar., 2019). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju povećanje ekspresije *Cox4i1*, gena koji kodira terminalni enzim mitohondrijalnog respiratornog lanca, u spermatozoidima akutno stresiranih životinja. Pokazano je da je transkripcija ovog gena značajno povećana u spermatozoidima gojaznih mužjaka (Binder i sar., 2015), i da je navedeni gen važan u tretmanu infertiliteta muškaraca (An i sar., 2014). Dalje, rezultati prikazani u ovoj disertaciji jasno pokazuju povećanje ekspresije *Ucp2* transkripta (najviše ekspresovanog gena za UCP proteine u spermatozoidima), koja verovatno predstavlja posledicu delovanja hormona stresa adrenalina (Slika 5.1.10). Ovakvi molekularni događaji mogu da povećaju pokretljivost spermatozoida, obzirom da je pokazano da UCP2 ublažava gubitak pokretljivosti humanih spermatozoida (Wang i sar., 2018).

Nova saznanja u razumevanju molekularnih događaja povezanih sa efektom akutnog stresa na spermatozoide daju i rezultati prikazani u ovoj disertaciji, koji pokazuju da je transkripcija 91% ispitivanih markera signalnih puteva koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku kao i funkcionalnost

spermatozoida, izmenjena tokom oporavka od akutnog psihofizičkog stresa. Analiza nivoa transkripcije (*engl.* Heat map) (Slika 5.2.9) pokazuje da su promene navedenih markera najizraženije u vremenskoj tački ZT23 i da je promena u najvećem broju ispitivanih markera povećanje. Svi transkripti čija je ekspresija povećana akutnim stresom, predstavljaju signalne molekule koje su dobro poznate kao važni regulatori broja i funkcionalnosti spermatozida (Silva i sar., 2015), kao i regulatori PGC1, biogeneze OXPPOS, mitofuzije, mitofisije i mitofagije (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015). Pored toga, sve afektovane molekule deo su kompleksne signalne mreže spermatozoida koja je precizno regulisana sa ciljem obezbeđivanja homeostaze fertiliteta u stanju zdravlja i bolesti (Finkelstein i sar., 2020). Posledica povećane ekspresije ispitivanih transkripata je oporavljena funkcionalnost spermatozoida u vremenskim tačkama ZT17 i ZT23, obzirom da je pokazano da cAMP signalizacija poboljšava pokretljivost spermatozoida (Schuh i sar., 2006; Wertheimer i sar., 2013) i važna je za aktivaciju CatSper kanala (Orta i sar., 2018). Povećan nivo ekspresije transkripta za sve subjedinice PRKA takođe predstavlja važan adaptivni mehanizam, obzirom da je pokazano da smanjenje PRKAR2A kod astenozoospermičnih pacijenata smanjuje kvalitet spermatozoida (Capkova i sar., 2016), dok je takođe pokazano da je Prkar2b osetljiva na visoke temperature (Yadav i sar., 2018). Dalje, povećanje nivoa transkripata *Mapk1*, *Mapk3* i *Mapk14* u spermatozoidima pacova sa periodom oporavka od 20 sati, može se uporediti sa činjenicama da testikularna hipertermija indukuje i MAPK1/3 i MAPK14 kao i da MEK1/2 i ERK2 regulišu kapacitaciju spermatozoida (Salgado-Lucio i sar., 2020). Takođe, važno je istaći da je MAPK11 jedna od najvažnijih MAPK u spermatozoidima locirana u glavenom regionu u nefosforilisanom obliku, dok se fosforilisana forma ovog proteina translocira u središnji region spermatozoida (Slika 5.1.8).



**Slika 6.2.1.** Akutni stres, najčešći tip stresa u humanoj populaciji, značajno menja transkripciju 91% praćenih markera dinamike i funkcionalnosti mitohondrija, kao i 91% signalnih molekula koji regulišu homeostazu spermatozoida i dinamiku/funkcionalnost mitohondrija. Najizraženije promene su primećene 20 sati nakon završetka stresa. Fiziološki značaj predstavlja oporavak broja i funkcionalnosti spermatozoida.

### **6.3. Ponavljani imobilizacioni stres u različitim periodima u toku dana menja transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima adultnih pacova**

Mitohondrije, sa svojim brojnim funkcijama i sposobnosti za unutarćelijsko kretanje, od velike su važnosti za homeostazu ćelija (Markaki i Tavernarakis, 2020; Valenti i Atlante, 2021), a posebno kod energetski zavisnih ćelija kao što su spermatozoidi (Barbagallo i sar., 2020). Takođe, mitohondrije su veoma važna karika u odgovoru na stres (Chrousos, 2009). Brojne studije su stoga diskutovale korelaciju između stresa i/ili stresnog načina života sa muškom (in)fertilnosti. Međutim, mehanizmi do sada nisu opisani.

Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put pokazuju dejstvo stresa, model koji je dizajniran sa ciljem oponašanja situacija u humanoj populaciji koja je izolžena ponavljanom psihološkom stresu (najčešćem tipu stresa u humanoj populaciji) u različitim periodima (ZT0-ZT3, ZT08-ZT11, ZT20-ZT23) u toku dana (24 časa). Tri vremenske tačke (2 tačke u toku svetle/inaktivne faze i 1 tačka u toku tamne/aktivne faze) dizajnirane su tako da oponašaju situacije u humanoj populaciji, situacije rada u smenama. Rezultati pokazuju da ponavljani stres indukuje psihološki-stres-odgovor spermatozoida koji se ogleda u cirkadijalno-sličnom maniru transkripcije markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti kao i transkripcije signalnih molekula koji regulišu kako mitohondrijalnu dinamiku tako i funkcionalnost spermatozoida. Cirkadijalna priroda adaptivnog odgovora spermatozoida, je delimično vođena ritmičnom sekrecijom kortikosterona i testosterona. Sekrecija kortikosterona i testosterona pokazuje ritmični obrazac sekrecije (Medar i sar., 2021a). Poznato je da kortikosteron deluje kao sinhronizator perifernih časovnika (Koch i sar., 2016). Stoga, kortikosteron zajedno sa testosteronom može biti uključen u cirkadijalnu prirodu regulacije molekularnih događaja u spermatozoidima. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da u situacijama gde je psihofizički stres prisutan u različitim vremenskim tačkama u toku dana, transkripcioni profili većine markera mitohondrijalne dinamike/funkcionalnosti, kao i većina signalnih molekula koji regulišu broj/funkcionalnost spermatozoida i mitohondrijalnu dinamiku u spermatozoidima, pokazuju sličan profil promene u vremenskim tačkama ZT3 i ZT23, ali drugačiji u ZT11 (Slika 6.1.3). Smanjen broj i funkcionalnost spermatozoida detektovani su u svim ispitivanim vremenskim tačkama. Prema poznatim literaturnim podacima, ne postoje objavljeni rezultati o uticaju stresa na broj i funkcionalnost spermatozoida u različitim vremenskim tačkama u toku dana. Ipak, rezultati detektovani u vremenskoj tački ZT3 su u saglasnosti sa rezultatima koji pokazuju da hronični naizmenični tip stresa smanjuje broj spermatozoida (Nirupama i sar., 2013), broj spermatogenih ćelija (Hou i sar., 2014), kao i pokretljivost (Mehfooz i sar., 2018) i kvalitet spermatozoida (Demirci i Sahin, 2019) mužjaka pacova. Ovakav rezultat može biti posledica inhibitorne uloge adrenalina na funkcionalnost spermatozoida (Slika 5.1.7) i/ili poremećene spermatogeneze kao rezultat aktivacije stresom pokrenute GR signalizacije (Zou i sar., 2019). Kod ljudi, smanjen nivo testosterona i pokretljivost spermatozoida pokazani su kod muških trkača (De Souza i sar., 1994). Takođe, stres indukuje smanjenje progresivno pokretnih spermatozoida (Fenster i sar., 1997), dok je kod pacijenata sa posttraumatskim stres poremećajem registrovan je sekundarni infertilitet (Elezaj i sar., 2015). Sve stres-signalne molekule dobro su poznati regulatori broja i funkcionalnosti spermatozoida (Silva i sar., 2015), kao i mitohondrijalne dinamike (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015). Stoga se mogu smatrati i veoma važnim za rešavanje problema (in)fertilnost.

Analiza obrasca transkripcionih profila markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima pokazuje da je transkripcija većine ispitivanih (17 od 22) molekularnih markera statistički značajno povećana u vremenskoj tački ZT3 (Slika 5.3.9). Smanjen nivo transkripcije detektovan je samo za transkript *Ucp3*. Manje izražene promene nivoa transkripcije detektovane su u vremenskim tačkama ZT11 i ZT23. Najistaknutiji cirkadijalnom-obrascu-slični profili detektovani su

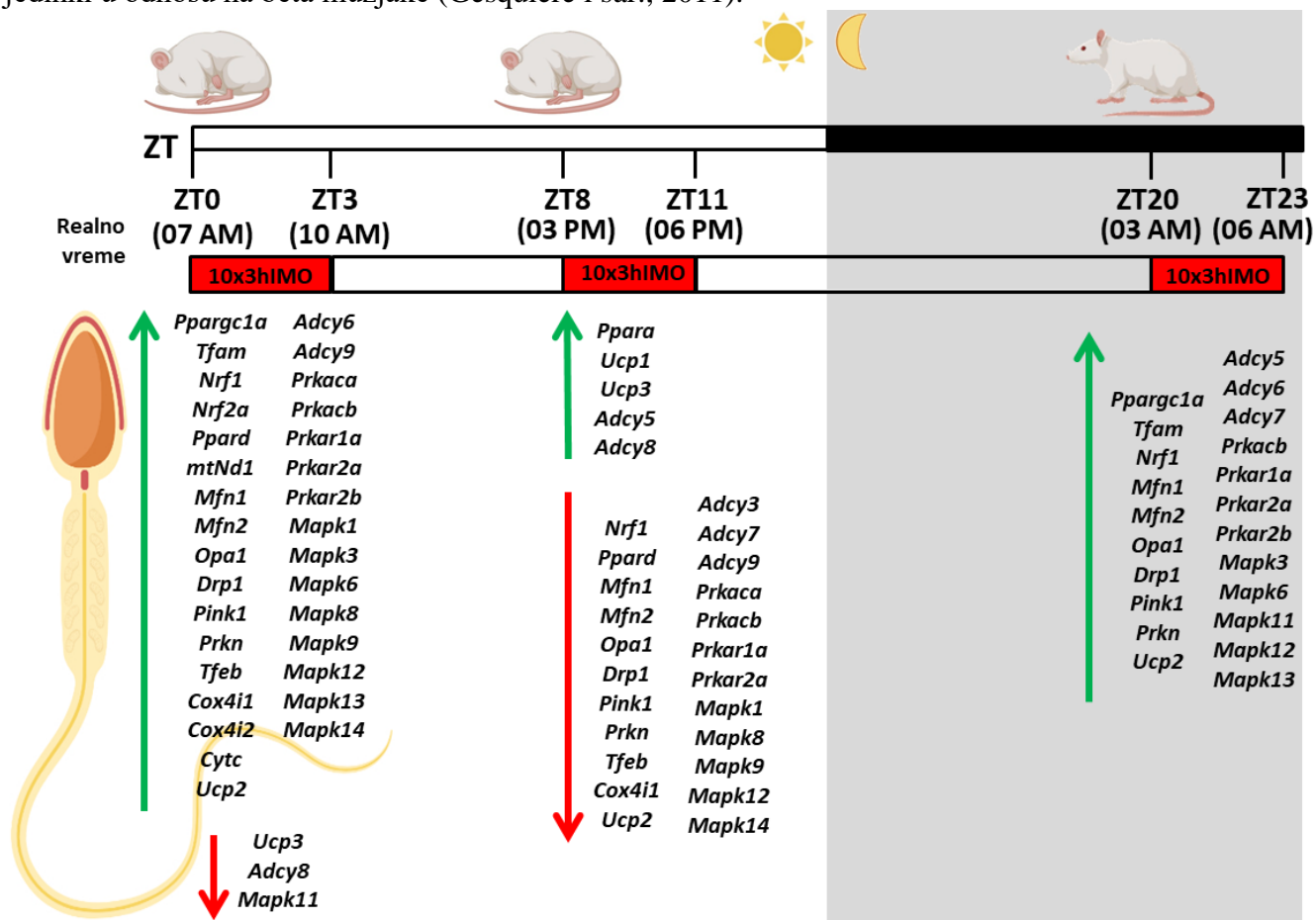
za sve glavne markere mitohondrijalne fuzije (*Mfn1*, *Mfn2* i *Opal*) i mitofagije (*Pink1* i *Prkn*), kao i neke od markera mitofisije (*Drp1*) i mitohondrijalne biogeneze (*Ppargc1a*, *Tfam* i *Nrf1*). Poređenje navedenih rezultata sa publikovanim rezultatima drugih istraživača trenutno nije moguće obzirom da prema dostupnoj literaturi nema objavljenih nalaza (dana 20.04.2022). Poznato je da je transkripcija gena kompleksno regulisan proces koji uključuje brojne signalne puteve upravljene nervnim, endokrinim, parakrinim, autokrinim, kriptokrinim i jukstakrinim signalima. Osim toga, centralni i periferni sistemi biološkog časovnika interaguju sa mnogo različitih signala sa ciljem produkcije integrisanog izlaznog signala preko diurnalnog ciklusa, upravljajući cikličnim aktivnostima ćelije (Ruginsk i sar., 2018). Štaviše, postojanje i uloga gena biološkog časovnika u spermatozoidima još uvek je nejasna, što bi moglo da posluži kao osnov budućih istraživanja. Najinteresantniji ispitivani markeri su markeri mitofuzije, što može da posluži razvoju novih dijagnostičkih kitova obzirom da je pokazano da ekspresioni nivo MFN2 pozitivno korelira sa pokretljivošću i potencijalom za krioprezervaciju humanih spermatozoida (Fang i sar., 2018), kao i sa mitofuzinom-posredovanom stimulacijom OXPHOS (Varuzhanyan i sar., 2019). Obrazac ekspresije *Tfam*, koji pokazuje cirkadijalnom-obrascu-sličan način ekspresije, takođe je važan za buduća istraživanja obzirom da ekspresija TFAM pozitivno korelira sa abnormalnim formama spermatozoida, fragmentacijom DNK spermatozoida i brojem kopija mitohondrijalne DNK (Borges i sar., 2019; Faja i sar., 2019). Rezultati koji pokazuju obrazac ekspresije *Ucp2* (Slika 5.3.6) mogu biti povezani sa otkrićem drugih autora koji pokazuju da prisustvo UCP2 ublažava gubitak pokretljivosti humanih spermatozoida (Wang i sar., 2018). Novi pristup razumevanju molekularnih događaja koji su povezani sa mogućim cirkadijalnim efektima ponavljanog stresa na spermatozoide, predstavljaju rezultati prikazni u ovoj doktorskoj disertaciji gde je 86% ispitivanih markera signalnih puteva, koji regulišu i mitohondrijalnu dinamiku i broj/funkcionalnost spermatozoida, izmenjeno.

Transkripcioni profili signalnih molekula koje regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost u spermatozoidima jasno pokazuju da je transkripcija većine ispitivanih markera (7 od 12 markera cAMP signalnog puta, i 8 od 10 markera MAPK signalnog puta) značajno povećana u vremenskoj tački ZT3 (Slika 5.3.9). U istoj vremenskoj tački (ZT3), suprotan obrazac ekspresije detektovan je na nivou transkripcije *Adcy8* gde je nivo ovog transkripta statistički značajno smanjen. Dalje, efekat imobilizacionog stresa u periodu od ZT8 do ZT11 tokom 10 uzastopnih dana, predstavljen je smanjenjem 11 i povećanjem 2 ispitivanih markera. Suprotno tome, povećanje ekspresije 12 ispitivanih markera detektovano je u vremenskoj tački ZT23. Poređenjem različitih formi *Adcy* suprotan obrazac ekspresije detektovan je samo u slučaju ekspresije *Adcy8*. Takođe, efekat je bio više izražen na nivou transkripcije markera MAPK signalnog puta. Prema dosadašnjim saznanjima, ne postoje publikovani dokazi koji pokazuju cirkadijalnu regulaciju cAMP i/ili MAPK signalnog puta u spermatozoidima. Međutim, sve pomenute signalne molekule poznati su regulatori broja i funkcionalnosti spermatozoida (Silva i sar. 2015), kao i regulatori PGC1, biogeneze OXPHOS, mitofuzije, mitofisije i mitofagije (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015). Pored toga, sve afektovane molekule deo su kompleksne signalne mreže u spermatozoidima precizno regulisane da bi obezbedile fertilizacionu homeostazu (Finkelstein i sar., 2020). Fiziološko značenje i posledica povećanja ekspresije transkripata može biti adaptivni mehanizam koji održava osnovnu funkcionalnost spermatozoida, obzirom da je pokazano da cAMP signalizacija poboljšava pokretljivost spermatozoida (Schuh i sar., 2006; Wertheimer i sar., 2013) i važna je za aktivaciju CatSper kanala (Orta i sar., 2018). Povećanje ekspresije transkripata svih subjedinića PRKA u spermatozoidima stresiranih pacova takođe predstavlja adaptivni mehanizam obzirom da je pokazano da smanjenje PRKAR2A kod astenozoospermičnih pacijenata smanjuje kvalitet spermatozoida (Capkova i sar., 2016). Takođe, povećanje nivoa ekspresije transkripata MAPK signalnog puta može se uporediti sa rezultatima koji pokazuju da testikularna hipertermija stimuliše i MAPK1/3 i MAPK14 (Jia i sar., 2009), kao i da MEK1/2 i ERK2 regulišu kapacitaciju spermatozoida



(Salgado-Lucio i sar., 2020). Rezultati ove doktorske disertacije ne obezbeđuju molekularne mehanizme niti uvid u molekularne mehanizme koji povezuju različite transkripcione profile sa specifičnim aspektima koji su u vezi sa dinamikom i funkcionalnošću mitohondrija. Međutim, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju prve rezultate koji pokazuju transkripcioni profil esencijalnih molekularnih markera za homeostazu i funkcionalnost spermatozoida nakon izlaganja ponavljanom imobilizacionom stresu u različitim cirkadijalnim vremenskim tačkama tokom inaktivne/svetle faze i aktivne/tamne faze 24 časovnog ciklusa adultnih pacova.

