

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ana A. Milošević

**UTICAJ EKSPERIMENTALNOG
AUTOIMUNSKOG ENCEFALOMIJELITISA NA
HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-GONADNU OSU
KOD *DARK AGOUTI* PACOVA OBA POLA**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ana A. Milošević

**THE EFFECTS OF EXPERIMENTAL
AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS ON THE
HYPOTHALAMIC-PITUITARY-GONADAL AXIS
IN *DARK AGOUTI* RATS OF BOTH SEXES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Mentori

dr Ivana Bjelobaba, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Danijela Laketa, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Članovi komisije

dr Marija Janjić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Predrag Vujović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Ivan Pilipović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za neurohemiju Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, i finansirana od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (451-03-68/2020-14/200007, 451-03-9/2021-14/200007, 451-03-68/2022-14/200007, 451-03-47/2023-01/200007 i 451-03-66/2024-03/200007), a započeta u okviru projekta "Čelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju" (III41014), pod rukovodstvom dr Sanje Peković.

Dr Sanji Peković želim da se zahvalim na tome što me je primila u svoju laboratoriju čime je omogućila realizaciju ove teze, kao i na svim prijateljskim i profesionalnim savetima.

Najveću zahvalnost dugujem osobama koje su rukovodile ovom tezom, dr Ivani Bjelobaba i dr Mariji Janjić. Hvala im na velikom trudu koje su uložile u ovu disertaciju, idejno i eksperimentalno, na svemu što su me naučile, o nauci i životu, i što su izvukle najbolje iz mene. Ivana, posebno hvala na poverenju koje ste mi ukazali svojim mentorstvom još na master studijama. Hvala na neiscrpnom strpljenju koje ste imali za mene od trenutka kad sam kročila u lab 30. Hvala na svim prekovremenim satima i vikendima koje smo provele radeći zajedno, na zajedničkim kreativnim projektima i na tome što se često bez reči razumemo. Marija, posebno hvala na strpljivim odgovorima na moja pitanja, na beskonačnim razgovorima, pogotovo onim prekookeanskim. Hvala na velikoj podršci u teškim trenucima, na prijateljskim savetima i na neumornom uveravanju da ja to mogu. Obema želim da se posebno zahvalim na tome što ste pokazale da biti mentor između ostalog znači i biti oslonac.

Hvala dr Danijeli Laketa na konstruktivnim komentarima koji su upotpunili ovaj tekst, kao i na vedrini i srdačnosti tokom svih prethodnih godina.

Dr Ivanu Pilipoviću želim da se zahvalim na njegovoj posvećenosti pri čitanju ove disertacije i na sugestijama koje su doprinele njenom kvalitetu, kao i na prijateljskoj pomoći, veoma korisnim savetima i pozajmicama kada nam je to bilo potrebno.

Veliko hvala dr Predragu Vujoviću na korisnim komentarima koji su doprineli finalnom obliku ove teze. Koristim ovu priliku da mu se zahvalim i na nesvakidašnje posvećenom odnosu prema nastavi i studentima, koje veoma cenim još od osnovnih studija.

Posebno se zahvaljujem dr Stanku Stojilkoviću, iz Nacionalnih instituta za zdravlje, SAD, bez čije stručnosti, saveta i podrške u svakom smislu ova teza ne bi mogla da bude izvedena.

Dr Ireni Lavrnja i dr Danijeli Savić hvala na pomoći i savetima tokom eksperimentalne izrade ove disertacije, na zanimljivim diskusijama naučne i nenaučne prirode, na iskrenosti i otvorenosti. Ireni posebno hvala na podršci u kriznim trenucima. Izuzetno sam zahvalna mojim laboratorijskim drugaricama - Ivi, Mariji, Anici, a naročito Katarini - na podršci, što su uvek bile tu da priskoče u pomoć, na drugarstvu i na smehu koji se čuje do kraja hodnika. Devojke, bez vas bi ovo bilo mnogo teže. Hvala i mladim kolegincama i kolegama koji su tokom mog rada na ovoj tezi prošli kroz laboratoriju 30, a koji su mi takođe bili od velike pomoći u različitim fazama eksperimentalnog rada.

Želim da se zahvalim i kolegama sa Biološkog fakulteta, profesorki Nadi, Sanji, Mariji A. i Miloradu, na diskusiji i savetima tokom mog naučnog rada. Naročito hvala dr Sanji Dacić na poverenju i prilici da učestvujem u realizaciji praktične nastave iz Neurobiologije.

Hvala dr Kristini Pogrmić Majkić na pozajmicama i pomoći u merenju hormona.

Hvala kolegama iz laboratorija 7, 27, 32 i 66, kao i kolegama sa Katedre za uporednu i eksperimentalnu fiziologiju Biološkog fakulteta, na pozajmicama, gostoprimstvu i savetima. Veliko hvala i osoblju Odgajališta za eksperimentalne životinje, na čelu sa dr. vet. Goranom Đmurom, koji su u mnogome olakšali in vivo eksperimente.

Hvala mojim prijateljima, srećna sam da kažem da ih je teško sve nabrojati, na velikoj podršci i na radosti koju unose u moj život, a posebno mojoj drugarici Vileni na neprikosnovenom prijateljstvu.

Beskonačno hvala mom čketrameru – Ars, Jo i Megi, koje su od početka osnovnih studija postale moje saputnice i sapatnice u nauci i svemu ostalom. Nisu mi držale ruku dok sam pipetirala, ali kao da jesu. Momci, moje divljenje za vas ne staje u reči.

Hvala svim Miloševićima, Šoševićima i Kilibardama koji su utkali svoje niti u ono što sam.

Posebno hvala mom partneru Dariju, jer uvek nastoji da razume, hvala na stalnom bodrenju, ljubavi i brižnosti.

Konačno i najvažnije - hvala mami, tati, Luki i Mili, bez čije безусловne ljubavi i podrške tokom celog života ne bih ništa postigla. Hvala što ste tu i oduvek verujete u mene.

Ana Milošević

UTICAJ EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNSKOG ENCEFALOMIJELITISA NA HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-GONADNU OSU KOD *DARK AGOUTI* PACOVA OBA POLA

SAŽETAK

Multipla skleroza (MS) je hronična inflamatorna bolest centralnog nervnog sistema koja se prevashodno javlja tokom reproduktivnog perioda, češće kod žena. Budući da MS može remetiti reproduktivni kapacitet, cilj ove disertacije je bio ispitivanje promena duž hipotalamo-hipofizno-gonadne ose u modelu bolesti, eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE), na *Dark Agouti* pacovima oba pola.

Monofazni EAE izazvan imunizacijom kod ženki se razvija ranije, a kod mužjaka pokazuje veću maksimalnu težinu. Smanjenje koncentracije luteinizirajućeg hormona (LH) u serumu, kod pacova oba pola, u skladu je sa polno-specifičnim promenama ekspresije *Gnrh1* i *Kiss1* u hipotalamusu. Kod pacova oba pola, tokom EAE-a, povećava se ekspresija markera inflamacije u hipotalamusu. Tokom EAE-a se uočavaju polne razlike u promenama ekspresije gena specifičnih za gonadotrope. Kapacitet za sekreciju LH potpuno je očuvan kod ženki, a delimično kod mužjaka na vrhuncu EAE-a. Smanjenje koncentracije testosterona u serumu mužjaka prati smanjenje ekspresije komponenata steroidogene mašinerije testisa, ali njihov steroidogeni kapacitet ostaje očuvan na vrhuncu EAE-a. Porast koncentracije progesterona u serumu mužjaka ne potiče iz testisa već iz nadbubrega. Kod ženki, zastoj u estrusnom ciklusu, produženo održavanje žutih tela i povećana koncentracija progesterona u serumu i ovarijumima tokom EAE-a ukazuju na stanje slično pseudotrudnoći. Smanjenje ekspresije CYP17A1 na vrhuncu EAE-a u skladu je sa smanjenjem koncentracije testosterona i estradiola u ovarijumu, iako je koncentracija estradiola u serumu nepromenjena.

Rezultati ove disertacije pokazuju da tokom akutnog EAE-a, kod pacova oba pola, dolazi do privremenog zastoja u reproduktivnom kapacitetu koji je zasnovan na polno-specifičnim mehanizmima.

Ključne reči: eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, multipla skleroza, hipotalamo-hipofizno-gonadna osa, luteinizirajući hormon, testosteron, progesteron, estradiol, neuroinflamacija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neuroendokrinologija

THE EFFECTS OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS ON THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-GONADAL AXIS IN *DARK AGOUTI* RATS OF BOTH SEXES

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system mostly occurring during the reproductive period, more frequently in women. Given that MS can affect reproductive capacity, the aim of this dissertation was to investigate the changes along the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in a disease model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), in *Dark Agouti* rats of both sexes.

Immunization-induced monophasic EAE occurs earlier in females, but presents a higher maximal severity in males. The decrease in luteinizing hormone (LH) serum levels, observed in both sexes, is correlated with sex-specific changes in *Gnrh1* and *Kiss1* expression in the hypothalamus. In rats of both sexes, hypothalamic expression of inflammation markers is elevated during EAE. During EAE, sex-specific changes of gonadotrope-characteristic genes are observed. The capacity of LH secretion is completely preserved in females, while partially preserved in males. The decline in serum testosterone levels in males reflects a decrease of steroidogenic machinery components in testes, but the testicular steroidogenic capacity is preserved at the peak of EAE. The increase in serum progesterone concentration in males stems from the adrenal glands, and not the testes. In females, the estrous cycle arrest, prolonged maintenance of the corpora lutea, and elevated serum and ovarian progesterone levels indicate a pseudopregnancy-like state during EAE. The CYP17A1 downregulation at the peak of EAE is in line with decreased levels of testosterone and estradiol in ovaries, in spite of unchanged serum estradiol levels.

The results of this dissertation demonstrate a temporary arrest in reproductive capacity during acute EAE in rats of both sexes, arising from sex-specific mechanisms.

Key words: experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis, hypothalamic-pituitary-gonadal axis, luteinizing hormone, testosterone, progesterone, estradiol, neuroinflammation

Research area: Biology

Research field: Neuroendocrinology

Skraćenice

17 β -HSD – 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza

3 β -HSD – 3 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza/ Δ 5-4-izomeraza

5 α R – 5 α -reduktaza

AC – adenilat-ciklaza

APĆ – antigen prezentujuće ćelije

APS – amonijim-persulfat

AR – androgenski receptor

Arc – lučno jedro (lat. *nucleus arcuatus*)

AVPV – anteroventralno periventrikularno jedro

BA – buserelin acetat

BCA – bicinhoninska kiselina (engl. *bicinchonic acid*)

BSA – albumin iz seruma govečeta (engl. *bovine serum albumin*)

CaMKII – kalcijum-kalmodulin-zavisna kinaza (engl. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*)

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

CCL2 – hemokin CC ligand 2 (engl. *chemokine (C-C motif) ligand 2*)

cDNK – komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

CFA – kompletan Frojndov adjuvans (engl. *complete Freund's adjuvant*)

CNS – centralni nervni sistem

CRE – elementi koji su efektori cAMP-a (engl. *cAMP-responsive element*)

CYP11A1 – citohrom P450-oksidaza (engl. *cytochrome P450*) porodica 11, podporodica A, polipeptid
1

CYP17A1 - steroid 17- α hidroksilaza/17,20 liaza

CYP19A1 – aromataza

DA – Dark Aguti

DAB – 3, 3'- diaminobenzidin-tetrahlorid

DEPC – dietilpirokarbonat (engl. *diethylpyrocarbonate*)

DHT - dihidrotestosteron

DMEM – Dulbekov modifikovani Iglov medijum (engl. *Dulbecco's modified Eagle medium*)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EAE – eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

EDTA – etilen diamin-tetrasirćetna kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGTA – etilen glikol-tetrasirćetna kiselina (engl. *ethyleneglycoltetraacetic acid*)

ELISA – enzimski imunotest (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EM – središnje uzvišenje (lat. *eminentia mediana*)

ERK – kinaze regulisane vanćelijskim signalima (engl. *extracellular signal-regulated kinases*)

FSH – folikulostimulišući hormon

FSHR – receptor za FSH (engl. *follicle-stimulating hormone receptor*)

GAPDH - gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GFAP – glijski fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*)

GnRH – gonadotropin-oslobađajući hormon (engl. *gonadotropin-releasing hormone*)

GnRHR – receptor za GnRH (engl. *gonadotropin-releasing hormone receptor*)

GPR54 – receptor za kisseptin (engl. *G-protein coupled receptor 54*)

hCG – humani horionski gonadotropin (engl. *human chorionic gonadotropin*)

HPA osa - hipotalamo-hipofizno-adrenalna osa (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal*)

HPG osa – hipotalamo-hipofizno-gonadna osa (engl. *hypothalamic-pituitary-gonadal*)

HRP – peroksidaza rena (engl. *horseradish peroxidase*)

IL-12 – interleukin 12

IL-1 β – interleukin 1 beta

IL-23 – interleukin 23

IL-4 – interleukin 4

IL-6 – interleukin 6

INSL3 – faktor sličan insulinu 3 (engl. *insulin-like factor 3*)

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina

JNK –kinaze N-terminalnog domena proteina c-Jun (engl. *c-Jun N-terminal kinases*)

KM – kičmena moždina

KMB – krvno-moždana barijera

KNDy - kisseptin-neurokinin B-dinorfin (engl. *kisspeptin-neurokinin B-dynorphin*)

Kp10 – kisseptin-10

KTB – krvno-testisna barijera

LĆ – Lajdigove ćelije

LH – luteinizirajući hormon

LHR – receptor za LH (engl. *luteinizing hormone receptor*)

LPS – lipopolisaharid

MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

MS – multipla skleroza

OD – optička gustina (engl. *optical density*)

OVLT – vaskularizovani organ završne ploče (lat. *organum vasculosum laminae terminalis*)

PBS – fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffered saline*)

PFA – paraformaldehid

PKA – protein-kinaza A

PKC – protein-kinaza C

PPMS – primarno-progresivna multipla skleroza

PVDF – poliviniliden-fluorid

qPCR – lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*)

RNK – ribonukleinska kiselina

RP3V – rostralna preoptička oblast oko treće moždane komore (engl. *rostral preoptic area of the 3rd ventricle*)

rPOA – rostralna preoptička oblast (engl. *rostral preoptic area*)

RRMS – relapsno-remitentna multipla skleroza

SDS – natrijum-dodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*)

SDS-PAGE – natrijum-dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*)

SEM - standardna greška (engl. *standard error of mean*)

SPMS – sekundarno-progresivna multipla skleroza

SR-B1 - receptor za lipidne kapi visoke gustine (engl. *scavenger receptor class B type 1*)

StAR – steroidni akutni regulatorni protein

TEMED – tetrametiletildiamin

Th – pomoćnički T limfocit (engl. *T helper cell*)

TNF – faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

upH₂O – ultraprečišćena voda

Sadržaj

I	Uvod	1
1.1.	Multipla skleroza	1
1.1.1.	Epidemiologija i klinička slika MS	1
1.1.2.	Patofiziologija MS	1
1.1.3.	Animalni modeli MS	2
1.2.	Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis	3
1.2.1.	Patogeneza EAE-a	3
1.2.2.	Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis kao model za MS	5
1.3.	Hipotalamo-hipofizno gonadna osa	5
1.3.1.	Hipotalamus	6
1.3.1.1.	Anatomska organizacija hipotalamusa pacova	6
1.3.1.2.	Distribucija i morfologija neurona koji sintetiziraju GnRH	6
1.3.1.3.	Regulacija oslobađanja GnRH	7
1.3.2.	Adenohipofiza pacova	9
1.3.2.1.	Kontrola sinteze i oslobađanja gonadotropnih hormona	10
1.3.3.	Polne žlezde mužjaka	12
1.3.3.1.	Morfologija i građa testisa pacova	12
1.3.3.1.1.	Intersticijalne ćelije testisa pacova	13
1.3.3.2.	Biosinteza androgena	14
1.3.3.3.	Kontrola endokrine funkcije testisa	15
1.3.4.	Polne žlezde ženki	17
1.3.4.1.	Morfologija i građa ovarijuma pacova	18
1.3.4.2.	Biosinteza ženskih polnih hormona	19
1.3.4.3.	Kontrola endokrine funkcije ovarijuma	20
1.3.4.3.1.	Estrusni ciklus ženki pacova	22
1.3.4.3.1.1.	Proestrus	22
1.3.4.3.1.2.	Estrus	23
1.3.4.3.1.3.	Diestrus I	23
1.3.4.3.1.4.	Diestrus II	23
1.4.	Polne razlike i uloga polnih hormona u MS i EAE-u	24
1.4.1.	Polne specifičnosti u prevalenciji i toku MS	24
1.4.2.	Polni hormoni i MS	24
1.4.2.1.	Uticaj nivoa polnih hormona na patologiju MS	24
1.4.2.2.	Uticaj MS na nivo polnih hormona	25
1.4.2.3.	Primena polnih hormona u terapiji MS	26
1.4.3.	Polne specifičnosti u incidenciji i toku EAE-a	27
1.4.4.	Polni hormoni i EAE	27
1.4.4.1.	Uticaj nivoa polnih hormona na tok EAE-a	27
1.4.4.2.	Terapijski potencijal polnih hormona u EAE modelu	28
1.4.4.3.	Uticaj EAE-a na HPG osu	29
II	Ciljevi	30
III	Materijal i metode	31
3. 1.	Materijal	31
3.1.1.	Hemikalije	31
3.1.2.	Životinje	35
3. 2.	Metode	35

3.2.1. Indukcija i evaluacija EAE-a	35
3.2.2. Utvrđivanje faze estrusnog ciklusa.....	36
3.2.3. Hormonski tretmani	36
3.2.3.1. Kisperitin.....	36
3.2.3.2. Buserelin acetat	37
3.2.3.3. Humani horionski gonadotropin	37
3.2.4. Uzorkovanje krvi i tkiva	37
3.2.5. Izolacija intersticijalnih ćelija testisa.....	37
3.2.6. Izolacija RNK.....	38
3.2.7. Reverzna transkripcija	38
3.2.8. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu.....	39
3.2.9. Izolacija proteina.....	40
3.2.10. Merenje koncentracije proteina.....	40
3.2.11. Elektroforetsko razdvajanje proteina i vestern blot	40
3.2.12. Ekstrakcija steroida iz tkiva.....	41
3.2.13. Enzimski imunotest.....	42
3.2.14. Priprema tkiva za histološka i imunohistohemijska bojenja	42
3.2.15. Histološka bojenja tkivnih preseka.....	42
3.2.16. Morfometrijska analiza tkivnih preseka.....	42
3.2.17. Imunohistohemijsko i imunofluorescentno obeležavanje tkivnih preseka.....	43
3.2.18. Statistička obrada podataka i prezentacija rezultata	44
IV Rezultati	45
4.1. Tok EAE-a kod mužjaka i ženki pacova	45
4.2. Dinamika estrusnog ciklusa	46
4.3. Koncentracija LH u serumu	47
4.4. Obrazac ekspresije <i>Kiss1</i> i <i>Gnrh1</i>	48
4.5. Ekspresija markera inflamacije u hipotalamusu	49
4.6. Genska ekspresija gonadotropinskih subjedinica i GnRHR	51
4.7. Koncentracija LH u serumu nakon tretmana kisperitinom i agonistom GnRHR.....	52
4.8. Masa testisa, semenih vezikula i broj intersticijalnih ćelija	53
4.9. Histološki prikaz poprečnog preseka testisa pacova.....	55
4.10. Koncentracija testosterona i progesterona u serumu mužjaka.....	56
4.11. Ekspresija <i>Insl3</i> i <i>Lhcgr</i> u testisima	57
4.12. Ekspresija gena i nivo proteina učesnika procesa steroidogeneze u intersticijalnim ćelijama testisa	57
4.13. Imunohistohemijsko obeležavanje proteina StAR u tkivu testisa	60
4.14. Ispitivanje ekspresije markera inflamacije u tkivu testisa	61
4.15. Koncentracija progesterona u ekstrahovanim steroidima iz testisa i nadbubrega.....	62
4.16. Koncentracija testosterona u serumu nakon tretmana kisperitinom, buserelin acetatom i humanim horionskim gonadotropinom	62
4.17. Ekspresija komponenata steroidogene mašinerije u intersticijalnim ćelijama nakon tretmana hCG-om.....	64
4.18. Masa ovarijuma.....	66
4.19. Histološki prikaz ovarijuma i morfometrijski parametri	66
4.20. Koncentracije polnih hormona u serumu ženki	67
4.21. Genska ekspresija i nivo proteina komponenata steroidogene mašinerije u tkivu ovarijuma.....	68
4.22. Imunohistohemijsko obeležavanje StAR na presecima ovarijuma	71
4.23. Imunofluorescentno obeležavanje CYP17A1 na presecima ovarijuma.....	72
4.24. Koncentracija polnih hormona u ekstraktima steroida ovarijuma	73
4.25. Koncentracija progesterona u nadbubrezima ženki	74
4.26. Koncentracija kortikosterona u serumu mužjaka i ženki	75

V	Diskusija	76
VI	Zaključci	87
VII	Literatura	89

I Uvod

1.1. Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS) je najrasprostranjenija hronična inflamatorna bolest centralnog nervnog sistema (CNS), koja pogađa gotovo tri miliona ljudi, a taj broj se u poslednjih nekoliko godina povećava svuda u svetu (Walton i sar., 2020). Ovo oboljenje je u prvoj polovini XIX veka nezavisno opisalo nekoliko evropskih patologa i kliničara, ali je tek 1868. godine Žan-Marten Šarko sistematizovao otkrića svojih savremenika i povezo patološke nalaze o lezijama u kičmenoj moždini (KM) sa neurološkim simptomima pacijenata, definišući tako MS kao zasebnu bolest. Glavna patološka odlika MS je postojanje demijelinizacionih lezija (plakova) u beloj i sivoj masi CNS-a, koje imaju različite histološke i imunocitološke karakteristike, u zavisnosti od aktivnosti bolesti. Postojanje lezija na različitim mestima u CNS-u dovodi do senzornih i motornih disfunkcija (Lassmann, 2018).

1.1.1. Epidemiologija i klinička slika MS

Prvi simptomi MS se uglavnom javljaju između 20. i 40. godine života. Tačan uzrok nastanka MS još nije utvrđen, ali smatra se da je pojava ovog oboljenja posledica zajedničkog delovanja sredinskih faktora i genetički determinisane predispozicije za nastanak bolesti. Neki od uslova sredine koji se dovode u vezu sa pojavom MS su izloženost suncu, odnosno količina vitamina D, pušenje i gojaznost (Reich i sar., 2018). Zanimljivo je da i migracije imaju uticaj na rizik za oboljevanje od MS – migracija iz regiona visoke u region niske prevalencije bolesti tokom detinjstva povezana je sa smanjenim rizikom za nastanak MS i obrnuto (Compston i Coles, 2008). Takođe, MS se dovodi u vezu sa infekcijom Epštajn–Barovim virusom nakon puberteta (Bjornevik i sar., 2022; Sumaya i sar., 1980). Studijama genomskih asocijacija utvrđeno je da je povećan rizik za nastanak MS povezan sa polimorfizmima u genima koji, direktno ili indirektno, imaju ulogu u imunskom odgovoru (Axisa i Hafler, 2016).

Na osnovu kliničke slike, postoji nekoliko tipova MS: relapsno-remitentni (RRMS), sekundarno-progresivni (SPMS), primarno-progresivni (PPMS) i klinički izolovani sindrom. Relapsno-remitentni tip MS pogađa oko 85% pacijenata. Osobe sa ovim tipom MS imaju epizode pojave simptoma – relapse, kada dolazi do formiranja/aktivacije novih inflamatornih demijelinizacionih lezija, nakon čega slede periodi oporavka odnosno odsustva simptoma – remisije. Između 15% i 30% pacijenata sa RRMS će postepeno razviti SPMS, tip koji se odlikuje postepenim pogoršanjem simptoma, bez perioda oporavka, pri čemu se mogu, ali i ne moraju, javljati dodatna akutna pogoršanja. Tok PPMS karakteriše konstantno neurološko pogoršanje već od pojave prvih simptoma, bez akutnih inflamatornih epizoda. Klinički izolovani sindrom podrazumeva prvu kliničku manifestaciju bolesti koju odlikuju inflamacija i demijelinizacija, ali ne i vremenska diseminacija odnosno pojava simptoma u više epizoda (Lublin i sar., 2014).

Simptomi MS su raznovrsni, ali najčešće uključuju jednostrani gubitak vida, usled oštećenja na optičkom nervu, zatim slabost u ekstremitetima, osećaj utrnulosti, lošu koordinaciju pokreta, kao i osećaj umora, vrtoglavicu i neuropatski bol. Simptomi uključuju i poremećaje u funkcionisanju urinarnog i gastrointestinalnog trakta (Compston i Coles, 2008; Noseworthy i sar., 2000).

1.1.2. Patofiziologija MS

Simptomi MS se javljaju kao posledica demijelinizacionih lezija na različitim mestima u CNS-u, najčešće u beloj masi, ali i u regionima sive mase kroz koje prolazi veći broj mijelinizovanih aksona (Segal, 2019). U okolini aktivnih demijelinizacionih lezija prisutni su inflamatorni infiltrati

sačinjeni od T-limfocita i makrofaga/monocita (Noseworthy i sar., 2000; Segal, 2019). Pokazano je da u infiltratima dominiraju citotoksični, CD8⁺ T-limfociti, ali su prisutni i pomoćnički, CD4⁺ T-limfociti i B-ćelije (Glatigny i Bettelli, 2018; Lassmann i Bradl, 2017; Wootla i sar., 2012). Inflamatorni infiltrati uglavnom se javljaju perivaskularno, ali, sa progresijom, lezije mogu zadirati i dublje u parenhim.

Iako je utvrđeno da tokom MS dolazi do perifernog imunskog odgovora na autoantigene – epitope mijelina, poreklom iz CNS-a, primarna etiologija ove bolesti još nije poznata. Kao odgovor na pitanje porekla MS postoje dve suprotstavljene hipoteze.

Daleko šire prihvaćena je hipoteza o autoimunosti kao primarnom uzroku MS, odnosno tzv. „*outside-in*“ modelu. Prema ovoj hipotezi, prvi događaj u patogenezi MS je aktivacija mijelin-specifičnih T-limfocita, u odgovoru na antigen virusa ili drugog patogena, zahvaljujući molekulskoj mimikriji (Constantinescu i sar., 2011; Fugger i sar., 2009). Aktivirane T-ćelije dobijaju sposobnost da prolaze kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) i imigriraju u tkivo CNS-a, gde bivaju ponovo aktivirane rezidentnim antigen-prezentujućim ćelijama (APĆ). Reaktivirani T-limfociti oslobađaju efektorske citokine i pokreću niz patofizioloških događaja koji naposljetku dovode do demijelinizacije, propadanja aksona i konačno, smrti neurona (t Hart i sar., 2021; Titus i sar., 2020). „*Outside-in*“ paradigma je podržana činjenicama da je pronađena veza između povećanog rizika za MS i mutacija u genima uključenim u funkcionisanje imunskog sistema, kao i da brojne terapije za MS usmerene na periferni imunski odgovor uspešno smanjuju demijelinizacione lezije kod pacijenata sa RRMS (Morgan i sar., 2020).

Nasuprot ovom modelu je hipoteza o destabilizaciji i degradaciji mijelina i aksona ili oligodendrocita, kao događaju koji prethodi, odnosno izaziva reaktivni inflamatorni odgovor – „*inside-out*“ model patogeneze MS (Stys i sar., 2012). Prema ovoj hipotezi, degradacija mijelina ili oligodendrocita dovodi do oslobađanja proteina mijelina u sistemsku cirkulaciju, što uzrokuje periferni autoimunski odgovor i aktivaciju T- i B-limfocita koji zatim migriraju u CNS (Sen i sar., 2020). „*Inside-out*“ hipoteza podržana je nalazima da se kod pacijenata sa MS u beloj masi mozga koja nije obuhvaćena demijelinizacionom lezijom, mogu pronaći strukturne abnormalnosti (t Hart i sar., 2021), kao i dokazima iz nekoliko studija da u određenim tipovima demijelinizacionih lezija, oštećenja oligodendrocita i aktivacija glijških ćelija nisu praćeni prisustvom inflamatornih imunskih ćelija (Sen i sar., 2020).

1.1.3. Animalni modeli MS

U cilju razjašnjavanja procesa koji se nalaze u osnovi MS, koriste se animalni modeli (Baker i Amor, 2014). Nijedan model samostalno ne obuhvata sve aspekte MS, ali je zato u upotrebi veliki broj različitih modela koji odlikavaju pojedinačne mehanizme koji učestvuju u patogenezi bolesti (Lassmann i Bradl, 2017). S obzirom na to da je glavna odlika MS demijelinizacija, *in vivo* modeli MS najčešće modeluju proces demijelinizacije, i to posredstvom toksina, virusa ili imunizacije.

Potencijalna povezanost između infekcije nekim virusima i povećanog rizika za nastanak MS (Mecha i sar., 2013) dovela je do korišćenja virusa u modelovanju demijelinizacije (Kipp i sar., 2012). Najčešće se koristi Tajlerov virus glodarskog encefalomijelitisa. U zavisnosti od izbora soja virusa, demijelinizacija i autoimunska reakcija kod glodara odvijaju se različitim patogenetskim mehanizmima koji nisu u potpunosti okarakterisani. Doprinos virusnih modela demijelinizacije se ogleda i u tome što odlikavaju veliki broj simptoma uočenih kod pacijenata sa MS (Mecha i sar., 2013).

Demijelinizacija lokalnom primenom toksina najčešće se izaziva etidijum-bromidom i lizolecitinom u različitim strukturama CNS-a, mada se koriste i drugi toksini (Kipp i sar., 2012).

Najšire upotrebljavan toksin koji se primenjuje sistemski, izazivajući demijelinizaciju, jeste kuprizon, helator bakra, koji se tokom nekoliko nedelja uključuje u ishranu glodara (Ransohoff, 2012). Kuprizon dovodi do poremećaja u funkcionisanju mitohondrija i posledično do apoptoze oligodendrocita (Matsushima i Morell, 2001; Ransohoff, 2012). Dakle, primena kuprizona je pogodna za ispitivanje „*inside-out*“ hipoteze o nastanku MS. Modeli demijelinizacije izazvane toksinima su se pokazali veoma korisnim za ispitivanje procesa demijelinizacije i remijelinizacije (Denic i sar., 2011).

Nesumnjivo najčešće upotrebljavan *in vivo* model MS je eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), koji odslikava mnoge osobine MS, pre svega infiltraciju imunskih ćelija u tkivo CNS i demijelinizaciju (Titus i sar., 2020).

1.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis je prvi put upotrebljen još u prvoj polovini 20. veka, kada su Rivers i saradnici (1933) izazvali encefalomijelitis kod majmuna emulzijom tkiva zečijeg mozga.

Danas se u istraživanjima na modelu EAE koriste različite vrste glodara – miševi, pacovi i zamorci, kao i neke vrste nižih primata. Najčešće se koriste C57BL/6 i SJL sojevi miševa, odnosno Dark Aguti (engl. *Dark Agouti*, DA) i Luis (engl. *Lewis*) sojevi pacova. Ovi sojevi glodara su genetički predisponirani za razvijanje bolesti – utvrđeno je da nekoliko gena koji kodiraju molekule u okviru glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) i van njega doprinose različitim aspektima bolesti (Lorentzen i sar., 1997). Kod genetički predisponiranih životinja, EAE može biti izazvan aktivnom ili pasivnom imunizacijom.

Aktivna imunizacija podrazumeva potkožno injektiranje encefalitogene emulzije – antigena mijelina pomešanih, najčešće, sa kompletnim Frojndovim adjuvansom (engl. *complete Freund's adjuvant*, CFA). Kompletan Frojndov adjuvans sadrži inaktiviranu ćelijsku suspenziju *Mycobacterium tuberculosis* u mineralnom ulju i ima ulogu u pojačavanju lokalnog imunskog odgovora kroz aktivaciju urođene imunosti (Constantinescu i sar., 2011), a pokazano je i da doprinosi povećanju propustljivosti KMB (Rabchevsky i sar., 1999). Pri aktivnoj imunizaciji se kao antigeni mijelina mogu koristiti homogenati tkiva CNS-a, uglavnom KM, kao i prečišćeni proteini mijelina – najčešće su u upotrebi mijelin oligodendrocitni glikoprotein, bazni protein mijelina, proteolipidni protein – odnosno delovi njihove aminokiselinske sekvence. U zavisnosti od izbora encefalitogenog agensa, kao i soja, uzrasta i pola životinja, aktivna imunizacija može dovesti do EAE-a različitog oblika i trajanja. Kod miševa i pacova opisani su monofazni, relapsno-remitentni i hronični tok EAE-a (Batoulis i sar., 2011).

Izazivanje EAE-a pasivnom imunizacijom podrazumeva adoptivni transfer T-limfocita specifičnih za antigene mijelina, izolovanih iz prethodno imunizovane životinje. Ovim modelom EAE-a omogućava se razdvajanje induktivne i efektorske faze bolesti, kao i bolja karakterizacija uloge CD4⁺ T-limfocita u patogenezi EAE-a (Bjelobaba i sar., 2018). Takođe, u poslednje vreme su razvijene transgene životinje kod kojih dolazi do spontanog razvoja EAE-a (Glatigny i Bettelli, 2018).

1.2.1. Patogeneza EAE-a

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis se, kao i MS, odlikuje narušenom KMB, infiltracijom imunskih ćelija u parenhim CNS-a i neuroinflamacijom, što za posledicu ima demijelinizaciju (pretežno u KM) i pojavu motornih simptoma.

U imunopatogenezi EAE-a centralnu ulogu imaju CD4⁺ T-limfociti (Segal, 2019; Sen i sar., 2020). Nakon imunizacije encefalitogenom emulzijom, dolazi do preuzimanja antigena mijelina od strane dendritskih ćelija koje zatim migriraju do limfnih čvorova, gde antigeni mijelina bivaju prezentovani naivnim CD4⁺ T-limfocitima, u sklopu kompleksa sa MHC molekulima II klase na membrani dendritskih ćelija. Na taj način, CD4⁺ T-limfociti se aktiviraju, odnosno diferenciraju u neki od efektorskih fenotipa (Karpus, 2020). Diferencijacija naivnih pomoćničkih CD4⁺ T-limfocita (engl. *T helper*, Th) u efektorske Th ćelije regulisana je uslovima sredine, pre svega citokinima koje oslobađaju APC. Proinflamatorni, Th1 limfociti se diferenciraju u prisustvu IL-12, oslobađaju interferon- γ (IFN- γ) i učestvuju u aktivaciji makrofaga i eliminaciji unutarćelijskih patogena. Oslobađanje IL-4 iz APC rezultuje diferencijacijom naivnih T-limfocita u Th2 ćelije, koje imaju važnu ulogu u alergijskim reakcijama. Ukoliko APC oslobađaju faktor transformacije rasta- β i IL-6, IL-1 β i/ili IL-23, diferencijacija naivnih T-limfocita odvijaće se prema Th17 fenotipu, koji ima ulogu u regrutaciji neutrofila i eliminaciji vanćelijskih patogena, ali i u autoimunskim reakcijama (Cosmi i sar., 2014; Kunkl i sar., 2020). Iako je ranije smatrano da u imunopatogenezi EAE-a učestvuju Th1 limfociti, kasnija istraživanja su pokazala da Th17 limfociti imaju ključni ulogu u efektorskoj fazi EAE-a (Segal, 2019). Aktivirani T-limfociti povećano ekspimiraju različite adhezivne molekule i dobijaju sposobnost prolaska kroz KMB (Engelhardt, 2006). U CNS-u se ove ćelije ponovo susreću sa antigenima mijelina, prezentovanim od strane rezidentnih APC, što su najčešće perivaskularni makrofagi ili mikroglija, a u nekim slučajevima i dendritske ćelije i astrociti (Constantinescu i sar., 2011). Reaktivirani T-limfociti oslobađaju brojne citokine, hemokine i druge molekule i time pokreću kaskadu procesa koja rezultuje aktivacijom glijskih ćelija CNS-a, demijelinizacijom i gubitkom aksona. Osim Th1 i Th17 limfocita, u patogenezi EAE-a u manjoj meri učestvuju i druge ćelije adaptivne imunosti – CD8⁺ T-limfociti, B-ćelije kao i regulatorni T-limfociti koji imaju ulogu u rezoluciji neuroinflamacije (Glatigny i Bettelli, 2018; Van Kaer i sar., 2019).

Kao i u MS, u efektorskoj fazi EAE-a i oštećenju tkiva CNS-a osim imunskih ćelija ključnu ulogu imaju i glijske ćelije CNS-a – astrociti i mikroglija.

Tokom efektorske faze EAE-a, pod dejstvom citokina, astrociti se aktiviraju i prolaze kroz niz morfoloških i funkcijskih promena koje se nazivaju reaktivna astroglia (Yi i sar., 2019). Tokom astrogliaze, ekspresija markera aktiviranih astrocita, glijskog fibrilarnog kiselog proteina (engl. *glial fibrillary acid protein*, GFAP), značajno se povećava. Zavisno od konteksta njihove aktivacije, astrociti sintetišu i oslobađaju različite molekule koji mogu imati neurotoksične ili neuroprotektivne efekte. U slučaju neurotoksičnosti, to su proinflamatorni citokini: faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF) (Rochfort i sar., 2016), IL-1 β (Didier i sar., 2003) i IL-6 (Savarin i sar., 2015); zatim hemokini, poput hemokin CC liganda 2 (engl. *chemokine (C-C motif) ligand 2*, CCL2) (Kim i sar., 2014), CCL10 (Mills Ko i sar., 2014) i CCL20 (Ambrosini i sar., 2005); pojedini faktori rasta, kao i reaktivni oblici kiseonika (Brambilla, 2019; Yi i sar., 2019). Ovi molekuli doprinose narušavanju KMB, regrutuju dodatne imunske ćelije u CNS i učestvuju u aktivaciji mikroglije (Brambilla, 2019; Yi i sar., 2019).

Mikroglijske ćelije su rezidentne APC, a tokom efektorske faze EAE-a mikroglija se takođe aktivira, kada dolazi do promena u morfologiji i u ekspresiji brojnih molekula na površini ćelija koji učestvuju u međućelijskoj komunikaciji i kao medijatori inflamacije (Bjelobaba i sar., 2017). Mikroglija se može aktivirati u pravcu proinflamatornog (M1) i antiinflamatornog (M2) fenotipa. U ranim fazama bolesti dolazi do diferencijacije mikroglije prema proinflamatornom fenotipu i oslobađanja brojnih proinflamatornih citokina i hemokina koji doprinose oštećenju tkiva CNS-a (Chu i sar., 2018; Voet i sar., 2019). U kasnijim fazama bolesti, mikroglija postepeno zadobija antiinflamatorni fenotip. Mikroglijske ćelije tada sintetišu i oslobađaju neurotrofičke faktore,

antiinflamatorne citokine i druge molekule koji pomažu u suprimiranju inflamacije i oštećenja tkiva i doprinose remijelinizaciji i razrešenju EAE-a (Chu i sar., 2018; O'Loughlin i sar., 2018).

1.2.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis kao model za MS

Opisani patogenetski mehanizmi dovode do manifestacije simptoma EAE-a koji se uočavaju oko 10. dana nakon aktivne imunizacije i ogledaju se u smanjenoj aktivnosti životinje i smanjenju telesne mase (van der Star i sar., 2012). Neurološki simptomi na početku bolesti podrazumevaju atoniju repa, a zatim napreduju preko slabosti i paralize zadnjih, a potom i prednjih ekstremiteta, do moribundnog stanja i mogu dovesti i do smrti životinje (Batoulis i sar., 2011). Osim motornih disfunkcija i promena u telesnoj masi, tokom EAE-a, slično kao i tokom MS, dolazi do promena u telesnoj temperaturi (Wrotek i sar., 2014), poremećaja u funkcionisanju bešike (Altuntas i sar., 2008), kao i promena na nivou neuroendokrinog i endokrinog sistema (Foster i sar., 2003; Heesen i sar., 2007).

Kao što je već napomenuto, kod miševa i pacova se mogu javiti monofazni, relapsno-remitentni i hronični tok EAE-a. Međutim, u najvećem broju slučajeva beleži se monofazni (akutni) oblik bolesti, što znači da su životinje u simptomatskoj fazi EAE-a najčešće između 10. i 20. dana nakon imunizacije, a nakon vrhunca bolesti ulaze u fazu oporavka (Pachner, 2011). Iako ovakav tok EAE-a ne odslikava RRMS, tip koji se javlja kod većine pacijenata, akutni model EAE-a je veoma koristan za izučavanje pojedinačnih epizoda MS, a posebno za rasvetljavanje mehanizama kojima imunski sistem doprinosi inflamaciji i oštećenju tkiva CNS-a (Lassmann, 2019; Ransohoff, 2012). Akutni EAE kod DA pacova karakteriše prisustvo inflamatornih infiltrata u KM, praćenih demijelinizacijom (Lavrnja i sar., 2009). U hroničnom modelu EAE-a demijelinizacija je izraženija u odnosu na akutni tip bolesti (Tanuma i sar., 2000), stoga je model hroničnog EAE-a pogodniji za izučavanje procesa remijelinizacije.

Međutim, pri korišćenju EAE-a kao modela za MS, treba imati u vidu određene razlike između ove dve patologije. Na primer, različite populacije T-limfocita uključene su u imunski odgovor – u lezijama u MS dominantne imunske ćelije su CD8⁺ T-limfociti, dok su u EAE-u to CD4⁺ T-limfociti (Wootla i sar., 2012). Osim toga, demijelinizacija u EAE-u se mahom dešava u KM, dok se kod pacijenata sa MS demijelinizacije lezije nalaze i u kori velikog i malog mozga (Ransohoff, 2012; Sen i sar., 2020).

Bez obzira na pojedine nedostatke, EAE je model koji u najvećoj meri odslikava različite patofiziološke aspekte MS (Baker i Amor, 2014). Iako su pojedini terapijski pristupi razvijeni upotrebom ovog modela imali ograničenu efikasnost, doprinos EAE-a u ispitivanju patogeneze MS i razvijanju brojnih terapija za ovu bolest je i dalje izuzetan (Glatigny i Bettelli, 2018). Zbog toga, upotreba ovog modela MS ne jenjava.

1.3. Hipotalamo-hipofizno gonadna osa

Reprodukcija sisara primarno je regulisana neuroendokrinim i endokrinim putem, odnosno delovanjem hipotalamo-hipofizno-gonadne (engl. *hypothalamic-pituitary-gonadal*, HPG) ose, koju čine:

- (i) neuroni u hipotalamusu koji sintetišu gonadotropin-oslobađajući hormon (engl. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH; u daljem tekstu: GnRH neuroni);
- (ii) ćelije adenohipofize – gonadotropi, koje u odgovoru na GnRH oslobađaju gonadotropine – luteinizirajući hormon (LH) i folikulo-stimulišući hormon (FSH);

- (iii) polne žlezde (gonade) – testisi i ovarijumi, u kojima gonadotropini regulišu biosintezu polnih hormona (steroidogenezu) i sazrevanje i diferencijaciju germinativnih ćelija (gametogenezu).