Takođe, prezentovani rezultati imaju važan translacioni aspekt povezan sa efektom stresa u različitim vremenskim tačkama i muškom fertiilnošću, obzirom da su mnoga skorija istraživanja pokazala povećan broj neobjašnjenih slučajeva infertiliteta muškaraca zajedno sa smanjenim nivoom fertiliteta muškaraca mlađih od 30 godina (Agarwal i sar., 2021; Barbagallo i sar., 2020). Stresan način života kao što je „život na vrhu“ alfa mužjaka pokazuje znatno veći nivo hormona stresa kod ovih jedinki u odnosu na beta mužjake (Gesquiere i sar., 2011).



**Slika 6.1.3.** Transkripcioni profili markera dinamike i funkcionalnosti mitohondrija, kao i signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost u spermatozoidima dobijenih od odraslih pacova, ponavljano stresiranih u različitim vremenskim tačkama (ZT0-ZT3, ZT08-ZT11 i ZT20-ZT23) tokom dana.

## **Hipogonadizam menja transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima**

Testosteron, dominantni cirkulišući androgen, produkovan od strane Lajdigovih ćelija, ključan je za virilizaciju i održavanje muškog fenotipa. Spermatogeneza se odvija unutar seminifernih tubula i esencijalna je za mušku plodnost. Muški hipogonadizam odnosi se na oštećenje jedne ili obe ove funkcije. Muški hipogonadizam je klinički sindrom koji se javlja usled poremećaja hipotalamo-hipofizno-gonadalne osovine na bilo kom nivou. Sekundarni hipogonadizam karakteriše nizak nivo testosterona u serumu, smanjena spermatogeneza i niske ili neprikladno normalne koncentracije gonadotropina (hipogonadotropni hipogonadizam) (Basaria, 2014). Da bismo ispitali uticaj hipogonadizma na molekularne markere mitohondrijalne biogeneze kao i signalne molekule koje ih regulišu u spermatozoidima, dizajnirani su različiti *in vivo* ogledi u kojima su dobijene hipogonadalne životinje. Eksperimentalni model prirodnog hipogonadizma dobijen je starenjem pacova (12, 18 i 21 mesec starosti). Sekundarni hipogonadizam izazvan je intramuskularnim iniciranjem GnRH analoga sa dugotrajnim dejstvom, Diferelina, adultnim mužjacima pacova. Treća grupa *in vivo* oglada predstavlja eksperimentalni model zasnovan na funkcionalnoj genomici, gde je hipogonadizam tzv. double knockout miševa dobijen kondicionalnom delecijom gena za *Insr* i *Igflr* u steroidogenim tkivima.

## **6.4. Starački hipogonadizam menja transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima**

Starenje se može definisati kao vremenski zavisno opšte smanjenje fizioloških funkcija organizma, povezano sa povećanim rizikom od morbiditeta i mortaliteta. Međutim, najistaknutije karakteristike koje su primećene u starenju ćelije su promene u mitohondrijama. Mitohondrije koje stare pokazuju strukturna oštećenja koja variraju od otoka i gubitka krista do potpunog gubitka i homogenizacije matriksa i mitohondrijalnih membrana, što dovodi do formiranja amorfnog elektron-gustog materijala. Ove senescentne mitohondrije su često uvećane, ponekad preterano, i to je razlog zašto se često nazivaju „džinovske” mitohondrije. Mutacije u mtDNK i promene u mitohondrijalnim proteinima se takođe progresivno povećavaju sa godinama (Amaral i Ramalho-Santos, 2009). Sa druge strane, proces mitohondrijalne biogeneze se na bazalnom nivou dešava stalno, i povećava se tokom obnavljanja ćelije, proliferacije, razvoja, pod uticajem različitih tipova stresa kao što su oksidativni stres, vežbanje, kalorijska restrikcija itd. Biogeneza ovih organela ne dešava se *de novo*, već proizilazi iz povećanja već postojećeg pula mitohondria. Poremećena mitohondrijalna biogeneza usko je povezana sa preuranjenim starenjem kao i počecima bolesti povezanih sa starenjem (Daskalaki i Tavernarakis, 2020).

Takođe, dobro je poznato da funkcija Lajdigovih ćelija sa starnjem opada, kako kod pacova tako i kod čoveka, što dalje dovodi do smanjenja produkcije testosterona (Chen i sar., 2020, p. 20; Sokanovic i sar., 2021, 2014). Poremećena steroidogena funkcija Lajdigovih ćelija pacova prvi put se primećuje oko dvanaestog meseca života jedinki, dalje funkcija progresivno opada do 15 meseca, dok se od petnaestog do dvadesetčetrtog meseca održava na niskom nivou (Sokanovic i sar., 2021, 2014). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji (Slika 5.4.1.A) pokazuju da je broj spermatozoida, izolovanih iz kaudalnog dela epididimisa, statistički značajno smanjen kod životinja starosti osamnaest i dvadesetjedan mesec, što je u saglasnosti sa drugim istraživanjima koja pokazuju da starenje utiče na smanjen broj spermatozoida u ejakulatu (Collodel i sar., 2021; Ng, 2004; Stone i sar., 2013) kao i smanjenje broja spermatogonijalnih stem ćelija (Kanatsu-Shinohara i sar., 2019). Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji (Slika 5.4.2.) po prvi put pokazuju transkripcioni profil markera mitohondrijalne biogeneze i funkcije kao i mitohondrijalne fuzije i arhitekture u spermatozoidima adultnih pacova kao i pacova starih dvanaest, osamnaest i dvadesetjedan mesec.

Različite studije na mladim i starim organizmima, tkivima ili tipovima ćelija pokušale su da se pozabave pitanjem kako normalno starenje utiče na mitohondrijalnu masu, ali rezultati su kontraverzni (Daskalaki i Tavernarakis, 2020). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da je nivo ekspresije transkripta *Pparg1a* povećan je u svim ispitivanim uzrasnim kategorijama, dok je povećanje ekspresije *Pparg1b* detektovano u spermatozoidima životinja starih 12 i 18 meseci (Slika 5.4.2.A). Sa druge strane, veliki broj radova sugerise da su nivoi proteina PGC1 i mRNK smanjeni tokom normalnog starenja (Daskalaki i Tavernarakis, 2020; Ghosh i sar., 2011; Picca i sar., 2013). Takođe, povećanje ekspresije *Pparg1a* može da preokrene smanjenje mišićne mase koje je zavisno od starosti, poboljša miopatiju i produži maksimalni životni vek (Daskalaki i Tavernarakis, 2020). Povećana ekspresija *Pparg1b* pokazala je korisne efekte usmerene protiv starenja u crevima miševa (Bellafante i sar., 2014). Štaviše, smanjenje PGC1 $\alpha$  i PGC1 $\beta$  povezano sa starenjem, povezano je i sa skraćivanjem telomera, što je obeležje ćelijskog starenja kao i starenja organizma (Daskalaki i Tavernarakis, 2020). Ovakvi rezultati nivoa ekspresije možda mogu biti objašnjeni činjenicom da u poređenju sa somatskim ćelijama, dužina telomera spermatozoida se iznenađujuće povećava kod starijih muškaraca kao vrsta biološke otpornosti na starenje (Chianese i Pierantoni, 2021). Stoga je model korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji koristan jer pruža dodatnu mogućnost za ispitivanje mehanizama funkcionisanja spermatozoida. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je nivo ekspresije *mtNdl* transkripta značajno povećan u spermatozoidima svih ispitivanih starosnih kategorija u odnosu na adultne spermatozoide, što može da ukazuje na povećanje broja kopija mtDNK starih spermatozoida (Slika 5.4.2.A). Dalje, rezultati drugih istraživanja pokazuju da je sa starošću broj kopija mtDNK značajno povećan, ili nepromenjen u zavisnosti od tkiva koji je ispitivano (Daskalaki i Tavernarakis, 2020). Obzirom da su transkripti glavnih markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture (*Mfn1*, *Mfn2* i *Opa1*), koji su važni za homeostazu mitohondrijalne mreže kao i funkcionalnosti (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015), dramatično povećani u spermatozoidima starih životinja, ovi rezultati možda mogu objasniti rezultate drugih autora koji su pokazali pozitivnu korelaciju ekspresionog nivoa MFN2 sa pokretljivošću i krioprotektivnim potencijalom humanih spermatozoida (Fang i sar., 2018), kao i mitofuzinima-posredovanu promociju OXPHOS (Varuzhanyan i sar., 2019). Takođe, pokazano da je nivo *Cox4i1*, gen koji kodira terminalni enzim u mitohondrijalnom respiratornom lancu kao i transkript koji je značajno povećan u spermatozoidima dvanaest i osamnaest meseci starih pacova, može biti važan u tretmanu infertilitnosti muškaraca (An i sar., 2014). Dalje, rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da je nivo ekspresije *Cytc* transkripta povećan u spermatozoidima 12, 18 i 21 mesec starih pacova (Slika 5.4.2.C), što se može povezati sa činjenicom da poremećeno oslobađanje *Cytc* iz mitohondrija humanih spermatozoida može biti prepoznatljiva molekularna odlika oligospermije i astenospermije (Zhang i sar., 2014). Veliki broj studija pokazao je da tokom starenja organizma dolazi do smanjenja pokretljivosti i morfologije spermatozoida, smanjenja progresivne pokretljivosti, kao i povećanja DNK fragmentacija i oštećenja uzrokovana reaktivnim vrstama kiseonika (Amaral i Ramalho-Santos, 2009; Chianese i Pierantoni, 2021; Kotarska i sar., 2017; Ma i sar., 2020). Objašnje za ovakve rezultate možda može biti i smanjenje nivoa ekspresije transkripta *Ucp2* koje je detektovano u spermatozoidima svih ispitivanih starosnih kategorija u ovoj disertaciji. Takođe, u saglasnosti sa dobijenim rezultatima su i rezultati koji pokazuju da inhibicija UCP2 dovodi ne samo do smanjenja pokretljivosti spermatozoida već i do povišenog nivoa mitohondrijalnih reaktivnih vrsta kiseonika, što sugerise da je UCP2 uključen u održavanje pokretljivosti spermatozoida, koja se verovatno postiže promovisanjem eliminacije mitohondrijalnih reaktivnih vrsta kiseonika (Wang i sar., 2018).

Rezultati ove disertacije pokazuju da starenje remeti transkripcione profile markera cAMP i MAPK signalnih puteva koji regulišu kako mitohondrijalnu dinamiku tako i broj i funkcionalnost spermatozoida (Slika 5.4.3). Signalne molekule čiji je nivo ekspresije transkripta istraživan u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju dobro poznate i važne regulatore broja i funkcionalnosti

spermatozoida (Silva i sar., 2015), kao i regularore PGC1, biogeneze OXPHOS, mitofuzije, mitofisije i mitofagije (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015), a takođe su važni i za fertilitet. Iako ne postoji mnogo publikovanih rezultata u ovoj oblasti, pokazano je da su cAMP signalni putevi u spermatozoidima kompartmentalizovani, sa ADCY1-9 lokalizovanim u glavenom regionu dok su ADCY10 i PRKA lokalizovani u repnom regionu (Wertheimer i sar., 2013). Genetičke studije pokazuju da je ADCY10 neophodna za mušku plodnost kod ljudi i miševa, gde su dodatne studije pokazale da je ADCY10 potrebna za pokretnije procesa kapacitacije i aktivaciju pokretljivosti spermatozoida (Balbach i sar., 2021). Smanjenje nivoa ekspresije *Adcy10* transkripta u spermatozoidima 21 mesec starih mužjaka pacova, može se povezati sa uticajem važnosti ovog tipa ADCY za pokretljivost i funkcionalnost spermatozoida, kao i činjenicom da starenje negativno utiče na obe pomenute karakteristike spermatozoida (Amaral i Ramalho-Santos, 2009; Balbach i sar., 2021; Chianese i Pierantoni, 2021; Kotarska i sar., 2017; Ma i sar., 2020). Pored toga, smanjenje nivoa ekspresije *Adcy7* i *Adcy9* detektovano je u istoj starosnoj kategoriji (21m) mužjaka pacova. Suprotno navedenim rezultatima, povećanje nivoa ekspresije transkripata većine ispitivanih adenilil ciklaza i subjedinica PRKA u spermatozoidima dvanaest i osamnaest meseci starih životinja, u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora koji pokazuju da adenozina i kateholamina analozi aktiviraju pokretljivost spermatozoida mehanizmima koji zahtevaju atipične ADCY i PRKACA spermatozoida (Schuh i sar., 2006). Takođe, rezultati ove doktorske disertacije (Slika 5.4.3.B) pokazuju da starenje povećava nivo ekspresije transkripata za *Mapk11* i *Mapk13* što može biti povezano sa činjenicom da aktivacija p38 MAPK negativno utiče na pokretljivost, kvalitet i funkcionalnost spermatozoida (Almog i sar., 2008). Takođe, obrazac ekspresije transkripata *Mapk3*, *Mapk6* i *Mapk7*, sa povećanjem ekspresije u spermatozoidima 12 meseci starih životinja, i smanjenjem ekspresije u spermatozoidima 21 mesec starih životinja, može se povezati sa rezultatima koji pokazuju da cela ERK signalna kaskada ima ulogu u kapacitaciji spermatozoida (Awda i Buhr, 2010; de Lamirande, 2002).

## **6.5. Hipogonadotropni hipogonadizam menja transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima**

Brojni radovi ukazuju na činjenicu da smanjenje nivoa cirkulišućeg testosterona, kao i smanjenje gonadotropina u adultnom periodu dovodi do smanjenja produkcije spermatozoida (Ferlin i sar., 2021; McLachlan i sar., 2002). Ranija istraživanja pokazala su da je nivo androgena u cirkulaciji statistički značajno smanjen kod *Insr/Igflr*-DKO. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji (Slika 5.6.1.) u saglasnosti su sa navedenim, obzirom da rezultati pokazuju smanjenje broja i funkcionalnosti spermatozoida adultnih mužjaka *Insr/Igflr*-DKO miševa. Dalje, pokazano je da NO kao i cGMP imaju brojne važne funkcije u reproduktivnom traktu muškaraca, uključujući pokretljivost spermatozoida, kapacitaciju, akrozomsku reakciju, hemotaksiju i sposobnost vezivanja spermatozoida za zonu pelucidu jajne ćelije (Miraglia i sar., 2011). Takođe, pokazano je da je koncentracija nitrita i nitrata u seminalnoj plazmi veća kod normozoospermičnih muškaraca u odnosu na oligozoospermične i azoospermične muškarce. Ovakva zapažanja ukazuju da lokalna sinteza NO može biti uključena u određivanje razlike u transportu spermatozoida između normozoospermičnih i oligozoospermičnih muškaraca (Revelli i sar., 2002). Stoga, smanjenje koncentracije nitrita u spermatozoidima Diferelinom tretiranih mužjaka pacova možda može ukazivati i na smanjenje pokretljivosti spermatozoida. Međutim, odustvo smanjenja koncentracije sekundarnog glasnika cGMP može ukazivati na drugačiju regulaciju cGMP signalizacije u spermatozoidima navedene grupe životinja. Dalja istraživanja uticaja sekundarnog hipogonadizma bila su usmerena na transkripcione profile markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija u spermatozoidima. Ranija istraživanja korišćenjem istog modela hipogonadotropnog hipogonadizma pokazala su da je tretman Diferelinom dovodi do smanjenja nivoa androgena u serumu (Medar i sar., 2021a). Iako prema

trenutnim literaturnim podacima ne postoje rezultati koji pokazuju uticaj sekundarnog hipogonadizma na nivo ekspresije navedenih markera, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji (Slika 5.5.2) pokazuju da je povećanje nivoa ekspresije *Pparg1a*, *Pparg1b* i *Ppara* prisutno u spermatozoidima hipogonadalnih životinja kao i starih životinja (prirodni hipogonadizam). Iako rezultati drugih naučnika pokazuju da androgeni stimuliraju mitohondrijalnu biogenezu aktivacijom AR/PGC1 $\alpha$ /TFAM signalnog puta, kao i da blokadom AR dolazi do smanjenja broja mitohondrija kao i ekspresije PGC1 $\alpha$  (Yin i sar., 2021), važno je imati u vidu dugačiju ulogu mitohondrija spermatozoida. Spermatozoidi su izuzetno specijalizovane ćelije sa jedinstvenom funkcijom u fertilizaciji. Oni poseduju visoko diferenciranu strukturu sa veoma specifičnom mitohondrijalnom organizacijom koja sugerise da su mitohondrije suštinski važne za funkcionalnost spermatozoida (Boguenet i sar., 2021). Dalje, pokazano je da je ekspresija mitohondrijalnih proteina, a posebno sujednica elektron transportnog lanca, povezana sa kvalitetom sperme (Amaral i sar., 2007). Aktivnost mitohondrijalnih enzima spermatozoida, uključujući komplekse elektron transportnog lanca, takođe je u korelaciji sa koncentracijom, vitalnošću i pokretljivošću spermatozoida (Amaral, 2013). Smanjenje ekspresije *Cox4il* transkripta u spermatozoidima hipogonadalnih životinja (Slika 5.5.2.C) možda može biti povezano sa smanjenjem broja i kvaliteta spermatozoida hipogonadalnih muškaraca (Ferlin i sar., 2021). Pored toga, rezultati ekspresije gena koji kodira enzim COX4I2 u spermatozoidima hipogonadalnih životinja u saglasnosti su sa rezultatima ekspresije istog transkripta u Lajdigovim ćelijama iste grupe životinja (Medar i sar., 2021a). Takođe, važan element mitohondrijalne funkcije je da su mitohondrije veoma dinamične organele koje međusobno interaguju u cilju odgovora na različite ćelijske potrebe. Mitohondrijalna dinamika posredovana je velikim dinamim GTP-azama (DRP1, MFN1, MFN2 i OPA1) smeštenim u mitohondrijalnim membranama. Protein MFN2, uključen u regulaciju procesa mitohondrijalne fuzije a time i očuvanje mitohondrijalne morfologije i funkcije, detektovan je u humanim spermatozoidima, sa blago povećanim nivoom ovog proteina kod normozoospermičnih pacijenata u odnosu na astenozoospermične pacijente (Boguenet i sar., 2021). Povećanje nivoa ekspresije markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture (*Mfn1*, *Mfn2* i *Opa1*) detektovano je u spermatozoidima Diferelinom tretiranih životinja, što je u saglasnosti i sa nivoom ekspresije istih transkripta u spermatozoidima starih životinja, što možda može predstavljati adaptivni mehanizam spermatozoida hipogonadalnih životinja u cilju očuvanja mitohondrijalne mreže spermatozoida.

Pored ispitivanja transkripcionih profila markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture mitohondrija, u ovoj doktorskoj disertaciji prikazani su i rezultati transkripcionih profila markera cAMP i MAPK signalnih puteva u spermatozoidima životinja tretiranih Diferelinom tj. hipogonadalnih životinja (Slika 5.5.3). Navedni molekularni markeri predstavljaju poznate i važne regulatore broja i funkcionalnosti spermatozoida (Silva i sar., 2015), kao i regularore PGC1, biogeneze OXPHOS, mitofuzije, mitofisije i mitofagije (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015), a takođe su važni i za fertilitnost. Obzirom da je transkripciona analiza u ovoj doktorskoj disertaciji pokazala prisustvo različitih izoformi ADCY (*Adcy3*, *Adcy5*, *Adcy6*, *Adcy7*, *Adcy8*, *Adcy9* i *Adcy10*), ovakav rezultat može ukazivati na ulogu obe izoforme ADCY u spermatozoidima hipogonadalnih životinja. Povećanje nivoa ekspresije *Adcy6*, *Adcy8* i *Adcy10* detektovano je u spermatozoidima životinja tretiranih Diferelinom (sekundarni hipogonadizam) ali i u spermatozoidima starih životinja (prirodni hipogonadizam), što možda može ukazivati na važnu ulogu svih izoformi ADCY u genezi cAMP-a u spermatozoidima hipogonadalnih mužjaka, koje su neophodne za maturaciju kao i inicijaciju pokretljivosti spermatozoida (Balbach i sar., 2021). Dalje, povećanje nivoa ekspresije transkripta većine ispitivanih subjednica PRKA (*Prkar2a*, *Prkar2b* i *Prkaca*) u spermatozoidima hipogonadalnih životinja kao i u spermatozoidima dvanaest i osamnaest meseci starih životinja, u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora koji pokazuju da cAMP signalizacija poboljšava pokretljivost spermatozoida (Schuh i sar., 2006; Wertheimer i sar., 2013) i važna je za

aktivaciju CatSper kanala (Orta i sar., 2018). Takođe, povećanje nivoa ekspresije transkripata za većinu subjedinica PRKA možda predstavlja adaptivni mehanizam hipogonadalnih spermatozoida, obzirim da rezultati drugih autora pokazuju da smanjenje PRKAR2A astenozoospermičnih muškaraca smanjuje kvalitet spermatozoida. Pored toga, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji (Slika 5.5.3.B) pokazuju da u spermatozoidima hipogonadalnih životinja dolazi do povećanja nivoa ekspresije transkripata za p38 MAPK (*Mapk11* i *Mapk13*), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u spermatozoidima starih životinja, i možda predstavlja adaptivni mehanizam hipogonadalnih spermatozoida obzirom na ulogu p38 MAPK u pokretljivosti spermatozoida, i njenoj lokalizaciji u postakrozomalnom regionu, kao i repnom delu spermatozoida (Almog i sar., 2008).

## **6.6. Akutni i ponavljani *in vivo* tretmani Sildenafilom menjaju transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima starih pacova**

Kao što je navedeno, kvalitet sperme kao i fertilitnost od velike su važnosti ne samo kao fundamentalni markeri reproduktivnog zdravlja, već i kao biomarkeri opšteg zdravlja organizma (Barbagallo i sar., 2020; Nordkap i sar., 2016). Uprkos tome, podaci o bolestima povezanim sa muškom neplodnošću su još uvek oskudni, a istraživanje neplodnih muškaraca često je ograničeno na analizu sperme. Lečenje se često fokusira samo na začecje, uglavnom uz pomoć potpomognutih reproduktivnih tehnologija, a opšte zdravstveno stanje muškaraca se ne uzima u obzir u velikoj meri. Pokazano je da ne samo što muška neplodnost može biti uzrokovana različitim etiologijama, već i sami parametri spermograma predstavljaju krajnju tačku različitih patofizioloških mehanizama. Međutim, studije koje se bave sveobuhvatnim kliničkim pristupom u cilju definisanja etioloških faktora neplodnih muškaraca su retke (Ferlin i sar., 2021). Primena različitih eksperimentalnih modela koji oponašaju situacije u humanoj populaciji, korišćenjem laboratorijskih životinja, možda može biti dobra polazna tačka za detekciju molekularnih obrazaca koji su povezani sa muškom neplodnošću. U tom maniru, u okviru ove doktorske disertacije urađeni su ogledi na starim mužjacima pacova akutno i hronično tretirani Sildenafilom, sa ciljem karakterizacije molekularnih profila mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture kao i njihovih regulatornih molekula u spermatozoidima. Mitohondrije, sa svojim brojnim funkcijama i sposobnosti za unutarćelijsko kretanje, od velike su važnosti za homeostazu ćelija (Markaki i Tavernarakis, 2020), a posebno kod visoko energetske zavisnih ćelija kao što su spermatozoidi (Barbagallo i sar., 2020). Sildenafil citrat (Viagra, Pfizer), inhibitor PDE5, prvi je oralni agent odobren 1998 godine od strane Uprave za hranu i lekove Sjedinjenih Američki Država, u cilju lečenja erektilne disfunkcije. Dobro su poznata pozitivna dejstva dugotrajne upotrebe ovog inhibitora PDE5, na testikularnu steroidogenezu i histološke odlike testisa starih mužjaka pacova (Sokanovic i sar., 2018). Takođe, ranija istraživanja pokazala su da akutni kao i ponavljani tretman Sildenafilom starih mužjaka pacova povećava koncentraciju testosterona u serumu. U saglasnosti sa tim, rezultati (Slika 5.7.1) prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da ponavljani tretman starih pacova Sildenafilom u trajanju od 4 meseca, povećava broj spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa. Iako akutni tretman Sildenafilom 18 meseci starih pacova nije statistički značajno povećao broj spermatozoida, istraživanja muškaraca sa problemima seksualne disfunkcije pokazuju da akutni tretman Sildenafilom povećava broj spermatozoida kao i njihovu linearnu pokretljivost (Jannini i sar., 2004). Sa druge strane, meta analiza i sistematski pregled literature pokazuje da akutna administracija PDE5 inhibitora nema uticaja na volumen sperme i koncentraciju spermatozoida muškaraca, dok su procenat pokretljivosti spermatozoida i progresivna pokretljivost povećane nakon oralnog tretmana PDE5 inhibitorom samo kod infertilnih muškaraca, ali ne i kod normalnih pacijenata (Tan i sar., 2017). Prema posledjim pretraživanjima literature, ne postoje istraživanja molekularnih markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u spermatozoidima starih pacova akutno i

ponavljano tretiranih Sildenafilom. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da akutni tretman Sildenafilom remeti ekspresiju većeg broja ispitivanih transkripata za navedene molekularne markere u odnosu na hronični tretman Sildenafilom (Slika 5.7.2 i Slika 5.7.4). Smanjenje nivoa ekspresije transkripata *Ppargc1a* i *Ppargc1b*, koji kodiraju protein koji je master regulator mitohondrijalne biogeneze (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020), detektovano je u spermatozoidima starih pacova akutno (*Ppargc1a* i *Ppargc1b*) i ponavljano (*Ppargc1b*) tretiranih Sildenafilom. Takođe, smanjenje nivoa ekspresije markera fuzije i arhitekture mitohondrija detektovano je u spermatozoidima starih pacova akutno (*Mfn1*, *Mfn2* i *Opa1*) i ponavljano (*Mfn2*) tretiranih Sildenafilom, što je u saglasnosti sa nivoom ekspresije navedenih markera u Lajdigovim ćelijama starih pacova akutno tretiranih Sildenafilom (Sokanovic i sar., 2021). Ispitivanje nivoa ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije i arhitekture mitohondrija kao i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima starih pacova akutno i ponavljano tretiranih Sildenafilom pokazuje donekle obrazac smanjenja nivoa većine ispitivanih markera (*Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *mtNdl*, *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*, *Cox4i2*, *Ucp2*). Takođe, pokazano je da kod muškaraca sa lošim kvalitetom sperme dolazi do značajnog povećanja broja kopija mtDNK (Song i Lewis, 2008), kao i da abnormalni spermatozoidi muškaraca imaju značajno veću amplifikaciju mtDNK (May-Panloup i sar., 2003). Stoga, smanjenje većine ispitivanih markera mitohondrijalne biogeneze, mitofuzije i funkcionalnosti mitohondrija možda može ukazivati na poboljšanje funkcionalnosti mitohondrija spermatozoida starih životinja tretiranih Sildenafilom, obzirom da je suprotan efekat, odnosno povećanje ekspresije većine navedenih markera detektovano u spermatozoidima starih životinja u donosu na adultne.

Pored analize molekularnih markera mitohondrijalne biogeneze, funkcionalnosti i fuzije/arhitekture, u okviru ove doktorske disertacije analizirani su i nivou ekspresije markera signalnih molekula koji regulišu procese mitohondrijalne dinamike u spermatozoidima starih životinja akutno i ponavljano tretiranih Sildenafilom. Navedni molekularni markeri predstavljaju markere cAMP i MAPK signalnih puteva, koji su poznati i važni regulatore broja i funkcionalnosti spermatozoida (Silva i sar., 2015), kao i regulatori PGC1, biogeneze OXPHOS, mitofuzije, mitofisije i mitofagije (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015). Rezultati pokazuju (Slika 5.7.3. i Slika 5.7.5) da akutni tretman Sildenafilom menja 3 od ispitivanih 21 marker (14.3%), dok hronični tretman menja 7 od 21 ispitivani marker (33.3%) signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima. Povećanje nivoa ekspresije *Prkar2a* u spermatozoidima starih životinja akutno tretiranih Sildenafilom možda mogu ukazivati na poboljšanje kvaliteta spermatozoida, obzirom da je suprotan obrazac ekspresije PRKAR2A detektovan u spermatozoidima pacijenata sa dijagnozom astenozoospermije (Capkova i sar., 2016). Suprotan obrazac ekspresije različitih ADCY u spermatozoidima starih pacova tretiranih tokom četiri meseca Sildenafilom, sa povećanjem ekspresije transkripta *Adcy7*, kao i smanjenjem ekspresije transkripta *Adcy3* i *Adcy10* kao i *Prkar1a* može ukazivati na različit mehanizam regulacije ekspresije gena koji kodiraju ADCY i regulatorne subjedinice PRKA u spermatozoidima pri hroničnom tretmanu inhibicije PDE5. Iako do sada nema publikovanih rezultata o uticaju Sildenafilom na ekspresiju navedenih markera u spermatozoidima, genetičke sudije pokazale su da je ADCY10 neophodna za plodnost muškaraca, pri čemu su dodatne studije pokazale da je ADCY10 potrebna za pokretnije procesa kapacitacije i aktivaciju pokretljivosti spermatozoida (Balbach i sar., 2021). Analiza ekspresije transkripta *Mapk14* u spermatozoidima pokazala je suprotan obrazac ekspresije nakon akutnog tretmana Sildenafilom gde je detektovano smanjenje nivoa ekspresije, i ponavljano tretmana Sildenafilom gde je detektovano povećanje nivoa ekspresije navedenog transkripta. Ponavljani tretman Sildenafilom možda ima ulogu u stimulaciji pokretljivosti i funkcionalnosti spermatozoida, obzirom na ulogu p38 MAPK u pokretljivosti spermatozoida, i njenoj lokalizaciji u postakrozomalnom regionu kao i repnom delu spermatozoida (Almog i sar., 2008). Dok sa druge strane, akutni tretman Sildenafilom, zbog kratkog vremena delovanja, ne ispoljava takav efekat. Takođe, *ex vivo* tretman spermatozoida adultnih i starih mužjaka



inhibitorom PDE5 Sildenafilom, promenio je nivo nitrita u ćelijskom sadržaju kao i u ćelijskom medijumu (Slika 5.7.6. i Slika 5.7.7). Povećanje koncentracije nitrita (stabilnog oksidacionog produkta NO) detektovano je u spermatozoidima 12 meseci starih životinja u odnosu na adultne, što je u saglasnosti sa nivoom koncentracije nitrita u serumu mužjaka iste starosne kategorije (Sokanovic i sar., 2018). Takođe, *ex vivo* tretman Sildenafilom koncentracije 0.1 mM i 0.5 mM povećao je nivo nitrita u spermatozoidima starih životinja i u odnosu na netretirane spermatozoide iste starosne kategorije i u odnosu na nivo nitrita u netretiranim adultnim spermatozoidima. Sa druge strane, Sildenafil koncentracije 1 mM i 5 mM smanjio je koncentraciju nitrita u spermatozoidima starih pacova u odnosu na netretirane spermatozoide iste starosne kategorije. Koncentracije Sildenafil od 1 mM i 5 mM su, suprotno 12 meseci starim spermatozoidima, povećale koncentraciju nitrita adultnih spermatozoida u odnosu na netretirane adultne uzorke (Slika 5.7.6.A). Navedeni rezultati možda mogu objasniti rezultate drugih koji pokazuju da nakon inkubacije spermatozoida zdravih muškaraca u prisustvu 0.03, 0.3 i 3  $\mu$ M Sildenafil, dolazi do smanjenja nivoa ATP-a ali povećanja nivoa slobodnih kiseoničnih radikala generisanih u mitohondrijama (Sousa i sar., 2014). Određivanjem koncentracije nitrita u ćelijskom medijumu nakon inkubacije spermatozoida u prisustvu različitih koncentracija Sildenafil, dobijeni rezultati pokazuju da adultni spermatozoidi oslobađaju veću količinu nitrita nakon inkubacije 0.5 mM Sildenafilom, dok spermatozoidi 12 meseci starih mužjaka povećavaju oslobađanje nitrita u medijum tokom inkubacije u prisustvu 0.1 mM Sildenafil. Smanjenje nivoa oslobođenog stabilnog oksidativnog produkta NO, detektovano nakon inkubacije spermatozoida starog fenotipa u prisustvu 0.5, 1 i 5 mM Sildenafil, u odnosu na netretirane adultne spermatozoide. Sa druge strane, povećanje koncentracije nitrita u ćelijskom medijumu detektovano je nakon inkubacije spermatozoida 18 meseci starih pacova u prisustvu 5 mM Sildenafil i nakon 2 sata i 6 sati stimulacije. Prezentovani rezultati možda mogu biti povezani sa rezultatima drugih autora koji su pokazali povećanje nivoa produkcije superoksida i smanjenje nivoa ATP-a nakon dvadestčetvoročasovne inkubacije humanih spermatozoida u prisustvu 0.3  $\mu$ M Sildenafil (Ramalho-Santos i Amaral, 2013).