Polni hormoni povratnim spregama na nivou hipotalamusa i adenohipofize kontrolišu sopstvenu produkciju.

1.3.1. Hipotalamus

Hipotalamus predstavlja intergrativni centar između nervnih signala i endokrinih, motornih i somatosenzornih sistema i učestvuje u regulaciji srednjeg arterijskog pritiska, telesne temperature, energetskog metabolizma, reprodukcije, itd. Uloga hipotalamusa kao integrativnog centra ostvarena je pre svega kroz njegovu vezu sa hipofizom, koja čini endokrinu komponentu složenih neuroendokrinih refleksa (Simerly, 2015).

1.3.1.1. Anatomska organizacija hipotalamusa pacova

Hipotalamus pacova zauzima ventralni deo međumozga, odnosno prostor oko treće moždane komore, dok je dorzalno oivičen oblašću sive mase (*zona incerta*). Hipotalamus se rostroventralno naslanja na optičku hijazmu, a kaudoventralno na hipofizu i na region sive mase oko Silvijevog kanala i oblast ventralnog tegmentuma srednjeg mozga, dok je rostralno oivičen Brokinom dijagonalom (Simerly, 2015).

Anatomska organizacija hipotalamusa je kompleksna i uključuje veliki broj jedara. Najveći broj tela neurona koji učestvuju u kontroli sekrecije hormona hipofize pripada jedrima u okviru periventrikularne zone, uključujući i neurone koji imaju ulogu u kontroli aktivnosti HPG ose: neuroni anteroventralnog periventrikularnog (AVPV) jedra (preoptički region periventrikularne zone) i lučnog jedra (lat. *nucleus arcuatus*, Arc; tuberalni region periventrikularne zone) (Simerly, 2015).

U blizini hipotalamusa nalaze se i dva cirkumventrikularna organa, koji imaju diskontinuiranu KMB. Vaskularizovani organ završne ploče (lat. *organum vasculosum laminae terminalis*, OVLT) pozicioniran je dorzalno od optičke hijazme, i dorzorostralno od anteroventralnog udubljenja treće moždane komore što znači da se nalazi u blizini preoptičke oblasti i AVPV. Središnje uzvišenje (lat. *eminentia mediana*, EM) čini dno treće moždane komore kaudalno od optičke hijazme. Upravo preko EM se ostvaruje povezanost hipotalamusa sa hipofizom, i to tako što se unutrašnji list EM direktno produžava na posteriorni deo hipofize, dok se u spoljašnjem listu EM oslobađaju neurohormoni koji regulišu oslobađanje hormona iz prednjeg režnja hipofize (Oldfield i McKinley, 2015).

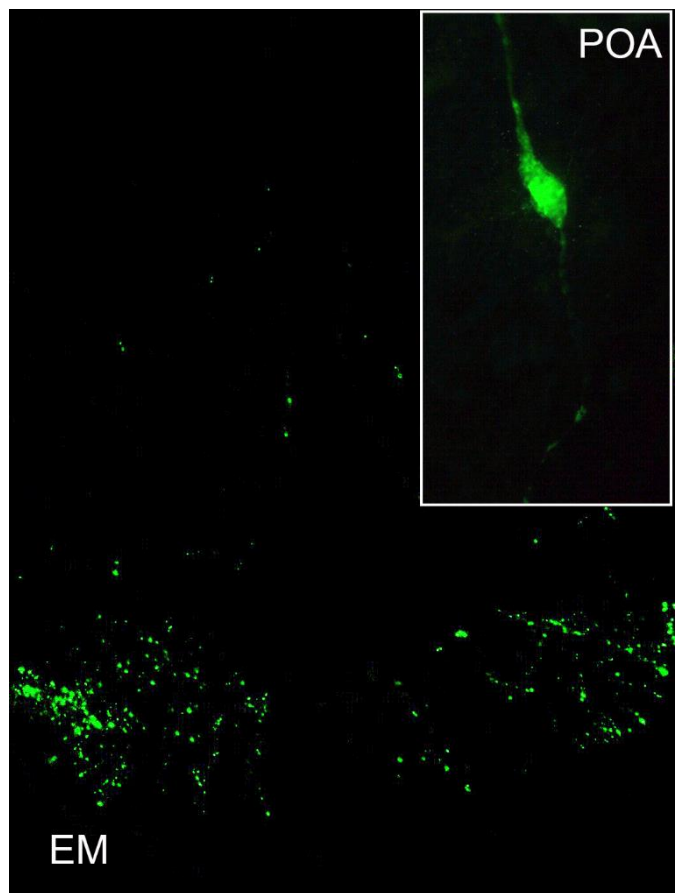
1.3.1.2. Distribucija i morfologija neurona koji sintetišu GnRH

Centralnu ulogu u kontroli reprodukcije kod sisara ima GnRH. Ovaj dekapeptid prvi put je izolovan iz hipotalamusa svinje (Schally i sar., 1971) i nazvan GnRH I, s obzirom na to da su kasnije izolovane i druge izoforme GnRH kod kičmenjaka: GnRH II kod ptica i GnRH III kod riba (Marques i sar., 2000). Izoforma GnRH I (u daljem tekstu: GnRH) kod pacova kodirana je genom *Gnrh1*.

Neuroni koji sintetišu GnRH razlikuju se u odnosu na ostale neurone hipotalamusa prema svom embrionalnom poreklu – ovi neuroni nastaju u olfaktornoj plakodi i tokom razvića migriraju duž aksona olfaktornih nerava kroz kribriformnu ploču, sve do baze prednjeg mozga, odnosno do hipotalamusa (Wray, 2010). Zahvaljujući ovom migratornom putu, GnRH neuroni imaju i specifičnu poziciju u hipotalamusu – za razliku od ostalih neurona hipotalamusa koji učestvuju u neuroendokrinoj regulaciji, GnRH neuroni ne pripadaju jednom jedru hipotalamusa već su difuzno

distribuirani duž svoje migratorne rute – od olfaktornih bulbosa do mediobazalnog hipotalamusa. Kod pacova, distribucija GnRH neurona zauzima oblik obrnutog slova Y, koji počinje od medijalnog septuma, dok se kraci slova Y granaju u okviru rostralne preoptičke oblasti (engl. *rostral preoptic area*, rPOA), i obuhvataju treću moždanu komoru sa obe strane, pružajući se prema anteriornom i mediobazalnom hipotalamusu. Kod pacova je najveći broj tela GnRH neurona lokalizovan upravo u oblasti ovog grananja u rPOA hipotalamusa (Herbison, 2015).

GnRH neuroni su većinski unipolarni ili bipolarni i orijentisani su duž longitudinalne ose mozga pacova. Jedan ili oba dugačka nastavka GnRH neurona pružaju se do EM, gde oslobađaju GnRH u portalni sistem hipofize (Slika 1.1). Nastavci GnRH neurona imaju odlike i dendrita –



primaju sinaptičke informacije, i aksona – provode akcijske potencijale, što je jedinstvena odlika u CNS-u među sisarima, te se ovi nastavci nazivaju „dendroni“ (Herbison, 2016; Herde i sar., 2011). Dendroni GnRH neurona primaju sinaptičke informacije kako na proksimalnim, tako i na distalnim regionima. Pokazano je da najdistalniji deo dendrona GnRH neurona, neposredno pre grananja na terminale u nivou EM, funkcioniše kao autonomna jedinica koja reguliše sekreciju GnRH u portalni sistem. Ovaj način regulacije oslobađanja neuropeptida nije zabeležen ni u jednom drugom sistemu osim u GnRH neuronima (Herbison, 2021).

Slika 1.1. GnRH neuron bipolarne morfologije u hipotalamusu pacova. Najveći broj tela neurona u hipotalamusu pacova nalazi se u okviru rostralne preoptičke oblasti. GnRH neuroni su po morfologiji unipolarni ili bipolarni, a njihovi nastavci imaju odlike i dendrita i aksona pa se nazivaju dendroni. Terminali dendrona GnRH neurona granaju se u nivou središnjeg uzvišenja, gde se GnRH oslobađa u portalni sistem hipofize. POA – preoptička oblast; EM – središnje uzvišenje.

1.3.1.3. Regulacija oslobađanja GnRH

Kod sisara se GnRH oslobađa pulsno, odnosno epizodično. Pulsni tip sekrecije predstavlja egzocitozu određenog broja vezikula hormona u kratkom vremenskom intervalu, nakon čega sledi pauza. Pulsno oslobađanje GnRH registruje se kasno tokom fetalnog razvoja ili u ranom postnatalnom periodu, ali je zatim inhibirano do puberteta. Ponovno uspostavljanje pulsne sekrecije GnRH, odnosno rada generatora pulsa GnRH, označava početak puberteta (Ebling i Cronin, 2000). Pulsevi GnRH kod adultnih mužjaka pacova zabeleženi su na oko 70 minuta (Levine i Duffy, 1988), dok kod ženki ta frekvencija iznosi jedan puls na oko 50 minuta (Park i Ramirez, 1989). Kod ženki sisara, pred ovulaciju dolazi do oslobađanja velike količine LH iz hipofize, što je definisano kao talas (engl. *surge*). Talasu LH prethodi i talas GnRH iz hipotalamusa, i kod pacova potiče od povećane amplitude a ne učestalosti pulseva (Park i Ramirez, 1989).

Pulsevi GnRH kod odraslih muškaraca javljaju se na oko dva sata, dok kod žena, njihova učestalost varira u skladu sa fazom menstrualnog ciklusa: tokom rane folikularne faze, pulsevi LH (a time i GnRH) su na svakih 90-100 minuta, dok se u kasnoj folikularnoj fazi javljaju na oko 60 minuta. Pred ovulaciju dolazi do talasa GnRH, a nakon ovulacije, tokom lutealne faze ciklusa, pulsevi se proređuju i javljaju na 4 do 8 sati (Hall, 2019).

Centralnu ulogu u regulaciji pulsog i talasnog oslobađanja GnRH imaju neuroni koji sintetišu kisseptin (Goodman i sar., 2022). Kisseptini su neuropeptidi koji nastaju isecanjem prepropeptida kodiranog genom *Kiss1*. Produkti gena *Kiss1* vezuju se za receptor spregnut sa proteinom G (engl. *G protein-coupled receptor 54*, GPR54), koji je široko eksprimiran u CNS-u pacova (Kotani i sar., 2001; Muir i sar., 2001), i što je još važnije, na GnRH neuronima (Irwig i sar., 2004; Messenger i sar., 2005). Delecija gena *Gpr54* dovodi do hipogonadotropnog hipogonadizma kod miševa, dok intracerebroventrikularna primena kisseptina dovodi do oslobađanja LH i FSH, koje izostaje u prisustvu antagonista GnRH (Gottsche i sar., 2004). Ovim studijama potvrđene su hipoteze o ulozi sistema kisseptin-GPR54 kao centralnog regulatora oslobađanja GnRH (Slika 1.2).

Tela kisseptinskih neurona u hipotalamusu glodara nalaze se u AVPV i periventrikularnom jedru, kao i u Arc (Clarkson i Herbison, 2006; Gottsche i sar., 2004). Kod glodara, oblast hipotalamusa koja obuhvata AVPV i periventrikularno jedro nazvana je rostralna periventrikularna zona oko treće moždane komore (engl. *rostral periventricular area of the third ventricle*, RP3V), pa se ova populacija kisseptinskih neurona u literaturi označava kao RP3V populacija. Pokazano je da kod glodara postoji polni dimorfizam u zastupljenosti kisseptinskih neurona u RP3V – kod ženki miševa postoji oko 10 puta više kisseptinskih neurona u ovom regionu u odnosu na mužjake (Clarkson i Herbison, 2006).

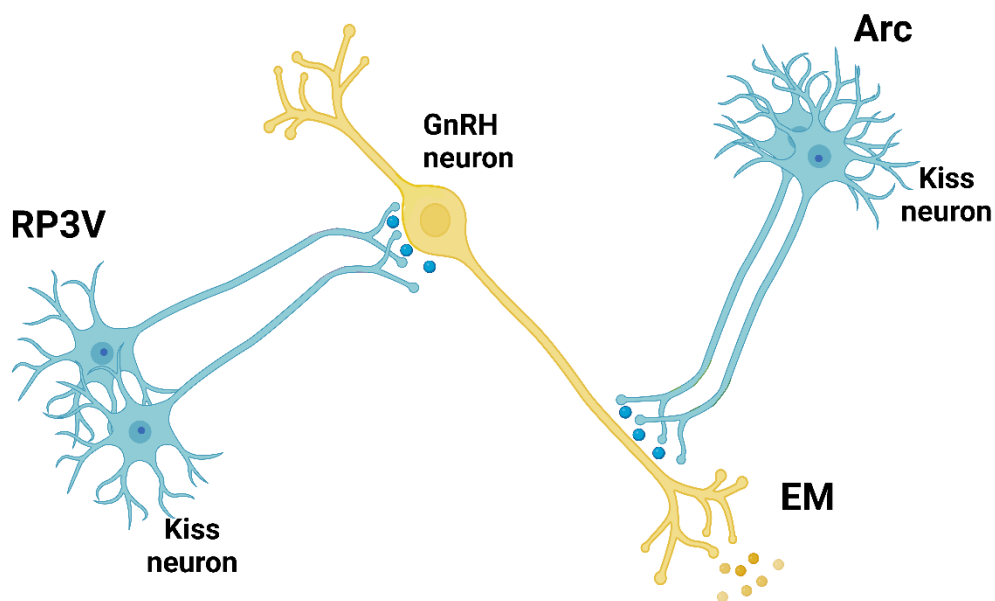
Mehanizam kojim polni hormoni povratnim spregama na nivou hipotalamusa regulišu sekreciju GnRH, a time posredno sopstvenu produkciju, oslanja se upravo na kisseptinske neurone. Naime, GnRH neuroni ne poseduju receptore za polne hormone, ali zato gotovo svi kisseptinski neuroni ženke miša eksprimiraju estrogenski receptor α (ER α) (Smith, Dungan, i sar., 2005). Takođe, kisseptinski neuroni ženki miša eksprimiraju i progesteronski receptor (Clarkson i sar., 2008), dok je kod mužjaka miša u kisseptinskim neuronima registrovano prisustvo ER α i androgenskog receptora (AR) (Smith, Cunningham, i sar., 2005).

Pulsna sekrecija GnRH kod glodara kontrolisana je aktivnošću kisseptinskih neurona u Arc (Han i sar., 2015; Uenoyama i sar., 2018). Kisseptin deluje na dendrone GnRH neurona ženki pacova u unutrašnjoj zoni EM, regulišući oslobađanje GnRH (Uenoyama i sar., 2011). Smatra se da se sinhronizacija nekoliko GnRH neurona tokom pulsa obezbeđuje zahvaljujući tome što kisseptin oslobođen u vanćelijsku tečnost deluje na više dendrona istovremeno (Herbison, 2021). Kisseptinski neuroni u Arc eksprimiraju i neurokinin B i dinorfin pa se ovi neuroni nazivaju KNDy neuroni (engl. *kisseptin-neurokinin B-dynorphin*). Imajući u vidu da neurokinin B deluje kao stimulatorni, a dinorfin kao inhibitorni neuropeptid, kao i da KNDy neuroni eksprimiraju receptore za ove neuropeptide, oslobađanje kisseptina u Arc je verovatno kontrolisano suprotstavljenim efektima ovih neuropeptida koji deluju autokrino i/ili parakrino (Harter i sar., 2018; Tsukamura, 2022). Kod ženki pacova je dovoljno samo oko 20% funkcionalnih KNDy neurona za održavanje pulsog oslobađanja GnRH/LH, folikulogenezu i regulaciju sinteze estradiola (Nagae i sar., 2021).

Kod ženki glodara, preovulatorni talas GnRH/LH regulisan je RP3V populacijom kisseptinskih neurona. Primena estrogena u preovulatornim dozama izaziva talas LH kod ženki pacova (Adachi i sar., 2007), a nedavno je i potvrđeno da su za ovaj efekat odgovorni neuroni u RP3V, a ne u Arc

(Nagae i sar., 2021). Preovulatorni talas GnRH/LH, osim pozitivnom povratnom spregom estradiola, regulisan je i nervnim signalima poreklom iz suprahijazmatičnog jedra hipotalamusa, koji su pod kontrolom cirkadijalnog ritma (Plant, 2012).

Kod čoveka, najveći broj kisseptinskih neurona lociran je u infundibularnom jedru, dok rostralna populacija ovih neurona (analogna RP3V) nije jasno definisana kao kod miševa i pacova već su kisseptinski neuroni difuzno raspoređeni u rPOA. Smatra se da su kod čoveka kisseptinski neuroni u infundibularnom jedru odgovorni za dejstvo polnih hormona putem povratnih sprega, dok uloga kisseptinskih neurona u rPOA nije u potpunosti razjašnjena (Marques i sar., 2000).



Slika 1.2. Šematski prikaz neurona hipotalamusa odgovornih za sekreciju GnRH. Pulsno i talasno oslobađanje GnRH kod pacova regulisano je signalima kisseptinskih neurona iz lučnog jedra (Arc) i rostralne periventrikularne zone oko treće moždane komore (RP3V) hipotalamusa. Kisseptinski neuroni u RP3V deluju na somu, a kisseptinski neuroni u Arc na distalne krajeve dendrona GnRH neurona regulišući sekreciju GnRH u nivou središnjeg uzvišenja (EM). Napravljeno u <https://www.biorender.com/>.

1.3.2. Adenohipofiza pacova

Hipofiza glodara i čoveka ima slične anatomske i histološke karakteristike. Nalazi se na dorzalnem delu bazosfenoidne kosti, u turskom sedlu (lat. *sella turcica*), i sačinjena je iz dva režnja.

Neurohipofiza predstavlja posteriorni režanj, potiče od neuroektoderma i obuhvata dršku (lat. *infundibulum*) i *pars nervosa*, koji sadrži nemijelinizovane aksone magnocelularnih neurona poreklom iz supraoptičkog i paraventrikularnog jedra hipotalamusa. Ovi aksoni do neurohipofize stižu prolazeći kroz unutrašnji list EM. Iz aksonskih terminala ovih neurona oslobađaju se arginin-vazopresin i oksitocin (La Perle i Dintzis, 2018).

Adenohipofiza nastaje od oralnog ektoderma i čini anteriorni režanj hipofize koji obavlja neurohipofizu. Kod pacova, oko 90% volumena adenohipofize čini *pars distalis*, dok manji deo čini *pars intermedia*, koji se nalazi neposredno uz neurohipofizu (La Perle i Dintzis, 2018). Adenohipofizu čini više tipova ćelija specijalizovanih za sintezu određenih peptidnih hormona koji dalje regulišu rad svih endokrinih žlezda. Ćelije specijalizovane za sintezu i oslobađanje LH i FSH nazivaju se gonadotropi i čine 10-15% ćelija adenohipofize. Osim gonadotropia, endokrine ćelije adenohipofize su i ćelije koje sintetišu hormon rasta (somatotropi), prolaktin (laktotropi),

tireostimulišući hormon (TSH; tireotropi) i adrenokortikotropni hormon (kortikotropi). Između grupacija ćelija adenohipofize nalazi se razgranata mreža fenestriranih kapilara portalnog sistema. Preko ove mreže kapilara do endokrinih ćelija adenohipofize dospevaju hormoni hipotalamusa kojima se reguliše sinteza i sekrecija hormona hipofize u cirkulaciju. Pored opisanog GnRH, koji deluje na sintezu i sekreciju LH i FSH u gonadotropima, iz neurona hipotalamusa se oslobađaju i: kortikotropin-oslobađajući hormon i arginin-vazopresin koji deluju na kortikotrope i regulišu oslobađanje adenokortikotropnog hormona; oslobađajući hormon faktora rasta koji stimuliše oslobađanje faktora rasta u somatotropima, kao i somatostatin, koji ga inhibira; dopamin koji ima inhibitorno dejstvo na laktotrope i sekreciju prolaktina; i oslobađajući hormon tireostimulišućeg hormona, koji stimuliše oslobađanje TSH u tireotropima (Gonzalez-Iglesias i Bertram, 2014).

Osim endokrinih tipova ćelija, u adenohipofizi nalazi se i mreža folikulostelatnih ćelija, koje čine 5-10% ćelija adenohipofize. Folikulostelatne ćelije nemaju endokrinu funkciju, ali imaju ulogu u parakrinoj kontroli sekretornih ćelija hipofize (Gonzalez-Iglesias i Bertram, 2014).

1.3.2.1. Kontrola sinteze i oslobađanja gonadotropnih hormona

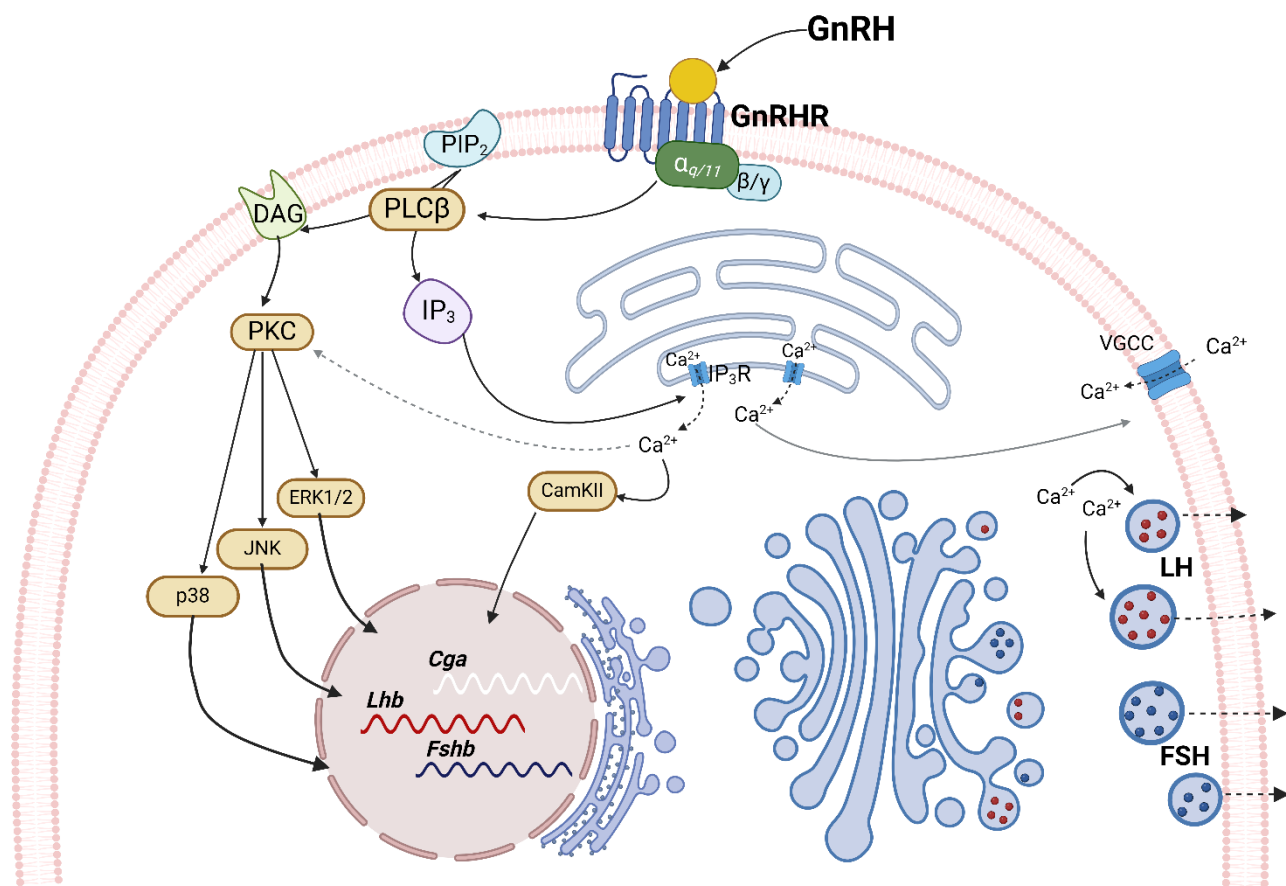
Gonadotropni hormoni, LH i FSH, su heterodimerni glikoproteini, sačinjeni od jedne α i jedne β subjedinice. Alfa subjedinica je kod glodara kodirana genom *Cga* i zajednička je za sve glikoproteine adenohipofize (LH, FSH i TSH) kao i za horionski gonadotropin. Proteinske β subjedinice su jedinstvene za LH i FSH, kodirane su genima *Lhb* i *Fshb* i određuju biološku aktivnost ovih hormona (McArdle i Roberson, 2015).

Koncentracija LH i FSH u cirkulaciji regulisana je na nivou transkripcije i translacije njihovih subjedinica, na nivou post-translacione obrade ovih proteina – glikozilacije, kao i na nivou egzocitoze zrelih glikoproteina (Narayan i sar., 2019) i ovi procesi su primarno pod kontrolom GnRH. Receptor za GnRH (GnRHR) se u adenohipofizi eksprimira isključivo na ćelijskoj membrani gonadotropa (Bliss i sar., 2010) i njegovu ekspresiju reguliše GnRH – pokazano je da se kod pacova, maksimalno povećanje ekspresije GnRHR dešava pri pulsevima GnRH na svakih 30 min (Kaiser i sar., 1997). Suprotno tome, kontinualna primena GnRH dovodi do smanjenja ekspresije GnRHR i posledično do smanjenja oslobađanja LH i FSH (Kaprra i Huhtaniemi, 2018).

Receptor za GnRH pripada familiji rodopsinskih receptora spregnutih sa proteinom G i ima tipičnu strukturu od sedam transmembranskih domena (Kaprra i Huhtaniemi, 2018). Međutim, GnRHR je specifičan po tome što ne poseduje unutarćelijski C-terminus pa mu je time onemogućena brza desenzitizacija i internalizacija posredovana β -arestinom (Naor, 2009). U gonadotropima, GnRHR interaguje sa $G_{q/11}$ familijom proteina G (Grosse i sar., 2000). Aktivacija $G_{\alpha_{q/11}}$ subjedinice dovodi do aktivacije fosfolipaze $C\beta$ (PLC β), koja hidrolizuje fosfatidilinozitol-difosfat (PIP $_2$) dajući inozitol-trifosfat (IP $_3$) i diacil-glicerol (DAG). Inozitol-trifosfat se vezuje za svoje receptore (IP $_3$ R) na membrani endoplazmatičnog retikuluma koji predstavljaju ligand-zavisne kalcijumske kanale i Ca^{2+} se oslobađa u citoplazmu. Porast koncentracije Ca^{2+} dovodi do depolarizacije i otvaranja voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala na ćelijskoj membrani, pa vanćelijski Ca^{2+} takođe ulazi u ćeliju. Povećanje koncentracije Ca^{2+} u citoplazmi dovodi do egzocitoze gonadotropina (Bliss i sar., 2010). Diacil-glicerol samostalno, ili sa Ca^{2+} iz endoplazmatičnog retikuluma, aktivira protein-kinazu C (PKC), koja moduliše Ca^{2+} -posredovanu egzocitozu (Durán-Pastén i Fiordeliso, 2013). Takođe, PKC aktivira nekoliko signalnih kaskada mitogenom-aktiviranih protein kinaza. To su kinaze regulisane vanćelijskim signalima (engl. *extracellular signal-regulated kinase* ERK1/2), kinaze N-terminalnog domena proteina c-Jun (engl. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK) i p38 kinaze, koje regulišu aktivnost nekoliko transkripcionih faktora koji učestvuju u regulaciji transkripcije gonadotropinskih subjedinica. Transkripcija

gonadotropinskih subjedinica regulisana je i jonima Ca^{2+} , kroz aktivaciju kalcijum-kalmodulin zavisne kinaze (engl. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*, CaMKII) koja takođe reguliše ekspresiju *Cga*, *Lhb* i *Fshb* (Stamatiades i Kaiser, 2018). Šematski prikaz signalne transdukcije posredovane receptorom za GnRH prikazan je na Slici 1.3.

Pulsna sekrecija GnRH iz neurona hipotalamusa diktira pulsno oslobađanje LH, dok se sekrecija FSH odvija konstitutivno. Naime, β subjedinica FSH ne poseduje sekvencu koja predstavlja signal za pakovanje u sekretorne vezikule namenjene za pulsom regulisano oslobađanje. Stoga se FSH pakuje u vezikule koje se brzo nakon njihovog formiranja u Goldžijevom aparatu translociraju do ćelijske membrane gonadotropa i FSH se oslobađa u cirkulaciju (Jablonka-Shariff i sar., 2008). To znači da nivo FSH u cirkulaciji zavisi primarno od stope njegove sinteze (Thompson i Kaiser, 2014).



Slika 1.3. Signalizacija posredovana receptorom za GnRH u gonadotropima. GnRH se veže za svoj receptor spregnut sa proteinom G, čijom se aktivacijom pokreće signalizacija posredovana sa PLC β , kojom se reguliše sinteza i sekrecija gonadotropnih hormona. Detaljan opis u tekstu. GnRH – gonadotropin-oslobađajući hormon; GnRHR – receptor za GnRH; PLC β – fosfolipaza C β ; PIP₂ – fosfatidilinozitol-difosfat; IP₃ – inozitol-trifosfat; DAG – diacil-glicerol; PKC – protein kinaza C, IP₃R – receptor za IP₃, ligand-zavisni kanal za kalcijum; VGCC – voltažno-zavisni kanal za kalcijum; ERK1/2 – kinaze regulisane vanćelijskim signalnima; JNK – kinaze N-terminalnog domena proteina c-Jun; p38 – p38 MAP kinaze; LH – luteinizirajući hormon; FSH – folikulostimulišući hormon. Napravljeno u <https://www.biorender.com/>.

1.3.3. Polne žlezde mužjaka

Muške polne žlezde, gonade, su testisi i oni zajedno sa genitalnim kanalima, penisom i pomoćnim polnim žlezdama čine reproduktivni sistem mužjaka sisara (Setchell i Breed, 2006). Između reproduktivnog sistema mužjaka pacova i čoveka postoji mnogo sličnosti, međutim, oni se razlikuju pre svega u prisustvu i građi pomoćnih polnih žlezda (Knoblauch i sar., 2018). Kod pacova, pomoćne polne žlezde obuhvataju semene vezikule, žlezde *ductus deferens*-a, multilobularnu prostatu sa koagulatornom žlezdom, zatim bulbouretralne, uretralne i prepucijalne žlezde (Maynard i Downes, 2019a). Spuštanje testisa u skrotum (oko 15. postnatalnog dana), početak proizvodnje pokretnih spermatozoida (između 40. i 55. postnatalnog dana), rast testisa i razdvajanje prepucijuma od penisa (oko 45. postnatalnog dana) su događaji koji kod pacova označavaju sazrevanje muških reproduktivnih organa (Prevot, 2015).

Testisi su parne žlezde ovalnog oblika sa dvojakom ulogom: egzokrinom – produkcija i sazrevanje germinativnih ćelija (spermatogeneza), i endokrinom – steroidogeneza, odnosno androgena tj. sinteza muških polnih hormona, od kojih su najpotentniji testosteron i dihidrotestosteron.

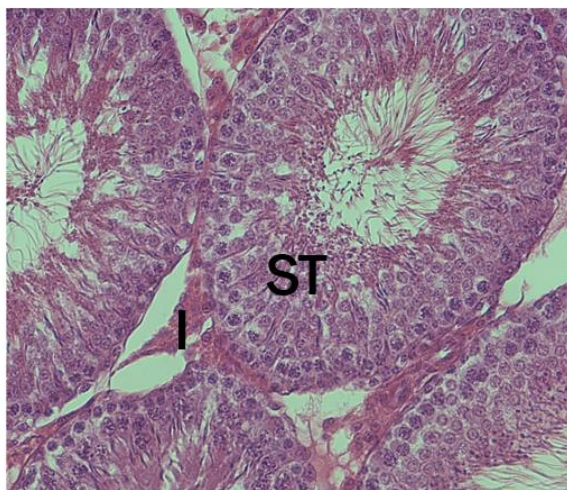
1.3.3.1. Morfologija i građa testisa pacova

Tkivo testisa obavijeno je tvrdom fibroznom kapsulom (lat. *tunica albuginea*), ispod koje se nalazi vaskularni sloj (lat. *tunica vascularis*) (Maynard i Downes, 2019a). Najveći deo zapremine testisa čine seminiferne tubule i intersticijalni prostor (Slika 1.4).

Seminiferne tubule predstavljaju splet izuvijanih kanalića, odvojenih od intersticijuma bazalnom laminom i peritubularnim mioidnim ćelijama. Duž zidova seminifernih tubula smeštene su germinativne ćelije u različitim fazama razvoja i čine ih: spermatogonije, primarne spermatocite, sekundarne spermatocite i spermatide od kojih nastaju spermatozoidi, koji se oslobađaju u lumen ovih tubula. Sazrevajuće germinativne ćelije leže „uronjene“ između somatskih, Sertolijevih ćelija. Sertolijeve ćelije su krupne, polarizovane epitelne ćelije koje se pružaju od bazalne lamine do lumena seminifernih tubula, i pružaju mehaničku potporu germinativnim ćelijama (Mruk i Cheng, 2015). Osim toga, Sertolijeve ćelije učestvuju i u modulaciji funkcije testisa kroz produkciju regulatornih molekula i nutrijenata neophodnih za proces spermatogeneze, kao što je androgen-vezujući protein, zatim sintezom inhibina, koji na nivou adenohipofize regulišu ekspresiju *Fshb* a time i sekreciju FSH. Ovi procesi su pod kontrolom sinergističkog delovanja testosterona i FSH, čiji se receptori nalaze na membrani Sertolijevih ćelija (Oduwole i sar., 2021). Osim toga, susedne Sertolijeve ćelije su u regionu iznad spermatogonija povezane čvrstim vezama i formiraju krvno-testisnu barijeru (KTB), koja omogućava održavanje stalnosti sastava tečnosti u lumenu seminifernih tubula i štiti germinativne ćelije, što predstavlja važan preduslov za pravilno odvijanje procesa spermatogeneze (Mruk i Cheng, 2015).

Intersticijum testisa predstavlja prostor između seminifernih tubula ispunjen različitim tipovima ćelija, sistemom krvnih i limfnih sudova, nervima i vezivnim tkivom. Građa intersticijuma varira između vrsta. U intersticijalnom prostoru testisa pacova dominiraju limfatični prostori, u kojima se nalaze malobrojne ćelije, uronjene u limfu, najčešće u neposrednoj blizini krvnog suda (Foley, 2001). Za razliku od seminifernih tubula koje su lišene vaskulature, intersticijum testisa je visoko vaskularizovan, pri čemu kapilari nisu fenestrirani (Hedger, 2015).

Slika 1.4. Građa testisa pacova. Na poprečnom preseku testisa pacova mogu se uočiti dva odeljka: seminiferne tubule (ST) i intersticijalni prostor (I). U lumenu seminiferne tubule prisutne su germinativne ćelije u različitim fazama razvoja i potporne Sertolijeve ćelije. Intersticijalni prostor ispunjavaju ćelije različitih tipova, među kojima su i Lajdigove ćelije, koje sintetišu androgene, kao i krvni i limfni sudovi, nervi i vezivno tkivo.



1.3.3.1.1. Intersticijalne ćelije testisa pacova

Primarno mesto biosinteze androgena su Lajdigove ćelije (LĆ) intersticijuma testisa. U testisu pacova, zavisno od faze razvoja, mogu se naći dva tipa LĆ – fetalne i adultne. Fetalne LĆ pojavljuju se u vreme diferencijacije Sertolijevih ćelija i prisutne su tokom fetalnog i neonatalnog perioda (O’Shaughnessy, 2015). I fetalne i adultne LĆ sintetišu androgene. Androgeni produkovani u fetalnim LĆ važni su za pravilnu diferencijaciju muškog reproduktivnog sistema i maskulinizaciju mozga (Chen i sar., 2019). Tokom kasnog fetalnog razvoja otpočinje regresija fetalnih LĆ, koja se nastavlja u postnatalnom periodu, i u prve dve do tri nedelje postnatalnog razvića, fetalne LĆ bivaju postepeno zamenjene adultnim LĆ, mada postoje dokazi da se mali broj fetalnih LĆ zadržava i u adultnom testisu (Zirkin i Papadopoulos, 2018). Iako se ranije smatralo da fetalne i adultne LĆ imaju drugačije poreklo, novija istraživanja pokazuju da bar deo adultnih LĆ potiče od istih progenitora kao i fetalne LĆ, a čak i da se izvestan broj fetalnih LĆ dediferencira i služi kao pul prekursora za adultne LĆ (Chen i sar., 2019). Između 10. i 13. postnatalnog dana, matične ćelije neonatalnog testisa pacova prolifериšu i diferenciraju se u progenitorske adultne LĆ, koje se oko 28. dana diferenciraju u nezrele, a zatim u zrele LĆ, i njihova diferencijacija se završava između 7. i 8. nedelje posle rođenja (Ivell i sar., 2013). Oko 30. postnatalnog dana, kod pacova počinje da se eksprimira faktor sličan insulinu (engl. *insulin-like factor 3*, INSL3) koji predstavlja marker zrelih LĆ. Ovaj mali peptidni hormon se eksprimira i u fetalnim LĆ i neophodan je za proces spuštanja testisa u skrotum. U adultnom testisu, INSL3 je, pored testosterona, najvažniji sekretorni produkt LĆ. Imajući u vidu da se eksprimira i sekretuje konstitutivno, predstavlja marker funkcionalnosti, proliferacije i diferencijacije zrelih LĆ (Ivell i sar., 2013).

Osim LĆ, u intersticijumu testisa nalaze se i imunske ćelije, pre svega makrofagi, ali i dendritske ćelije, T-limfociti i NK ćelije. Makrofagi su najbrojnija populacija imunskih ćelija testisa, i kod pacova čine oko 20% intersticijalnih ćelija (Winnall i Hedger, 2013). Rezidentni intersticijalni makrofagi i LĆ su tesno povezani – između njih se formiraju specifične citoplazmatične interdigitacije (Hedger, 2015). Ove digitacije mogu se uočiti oko 30. postnatalnog dana, sa pojavom zrelih adultnih LĆ, a tada dolazi i do porasta broja makrofaga u intersticijumu (Hutson, 1992). Mada još nije jasna uloga ovih digitacija, pokazano je da smanjenje broja LĆ dovodi i do smanjenja broja makrofaga, bez uticaja na ćelije spermatogene loze (Winnall i Hedger, 2013). Makrofagi testisa predstavljaju heterogenu populaciju ćelija. Kod pacova, većina makrofaga eksprimira CD163 (ED2), odnosno ispoljava fenotip alternativne aktivacije, M2, dok 15-20% makrofaga eksprimira CD68 (ED1) (Hedger, 2015). U fiziološkim uslovima, rezidentni M2 makrofagi imaju

važnu ulogu u održavanju homeostaze u testisima i regulaciji imunskog odgovora, budući da konstitutivno sintetišu antiinflamatorne citokine, čime doprinose imunskoj privilegiji testisa – naime, iako je ranije smatrano da je imunska privilegija testisa ostvarena samo preko KTB, pokazano je da su i spermatogonije i intersticijum testisa, koji se nalaze van KTB, takođe obuhvaćeni ovim fenomenom (Zhao i sar., 2014). Tokom inflamacije u testisima, dolazi do porasta broja proinflamatornih, CD68⁺ makrofaga (Winnall i Hedger, 2013) i do povećane sekrecije proinflamatornih citokina i hemokina, poput IL-1, IL-6, TNF i CCL2 (Loveland i sar., 2017).

1.3.3.2. Biosinteza androgena

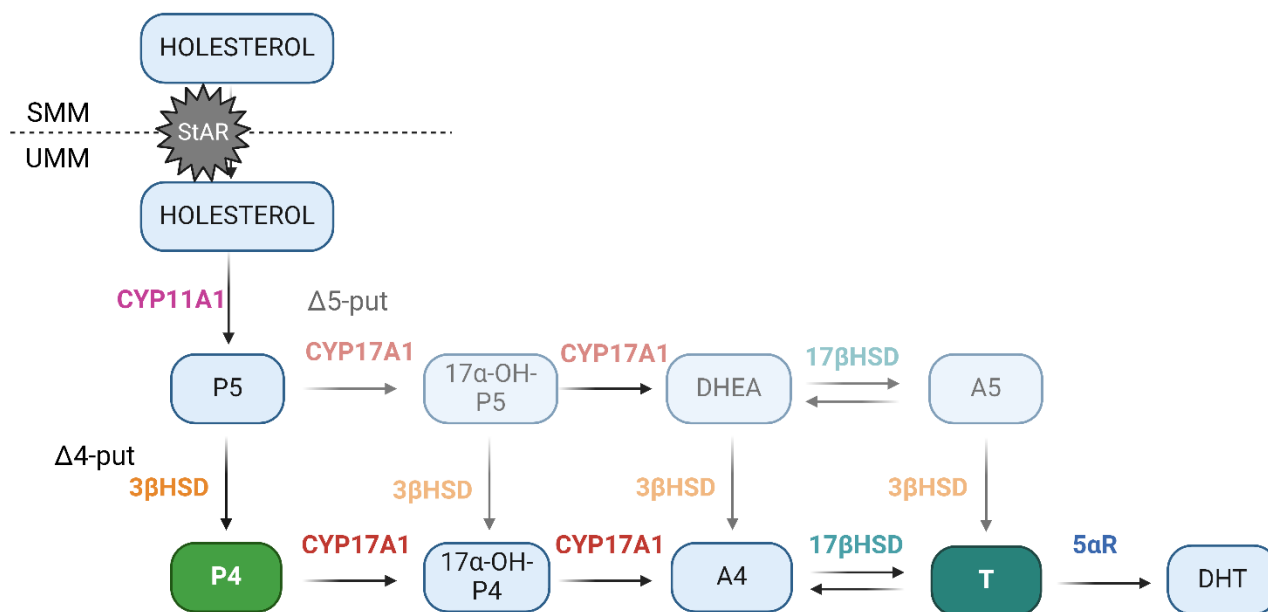
Prekursor za biosintezu svih steroidnih hormona je holesterol, koji je ćelijama dostupan iz tri izvora: i) *de novo* sinteze u endoplazmatičnom retikulumu; ii) preuzimanjem holesterola koji je u sastavu ćelijske membrane (i predstavlja 65-80% ćelijskog holesterola) i preuzimanjem holesteril-estara iz vanćelijske sredine; iii) mobilizacijom holesterola iz lipidnih kapi (Rone i sar., 2009). Kada su u pitanju vanćelijski izvori, steroidogene ćelije pacova se dominantno snabdevaju holesterolom iz lipoproteina visoke gustine (engl. *high-density lipoproteins*, HDL). Glavnu ulogu u preuzimanju holesterola iz HDL partikula ima membranski protein SR-B1 (od engl. *scavenger receptor class B type 1*), kodiran genom *Scarb1* (Acton i sar., 1996; Connelly i Williams, 2003).