### **6.7. Ponavljani *in vivo* tretman Metforminom menja transkripcione profile markera mitohondrijale biogeneze, fuzije/arhitekture, kao i markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima adultnih i starih pacova**

AMP-aktivirana protein kinaza, AMPK, je ključni ćelijski senzor energetskeg statusa, protein sastavljen od katalitičke  $\alpha$  subjedinice i dve regulatorne subjedinice  $\beta$  i  $\gamma$  (Zhu i sar., 2018). AMPK se aktivira u patofiziološkim situacijama (vežbanje, stres), metaboličkim hormonima (leptin, adiponektin, grelin) ili farmakološkim agensima kao što su 5-aminoimidazol-4-karboksamid-1- $\beta$ -D-ribozid (AICAR), metformin i tiazolidindioni (Tiazolidindioni) (Bertoldo i sar., 2015). Studije su pokazale je da je AMPK ekspresovana u gonadama i da ima važnu ulogu u reproduktivnoj funkciji povezujući gonadalnu osovinu sa energetskeg balansom (Bertoldo i sar., 2015). Takođe, pokazano je da je AMPK protein ekspresovan u spermatozoidima epididimisa miša (Bertoldo i sar., 2014b) i da je lokalizovan u glavenom regionu kao i u središnjem regionu spermatozoida (Hurtado de Llera i sar., 2018). Imunofluorescentna analiza adultnih spermatozoida kaudalnog epididimisa pacova prikazana u ovoj disertaciji (Slika 5.1.8) pokazuje da je lokalizacija  $\alpha$  subjedinice AMPK u središnjem regionu spermatozoida, obzirom da je najintenzivniji fluorescentni signal detektovan u ovom regionu.

Metformin je molekul iz porodice biguanida i ima sposobnost smanjenja reaktivnih vrsta kiseonika kao i aktivacije transkripcionog faktora Nrf2, što rezultira povećanom ekspresijom antioksidativnih gena. Na citoplazmatskom nivou, Metformin je u stanju da smanji aktivnost mitohondrijalnog kompleksa I, što rezultira smanjenjem reaktivnih vrsta kiseonika. Iako je Metformin u upotrebi već više od 50 godina, mehanizam delovanja metformina je počeo da se razume tek od poslednje decenije i opisan je kroz aktivaciju AMPK Metforminom (Zhou i sar., 2001). Iako do sad

nisu poznati podaci o koncentraciji Metformina u testisima, ranija studija je pokazala da Metformin može da prođe krvno-moždanu barijeru, ali i da se može transportovati u reproduktivna tkiva pomoću membranskih transportera kao što su transporteri organskih katjona (Bertoldo i sar., 2014a). Da bismo ispitali efekat Metformina na broj, funkcionalnost kao i ekspresiju molekularnih markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture, ali i markera signalnih puteva koji ih regulišu, dizajnirani su eksperimentalni modeli na adultnim i starim mužjacima pacova tretiranim tokom 3 ili tokom 6 meseci lekom Metformin. Tromesečni tretman adultnih mužjaka pacova smanjio je koncentraciju cGMP-a u spermatozoidima, dok je sa druge strane kod starih pacova doveo do smanjenja nivoa nitrita, stabilnog oksidacionog produkta NO, ali i povećanja nivoa cGMP-a u spermatozoidima (Slika 5.8.1). Suprotno tome, podaci studije o efektima Metformina na ćelije endotela aorte pokazuju da metformin povećava aktivnost endotelijalne azot-oksida sintaze, ali smanjuje nivo cGMP-a u navedenim ćelijama (Kinaan i sar., 2015). Takođe, *ex vivo* tretman adultnih spermatozoida menja koncentraciju nitrita u ćelijskom medijumu, povećanjem nivoa nitrita nakon tretmana 100  $\mu$ M Metforminom i smanjujući nivo nitrita nakon tretmana 600  $\mu$ M Metforminom (Slika 5.8.7).

Rezultati šestomesečnog tretmana Metforminom starih mužjaka pacova pokazuju povećanje broja spermatozoida kaudalnog epididimisa, ali sa druge strane smanjenje funkcionalnosti spermatozoida, detektovano smanjenjem % spermatozoida kod kojih je progesteronom stimulirana akrozomska reakcija (Slika 5.8.4). Povećanje broja spermatozoida nakon šestomesečnog tretmana starih pacova Metforminom u saglasnosti je sa pokazanim stimulatornim dejstvom Metformina na broj i pokretljivost spermatozoida dijabetičnih pacova (Attia i sar., 2009; Chen i sar., 2020). Uticaj Metformina na akrozomsku reakciju spermatozoida pokazuje različite efekte, smanjenje (Hurtado de Llera i sar., 2018), povećanje (Nguyen i sar., 2014; Zhu i sar., 2018) ili čak bez uticaja na akrozomsku reakciju (Bertoldo i sar., 2014a) ukazujući da je optimalna doza kao i dužina trajanja tretmana aktivacije AMPK esencijalna za regulaciju funkcije spermatozoida (Bertoldo i sar., 2015).

Obzirom na sposobnost Metformina da indirektno aktivira AMPK blokirajući elektron transportni lanac mitohondrija (Nguyen i sar., 2014), istraživanja u okviru ove doktorske disertacije rađena su na nivou ekspresije transkriptata molekularnih markera mitohondrijalne biogeneze, mitofuzije/arhitekture kao i mitohondrijalne funkcionalnosti. Rezultati ekspresije transkriptata za glavne markere mitohondrijalne biogeneze (Slika 5.8.2. i Slika 5.8.5) ukazuju da tromesečni i šestomesečni tretman Metforminom menjaju transkripciju navedenih markera u spermatozoidima adultnih i starih životinja. Nivoi ekspresije transkriptata koji kodiraju PGC1 (*Ppargc1a* i *Ppargc1b*) povećani su u spermatozoidima adultnih i starih životinja tretiranih tokom 3 meseca Metforminom. Ovi rezultati u saglasnosti su sa rezultatima drugih istraživača koji pokazuju da inaktivacija  $\alpha$ 1AMPK u Sertolijevim ćelijama miševa smanjuje ekspresiju PGC1 $\alpha$  (Martin-Hidalgo i sar., 2018). Takođe, pokazano je da ishrana pacova visoko-energetskom hranom (dovodeći do stanja predijabetesa) dovodi do značajnog smanjenja nivoa PGC1  $\alpha$  proteina u testisima (Rato i sar., 2014). Kompleks SIRT1 i fosforilisanog PGC1 $\alpha$  može da stimuliše ekspresiju NRF1/NRF2 koji dalje pozitivno regulišu ekspresiju gena mitohondrijalnih proteina koji formiraju subjedinice OXPHOS kompleksa (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020). Stimulacija ekspresije *Nrf1* transkripta detektovana je u spermatozoidima adultnih mužjaka tretiranih Metforminom, dok je suprotan efekat smanjenja nivoa ekspresije navedenog transkripta detektovano u spermatozoidima starih životinja tretiranih Metforminom u trajanju od 6 meseci. Ovakvi rezultati možda mogu potvrditi antidijabetogeni efekat Metformina na adultne životinje, obzirom da je pokazano da u testisima pacova u stanju predijabetesa ne dolazi do promene u nivou ekspresije NRF1 proteina (Rato i sar., 2014). Suprotan obrazac ekspresije detektovan je na nivou ekspresije transkripta *mtNdl*, gde tromesečni tretman Metforminom adultnih i starih pacova povećava nivo ekspresije ovog transkripta, dok suprotno tome šestomesečni tretman Metforminom smanjuje nivo navedenog transkripta u spermatozoidima. Ovakav rezultat ekspresije pokazuje da dužina trajanja tretmana Metforminom utiče na nivo ekspresije *mtNdl* u

spermatozoidima starih pacova. Obzirom na povećanje ekspresije transkripata glavnih markera mitohondrijalne fuzije (*Mfn1*, *Mfn2* i *Opa1*) koji su važni za homeostazu mitohondrijalne mreže kao i funkcionalnosti (Dominy i Puigserver, 2013; Markaki i Tavernarakis, 2020; Pyakurel i sar., 2015), nakon *in vivo* tretmana Metforminom, ovi rezultati možda mogu objasniti rezultate drugih autora koji su pokazali pozitivnu korelaciju ekspresionog nivoa MFN2 sa pokretljivošću i krioprotektivnim potencijalom humanih spermatozoida (Fang i sar., 2018). Takođe, pokazano je da dodatak Metformina u medijum za krioprezervaciju spermatozoida ima pozitivno dejstvo na sposobnost fertilizacije spermatozoida (Bertoldo i sar., 2014a; Grandhaye i sar., 2020). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da aktivacija AMPK Metforminom dovodi do povećanja nivoa ekspresije transkripta *Cytc* u spermatozoidima adultnih pacova, dok je povećanje ekspresije *Cox4i2* transkripta detektovano u spermatozoidima adultnih i starih pacova tretiranih Metforminom, suprotno dejstvu inaktivacije  $\alpha$ 1AMPK u Sertolijevim ćelijama na smanjenje ekspresije citohroma c (Martin-Hidalgo i sar., 2018). Pokazano je povećanje nivoa slobodnih vrsta kiseonika detektovano je u testisima i semenju tečnosti gojaznih i dijabetičnih individua, dok je takođe poznato da UCP proteini imaju antioksidativne aktivnosti što može imati važnu ulogu u posredovanju štetnih uticaja dijabetesa na mušku neplodnost (Monteiro i sar., 2021). Smanjenje nivoa ekspresije *Ucp1* u spermatozoidima adultnih i starih mužjaka, kao i smanjenje *Ucp2* u spermatozoidima starih životinja tretiranih Metforminom, možda može ukazivati na antioksidativno dejstvo Metformina u spermatozoidima, obzrom da su druge studije pokazale stimulatoran efekat metformina na spermatozoide različitih vrsta uključujući antioksidativnu ulogu kod dijabetičnih pacova (Calle-Guisado i sar., 2019).

Ispitivanje uticaja ponavljano tretmana Metforminom na transkripcioni profil molekularnih markera signalnih puteva cAMP i MAPK u spermatozoidima, pokazuje da tromesečni tretman menja 17 od 22 ispitivana markera (77%), dok šestomesečni tretman utiče na promenu 6 od 21 ispitivanih markera navedenih signalnih puteva u spermatozoidima adultnih i starih životinja (Slika 5.8.3. i Slika 5.8.6). Veliki broj promenjenih transkripata cAMP signalnog puta u spermatozoidima nakon *in vivo* tretmana Metforminom pokazuje da aktivacija AMPK ovim lekom dovodi do promena u nivou transkripcije gena koji kodiraju ADCY kao i regulatornih i katalitičkih formi PRKA. Povećanje ekspresije većine ispitivanih transkripata ADCY, *Adcy3*, *Adcy5*, *Adcy6*, *Adcy7*, *Adcy8*, *Adcy9* kao i *Adcy10*, u spermatozoidima mužjaka tretiranih Metforminom možda može biti povezano sa stimulatornim dejstvom aktivacije AMPK Metforminom na pokretljivost spermatozoida (Attia i sar., 2009; Bertoldo i sar., 2014a; Chen i sar., 2020; Grandhaye i sar., 2020; Zhu i sar., 2018). Takođe rezultati pokazuju da tretman Metforminom povećava nivo ekspresije većine ispitivanih subjedinica PRKA u spermatozoidima, što možda može ukazivati na regulaciju ekspresije navedenih transkripata aktivacijom AMPK. Takođe, pokazano je da *PRKARIA* transkript predstavlja jedan od 10 važnih transkripata u spermatozoidima muškaraca sa dijabetes melitusom tip 2 (Chen i sar., 2020). Dalje, rezultati ovde doktorske disertacije pokazuju povećanje nivoa transkripcije 60% ispitivanih markera MAPK signalnog puta, što se može uporediti sa istraživanjima koja pokazuju da MEK1/2 i ERK2 regulišu polimerizaciju aktina povezanu sa kapacitacijom spermatozoida (Salgado-Lucio i sar., 2020). Takođe, istraživanja pokazuju da Metformin i aktivacija AMPK utiču na proces kapacitacije i akrozomske reakcije spermatozoida (Martin-Hidalgo i sar., 2018; Zhu i sar., 2018). Dalje, važno je istaći da je MAPK11 jedna od najvažnijih MAPK u spermatozoidima locirana u glavenom regionu u nefosforilisanom obliku, dok se fosforilisana forma ovog proteina translocira u središnji region spermatozoida gde je pokazano i prisustvo  $\alpha$  subjedinice AMPK (Slika 5.1.8).

## **6.8. Pravci budućih istraživanja, translacioni aspekt i inovativni potencijal rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji**

Pravci budućih istraživanja su otkrivanje mehanizama koji menjaju transkripcione profile markera mitohondrijalne dinamike i regulatornih signalnih puteva, kao formiranje matematičkih modela. Direktni translacioni aspekt je potvrđen na uzorcima humanih spermatozoida i dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji. Potvrda inovativnog potencijala rezultata disertacije je projekat dokaza koncepta EUTech4PoC Evropske Unije koji je zasnovan na rezultatima ove doktorske disertacije i prikazan kao primer dobre prakse EUTech4PoC projekata Evropske Unije.

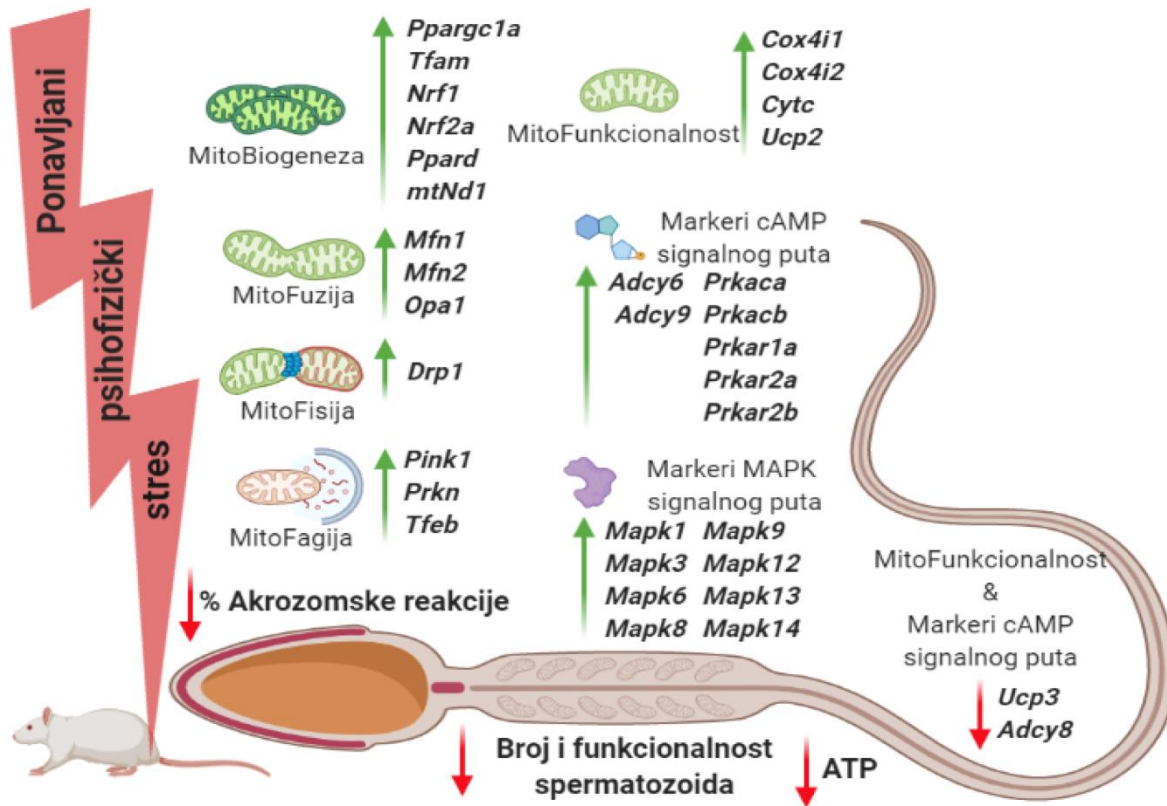
# **7. Zakujuči**

Na osnovu dobijenih rezultata, opšti zaključak je da u uslovima poremećene homeostaze cirkulišućih androgena dolazi do promene transkripcionih profila markera mitohondrijalne dinamike, kao i markera regulatornih signalnih puteva (cAMP i MAPK), a u cilju adaptacije specifičnih ćelijskih tipova reproduktivne osovine (detaljnije u specifičnim zaključcima).

(1) Akutni i ponavljani psihofizički stres menjaju profile markera mitohondrijalne dinamike, te na taj način stvaraju jedan od mehanizama adaptacije specifičnih tipova ćelija u reproduktivnom sistemu mužjaka.

Zaključak je izveden na osnovu dole-navedenih rezultata.

- Povećanih nivoa stres hormona, adrenalina i kortikosterona u cirkulaciji.
- Smanjenog nivoa androgena u cirkulaciji.
- Promenjene ekspresije transkripata (*Ppara*, *Ppard* i *mtNd1*) i proteina (NRF1, TFAM, TFB1M i COX4) markera mitohondrijalne biogeneze i funkcionalnosti u hipotalamusu.
- Promenjene ekspresije transkripata (*Ppargc1b*, *Ppard*, *Ucp3* i *mtNd1*) i proteina (PGC1, TFB1M, COX4) markera mitohondrijalne biogeneze i funkcionalnosti u adenohipofizi.
- Promenjene ekspresije transkripata (*Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Ppard*, *Cytc* i *Ucp1*) markera mitohondrijalne biogeneze i funkcionalnosti u celoj adrenalnoj žlezdi, kao i korteksu i meduli adrenalne žlezde.
- Smanjenog broja spermatozoida izolovanih iz kaudalnih epididimisa životinja izlaganih deset puta ponavljanom psihofizičkom stresu.
- Smanjene koncentracije ATP-a u spermatozoidima nakon akutnog i deset puta ponavljano psihofizičkog stresa.
- Smanjene funkcionalnosti spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) nakon akutnog i deset puta ponavljano psihofizičkog stresa, kao i nakon tretmana stres hormonima adrenalinom i hidrokortizonom.
- Povećane ekspresije transkripata markera mitohondrijalne biogeneze (*Ppargc1a*, *Tfam*, *Nrf1*, *Nrf2a*, *Ppard* i *mtNd1*), mitohondrijalne fuzije (*Mfn1*, *Mfn2* i *OPA1*), mitohondrijalne fisije (*Drp1*), mitohondrijalne autofagije (*Pink1*, *Prkn* i *Tfeb*) i markera funkcionalnosti mitohondrija (*Cox4i1*, *Cox4i2*, *Cytc* i *Ucp2*) u spermatozoidima nakon deset puta ponavljano psihofizičkog stresa.
- Promenjene ekspresije transkripata (dominantno u smislu povećanja) markera mitohondrijalne dinamike u spermatozoidima u prisustvu agonista i/ili antagonista adrenergičkih receptora.
- Povećane ekspresije transkripata signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku i funkcionalnost, kao i broj i funkcionalnost spermatozoida: cAMP (*Adcy6*, *Adcy9*, *Prkaca*, *Prkacb*, *Prkar1a*, *Prkar2a* i *Prkar2b*) i MAPK (*Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk6*, *Mapk8*, *Mapk9*, *Mapk12*, *Mapk13* i *Mapk14*) signalinga.



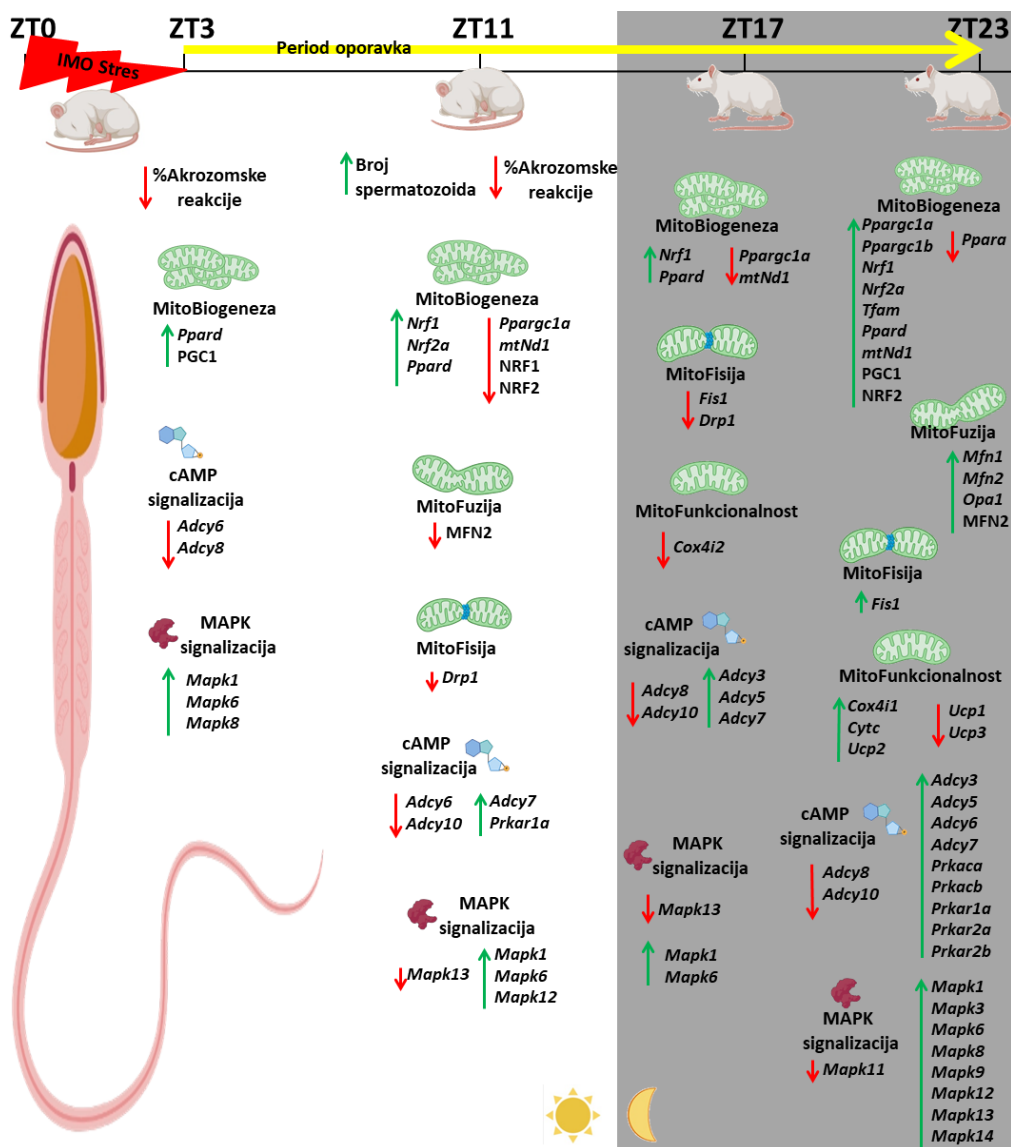
**Slika 7.1.** Ponavljani psihofizički stres remeti transkripcione profile markera mitohondrijalne dinamike kao i markera signalnih puteva koji regulišu i mitohondrijalnu dinamiku i homeostazu spermatozoida.



(2) Tokom oporavka organizma od akutnog psihofizičkog stresa menjaju se molekularni profili markera mitohondrijalne dinamike, te se na taj način stvara jedan od mehanizama adaptacije spermatozoida.

Zaključak je izveden na osnovu dole-navedenih rezultata.

- Smanjenja broja spermatozoida tokom perioda oporavka od akutnog stresa.
- Povećane funkcionalnosti spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) nakon 14 i 20 sati oporavka od akutnog stresa.
- Promenjene ekspresije transkripata 91% ispitivanih markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima.
- Promenjene ekspresije transkripata 91% ispitivanih markera signalnih molekula cAMP i MAPK signalnih puteva, koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku/funkcionalnost i homeostazu spermatozoida.

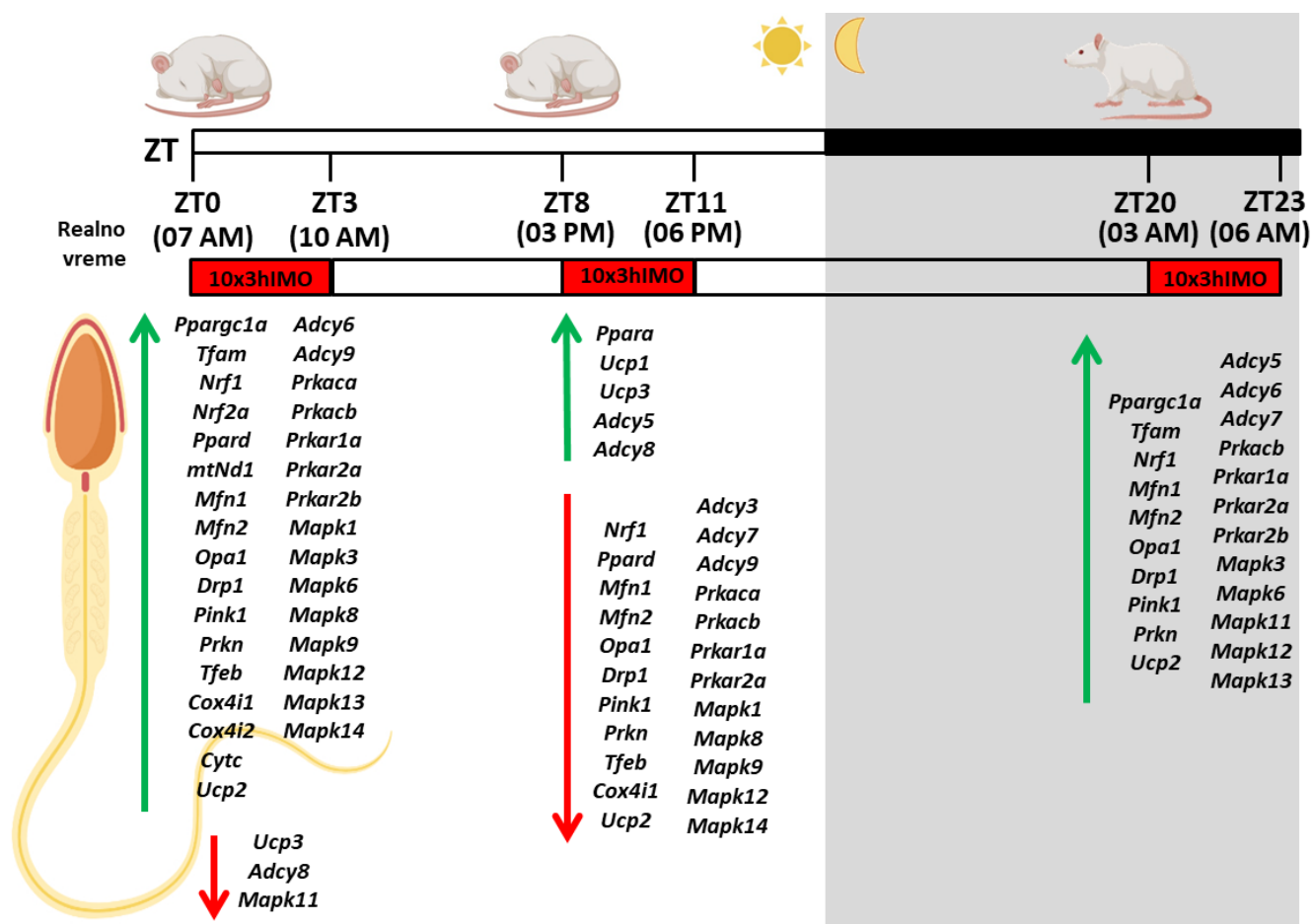


Slika 7.2. Tokom oporavka organizma od akutnog stresa (najčešćeg tipa stresa u humanoju populaciji) značajno se menjaju profili ekspresije transkripata za markere dinamike i funkcionalnosti mitohondrija, kao i markere signalnih molekula koji regulišu dinamiku/funkcionalnost mitohondrija i homeostazu spermatozoida.

(3) Ponavljani psihofizički stres organizma primenjen u različitim vremenskim tačkama u toku dana menja molekularne profile markera mitohondrijalne dinamike, i na taj način stvara jedan od mehanizama adaptacije spermatozoida.

Zaključak je izveden na osnovu dole-navedenih rezultata.

- Smanjenog broja i funkcionalnosti spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) u svim ispitivanim vremenskim tačkama (ZT3, ZT11, ZT23).
- Promenjene ekspresije transkripata 91% ispitivanih markera mitohondrijalne dinamike i funkcionalnosti u spermatozoidima. Sličan transkripcioni profil promena detektovan je u vremenskim tačkama ZT3 i ZT23, ali suprotan u vremenskoj tački ZT11, ukazujući na eventualnu vremenski zavisnu prirodu adaptivnog odgovora u spermatozoidima.
- Promenjene ekspresije transkripata 86% ispitivanih markera cAMP i MAPK signalnih puteva, koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku/funkcionalnost i homeostazu spermatozoida. Sličan profil promena detektovan je u vremenskim tačkama ZT3 i ZT23, ali suprotan u vremenskoj tački ZT11, ukazujući na vremenski zavisnu prirodu adaptivnog odgovora u spermatozoidima.



**Slika 7.3.** Transkripcioni profili markera dinamike i funkcionalnosti mitohondrija, kao i signalnih molekula koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku/funkcionalnost i homeostazu spermatozoida mužjaka ponavljano stresiranih u različitim vremenskim tačkama (ZT0-ZT3, ZT08-ZT11 i ZT20-ZT23) tokom dana.

(4) Starenje organizma menja molekularne profile markera mitohondrijalne biogeneze, te na taj način stvara jedan od mehanizama adaptacije spermatozoida.

Zaključak je izveden na osnovu dole-navedenih rezultata.

- Smanjenog broja spermatozoida 18 i 21 mesec starih životinja.
- Promenjene ekspresije transkripata 77% ispitivanih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima starih životinja.
- Promenjene ekspresije transkripata 68% ispitivanih markera cAMP i MAPK signalnih puteva, koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku/funkcionalnost i homeostazu spermatozoida starih životinja.

(5) Hipogonadotropni hipogonadizam menja molekularne profile markera mitohondrijalne biogeneze, te na taj način stvara jedan od mehanizama adaptacije spermatozoida.

Zaključak je izveden na osnovu dole-navedenih rezultata.

- Smanjene koncentracije nitrata u spermatozoidima hipogonadalnih životinja.
- Promenjene ekspresije transkripata 56% ispitivanih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima hipogonadalnih životinja.
- Promenjene ekspresije transkripata 50% ispitivanih markera cAMP i MAPK signalnih puteva, koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku/funkcionalnost i homeostazu spermatozoida hipogonadalnih životinja.

(6) Hipogonadizam adutnih miševa koji je prouzrokovan kondicionalnom delecijom gena za insulinski i IGF1 receptor u steroidogenim ćelijama menja broj i funkcionalnost spermatozoida.

Zaključak je izveden na osnovu dole-navedenih rezultata.

- Smanjenog broja spermatozoida izolovanih iz kaudalnog epididimisa.
- Smanjene funkcionalnosti spermatozoida (% spermatozoida koji su prošli akrozomsku reakciju) izolovanih iz kaudalnog epididimisa.

(7) Akutni i ponavljani *in vivo* tretman starih mužjaka pacova Sildenafilom menja molekularne profile markera mitohondrijalne biogeneze, te na taj način stvara jedan od mehanizama adaptacije spermatozoida.

Zaključak je izveden na osnovu dole-navedenih rezultata.

- Povećanog broja spermatozoida nakon ponavljanog tretmana Sildenafilom tokom četiri meseca.
- Promenjene ekspresije transkripata 56% ispitivanih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima starih životinja akutno tretiranih Sildenafilom.
- Promenjene ekspresije transkripata 14% ispitivanih markera cAMP i MAPK signalnih puteva, koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku/funkcionalnost i homeostazu spermatozoida starih životinja akutno tretiranih Sildenafilom.
- Promenjene ekspresije transkripata 20% ispitivanih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima starih životinja ponavljano tretiranih Sildenafilom tokom četiri meseca.
- Promenjene ekspresije transkripata 29% ispitivanih markera cAMP i MAPK signalnih puteva, koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku/funkcionalnost i homeostazu spermatozoida starih životinja ponavljano tretiranih Sildenafilom tokom četiri meseca.

(8) *In vivo* tretman Metforminom, lekom za dijabetes tip 2, adultnih i starih mužjaka pacova menja molekularne profile markera mitohondrijalne biogeneze, te na taj način stvara jedan od mehanizama adaptacije spermatozoida.

Zaključak je izveden na osnovu dole-navedenih rezultata.

- Povećanog broja spermatozoida nakon šestomesečnog tretmana Metforminom starih pacova.
- Smanjene koncentracije nitrita i povećane koncentracije cGMP u spermatozoidima starih životinja tretiranih Metforminom tokom tri meseca.
- Smanjene koncentracije cGMP u spermatozoidima adultnih životinja tretiranih Metforminom tokom tri meseca.
- Promenjene ekspresije transkripata 75% ispitivanih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima adultnih i starih životinja tretiranih Metforminom tokom tri meseca.
- Promenjene ekspresije transkripata 77% ispitivanih markera cAMP i MAPK signalnih puteva, koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku/funkcionalnost i homeostazu spermatozoida adultnih i starih životinja tretiranih Metforminom tokom tri meseca.
- Promenjene ekspresije transkripata 41% ispitivanih markera mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture i funkcionalnosti mitohondrija u spermatozoidima starih životinja tretiranih Metforminom tokom šest meseci.
- Promenjene ekspresije transkripata 33% ispitivanih markera signalnih molekula cAMP i MAPK signalnih puteva, koji regulišu mitohondrijalnu dinamiku/funkcionalnost i homeostazu spermatozoida starih životinja tretiranih Metforminom tokom šest meseci.