Enzimi koji učestvuju u konverziji holesterola do svih steroidnih hormona locirani su na unutrašnjoj membrani mitohondrija i u glatkom endoplazmatičnom retikulumu (Payne i Hales, 2004). Budući da je holesterol hidrofoban molekul, njegovo kretanje kroz citoplazmu i nagomilavanje na spoljašnjoj membrani mitohondrija omogućeno je vezikularnim transportom i odgovarajućim proteinskim nosačima (Ikonen, 2008). Limitirajući korak u procesu steroidogeneze predstavlja transport holesterola kroz hidrofilni intramembranski prostor, sa spoljašnje mitohondrijalne membrane do unutrašnje mitohondrijalne membrane gde se dešava prva enzimska reakcija konverzije holesterola (Zirkin i Papadopoulos, 2018). Ovaj transport holesterola, koji je hormonski regulisan, odvija se pomoću kompleksne proteinske mašinerije koju čine proteini locirani u citoplazmi i u mitohondrijama (Liu i sar., 2006) i nazvana je transduceozom (Rone i sar., 2009). U sastav transduceozoma ulaze brojni proteini (Zirkin i Papadopoulos, 2018), a veliki značaj u regulaciji steroidogeneze se pripisuje citoplazmatičnoj komponenti transduceozoma – steroidnom akutnom regulatornom proteinu (StAR) (Clark i sar., 1994).

Konverzija holesterola odigrava se uz pomoć složene enzimske mašinerije, čije se komponente mogu podeliti u dve familije enzima: to su hidrosisteroid-dehidrogenaze (HSD familija enzima) i citohrom P450 oksidaze (engl. *cytochrome P450*, CYP familija enzima). Enzimi iz HSD familije mogu se, prema svojoj aktivnosti, klasifikovati u grupu dehidrogenaza, koje oksiduju hidrosisteroide u ketosteroide, i u grupu reduktaza, koje redukuju ketosteroide do hidrosisteroida. Pripadnici CYP familije enzima katalizuju reakcije hidrosilacije i raskidanja veza između atoma ugljenika (Bremer i Miller, 2014).

Kod pacova, steroidogeneza se dominantno odvija preko $\Delta 4$ puta. Prvi korak u procesu steroidogeneze je reakcija katalizovana enzimom citohrom P450 oksidaza familija 11, podfamilija A, polipeptid 1 (CYP11A1), smeštenom na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani, koji iseca bočne lance holesterola dajući pregnenolon. Enzimsku reakciju konverzije pregnenolona u progesteron katalizuje enzim 3β -hidrosisteroid-dehidrogenaza/ $\Delta 5$ -4-izomeraza (3β -HSD). Ovaj enzim lociran je i u mitohondrijama, ali dominantno u endoplazmatičnom retikulumu (Zirkin i Papadopoulos, 2018). U steroidogenim ćelijama pacova, progesteron se konvertuje u $\Delta 4$ -androstendion, u reakciji koju katalizuje enzim steroid 17- α hidrosilaza/17,20 liaza (CYP17A1). Ovi koraci u steroidogenezi određuju dominantni, $\Delta 4$ put kod pacova. Kod čoveka, pregnenolon se

konvertuje u 17-hidroksipregnenolon, koji se zatim konvertuje u dihidroepiandrosteron, što znači da se steroidogeneza kod čoveka odvija preko $\Delta 5$ puta (Scott i sar., 2009). Dejstvom enzima 17 β -HSD, androstendion se konvertuje u testosteron. U testisima je dominantno eksprimirana izoforma 17 β -HSDIII (Payne i Hales, 2004). Testosteron se konvertuje u njegov potentniji metabolit, dihidrotestosteron (DHT), aktivnošću enzima 5 α -reduktaze (5 α R), koji je kod pacova eksprimiran najviše u jetri, ali je prisutan i u testisima i pomoćnim polnim žlezdama (Russell i Wilson, 1994). Šematski prikaz biosinteze androgena prikazan je na Slici 1.5.



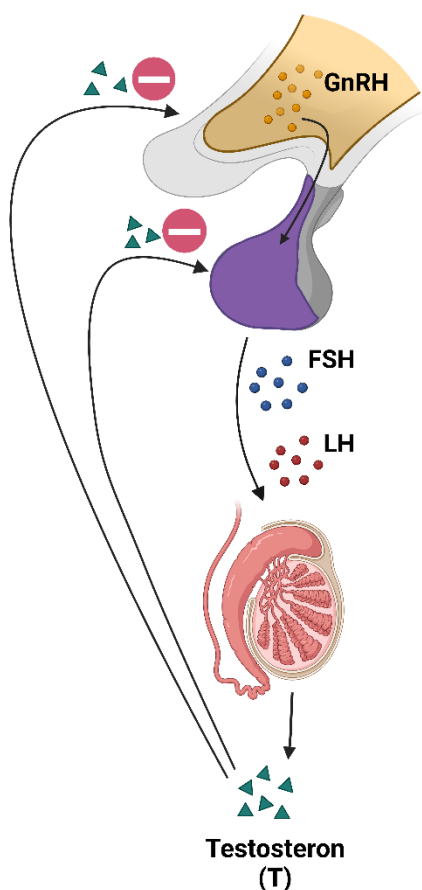
Slika 1.5. Šematski prikaz biosinteze androgena. Steroidogeneza se odvija u lumenu mitohondrija i u glatkom endoplazmatičnom retikulumu. Kod čoveka, steroidogeneza se odvija preferencijalno preko $\Delta 5$ puta dok je kod pacova dominantan $\Delta 4$ put. SMM – spoljašnja membrana mitohondrija; UMM – unutrašnja membrana mitohondrija; P5 – pregnenolon; 17 α -OH-P5 – 17 α -hidroksipregnenolon; DHEA – dihidroepiandrosteron; A5 – androstenediol; P4 – progesteron; 17 α -OH-P4 – 17 α -hidroksiprogesteron, A4 – androstendion; T – testosteron; DHT – dihidrotestosteron; StAR – steroidni akutni regulatorni protein; CYP11A1 – citohrom P450 oksidaza familija 11, podfamilija A, polipeptid 1; 3 β HSD – 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza/ $\Delta 5$ -4 izomeraza; CYP17A1 – 17- α hidroksilaza/17,20 liaza; 17 β HSD – 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza; 5 α R – 5 α -reduktaza. Napravljeno u <https://www.biorender.com/>.

1.3.3.3. Kontrola endokrine funkcije testisa

U endokrinim ćelijama koje sintetisaju peptidne hormone, ovi hormoni čuvaju se u sekretornim vezikulama i spremni su za oslobađanje u odgovoru na adekvatan stimulus. Za razliku od ovih ćelija, steroidogene endokrine ćelije sadrže veoma male količine sintetisanih steroida, tako da moraju da ih sintetisaju neposredno pre oslobađanja, u odgovoru na stimulus (Bremer i Miller, 2014). Stoga regulacija samog procesa steroidogeneze predstavlja ključan faktor koji determiniše koncentraciju steroida u cirkulaciji.

Steroidogeneza u testisima je primarno regulisana neuroendokrinim odnosno endokrinim putem, delovanjem hormona HPG ose. Tonični obrazac pulsne sekrecije GnRH neurona hipotalamusa mužjaka diktira toničnu sekreciju gonadotropina hipofize što omogućava održavanje konstantnog nivoa testosterona neophodnog za neometano odvijanje procesa spermatogeneze. Testosteron kao krajnji produkt, preko negativnih povratnih sprega na nivou

hipotalamusa i adenohipofize, reguliše aktivnost HPG ose i time sopstvenu produkciju (Slika 1.6). Povratna regulacija se odvija dominantno na nivou hipotalamusa, regulacijom oslobađanja GnRH, a manjim delom na nivou gonadotropa adenohipofize (Bliss i sar., 2010).

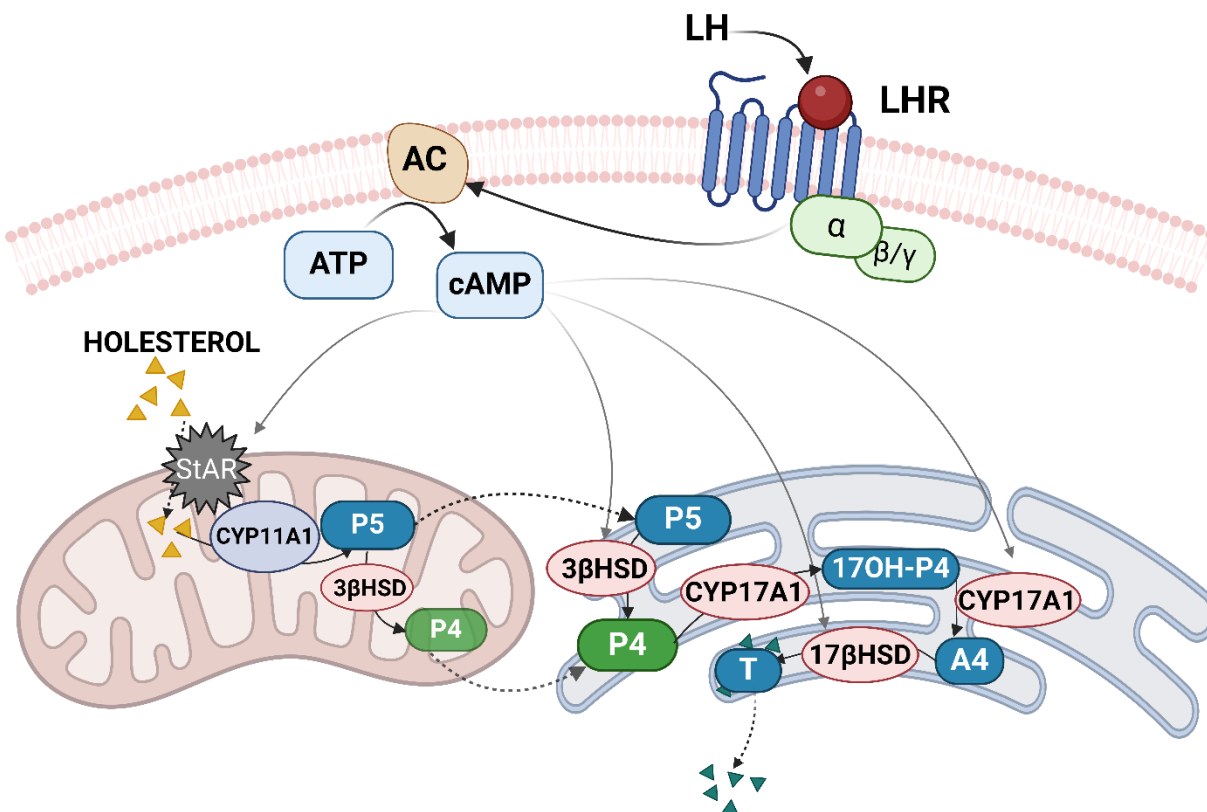


Slika 1.6. Kontrola endokrine funkcije testisa – hipotalamo-hipofizno-gonadna osa mužjaka. GnRH neuroni sintetišu i sekretuju GnRH, koji preko GnRHR reguliše sintezu i oslobađanje gonadotropnih hormona adenohipofize, LH i FSH. Gonadotropni hormoni na nivou testisa regulišu procese spermatogeneze i androgeneze. Testosteron negativnim povratim spregama na nivou hipotalamusa i adenohipofize reguliše sopstvenu produkciju. GnRH – gonadotropin-oslobađajući hormon; FSH – folikulostimulišući hormon; LH – luteinizirajući hormon; T – testosteron; „-“ – negativna povratna sprega. Napravljeno u <https://www.biorender.com/>.

Vezivanjem LH za njegov receptor koji se eksprimira na membrani LĆ (engl. *luteinizing hormone receptor*, LHR), receptor spregnut sa proteinom G, pokreće se cAMP/PKA signalni put koji je dominantan signalni put kontrole procesa steroidogeneze. Naime, vezivanjem liganda za LHR, aktivira se adenilat-ciklaza (AC), koja konvertuje adenzin-trifosfat (ATP) u ciklični adenzin-monofosfat (cAMP), koji zatim aktivira protein-kinazu A (PKA). Svojom aktivnošću PKA otpočinje proces steroidogeneze time što fosforiliše, a samim tim aktivira, učesnike u regulaciji transporta holesterola i ekspresiju steroidogenih enzima (Stocco i sar., 2005). Šematski prikaz regulacije sinteze testosterona cAMP signalnim putem u LĆ predstavljen je na Slici 1.7.

Regulacija steroidogeneze može biti akutna i hronična. Pokazano je da akutna regulacija steroidogeneze podrazumeva aktivaciju proteina StAR i njegovu transkripciju (Miller, 2013). Za aktivaciju StAR proteina neophodna je njegova fosforilacija (Arakane i sar., 1997), od strane PKA (Clark, 2016; Zirkin i Papadopoulos, 2018). Pod akutnom regulacijom steroidogeneze podrazumeva se i transkripcija iRNK za StAR, jer se ovaj proces dešava tokom nekoliko minuta od vezivanja LH za receptor (Jo i sar., 2005; Manna i sar., 2009). Signalizacija posredovana sa cAMP/PKA ima ključnu ulogu i u hroničnoj regulaciji steroidogeneze, koja podrazumeva regulaciju transkripcije enzima koji katalizuju konverziju holesterola, i dešava se tokom nekoliko sati/dana (Miller, 2013). U ovom procesu, PKA fosforiliše transkripcione faktore koji se vezuju za CRE elemente (engl. *cAMP-responsive element*) u promotorima gena koji kodiraju za ove enzime.

Međutim, i brojni drugi transkripcioni faktori, nezavisni od cAMP signalizacije, takođe učestvuju u regulaciji transkripcije steroidogenih enzima (Bremer i Miller, 2014).



Slika 1.7. Regulacija sinteze testosterona u LĆ pacova. LH – luteinizirajući hormon; LHR – receptor za LH; AC – adenilat-ciklaza; ATP – adenzin-trifosfat; cAMP- ciklični adenzin-monofosfat; P5 – pregnenolon; 17 α -OH-P5 – 17 α -hidroksipregnenolon; DHEA – dihidroepiandrosteron; A5 – androstenediol; P4 – progesteron; 17 α -OH-P4 – 17 α -hidroksiprogesteron, A4 – androstendion; T – testosteron; DHT – dihidrotestosteron; StAR – steroidni akutni regulatorni protein; CYP11A1 – citohrom P450 oksidaza familija 11, podfamilija A, polipeptid 1; 3 β HSD – 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza/ Δ 5-4 izomeraza; CYP17A1 – 17- α hidroksilaza/17,20 liaza; 17 β HSD –17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza. Napravljeno u <https://www.biorender.com/>.

Iako je LH glavni regulator steroidogeneze u LĆ, ovaj proces je regulisan i drugim hormonima, faktorima rasta, citokinima, reaktivnim oblicima kiseonika itd., koji potiču iz cirkulacije, i/ili su produkovani lokalno, od stane susednih ćelija ili samih LĆ (Hales, 2002; Manna i sar., 2006; Saez, 1994). Takođe, pored dominantne cAMP/PKA-zavisne regulacije steroidogeneze, u ovom procesu učestvuju i drugi molekuli i signalni putevi koji ne uključuju cAMP. Međutim, doprinos cAMP-nezavisne regulacije steroidogeneze u odnosu na cAMP-zavisnu regulaciju je manji od 1% (Manna i sar., 2006; Stocco i sar., 2005).

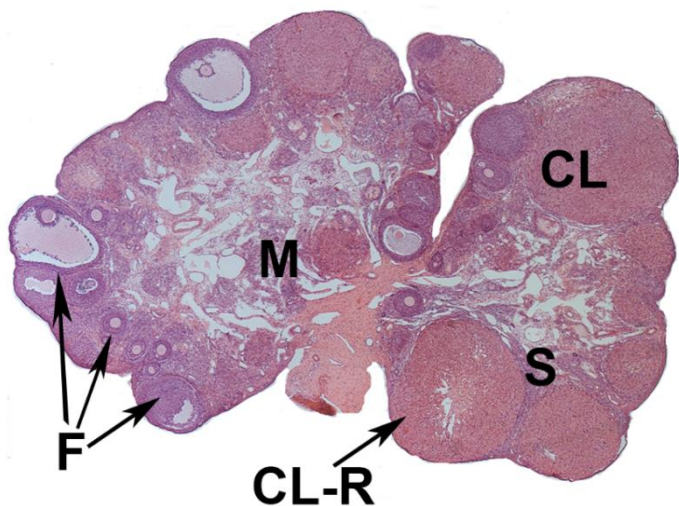
1.3.4. Polne žlezde ženki

Polne žlezde ženki, ovarijumi, uz jajovode, matericu, vaginu i mlečne žlezde predstavljaju reproduktivni sistem ženki sisara (Boyd i sar., 2018). Razlike u reproduktivnom sistemu između ženki pacova i primata ogledaju se pre svega u anatomskoj građi materice, jajovoda i vagine, dok je histološka struktura i funkcija slična između ovih vrsta (Boyd i sar., 2018). Kod pacova, otvaranje vagine i prva ovulacija označavaju početak puberteta, što se dešava između 30. i 37. dana postnatalno, mada postoje razlike između sojeva (Goldman i sar., 2000; Rivest, 1991).

Ovarijumi su, kao i testisi, parne žlezde, i takođe imaju dve funkcije: egzokrinu – produkciju i sazrevanje ženskih germinativnih ćelija (oogenezu), i endokrinu – sintezu i sekreciju ženskih polnih hormona – estrogena i progesterona. Osim toga, ovarijumi produkuju i male količine androgena i inhibin.

1.3.4.1. Morfologija i građa ovarijuma pacova

Kod polno zrelih ženki, usled sazrevanja folikula i formiranja žutih tela, ovarijumi imaju nodularnu strukturu (Boyd i sar., 2018). Površina jajnika pokrivena je ovarijalnim epitelom ispod koga se nalazi sloj gustog vezivnog tkiva, *tunica albuginea*. Na poprečnom preseku ovarijuma razlikuju se srž (medula), koja sadrži gusto vezivno tkivo i krvne sudove; i kora, u kojoj se nalaze folikuli u različitim fazama sazrevanja, žuta tela (lat. *corpus luteum*), interfolikularna stroma i krvni sudovi (Slika 1.8).



Slika 1.8. Građa ovarijuma pacova. Na preseku ovarijuma uočavaju se medula (M) i kora u kojoj se nalaze folikuli (F) u različitim stadijumima razvoja, kao i žuta tela (CL) od koji su neka u fazi regresije (CL-R). Na preseku se uočava i interfolikularna stroma (S).

Folikul predstavlja osnovnu funkcionalnu jedinicu ovarijuma i sadrži buduću jajnu ćeliju okruženu somatskim ćelijama, obavijenim bazalnom laminom (Magoffin, 2005). Folikulogeneza i oogeneza su paralelni procesi koji podrazumevaju proliferaciju i sazrevanje somatskih ćelija i buduće jajne ćelije, kroz sledeće stadijume folikula: primordijalni, primarni, sekundarni, tercijarni, preovulatorni, i kulminiraju oslobađanjem jajne ćelije – ovulacijom. Nakon ovulacije, somatske ćelije folikula se transformišu u luteinske ćelije, odnosno folikul se transformiše u žuto telo (Edson i sar., 2009).

Ženke sisara se rađaju sa određenim brojem germinativnih ćelija koje su zaustavljene u profazi mejoze I i ostaju u toj fazi sve do početka sazrevanja, pred ovulaciju (Pangas i Rajkovic, 2015). Ove germinativne ćelije formiraju „гнездо“ koje biva razbijeno da bi se formirali primordijalni folikuli, sačinjeni od oocite okružene jednim slojem pljosnatih *pregranulosa* ćelija (Boyd i sar., 2018). Drugim rečima, za razliku od mužjaka kod kojih se proces spermatogeneze, inicirane pubertetom, dešava tokom adultnog života, kod ženki proces formiranja primordijalnih folikula, odnosno germinativnih ćelija, dešava se samo tokom embrionalnog razvića. Prema klasifikaciji Pedersena i Petersa (1968), primordijalni folikuli spadaju u male folikule, tipove 1 i 2 (Edson i sar., 2009). Primarni folikul sadrži oocitu okruženu jednim slojem kuboidnih *granulosa* ćelija (tip 3). Nakon dalje proliferacije *granulosa* ćelija nastaju sekundarni folikuli (tipovi 4 i 5), koje čine oocita okružena višeslojnim omotačem *granulosa* ćelija, a od nespecijalizovanih mezenhimskih ćelija strome formira se sloj *theca* ćelija, odvojenih od *granulosa* ćelija bazalnom laminom. *Theca* ćelije

diferenciraju se iz nespecijalizovanih mezenhimskih ćelija strome. Sloj *theca* ćelija je visoko vakularizovan i čine ga unutrašnji sloj (*theca interna*), u kome se odvija proces steroidogeneze, i spoljašnji sloj (*theca externa*), koji čine nesteroidogene ćelije (Magoffin, 2005). Kada se daljim rastom folikula u njegovoj unutrašnjosti formira šupljina, *antrum*, ispunjena folikularnom tečnošću koja je bogata estrogenim hormonima porekleom iz *granulosa* ćelija, folikul je označen kao tercijarni (tipovi 6 i 7). Nakon ove faze, folikul raste i finalno sazreva do preovulatornog (Grafovog) folikula (tip 8) koji je definisan velikom šupljinom ispunjenom tečnošću i budućom jajnom ćelijom koja je postavljena ekscentrično, sa tankim slojem *granulosa* ćelija koje je okružuju (Maynard i Downes, 2019b). Pored *granulosa* ćelija i ćelija sloja *theca interna*, produkcija polnih hormona u ovarijumu se odigrava i u ćelijama strome, ali u znatno manjim količinama.

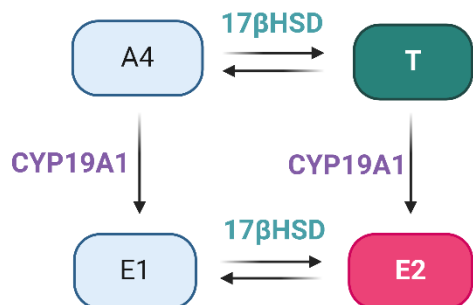
Regrutacija primordijalnih folikula i njihovo sazrevanje do sekundarnih folikula kod glodara odvija se kontinuirano, bez uticaja gonadotropnih hormona. Ova faza se naziva i inicijalna regrutacija folikula. Sazrevanje folikula u sekundarnoj i tercijarnoj fazi ne zavisi od gonadotropina, ali ovi hormoni stimulišu taj proces. Od ulaska u pubertet, porast nivoa FSH tokom svakog ciklusa reguliše regrutaciju tercijarnih folikula koji će se pod uticajem rastuće koncentracije LH razviti u preovulatorni folikul. Stoga, ova faza zavisi od gonadotropina i označena je kao ciklična regrutacija folikula (Craig i sar., 2007; McGee i Hsueh, 2000).

Broj folikula koji će postati preovulatorni veoma je mali. Tokom reproduktivnog života ženke sisara najveći broj folikula propada, odnosno podleže procesu koji se naziva atrezija. Atrezija je proces vođen ćelijskom smrću tipa apoptoze (Craig i sar., 2007). Ovaj proces može zahvatati i primordijalne i primarne folikule, ali se najčešće dešava u stadijumu sekundarnih i tercijarnih folikula. Zavisno od stadijuma folikula zahvaćenog atrezijom, izgled atretičnih folikula je različit. Zajednička karakteristika je svakako piknoza – proces skupljanja jedra i kondenzacija hromatina u *granulosa* ćelijama (Levine, 2015).

U kori ovarijuma se kod polno zrelih jedinki uočavaju i žuta tela, koja, kao što je napomenuto, nastaju od ćelija preovulatornog folikula koje podležu procesu luteinizacije nakon ovulacije i nastavljaju da produkuju polne hormone. Osim toga, bazalna lamina propada, što omogućava migraciju endotelih ćelija i vaskularizaciju folikula u *granulosa* sloju, koji je prethodno bio lišen vaskulature (Stocco i sar., 2007). Budući da kod ženki pacova istovremeno sazreva više oocita odnosno folikula, u ovarijumima pacova se nakon ovulacije može uočiti više žutih tela. Osim toga, kod pacova su prisutna i žuta tela iz nekoliko prethodnih ciklusa (Boyd i sar., 2018). Žuta tela iz različitih ciklusa mogu se razlikovati na osnovu veličine, vaskularizacije i obojenosti u histološkim bojenjima (Westwood, 2008).

1.3.4.2. Biosinteza ženskih polnih hormona

Neposredni prekursori za sintezu estrogenih hormona su androgeni, stoga je ceo put biosinteze do androgena identičan i za estrogene hormone (Slika 1.5). Aromatizacija androgena do estrogena katalizovana je dejstvom enzima aromataze (CYP19A1). Aromataza katalizuje konverziju testosterona u estradiol, kao i androstendiona u estron. Estron se zatim konvertuje u estradiol, dejstvom enzima 17 β -HSD (Bremer i Miller, 2014). U ovarijumima je dominantno eksprimirana izoforma 17 β -HSDI. Kod čoveka, izoforma 17 β -HSDI dominantno koristi estron kao supstrat i redukuje ga do estradiola, dok kod pacova ova izoforma enzima jednakom efikasnošću koristi estron i androstendion (Payne i Hales, 2004). Konverzija androgena u estrogene šematski je prikazana na Slici 1.9.

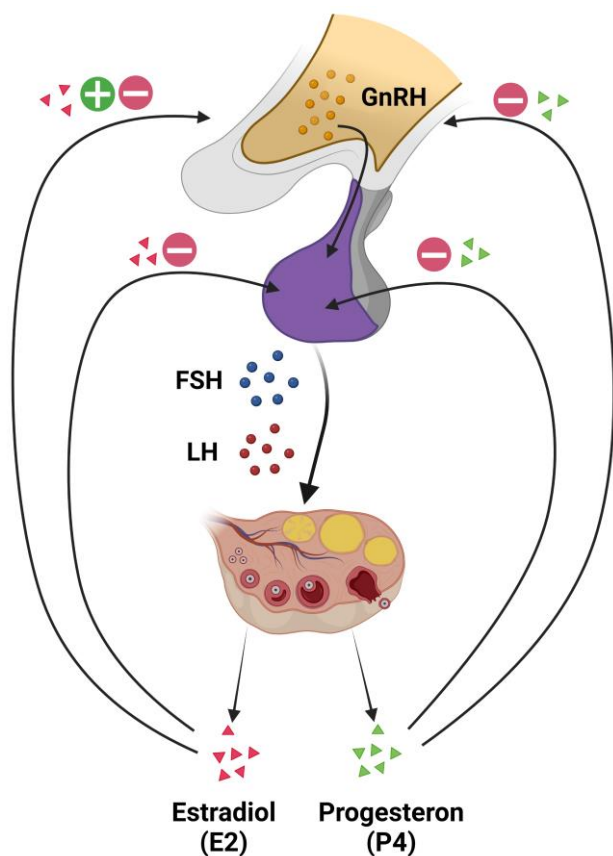


Slika 1.9. Šematski prikaz sinteze estrogenih hormona od androgena. Androgeni su neposredni prekursori za sintezu estrogena, pa je put biosinteze do androgena identičan onome prikazanom na Slici 1.5. A4 – androstendion; T – testosteron; E1 – estron; E2 – estradiol; 17βHSD – 17β-hidroksisteroid dehidrogenaza; CYP19A1 – aromataza. Napravljeno u <https://www.biorender.com/>.

1.3.4.3. Kontrola endokrine funkcije ovarijuma

Regulacija steroidogeneze u jajnicima, kao i u testisima, primarno se odvija neuroendokrinim i endokrinim putem, delovanjem hormona HPG ose. Pulsna sekrecija GnRH iz hipotalamusa definiše bazalnu pulsnu sekreciju LH i FSH. Estrogeni i progesteron kao krajnji produkti regulišu aktivnost HPG ose i time sopstvenu produkciju, tako što deluju negativnim povratnim spregama na nivou hipotalamusa i hipofize, osim u slučaju dostizanja visokih koncentracija estradiola, pred ovulaciju, kada sprega postaje pozitivna i indukuje talasno oslobađanje GnRH/LH (Slika 1.10). Za razliku od mužjaka, reproduktivni sistem ženki karakterišu ciklične promene koje nastaju kao rezultat cikličnog obrasca pulsne sekrecije GnRH neurona hipotalamusa, što dalje vodi ka cikličnoj sekreciji gonadotropina hipofize, što se odražava i na regulaciju sinteze hormona u ovarijumima.

Slika 1.10. Kontrola endokrine funkcije ovarijuma – hipotalamo-hipofizno-gonadna osa ženki. GnRH neuroni sintetišu i sekretuju GnRH, koji reguliše sintezu i oslobađanje gonadotropnih hormona adenohipofize, LH i FSH. Gonadotropni hormoni deluju na ovarijume i regulišu procese oogeneze, folikulogeneze i sinteze estrogenih hormona i progesterona. Polni hormoni negativnim povratim spregama na nivou hipotalamusa i adenohipofize regulišu sopstvenu produkciju, osim u slučaju visokih koncentracija estradiola, pred ovulaciju, kada povratna sprega na nivou hipotalamusa postaje pozitivna. GnRH – gonadotropin-oslobađajući hormon; FSH – folikulostimulišući hormon; LH – luteinizirajući hormon; E2 – estradiol; P4 – progesteron; „+“ – pozitivna povratna sprega; „-“ – negativna povratna sprega. Napravljeno u <https://www.biorender.com/>.

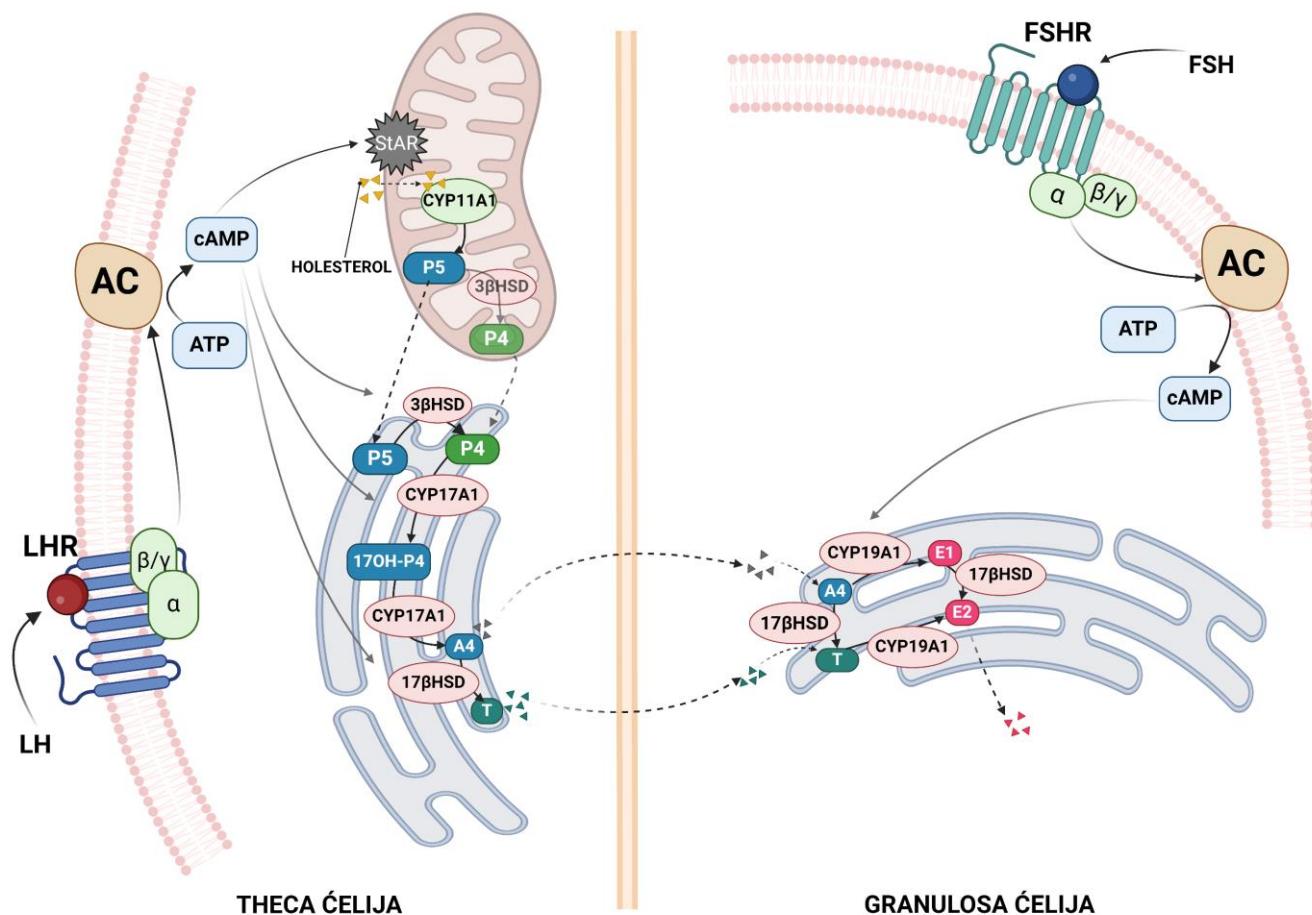


Receptori za gonadotropne hormone eksprimirani su na somatskim ćelijama ovarijuma. Treba napomenuti da, kao i LHR, i receptor za FSH (engl. *follicle-stimulating hormone receptor*, FSHR) predstavlja receptor spregnut sa proteinom G, koji aktivira AC i nishodnu cAMP-zavisnu signalizaciju (Dufau i Catt, 1978). Dominantan signalni put regulacije steroidogeneze u ovarijumima je cAMP/PKA, kao i u LĆ.

Folikuli ovarijuma dominantno proizvode estradiol. Sinteza estradiola vrši se po modelu „dva gonadotropina/dva tipa ćelija“ (Hillier i sar., 1994). Osnovni postulati ovog modela su:

- i) *granulosa*, ali ne i *theca*, ćelije eksprimiraju FSHR;
- ii) *theca*, ali ne i *granulosa*, ćelije nezrelog folikula, poseduju LHR;
- iii) u *granulosa* ćelijama, FSH reguliše aktivnost aromataze, ali ne i sintezu androgena;
- iv) u *theca* ćelijama, LH reguliše sintezu androgena ali ne i aktivnost aromataze.

Delovanjem LH na LHR na membrani *theca* ćelija, aktivira se cAMP/PKA-zavisna signalizacija, čime se aktivira steroidogeneza na isti način kao što je opisano za LĆ, što vodi povećanoj konverziji holesterola do androgena. Androgeni, sintetisani u *theca* ćelijama, difunduju kroz bazalnu laminu do *granulosa* ćelija folikula. Na membrani *granulosa* ćelija, vezivanjem FSH za FSHR takođe se aktivira cAMP-zavisan signalni put, čime se povećava ekspresija i aktivacija aromataze. Na taj način regulisana je aromatizacija androgena do estrogena, koja se odvija u *granulosa* ćelijama folikula (Slika 1.11).



Slika 1.11. Regulacija sinteze estradiola u folikulima - princip „dva gonadotropina - dva tipa ćelija“. LH - luteinizirajući hormon; LHR - receptor za LH; FSH - folikulostimulišući hormon; FSHR - receptor za FSH; AC - adenilat-

ciklaza; ATP – adenzin-trifosfat; cAMP- ciklični adenzin-monofosfat; P5 – pregnenolon; 17 α -OH-P5 – 17 α -hidroksipregnenolon; DHEA – dihidroepiandrosteron; A5 – androstenediol; P4 – progesteron; 17 α -OH-P4 – 17 α -hidroksiprogesteron, A4 – androstendion; T – testosteron; DHT – dihidrotestosteron; E1 – estron; E2 – estradiol; StAR – steroidni akutni regulatorni protein; CYP11A1 – citohrom P450 oksidaza familija 11, podfamilija A, polipeptid 1; 3 β HSD – 3 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza/ Δ 5-4-izomeraza; CYP17A1 – 17- α -hidroksilaza/17,20-liaza; 17 β HSD – 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza; CYP19A1 – aromataza. Napravljeno u <https://www.biorender.com/>.

Luteinizacija ćelija folikula dovodi do promene u glavnom produktu endokrine aktivnosti ovarijuma, i u žutim telima dominantno sintetisan polni hormon je progesteron. To podrazumeva i promenu u ekspresiji gena u transformisanim luteinskim ćelijama, što utiče pre svega na njihovu sposobnost da odgovore na stimulaciju hormonima. Ovde je bitno napomenuti da kod pacova, važnu ulogu u regulaciji endokrine funkcije ovarijuma ima i prolaktin, koji deluje na održavanje žutog tela (Levine, 2015). Nakon luteinizacije, dolazi do promena u ekspresiji receptora za LH, FSH i prolaktin. Preovulatorni talas LH dovodi do „utišavanja“ ekspresije FSHR, i ovaj receptor se ne eksprimira u ćelijama žutog tela. LHR se nakon talasa LH prvo aktivira, a zatim dolazi do njegove kratkotrajne desenzitizacije, nakon čega se njegova ekspresija povećava i ostaje konstantno visoka u žutim telima. Ekspresija receptora za prolaktin je konstantno povećana u žutom telu, i to verovatno takođe pod uticajem talasa LH. Budući da LH i prolaktin pozitivno regulišu ekspresiju svih proteina i enzima neophodnih za transport i konverziju holesterola, luteinske ćelije žutog tela imaju sposobnost sinteze velikih količina progesterona (Stocco i sar., 2007).

Pored ovoga, u regulaciji steroidogeneze u ovarijumima, kao i u LC, učestvuju i drugi faktori. To su različiti faktori rasta, citokini, insulin, kao i inhibini i aktivini. Ovi molekuli mogu delovati endokrino, autokrino ili parakrino, i na različite načine učestvuju u LHR- i FSHR-posredovanoj regulaciji steroidogeneze u ovarijumima (Wood i Strauss, 2002).

1.3.4.3.1. Estrusni ciklus ženki pacova

Ciklična sekrecija hormona ovarijuma dovodi do cikličnih promena na nivou svih steroid-zavisnih organa ženki (epitela vagine, uterusa, mlečnih žlezda) koje se nazivaju estrusni ciklus kod pacova i ostalih sisara osim primata kod kojih se te promene zajednički nazivaju menstrualni ciklus.

Kod pacova, ove ciklične promene se spontano dešavaju tokom reproduktivnog života ženke, na svakih 4-5 dana, što ih čini nesezonskim, spontano ovulirajućim, poliestrusnim životinjama (Levine, 2015). Za razliku od čoveka, promene na nivou epitela vagine su kod pacova veoma izražene i nazivaju se ciklus vagine. Na osnovu prisustva, gustine i zastupljenosti ćelija u uzorku vaginalnog brisa, jednostavno se može utvrditi faza estrusnog ciklusa (Cora i sar., 2015).

Estrusni ciklus pacova obuhvata sledeće faze: proestrus, estrus, metestrus (diestrus I) i diestrus (diestrus II).

1.3.4.3.1.1. Proestrus

Na preparatu vaginalnog brisa u ovoj fazi estrusnog ciklusa uočavaju se žive, krupne, okruglaste epitelne ćelije sa centralno postavljenim jedrom (Cora i sar., 2015). Proestrus kod pacova traje oko 14 sati i može se poistovetiti sa fazom razvoja folikula menstrualnog ciklusa kod žena (Ajayi i Akhigbe, 2020). Na nivou ovarijuma tokom ove faze estrusnog ciklusa dolazi do finalnog sazrevanja tercijarnih u preovulatorne folikule. Somatske ćelije preovulatornih folikula sintetišu sve veće količine estradiola. Nivo estradiola dostiže maksimalnu koncentraciju oko

podneva na dan proestrusa i tada dejstvo ovog hormona na hipotalamus iz negativne prelazi u modalitet pozitivne povratne sprege, izazivajući preovulatorni talas GnRH koji dovodi do talasa LH, ali i FSH, što se dešava u kasno popodne na dan proestrusa. U to vreme registruje se i porast progesterona u ovarijumima. Nivo estradiola počinje da opada popodne na dan proestrusa (Levine, 2015). U parenhimu ovarijuma se tokom proestrusa mogu uočiti žuta tela iz prethodnog ciklusa, koja počinju da propadaju (prisustvo citopazmatičnih vakuola i proliferacija fibroznog tkiva) (Westwood, 2008).

1.3.4.3.1.2. Estrus

U vaginalnom brisu pacova u ovoj fazi estrusnog ciklusa uočava se veliki broj poliedarnih, kornifikovanih ćelija nepravilnog oblika, bez uočljivog jedra (Cora i sar., 2015). Kod pacova ova faza traje između 24 i 48h (Ajayi i Akhigbe, 2020). Preovulatorni talas LH dovodi do pucanja folikula i ovulacije; u jutarnjim časovima estrusa nivo estradiola je najniži i ostaje na niskom nivou do kraja ciklusa, dok koncentracija progesterona takođe opada do bazalnih vrednosti. Nakon preovulatornog talasa, nivo LH u cirkulaciji se takođe smanjuje tokom estrusa, i pulsevi LH se proređuju (Levine, 2015). Tokom estrusa kod pacova dolazi do još jednog porasta nivoa FSH, za razliku od primata kod kojih je nakon ovulacije inhibirana sekrecija ovog gonadotropina (Plant, 2012). Drugi talas FSH ključan je za regrutaciju novog pula tercijarnih folikula za sledeći estrusni ciklus (Chaffin i Vandevort, 2013; Coss, 2018). Tokom estrusa, u parenhimu ovarijuma uočavaju se tek nastala, mala, žuta tela, sa ćelijama koje imaju bazofilnu citoplazmu. Kod nekih se vide i ostaci centralne šupljine koja je zaostala iz folikula. Takođe, uočavaju se i žuta tela iz prethodnog ciklusa koja su u regresiji (Westwood, 2008).

1.3.4.3.1.3. Diestrus I

Na nivou epitela vagine tokom diestrusa I uočavaju se žive epitelne ćelije sa jedrom, kornifikovane ćelije i leukociti (Cora i sar., 2015). Diestrus I kod pacova traje između 6 i 8h. Sekrecija LH i FSH u ovoj fazi je na bazalnom nivou. Tokom diestrusa I, kod pacova se registruje još jedan porast progesterona u ovarijumima, koji potiče iz novonastalih žutih tela. Novi pul folikula regrutovanih za sledeći ciklus počinje da sintetiše sve veće količine estradiola, i postepeno povećanje koncentracije ovog hormona u cirkulaciji registruje se od kasnog diestrusa I i kroz diestrus II (Levine, 2015). Žuta tela u diestrusu I još mogu imati centralnu šupljinu i nemaju naznake fibroznog tkiva (Westwood, 2008).