Sumirano, poremećena homeostaza cirkulišućih androgena remeti transkripcione profile markera mitohondrijalne dinamike, ali i markera cAMP i MAPK signalnih puteva koji su važni regulatori homeostaze i mitohondrijalne mreže i spermatozoida. Ovi molekularni događaji predstavljaju adaptivne mehanizme očuvanja funkcionalnosti spermatozoida i homeostaze organizma.

# 8. Literatura

- Abou-haila, A., Tulsiani, D.R.P., 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 485, 72–81.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.02.003>
- Adeoya-Osiguwa, S.A., Gibbons, R., Fraser, L.R., 2006. Identification of functional  $\alpha_2$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in mammalian spermatozoa. *Hum. Reprod.* 21, 1555–1563.  
<https://doi.org/10.1093/humrep/del016>
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C.-L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M.K., Shah, R., 2021. Male infertility. *Lancet Lond. Engl.* 397, 319–333.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Allen, J.A., Shankara, T., Janus, P., Buck, S., Diemer, T., Held Hales, K., Hales, D.B., 2006. Energized, Polarized, and Actively Respiring Mitochondria Are Required for Acute Leydig Cell Steroidogenesis. *Endocrinology* 147, 3924–3935. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1204>
- Almog, T., Lazar, S., Reiss, N., Etkovitz, N., Milch, E., Rahamim, N., Dobkin-Bekman, M., Rotem, R., Kalina, M., Ramon, J., Raziel, A., Breitbart, H., Brietbart, H., Seger, R., Naor, Z., 2008. Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAPK as regulators of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoan quality. *J. Biol. Chem.* 283, 14479–14489. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710492200>
- Almog, T., Naor, Z., 2008. Mitogen activated protein kinases (MAPKs) as regulators of spermatogenesis and spermatozoa functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 282, 39–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.011>
- Amaral, A., Ramalho-Santos, J., St John, J.C., 2007. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum. Reprod.* 22, 1585–1596. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem030>
- Amaral, S., 2013. Aging and male reproductive function A mitochondrial perspective. *Front. Biosci.* S5, 181–197. <https://doi.org/10.2741/S365>
- Amaral, S., Ramalho-Santos, J., 2009. Aging, Mitochondria and Male Reproductive Function. *Curr. Aging Sci.* 2, 165–173. <https://doi.org/10.2174/1874609810902030165>
- An, J., Zhang, X., Qin, J., Wan, Y., Hu, Y., Liu, T., Li, J., Dong, W., Du, E., Pan, C., Zeng, W., 2014. The histone methyltransferase ESET is required for the survival of spermatogonial stem/progenitor cells in mice. *Cell Death Dis.* 5, e1196. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.171>
- Andric, S.A., Kojic, Z., Bjelic, M.M., Mihajlovic, A.I., Baburski, A.Z., Sokanovic, S.J., Janjic, M.M., Stojkov, N.J., Stojilkovic, S.S., Kostic, T.S., 2013. The opposite roles of glucocorticoid and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in stress triggered apoptosis of rat Leydig cells. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 304, E51–E59. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00443.2012>
- Archer, S.L., 2013. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N. Engl. J. Med.* 369, 2236–2251. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1215233>
- Attia, S.M., Helal, G.K., Alhaider, A.A., 2009. Assessment of genomic instability in normal and diabetic rats treated with metformin. *Chem. Biol. Interact.* 180, 296–304.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.03.001>
- Awda, B.J., Buhr, M.M., 2010. Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs) Pathway and Reactive Oxygen Species Regulate Tyrosine Phosphorylation in Capacitating Boar Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 83, 750–758. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082008>
- Balbach, M., Ghanem, L., Rossetti, T., Kaur, N., Ritagliati, C., Ferreira, J., Krapf, D., Puga Molina, L.C., Santi, C.M., Hansen, J.N., Wachten, D., Fushimi, M., Meinke, P.T., Buck, J., Levin, L.R., 2021. Soluble adenylyl cyclase inhibition prevents human sperm functions essential for fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* 27, gaab054. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab054>

- Barbagallo, F., La Vignera, S., Cannarella, R., Aversa, A., Calogero, A.E., Condorelli, R.A., 2020. Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. *J. Clin. Med.* 9, 363. <https://doi.org/10.3390/jcm9020363>
- Basaria, S., 2014. Male hypogonadism. *The Lancet* 383, 1250–1263. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61126-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61126-5)
- Bassi, G., Sidhu, S.K., Mishra, S., 2021. The Expanding Role of Mitochondria, Autophagy and Lipophagy in Steroidogenesis. *Cells* 10, 1851. <https://doi.org/10.3390/cells10081851>
- Bellafante, E., Morgano, A., Salvatore, L., Murzilli, S., Di Tullio, G., D’Orazio, A., Latorre, D., Villani, G., Moschetta, A., 2014. PGC-1 $\beta$  promotes enterocyte lifespan and tumorigenesis in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4523–4531. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415279111>
- Bertoldo, M.J., Faure, M., Dupont, J., Froment, P., 2015. AMPK: a master energy regulator for gonadal function. *Front. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00235>
- Bertoldo, M.J., Faure, M., Dupont, J., Froment, P., 2014a. Impact of metformin on reproductive tissues: an overview from gametogenesis to gestation. *Ann. Transl. Med.* 2, 55. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.06.04>
- Bertoldo, M.J., Guibert, E., Tartarin, P., Guillory, V., Froment, P., 2014b. Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology* 68, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.006>
- Binder, N.K., Sheedy, J.R., Hannan, N.J., Gardner, D.K., 2015. Male obesity is associated with changed spermatozoa Cox4i1 mRNA level and altered seminal vesicle fluid composition in a mouse model. *Mol. Hum. Reprod.* 21, 424–434. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav010>
- Boguenet, M., Bouet, P.-E., Spiers, A., Reynier, P., May-Panloup, P., 2021. Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Hum. Reprod. Update.* <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab001>
- Borges, E., Zanetti, B.F., Setti, A.S., Braga, D.P. de A.F., Provenza, R.R., Iaconelli, A., 2019. Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non–male factor infertility. *Fertil. Steril.* 112, 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.029>
- Bouchez, C., Devin, A., 2019. Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP/PKA Signaling Pathway. *Cells* 8, 287. <https://doi.org/10.3390/cells8040287>
- 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, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braun, T., Dods, R.F., 1975. Development of a Mn<sup>2+</sup>-Sensitive, “Soluble” Adenylate Cyclase in Rat Testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1097–1101.
- Bräuner, E.V., Nordkap, L., Priskorn, L., Hansen, Å.M., Bang, A.K., Holmboe, S.A., Schmidt, L., Jensen, T.K., Jørgensen, N., 2020. Psychological stress, stressful life events, male factor infertility, and testicular function: a cross-sectional study. *Fertil. Steril.* 113, 865–875. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.12.013>
- Buffone, M.G., Wertheimer, E.V., Visconti, P.E., Krapf, D., 2014. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 2610–2620. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.013>
- Calle-Guisado, V., Gonzalez-Fernandez, L., Martin-Hidalgo, D., Garcia-Marin, L.J., Bragado, M.J., 2019. Metformin inhibits human spermatozoa motility and signalling pathways mediated by protein kinase A and tyrosine phosphorylation without affecting mitochondrial function. *Reprod. Fertil. Dev.* 31, 787–795. <https://doi.org/10.1071/RD18256>



- Camacho, A., Rodriguez-Cuenca, S., Blount, M., Prieur, X., Barbarroja, N., Fuller, M., Hardingham, G.E., Vidal-Puig, A., 2012. Ablation of PGC1 beta prevents mTOR dependent endoplasmic reticulum stress response. *Exp. Neurol.* 237, 396–406.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.031>
- Cannarella, R., Condorelli, R.A., Mongioi, L.M., La Vignera, S., Calogero, A.E., 2020. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1728. <https://doi.org/10.3390/ijms21051728>
- Capkova, J., Kubatova, A., Ded, L., Tepla, O., Peknicova, J., 2016. Evaluation of the expression of sperm proteins in normozoospermic and asthenozoospermic men using monoclonal antibodies. *Asian J. Androl.* 18, 108–113. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.151400>
- Chen, X., Lin, Q., Wen, J., Lin, W., Liang, J., Huang, H., Li, L., Huang, J., Chen, F., Liu, D., Chen, G., 2020. Whole genome bisulfite sequencing of human spermatozoa reveals differentially methylated patterns from type 2 diabetic patients. *J. Diabetes Investig.* 11, 856–864.  
<https://doi.org/10.1111/jdi.13201>
- Chen, Y., Dorn, G.W., 2013. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 340, 471–475. <https://doi.org/10.1126/science.1231031>
- Chianese, R., Pierantoni, R., 2021. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality. *Antioxidants* 10, 92. <https://doi.org/10.3390/antiox10010092>
- Chien, Y., Rosal, K., Chung, B.-C., 2017. Function of CYP11A1 in the mitochondria. *Mol. Cell. Endocrinol.* 441, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.030>
- Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I., Pezzi, V., 2014. Role of estrogen receptors and g protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis. *Front. Endocrinol.* 5, 1. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00001>
- Choy, J.T., Eisenberg, M.L., 2018. Male infertility as a window to health. *Fertil. Steril.* 110, 810–814. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.08.015>
- Chrousos, G.P., 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>
- Collodel, G., Ferretti, F., Masini, M., Gualtieri, G., Moretti, E., 2021. Influence of age on sperm characteristics evaluated by light and electron microscopies. *Sci. Rep.* 11, 4989. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84051-w>
- Corradi, P.F., Corradi, R.B., Greene, L.W., 2016. Physiology of the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in the Male. *Urol. Clin. North Am.* 43, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.01.001>
- Cribbs, J. T., and Strack, S. 2007. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* 8, 939–944. doi: 10.1038/sj.embor.7401062
- Dallman, M.F., 2010. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.10.004>
- Daskalaki, I., Tavernarakis, N., 2020. Mitochondrial biogenesis in organismal senescence and neurodegeneration. *Mech. Ageing Dev.* 191, 111345. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111345>
- de Lamirande, E., 2002. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 124–135. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.2.124>
- De Souza, M.J., Arce, J.C., Pescatello, L.S., Scherzer, H.S., Luciano, A.A., 1994. Gonadal hormones and semen quality in male runners. A volume threshold effect of endurance training. *Int. J. Sports Med.* 15, 383–391. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1021075>

- Demirci, T., Sahin, E., 2019. The effect of chronic stress and obesity on sperm quality and testis histology in male rats; a morphometric and immunohistochemical study. *Histol. Histopathol.* 34, 287–302. <https://doi.org/10.14670/HH-18-077>
- Dominy, J.E., Puigserver, P., 2013. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a015008. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015008>
- Elezaj, S., Gashi, Z., Zeqiraj, A., Grabanica, D., Shllaku, A., Gruda, B., Musaj, V., 2015. Treatment of Infertility in Men with Post-traumatic Stress Disorder (PTSD) with the Method of Intrauterine Insemination. *Med. Arch.* 69, 327–330. <https://doi.org/10.5455/medarh.2015.69.327-330>
- Faja, F., Carlini, T., Coltrinari, G., Finocchi, F., Nespoli, M., Pallotti, F., Lenzi, A., Lombardo, F., Paoli, D., 2019. Human sperm motility: a molecular study of mitochondrial DNA, mitochondrial transcription factor A gene and DNA fragmentation. *Mol. Biol. Rep.* 46, 4113–4121. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04861-0>
- Fang, F., Ni, K., Shang, J., Zhang, X., Xiong, C., Meng, T., 2018. Expression of mitofusin 2 in human sperm and its relationship to sperm motility and cryoprotective potentials. *Exp. Biol. Med.* 243, 963–969. <https://doi.org/10.1177/1535370218790919>
- Faravelli, C., Lo Sauro, C., Godini, L., Lelli, L., Benni, L., Pietrini, F., Lazzarotti, L., Talamba, G.A., Fioravanti, G., Ricca, V., 2012. Childhood stressful events, HPA axis and anxiety disorders. *World J. Psychiatry* 2, 13–25. <https://doi.org/10.5498/wjp.v2.i1.13>
- Felix, R., 2005. Molecular physiology and pathology of Ca<sup>2+</sup>-conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm. *Reprod. Camb. Engl.* 129, 251–262. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00478>
- Fenster, L., Katz, D.F., Wyrobek, A.J., Pieper, C., Rempel, D.M., Oman, D., Swan, S.H., 1997. Effects of Psychological Stress on Human Semen Quality. *J. Androl.* 18, 194–202. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1997.tb01900.x>
- Ferlin, A., Garolla, A., Ghezzi, M., Selice, R., Palego, P., Caretta, N., Di Mambro, A., Valente, U., De Rocco Ponce, M., Dipresa, S., Sartori, L., Plebani, M., Foresta, C., 2021. Sperm Count and Hypogonadism as Markers of General Male Health. *Eur. Urol. Focus* 7, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2019.08.001>
- Finkel, T., 2006. A clean energy programme. *Nature* 444, 151–152. <https://doi.org/10.1038/444151a>
- Finkelstein, M., Etkovitz, N., Breitbart, H., 2020. Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian spermatozoa. *Mol. Cell. Endocrinol.* 516, 110953. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110953>
- Fujita, H., Habuta, M., Hattori, T., Kubota, S., Kumon, H., Ohuchi, H., 2021. UCP1 expression in the mouse adrenal gland is not upregulated by thermogenic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 566, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.06.013>
- Gak, I.A., Radovic, S.M., Dukic, A.R., Janjic, M.M., Stojkov-Mimic, N.J., Kostic, T.S., Andric, S.A., 2015. Stress triggers mitochondrial biogenesis to preserve steroidogenesis in Leydig cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853, 2217–2227. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.030>
- García-Bueno, B., Madrigal, J.L.M., Pérez-Nievas, B.G., Leza, J.C., 2008. Stress mediators regulate brain prostaglandin synthesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation after stress in rats. *Endocrinology* 149, 1969–1978. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0482>
- Gawish, R.A., Fahmy, H.A., Abd El Fattah, A.I., Nada, A.S., 2020. The potential effect of methylseleninic acid (MSA) against  $\gamma$ -irradiation induced testicular damage in rats: Impact on JAK/STAT pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 679, 108205. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108205>

- Gesquiere, L.R., Learn, N.H., Simao, M.C.M., Onyango, P.O., Alberts, S.C., Altmann, J., 2011. Life at the top: rank and stress in wild male baboons. *Science* 333, 357–360. <https://doi.org/10.1126/science.1207120>
- Ghosh, S., Lertwattanakarak, R., Lefort, N., Molina-Carrion, M., Joya-Galeana, J., Bowen, B.P., Garduno-Garcia, J. de J., Abdul-Ghani, M., Richardson, A., DeFronzo, R.A., Mandarino, L., Van Remmen, H., Musi, N., 2011. Reduction in Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria From Elderly Subjects With Normal and Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes* 60, 2051–2060. <https://doi.org/10.2337/db11-0121>
- Gomes, L.C., Benedetto, G.D., Scorrano, L., 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13, 589–598. <https://doi.org/10.1038/ncb2220>
- Grandhaye, J., Partyka, A., Ligocka, Z., Dudek, A., Nizański, W., Jeanpierre, E., Estienne, A., Froment, P., 2020. Metformin Improves Quality of Post-Thaw Canine Semen. *Animals* 10, 287. <https://doi.org/10.3390/ani10020287>
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Gregoriou, O., Vitoratos, N., Papadias, C., Gargaropoulos, A., Konidaris, S., Giannopoulos, V., Chryssicopoulos, A., 1997. Treatment of idiopathic oligozoospermia with an alpha-blocker: a placebo-controlled double-blind trial. *Int. J. Fertil. Womens Med.* 42, 301–305.
- Gu, N.-H., Zhao, W.-L., Wang, G.-S., Sun, F., 2019. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 17, 66. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0510-y>
- Hara, M.R., Kovacs, J.J., Whalen, E.J., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Grant, W., Towers, A.J., Williams, B., Lam, C.M., Xiao, K., Shenoy, S.K., Gregory, S.G., Ahn, S., Duckett, D.R., Lefkowitz, R.J., 2011. A stress response pathway regulates DNA damage through  $\beta$ 2-adrenoreceptors and  $\beta$ -arrestin-1. *Nature* 477, 349–353. <https://doi.org/10.1038/nature10368>
- Hirohashi, N., Yanagimachi, R., 2018. Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization†. *Biol. Reprod.* 99, 127–133. <https://doi.org/10.1093/biolre/iyoy045>
- Hou, G., Xiong, W., Wang, M., Chen, X., Yuan, T., 2014. Chronic Stress Influences Sexual Motivation and Causes Damage to Testicular Cells in Male Rats. *J. Sex. Med.* 11, 653–663. <https://doi.org/10.1111/jsm.12416>
- Huang, Y., Wang, Shaobo, Zhou, J., Liu, Y., Du, C., Yang, K., Bi, X., Liu, M., Han, W., Wang, K., Xiong, J., Wang, Song, Wang, Y., Nie, L., Liu, C., Zhang, D., Gu, J., Zeng, C., Zhao, J., 2020. IRF1-mediated downregulation of PGC1 $\alpha$  contributes to cardiorenal syndrome type 4. *Nat. Commun.* 11, 4664. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18519-0>
- Hurtado de Llera, A., Martin-Hidalgo, D., Garcia-Marin, L., Bragado, M., 2018. Metformin blocks mitochondrial membrane potential and inhibits sperm motility in fresh and refrigerated boar spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 53, 733–741. <https://doi.org/10.1111/rda.13164>
- Jannini, E.A., Lombardo, F., Salacone, P., Gandini, L., Lenzi, A., 2004. Treatment of sexual dysfunctions secondary to male infertility with sildenafil citrate. *Fertil. Steril.* 81, 705–707. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.08.032>
- Jia, Y., Castellanos, J., Wang, C., Sinha-Hikim, I., Lue, Y., Swerdloff, R.S., Sinha-Hikim, A.P., 2009. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Male Germ Cell Apoptosis in the Rat1. *Biol. Reprod.* 80, 771–780. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072843>
- Kanatsu-Shinohara, M., Yamamoto, T., Toh, H., Kazuki, Y., Kazuki, K., Imoto, J., Ikeo, K., Oshima, M., Shirahige, K., Iwama, A., Nabeshima, Y., Sasaki, H., Shinohara, T., 2019. Aging of

- spermatogonial stem cells by Jnk-mediated glycolysis activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 16404–16409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904980116>
- Kinaan, M., Ding, H., Triggle, C.R., 2015. Metformin: An Old Drug for the Treatment of Diabetes but a New Drug for the Protection of the Endothelium. *Med. Princ. Pract.* 24, 401–415. <https://doi.org/10.1159/000381643>
- Klinefelter, G.R., Hall, P.F., Ewing, L.L., 1987. Effect of Luteinizing Hormone Deprivation In Situ on Steroidogenesis of Rat Leydig Cells Purified by a Multistep Procedure. *Biol. Reprod.* 36, 769–783. <https://doi.org/10.1095/biolreprod36.3.769>
- Koch, C.E., Leinweber, B., Drengberg, B.C., Blaum, C., Oster, H., 2016. Interaction between circadian rhythms and stress. *Neurobiol. Stress* 6, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.09.001>
- Kostic, T.S., Andric, S.A., Maric, D., Kovacevic, R.Z., 2000. Inhibitory effects of stress-activated nitric oxide on antioxidant enzymes and testicular steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75, 299–306. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(00\)00185-0](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(00)00185-0)
- Kostic, T.S., Andric, S.A., Maric, D., Stojilkovic, S.S., Kovacevic, R., 1999. Involvement of inducible nitric oxide synthase in stress-impaired testicular steroidogenesis. *J. Endocrinol.* 163, 409–416. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1630409>
- Kostic, T.S., Stojkov, N.J., Bjelic, M.M., Mihajlovic, A.I., Janjic, M.M., Andric, S.A., 2011. Pharmacological Doses of Testosterone Upregulated Androgen Receptor and 3-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Delta-5-Delta-4 Isomerase and Impaired Leydig Cells Steroidogenesis in Adult Rats. *Toxicol. Sci.* 121, 397–407. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr063>
- Kostic, T.S., Stojkov, N.J., Janjic, M.M., Andric, S.A., 2010. Structural complexity of the testis and PKG I / StAR interaction regulate the Leydig cell adaptive response to repeated immobilization stress: Repeated stress enhances PKG I/StAR interaction. *Int. J. Androl.* 33, 717–729. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01018.x>
- Kostic, T.S., Stojkov, N.J., Janjic, M.M., Maric, D., Andric, S.A., 2008. The adaptive response of adult rat Leydig cells to repeated immobilization stress: The role of protein kinase A and steroidogenic acute regulatory protein: Research Report. *Stress* 11, 370–380. <https://doi.org/10.1080/10253890701822378>
- Kotarska, K., Doniec, A., Bednarska, M., Polański, Z., Styrna, J., 2017. Aging deteriorates quality of sperm produced by male mice with partial Yq deletion. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 63, 360–363. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1391888>
- Krauss, S., Zhang, C.-Y., Lowell, B.B., 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 248–261. <https://doi.org/10.1038/nrm1592>
- Kvetňanský, R., Mikulaj, L., 1970. Adrenal and Urinary Catecholamines in Rats During Adaptation to Repeated Immobilization Stress. *Endocrinology* 87, 738–743. <https://doi.org/10.1210/endo-87-4-738>
- Larsson, N.G., Garman, J.D., Oldfors, A., Barsh, G.S., Clayton, D.A., 1996. A single mouse gene encodes the mitochondrial transcription factor A and a testis-specific nuclear HMG-box protein. *Nat. Genet.* 13, 296–302. <https://doi.org/10.1038/ng0796-296>
- Li, M.W.M., Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2009. Mitogen-activated protein kinases in male reproductive function. *Trends Mol. Med.* 15, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.02.002>
- Li YJ, Cao YL, Feng JX, Qi Y, Meng S, Yang JF, Zhong YT, Kang S, Chen X, Lan L, Luo L, Yu B, Chen S, Chan DC, Hu J, Gao S., 2019. Structural insights of human mitofusin-2 into mitochondrial fusion and CMT2A onset. *Nat Commun.* 10(1):4914. doi: 10.1038/s41467-019-12912-0.

- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., Efstratiadis, A., 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59–72.
- Lv, Z., Guo, Y., 2020. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Front. Endocrinol.* 11, 191. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00191>
- Ma, J., Chen, Q., Wang, S., Ma, R., Jing, J., Yang, Y., Feng, Y., Zou, Z., Zhang, Y., Ge, X., Xue, T., Liang, K., Cao, S., Wang, D., Chen, L., Yao, B., 2020. Mitochondria-related miR-574 reduces sperm ATP by targeting ND5 in aging males. *Aging* 12, 8321–8338. <https://doi.org/10.18632/aging.103141>
- Manoli, I., Alesci, S., Blackman, M.R., Su, Y.A., Rennert, O.M., Chrousos, G.P., 2007. Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.04.004>
- Markaki, M., Tavernarakis, N., 2020. Mitochondrial turnover and homeostasis in ageing and neurodegeneration. *FEBS Lett.* 594, 2370–2379. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13802>
- Martin-Hidalgo, D., Hurtado de Llera, A., Calle-Guisado, V., Gonzalez-Fernandez, L., Garcia-Marin, L., Bragado, M.J., 2018. AMPK Function in Mammalian Spermatozoa. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3293. <https://doi.org/10.3390/ijms19113293>
- Matamoros-Volante, A., Moreno-Irusta, A., Torres-Rodriguez, P., Giojalas, L., Gervasi, M.G., Visconti, P.E., Treviño, C.L., 2018. Semi-automatized segmentation method using image-based flow cytometry to study sperm physiology: the case of capacitation-induced tyrosine phosphorylation. *Mol. Hum. Reprod.* 24, 64–73. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax062>
- May-Panloup, P., Chrétien, M.-F., Savagner, F., Vasseur, C., Jean, M., Malthiery, Y., Reynier, P., 2003. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 18, 550–556. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg096>
- McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., de, K., Pratis, K., Robertson, D.M., 2002. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *J. Androl.* 23, 149–162.
- Medar, M.L., Andric, S.A., Kostic, T.S., 2021. Stress-induced glucocorticoids alter the Leydig cells' timing and steroidogenesis-related systems. *Mol. Cell. Endocrinol.* 538, 111469. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111469>
- Medar, M.L.J., Marinkovic, D.Z., Kojic, Z., Becin, A.P., Starovlah, I.M., Kravic-Stevovic, T., Andric, S.A., Kostic, T.S., 2021a. Dependence of Leydig Cell's Mitochondrial Physiology on Luteinizing Hormone Signaling. *Life* 11, 19. <https://doi.org/10.3390/life11010019>
- Mehfooz, A., Wei, Q., Zheng, K., Fadlalla, M.B., Maltasic, G., Shi, F., 2018. Protective roles of Rutin against restraint stress on spermatogenesis in testes of adult mice. *Tissue Cell* 50, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.01.003>
- Meng, J., Holdcraft, R.W., Shima, J.E., Griswold, M.D., Braun, R.E., 2005. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16696–16700. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506084102>
- Mhaouty-Kodja, S., Lozach, A., Habert, R., Tanneux, M., Guigon, C., Brailly-Tabard, S., Maltier, J.-P., Legrand-Maltier, C., 2007. Fertility and spermatogenesis are altered in 1b-adrenergic receptor knockout male mice. *J. Endocrinol.* 195, 281–292. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0071>
- Midzak, A., Papadopoulos, V., 2016. Adrenal Mitochondria and Steroidogenesis: From Individual Proteins to Functional Protein Assemblies. *Front. Endocrinol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00106>
- Miraglia, E., De Angelis, F., Gazzano, E., Hassanpour, H., Bertagna, A., Aldieri, E., Revelli, A., Ghigo, D., 2011. Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic

- GMP/protein kinase G signaling pathway. *Reprod. Camb. Engl.* 141, 47–54.  
<https://doi.org/10.1530/REP-10-0151>
- Monteiro, B.S., Freire-Brito, L., Carrageta, D.F., Oliveira, P.F., Alves, M.G., 2021. Mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) as Key Modulators of ROS Homeostasis: A Crosstalk between Diabesity and Male Infertility? *Antioxidants* 10, 1746. <https://doi.org/10.3390/antiox10111746>
- Moraes, C.R., Meyers, S., 2018. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Anim. Reprod. Sci.* 194, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.024>
- Neirijnck, Y., Calvel, P., Kilcoyne, K.R., Kühne, F., Stévant, I., Griffeth, R.J., Pitetti, J.-L., Andric, S.A., Hu, M.-C., Pralong, F., Smith, L.B., Nef, S., 2018. Insulin and IGF1 receptors are essential for the development and steroidogenic function of adult Leydig cells. *FASEB J.* 32, 3321–3335. <https://doi.org/10.1096/fj.201700769RR>
- Ng, K.K., 2004. Sperm output of older men. *Hum. Reprod.* 19, 1811–1815.  
<https://doi.org/10.1093/humrep/deh315>
- Nguyen, T.M.D., Alves, S., Grasseau, I., Métayer-Coustard, S., Praud, C., Froment, P., Blesbois, E., 2014. Central Role of 5'-AMP-Activated Protein Kinase in Chicken Sperm Functions1. *Biol. Reprod.* 91. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121855>
- Nirupama, M., Devaki, M., Nirupama, R., Yajurvedi, H.N., 2013. Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *J. Physiol. Biochem.* 69, 59–68. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0187-6>
- Nordkap, L., Jensen, T.K., Hansen, Å.M., Lassen, T.H., Bang, A.K., Joensen, U.N., Jensen, M.B., Skakkebaek, N.E., Jørgensen, N., 2016. Psychological stress and testicular function: a cross-sectional study of 1,215 Danish men. *Fertil. Steril.* 105, 174-187.e2.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.016>
- Orta, G., de la Vega-Beltran, J.L., Martín-Hidalgo, D., Santi, C.M., Visconti, P.E., Darszon, A., 2018. CatSper channels are regulated by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 293, 16830–16841.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001566>
- Oyola, M.G., Handa, R.J., 2017. Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress* 20, 476–494.  
<https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1369523>
- Pacák, K., Palkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22, 502–548. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.4.0436>
- Palikaras, K., Tavernarakis, N., 2014. Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp. Gerontol.* 56, 182–188.  
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.01.021>
- Pallanck, L., 2013. Mitophagy: mitofusin recruits a mitochondrial killer. *Curr. Biol. CB* 23, R570-572.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.032>
- Parvinen, M., Ventelä, S., 1999. Local regulation of spermatogenesis: A living cell approach. *Hum. Fertil.* 2, 138–142. <https://doi.org/10.1080/1464727992000198521>
- Payne, A.H., 2007. Steroidogenic Enzymes in Leydig Cells, in: Payne, A.H., Hardy, M.P. (Eds.), *The Leydig Cell in Health and Disease, Contemporary Endocrinology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 157–171. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-453-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-453-7_10)
- Paz, C., Poderoso, C., Maloberti, P., Maciel, F.C., Mendez, C., Poderoso, J.J., Podestá, E.J., 2009. Chapter 10 Detection of a Mitochondrial Kinase Complex That Mediates PKA–MEK–ERK-Dependent Phosphorylation of Mitochondrial Proteins Involved in the Regulation of Steroid Biosynthesis, in: *Methods in Enzymology, Mitochondrial Function, Part B: Mitochondrial Protein Kinases, Protein Phosphatases and Mitochondrial Diseases*. Academic Press, pp. 169–192. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)05010-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)05010-1)

- Perrard, M.-H., Sereni, N., Schluth-Bolard, C., Blondet, A., d'Estaing, S.G., Plotton, I., Morel-Journel, N., Lejeune, H., David, L., Durand, P., 2016. Complete Human and Rat Ex Vivo Spermatogenesis from Fresh or Frozen Testicular Tissue. *Biol. Reprod.* 95, 89–89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.142802>
- Picard, M., McEwen, B.S., Epel, E.S., Sandi, C., 2018. An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Front. Neuroendocrinol.* 49, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.01.001>
- Picca, A., Pesce, V., Fracasso, F., Joseph, A.-M., Leeuwenburgh, C., Lezza, A.M.S., 2013. Aging and Calorie Restriction Oppositely Affect Mitochondrial Biogenesis through TFAM Binding at Both Origins of Mitochondrial DNA Replication in Rat Liver. *PLOS ONE* 8, e74644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074644>
- Pitman, R.K., Rasmusson, A.M., Koenen, K.C., Shin, L.M., Orr, S.P., Gilbertson, M.W., Milad, M.R., Liberzon, I., 2012. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 769–787. <https://doi.org/10.1038/nrn3339>
- . <https://doi.org/10.2337/diacare.28.7.1636>
- Popov, L.D., 2020. Mitochondrial biogenesis: An update. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 4892–4899. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15194>
- Prasad, M., Walker, A.N., Kaur, J., Thomas, J.L., Powell, S.A., Pandey, A.V., Whittal, R.M., Burak, W.E., Petruzzelli, G., Bose, H.S., 2016. Endoplasmic Reticulum Stress Enhances Mitochondrial Metabolic Activity in Mammalian Adrenals and Gonads. *Mol. Cell. Biol.* 36, 3058–3074. <https://doi.org/10.1128/MCB.00411-16>
- Puigserver, P., Spiegelman, B.M., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* 24, 78–90. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0012>
- Pyakurel, A., Savoia, C., Hess, D., Scorrano, L., 2015. Extracellular regulated kinase phosphorylates mitofusin 1 to control mitochondrial morphology and apoptosis. *Mol. Cell* 58, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.021>
- Radovic Pletikovic, S.M., Starovlah, I.M., Miljkovic, D., Bajic, D.M., Capo, I., Nef, S., Kostic, T.S., Andric, S.A., 2021b. Deficiency in insulin-like growth factors signalling in mouse Leydig cells increase conversion of testosterone to estradiol because of feminization. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 231, e13563. <https://doi.org/10.1111/apha.13563>
- Radovic, S.M., Starovlah, I.M., Capo, I., Miljkovic, D., Nef, S., Kostic, T.S., Andric, S.A., 2019. Insulin/IGF1 signaling regulates the mitochondrial biogenesis markers in steroidogenic cells of prepubertal testis, but not ovary. *Biol. Reprod.* 100, 253–267. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy177>
- Ramalho-Santos, J., Amaral, S., 2013. Mitochondria and mammalian reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 379, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.005>
- Rato, L., Duarte, A.I., Tomás, G.D., Santos, M.S., Moreira, P.I., Socorro, S., Cavaco, J.E., Alves, M.G., Oliveira, P.F., 2014. Pre-diabetes alters testicular PGC1- $\alpha$ /SIRT3 axis modulating mitochondrial bioenergetics and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1837, 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2013.12.008>
- Ren L., Chen X., Chen X., Li J., Cheng B., Xia J., 2020. Mitochondrial Dynamics: Fission and Fusion in Fate Determination of Mesenchymal Stem Cells. *Front Cell Dev Biol.* 8:580070. doi:10.3389/fcell.2020.580070.
- Revelli, A., Ghigo, D., Moffa, F., Massobrio, M., Tur-Kaspa, I., 2002. Guanylate cyclase activity and sperm function. *Endocr. Rev.* 23, 484–494. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0020>
- Ruiz-Pesini, E., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M.J., Enríquez, J.A. 2007 The role of the mitochondrion in sperm function: Is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr. Top Dev. Biol.* 77, 3–19. doi: 10.1016/S0070-2153(06)77001-6.