1.3.4.3.1.4. Diestrus II

Na nivou epitela vagine, tokom faze diestrusa II dominiraju leukociti, mada se mogu naći i žive epitelne ćelije i mali broj kornifikovanih ćelija (Cora i sar., 2015). Diestrus II je najduža faza ciklusa, i traje između 48 i 72 h. Ova faza odgovara lutealnoj fazi kod žena (Ajayi i Akhigbe, 2020). U diestrusu II, sekrecija LH i FSH je na bazalnom nivou. Kao što je gore navedeno, koncentracija estradiola u cirkulaciji počinje da raste u diestrusu I i nastavlja da se povećava tokom diestrusa II da bi se maksimalne koncentracije dostigle u proestrusu. Porast nivoa progesterona koji se javlja u diestrusu I registruje se i rano u diestrusu II ali zatim koncentracija ovog hormona u cirkulaciji opada, i ostaje na niskom nivou sve do proestrusa. Do smanjenja u koncentraciji progesterona dolazi jer žuto telo pacova vrlo brzo podleže funkcionalnoj luteolizi (Levine, 2015). U parenhimu ovarijuma u diestrusu II prisutna su velika žuta tela, sa finom vakuolacijom ćelija. U regionu centralne šupljine počinje da se stvara fibrozno tkivo (Westwood, 2008).

1.4. Polne razlike i uloga polnih hormona u MS i EAE-u

1.4.1. Polne specifičnosti u prevalenciji i toku MS

Multipla skleroza se dva puta češće dijagnostikuje kod žena nego kod muškaraca, a u nekim regionima sveta taj odnos je čak 4 : 1 (Walton i sar., 2020). Veća prevalencija kod žena je, osim u patologiji MS, uočena i za druge autoimunske bolesti, poput sistemskog eritemskog lupusa, reumatoidnog artritisa, Sjogrenovog sindroma i Hašimotovog tiroiditisa (Libert i sar., 2010). Za ovaj fenomen je verovatno delom odgovorna i činjenica da žene pokazuju jači ćelijski i humoralni imunski odgovor u odnosu na muškarce (Butterworth i sar., 1967; Voskuhl, 2011; Whitacre i sar., 1999).

Osim u prevalenciji, polne razlike postoje i u toku i simptomima MS. Prema tipovima lezija detektovanih magnetnom rezonancom, pokazano je da kod žena dominira inflamatorni, a kod muškaraca neurodegenerativni fenotip bolesti (Gilli i sar., 2020; Pozzilli i sar., 2003). Takođe, žene pokazuju češće relapse i raniju pojavu simptoma MS, dok muškarci imaju veću predispoziciju za teže oblike bolesti, što se ogleda u većem riziku za ispoljavanje PPMS, većem stepenu oštećenja tkiva CNS-a i izraženijim kognitivnim disfunkcijama (Bove i Chitnis, 2013; Chitnis, 2018; Magyari i Koch-Henriksen, 2022; Ysrraelit i Correale, 2019). U slučaju RRMS, progresija bolesti je brža, odnosno prelazak u SPMS je raniji kod muškaraca u odnosu na žene (Collongues i sar., 2018; Confavreux i sar., 2003). Osim toga, muškarci se teže oporavljaju od relapsa bolesti (Chitnis, 2018; Malik i sar., 2014).

Faktori koji doprinose ovakvim razlikama između polova u patologiji MS jesu polni hormoni ili geni locirani na polnim hromozomima, pri čemu njihova uloga ne mora biti međusobno isključiva (Spence i Voskuhl, 2012).

1.4.2. Polni hormoni i MS

1.4.2.1. Uticaj nivoa polnih hormona na patologiju MS

Ispitivanje polnih hormona kao faktora koji utiču na patologiju MS ima uporište u činjenici da se promena odnosa u prevalenciji bolesti kod žena i muškaraca može korelirati sa periodima izrazitih fizioloških fluktuacija ženskih polnih hormona. Tako, odnos između devojčica i dečaka koji oboljevaju od MS u periodu pre puberteta približno je 1 : 1, dok je nakon ulaska u pubertet prevalencija značajno veća kod jedinki ženskog pola (Bove i Chitnis, 2013; Chitnis, 2018). Osim toga, pokazano je da je kod devojčica ranija menarha povezana sa povećanim rizikom i sa ranijim ispoljavanjem simptoma MS (Ahn i sar., 2015; Bove, 2016; Ramagopalan i sar., 2009; Sloka i sar., 2006).

Izrazito povećanje koncentracije estrona, estradiola, estriola i progesterona tokom trudnoće smatra se značajnim za patologiju MS, budući da su protektivni efekti gestacije pokazani u velikom broju studija (McCombe, 2018). Recimo, kod trudnih pacijentkinja sa MS registrovan je značajno manji broj relapsa (Langer-Gould i sar., 2020), naročito u trećem trimestru (Confavreux i sar., 1998). Protektivno dejstvo trudnoće kod pacijentkinja sa MS pokazano je i dugoročno (Runmarker i Andersen, 1995). Tako, žene koje su imale barem jednu trudnoću kasnije dostižu određeni nivo invaliditeta (Verdru i sar., 1994), što je još izraženije u slučaju dve ili više trudnoća (Matera i sar., 2015), naročito kod pacijentkinja sa RRMS (D'Hooghe M i sar., 2012). Važno je istaći da je paritet, a ne graviditet, faktor koji se dovodi u vezu sa protektivnim efektima u MS (Ysrraelit i Correale, 2019), što ukazuje na značaj hormonskih promena u trećem trimestru gestacije. Značajno povećan broj relapsa u odnosu na godinu pre trudnoće registrovan je tokom tri meseca *postpartum* (Confavreux i sar., 1998), mada noviji podaci ne ukazuju na razlike u učestalosti relapsa tokom ova

dva perioda (Langer-Gould i sar., 2020). Ipak, mora se naglasiti da je većina žena u ovoj studiji došla, a dojenje je povezano sa smanjenim rizikom od relapsa u *postpartum* periodu (Langer-Gould i sar., 2017).

Kod pacijenata kod kojih se prvi simptomi MS javljaju nakon 50. godine života, kada dolazi do smanjenja koncentracije polnih hormona u sistemskoj cirkulaciji žena, dakle tokom menopauze, razlika u prevalenciji MS između polova se smanjuje, što je još izraženije nakon 60. godine (Bove i sar., 2012). S druge strane, smatra se da bi smanjenje nivoa polnih hormona u menopauzi moglo doprinosti neurodegenerativnim promenama kod pacijentkinja sa MS (Bove i sar., 2021). U prilog tome idu i podaci da su niske koncentracije anti-Milerovog hormona, markera ovarijalnih rezervi koji se smanjuje tokom perimenopauze (La Marca i Volpe, 2006), povezani sa većim stepenom gubitka sive mase i invaliditeta kod žena sa MS, nezavisno od starosti pacijentkinja (Graves i sar., 2018).

Mada se uloga hormonskih fluktuacija u patologiji MS vezuje za ženske polne hormone, neke studije podržavaju hipotezu da smanjene koncentracije androgenih hormona u različitim periodima života muškaraca, nose povećan rizik za oboljevanje od MS (Chitnis, 2018). Na primer, iako nije utvrđena korelacija između hormonskih promena u pubertetu i povećanog rizika za nastanak MS kod dečaka (Ramagopalan i sar., 2009), raniji ulazak u pubertet kod dečaka povezan je sa ranijim ispoljavanjem simptoma MS (Chitnis, 2013). Zapravo, uloga testosterona u riziku za nastanak MS proteže se sve do prenatalnog perioda – odnos između androgena i estrogena u ovom periodu niži je kod pacijenata sa MS (Bove i sar., 2015).

Simptomi MS se kod muškaraca pojavljuju kasnije nego kod žena, obično između 30. i 40. godine života, kada nivo testosterona počinje postepeno da opada (Voskuhl, 2011), implicirajući da fiziološko smanjenje koncentracije testosterona doprinosi razvoju MS (Ysrraelit i Correale, 2021). Već od 25. godine života koncentracija testosterona u krvi počinje da se smanjuje, što bi se moglo označiti kao andropauza (Ysrraelit i Correale, 2021), međutim, za razliku od menopauze koja je jasnije definisana, pre svega u pogledu hormonskih promena, andropauza podrazumeva suptilnije i sporije procese, pa je njen uticaj na razvoj MS kod muškaraca još nedovoljno jasan.

1.4.2.2. Uticaj MS na nivo polnih hormona

Literaturni podaci ukazuju da je i sam razvoj MS povezan sa promenama u koncentraciji polnih hormona u cirkulaciji.

Značajno smanjenje koncentracije estradiola kod pacijentkinja sa MS registrovano je u lutealnoj, ali ne i u folikularnoj fazi (Tomassini i sar., 2005), dok drugi istraživači nisu detektovali promene koncentracije ovog hormona ni u jednoj od pomenutih faza ciklusa (Kempe i sar., 2018). Suprotno tome, druge istraživačke grupe nisu uočile promene u koncentraciji estradiola u lutealnoj fazi, već smanjenje koncentracije ovog hormona u fazi ovulacije kod pacijentkinja sa MS (Foroughipour i sar., 2012; Guven Yorgun i Ozakbas, 2019). Takođe, snižene koncentracije estradiola su u korelaciji sa većom učestalošću relapsa kod pacijentkinja sa MS (Sepúlveda i sar., 2016).

Kod pacijentkinja sa MS, nisu uočene razlike u koncentraciji progesterona u poređenju sa zdravim ženama (Foroughipour i sar., 2012; Guven Yorgun i Ozakbas, 2019; Kempe i sar., 2018; Tomassini i sar., 2005). Sa druge strane, kod muškaraca sa MS, koncentracija progesterona značajno je povećana (Caruso i sar., 2014).

Odnos između koncentracije progesterona i estradiola takođe može biti povezan sa aktivnošću bolesti kod pacijentkinja sa MS. Međutim, u literaturi se nailazi na slučajeve koji su u međusobnoj

suprotnosti: visok estradiol uz nizak progesteron je povezan sa većom aktivnošću MS (Bansil i sar., 1999), ali je veća aktivnost bolesti korelirana i sa većim nivoima progesterona u odnosu na estradiol u lutealnoj fazi ciklusa pacijentkinja sa MS (Pozzilli i sar., 1999).

Neki literaturni podaci ukazuju da se koncentracija testosterona kod pacijenata sa MS ne menja (Tomassini i sar., 2005; Wei i Lightman, 1997). Međutim, u više istraživanja pokazano je da je koncentracija testosterona u cirkulaciji značajno smanjena (D'Amico i sar., 2020; Foster i sar., 2003; Safarinejad, 2008), što je u korelaciji i sa većim stepenom invaliditeta kod muškaraca sa MS (Bove i sar., 2014). Važno je istaći da su u nekoliko studija u kojima je izmeren nizak testosteron kod pacijenata sa MS, nivoi LH bili ili u normalnom opsegu ili takođe smanjeni (Bove i sar., 2014; Foster i sar., 2003; Safarinejad, 2008). Takođe, niži nivoi testosterona u odnosu na fiziološke izmereni su i kod žena obolelih od MS (Kempe i sar., 2018; Tomassini i sar., 2005).

1.4.2.3. Primena polnih hormona u terapiji MS

S obzirom na to da do promena u prevalenciji, toku i simptomima MS dolazi u periodima fizioloških fluktuacija cirkulišućih koncentracija polnih hormona, ispitivani su efekti egzogene primene polnih hormona i njihovih derivata na patologiju ove bolesti.

Visoke doze estriola kod pacijentkinja sa MS dovode do smanjenja IFN- γ u nestimulisanim monocitima izolovanim iz krvi (Sicotte i sar., 2002). Smanjenje nivoa proinflamatornih i povećanje nivoa antiinflamatornih citokina nakon primene estriola je potvrđeno i na stimulisanim monocitima (Soldan i sar., 2003). Ovi rezultati su korelirani i sa smanjenjem veličine lezija uočenim na magnetnoj rezonanci. Efekti estriola u ovim studijama bili su izraženiji kod pacijentkinja sa RRMS, u odnosu na SPMS (Sicotte i sar., 2002; Soldan i sar., 2003). Kod žena sa RRMS, estriol dovodi do smanjene učestalosti relapsa i poboljšanja kognitivnih funkcija (Voskuhl i sar., 2016), što je potvrđeno i kroz smanjenje atrofije u sivoj masi (MacKenzie-Graham i sar., 2018). Primena etinil-estradiola kroz oralne kontraceptive, pokazala je pozitivne, dozno-zavisne, efekte kod pacijentkinja sa MS u pogledu smanjenja veličine aktivnih inflamatornih lezija i poboljšanja kognitivnih funkcija (De Giglio i sar., 2017; Pozzilli i sar., 2015).

Primena derivata progesterona kod pacijenata sa MS pokušana je, u kombinaciji sa estradiolom, u cilju sprečavanja relapsa tokom *postpartum* perioda, ali je ova studija obustavljena zbog nedovoljnog odziva pacijentkinja (Vukusic i sar., 2009).

Svakodnevna primena gela sa 100 mg testosterona tokom godinu dana kod 10 pacijenata sa RRMS dovela je do poboljšanja kognitivnih sposobnosti i značajnog smanjenja stepena atrofije mozga, iako nije uočena promena u broju i veličini inflamatornih lezija (Sicotte i sar., 2007). Pacijenti iz iste studije praćeni su i šest meseci nakon prestanka terapije, i na magnetnoj rezonanci je uočeno da je stepen gubitka sive mase posle terapije testosteronom bio značajno smanjen u odnosu na početak studije (Kurth i sar., 2014). Testosteron primenjen na isti način doveo je do smanjenja broja CD4⁺ T-limfocita, a uvećanja populacije NK ćelija, kao i smanjenja nivoa proinflamatornog citokina IL-2 i povećanja nivoa različitih faktora rasta u monocitima izolovanim iz krvi (Gold i sar., 2008). Primena testosterona i njegovih derivata kao terapeutika za MS je i dalje aktuelna – klinička studija u kojoj se ispituju neuroprotektivni i remijelinizujući efekti testosteron-undekanoata kod pacijenata sa RRMS još regrutuje ispitanike (Metzger-Peter i sar., 2020; NCT03910738).

1.4.3. Polne specifičnosti u incidenciji i toku EAE-a

Veća incidencija kod ženki je pokazana i u brojnim životinjskim modelima autoimunskih bolesti, uključujući i EAE. Polne specifičnosti u incidenciji EAE-a kod miševa karakteristične su za soj. Nakon aktivne indukcije EAE-a, kod ženki SJL i NZW sojeva miševa utvrđena je značajno veća incidencija u odnosu na mužjake, dok kod B10.PL, PL/J i C57BL6 sojeva nisu uočene razlike između polova (Papenfuss i sar., 2004). Pasivno indukovani EAE u miševima SJL/J soja je intenzivniji ukoliko su antigen-specifične ćelije poreklom iz prethodno imunizovanih ženki, u odnosu na mužjake (Bebo, Schuster, i sar., 1998; Bebo i sar., 1999), a u ovom slučaju i izbor antigena može uticati na razlike između polova (Massilamany i sar., 2011). Pacovi DA soja imaju veću incidenciju EAE-a kod ženki (Nacka-Aleksić i sar., 2015; Stojić-Vukanić i sar., 2018).

U modelu EAE-a su, osim u incidenciji, uočene i polne razlike u progresiji i manifestaciji bolesti – kod miševa dobijenih nakon ukrštanja dva soja različite osetljivosti na indukciju EAE-a, kod ženki je simptomatska faza trajala duže, sa većom kumulativnom težinom bolesti, dok je kod mužjaka registrovana veća maksimalna ocena na vrhuncu EAE-a i veći stepen gubitka telesne mase (Fillmore i sar., 2004). Zanimljivo, uočen je veći stepen demijelinizacije u KM kod ženki miševa u odnosu na mužjake, mada nisu utvrđene razlike u kliničkoj manifestaciji bolesti (Wiedrick i sar., 2021). Ženke Luis soja pacova podložnije su relapsima, dok se mužjaci potpuno oporavljaju posle akutne faze EAE-a (Keith, 1978b).

1.4.4. Polni hormoni i EAE

1.4.4.1. Uticaj nivoa polnih hormona na tok EAE-a

Na važnost polnih hormona za patogenezu EAE-a, pre svega, ukazuju razlike u progresiji ove bolesti uočene kod životinja različitog gonadalnog statusa. Na primer, kod kastriranih mužjaka SJL/J miševa utvrđena je pojava relapsa za razliku od lažno operisanih mužjaka, koji pokazuju monofazni tok bolesti, kako u slučaju aktivno indukovanih EAE-a (Bebo, Zelinka-Vincent, i sar., 1998), tako i u pasivnom modelu ove bolesti (Palaszynski, Loo, i sar., 2004). Suprotno tome, kod miševa C57BL/6 soja miševa nije registrovana razlika između kastriranih i lažno operisanih mužjaka, što bi moglo značiti da je uticaj gonadalnog statusa na tok EAE-a takođe specifičan za soj (Palaszynski, Loo, i sar., 2004). Ovaj fenomen je pokazan i kod ženki – ovarijektomija je kod miševa B10.RIII soja dovela do ranije pojave simptoma (Jansson i sar., 1994), dok je kod hibrida SJL/J × B10.S soja povezana sa kraćim trajanjem bolesti i većim kliničkim skorom (Fillmore i sar., 2004). Uloga gonadalnog statusa u progresiji EAE-a takođe zavisi od soja i kod pacova: kod kastriranih mužjaka Luis pacova nisu utvrđene promene u pogledu incidencije i simptoma EAE-a (Trooster i sar., 1996), dok je kod Vistar soja kastracija dovela do dužeg trajanja bolesti (Macció i sar., 2005).

Kao i u MS, fiziološke fluktuacije u koncentracijama polnih hormona imaju ulogu u razvoju EAE-a. Početak puberteta nosi veći rizik i za nastanak EAE-a kod glodara – registrovana je značajno manja incidencija bolesti kod ženki miševa koje su ovarijektomijom sprečene da uđu u pubertet (Ahn i sar., 2015). Analogno najizraženijim protektivnim efektima u trećem trimestru trudnoće kod žena sa MS, kod ženki miševa sa EAE-om značajno je smanjen broj relapsa u drugoj polovini gestacije, dok je u *postpartum* periodu aktivnost bolesti ponovo povećana (Langer-Gould i sar., 2002). Dodatno, nakon imunizacije već skotnih ženki miševa tokom druge/treće nedelje gestacije dolazi do smanjenja incidencije EAE-a, manjeg broja relapsa i kasnije pojave simptoma, dok je imunizacija u *postpartum* periodu povezana sa pogoršanjem relapsa (Langer-Gould i sar., 2002; McClain i sar., 2007). Kod pacova, imunizacija čak i tokom rane faze gestacije rezultuje smanjenom kumulativnom težinom bolesti i maksimalnom ocenom simptoma (Harness i McCombe, 2001),

odnosno odlaganjem pojave simptoma EAE-a ili čak njihovim potpunim odsustvom (Keith, 1978a). Međutim, u jednoj od studija, značajnije poboljšanje kliničkih parametara EAE-a uočeno je prilikom imunizacije u trećoj nedelji, u odnosu na prve dve nedelje gestacije (Mertin i Rumjanek, 1985). Prilikom imunizacije skotnih ženki, neki od mehanizama zaštite od EAE-a predstavljaju smanjenje proliferacije imunskih ćelija (Gatson i sar., 2011; Langer-Gould i sar., 2002) kao i povećanje produkcije antiinflamatornih, a smanjenje produkcije proinflamatornih citokina (McClain i sar., 2007). Osim toga, vezivanjem progesterona za glukokortikoidni receptor na T-limfocitima, njihova diferencijacija se usmerava prema fenotipu regulatornih T-ćelija, što bi takođe moglo doprinosti protektivnom dejstvu gestacije (Engler i sar., 2017).

1.4.4.2. Terapijski potencijal polnih hormona u EAE modelu

Zbog uticaja gonadalnog statusa na tok EAE-a, u mnogim studijama su kao terapeutici korišćeni polni hormoni. Na primer, pretretman estradiolom dovodi do smanjenja incidencije EAE-a, kasnije pojave simptoma i manje ukupne težine bolesti kod miševa oba pola, a adoptivni transfer encefalitogenih T-limfocita izolovanih iz ovako pretretiranih donora značajno je manje uspešan u izazivanju EAE-a (Bebo i sar., 2001). Slično, primena etinil estradiola odlaže početak EAE-a i smanjuje težinu simptoma, uz smanjenje infiltracije imunskih ćelija u tkivo CNS-a (Subramanian i sar., 2003). Pokazani protektivni efekti estradiola i njegovih derivata verovatno su ostvareni kroz smanjenje nivoa proinflamatornih citokina karakterističnih za Th1 limfocite, ali bez povećanja nivoa antiinflamatornih citokina (Ito i sar., 2001; Matejuk i sar., 2001). Zanimljivo je da se ovo imunomodulatorno dejstvo estradiola u EAE-u najverovatnije odvija preko ER α (Polanczyk i sar., 2003; Tiwari-Woodruff i sar., 2007), dok su oba estrogenska receptora uključena u neuroprotektivne efekte estrogena (Tiwari-Woodruff i sar., 2007).

Pretretman estriolom ublažava simptome EAE-a i/ili dovodi do njihove kasnije pojave kod mužjaka miševa različitih sojeva (Bebo i sar., 2001; Palaszynski, Liu, i sar., 2004). Kod ženki miševa C57BL/6 soja, pretretman estriolom čak u potpunosti obustavlja razvoj bolesti (Palaszynski, Liu, i sar., 2004). Prema podacima iz literature, prethodni gonadalni status ženki ne utiče bitno na efekte estriola, pošto i na ovarijektomisanim ženkama ovaj tretman dovodi do odlaganja pojave simptoma za čak 25 dana (Jansson i sar., 1994), kao i do značajno blažih simptoma i gotovo potpunog odsustva demijelinizacionih i inflamatornih lezija (Kim i sar., 1999).

Protektivni efekti progesterona uočeni u EAE-u mogli bi biti posledica smanjenja nivoa proinflamatornih citokina (Giatti i sar., 2012; Yates i sar., 2010). Međutim, protektivno dejstvo ovog hormona se ogleda i u sprečavanju oštećenja aksona (Garay i sar., 2009), kao i kroz direktno delovanje na oligodendrocite i pospešivanje remijelinizacije (El-Etr i sar., 2015; Ibanez i sar., 2004). Pretretman progesteronom dovodi do poboljšanja kliničkih parametara EAE-a, uz smanjenje stepena infiltracije imunskih ćelija i demijelinizacije u KM ženki miševa (Garay i sar., 2007), a još izraženije poboljšanje utvrđeno je u ispitivanju delovanja kombinacije progesterona i estradiola (Garay i sar., 2010). Suprotno, tretman progesteronom na ovarijektomisanim ženkama pacova doveo je do povećanja infiltracije imunskih ćelija u KM (Hoffman i sar., 2001), što ukazuje na to da je za efekte progesterona u EAE modelu važan i gonadalni status ženki.

Tretmani androgenim hormonima u animalnim modelima MS imaju imunomodulatorne, neuroprotektivne i promijelinizujuće efekte (Collongues i sar., 2018). Imunomodulatorno dejstvo androgena ostvareno je kroz smanjenje produkcije proinflamatornih i povećanje produkcije antiinflamatornih citokina u ćelijama imunskog sistema, kako nakon tretmana *in vitro* (Bebo i sar., 2001), tako i posle tretmana *in vivo* (Dalal i sar., 1997; Liva i Voskuhl, 2001). Kada se encefalitogeni

T-limfociti tretirani androgenima upotrebe za pasivnu indukciju EAE-a, dovode do slabije bolesti (Bebo i sar., 1999). Oralna primena testosterona kod mužjaka pacova Vistar soja, dovodi do smanjene incidencije EAE-a, a kod kastriranih životinja smanjuje negativne efekte kastracije na trajanje simptoma (Macció i sar., 2005). Osim efekta na produkciju citokina, tretman DHT-om smanjuje i ekspresiju markera neuroinflamacije u KM, ublažavajući simptome bolesti, što je pokazano na modelu hroničnog EAE-a kod DA pacova (Giatti i sar., 2015). Pored ovoga, pokazano je da tretman ovim hormonom dovodi do poboljšanja sinaptičke transmisije i očuvanja funkcionalnosti hipokampusa kod miševa sa EAE-om (Ziehn i sar., 2012). U kuprizonskom modelu demijelinizacije pokazano je da testosteron i estradiol imaju promijelinizujuće efekte, ali ne i DHT, što bi moglo da znači da testosteron u ovom slučaju deluje preko ER, nakon konverzije u estradiol (Patel i sar., 2013). Međutim, utvrđeno je i da se na mestu demijelinizacije lezije u KM, uzrokovane lizolecitinom kod miševa, testosteron vezuje za AR ekspresiran na astrocitima, aktivira ih i regrutuje oligodendrocite, dovodeći do remijelinizacije (Bielecki i sar., 2016). Funkcionalan AR u žuljevitom telu je neophodan da bi se ostvarilo promijelinizujuće dejstvo testosterona, ali i njegovih derivata koji se ne mogu aromatizovati (Hussain i sar., 2013).

1.4.4.3. Uticaj EAE-a na HPG osu

Smanjena koncentracij progesterona ustanovljena je u akutnom (Giatti i sar., 2010) i hroničnom modelu EAE-a ženki pacova (Caruso i sar., 2010), dok je koncentracija estradiola nepromenjena kod ženki miševa sa pasivno indukovanim EAE-om (Foster i sar., 2003).

Značajno smanjena koncentracija testosterona izmerena je kod pacova tokom simptomatske faze EAE-a, nakon aktivne indukcije bolesti (Macció i sar., 2004), kao i kod miševa nakon pasivne indukcije EAE-a (Foster i sar., 2003). Foster i saradnici (2003) su takođe uočili da je, za razliku od pacijenata sa MS, kod miševa sa smanjenim nivoom testosterona tokom EAE-a, nivo LH povišen.

Različite promene u dinamici estrusnog ciklusa registrovane su u modelima MS na miševima i pacovima (Jaini i sar., 2015; Rahn i sar., 2014; Taylor i sar., 2010). Naša prethodna istraživanja pokazala su da kod ženki DA pacova dolazi do zastoja u estrusnom ciklusu, kao i do smanjenja ekspresije *Kiss1* u preoptičkoj oblasti i u posteriornom hipotalamusu tokom simptomatske faze bolesti (Milošević, 2016).

Uprkos pomenutim rezultatima, veoma mali broj istraživanja se sistematski bavio promenama funkcionalnosti HPG ose u kontekstu EAE-a, pa je time ostavljen prostor za dalja istraživanja.

II Ciljevi

Imajući u vidu da se patologija MS odlikuje brojnim polnim specifičnostima, te da se uloga HPG ose u tim polnim razlikama može detaljno sagledati jedino korišćenjem animalnih modela, opšti cilj ove teze je ispitivanje promena koje se dešavaju na nivou hipotalamusa, hipofize i gonada tokom razvoja EAE-a kod mužjaka i ženki DA pacova. Ovaj opšti cilj biće postignut kroz realizaciju sledećih specifičnih ciljeva:

1. Ispitati profil genske ekspresije glavnih medijatora inflamacije i neuropeptida koji učestvuju u regulaciji HPG ose u tkivu hipotalamusa u različitim fazama bolesti.
2. Utvrditi status gonadotropa hipofize, utvrđivanjem vremenskog profila ekspresije gena specifičnih za gonadotrope i koncentracije LH u serumu.
3. Analizirati koncentracije polnih hormona u serumu i ekstraktima gonada tokom razvoja bolesti.
4. Utvrditi dinamiku estrusnog ciklusa ženki pacova kao i status gonada kroz analizu tkiva ovarijuma i testisa tokom razvoja bolesti, kao i analize ekspresije gena i nivoa proteina komponenata steroidogene mašinerije.
5. Ispitati funkcionalnost pojedinačnih komponenata HPG ose na vrhuncu bolesti, primenom adekvatnih tretmana *in vivo*.

III Materijal i metode

3. 1. Materijal

3.1.1. Hemikalije

Tabela 3.1. Lista hemikalija sa proizvođačima

Naziv	Proizvođač
Dulbekov modifikovani Iglov medijum (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> , DMEM), <i>UltraPure</i> voda (upH ₂ O)	Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD
Koktel inhibitora proteaza i fosfataza BCA komplet za određivanje koncentracije proteina, <i>MemCode™ Reversible Protein Stain</i> komplet za bojenje proteina	Pierce, ThermoFisher Scientific, SAD
Proteinski standard (<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i> , 10-180 kDa)	ThermoFisher Scientific, SAD
SYBR zeleno smeša (<i>Power SYBR™ Green PCR Master Mix</i>), Taqman smeša (<i>TaqMan™ Universal PCR Master Mix</i>), TRIzol	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD
Komplet za sintezu cDNK (<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription kit</i>), <i>RNAlater®</i>	Applied Biosystems, SAD
Komplet za izolaciju iRNK (<i>RNeasy MiniSpin</i>)	Qiagen, Nemačka
albumin iz seruma govečeta (engl. <i>bovine serum albumin</i> , BSA), paraformaldehid (PFA), DPX medijum za pokrivanje, etilen diamin-tetrasirćetna kiselina (engl. <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> , EDTA), etilen glikol-tetrasirćetna kiselina (engl. <i>ethyleneglycol tetraacetic acid</i> , EGTA), Mowiol, Tris, Triton X-100, Glicerol, Glicin Akrilamid/bisakrilamid 29:1; NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , NaOH, dietilpirokarbonat (engl. <i>diethylpirocarbonate</i> , DEPC), natrijum dodecil-sulfat (engl. <i>sodium-dodecylsulphate</i> , SDS), β-merkaptioetanol, Tween-20, NP-40, amonijum-persulfat (APS), tetrametileten-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, SAD
2x Lemli pufer, 4x Lemli pufer	BioRad Laboratories, SAD
Etanol, hloroform, metanol, 30% H ₂ O ₂ , 37% HCl	Zorka, Srbija
Izopropanol	J.T. Baker, SAD
ELISA komplet za određivanje koncentracije testosterona (kat.br. 582701), estradiola (kat. br. 582251) i progesterona (kat.br. 582601)	Cayman Chemical Company, SAD

ELISA komplet za određivanje koncentracije kortikosterona (kat. br. ADI-900-097)	Enzo Biochem, SAD
ELISA komplet za određivanje koncentracije LH	Endocrine Technologies, SAD
Polivinilidenfluorid (PVDF) membrana	Millipore, Nemačka
3,3'-diaminobenzidin tetrahidrohlorid (DAB)	Vector Laboratories, SAD

Tabela 3.2. Sastav rastvora i pufera

Rastvori/Puferi	Sastav
Fosfatni pufer 0.2 M pH 7.4	0.2 M NaH ₂ PO ₄ 0.2 M Na ₂ HPO ₄
Fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (engl. <i>phosphate buffered saline</i> , PBS) pH 7.4	8.7 g NaCl 50 ml 0.2 M fosfatnog pufera do 1000 ml dH ₂ O
4% PFA pH 7.4	40 g PFA 500 ml dH ₂ O 500 ml 0.2 M fosfatnog pufera (1 M NaOH)
RIPA pufer pH 7.4	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% NP 40 0.1% SDS 10 mM EDTA 10 mM EGTA 0.5% Triton X-100
Gelovi za elektroforezu	<u>Gel za koncentovanje</u> 4% akrilamid/bisakrilamid (29:1) 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 10% SDS 10% APS 1% TEMED
	<u>Gel za razdvajanje</u> 10% ili 12% akrilamid/bisakrilamid (29:1) 1.5 M Tris pH 8.8 10% SDS 10% APS 1% TEMED
Pufer za elektroforezu	192 mM glicin 25 mM Tris 0.1% SDS
Pufer za transfer proteina	20% metanol

	192 mM glicin 25 mM Tris
TBST pufer	50 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 0.5% Tween
Citratni pufer pH 6.0	2,57 g natrijum-citrat-dihidrat 0,26 g monohidrat limunske kiseline do 1000 ml dH ₂ O
DEPC tretirana voda	1 ml 0.1% DEPC u 1000 ml dH ₂ O autoklavirano
Rastvor moviola	9.6 g moviola 24 ml glicerola

Tabela 3.3. Prajmeri korišćeni za qPCR

Gen	Sekvenca	NM Broj	Dužina amplikona
<i>Actb</i>	f AGATTACTGCCCTGGCTCCT r ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	>NM_031144.3	120
<i>Ccl2</i>	f TGATCCCAATGAGTCGGCTG r TGGACCCATTCTTATTGGGG	>NM_031530.1	127
<i>Cd68</i>	f TGTGTGTCTGACCTTGCTGG r AAGGATGGCAGAAGAGTGGC	>NM_001031638.1	90
<i>Cyp11a1</i>	f ACTTCCTGAGGGAGAACGGC r TCCATGTTGCCAGCTTCTC	>NM_017286.3	100
<i>Cyp17a1</i>	f GTTTCTCCCCAGACGTGGTC r GGTCCGACAAGAGGCTTTGA	>NM_012753.2	200
<i>Cyp19a1</i>	f CTCAACCTCACCACGGATGT r GGCTCTCTGGATGGATGCTC	>NM_017085.2	93
<i>Fshr</i>	f CTACACATTGACAGCCATCACCTA r GGCAAAAGTCCAGCCCAATACC	>NM_199237.1	121
<i>Gapdh</i>	f CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA r GGCATGGACTGTGGTCATGA	>NM_017008.4	118
<i>Hsd17b1</i>	f ATGAGTTGAACGCTGTGGGT r GGCACAGTACACTTCGTGGA	>NM_012851.2	167
<i>Hsd17b3</i>	f CTGCTTGTGTGCCTCGTTTG r ACTGCCATTGTCCATTGA	>NM_054007.1	116
<i>Hsd3b1/2</i>	f GACAGGAGCAGGAGGTTTGTGG r CTCCTTCTAACATTGTCACCTTGGCCT	>NM_001007719	161
<i>Il1b</i>	f CACCTCTCAAGCAGAGCACAG r GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	>NM_031512.2	79
<i>Il6</i>	f GCCCACCAGGAACGAAAGT r GGCAACTGGCTGGAAGTCTC	>NM_012589.2	86
<i>Lhcgr</i>	f TATGCTCGGAGGATGGCTCT r AGCACAGATGACGACGAAGG	>NM_012978.1	175
<i>Scarb1</i>	f GCTTCTGGTGCCATCATTAC	>NM_031541.1	162

	r AGCTTGGCTTCTTGCAGTACC		
<i>Spp1</i>	f AGACTGGCAGTGGTTTGCTT r TGTAATGCGCCTTCTCCTCT	>NM 012881.2	97
<i>Star</i>	f AGCAAGGAGAGGAAGCTATGC r GGCACCACCTTACTTAGCACT	>NM 031558.3	112
<i>Tnf</i>	f CCCCCATTACTCTGACCCCT r CCCAGAGCCACAATTCCTT	>NM 012675.3	88
<i>Vim</i>	f TTCTCTGGCACGTCTTGACC r TCATACTGCTGGCGGACATC	>NM 031140.1	109

f – sense prajmer, r – antisense prajmer

Tabela 3.4. Taqman probe korišćene za qPCR

Gen	Identifikacioni broj
<i>Actb</i>	Rn00667869_m1
<i>Cga</i>	Rn01440184_m1
<i>Fshb</i>	Rn01484594_m1
<i>Gapdh</i>	Rn01462661_g1
<i>Gnrh1</i>	Rn00562754_m1
<i>Gnrhr</i>	Rn00578981_m1
<i>Insl3</i>	Rn00586632_m1
<i>Kiss1</i>	Rn00710914_m1
<i>Lhb</i>	Rn00563443_g1
<i>Pdyn</i>	Rn00571351_m1
<i>Tac3</i>	Rn00569758_m1

Tabela 3.5. Lista primarnih i sekundarnih antitela sa proizvođačima

Antitelo	Poreklo i tip	Proizvođač i kataloški broj	Metoda i razblaženje
3 β -HSD	kunić, poliklonsko	poklon prof. I. Mejsona	1:1000 WB (testisi)
3 β -HSD	miš, monoklonsko	Santa Cruz, sc-515120	1:500 WB (jajnici)
CD68 (ED1)	miš, monoklonsko	Abcam, ab31630	1:100 IHC
CYP11A1	kunić, poliklonsko	ProteinTech, 13363-1-AP	1:2000 WB
CYP17A1	kunić, poliklonsko	ProteinTech, 14447-1-AP	1:500 IF

StAR	kunić, poliklonsko	Cell Signalling, D10H12	1:200 IHC
StAR	kunić, poliklonsko	poklon prof. D. Stokoa	1:500 WB (testisi)
StAR	kunić, poliklonsko	poklon prof. V. Selvaraja	1:500 WB (jajnici)
β -aktin	miš, monoklonsko	Sigma, A5316	1:5000 WB
protiv IgG miša, konjugovano sa HRP	magarac, poliklonsko	Santa Cruz, sc-2314	1:5000 WB
protiv IgG kunića, konjugovano sa HRP	magarac, poliklonsko	Santa Cruz, sc-2313	1:5000 WB
protiv IgG kunića, konjugovano sa HRP	koza, poliklonsko	Santa Cruz, sc-2004	IHC 1:200
protiv IgG kunića, konjugovano sa AlexaFluor™ 555	magarac, poliklonsko	Invitrogen, A-31572	IHC 1:400

IHC – imunohistohemijsko obeležavanje, IF – imunofluorescentno obeležavanje, WB – western blot

3.1.2. Životinje

Ogledi su izvedeni na životinjama muškog i ženskog pola, DA soja pacova (soja ukrštanog u srodstvu, RRID:RGD_21409748). Životinje su uzgajane u Odgajalištu eksperimentalnih životinja Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Sva ispitivanja odobrena su od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti eksperimentalnih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede republike Srbije (br. dozvole 323-07-05970/2020-05 i 323-07-01374/2021-05). Starost životinja na početku eksperimenta bila je između 9 i 12 nedelja, a prosečna telesna masa ~200 g za mužjake i ~150 g za ženke. Tokom eksperimenta, životinje su čuvane po tri - pet u kavezu, na konstantnoj temperaturi i vlažnosti vazduha, sa slobodnim pristupom vodi i hrani i pod dvanaestočasovnim svetlosnim režimom (12 h svetlo / 12 h mrak).

3. 2. Metode

3.2.1. Indukcija i evaluacija EAE-a

Životinje su pred početak svakog eksperimenta nasumično raspoređene u kaveze i podeljene u dve grupe - kontrolne i imunizovane životinje. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis je izazvan aktivnom imunizacijom - intradermalnom injekcijom 150 μ l encefalitogene emulzije u zadnju desnu šapu. Encefalitogena emulzija napravljena je na sledeći način: kičmena moždina izolovana iz zdravih DA pacova je macerirana i homogenizovana u PBS-u (1 g tkiva : 1 ml PBS-a). Tako dobijena encefalitogena emulzija pomešana je sa jednakom zapreminom CFA, koji je sadržao

1 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*. Tokom 28 dana nakon imunizacije, životinjama je merena telesna masa i posmatrani su simptomi bolesti. Simptomi EAE-a najčešće se ocenjuju pomoću skale od 0 do 5, pri čemu ocena 0 označava potpuno odsustvo simptoma dok ocena 5 označava smrt životinje (Batoulis i sar., 2011; van der Star i sar., 2012). Prema tome, u opisanim eksperimentima simptomi EAE-a su ocenjivani na sledeći način: 0 - bez promena, 1 - atonija repa, 2 - atonija repa i slabost (pareza) zadnjih ekstremiteta, 3 - paraliza zadnjih ekstremiteta, 4 – ubrzano disanje, pojava inkontinencije - moribundno stanje. Paralizovane životinje su smeštane u kaveze niske forme, kako bi se obezbedio lakši pristup vodi i hrani. Ocena 4 tokom dva dana je određena kao humana krajnja tačka, kada su životinje lišene života na human način.

Životinje su žrtvovane u tri vremenske tačke tokom eksperimenta: početak (atonija, Ea), vrhunac (paraliza, Ep) i kraj (Ek) EAE-a. Zdrave životinje su činile kontrolnu grupu (fiziološka kontrola, FK). Svaka grupa životinja u svakom pojedinačnom ogledu sadržala je $n \geq 5$ jedinki.

Analizirani parametri toka EAE-a definisani su na sledeći način:

- incidencija – aritmetička sredina broja imunizovanih životinja koje su razvile simptome bolesti u odnosu na ukupan broj imunizovanih životinja, iz pet ogleda na mužjacima i pet ogleda na ženkama;
- početak bolesti – aritmetička sredina dana kada je registrovan prvi simptom bolesti kod svake životinje;
- trajanje simptoma – aritmetička sredina broja dana tokom kojih je svaka životinja ocenjena ocenom većom od 0;
- trajanje paralize – aritmetička sredina broja dana tokom kojih je svaka životinja ocenjena ocenom 3 ili 4;
- maksimalna ocena bolesti – aritmetička sredina maksimalne ocene koju je svaka životinja dobila tokom trajanja bolesti;
- ukupna težina bolesti – aritmetička sredina zbira svih ocena koje je svaka životinja dobila tokom trajanja bolesti (površina ispod krive toka bolesti).

3.2.2. Utvrđivanje faze estrusnog ciklusa

Ženkama pacova je tokom trajanja eksperimenta svakodnevno uziman vaginalni bris između 9 h i 10 h. Vaginalni brisevi su uzorkovani neinvazivnom metodom – ispiranjem sterilnim PBS-om. Preparati su posmatrani pod mikroskopom odmah nakon uzorkovanja (Marcondes i sar., 2002). Za procenu faze estrusnog ciklusa na osnovu vaginalne citologije, korišćen je svetlosni mikroskop sa 10× uvećanjem. Ženke pacova praćene su oko dve nedelje pre imunizacije a zatim i tokom celog trajanja eksperimenta. Ženke kod kojih je pre dana imunizacije registrovan anestrus isključene su iz eksperimenta.

3.2.3. Hormonski tretmani

3.2.3.1. Kispeptin

Da bi se proverilo da li GnRH neuroni i dalje mogu da oslobađaju GnRH u odgovoru na stimulus, životinje su tretirane C-terminalnim dekaeptidom kispeptina (kispeptin-10, Kp10). Mužjaci i ženke pacova iz FK i Ep grupa ($n = 6$ /grupi) tretirani su bolus injekcijom Kp10 (20 nmol u fiziološkom rastvoru), intraperiotenalan. Nakon sat vremena, životinje su žrtvovane. I tretirane i netretirane grupe životinja (FK i Ep) žrtvovane su istovremeno.