- Ruginsk, S., Uchoa, E., Leite, C., Martins, C., Araujo, L., Castro, M., Elias, L., Antunes-Rodrigues, J., 2018. Glucocorticoid-Mediated Regulation of Circadian Rhythms: Interface with Energy Homeostasis and Reproduction. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73599>
- Salgado-Lucio, M.L., Ramírez-Ramírez, D., Jorge-Cruz, C.Y., Roa-Espitia, A.L., Hernández-González, E.O., 2020. FAK regulates actin polymerization during sperm capacitation via the ERK2/GEF-H1/RhoA signaling pathway. *J. Cell Sci.* 133. <https://doi.org/10.1242/jcs.239186>
- Sapolsky, R.M., 2005. The influence of social hierarchy on primate health. *Science* 308, 648–652. <https://doi.org/10.1126/science.1106477>
- Scarpulla, R.C., 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev.* 88, 611–638. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2007>
- Scarpulla, R.C., Vega, R.B., Kelly, D.P., 2012. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 23, 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.006>
- Schuh, S.M., Carlson, A.E., McKnight, G.S., Conti, M., Hille, B., Babcock, D.F., 2006. Signaling pathways for modulation of mouse sperm motility by adenosine and catecholamine agonists. *Biol. Reprod.* 74, 492–500. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.047837>
- Sharpe RM., 1994. Regulation of spermatogenesis. *Physiol. Reprod.* Knobil E Neil JD Ed. 1363–1434.
- Sheng JA, Bales NJ, Myers SA, Bautista AI, Roueinfar M, Hale TM, Handa RJ., 2021. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Development, Programming Actions of Hormones, and Maternal-Fetal Interactions. *Front Behav Neurosci.* 14:601939. doi:10.3389/fnbeh.2020.601939.
- Signorile, A., Micelli, L., De Rasmio, D., Santeramo, A., Papa, F., Ficarella, R., Gattoni, G., Scacco, S., Papa, S., 2014. Regulation of the biogenesis of OXPHOS complexes in cell transition from replicating to quiescent state: Involvement of PKA and effect of hydroxytyrosol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 675–684. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.017>
- Silva, J.V., Freitas, M.J., Correia, B.R., Korrodi-Gregório, L., Patrício, A., Pelech, S., Fardilha, M., 2015. Profiling signaling proteins in human spermatozoa: biomarker identification for sperm quality evaluation. *Fertil. Steril.* 104, 845-856.e8. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.039>
- Simmons, E.C., Scholpa, N.E., Schnellmann, R.G., 2020. Mitochondrial biogenesis as a therapeutic target for traumatic and neurodegenerative CNS diseases. *Exp. Neurol.* 329, 113309. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113309>
- Simoni, M., Gromoll, J., Nieschlag, E., 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr. Rev.* 18, 739–773. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.6.0320>
- Sokanovic, S.J., Baburski, A.Z., Kojic, Z., Medar, M.L.J., Andric, S.A., Kostic, T.S., 2021. Aging-Related Increase of cGMP Disrupts Mitochondrial Homeostasis in Leydig Cells. *J. Gerontol. Ser. A* 76, 177–186. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa132>
- Sokanovic, S.J., Capo, I., Medar, M.M., Andric, S.A., Kostic, T.S., 2018. Long-term inhibition of PDE5 ameliorates aging-induced changes in rat testis. *Exp. Gerontol.* 108, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.04.007>
- Sokanovic, S.J., Janjic, M.M., Stojkov, N.J., Baburski, A.Z., Bjelic, M.M., Andric, S.A., Kostic, T.S., 2014. Age related changes of cAMP and MAPK signaling in Leydig cells of Wistar rats. *Exp. Gerontol.* 58, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.07.004>
- Song, G.J., Lewis, V., 2008. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertil. Steril.* 90, 2238–2244. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.059>

- Sousa, M.I., Amaral, S., Tavares, R.S., Paiva, C., Ramalho-Santos, J., 2014. Concentration-dependent Sildenafil citrate (Viagra) effects on ROS production, energy status, and human sperm function. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60, 72–79. <https://doi.org/10.3109/19396368.2013.867380>
- Spiers, J.G., Chen, H.-J.C., Sernia, C., Lavidis, N.A., 2015. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Front. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00456>
- Spinelli, J.B., Haigis, M.C., 2018. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.* 20, 745–754. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>
- Starovlah, I.M., Radovic Pletikosic, S.M., Kostic, T.S., Andric, S.A., 2021. Mitochondrial Dynamics Markers and Related Signaling Molecules Are Important Regulators of Spermatozoa Number and Functionality. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5693. <https://doi.org/10.3390/ijms22115693>
- Starovlah, I.M., Radovic Pletikosic, S.M., Kostic, T.S., Andric, S.A., 2020. Reduced spermatozoa functionality during stress is the consequence of adrenergic-mediated disturbance of mitochondrial dynamics markers. *Sci. Rep.* 10, 16813. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73630-y>
- Starovlah, I.M., Radovic Pletikosic, S.M., Tomanic, T.M., Medar, M.L.J., Kostic, T.S., Andric, S.A., 2022. Spermatozoal Mitochondrial Dynamics Markers and Other Functionality-Related Signaling Molecules Exert Circadian-like Response to Repeated Stress of Whole Organism. *Cells* 11, 993. <https://doi.org/10.3390/cells11060993>
- Starovlah, I.M., Sava, R.M., Marinovic, M.A., Kostic, T.S., Andric, S.A., 2017. Psychophysical stress disturbs expression of mitochondrial biogenesis markers in hypothalamus and adenohypophysis. *Biol. Serbica* 39, 43–51. <https://doi.org/10.5281/zenodo.827157>
- Steiner, J.L., Murphy, E.A., McClellan, J.L., Carmichael, M.D., Davis, J.M., 2011. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 111, 1066–1071. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00343.2011>
- Stival, C., Puga Molina, L. del C., Paudel, B., Buffone, M.G., Visconti, P.E., Krapf, D., 2016. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm, in: Buffone, M.G. (Ed.), *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization, Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 93–106. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_5)
- Stojkov, N.J., Baburski, A.Z., Bjelic, M.M., Sokanovic, S.J., Mihajlovic, A.I., Drljaca, D.M., Janjic, M.M., Kostic, T.S., Andric, S.A., 2014. In vivo blockade of 1-adrenergic receptors mitigates stress-disturbed cAMP and cGMP signaling in Leydig cells. *Mol. Hum. Reprod.* 20, 77–88. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat052>
- Stojkov, N.J., Janjic, M.M., Bjelic, M.M., Mihajlovic, A.I., Kostic, T.S., Andric, S.A., 2012. Repeated immobilization stress disturbed steroidogenic machinery and stimulated the expression of cAMP signaling elements and adrenergic receptors in Leydig cells. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 302, E1239–E1251. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00554.2011>
- Stojkov, N.J., Janjic, M.M., Kostic, T.S., Andric, S.A., 2013. Orally applied doxazosin disturbed testosterone homeostasis and changed the transcriptional profile of steroidogenic machinery, cAMP/cGMP signalling and adrenergic receptors in Leydig cells of adult rats. *Andrology* 1, 332–347. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2012.00035.x>
- Stone, B.A., Alex, A., Werlin, L.B., Marrs, R.P., 2013. Age thresholds for changes in semen parameters in men. *Fertil. Steril.* 100, 952–958. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.046>
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R., Spiegelman, B.M., 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>

- Tamburrino, L., Marchiani, S., Muratori, M., Luconi, M., Baldi, E., 2020. Progesterone, spermatozoa and reproduction: An updated review. *Mol. Cell. Endocrinol.* 516, 110952. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110952>
- Tan, P., Liu, L., Wei, S., Tang, Z., Yang, L., Wei, Q., 2017. The Effect of Oral Phosphodiesterase-5 Inhibitors on Sperm Parameters: A Meta-analysis and Systematic Review. *Urology* 105, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2017.02.032>
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., Kahn, C.R., 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>
- Teves, M.E., Roldan, E.R.S., 2022. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiol. Rev.* 102, 7–60. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2020>
- Valenti, D., Atlante, A., 2021. Mitochondrial Bioenergetics in Different Pathophysiological Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7562. <https://doi.org/10.3390/ijms22147562>
- van Bodegom, M., Homberg, J.R., Henckens, M.J.A.G., 2017. Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Front. Cell. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00087>
- van den Beukel, J.C., Grefhorst, A., Quarta, C., Steenbergen, J., Mastroberardino, P.G., Lombès, M., Delhanty, P.J., Mazza, R., Pagotto, U., van der Lely, A.J., Themmen, A.P.N., 2014. Direct activating effects of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on brown adipose tissue are attenuated by corticosterone. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 4857–4867. <https://doi.org/10.1096/fj.14-254839>
- Varghese, F.P., Brown, E.S., 2001. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Major Depressive Disorder: A Brief Primer for Primary Care Physicians. *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* 3, 151–155.
- Varuzhanyan, G., Rojansky, R., Sweredoski, M.J., Graham, R.L., Hess, S., Ladinsky, M.S., Chan, D.C., 2019. Mitochondrial fusion is required for spermatogonial differentiation and meiosis. *eLife* 8, e51601. <https://doi.org/10.7554/eLife.51601>
- Ventura, R.D., Chaves, A.S., Magalhães, N.S., Gonzalez, F.B., Pacini, M.F., Pérez, A.R., Silva, P.M.R., Martins, M.A., Carvalho, V.F., 2020. Activation of PPAR $\gamma$  reduces N-acetyl-cysteine - induced hypercorticism by down-regulating MC2R expression into adrenal glands. *Free Radic. Biol. Med.* 156, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.008>
- Villa, R.F., Ferrari, F., Bagini, L., Gorini, A., Brunello, N., Tascetta, F., 2017. Mitochondrial energy metabolism of rat hippocampus after treatment with the antidepressants desipramine and fluoxetine. *Neuropharmacology* 121, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.025>
- Wang, X., Qian, H., Huang, X., Li, J., Zhang, J., Zhu, N., Chen, H., Zhu, C., Wang, J., Zhang, P., Jin, C., Ge, H., 2018. UCP2 Mitigates the Loss of Human Spermatozoa Motility by Promoting mROS Elimination. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 50, 952–962. <https://doi.org/10.1159/000494479>
- Weber, K., Brück, P., Mikes, Z., Küpper, J.-H., Klingenspor, M., Wiesner, R.J., 2002. Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology* 143, 177–184. <https://doi.org/10.1210/endo.143.1.8600>
- Weinbauer, G.F., Luetjens, C.M., Simoni, M., Nieschlag, E., 2010. Physiology of Testicular Function, in: Nieschlag, E., Behre, H.M., Nieschlag, S. (Eds.), *Andrology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 11–59. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-78355-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-78355-8_2)
- Wenz, T., 2013. Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1 $\alpha$  under cellular stress. *Mitochondrion* 13, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.006>
- Wertheimer, E., Krapf, D., de la Vega-Beltran, J.L., Sánchez-Cárdenas, C., Navarrete, F., Haddad, D., Escoffier, J., Salicioni, A.M., Levin, L.R., Buck, J., Mager, J., Darszon, A., Visconti, P.E.,

2013. Compartmentalization of Distinct cAMP Signaling Pathways in Mammalian Sperm. *J. Biol. Chem.* 288, 35307–35320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489476>
- Willems, A., Batlouni, S.R., Esnal, A., Swinnen, J.V., Saunders, P.T.K., Sharpe, R.M., França, L.R., De Gendt, K., Verhoeven, G., 2010. Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PloS One* 5, e14168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014168>
- Wu, H.-S., Lin, H.-T., Wang, C.-K.L., Chiang, Y.-F., Chu, H.-P., Hu, M.-C., 2007. Human CYP11A1 promoter drives Cre recombinase expression in the brain in addition to adrenals and gonads. *Genes. N. Y. N* 2000 45, 59–65. <https://doi.org/10.1002/dvg.20266>
- Yadav, S.K., Pandey, A., Kumar, L., Devi, A., Kushwaha, B., Vishvkarma, R., Maikhuri, J.P., Rajender, S., Gupta, G., 2018. The thermo-sensitive gene expression signatures of spermatogenesis. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 16, 56. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0372-8>
- Yamamoto, M., Hibi, H., Miyake, K., 1995. Comparison of the effectiveness of placebo and  $\alpha$ -blocker therapy for the treatment of idiopathic oligozoospermia\*. *Fertil. Steril.* 63, 396–400. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)57375-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57375-0)
- Yin, L., Luo, M., Wang, R., Ye, J., Wang, X., 2021. Mitochondria in Sex Hormone-Induced Disorder of Energy Metabolism in Males and Females. *Front. Endocrinol.* 12, 749451. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.749451>
- Yu, R., Lendahl, U., Nistér, M., Zhao, J., 2020. Regulation of Mammalian Mitochondrial Dynamics: Opportunities and Challenges. *Front. Endocrinol.* 11, 374. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00374>
- Zhang, G., Wang, Z., Ling, X., Zou, P., Yang, H., Chen, Q., Zhou, N., Sun, L., Gao, J., Zhou, Z., Cao, J., & Ao, L. 2016. Mitochondrial Biomarkers Reflect Semen Quality: Results from the MARCHS Study in Chongqing, China. *PloS one*, 11(12), e0168823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168823>
- Zhang, G., Yang, W., Zou, P., Jiang, F., Zeng, Y., Chen, Q., Sun, L., Yang, H., Zhou, N., Wang, X., Liu, J., Cao, J., Zhou, Z., Ao, L., 2019. Mitochondrial functionality modifies human sperm acrosin activity, acrosome reaction capability and chromatin integrity. *Hum. Reprod.* 34, 3–11. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey335>
- Zhang, W.D., Zhang, Z., Jia, L.-T., Zhang, L.-L., Fu, T., Li, Y.-S., Wang, P., Sun, L., Shi, Y., Zhang, H.-Z., 2014. Oxygen free radicals and mitochondrial signaling in oligospermia and asthenospermia. *Mol. Med. Rep.* 10, 1875–1880. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2428>
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1167–1174. <https://doi.org/10.1172/JCI13505>
- Zhu, Q., Gu, L., Wang, Y., Jia, L., Zhao, Z., Peng, S., Lei, L., 2014. The role of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in restraint stress-induced liver injury in mice. *PloS One* 9, e92125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092125>
- Zhu, Z., Li, R., Ma, G., Bai, W., Fan, X., Lv, Y., Luo, J., Zeng, W., 2018. 5'-AMP-Activated Protein Kinase Regulates Goat Sperm Functions via Energy Metabolism In Vitro. *Cell. Physiol. Biochem.* 47, 2420–2431. <https://doi.org/10.1159/000491616>
- Zirkin, B.R., Papadopoulos, V., 2018. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol. Reprod.* 99, 101–111. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y059>
- Zou, P., Wang, X., Yang, W., Liu, C., Chen, Q., Yang, H., Zhou, N., Zeng, Y., Chen, H., Zhang, G., Liu, J., Cao, J., Ao, L., Sun, L., 2019. Mechanisms of Stress-Induced Spermatogenesis

Impairment in Male Rats Following Unpredictable Chronic Mild Stress (uCMS). *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4470. <https://doi.org/10.3390/ijms20184470>

## **Biografija autora**

Isidora Starovlah rođena je u Novom Sadu 03.09.1990. godine. Osnovne akademske studije Biologije upisala je 2009. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, gde je stekla zvanje Diplomirani biolog-master, molekularni biolog 2013. godine. Doktorske akademske studije Biologije upisala je 2014. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modlul: Animalna i humana fiziologija. U martu 2015. godine angažovana je kao istraživač - pripravnik na projektu MPNTR Republike Srbije, u okviru Laboratorije za reproduktivnu endokrinologiju i signalizaciju. U zvanje asistenta izabrana je 2017. godine na katedri za Fiziologiju životinja, Departmana za biologiju i ekologiju, PMF UNS. Bila je uključena u realizaciju dva projekta MPNTR, tri projekta APV, jednog projekta dokaza koncepta Evropske Unije, jednog projekta bilateralne saradnje između Republike Srbije i Češke Republike, kao i jednog SCOPES projekta Švajcarske nacionalne fondacije za nauku. Sve ispite predviđene programom doktorskih studija položila je sa prosečnom ocenom 9.60. Kao prvi autor objavila je 3 rada u časopisima međunarodnog značaja kategorije M21 i 1 rad u istaknutom nacionalnom časopisu kategorije M51, 11 kongresnih saopštenja na skupovima međunarodnog značaja (M34) i 5 kongresnih saopštenja na skupovima nacionalnog značaja (M64). U koautorstvu je objavila 2 rada kategorije M21, 1 rad kategorije M21a, kao i 16 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja (M34) i 8 kongresnih saopštenja na skupovima domaćeg značaja (M64). Kao asistent bila je angažovana na realizaciji praktične nastave u okviru šest predmeta na osnovnim akademskim studijama i jednog predmeta na master akademskim studijama, kao i u izradi eksperimentalnog dela diplomskih i master radova 31 studenta.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Исидора Старовлах

Број индекса Б3006/2014

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Митохондријална биогенеза као механизам адаптације специфичних типова ћелија  
репродуктивне осовине

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Исидора Старовлах

Број индекса Б3006/2014

Студијски програм Биологија

Наслов рада Митохондријална биогенеза као механизам адаптације специфичних типова ћелија репродуктивне осовине

Ментори проф. др Силвана Андрић и проф. др Бато Кораћ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## Изјава о коришћењу

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

Митохондријална биогенеза као механизам адаптације специфичних типова ћелија репродуктивне осовине

---

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Ауторство. Дозвољаваће 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. Дозвољаваће 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 прерада. Дозвољаваће 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. Дозвољаваће 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 прерада. Дозвољаваће 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. Дозвољаваће 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.