3.2.3.2. Buserelin acetat

Sa ciljem da se proveriti sposobnost gonadotropa da odgovore na stimulus sličan GnRH i oslobode gonadotropine, FK i Ep grupama životinja oba pola ($n = 6$ /grupi) dat je agonist receptora za GnRH – buserelin acetat (BA). Svaka životinja primila je bolus injekciju (4 μ g soli BA u fiziološkom rastvoru), intraperitonealno. Životinje su žrtvovane sat vremena nakon ovog tretmana. Istovremeno su žrtvovane i grupe netretiranih životinja (FK i Ep).

3.2.3.3. Humani horionski gonadotropin

U drugom eksperimentu, radi procene funkcionalnosti gonada i njihove sposobnosti da odgovore na adekvatan stimulus, životinje su tretirane prirodnim agonistom LHR - humanim horionskim gonadotropinom (engl. *human chorionic gonadotropin*, hCG), koji se za LHR vezuje sa istim afinitetom kao LH (Dufau i Catt, 1978). Mužjacima pacova na vrhuncu bolesti, kao i njihovim kontrolnim parnjacima, hCG je injiciran u dve različite doze. U prvom slučaju pacovi su tretirani sa 10 IU hCG, supkutano. Ove životinje su žrtvovane 24 h nakon tretmana. U drugom slučaju, pacovi su tretirani sa 100 IU hCG supkutano, i životinje su žrtvovane nakon 2 h. Opisane doze hCG-a u datim vremenskim intervalima primenjene su zahvaljujući činjenici da dovode do maksimalnog oslobađanja testosterona kod adultnih pacova (Hodgson i de Kretser, 1982; Tremblay i Belanger, 1985).

3.2.4. Uzorkovanje krvi i tkiva

U svakom eksperimentu pacovi su žrtvovani u tri vremenske tačke koje su prethodno definisane simptomima EAE-a: Ea, Ep i Ek. Sve ženke iz FK, Ea i Ek grupa su žrtvovane u drugom danu diestrusa (D_2), osim ako nije drugačije naglašeno. Ženke Ep grupe su žrtvovane u produženom diestrusu (D_n , $n \geq 4$).

Životinje su žrtvovane u CO₂ komori, rastućom koncentracijom CO₂. Punkcijom leve komore srca izolovana je krv, a zatim su životinje kardijalno perfundovane hladnim fiziološkim rastvorom i dekapitovane. Odmah posle dekapitacije, tkiva i organi od interesa su izolovani, izmereni i pripremljeni za dalju manipulaciju.

Krv je ostavljena da koaguliše 20 min na sobnoj temperaturi, a zatim je centrifugirana 10 min na $3000 \times g$, radi izdvajanja seruma. Nakon centrifugiranja, supernatanti - serumi su prebačeni u čiste tubice, vorteksovani, alikvotirani i zamrznuti na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do upotrebe.

3.2.5. Izolacija intersticijalnih ćelija testisa

Izolacija intersticijalnih ćelija testisa vršena je po uzoru na prethodno opisane protokole (Anakwe i sar., 1985; Andric i sar., 2007). Nakon perfuzije, po jedan ceo testis iz svake životinje je izolovan i izmeren. Nakon uklanjanja kapsule i glavnog krvnog suda, tkivo testisa je stavljeno u tube zapremine 50 ml sa 1,5 ml DMEM-a koji je sadržao 1,5 % BSA i 1,2 mg/ml kolagenaze (tip IA, poreklom iz bakterije *Clostridium histolyticum*) na ledu. Tako pripremljeni testisi stavljeni su u oscilirajuće vodeno kupatilo podešeno na $34 \text{ }^\circ\text{C}$ i brzinu 120 rpm, na 15 min, kako bi se omogućilo dejstvo kolagenaze, odnosno razlaganje vezivnog tkiva u testisu. Enzimska reakcija je zatim prekinuta dodavanjem 10 ml hladnog DMEM-a, obogaćenog sa 0,5 % BSA, u ćelijsku suspenziju i inkubacijom na ledu tokom 5 min. Uzorci su zatim profiltrirani kroz najlonsku mrežicu promera pore 100 μ m, kako bi se uklonile seminiferne tubule. Preostala ćelijska suspenzija je centrifugirana 5 min na $150 \times g$, supernatant je odliven, a talog je resuspendovan u 0,5 % BSA u DMEM-u. Nakon još jedne serije centrifugiranja, finalni talog koji je sadržao intersticijalne ćelije resuspendovan je u 2 ml DMEM-a sa 0,1 % BSA. Ćelije su obojene tripan plavim i izbrojane na hemocitometru, nakon

čega je 35×10^6 ćelija iz svakog testisa odvojeno za izolaciju iRNK i zamrznuto na $-80\text{ }^\circ\text{C}$, dok je ostatak ćelija sakupljen i spojen u okviru svake grupe ($n \geq 5$) radi izolacije proteina.

3.2.6. Izolacija RNK

Nakon disekcije, tkiva od interesa su stavljena u rastvor *RNAlater*[®], koji ima ulogu očuvanja integriteta RNK, i zamrznuta na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ do upotrebe.

Izolacija ukupne RNK iz intersticijalnih ćelija i hipofize vršena je pomoću *RNeasy MiniSpin* kompleta za izolaciju RNK, prema uputstvu proizvođača. Ovaj komplet namenjen je izolaciji RNK dužine preko 200 nukleotida, što znači da se sa velikom pouzdanošću može tvrditi da je izolovana RNK tipa iRNK. Uzorci su najpre homogenizovani u 350 μl pufera za liziranje koji sadrži guanidintiocijanat, a zatim su tako dobijeni homogenati naneti u kolonu za uklanjanje genomske DNK i centrifugirani 1 min na $13000 \times g$, na $22\text{ }^\circ\text{C}$. Ovi uslovi centrifugiranja korišćeni su tokom celog protokola izolacije. Kolone sa izdvojenom genomskom DNK su odbačene, a eluati u kojima se nalazila RNK su zatim pomešani sa 350 μl 70% etanola u ultra-prečišćenoj vodi, bez DNaza i RNaza (upH₂O). Primenom etanola u vodenom rastvoru stvaraju se adekvatni uslovi za vezivanje RNK za membranu kolone za izolaciju RNK. Mešanje faza vršeno je laganim povlačenjem pipete nekoliko puta. Uzorci su zatim preneti u kolone za izdvajanje RNK i centrifugirani. Nakon centrifugiranja, eluati su odbačeni, a na kolone sa izdvojenom RNK sipano je 350 μl pufera sa 80% etanola i kolone su opet podvrgnute centrifugiranju. Posle odbacivanja eluata, u kolone je sipano 500 μl pufera za ispiranje i uzorci su ponovo centrifugirani. Ovaj ciklus je ponovljen još jednom, posle čega su prazne kolone centrifugirane tokom 2 min, radi sušenja. Na kraju, direktno na membranu kolone sipano je 40 μl upH₂O i RNK je još jednim ciklusom centrifugiranja eluirana sa kolona i zamrznuta na $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

RNK iz tkiva hipotalamusa, ovarijuma i testisa izolovana je TRIzol metodom. TRIzol[™] je komercijalno dostupan reagens koji sadrži guanidin-izotiocijanat i fenol. Do izolacije, tkivo je čuvano u *RNAlater*[®] rastvoru na $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Nakon odmrzavanja, tkivo je izmereno, stavljeno u tubice sa TRIzolom[™] (1 ml na 100 mg tkiva) i homogenizovano. Homogenati su ostavljeni 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim je dodat hloroform u zapreminskom odnosu 1 : 5 u odnosu na TRIzol[™], odnosno 0,2 ml hloroforma na 1 ml TRIzola[™]. Tubice su snažno vorteksovane tokom 15 s, dok smeša nije postala potpuno homogena, a zatim su uzorci centrifugirani 15 min na $4\text{ }^\circ\text{C}$ i $12000 \times g$. Nakon centrifugiranja, razdvajaju se tri faze: gornja, bezbojna, vodena faza, koja sadrži RNK; gusta međufaza bele boje; i donja, crvena, organska faza, koja sadrži DNK i proteine. Vodena faza sa RNK je pažljivo prebačena u nove tubice, i dodat joj je izopropanol (0,5 ml na 1 ml TRIzola[™]). Posle snažnog vorteksovanja, uzorci su zamrznuti na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ preko noći. Drugog dana izolacije, uzorci su odmrznuti i centrifugirani 10 min na $4\text{ }^\circ\text{C}$ pri $12000 \times g$. Na ovaj način, RNK se izdvaja u vidu belog taloga na dnu tubice. Supernatanti su odbačeni, a talozi su „oprani“ u 75% rastvoru etanola u vodi tretiranoj DEPC-om (Tabela 3.2), i vorteksovani dok se talog nije odvojio od dna tubice. Uzorci su ponovo centrifugirani, 15 min na $7500 \times g$, na $4\text{ }^\circ\text{C}$; supernatanti su odbačeni a tubice su ostavljene otvorene 5 min, da bi se talozi sa RNK dodatno osušili. Zatim je RNK rastvorena u upH₂O (50-100 μl po uzorku, zavisno od polazne mase tkiva). Uzorci su rastvarani na ledu, laganim provlačenjem kroz pipetu sve dok se RNK nije potpuno rastvorila i zatim zamrznuti na $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.7. Reverzna transkripcija

Komplementarna DNK (cDNK), potrebna za analizu ekspresije gena, dobija se od iRNK procesom reverzne transkripcije. Pred reakciju reverzne transkripcije, uzorci su odmrznuti na ledu i vorteksovani a zatim je određena koncentracija RNK svakog uzorka. Određivanje koncentracije RNK vršeno je na *Nanophotometer N60* spektrofotometru (IMPLEN, Nemačka),

merjenjem apsorbancije uzorka pri interakciji sa svetlosnim snopom talasne dužine 260 nm (A_{260}). Kao blank korišćena je upH₂O u kojoj su uzorci rastvoreni. Kvalitet RNK, odnosno stepen kontaminacije uzorka drugim organskim i makromolekulima, određivan je putem odnosa apsorbancija merenim na talasnim dužinama 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}), i talasnim dužinama 260 i 230 nm (A_{260}/A_{230}).

Za reverznu transkripciju korišćena je zapremina uzorka koja je sadržala 1 µg RNK. Reakcija reverzne transkripcije izvođena je u ukupnoj zapremini od 20 µl, od čega je 10 µl činio uzorak RNK razblažen odgovarajućom zapreminom upH₂O, a 10 µl je činila reakciona smeša sledećeg sastava: 0,8 µl smeše 25× dezoksiribonukleotida (dNTP, 100 mM), 1 µl enzima MultiScribe™ reverzna transkriptaza, 2 µl pufera za reverznu transkripciju, 2 µl nasumičnih prajmera, 4,2 µl upH₂O. Svi sastojci reakcione smeše, osim upH₂O, dobijeni su u kompletu za reverznu transkripciju. Reakciona smeša je podvrgnuta sledećim temperaturnim uslovima: elongacija prajmera na 25 °C tokom 10 min, polimerizacija cDNK na 37 °C tokom 2 h, prekidanje aktivnosti reverzne transkriptaze podizanjem temperature na 85 °C tokom 5 min. Dobijeni uzorci cDNK razblaženi su 10× sa upH₂O i zamrznuti na -20 °C.

3.2.8. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

Ekspresija gena određena je lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, qPCR). Ova metoda zasniva se na merenju fluorescentnog signala koji potiče od fluorofore vezane za DNK sekvencu od interesa koja se amplifikuje. Zavisno od mehanizma delovanja fluorescentnog obeleživača, razlikuje se nekoliko metodoloških pristupa qPCR-u. U ovim eksperimentima, korišćene su SYBR®Green i Taqman tehnologija. Za specifično umnožavanje DNK sekvence od interesa, koriste se parovi prajmera, u slučaju SYBR®green tehnologije, ili parovi prajmera i obeležena oligonukleotidna proba, u slučaju Taqman tehnologije. Prajmeri i probe korišćeni u ovim eksperimentima dati su u Tabelama 3.3 i 3.4. Kao matrica za amplifikaciju gena od interesa korišćena je prethodno sintetisana cDNK.

Metoda qPCR vršena je na aparatu *QuantStudio™ 3 Real-time PCR System* (Applied Biosystems, SAD) u sterilnim pločama sa 96 bunarića. Zapremina reakcione smeše u svakom bunariću bila je 10 µl, a činilo ju je, u slučaju SYBR®Green metode: 5 µl Power SYBR®Green master smeše, 0,5 µl *forward* (za *sense*, 5' → 3' lanac DNK) prajmera, 0,5 µl *reverse* (za *antisense*, 3' → 5' lanac DNK) prajmera, 2 µl upH₂O i 2 µl uzorka cDNK; a u slučaju Taqman metode: 5 µl Taqman master smeše, 0,5 µl probe, 2,5 µl upH₂O i 2 µl uzorka cDNK. Ploča je izlagana sledećim temperaturnim uslovima: inicijalna inkubacija 2 min na 50 °C, aktivacija Taq polimeraze („*hot start*“) 10 min na 95 °C, a zatim 40 ciklusa od kojih je svaki obuhvatao sledeće korake: 15 s na 95 °C radi denaturacije dvolančane DNK, 1 min na 60 °C, kada se dešava vezivanje prajmera/probe za matricu, elongacija DNK lanca i očitavanje fluorescentnog signala. Za metodologiju koja koristi fluorescentnu boju SYBR®Green, nakon kompletiranih 40 ciklusa, urađen je finalni korak radi analize krive topljenja, koji su činile inkubacije od 15 s na 95 °C a zatim 1 min na 60 °C. Analiza krive topljenja omogućava proveru kvaliteta qPCR reakcije i postojanje potencijalnih prajmer-dimera. Ukoliko je kriva topljenja imala dva ili više pikova, takvi prajmeri su izbačeni iz dalje upotrebe i dizajnirani su novi.

Analiza završene qPCR reakcije rađena je u *QuantStudio™ Design and Analysis* softveru (Applied Biosystems, SAD). Za kvantifikaciju ekspresije gena od interesa korišćena je 2^{-ΔCt} metoda. Ct predstavlja ciklus (C) u kojem količina detektovane fluorescence produkta qPCR reakcije prelazi zadati prag (engl. *threshold*, t). Ova vrednost je obrnuto proporcionalna količini amplifikovane sekvence. ΔCt predstavlja razliku između Ct vrednosti gena od interesa i Ct vrednosti gena koji

predstavlja internu kontrolu ($\Delta Ct = Ct_{gi} - Ct_{ik}$). Kao interne kontrole korišćeni su geni eksprimirani nezavisno od fizioloških i patofizioloških uslova, gliceraldehid-3 fosfat dehidrogenaza (*Gapdh*), enzim koji učestvuje u glikolizi, i β -aktin (*Actb*), komponenta citoskeleta. Jedna od ove dve kontrole odabrana je zavisno od stabilnosti njene ekspresije u svakom analiziranom tkivu. Metoda qPCR rađena je u tehničkom duplikatu za svaki uzorak, iz $n \geq 2$ eksperimenata, sa $n \geq 5$ životinja po grupi u svakom eksperimentu, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije gena od interesa za svaku grupu životinja \pm standardna greška (engl. *standard error of mean*, SEM).

3.2.9. Izolacija proteina

Ukupan sadržaj proteina iz tkiva ili izolovanih intersticijalnih ćelija izolovan je pomoću RIPA pufera (Tabela 3.2). U svakoj grupi (FK, Ea, Ep, Ek), pojedinačni uzorci ($n \geq 5$ životinja po grupi) su spojeni i izmereni. U RIPA pufer je neposredno pred upotrebu dodat koktel inhibitora proteaza i fosfataza (Tabela 3.1; jedna tableta na 10 ml pufera). Tkivo je homogenizovano na ledu u RIPA puferu koji je odmeren u 10 puta većoj zapremini u odnosu na ukupnu masu tkiva za svaku grupu. Uzorci su potom sonifikovani u dve serije po 5 s, sa 5 s pauze između serija, i centrifugirani tokom 30 min, na 4 °C, pri brzini od $14000 \times g$. Nakon centrifugiranja, u supernatantu se nalaze proteini, dok se u talogu nalaze ćelijski ostaci. Supernatanti su pažljivo preneti u čiste tubice, vorteksovani, alikvotirani i zamrznuti na -80 °C.

3.2.10. Merenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima merena je pomoću komercijalno dostupnog *Micro BCA Protein Assay* kompleta (Tabela 3.1). Princip ove kolorimetrijske metode počiva na promeni boje rastvora od zelene ka ljubičastoj, u zavisnosti od prisustva i količine proteina u rastvoru. U visoko baznoj sredini i na povišenoj temperaturi (37 °C), peptidne veze u proteinima redukuju Cu^{2+} do Cu^+ , koji zatim sa dva molekula bicinhoninske kiseline (engl. *bicinchoninic acid*, BCA) formira kompleks ljubičaste boje. Ova metoda rađena je u pločama sa 96 bunarića, a u svaki bunarić sipano je 125 μ l trokomponentne boje dostupne u kompletu i 125 μ l uzorka (razblaženog 125 \times), odnosno 125 μ l serijskog razblaženja BSA. Serijska razblaženja BSA poznate koncentracije služila su za formiranje standardne krive, na osnovu koje je izračunata koncentracija proteina u bunariću. Nakon inkubacije na 37 °C tokom 2 h, apsorbancija je merena na *Synergy H1* spektrofotometru (Agilent, SAD), na talasnoj dužini od 562 nm.

3.2.11. Elektroforetsko razdvajanje proteina i vestern blot

Kvantifikacija proteina od interesa u različitim tkivima pacova sa EAE-om vršena je vestern blot (engl. *western blot*) metodom. Ovoj metodi prethodi elektroforetsko razdvajanje negativno naelektrisanih proteina na osnovu veličine, odnosno molekulske mase. Nakon toga, vestern blot podrazumeva prenos proteina na membranu, inkubaciju membrane sa antitelom specifičnim za ciljni protein i hemiluminiscentnu vizuelizaciju vezanog antitela.

Uzorci proteina svedeni su na jednake koncentracije i pomešani sa Lemli puferom (Tabela 3.1) za nalivanje, sa 3% β -merkaptetanola. Koncentracije proteina u uzorku i željene količine za nalivanje u bunariće, odredile su da li je korišćen 2 \times ili 4 \times Lemli pufer. Uzorci sa Lemli puferom su denaturisani na temperaturi od 95 °C tokom 5 min i na taj način adekvatno pripremljeni za naredni korak razdvajanja elektroforezom na poliakrilamidnom gelu sa SDS-om. U zavisnosti od molekulske težine proteina od interesa, pravljani su gelovi za razdvajanje različite koncentracije poliakrilamida (10 ili 12 %), dok je gel za koncentrovanje uvek imao 4% poliakrilamida. Sastav gelova prikazan je u Tabeli 3.2. Komercijalno dostupna smeša obojenih proteina poznate molekulske mase (Page Ruler, Tabela 3.1) je nalivena na svaki gel kao kontrola veličine razdvojenih proteina. Elektroforeza se odvijala u puferu za elektroforezu (Tabela 3.2), na konstantnom naponu

(80 V u fazi koncentrovanja uzoraka i 120 V u fazi razdvajanja proteina) i na sobnoj temperaturi. Nakon toga, proteini su preneti na PVDF membranu, veličine pora 0,45 μm , prethodno aktiviranu inkubacijom u sledećoj seriji hemikalija: metanol 20 s, voda 2 min, pufer za transfer najmanje 30 min. Transfer proteina na PVDF membranu događao se u komori za vlažni transfer pod konstantnim naponom (100 V) tokom 1 h, u ohlađenom puferu za transfer (Tabela 3.2).

Posle završenog prenosa proteina, za analizu određenih proteina, membrane su obojene pomoću *MemCode™ Reversible Protein Stain* kompleta za vizuelizaciju ukupnih proteina (Tabela 3.1), prema uputstvu proizvođača. Nakon slikanja i ispiranja membrana u ddH₂O, prevencija nespecifičnih interakcija proteina sa antitelom izvršena je inkubacijom membrana u 5 % razblaženju BSA u TBST puferu (Tabela 3.2) ili 5 % razblaženju mleka (Blotto, Tabela 3.1) u TBST-u. Blokiranje nespecifičnih interakcija odvijalo se na sobnoj temperaturi tokom 1h, nakon čega je membrana inkubirana sa primarnim antitelom (Tabela 3.5), preko noći na 4 °C. Nakon ispiranja u TBST-u, 3 x 10 min, membrana je inkubirana sa sekundarnim antitelom (Tabela 3.5), konjugovanim sa peroksidazom rena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Proteinske trake od interesa vizuelizovane su zahvaljujući principu hemiluminiscencije – svojstvu luminola da, u prisustvu vodonik peroksida, biva oksidovan od strane HRP i da u tom, ekscitovanom, stanju emituje fotone svetlosti. Membrane su inkubirane sa rastvorom luminola (Tabela 3.2) sa 0,009 % H₂O₂ i slikane pomoću iBright CL1500 Imaging System aparata za vizuelizaciju membrana (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Kvantifikacija ciljnih proteina vršena je merenjem optičke gustine (engl. *optical density*, OD) vizualizovanih traka, korišćenjem ImageJ softvera. Za svaki uzorak, pored proteina od interesa, kvantifikovana je i OD interne kontrole - β -aktina ili totalnih proteina, obojenih i vizuelizovanih pre koraka blokiranja. Bojenje totalnih proteina korišćeno je u slučaju kada je protein od interesa bio iste ili veoma slične molekulske mase kao β -aktin, te je bilo nemoguće pravilno uraditi kvantifikaciju. Relativna OD za svaki uzorak kvantifikovana je kao količnik OD proteina od interesa i OD interne kontrole. Tako dobijene relativne OD normalizovane su prema FK grupi životinja, koja je prikazana kao 100% \pm SEM, dok su relativne OD ostalih grupa prikazane kao povećanje odnosno smanjenje u odnosu na FK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM iz najmanje tri western blota, iz barem dva EAE eksperimenta.

3.2.12. Ekstrakcija steroida iz tkiva

Nakon perfuzije, polovina dekapuliranog testisa iz svakog mužjaka, po jedan ceo ovarijum odvojen od ovidukta iz svake ženke, kao i po jedna dekapulirana nadbubrežna žlezda iz pacova oba pola, trenutno su zamrznuti u tečnom azotu i sačuvani na -80 °C do ekstrakcije ukupnih steroida. Nakon odmrzavanja, tkivo je izmereno, stavljeno u PBS ($m_{\text{tkiva}} : V_{\text{PBS}} = 1 : 5$) i homogenizovano, a zatim sonifikovano tokom 5 s. Radi potpunog razbijanja ćelijskih organela, homogenati tkiva su podvrgnuti zamrzavanju i odmrzavanju u tri serije. Zamrzavanje je vršeno u tečnom azotu. Nakon trećeg odmrzavanja, homogenat je prenet u staklene epruvete i dodato mu je četiri puta više etra u odnosu na zapreminu homogenata. Nakon vorteksovanja, epruvete su potopljene u tečni azot na 10 s. Tokom ovog postupka, donji, vodeni, sloj se zaledi dok u gornjem sloju ostaje nezamrznuti etar sa rastvorenim steroidima. Etar je prenet u čiste epruvete. Ostatak homogenata je ostavljen da se odmrzne pa mu je ponovo dodat etar ($V_{\text{homogenata}} : V_{\text{etra}} = 1 : 3$) i ova procedura je ponovljena u još dve serije. Prikupljeni etar je ostavljen da upari, a steroidi koji su nakon uparavanja ostali u epruveti u vidu praha rastvoreni su u 0,2% rastvoru EDTA u PBS-u.

3.2.13. Enzimski imunotest

Enzimski imunotest (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) jeste rutinski upotrebljavana metoda za kvantifikaciju hormona u serumu ili izolatima tkiva. Princip ELISA metode zasniva se na interakciji antigen-antitelo, između površine bunarića na mikrotitarskoj ploči, koja je obložena antitelom, i uzorka (najčešće seruma) koji sadrži specifičan antigen od interesa. Kompleks antigen-antitelo predstavlja supstrat za enzim, tako da se formira obojeni proizvod enzimske reakcije koji se može kolorimetrijski detektovati i kvantifikovati na osnovu standardne krive.

Ova metoda je korišćena za merenje koncentracija hormona u serumu pacova sa EAE-om, kao i u rastvorima steroida ekstrahovanih iz gonada i nadbubrežnih žlezda. Merene su koncentracije LH, testosterona, estradiola, progesterona i kortikosterona. Za ove ELISA eseje korišćeni su komercijalno dostupni kompleti za ELISA metodu, nabavljeni od nekoliko proizvođača (Tabela 3.1), i njihova uputstva su detaljno praćena. Svi kompleti sadržali su mikrotitarske ploče sa 96 bunarića koji su već obloženi antitelom specifičnim za ciljni antigen. Nakon optimizacije metode, uzorci Kp10-, BA- i hCG-tretiranih životinja, kao i uzorci rastvora steroida izolovanih iz tkiva, adekvatno su razblaženi. Kvantifikacija količine hormona u uzorcima vršena je na osnovu standardne krive, puštane u duplikatu na svakoj ploči. Rezultati su predstavljeni kao količina hormona (u ng) po ml seruma, dok je za steroide izolovane iz tkiva količina hormona preračunata prema masi tkiva. Na graficima je predstavljena srednja vrednost \pm SEM za svaku grupu životinja ($n \geq 5$ životinja po grupi), iz barem dva nezavisna EAE eksperimenta.

3.2.14. Priprema tkiva za histološka i imunohistohemijska bojenja

Posle perfuzije, iz svake životinje izolovane su gonade i potopljene u Buenov rastvor radi fiksiranja. Testisi su ostavljeni u kapsuli koja je probušena 27 G iglom na nekoliko mesta, kako bi fiksativ mogao da prodre u tkivo. Ovarijumi i testisi ostavljeni su u Buenovom rastvoru tokom 24 h na sobnoj temperaturi, nakon čega su dehidratirani u seriji vodenih rastvora etanola rastuće koncentracije (30% \rightarrow 50% \rightarrow 70%). Tkivo je zatim podvrgnuto sledećim uslovima: najpre je izvršena finalna dehidratacija tkiva u 96% i 100 % etanolu, potom je alkohol zamenjen potapanjem u ksilol, a zatim je tkivo ukalupljeno u parafin. Ovako pripremljeni uzorci gonada sećeni su na mikrotomu (Leica Microsystems, Nemačka) na preseke debljine 7 μ m, koji su potom montirani na prethodno želatinizirana predmetna stakla.

3.2.15. Histološka bojenja tkivnih preseka

Hematoksilin je boja koja se vezuje za negativno naelektrisane strukture u ćeliji, poput hromatina, te u alkalnoj sredini boji jedra u plavo-ljubičastu boju. Eozin je boja koja se uz hematoksilin rutinski koristi, budući da boji strukture u citoplazmi u roze boju.

Pločice sa presecima testisa i ovarijuma deparafinisane su i rehidratirane u ksilolu i seriji rastvora etanola opadajuće koncentracije (100% \rightarrow 96% \rightarrow 70%). Zatim su potopljene u rastvor hematoksilina na 3 min i isprane česmenskom vodom. Pločice sa presecima su zatim potopljene u rastvor eozina na 2 min i isprane u česmenskoj vodi. Nakon ispiranja, preseci testisa i ovarijuma su dehidratirani u seriji etanola rastuće koncentracije (70% \rightarrow 96% \rightarrow 100%) i ksilolu, a zatim pokriveni pomoću DPX medijuma za pokrivanje. Preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom koji je povezan sa kamerom (DMRX 301-371.010, Leica Microsystems, Nemačka).

3.2.16. Morfometrijska analiza tkivnih preseka

Preseci ovarijuma obojeni su metodom hematoksilin/eozin. Mikrografije preseka udaljenih 350 μ m kroz ceo ovarijum korišćene su za analizu i brojanje velikih folikula i žutih tela. Folikuli su

klasifikovani prema metodi Pedersena i Petersa i brojani su folikuli tipa 5b i veći (Pedersen i Peters, 1968). Folikuli koji su sadržali više od 5% ćelija sa piknotičnim jedrima okarakterisani su kao atretični. Folikuli bez oocite, sa velikom antralnom šupljinom, uvećanim slojem *theca* ćelija i tankim slojem *granulosa* ćelija klasifikovani su kao cistični folikuli (Lara i sar., 2000).

Žuta tela klasifikovana su kao žuta tela iz poslednjeg započetog ciklusa, i žuta tela sa znakovima regresije, odnosno ona koja pripadaju prethodnim ciklusima (Sato i sar., 2014; Taketa, 2022). Kao žuta tela u regresiji okarakterisana su žuta tela sa znakovima vakuolacije u citoplazmi luteinskih ćelija i fibroze. Žuta tela u kojima nije uočeno fibrozno tkivo i znaci nekroze okarakterisana su kao žuta tela iz poslednjeg započetog ciklusa. Brojana su samo velika žuta tela, prečnika preko 800 μm . Analizirani su preseci ovarijuma iz $n = 5$ ženki/grupi, iz FK i Ep grupa.

3.2.17. Imunohistohemijsko i imunofluorescentno obeležavanje tkivnih preseka

Nakon deparafinizacije i rehidratacije u ksilolu i seriji rastvora etanola opadajuće koncentracije, pločice sa presecima tkiva potopljene su na 5 min u PBS. Opciono, usledio je povratak tkivne antigenosti izazvan visokom temperaturom – pločice su potopljene u posudu sa citratnim puferom (Tabela 3.2) i kuvane u mikrotalasnoj pećnici 5 min. Nakon serije ispiranja u PBS-u, 3×5 min, izvršen je korak blokiranja aktivnosti endogene peroksidaze, koje se postiže potapanjem preseka u 0,3 % rastvor H_2O_2 u metanolu na 10 min na sobnoj temperaturi. Permeabilizacija membrana izvršena je inkubacijom preseka tokom 15 min u 0,1% Triton-X100 deterdžentu (Tabela 3.1) rastvorenom u PBS-u. Nakon ispiranja PBS-om, 3×5 min, izvršen je korak blokiranja nespecifičnih interakcija antigen-antitelo. Optimizacijom ove metode je utvrđeno da je za tkivo gonada najbolje koristiti 5 % serum koze, tokom 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, na preseke je naneto primarno antitelo (Tabela 3.5) u odgovarajućem razblaženju u PBS-u. Preseci su inkubirani sa primarnim antitelom preko noći, na 4 °C. Narednog dana, nakon ispiranja u PBS-u 3×5 min, na preseke je naneto sekundarno antitelo, konjugovano sa HRP (Tabela 3.5), u odgovarajućem razblaženju u PBS-u. Nakon inkubacije u trljanju od 2 h, i još jedne serije ispiranja u PBS-u, 3×5 min, na preseke je nanet rastvor DAB-a (Tabela 3.1). U prisustvu H_2O_2 , DAB predstavlja supstrat za enzim HRP, sa kojom je konjugovano sekundarno antitelo; nakon oksidacije DAB-a delovanjem HRP nastaje obojeni proizvod koji se taloži na mestu reakcije i može se vizuelizovati. Preseci su nakon 1 min inkubacije sa DAB-om ispirani u česmenskoj vodi, a zatim dehidratirani u seriji etanola rastuće koncentracije i ksilolu, pokriveni DPX medijumom i posmatrani pod mikroskopom. Određeni preseci testisa i ovarijuma su nakon imunohistohemijskog obeležavanja potopljene u hematoksilin na 3 s, a potom isprani česmenkom vodom, dehidratirani i pokriveni. Preseci su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom koji je povezan sa kamerom (DMRX 301-371.010, Leica Microsystems, Nemačka).

Pločice sa presecima jajnika su podrvgnute imunofluorescentnom obeležavanju. Nakon deparafinizacije i rehidratacije tkiva u ksilolu i rastvorima etanola, pločice su potopljene u PBS na 5 min. Nespecifične interakcije antigen-antitelo blokirane su u 5% BSA rastvorenom u PBS-u, tokom 30 min, a zatim je naneto primarno antitelo (Tabela 3.5) u odgovarajućem razblaženju u PBS-u. Preseci su sa primarnim antitelom inkubirani preko noći, na 4 °C. Nakon ispiranja 3×5 min u PBS-u, na preseke je naneto sekundarno antitelo konjugovano sa fluorescentnom bojom (Tabela 3.5), koje je inkubirano tokom 2 h na sobnoj temperaturi, u mraku. Posle još jedne serije ispiranja 3×5 min u PBS-u, preseci su pokriveni pomoću rastvora moviola (Tabela 3.2). Mikrografije su napravljene pomoću fluorescentnog mikroskopa Zeiss Axiovert (Zeiss, Nemačka).

Sečenje, obrada i uklapanje mikrografija urađeno je u programu Photoshop CC (Adobe, SAD). Prikazane su odabrane mikrografije iz svake grupe.

3.2.18. Statistička obrada podataka i prezentacija rezultata

Statistička analiza vršena je u programima *SPSS 20* (IBM, SAD) i *GraphPad Prism 8* (verzija 8.0.2, GraphPad Software, SAD). Najpre je urađena analiza normalne raspodele Kolmogorov-Smirnovljevim testom i analiza homogenosti varijanse Lavinovim testom (engl. *Levene's test*). Budući da podaci nisu ispunjavali oba navedena uslova, za analizu razlika između grupa upotrebljavani su neparametrijski statistički testovi - Kruskal-Volisov test (engl. *Kruskal-Wallis*), praćen nekorigovanim Danovim testom (engl. *uncorrected Dunn's test*), za analizu više grupa, odnosno Man-Vitnijev test (engl. *Mann-Whitney test*) za analizu dveju grupa. Korelacija između varijabli, analizirana u pojedinim slučajevima, izražena je Pirsonovim koeficijentom korelacije (engl. *Pearson correlation coefficient - r*). Razlike su smatrane statistički značajnim ukoliko je p vrednost bila manja od 0,05.

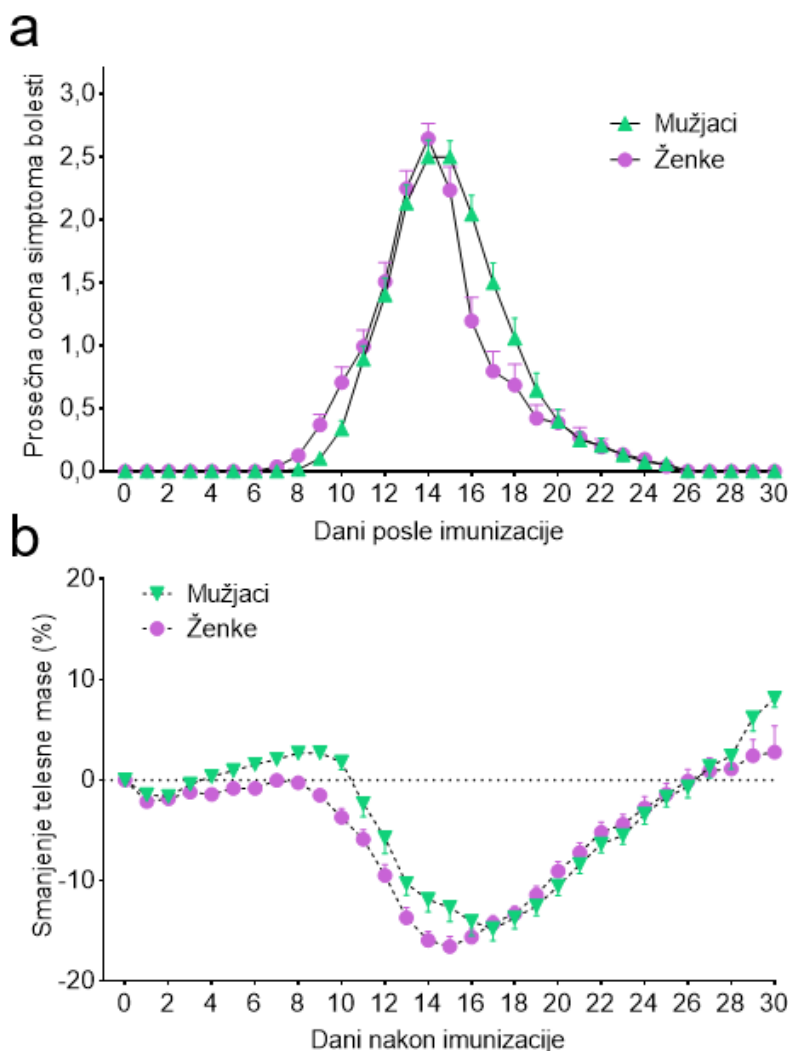
Grafički prikazi rezultata, odnosno razlika između grupa, realizovani su u programu *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software, SAD). Oznake nivoa statističke značajnosti na graficima su sledeće: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

IV Rezultati

4.1. Tok EAE-a kod mužjaka i ženki pacova

Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis kod DA pacova oba pola izazvan je aktivnom imunizacijom, a simptomi bolesti su praćeni tokom 30 dana nakon imunizacije (dni), prema prethodno utvrđenoj skali (0-4).

U svim oglecima, kod pacova oba pola, uočen je EAE monofaznog toka prikazan na Slici 4.1a. Prvi znaci bolesti, definisani atonijom repa, uočeni su 8. dni kod mužjaka, odnosno 7. dni kod ženki. Vrhunac EAE-a registrovan je dva dana zaredom kod mužjaka – 14. i 15. dni (prosečne ocene $2,50 \pm 0,14$ i $2,50 \pm 0,13$), a kod ženki 14. dni (prosečna ocena $2,58 \pm 0,13$). Nakon oporavka od bolesti, prestanak svih simptoma je zabeležen $20,94 \pm 0,48$ dni kod mužjaka, odnosno $20,15 \pm 0,98$ dni kod ženki. Od 26. dni nisu zabeleženi znaci bolesti ni kod jedne životinje. Kraj oglada je označen 30. dni (Slika 4.1a).



Slika 4.1. Tok EAE-a kod DA pacova oba pola. Imunizovane životinje praćene su 30 dni, uz procenu simptoma bolesti i merenje telesne mase. **a**, Tok EAE-a izražen kroz prosečnu ocenu simptoma bolesti za svaki dni; **b**, Gubitak telesne mase, predstavljen kao procentualna promena u odnosu na masu izmerenu na početku oglada; Prikazani grafici su

rezultat analize iz pet ogleda na mužjacima i pet ogleda na ženka izvedenim u našoj laboratoriji, sa ukupno $n = 96$ životinja za mužjake i $n = 84$ životinje za ženke.

Simptomatska faza EAE-a kod pacova oba pola bila je praćena gubitkom telesne mase. Kod mužjaka je najveće smanjenje telesne mase registrovano 17. dni (~15% gubitka u odnosu na masu izmerenu na početku ogleda), dok je kod ženki najizraženiji gubitak telesne mase (~17%) registrovan 15. dni (Slika 4.1b).

Iz pet ogleda na mužjacima i pet ogleda na ženka, analizirani su parametri toka bolesti koji su prikazani u Tabeli 4.1. Analize su pokazale da se, u proseku, prvi simptomi EAE ranije javljaju kod ženki u odnosu na mužjake. Zabeležena je značajno veća prosečna maksimalna ocena bolesti kod mužjaka nego kod ženki. Bez obzira na to, ukupna težina bolesti nije se značajno razlikovala između mužjaka i ženki.

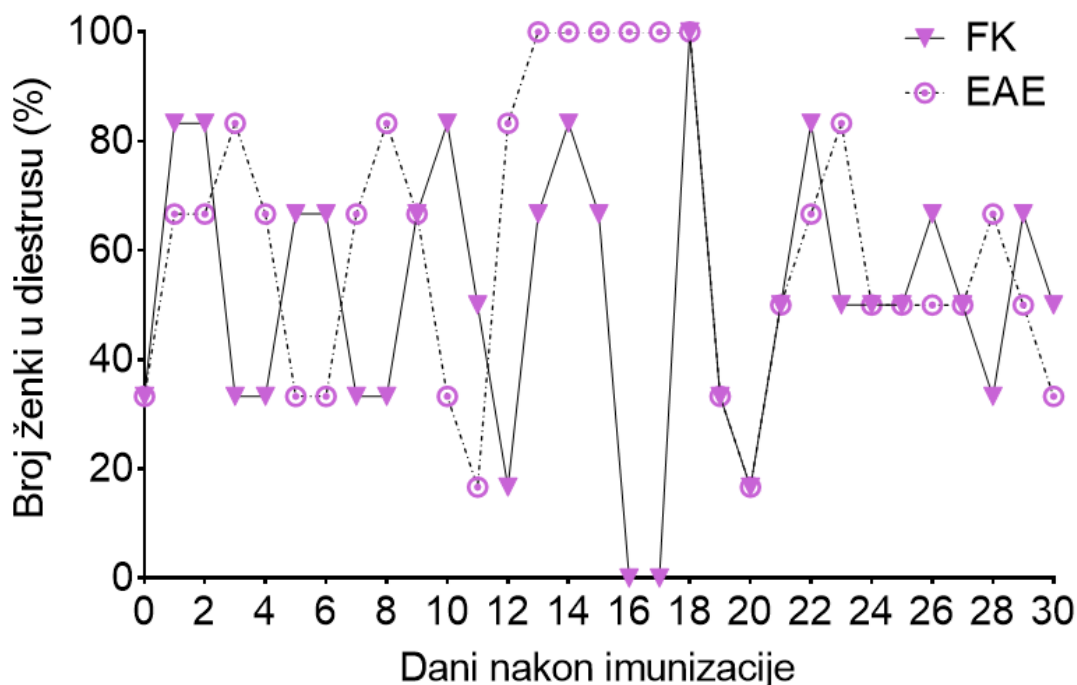
Tabela 4.1. Analiza parametara EAE-a kod DA pacova oba pola.

	Mužjaci	Ženke
Incidencija (%)	88,43 ± 5,87	93,33 ± 2,34
Početak bolesti (dni)	11,07 ± 0,15	10,55 ± 0,17 *
Trajanje simptoma (dani)	9,23 ± 0,56	9,44 ± 0,79
Trajanje paralize (dani)	1,88 ± 0,29	1,41 ± 0,29
Maksimalna ocena bolesti	3,18 ± 0,07	2,97 ± 0,10 *
Ukupna težina bolesti	14,64 ± 0,93	13,00 ± 1,17

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM za svaku grupu, iz po pet ogleda za svaki pol. * $p < 0,05$ u odnosu na mužjake; Man-Vitnjev test.

4.2. Dinamika estrusnog ciklusa

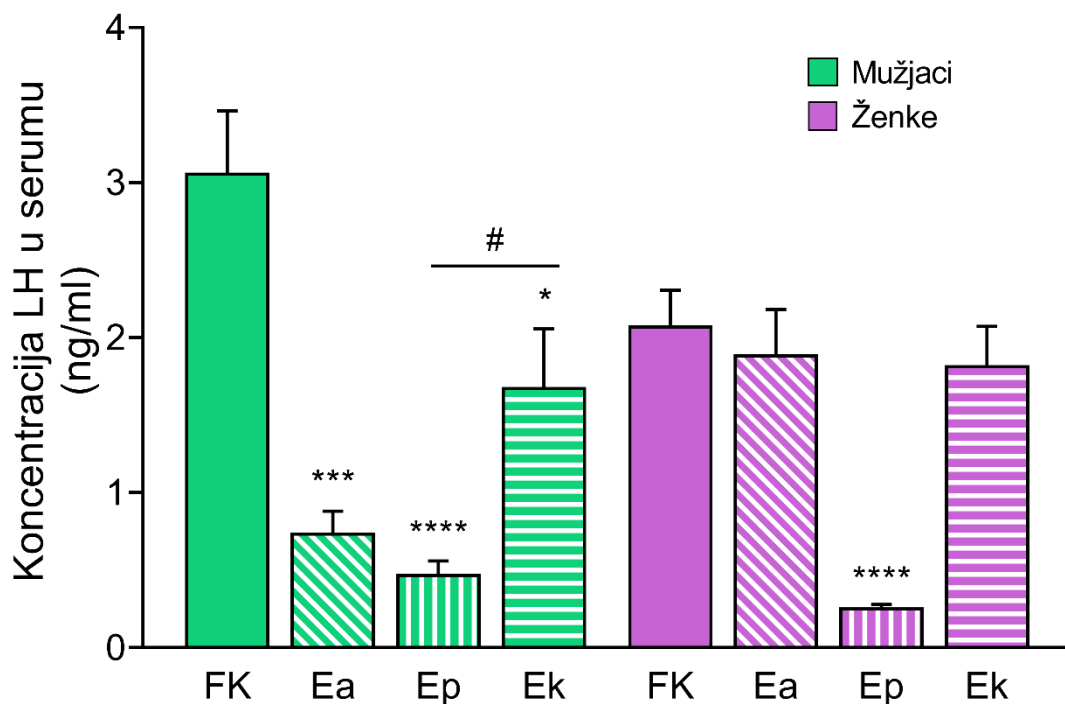
Na osnovu prisustva i morfologije ćelija u vaginalnom brisu, kod zdravih ženki je tokom ogleda uočen ciklus od 4 ili 5 ($4,42 \pm 0,64$) dana. Nakon imunizacije, sa pojavom simptoma bolesti, uočen je zastoj u fazi diestrusa koji je trajao najmanje 5 a najviše 12 dana. Na Slici 4.2 je prikazan procenat ženki u diestrusu za svaki dni, u okviru FK i Ek grupe iz reprezentativnog ogleda. Procenat životinja u fazi diestrusa u FK grupi bio je varijabilan, u skladu sa normalnom dinamikom estrusnog ciklusa, dok se u Ek grupi uočava da je 100% životinja bilo u fazi diestrusa od 13. do 18. dni, što obuhvata period vrhunca EAE-a. Prosečan zastoj u fazi diestrusa trajao je $7,73 \pm 0,38$ dana ($n = 27$). Zastoj u diestrusu koreliran je sa smanjenjem telesne mase tokom paralize ($r = -0,486$). Tokom delimične/potpune atonije repa, ili nakon potpunog oporavka od bolesti, kod ženki je ponovo registrovan proestrus, u proseku $19,54 \pm 0,35$ dni ($n = 27$). Uočena je i pozitivna korelacija između prosečnog dana prestanka simptoma i dana ponovnog ulaska u fazu proestrusa ($r = 0,469$, $n = 27$).



Slika 4.2. Estrusni ciklus pacova tokom EAE-a. Estrusni ciklus praćen je na osnovu prisustva i morfologije ćelija u vaginalnom brisu. Na slici je predstavljen procenat ženki u diestrusu za svaki dni, u okviru FK grupe (puna linija, trouglovi) i Ek grupe životinja (isprekidana linija, krugovi). Prikazan je reprezentativni ogled, $n = 6$ životinja/grupi.

4.3. Koncentracija LH u serumu

Koncentracija LH u serumu mužjaka i ženki pacova predstavljen je na Slici 4.3. U serumu mužjaka je izmerena značajno smanjena koncentracija LH u Ea grupi ($0,74 \pm 0,14$ ng/ml), u odnosu na FK grupu ($3,06 \pm 0,39$ ng/ml), dok je u Ep grupi smanjenje bilo dodatno izraženo ($0,48 \pm 0,08$ ng/ml). U Ek grupi, koncentracija LH u serumu je i dalje bila značajno smanjena ($1,68 \pm 0,38$ ng/ml) u odnosu na kontrolne životinje. Međutim, u Ek grupi je zabeležen i značajan porast koncentracije LH u odnosu na Ep grupu (Slika 4.3, levo). Kod ženki, značajno smanjenje koncentracije LH u serumu u odnosu na kontrolne životinje ($2,08 \pm 0,23$ ng/ml) izmereno je samo u Ep grupi ($0,26 \pm 0,02$ ng/ml), dok se koncentracija ovog hormona u serumu Ea i Ek grupa nije razlikovala u odnosu na FK grupu (Slika 4.3, desno).

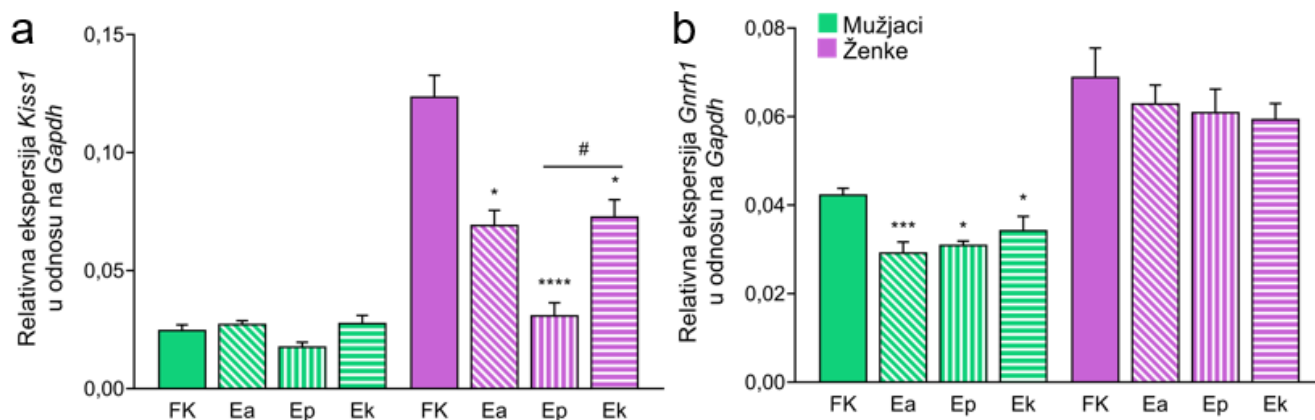


Slika 4.3. Koncentracija LH u serumu. Koncentracija LH u serumu pacova izmerena je metodom ELISA. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije LH (u ng/ml seruma) \pm SEM, iz dva eksperimenta, sa ukupno $n \geq 9$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ u odnosu na FK grupu; # $p < 0,05$ u odnosu na Ep grupu; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

4.4. Obrazac ekspresije *Kiss1* i *Gnrh1*

Ekspresija gena *Kiss1* i *Gnrh1*, ispitana u tkivu hipotalamusa pacova oba pola, prikazana je na Slici 4.4. Kod mužjaka, nije uočena promena ekspresije *Kiss1* (Slika 4.4a, levo) dok je kod ženki nivo *Kiss1* iRNK bio značajno smanjen u svim eksperimentalnim grupama u poređenju sa FK grupom (Slika 4.4a, desno). Međutim, u Ek grupi je registrovano povećanje ekspresije ovog gena u odnosu na Ep grupu.

Nasuprot tome, kod mužjaka je zabeleženo značajno smanjenje ekspresije *Gnrh1* u svim grupama imunizovanih životinja (Slika 4.4b, levo), dok kod ženki nije registrovana promena ekspresije ovog gena tokom razvoja EAE-a (Slika 4.4b, desno).



Slika 4.4. Obrazac ekspresije *Kiss1* i *Gnrh1* u hipotalamusu. Ekspresija gena koji kodiraju kipeptin i GnRH ispitana je metodom qPCR u tkivu hipotalamusa. **a**, *Kiss1*; **b**, *Gnrh1*. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije gena od interesa (izračunate prema *Gapdh*) \pm SEM, za svaku grupu životinja, sa $n \geq 6$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ u odnosu na FK grupu; # $p < 0,05$ u odnosu na Ep grupu; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

Ekspresija gena *Pdyn* i *Tac3* nije bila promenjena u tkivu hipotalamusa ni mužjaka ni ženki pacova. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.2.

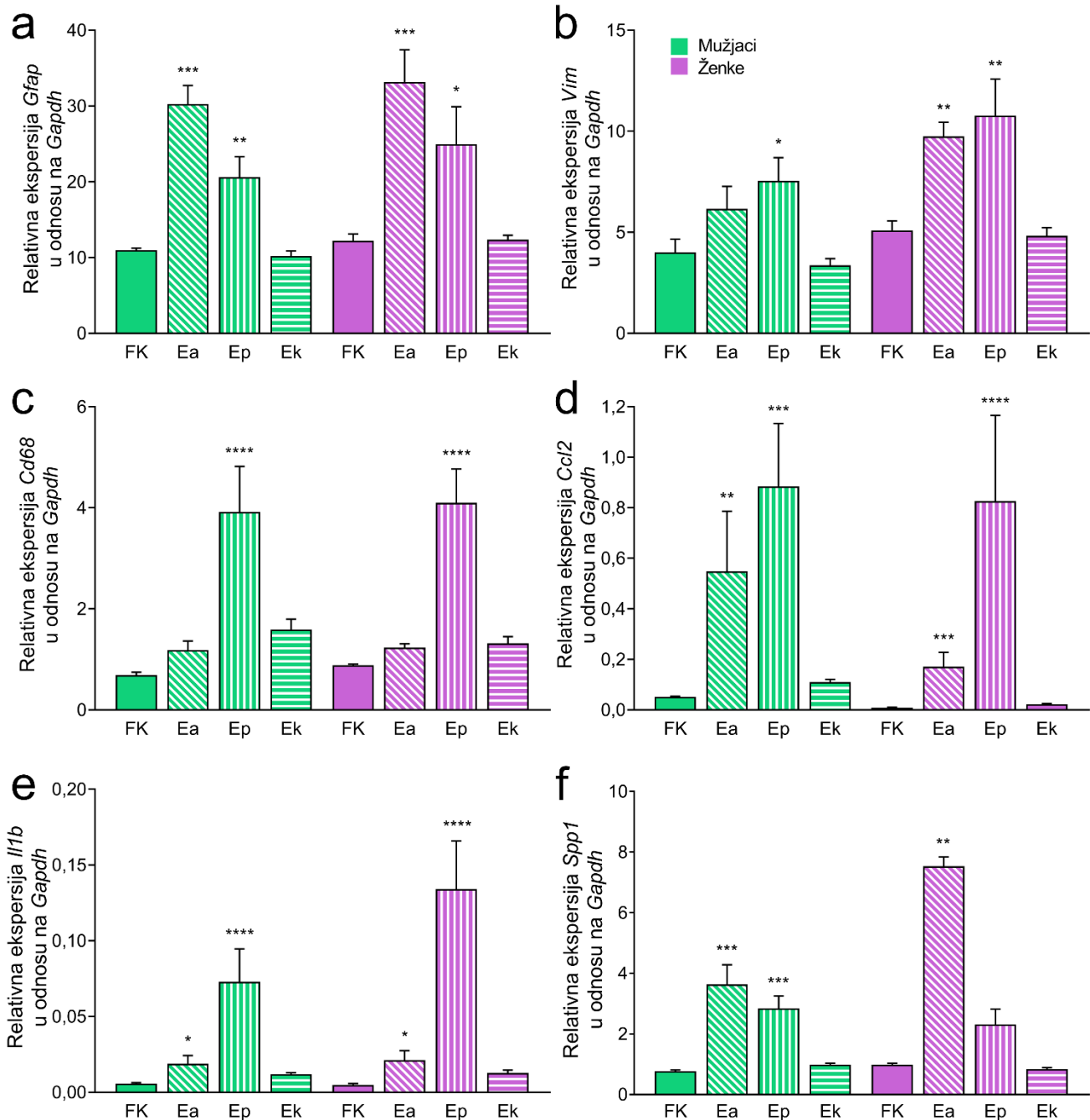
Tabela 4.2. Ekspresija *Pdyn* i *Tac3* u hipotalamusu pacova.

		FK	Ea	Ep	Ek
<i>Pdyn</i>	Mužjaci	2,72 \pm 0,25	2,46 \pm 0,22	3,42 \pm 0,21	2,55 \pm 0,21
	Ženke	3,27 \pm 0,25	2,81 \pm 0,22	3,26 \pm 0,48	4,01 \pm 0,36
<i>Tac3</i>	Mužjaci	1,30 \pm 0,07	1,19 \pm 0,10	1,57 \pm 0,12	1,24 \pm 0,08
	Ženke	1,36 \pm 0,10	1,19 \pm 0,05	1,20 \pm 0,07	1,32 \pm 0,07

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije gena od interesa (izračunate prema *Gapdh*) \pm SEM za svaku grupu životinja, sa $n \geq 6$ životinja/grupi.

4.5. Ekspresija markera inflamacije u hipotalamusu

Ekspresija gena koji kodiraju molekule uključene u patogenezu EAE-a predstavljena je na Slici 4.5. Kod pacova oba pola, i to u Ea i/ili Ep grupama, uočeno je povećanje genske ekspresije ispitanih faktora. Povećanje ekspresije *Gfap* je bilo izraženije u Ea grupi pacova oba pola (Slika 4.5a). S druge strane, izraženije povećanje ekspresije *Vim*, *Cd68*, *Ccl2* i *Il1b* zabeleženo je u Ep grupama mužjaka i ženki (Slika 4.5b, 4.5c, 4.5d i 4.5e, redom). Povećanje nivoa *Spp1* iRNK bilo je izraženije u Ea grupama pacova (Slika 4.5f).



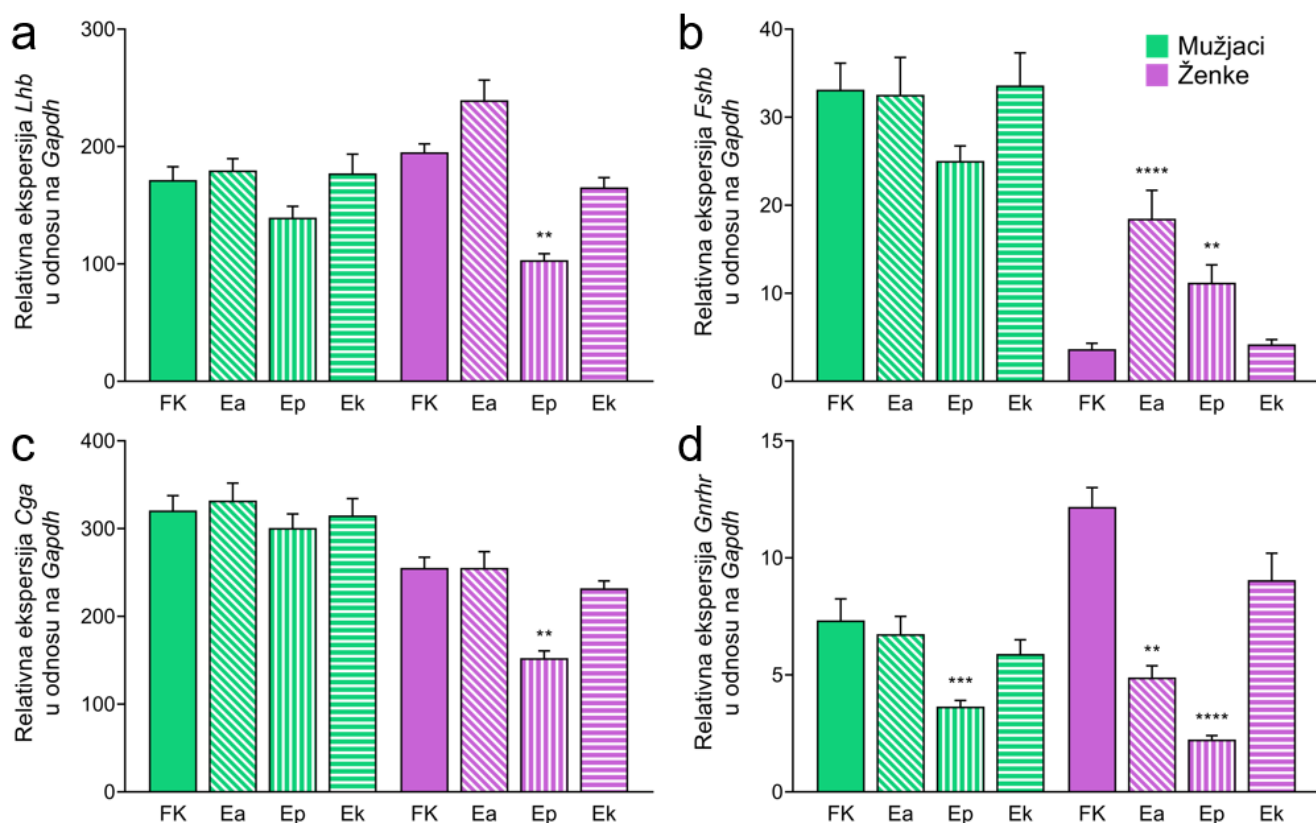
Slika 4.5. Genska ekspersija faktora koji učestvuju u patogenezi EAE-a u tkivu hipotalamusa. Hipotalamusi pacova oba pola bili su predmet analize genske ekspresije, metodom qPCR. **a**, *Gfap*; **b**, *Vim*; **c**, *Cd68*; **d**, *Ccl2*; **e**, *Il1b*; **f**, *Spp1*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost relativne ekspresije gena od interesa (izračunate prema *Gapdh*) \pm SEM za svaku grupu životinja ($n \geq 6$ životinja/grupi). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Kruskal-*Volisov* test uz nekorigovani *Danov post hoc* test.

4.6. Genska ekspresija gonadotropinskih subjedinica i GnRHR

U tkivu adenohipofize ispitana je ekspresija gonadotropinskih subjedinica, koje su kodirane genima *Lhb*, *Fshb* i *Cga*, kao i ekspresija gena koji kodira GnRHR – *Gnrhr* (Slika 4.6).

Kod mužjaka nije uočena promena ekspresije *Lhb*, dok je kod ženki zabeležen smanjen nivo iRNK ovog gena u Ep grupi (Slika 4.6a). Ekspresija *Fshb* takođe nije bila promenjena kod mužjaka, dok je u adenohipofizi ženki registrovan porast ekspresije ovog gena u Ea i Ep grupama, pri čemu je to povećanje bilo izraženije u Ea grupi (Slika 4.6b, levo). Nivo *Cga* iRNK je bio nepromenjen u tkivu adenohipofize mužjaka, a kod ženki je uočeno smanjenje ekspresije ovog gena, i to u Ep grupi (Slika 4.6c, levo).

Ekspresija *Gnrhr* je bila smanjena u tkivu adenohipofize pacova oba pola – kod mužjaka, to smanjenje je registrovano u Ep grupi, dok je kod ženki zabeleženo u Ea i Ep grupama (Slika 4.6d).



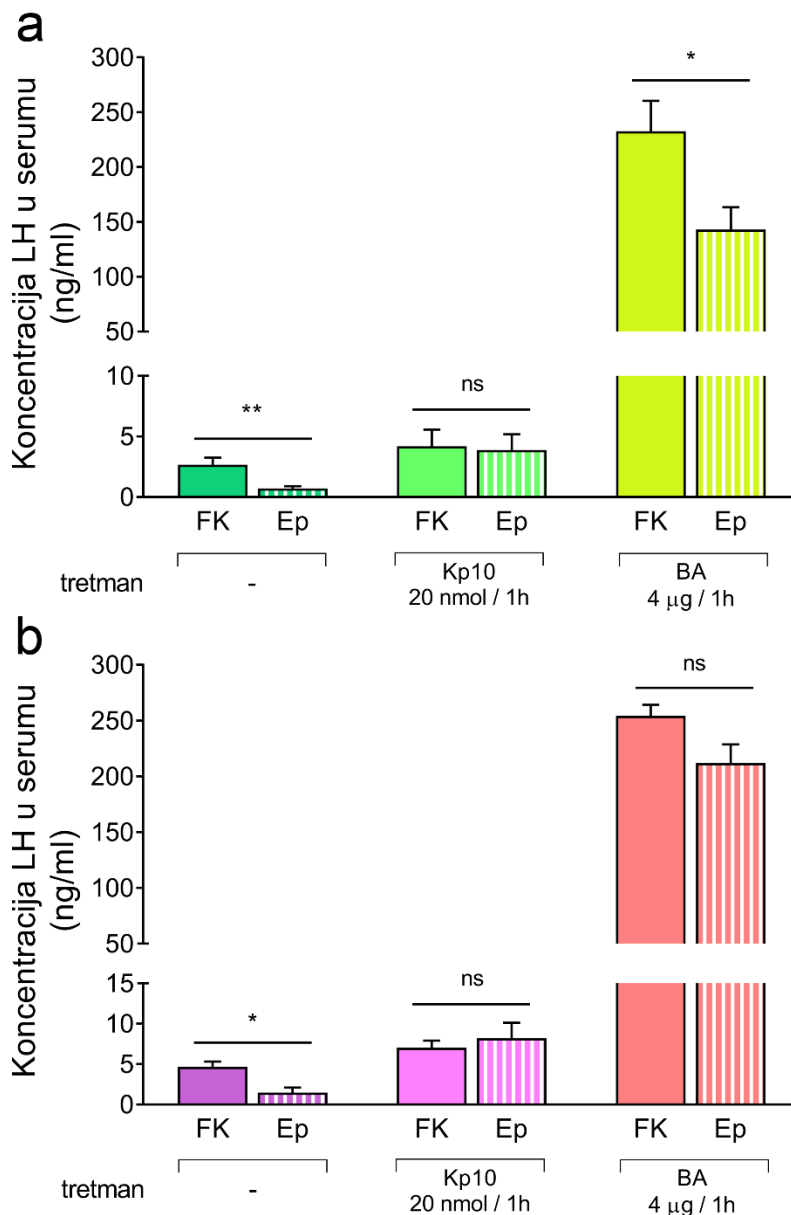
Slika 4.6. Obrazac ekspresije gonadotropinskih subjedinica i *Gnrhr* u adenohipofizi. Genska ekspresija gonadotropinskih subjedinica i GnRHR analizirana je u tkivu adenohipofize pacova, metodom qPCR. **a**, *Lhb*; **b**, *Fshb*; **c**, *Cga*; **d**, *Gnrhr*. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije gena od interesa (izračunate prema *Gapdh*) \pm SEM za svaku grupu životinja ($n \geq 6$ životinja/grupi). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

4.7. Koncentracija LH u serumu nakon tretmana kisperptinom i agonistom GnRHR

Na Slici 7 su predstavljeni rezultati merenja koncentracije LH u serumu pacova oba pola nakon bolus tretmana Kp10 i BA.

Koncentracija LH u serumu mužjaka predstavljena je na Slici 4.7a. Kao što je prethodno utvrđeno, zabeležena je smanjena koncentracija LH u serumu pacova Ep grupe ($0,72 \pm 0,19$ ng/ml) u odnosu na FK grupu ($2,67 \pm 0,58$ ng/ml; Slika 4.7a, levo). Nakon tretmana sa Kp10, koncentracija LH nije se značajno razlikovala između FK ($4,18 \pm 1,38$ ng/ml) i Ep grupe ($3,88 \pm 1,30$ ng/ml; Slika 4.7a, sredina). Koncentracija LH u serumu Ep grupe je nakon tretmana BA i dalje bila značajno manja ($143,00 \pm 20,28$ ng/ml) u odnosu na FK grupu ($232,60 \pm 27,71$ ng/ml), iako je u obe grupe registrovano višestruko povećanje koncentracije LH nakon ovog tretmana u odnosu na odgovarajuće netretirane grupe životinja (Slika 4.7a, desno).

Rezultati analize koncentracije LH u serumu ženki prikazani su na Slici 4.7b. Kod ženki je takođe zabeležena smanjena koncentracija LH u serumu u Ep grupi ($1,49 \pm 0,61$ ng/ml) u odnosu na kontrolne životinje ($4,67 \pm 0,65$ ng/ml; Slika 4.7b, levo). Nakon tretmana sa Kp10, nije izmerena značajna razlika između FK ($7,04 \pm 0,88$ ng/ml) i Ep grupe ($8,20 \pm 1,93$ ng/ml; Slika 4.7b, sredina). Nakon tretmana BA izmerena je povećana koncentracija LH u serumu u obe eksperimentalne grupe, u odnosu na odgovarajuće netretirane životinje, pri čemu nije zabeležena razlika između FK ($254,30 \pm 9,98$ ng/ml) i Ep grupe ($212,00 \pm 16,76$ ng/ml) BA-tretiranih ženki (Slika 4.7b, desno).

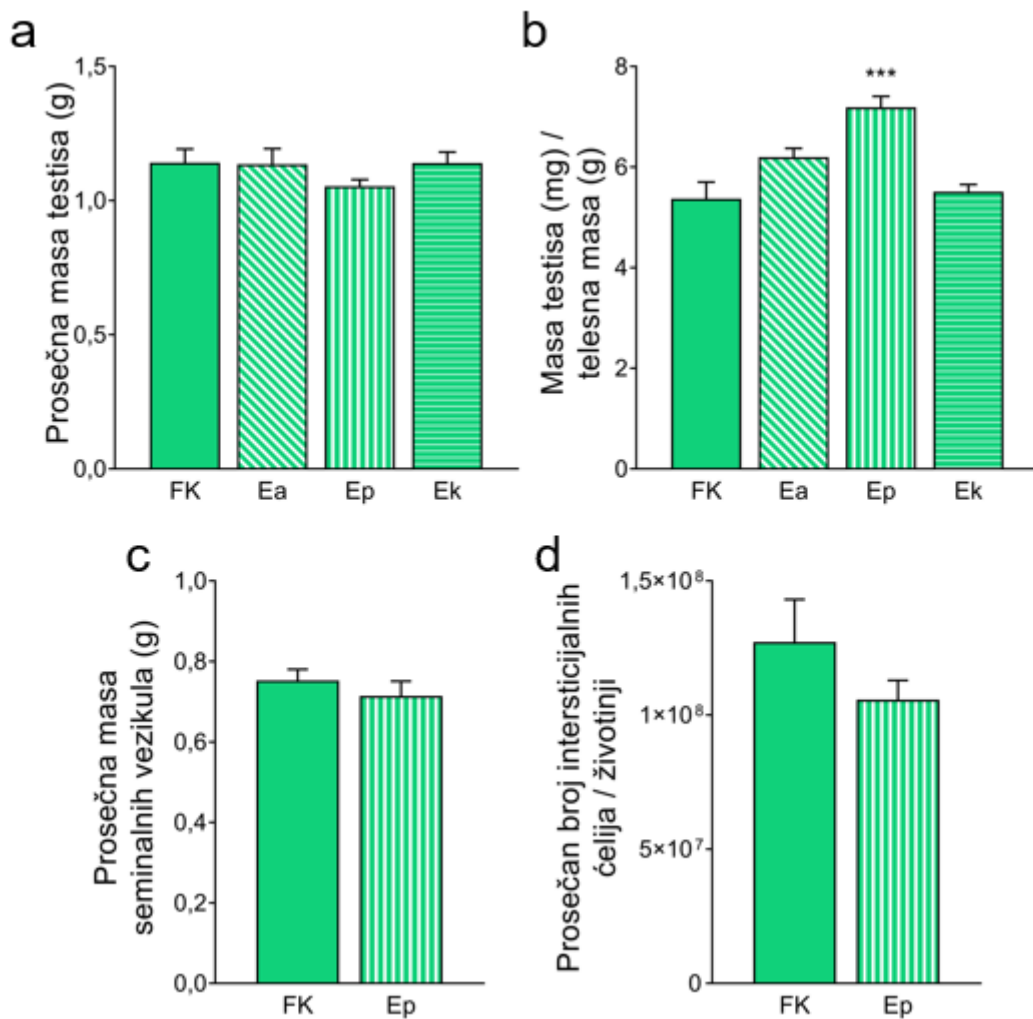


Slika 4.7. Koncentracija LH u serumu pacova nakon tretmana Kp10 i BA. Pacovi FK i Ep grupa tretirani su bolus injekcijom kisseptina (Kp10, 20nmol, i.p.) ili buserelin acetata (BA, 4 µg, i.p.). Životinje su žrtvovane 1h nakon tretmana. Koncentracija LH u serumu izmerena je metodom ELISA. **a**, Mužjaci; **b**, Ženke. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije LH u serumu (u ng/ml) ± SEM, za $n \geq 6$ životinja/grupi. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Man-Vitnijev test.

4.8. Masa testisa, semenih vezikula i broj intersticijalnih ćelija

Masa testisa se nije značajno razlikovala između kontrolnih i imunizovanih životinja (Slika 4.8a). Odnos između mase testisa i telesne mase ukazuje na to da se gubitak telesne mase uočen tokom simptomatske faze EAE-a nije odrazio na masu testisa: značajno povećanje ovog odnosa u poređenju sa kontrolnim vrednostima zabeleženo je u Ep grupi (Slika 4.8b). Nije registrovana razlika u masi semenih vezikula između FK ($752,5 \pm 27,7$ mg) i Ep ($713,9 \pm 36,8$ mg) grupa pacova (Slika 4.8c).

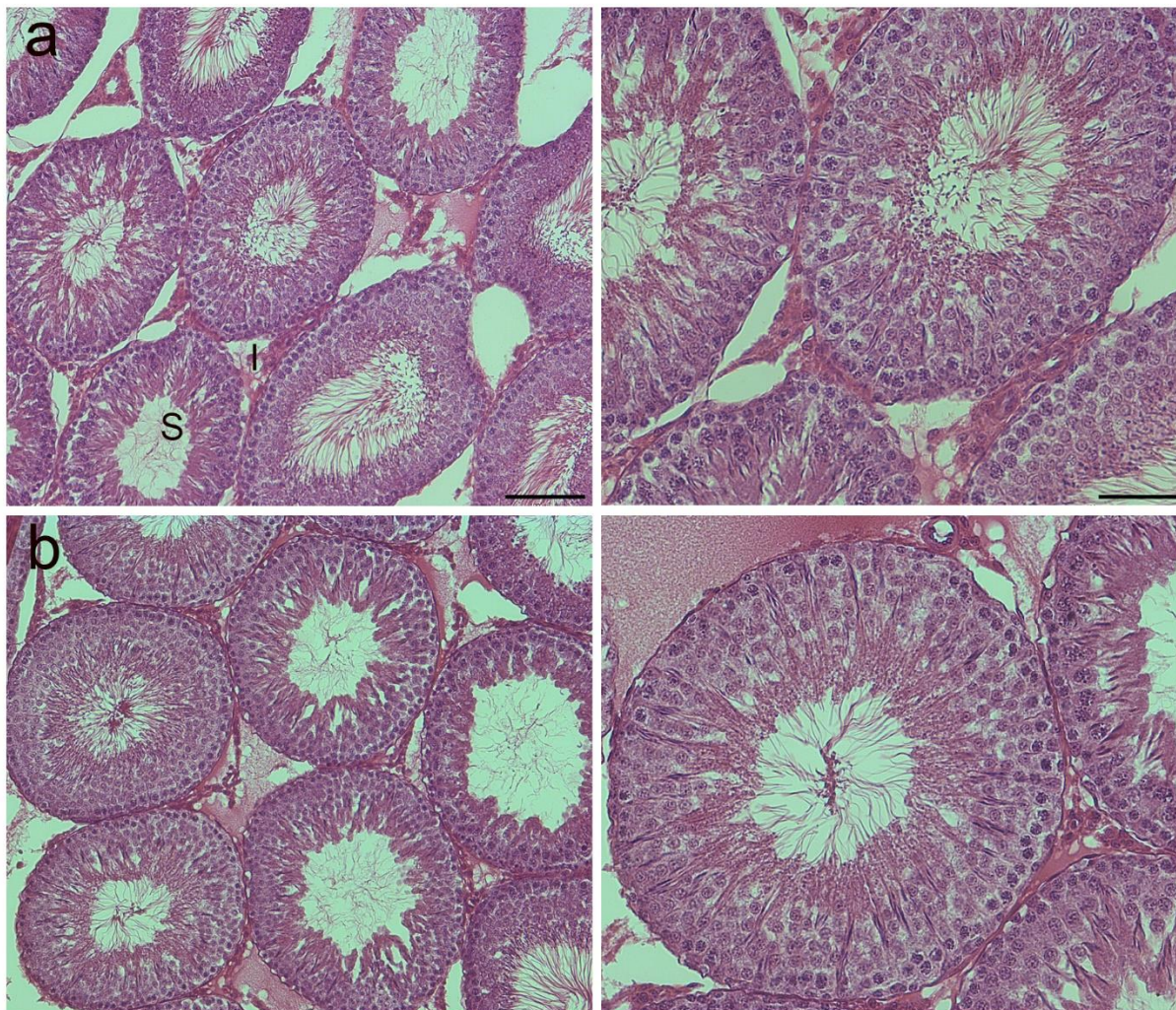
Broj intersticijalnih ćelija izolovanih iz testisa, predstavljen na Slici 4.8d, takođe se nije se značajno razlikovao između FK ($127,2 \pm 15,8$ miliona ćelija/životinji) i Ep grupe ($105,7 \pm 7,21$ miliona ćelija/životinji).



Slika 4.8. Masa testisa i seminalnih vezikula i broj intersticijalnih ćelija. Intersticijalne ćelije su nakon izolacije iz testisa izbrojane na hemocitometru. **a**, Prosečna masa testisa (g); **b**, Odnos mase testisa i telesne mase (mg/g); **c**, Prosečna masa seminalnih vezikula (g); **d**, Prosečan broj intersticijalnih ćelija po životinji. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM, za $n \geq 6$ životinja/grupi. *** $p < 0,001$; Kruskal-Willisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test (a, b); Man-Vitnjev test (c, d).

4.9. Histološki prikaz poprečnog preseka testisa pacova

Na Slici 4.9 prikazane su reprezentativne mikrografije histološkog bojenja hematoksilinom/eozinom, izvedenog na poprečnim presecima testisa izolovanim iz FK grupe (Slika 4.9a) i Ep grupe pacova (Slika 4.9b). Na presecima Ep grupe pacova nisu uočene morfološke promene na nivou seminifernih tubula i intersticijalnog prostora kao ni znaci inflamacije.

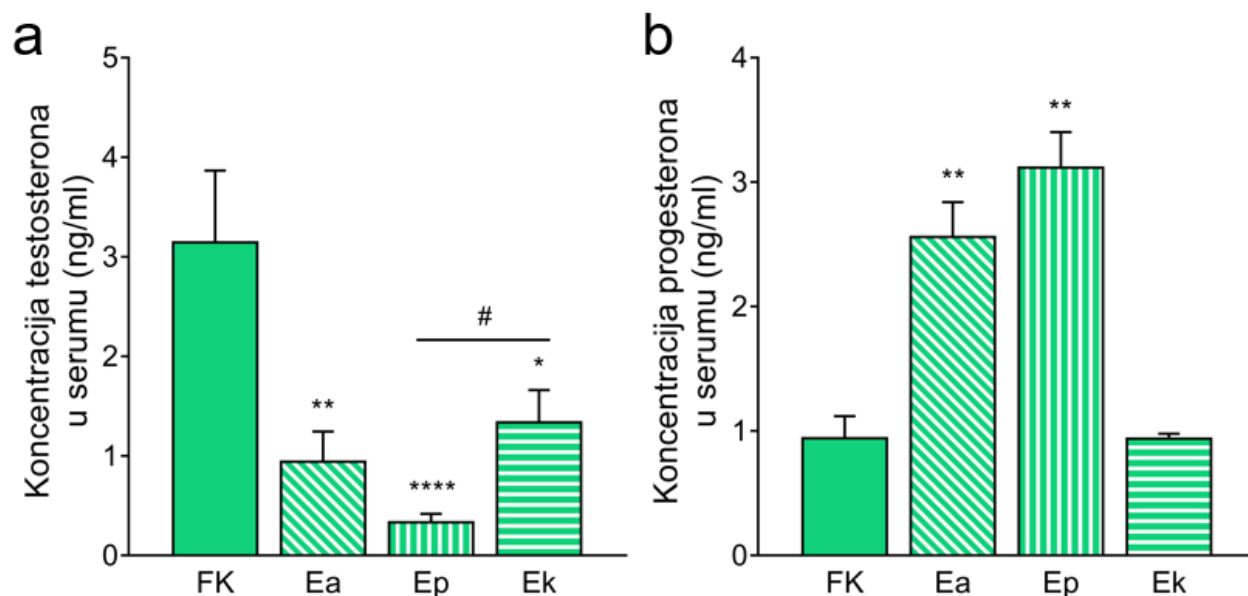


Slika 4.9. Histološki prikaz poprečnog preseka testisa nakon bojenja hematoksilinom/eozinom. Preseci testisa pacova **a**, FK grupe i **b**, Ep grupe, obojeni su hematoksilinom/eozinom. Na manjem uveličanju (levo), uočavaju se seminiferne tubule (S) i intersticijalni prostor (I). Na većem uveličanju (desno) vidi se lumen seminifernih tubula sa germinativnim ćelijama u sazrevanju, kao i ćelije intersticijuma. Ne uočavaju se značajne histološke razlike u tkivu testisa između FK i Ep grupa. Razmernik: 100 μ m (levo), 50 μ m (desno).

4.10. Koncentracija testosterona i progesterona u serumu mužjaka

Rezultati merenja koncentracije testosterona i progesterona u serumu mužjaka prikazani su na Slici 4.10.

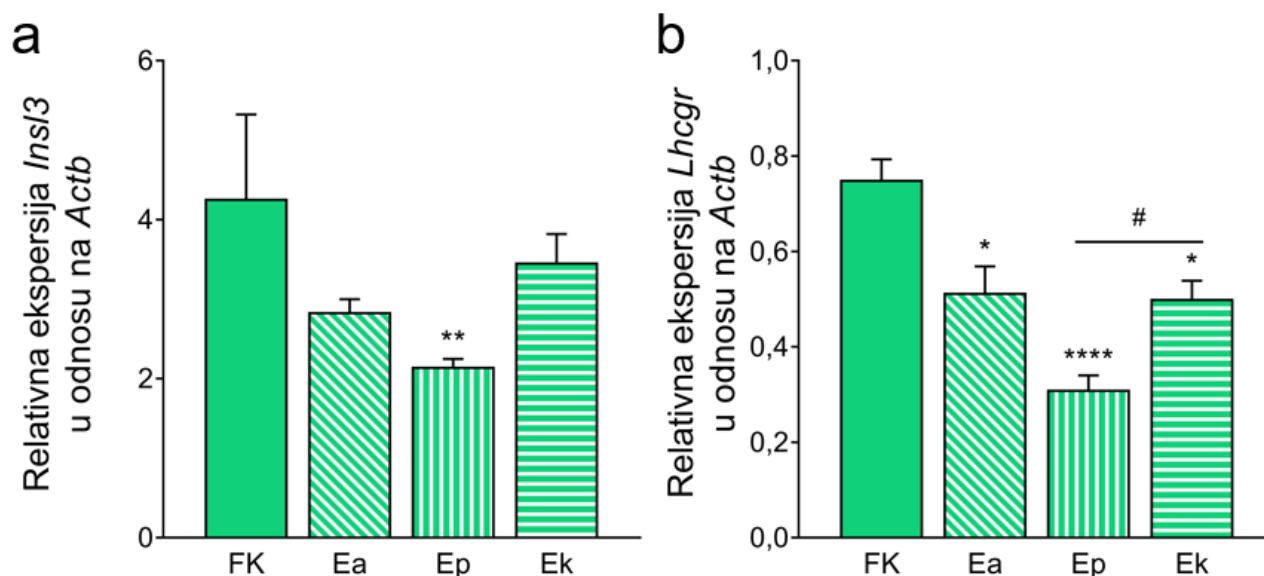
U Ea grupi je zabeleženo značajno smanjenje koncentracije testosterona ($0,95 \pm 0,29$ ng/ml), koje je bilo još izraženije u Ep grupi ($0,34 \pm 0,07$ ng/ml) u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($3,16 \pm 0,71$ ng/ml). U Ek grupi je uočeno značajno povećanje koncentracije testosterona u odnosu na Ep grupu ($1,35 \pm 0,31$ ng/ml), iako je prema statističkoj analizi ta vrednost i dalje bila manja u odnosu na FK grupu pacova (Slika 4.10a). Utvrđen je visok stepen korelacije između koncentracije testosterona i koncentracije LH u serumu mužjaka ($r = 0,98$). Međutim, koncentracija prekursora testosterona, progesterona, u serumu bila je značajno povećana u Ea grupi ($2,57 \pm 0,27$ ng/ml), što je bilo još izraženije u Ep grupi ($3,13 \pm 0,28$ ng/ml), dok u Ek grupi nije uočena razlika u odnosu na kontrolne vrednosti ($0,95 \pm 0,17$ ng/ml; Slika 4.10b).



Slika 4.10. Koncentracija testosterona i progesterona u serumu mužjaka pacova. Koncentracija testosterona i progesterona izmerena je metodom ELISA. **a**, Testosteron; **b**, Progesteron. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracije hormona (u ng/ml seruma) \pm SEM, za $n \geq 6$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ u odnosu na FK grupu; # $p < 0,05$ u odnosu na Ep grupu; Kruskal-Volison test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

4.11. Ekspresija *Insl3* i *Lhcgr* u testisima

Obrazac ekspresije *Insl3* i *Lhcgr* u tkivu testisa predstavljen je na Slici 4.11. Zabeležena je značajno smanjena ekspresija *Insl3* u Ep grupi u odnosu na kontrolne životinje (Slika 4.11a). Ekspresija *Lhcgr* je bila značajno smanjena u svim grupama imunizovanih životinja u odnosu na FK grupu životinja, međutim u Ek grupi je zabeleženo značajno povećanje ekspresije ovog gena u odnosu na Ep grupu pacova (Slika 4.11b).

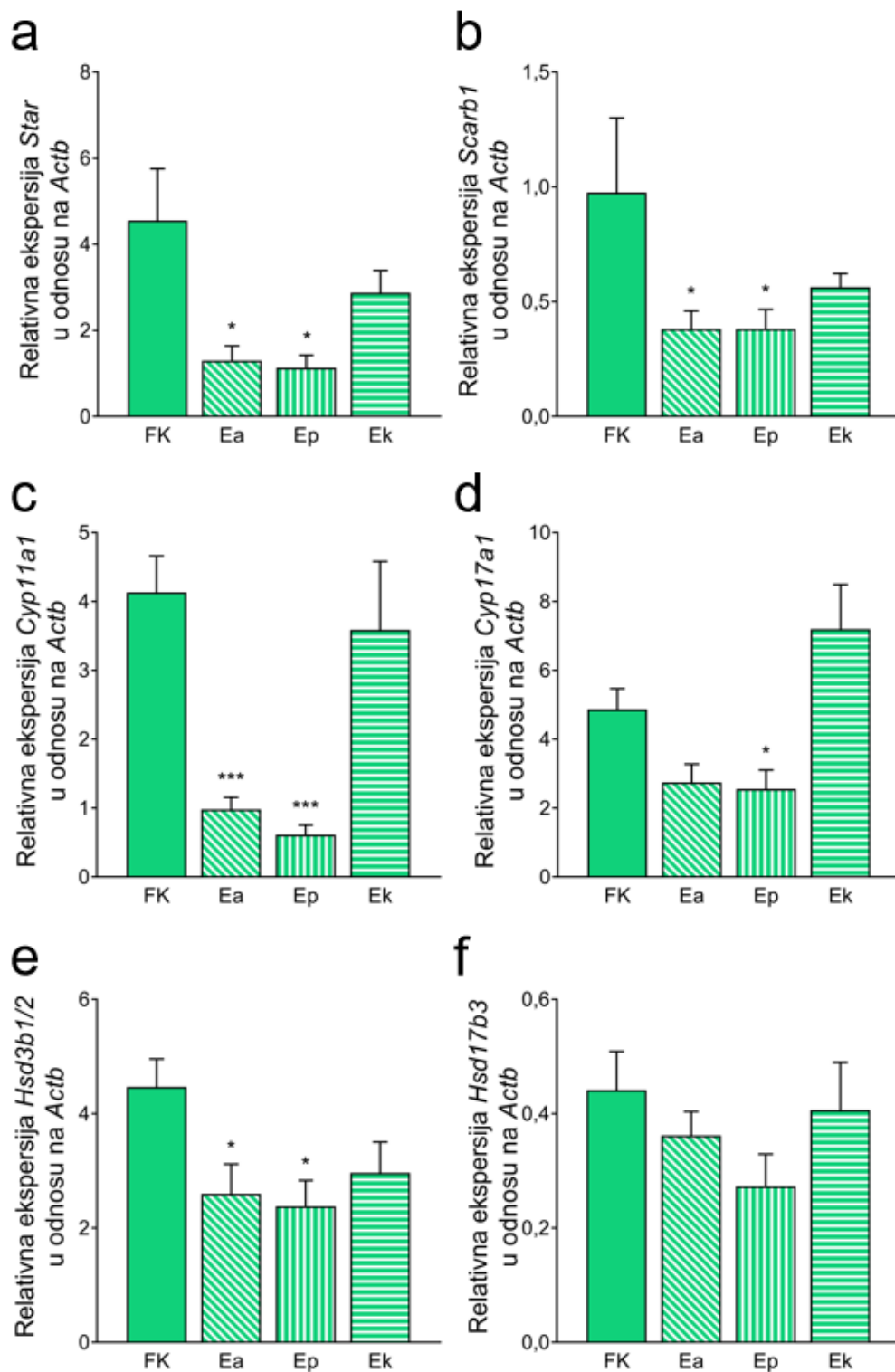


Slika 4.11. Obrazac ekspresije *Insl3* i *Lhcgr* u testisima. Nivo iRNK *Insl3* i *Lhcgr* u tkivu testisa pacova analiziran je metodom qPCR. **a**, *Insl3*; **b**, *Lhcgr*. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije gena od interesa (izračunate prema *Actb*) \pm SEM za svaku grupu životinja, sa $n \geq 6$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ u odnosu na FK grupu; # $p < 0,05$ u odnosu na Ep grupu; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

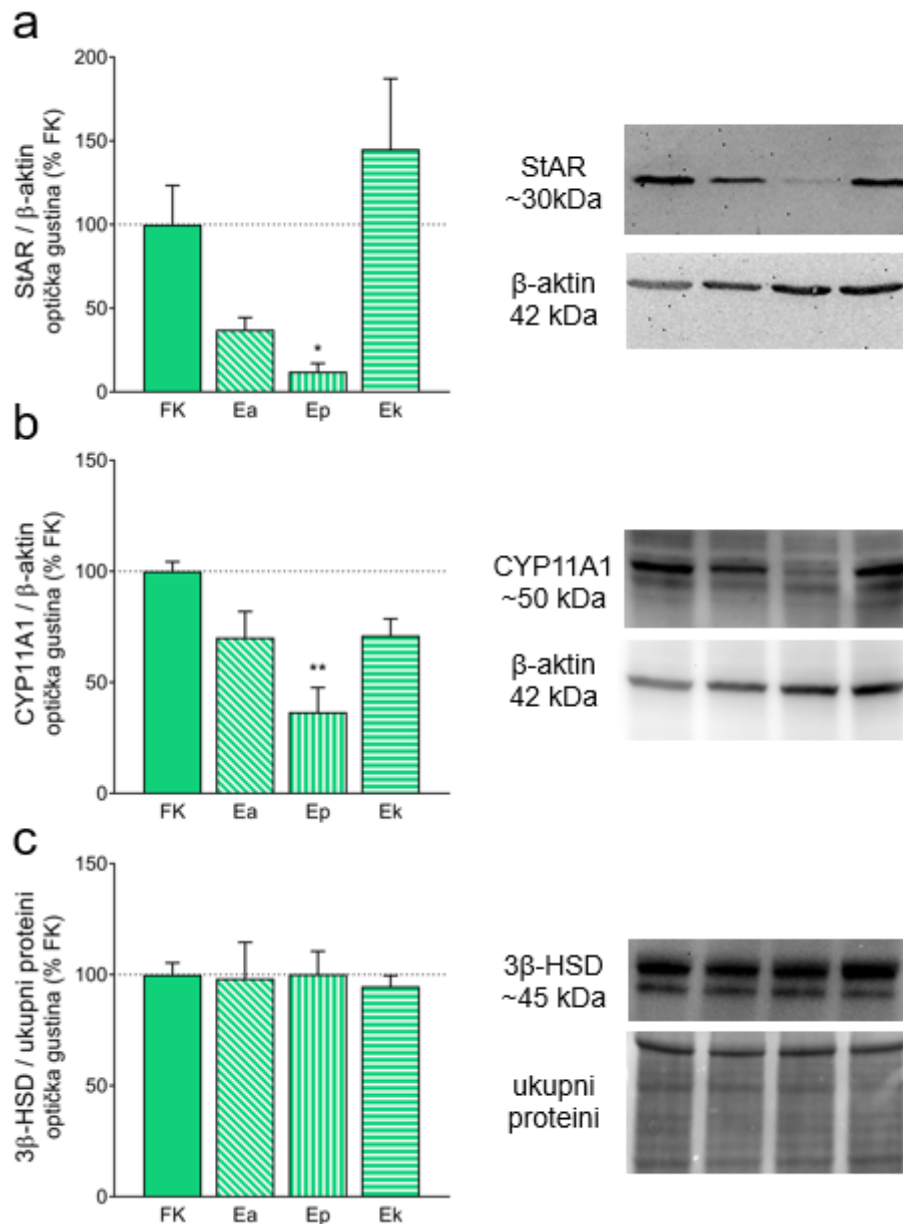
4.12. Ekspresija gena i nivo proteina učesnika procesa steroidogeneze u intersticijalnim ćelijama testisa

Na Slici 4.12 predstavljen je obrazac genske ekspresije komponenata steroidogene mašinerije u intersticijalnim ćelijama. U Ea i Ep grupama zabeleženo je značajno smanjenje genske ekspresije *Star* (Slika 4.12a), *Scarb1* (Slika 4.12b) i *Cyp11a1* (Slika 4.12c) u odnosu na FK grupu. Značajno smanjenje ekspresije *Cyp17a1* registrovano je samo u Ep grupi, dok trend smanjenja uočeno u Ea grupi nije dostigao statističku značajnost (Slika 4.12d). Ekspresija *Hsd3b1/2* je bila značajno smanjena u Ea i Ep grupama (Slika 4.12e). Nije uočena značajna promena ekspresije *Hsd17b3* ni u jednoj grupi imunizovanih pacova (Slika 4.12f).

Nivo proteina StAR, CYP11A1 i 3β -HSD u izolovanim intersticijalnim ćelijama prikazan je na Slici 4.13. Merenjem OD i normalizacijom prema FK grupi (100%), uočeno je da je nivo proteina StAR bio značajno smanjen u Ep grupi u odnosu na kontrolne životinje (Slika 4.13a), kao i nivo CYP11A1 (Slika 4.13b). Nije zabeležena promena u nivou proteina 3β -HSD (Slika 4.13c).



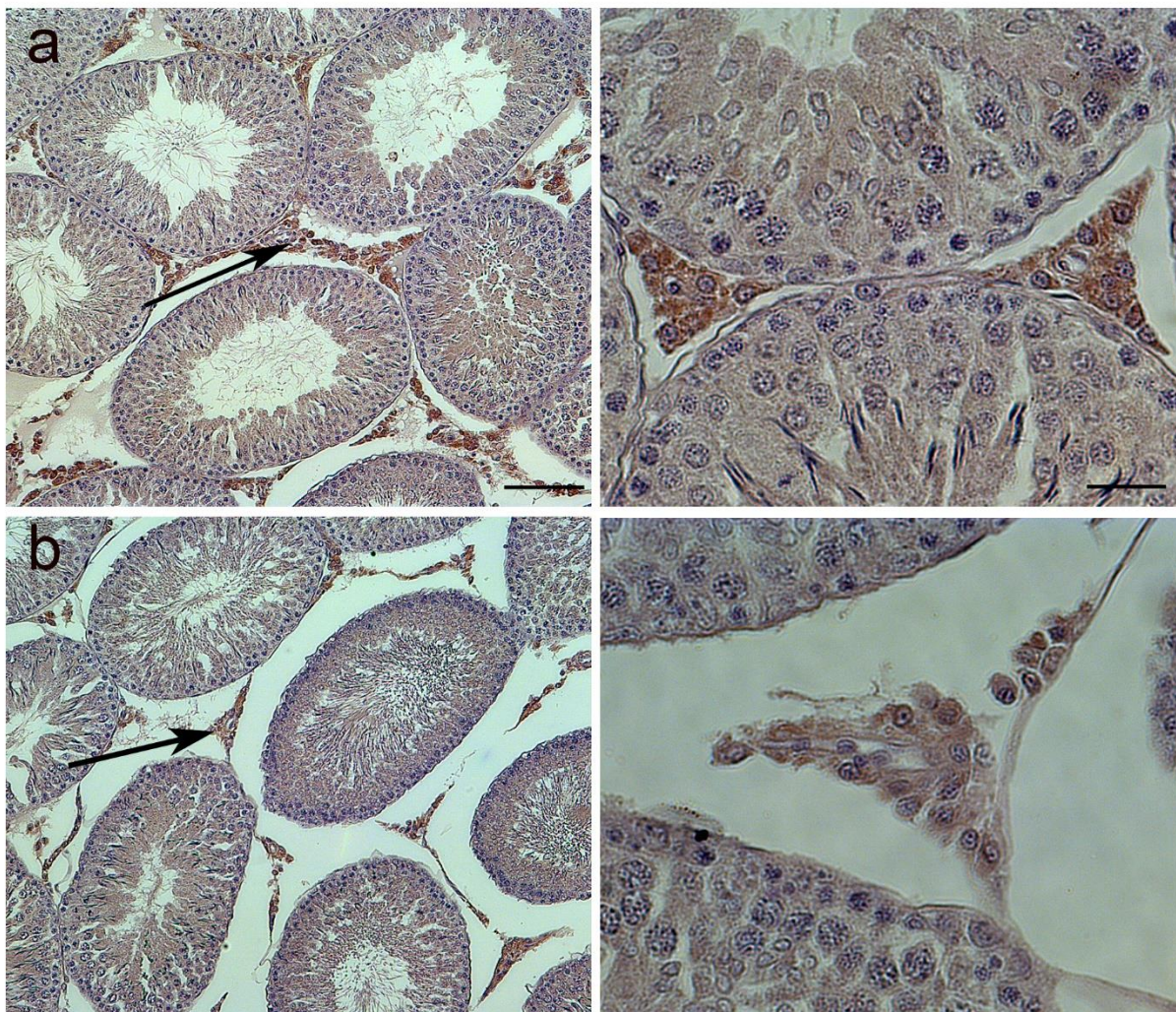
Slika 4.12. Genska ekspresija komponenta steroidogene mašinerije u intersticijalnim ćelijama testisa. Informaciona RNK izolovana je iz intersticijalnih ćelija i analizirana metodom qPCR. **a**, *Star*; **b**, *Scarb1*; **c**, *Cyp11a1*; **d**, *Cyp17a1*; **e**, *Hsd3b1/2*; **f**, *Hsd17b3*. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost relativne ekspresije gena od interesa (izračunate prema *Actb*) \pm SEM za svaku grupu životinja, sa $n \geq 6$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.



Slika 4.13. Nivo proteina StAR, CYP11A1 i 3β-HSD u intersticijalnim ćelijama. Iz intersticijalnih ćelija testisa pacova izolovani su proteini, razdvojeni SDS-PAGE-om i analizirani metodom vestern blot. **a**, StAR; **b**, CYP11A1; **c**, 3β-HSD. Reprezentativni imunoblotovi za svaki protein od interesa uz odgovarajuću endogenu kontrolu (β-aktin ili ukupne proteine) predstavljani su na desnoj strani svake slike. Na levoj strani prikazani su rezultati kvantifikacije za dati protein, kao odnos OD proteina od interesa i odgovarajuće endogene kontrole iz iste kolone, normalizovani prema FK grupi koja predstavlja 100% (± SEM). Ostale grupe su predstavljene kao procenat promene u odnosu na FK, kao srednja vrednost ± SEM ($n = 3$ ponavljanja za svaki protein). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

4.13. Imunohistohemijsko obeležavanje proteina StAR u tkivu testisa

Imunohistohemijsko obeležavanje proteina StAR na poprečnim presecima testisa iz FK i Ep grupa prikazano je na Slici 4.14. Imunoreaktivne StAR-pozitivne ćelije mogle su se uočiti u intersticijalnom prostoru testisa kako kontrolnih životinja (Slika 4.14a) tako i pacova Ep grupe (Slika 4.14b). Intenzitet obojenosti specifične za StAR bio je manji na presecima testisa Ep grupe u odnosu na na preseke FK grupe životinja.



Slika 4.14. Imunohistohemijsko obeležavanje proteina StAR u testisima. Poprečni preseki testisa pacova **a**, FK grupe i **b**, Ep grupe su imunohistohemijski obeleženi na protein StAR i dodatno obojeni hematoksilinom. Na malom uveličanju (levo) uočava se obojenost specifična za StAR u intersticijalnom prostoru testisa na presecima iz obe grupe pacova (strelice na a i b). Na velikom uveličanju (desno), mogu se videti jasno obojene StAR-imunopozitivne ćelije u intersticijumu, koje su intenzivnije obojene na preseku testisa FK grupe nego Ep grupe. Razmernik: 100 μ m (levo), 25 μ m (desno).

4.14. Ispitivanje ekspresije markera inflamacije u tkivu testisa

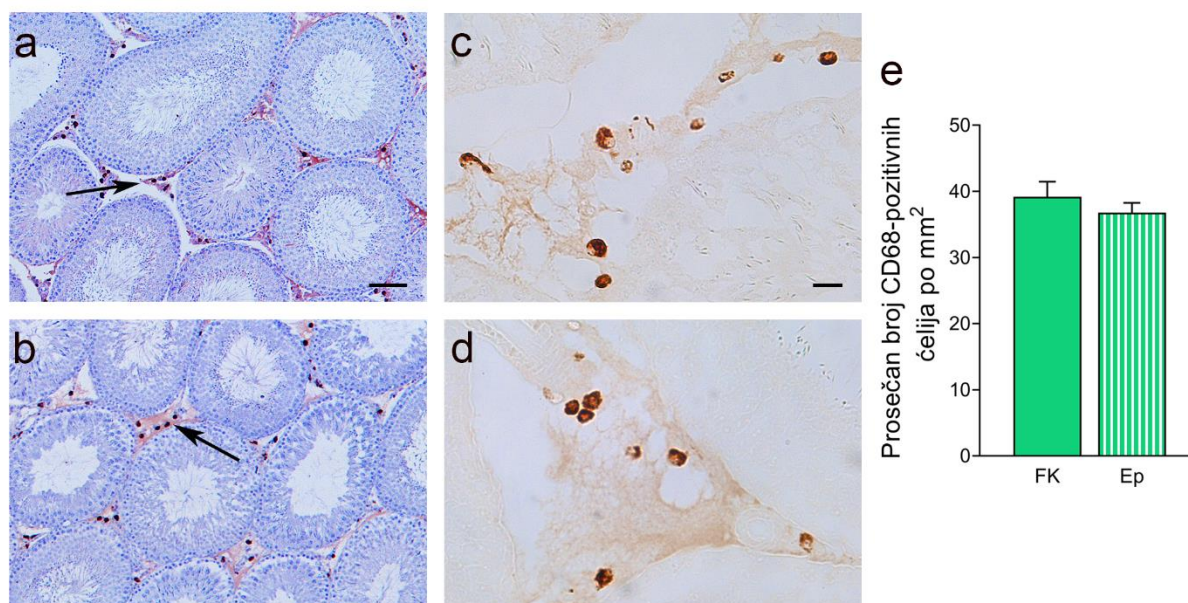
Rezultati analize ekspresije markera inflamacije u testisima su pokazali da se nivo iRNK *Tnfa*, *Ifng*, *Il1b* i *Il6* nije menjao tokom razvoja EAE-a (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Ekspresija proinflamatornih markera u tkivu testisa.

	FK	Ea	Ep	Ek
<i>Tnfa</i>	0,0076 ± 0,0005	0,0062 ± 0,0002	0,004 ± 0,0006	0,006 ± 0,0006
<i>Ifng</i>	0,005 ± 0,0005	0,003 ± 0,0002	0,003 ± 0,0004	0,004 ± 0,0005
<i>Il1b</i>	0,045 ± 0,005	0,043 ± 0,001	0,042 ± 0,005	0,048 ± 0,003
<i>Il6</i>	0,0007 ± 0,0001	0,0009 ± 0,0001	0,0009 ± 0,0002	0,0007 ± 0,0001

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost relativne ekspresije gena od interesa (izračunate prema *Actb*) ± SEM za svaku grupu životinja, sa $n \geq 6$ životinja/grupi.

Preseci testisa su imunohistohemijski obeleženi na protein CD68, marker makrofaga (Slika 4.15). Jasno obojene CD68-pozitivne ćelije uočene su u intersticijalnom prostoru, ali ne i u seminiferim tubulama testisa, kako životinja FK grupe (Slika 4.15a), tako i Ep grupe (Slika 4.15b i 4.15d). Kvantifikacijom CD68-pozitivnih ćelija potvrđeno je da nije bilo razlike u broju ovih ćelija između FK ($39,18 \pm 2,27$ ćelija/mm²) i Ep grupe ($36,77 \pm 1,49$ ćelija/mm², Slika 4.15e).

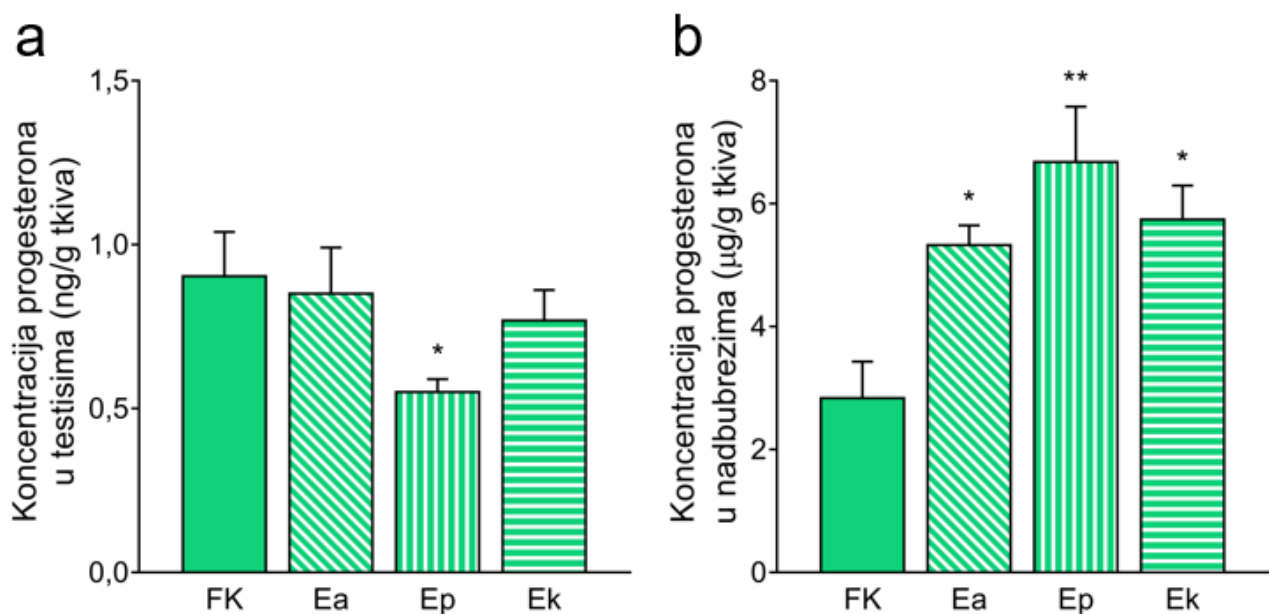


Slika 4.15. Imunohistohemijsko obeležavanje makrofaga testisa. Obojene CD68-pozitivne ćelije mogu se uočiti u intersticijumu, ali ne i seminiferim tubulama na poprečnim presecima testisa pacova **a**, FK grupe i **b**, Ep grupe (strelice na a i b). Jasno obojene okruglaste CD68-pozitivne ćelije uočavaju se i na većem uveličanju na preseku testisa **c**, FK grupe i **d**, Ep grupe. Preseci su dodatno obojeni hematoksilinom (a, b). Razmernik: 100 μ m (a i b), 20 μ m (c i d). **e**, prosečan broj CD68-imunopozitivnih ćelija na presecima testisa pacova FK i Ep grupa (broj ćelija/mm²) ± SEM, brojano na tri preseka testisa po životinji i 10 kadrova po preseku za obe grupe, $n = 4$ životinje/grupi; Man-Vitnijev test.

4.15. Koncentracija progesterona u ekstrahovanim steroidima iz testisa i nadbubrega

Rezultati merenja koncentracije progesterona u uzorcima steroida ekstrahovanih iz tkiva testisa i nadbubrežnih žlezda prikazani su na Slici 4.16.

Zabeleženo je značajno smanjenje koncentracije progesterona u testisima mužjaka na vrhuncu bolesti (0.55 ± 0.04 ng/g tkiva) u odnosu na kontrolne životinje (0.91 ± 0.13 ng/g tkiva; Slika 4.16a). S druge strane, u nadbubrežnim žlezdama uočeno je značajno povećanje koncentracije ovog hormona u odnosu na FK grupu ($2,85 \pm 0,58$ μ g/g tkiva), i to tokom čitavog trajanja EAE-a: na početku ($5,34 \pm 0,30$ μ g/g tkiva), vrhuncu ($6,70 \pm 0,88$ μ g/g tkiva) i kraju bolesti ($5,76 \pm 0,53$ μ g/g tkiva; Slika 4.16b).



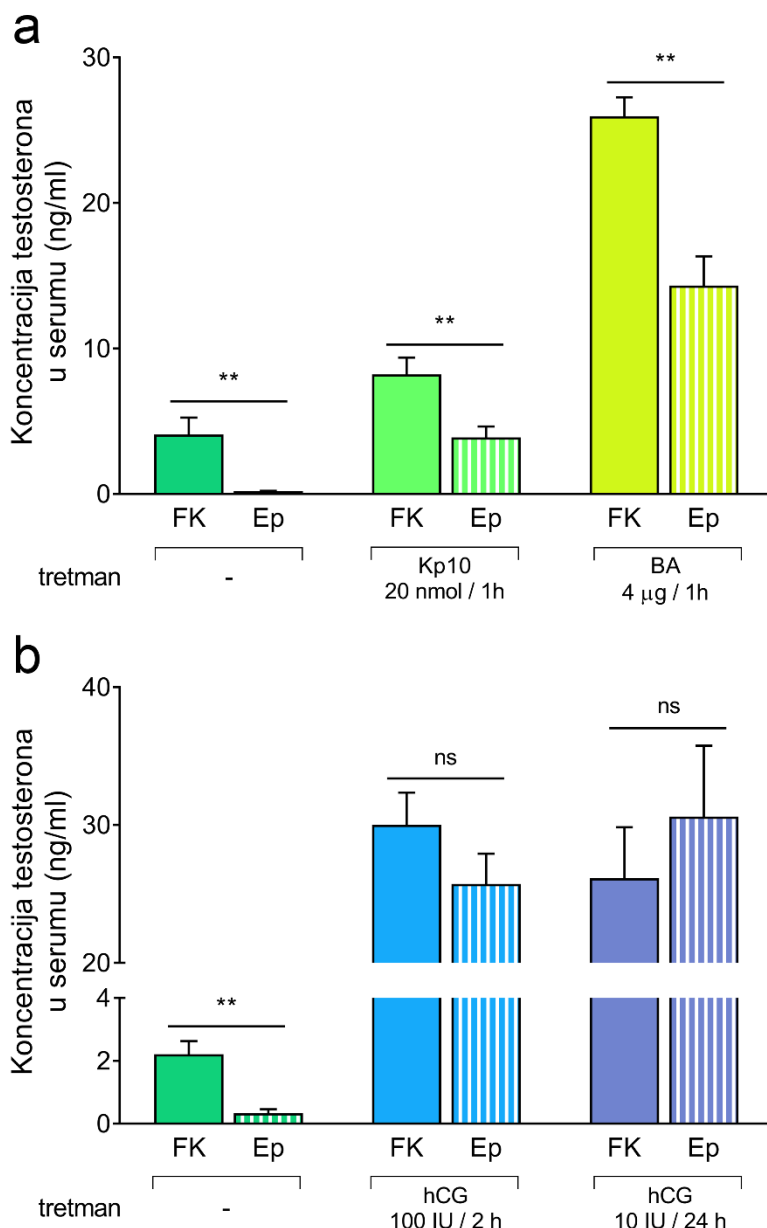
Slika 4.16. Koncentracija progesterona u uzorcima steroida ekstrahovanih iz testisa i nadbubrega. Tkivo testisa i nadbubrežnih žlezda je homogenizovano, steroidi su ekstrahovani etrom i rastvoreni. Koncentracija progesterona izmerena je metodom ELISA. **a**, Koncentracija progesterona u testisima (ng/g tkiva); **b**, Koncentracija progesterona u nadbubrežnim žlezdama (μ g/g tkiva). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije testosterona \pm SEM, za $n \geq 5$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Kruskal-Volison test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

4.16. Koncentracija testosterona u serumu nakon tretmana kisperinom, buserelin acetatom i humanim horionskim gonadotropinom

Efekti tretmana Kp10 i BA na koncentraciju testosterona u serumu mužjaka prikazani su na Slici 4.17a. Kao što je već utvrđeno, koncentracija testosterona u Ep grupi bila je značajno smanjena ($0,19 \pm 0,02$ ng/ml) u odnosu na FK grupu ($4,09 \pm 1,16$ ng/ml; Slika 4.17a, levo). Nakon tretmana sa Kp10, zabeležen je porast koncentracije testosterona u serumu, međutim koncentracija testosterona u serumu pacova Ep grupe je i dalje bila značajno niža ($3,89 \pm 0,76$ ng/ml) u odnosu na Kp10-tretiranu FK grupu ($8,22 \pm 1,15$ ng/ml; Slika 4.17a, sredina). Sličan efekat imao je i tretman BA: zabeležen je porast u FK i Ep grupama u odnosu na odgovarajuće netretirane grupe,

ali je u BA-tretiranoj Ep grupi registrovana značajno niža koncentracija testosterona ($14,31 \pm 2,01$ ng/ml) u odnosu na FK grupu tretiranu sa BA ($25,95 \pm 1,31$ ng/ml; Slika 4.17a, desno).

Na Slici 4.17b prikazane su koncentracije testosterona u serumu nakon tretmana hCG-om. I u ovom ogledu, u Ep grupi mužjaka je registrovana smanjena koncentracija testosterona ($0,34 \pm 0,13$ ng/ml) u serumu, u odnosu na kontrolne životinje ($2,21 \pm 0,42$ ng/ml; Slika 4.17b, levo). Dva sata nakon tretmana hCG-om (100 IU), registrovano je višestruko povećanje koncentracije testosterona u serumu u obe eksperimentalne grupe (FK: $30,02 \pm 2,34$ ng/ml; Ep: $25,73 \pm 2,20$ ng/ml) ali nije zabeležena razlika između ovih grupa (Slika 4.17b, sredina). Tretman od 10 IU hCG-a nakon 24 h doveo je do sličnih efekata: zabeležen je porast koncentracije testosterona u serumu, koja se nije razlikovala između FK ($26,15 \pm 3,69$ ng/ml) i Ep grupa životinja ($30,61 \pm 5,14$ ng/ml; Slika 4.17b, desno).



Slika 4.17. Koncentracija testosterona u serumu mužjaka nakon Kp10, BA i hCG tretmana. Pacovi su tretirani bolus injekcijom kipeptina (Kp10, 20 nmol, i.p.) ili buserelin acetata (BA, 4 ug, i.p.) ili humanog horionskog gonadotropina (hCG, 100 IU ili 10 IU, s.c.). Životinje su žrtvovane 1 h nakon tretmana sa Kp10 ili BA, odnosno 2 h nakon

tretmana sa 100 IU hCG-a ili 24 h nakon tretmana sa 10 IU hCG-a. Koncentracija testosterona u serumu analizirana je metodom ELISA. **a**, Koncentracija testosterona u serumu nakon tretmana Kp10 ili BA; **b**, Koncentracija testosterona u serumu nakon tretmana hCG-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracije testosterona (u ng/ml seruma) \pm SEM, za $n \geq 6$ životinja/grupi. ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; Man-Vitnijev test.

4.17. Ekspresija komponenata steroidogene mašinerije u intersticijalnim ćelijama nakon tretmana hCG-om

Obrazac genske ekspresije komponenata steroidogene mašinerije nakon tretmana hCG-om prikazan je na Slici 4.18.

Kao što je prethodno utvrđeno, ekspresija *Star* je bila značajno smanjena u Ep grupi u odnosu na FK grupu mužjaka (Slika 4.18a, levo). Dva sata nakon hCG tretmana (100 IU), zabeležen je porast ekspresije *Star* u Ep grupi, ali je ekspresija bila značajno manja u odnosu na jednako tretiranu FK grupu (Slika 4.18a, sredina). Porast nivoa *Star* iRNK zabeležen je 24 h nakon tretmana sa 10 IU hCG-a u FK i Ep grupama, pri čemu nije uočena razlika između ove dve grupe tretiranih životinja (Slika 4.18a, desno).

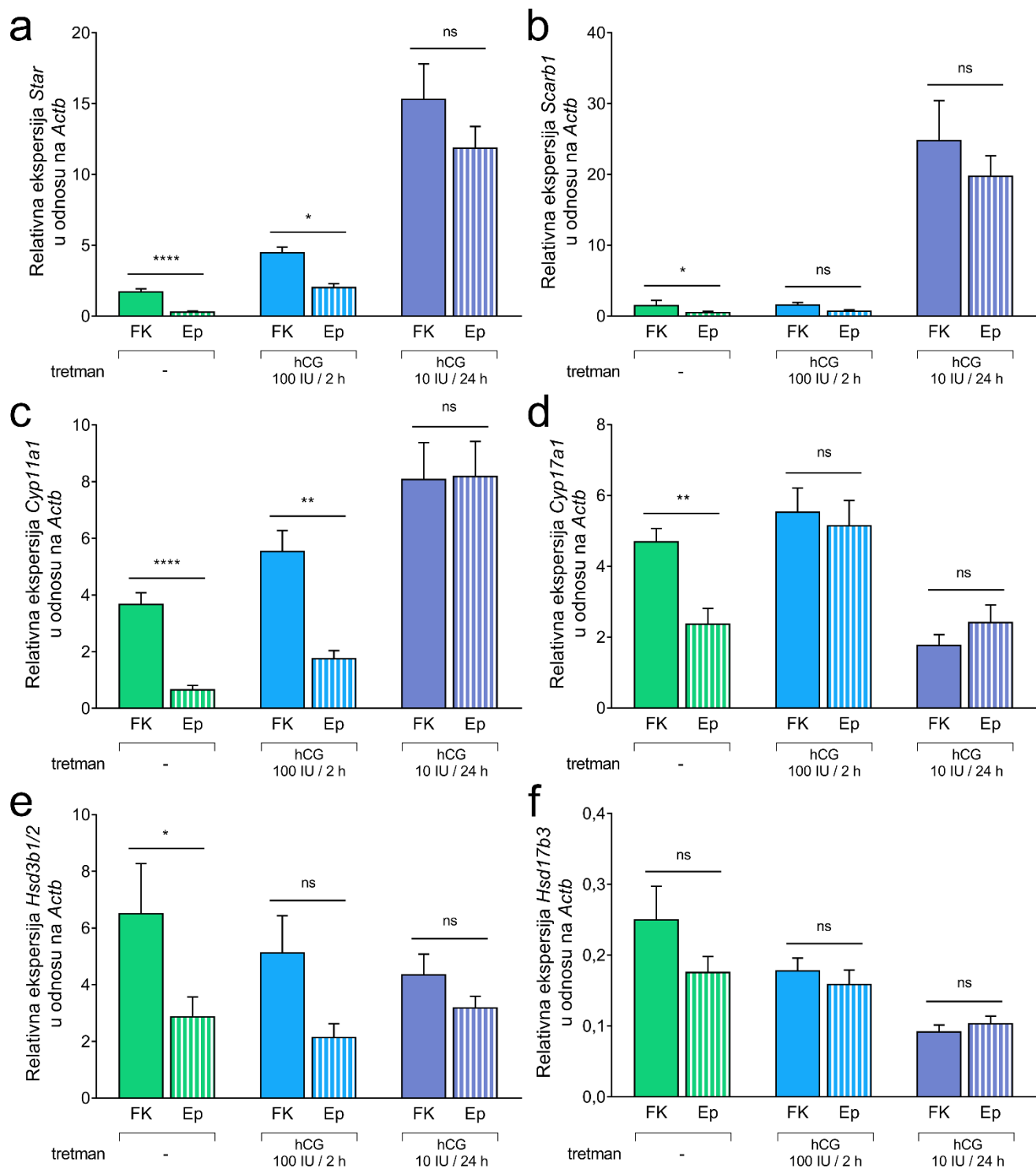
Kao što je prethodno zabeleženo, ekspresija *Scarb1* je takođe bila smanjena u Ep grupi pacova, u poređenju sa životinjama FK grupe (Slika 4.18b, levo). Nakon tretmana hCG-om, razlike u ekspresiji ovog gena između FK i Ep grupa nisu uočene (Slike 4.18b, sredina i desno).

Ekspresija *Cyp11a1*, koja je bila značajno manja u Ep grupi u poređenju sa FK grupom pacova (Slika 4.18c, levo), 2 h nakon tretmana sa 100 IU hCG-a ostala je značajno manja u Ep grupi u odnosu na FK grupu (Slika 4.18c, sredina). Pri tretmanu od 10 IU hCG-a, nakon 24 h, nije bilo razlike u nivou *Cyp11a1* iRNK između FK i Ep grupa (Slika 4.18c, desno).

Efekat tretmana hCG-om na ekspresiju *Cyp17a1* prikazan je na Slici 4.18d. Kod pacova Ep grupe, u odnosu na životinje FK grupe, prethodno je uočen smanjen nivo *Cyp17a1* iRNK (Slika 4.18d, levo). Dva sata nakon tretmana hCG-om od 100 IU, ekspresija ovog gena je povećana u obe tretirane grupe, ali nije zabeležena razlika između FK i Ep grupa (Slika 4.18d, sredina). Tretman sa 10 IU hCG-a nakon 24 h doveo je do smanjenja ekspresije *Cyp17a1* u FK grupi u odnosu na netretirane kontrolne životinje, i nije zabeležena razlika između FK i Ep grupa nakon ovog tretmana (Slika 4.18d, desno).

Razlika u ekspresiji *Hsd3b1/2* uočena je između FK i Ep grupa (Slika 4.18e, levo), ali nije zabeležena nakon tretmana hCG-om (Slika 4.18e, sredina i desno)

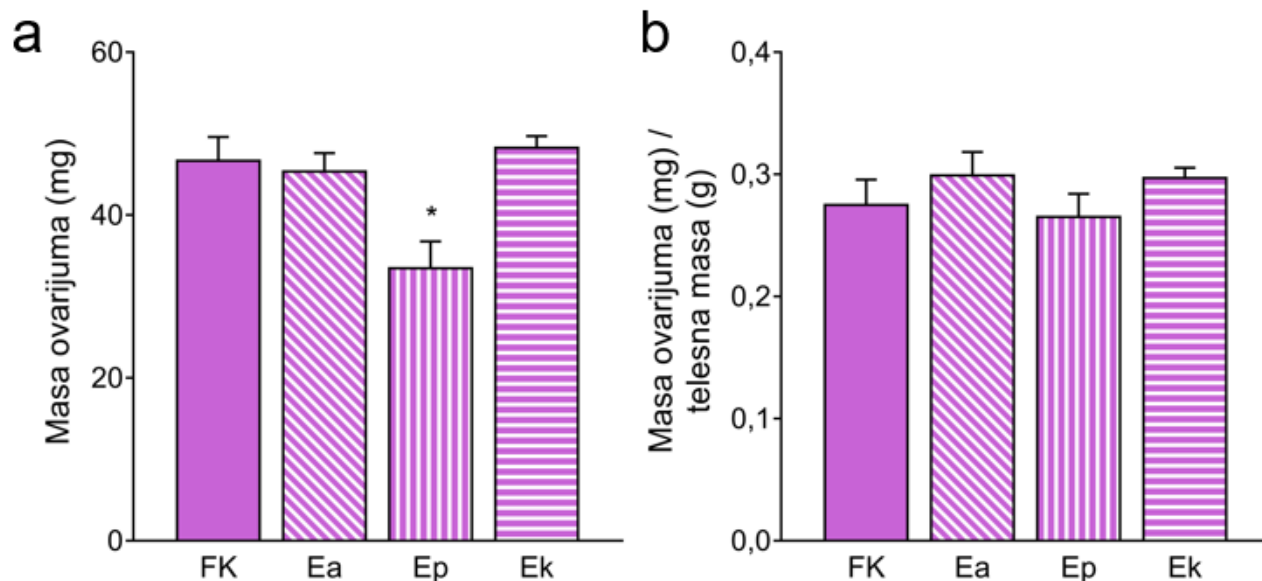
Ekspresija *Hsd17b3* se nije razlikovala između FK i Ep grupa pacova (Slika 4.18f, levo). Nakon tretmana hCG-om takođe nije zabeležena razlika između tretiranih grupa (Slika 4.18f, sredina i desno), mada je 24 h nakon 10 IU hCG-a registrovano smanjenje nivoa iRNK za *Hsd17b3* u obe tretirane grupe u odnosu na odgovarajuće grupe netretiranih životinja.



Slika 4.18. Efekat tretmana hCG-om na gensku ekspresiju komponenata steroidogene mašinerije u intersticijalnim ćelijama testisa. Mužjaci pacova FK i Ep grupa tretirani su sa 100 IU hCG-a s.c. i žrtvovani nakon 2 h (na svakom grafiku u sredini), odnosno sa 10 IU hCG-a s.c. i žrtvovani nakon 24 h (na svakom grafiku desno). Genska ekspresija komponenata steroidogene mašinerije analizirana je u izolovanim intersticijalnim ćelijama testisa metodom qPCR. **a**, *Star*; **b**, *Scarb1*; **c**, *Cyp11a1*; **d**, *Cyp17a1*; **e**, *Hsd3b1/2*; **f**, *Hsd17b3*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost relativne ekspresije gena od interesa (izračunate prema *Actb*) ± SEM za svaku grupu životinja, sa $n \geq 6$ životinja/grupi. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; Man-Vitnijev test.

4.18. Masa ovarijuma

Značajno smanjenje u masi ovarijuma zabeleženo je u Ep grupi ($33,60 \pm 3,16$ mg) u odnosu na FK grupu životinja ($46,80 \pm 2,80$ mg; Slika 4.19a). Međutim, imajući u vidu da su životinje izgubile na telesnoj masi, kada se analizira odnos između mase ovarijuma i telesne mase, nisu zabeležene promene tokom EAE-a (Slika 4.19b).

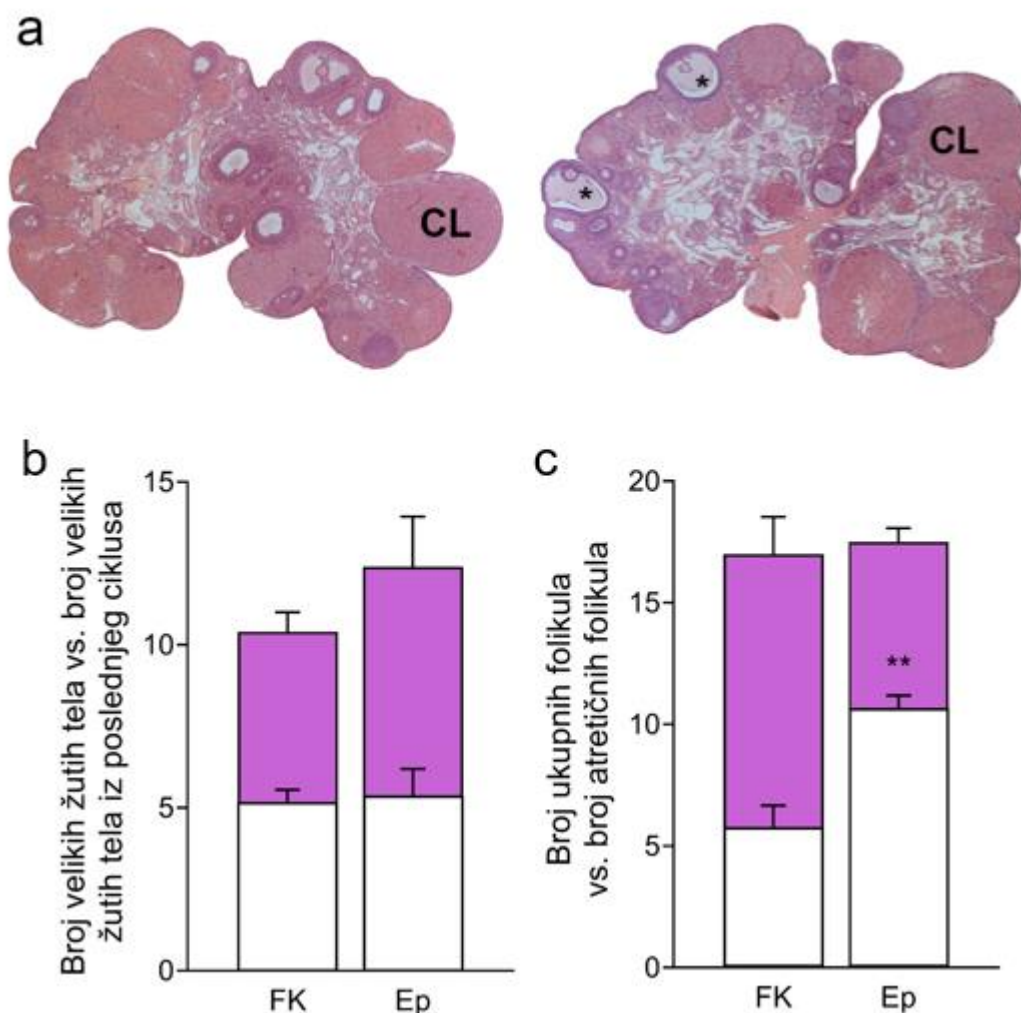


Slika 4.19. Masa ovarijuma. **a**, Prosečna masa ovarijuma (mg); **b**, Odnos mase ovarijuma i telesne mase (mg/g). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM, za $n \geq 5$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

4.19. Histološki prikaz ovarijuma i morfometrijski parametri

Na Slici 4.20 prikazane su reprezentativne mikrografije preseka ovarijuma životinje iz FK grupe, u D₂ (Slika 4.20a levo) i životinje iz Ep grupe, u D₄ (Slika 4.20a, desno) obojenih hematoksilinom/eozinom. Na presecima ovarijuma životinja iz obe grupe, uočeni su svi tipovi folikula osim preovulatornih, kao i žuta tela sa i bez znakova regresije.

Dalja morfometrijska analiza pokazala je da je broj velikih žutih tela (preko 800 μ m u prečniku) bio sličan između ženki FK grupe ($10,40 \pm 0,60$) i Ep grupe ($12,40 \pm 1,54$). Među velikim žutim telima, udeo žutih tela koja, s obzirom na odsustvo znakova degeneracije, pripadaju poslednjem započetom estrusnom ciklusu takođe se nije razlikovao između FK ($5,20 \pm 0,37$) i Ep grupa ($5,40 \pm 0,81$; Slika 4.20b). S druge strane, iako se ukupan broj velikih folikula nije razlikovao između grupa (FK: $17,20 \pm 1,85$; Ep: $17,80 \pm 0,58$), zabeležen je značajno veći broj atretičnih/cističnih folikula u ovarijumima životinja Ep grupe ($10,40 \pm 0,51$) nego kod pacova iz FK grupe ($5,80 \pm 0,97$; Slika 4.20c).



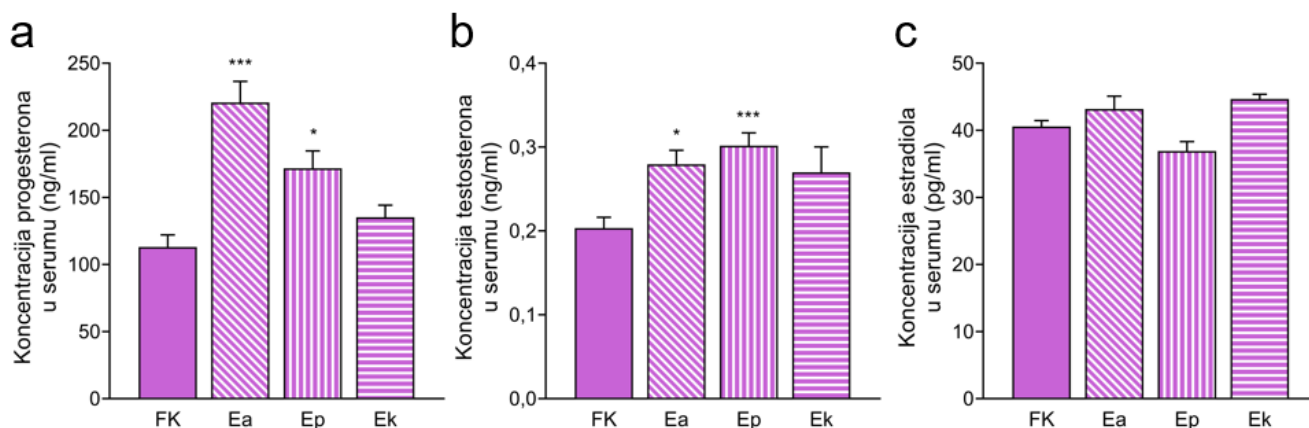
Slika 4.20. Histološki prikaz preseka ovarijuma i morfometrijski parametri. a, Reprezentativne mikrografije preseka ovarijuma obojenih hematoksilinom/eozinom, pacova iz FK grupe, u D₂ (levo), i Ep grupe, u D₄ (desno). CL – žuto telo; * - atretični folikul; b, Broj velikih žutih tela, dijametra većeg od 800 μm (ljubičasti stubići) u odnosu na broj žutih tela iz poslednjeg estrusnog ciklusa (beli stubići); c, Ukupan broj velikih folikula (ljubičasti stubići) u odnosu na broj atretičnih/cističnih folikula (beli stubići). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM broja žutih tela/folikula izbrojanih na 350 μm udaljenim presecima iz celog ovarijuma (n = 5 životinja / grupi). ** $p < 0.01$; Man-Vitnijev test.

4.20. Koncentracije polnih hormona u serumu ženki

Rezultati merenja koncentracija polnih hormona u serumu ženki pacova predstavljani su na Slici 4.21.

Koncentracija progesterona u serumu je bila povišena u Ea grupi ($220,70 \pm 15,82$ ng/ml) u odnosu na FK grupu ($113,10 \pm 8,97$ ng/ml), a povećanje je registrovano i u Ep grupi ($171,70 \pm 13,00$ ng/ml; Slika 4.21a). U Ek grupi, koncentracija progesterona u serumu se nije razlikovala u odnosu na FK grupu. Koncentracija testosterona u cirkulaciji je, u odnosu na FK grupu ($0,20 \pm 0,01$ ng/ml), bila značajno povećana u Ea grupi ($0,28 \pm 0,02$ ng/ml, $p = 0,025$) i u Ep grupi ($0,30 \pm 0,02$ ng/ml). Na kraju EAE-a nisu registrovane promene u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Slika

4.21b). Promena koncentracije estradiola u serumu nije zabeležena ni u jednoj eksperimentalnoj grupi (Slika 4.21c).

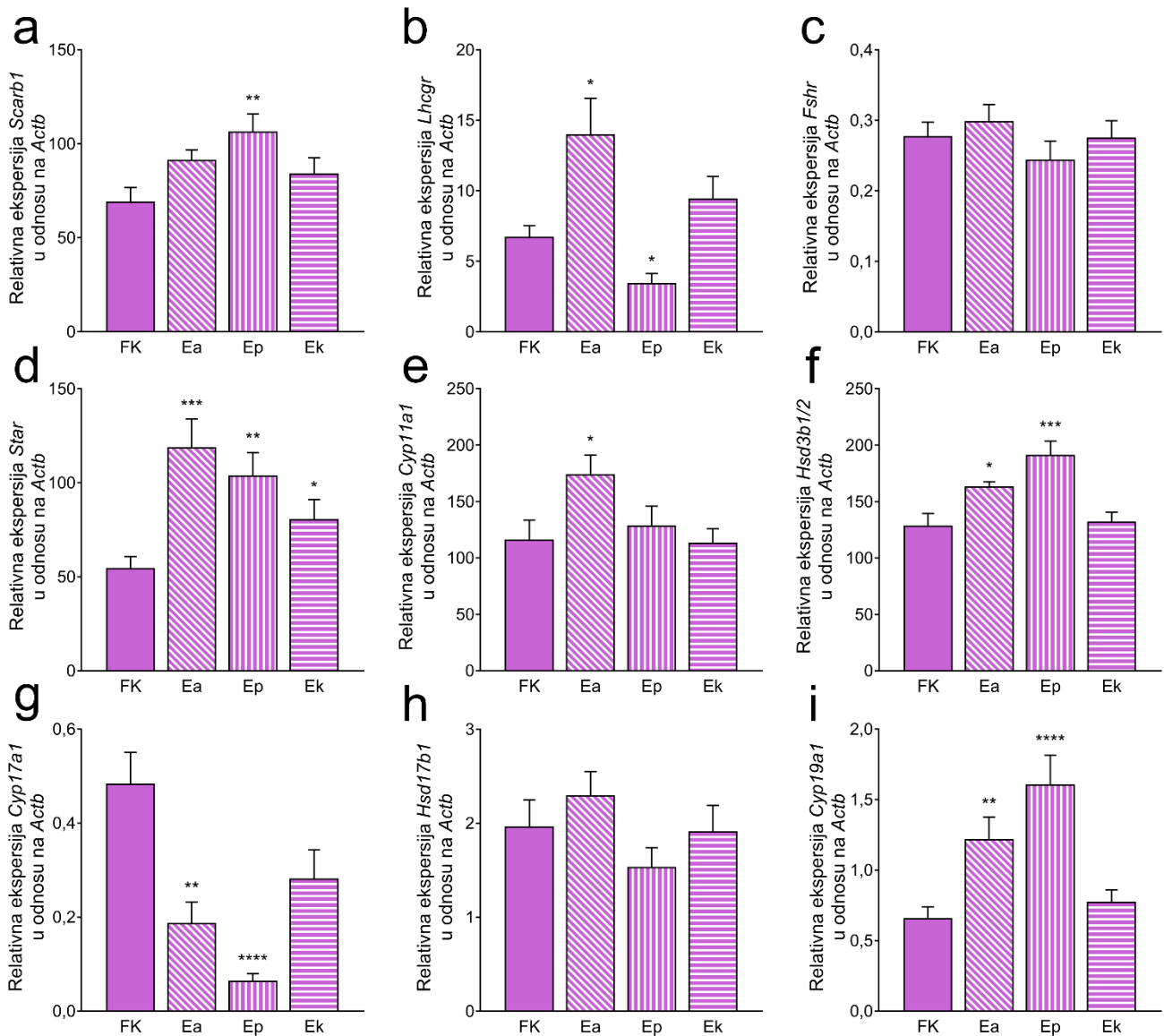


Slika 4.21. Koncentracija polnih hormona u serumu ženki pacova. Koncentracija progesterona, testosterona i estradiola u serumu izmerena je ELISA metodom. **a**, Progesteron (ng/ml); **b**, Testosteron (ng/ml) **c**, Estradiol (pg/ml). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracije hormona \pm SEM, za $n \geq 5$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

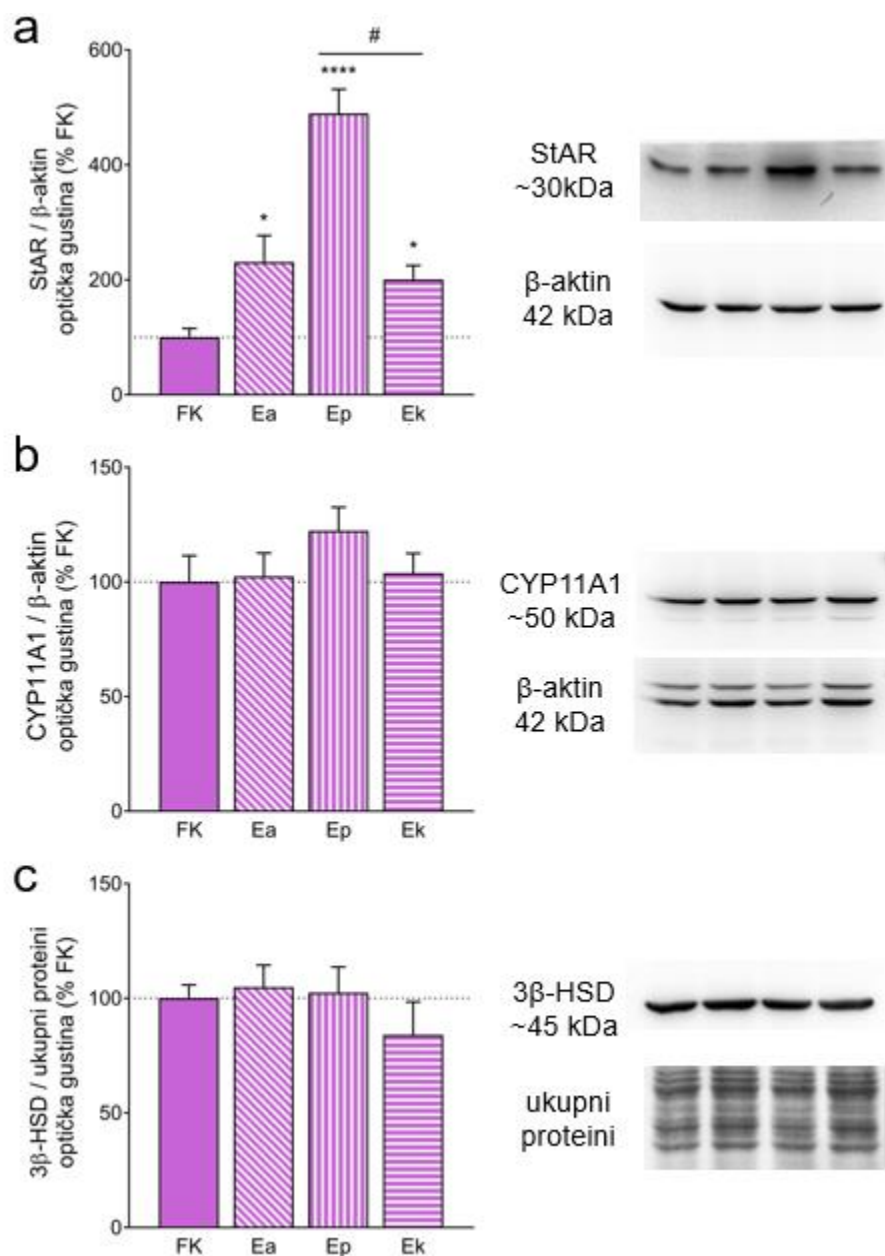
4.21. Genska ekspresija i nivo proteina komponenata steroidogene mašinerije u tkivu ovarijuma

Obrazac genske ekspresije komponenata steroidogene mašinerije u tkivu ovarijuma predstavljen je na Slici 4.22. Značajno povećanje ekspresije gena *Scarb1* uočeno je u Ep grupi (Slika 4.22a). Nivo *Lhcgr* iRNK je bio značajno povećan u Ea grupi a zatim značajno smanjen u Ep grupi (Slika 4.22b) u odnosu na životinje FK grupe. Promene ekspresije *Fshr* tokom razvoja EAE-a nisu uočene (Slika 4.22c). Zabeleženo je značajno povećanje ekspresije *Star* u sve tri grupe imunizovanih životinja (Slika 4.22d), dok je povećanje ekspresije *Cyp11a1* bilo ograničeno na Ea grupu (Slika 4.22e). Povećanje nivoa *Hsd3b1/2* iRNK registrovano je u Ea i Ep grupama (Slika 4.22f). Nasuprot tome, ekspresija *Cyp17a1* bila je značajno smanjena u Ea i Ep grupama, pri čemu je to smanjenje bilo izraženije u Ep grupi (Slika 4.22g). Promene u ekspresiji gena *Hsd17b1* nisu zabeležene (Slika 4.22h), dok je ekspresija *Cyp19a1* iRNK bila značajno povećana u Ea i Ep grupama životinja u poređenju sa pacovima FK grupe (Slika 4.22i).

Rezultati analize nivoa proteina StAR, CYP11A1 i 3β -HSD u tkivu ovarijuma predstavljeni su na Slici 4.23. Kvantifikacijom OD i normalizacijom prema FK grupi (100%) pokazano je značajno povećanje nivoa StAR u svim eksperimentalnim grupama (Slika 4.23a). Statistička analiza je pokazala da je nivo proteina StAR u Ek grupi bio značajno smanjen u odnosu na Ep. Na osnovu rezultata kvantifikacije utvrđeno je da u ovarijumima nije bilo promena u nivou proteina CYP11A1 (Slika 4.23b) i 3β -HSD (Slika 4.23c) ni u jednoj eksperimentalnoj grupi.



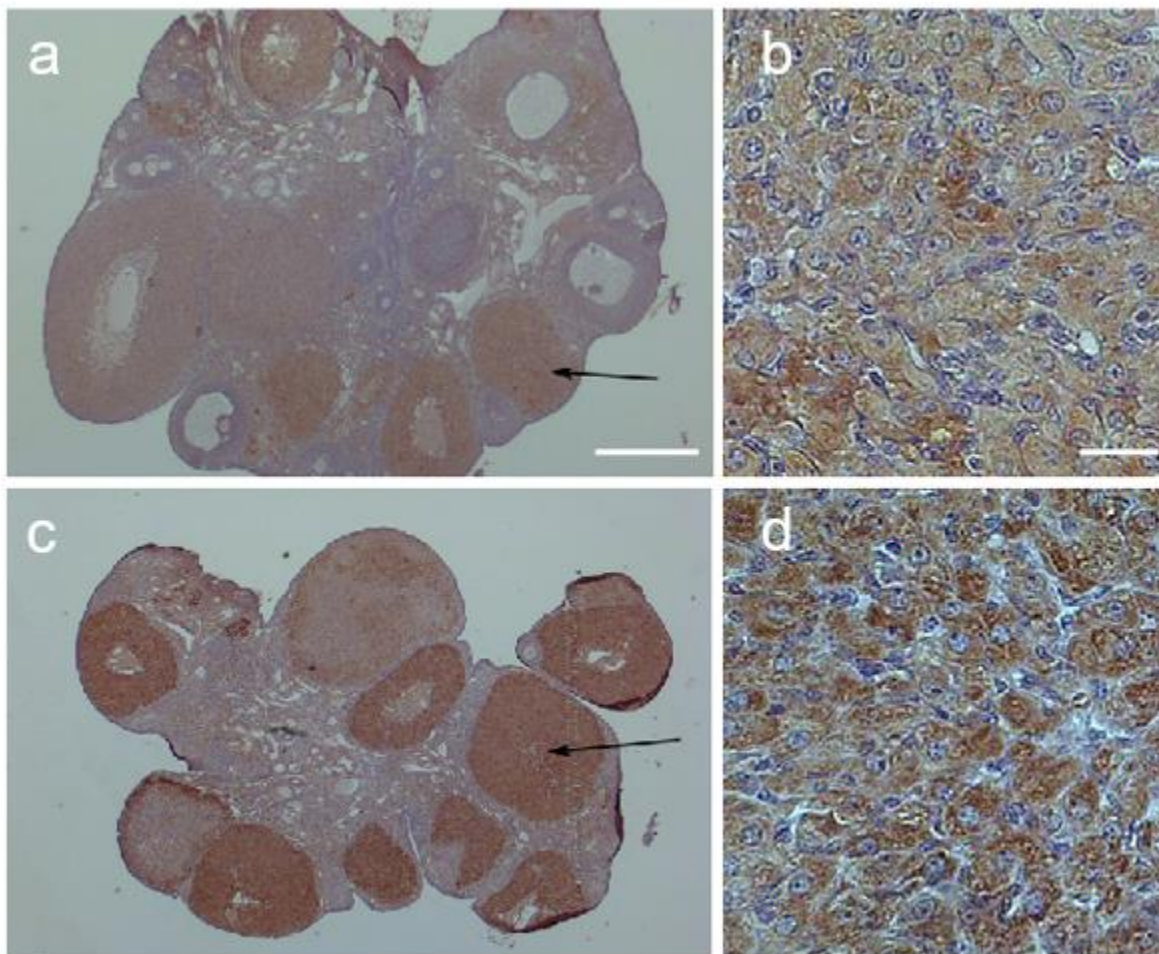
Slika 4.22. Genska ekspersija komponenta steroidogene mašinerije u ovarijumima. Nivoi iRNK za proteine/enzime učesnike procesa steroidogeneze ispitani su metodom qPCR. **a**, *Scarb1*; **b**, *Lhcgr*; **c**, *Fshr*; **d**, *Star*; **e**, *Cyp11a1*; **f**, *Hsd3b1/2*; **g**, *Cyp17a1*; **h**, *Hsd17b1*; **i**, *Cyp19a1*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost relativne ekspresije gena od interesa (izračunate prema *Actb*) \pm SEM za svaku grupu životinja, sa $n \geq 12$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.



Slika 4.23. Nivo proteina StAR, CYP11A1 i 3 β -HSD u ovarijumima. Iz tkiva ovarijuma izolovani su proteini, razvojeni SDS-PAGE-om i analizirani metodom vestern blot. **a**, StAR; **b**, CYP11A1; **c**, 3 β -HSD. Na desnoj strani svake slike predstavljeni su reprezentativni imunoblotovi za svaki protein uz odgovarajuću endogenu kontrolu (β -aktin ili ukupne proteine). Na levoj strani prikazani su rezultati kvantifikacije za dati protein od interesa, kao odnos OD proteina od interesa i odgovarajuće endogene kontrole iz iste kolone, normalizovani prema FK grupi koja predstavlja 100% (\pm SEM). Ostale grupe predstavljene su kao procenat promene u odnosu na FK grupu, kao srednja vrednost \pm SEM ($n \geq 5$ ponavljanja za svaki protein, iz dva nezavisna EAE ogleda). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ u odnosu na FK grupu; # $p < 0,05$ u odnosu na Ep grupu; Kruskal-Volison test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

4.22. Imunohistohemijsko obeležavanje StAR na presecima ovarijuma

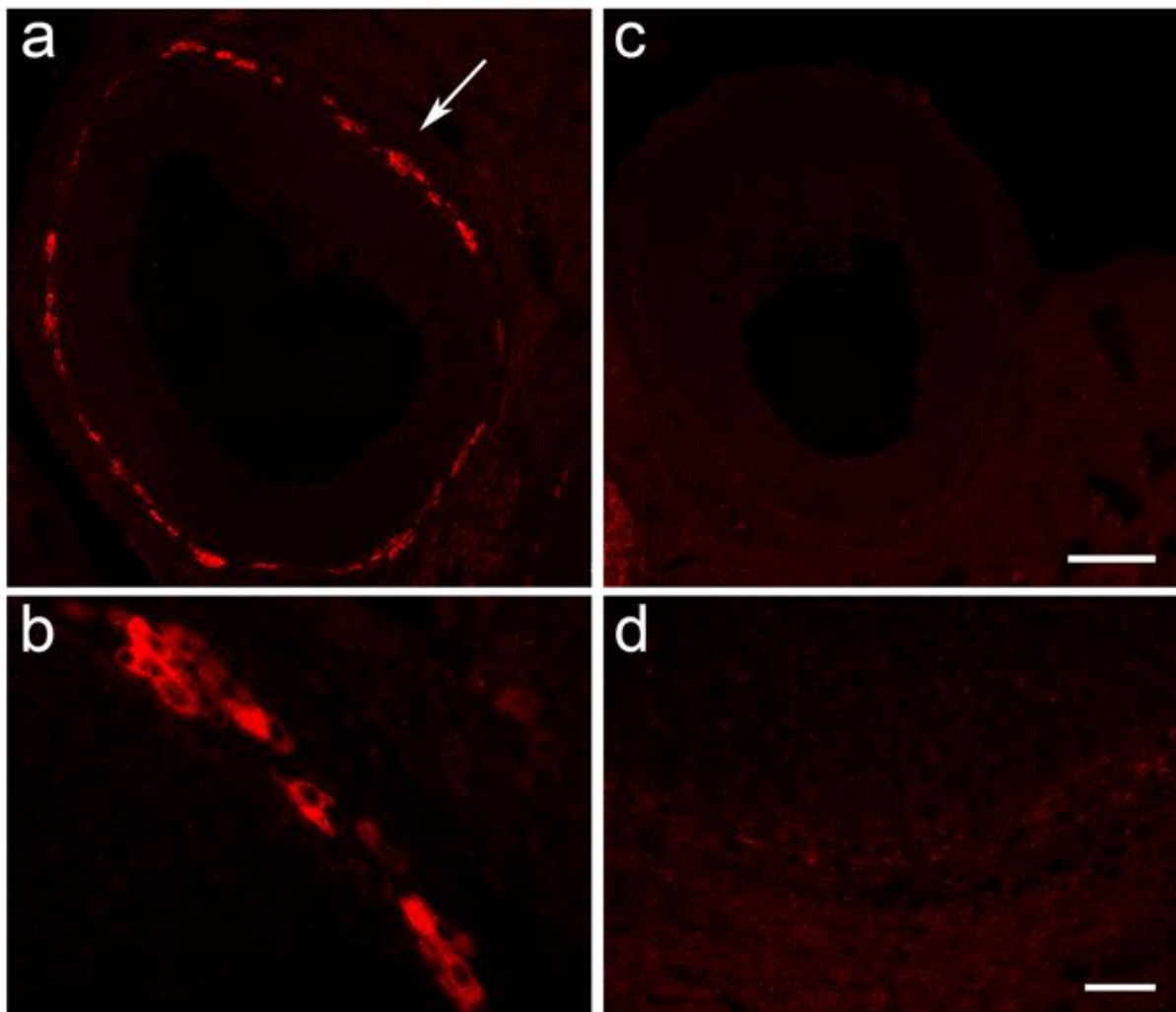
Preseci ovarijuma iz FK i Ep grupa pacova imunohistohemijski su obeleženi na protein StAR. Reprezentativne mikrofografije prikazane su na Slici 4.24. Obojenost specifična za StAR uočena je na presecima ovarijuma i kontrolnih (Slika 4.24a i 4.24b) i životinja Ep grupe (Slika 4.24c i 4.24d), pretežno u luteinskim ćelijama. Uočeno je da je intenzitet obojenosti StAR-pozitivnih ćelija bio veći na presecima ovarijuma iz Ep grupe.



Slika 4.24. Imunohistohemijsko obeležavanje StAR proteina na presecima ovarijuma. **a**, Presek ovarijuma iz kontrolne životinje, u D₂, ukazuje na StAR-imunopozitivno bojenje u žutim telima, prikazano na **b**, u većem uveličanju. **c**, Presek ovarijuma životinje iz Ep grupe, u D₄. Uočeno je bojenje imunopozitivno za StAR jačeg intenziteta u odnosu na bojenje u ovarijumu iz kontrolne životinje, prikazano i na **d**, većem uveličanju. Strelice na **a** i **c** ukazuju na žuta tela koja su prikazana na **b** i **d**. Razmernik: 500 μm (a i c), 25 μm (b i d).

4.23. Imunofluorescentno obeležavanje CYP17A1 na presecima ovarijuma

Prisustvo proteina CYP17A1 na presecima ovarijuma ispitano je imunofluorescentnim obeležavanjem. Reprezentativne mikrografije predstavljene su na Slici 4.24. Na presecima ovarijuma iz životinja FK grupe mogle su se uočiti jasno obojene CYP17A1-pozitivne ćelije, i to isključivo u ćelijama *theca interna* sloja folikula (Slika 4.25a i 4.25b). U ovarijumima izolovanim iz životinja Ep grupe nisu uočene CYP17A1-pozitivne ćelije (Slika 4.25c i 4.25d).

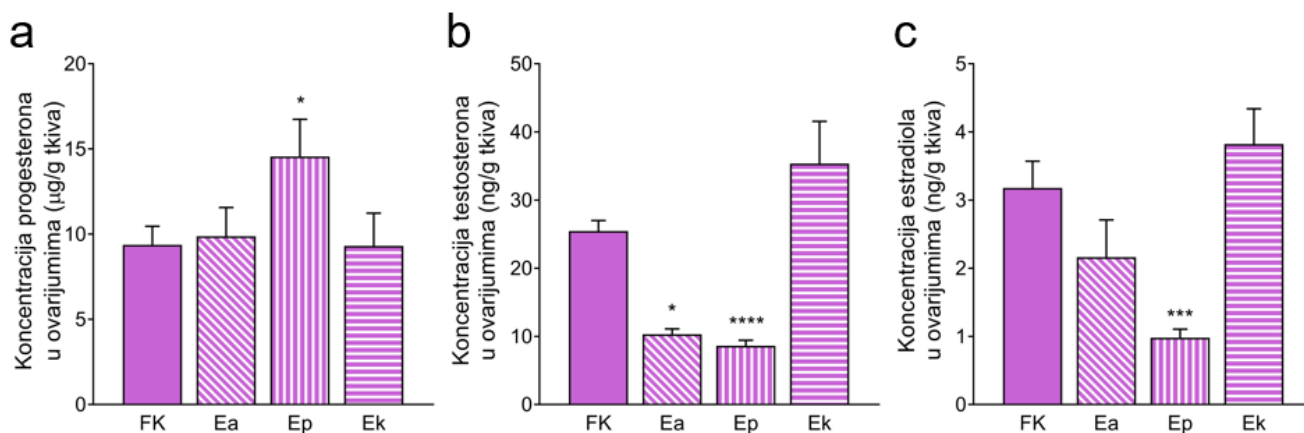


Slika 4.25. Imunofluorescentno obeležavanje enzima CYP17A1 na presecima ovarijuma. a, Presek ovarijuma ženke iz FK grupe, u D₂, ukazuje na jasno obojene CYP17A1-imunopozitivne ćelije u *theca interna* sloju folikula, što se jasnije vidi na većem uveličanju na b. Strelica ukazuje na region *theca interna* koji je predstavljen na većem uveličanju. c, Na preseku ovarijuma životinje iz Ep grupe, u D₄, može se uočiti da *theca interna* nije specifično obojena na CYP17A1, prikazano i na većem uveličanju na d. Razmernik: 100 μm (a i c), 20 μm (b i d).

4.24. Koncentracija polnih hormona u ekstraktima steroida ovarijuma

Koncentracije polnih hormona izmerenih u ekstraktima steroida iz tkiva ovarijuma prikazane su na Slici 4.26.

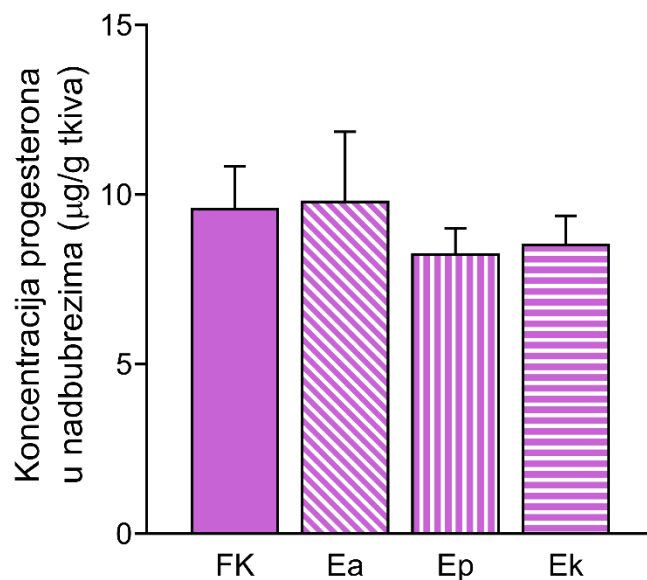
U skladu sa povećanjem ekspresije pojedinih komponenata steroidogene mašinerije, u ovarijumima je zabeležen značajan porast koncentracije progesterona u Ep grupi ($14,55 \pm 2,19 \mu\text{g/g}$ tkiva) u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($9,37 \pm 1,09 \mu\text{g/g}$ tkiva; Slika 4.26a). Suprotno koncentraciji u serumu, u ovarijumima je zabeleženo značajno smanjenje koncentracije testosterona u Ea grupi ($6,17 \pm 0,55 \text{ ng/g}$ tkiva) i Ep grupi ($5,23 \pm 0,52 \text{ ng/g}$ tkiva), u odnosu na FK grupu ($15,23 \pm 1,69 \text{ ng/g}$ tkiva). U Ek grupi, koncentracija testosterona se nije razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Slika 4.26b). Dodatno, koncentracija estradiola u ovarijumima bila je takođe smanjena, i to u Ep grupi ($0,98 \pm 0,13 \text{ ng/g}$ tkiva) u poređenju sa FK grupom ($3,18 \pm 0,39 \text{ ng/g}$ tkiva; Slika 4.26c).



Slika 4.26. Koncentracija polnih hormona u uzorcima steroida ekstrahovanih iz tkiva ovarijuma. Steroidi su ekstrahovani iz homogenata ovarijuma pomoću etra i rastvoreni u 0.1% BSA u PBS-u. Koncentracije polnih hormona u ekstraktima steroida izmerene su metodom ELISA. **a**, Progesteron ($\mu\text{g/g}$ tkiva); **b**, Testosteron (ng/g tkiva); **c**, estradiol (ng/g tkiva). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije hormona \pm SEM, za $n \geq 5$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

4.25. Koncentracija progesterona u nadbubrezima ženki

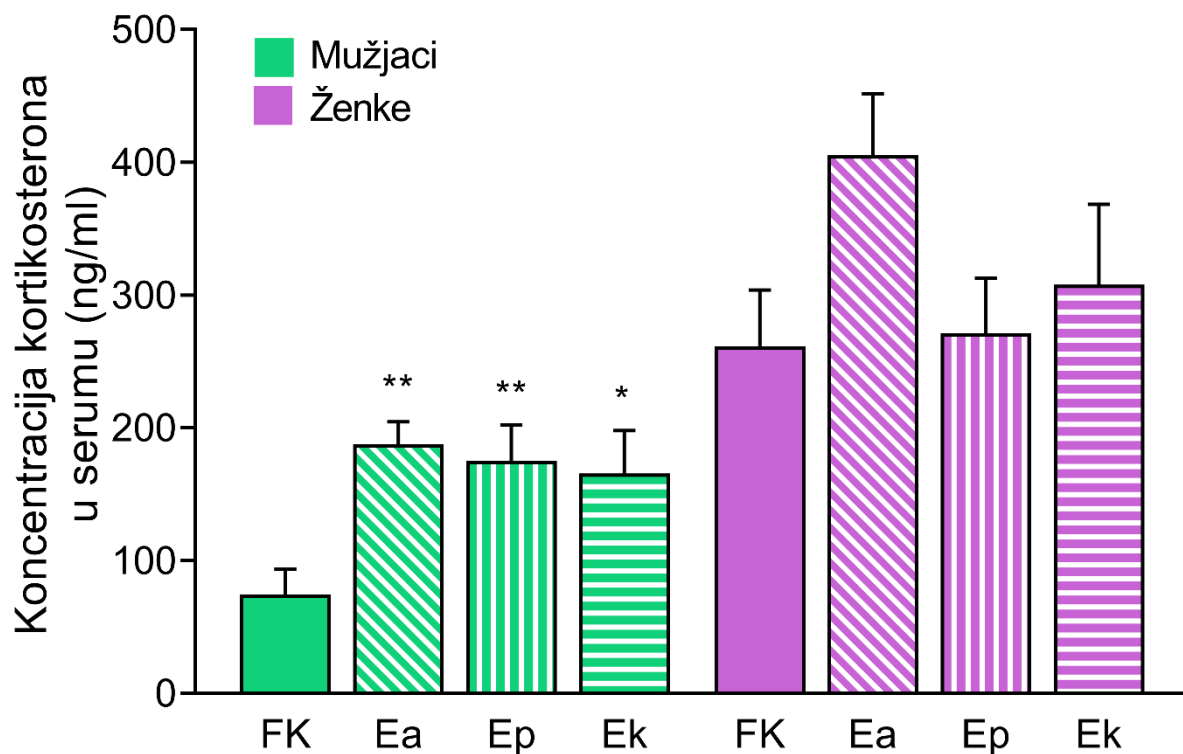
Promene u koncentraciji progesterona u nadbubrezima nisu zabeležene ni u jednoj eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolne životinje (Slika 4.27).



Slika 4.27. Koncentracija progesterona u nadbubrežnim žlezdama ženki pacova. Steroidi su ekstrahovani iz homogenata nadbubrežnih žlezda pomoću etra i rastvoreni u 0.1% BSA u PBS-u. Koncentracija progesterona je određena metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracije progesterona (u µg/g tkiva) ± SEM, za $n \geq 5$ životinja/grupi. Kruskal-Volison test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

4.26. Koncentracija kortikosterona u serumu mužjaka i ženki

Koncentracije kortikosterona u serumu mužjaka i ženki pacova tokom razvoja EAE-a prikazane su na Slici 4.26. Izmerena je veća bazalna koncentracija kortikosterona u cirkulaciji ženki ($261,5 \pm 42,32$ ng/ml) u odnosu na mužjake ($74,61 \pm 19,03$ ng/ml). Koncentracija kortikosterona u serumu bila je značajno povećana tokom trajanja bolesti kod mužjaka (Ea $187,40 \pm 17,33$ ng/ml; Ep $175,30 \pm 26,98$ ng/ml; Ek $165,70 \pm 32,47$ ng/ml; Slika 4.26a, levo), dok kod ženki nije registrovan statistički značajan porast koncentracije ovog hormona, iako je na početku bolesti uočen trend povećanja ($405,40 \pm 46,38$ ng/ml; Slika 4.26a, desno).



Slika 4.28. Koncentracija kortikosterona u serumu pacova oba pola. Koncentracija kortikosterona u serumu izmerena je metodom ELISA. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije kortikosterona (u ng/ml seruma) \pm SEM, za $n \geq 5$ životinja/grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Kruskal-Volisov test uz nekorigovani Danov *post hoc* test.

V Diskusija

Ispitivanja koja se već decenijama bave patologijom MS dovela su do razvoja brojnih terapija koje tretiraju određene aspekte ove bolesti. Međutim, patološki mehanizmi ovog kompleksnog oboljenja još nisu u potpunosti rasvetljeni. Osim toga, incidencija MS se tokom poslednje decenije povećala za oko 30% u svim regionima sveta (Walton i sar., 2020). Dakle, i dalje postoji velika potreba za ispitivanjem MS. Posebno je malo ispitivan doprinos MS promenama na nivou reproduktivnog sistema, iako se polne specifičnosti u riziku, pojavi simptoma i aktivnosti MS povezuju upravo sa reproduktivnim periodom (Magyari i Koch-Henriksen, 2022; Ysrraelit i Correale, 2019). Ova disertacija doprinosi razjašnjavanju uticaja neuroinflamatornih procesa, poput onih koji se dešavaju tokom MS, odnosno EAE-a, na regulaciju reprodukcije na nivou neuroendokrinog i endokrinog sistema.

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis je animalni model koji odslikava najviše osobina MS (Baker i Amor, 2014) i ispitivanja na ovom modelu bila su ključna za razvoj terapija koje se danas primenjuju, posebno onih koje tretiraju imunološke aspekte bolesti (Lassmann, 2019). Aktivna imunizacija na pacovima DA soja oba pola, izvedena u eksperimentima opisanim u ovoj disertaciji, dovodi do akutnog monofaznog EAE-a, što je zabeleženo i u prethodnim istraživanjima naše laboratorije (Bozic i sar., 2019; Jakovljevic i sar., 2019; Jakovljevic i sar., 2017). Iako su drugi istraživači nakon aktivne indukcije EAE uočili veću incidenciju bolesti kod ženki nego kod mužjaka pacova DA soja (Nacka-Aleksić i sar., 2015; Stojić-Vukanić i sar., 2018), ovde prikazani rezultati ne ukazuju na takve razlike. Na pacovima DA soja je i prethodno zabeležen raniji početak bolesti kod ženki u odnosu na mužjake (Dimitrijević i sar., 2017; Stojić-Vukanić i sar., 2018), što je i ovde pokazano. Analizom većeg broja oglada izvedenih u našoj laboratoriji, uočeno je da mužjaci imaju veću maksimalnu prosečnu ocenu težine bolesti. Uz to, budući da je početak bolesti kasniji kod mužjaka dok je vrhunac registrovan u isto vreme, može se reći da kod mužjaka dolazi do brže progresije bolesti. Poznato je da muškarcima sa MS takođe pokazuju bržu progresiju bolesti iz relapsno-remitentnog do sekundarno progresivnog oblika, kao i to da imaju veća oštećenja u beloj i sivoj masi (Dunn i sar., 2015). Međutim, bez obzira na raniji početak EAE-a kod ženki i veću maksimalnu ocenu kod mužjaka, ukupna težina bolesti ne razlikuje se između mužjaka i ženki. Slično tome, u modelu hroničnog EAE-a na pacovima DA soja, ženke ranije ulaze u fazu relapsa u odnosu na mužjake, iako se kumulativna težina bolesti ne razlikuje između polova (Giatti i sar., 2020).

Akutni monofazni tok EAE-a na pacovima DA soja praćen je i smanjenjem telesne mase, naročito na vrhuncu bolesti, što je takođe opisano u prethodnim studijama. Smanjenje telesne mase od 15-20% tokom simptomatske faze EAE-a zabeležen je i na ženkama C57BL/6 miševa (Bernardes i sar., 2016) i mužjacima pacova Luis soja (Macció i sar., 2005). Promene u telesnoj masi registrovane su i kod pacijenata sa MS. Naime, značajan gubitak masnog i mišićnog tkiva – kaheksija – povezana je sa smrtnim ishodom kod pacijenata sa MS (van Waesberghe i sar., 1999). Međutim, kod pacijenata sa MS uobičajeno je povećanje telesne mase koje često prelazi i u gojaznost (Khurana i sar., 2009; Marck i sar., 2016). Promene u telesnoj masi kod pacijenata sa MS mogle bi biti povezane sa povećanjem količine proinflamatornih citokina u CNS-u (Clarke, 2010), s obzirom na to da se u Arc nalaze neuroni koji proizvode oreksigene i anoreksigene peptide (Valassi i sar., 2008).

U svim ogledima opisanim u ovoj disertaciji, zabeležena je promena dinamike estrusnog ciklusa kod ženki pacova. Tačnije, registrovano je zadržavanje u fazi diestrusa tokom

simptomatske faze EAE-a, dok se ulazak u fazu proestrusa poklapa sa oporavkom od bolesti. Promene u pravilnosti estrusnog ciklusa prethodno su takođe registrovane u animalnim modelima MS na glodarima. Kod ženki miševa C57BL/6 soja zabeležen je zastoj u diestrusu nakon aktivne indukcije EAE-a, a nakon dve nedelje od imunizacije, ponovo se uspostavlja normalna dinamika estrusnog ciklusa (Rahn i sar., 2014). Slično tome, u modelu demijelinizacije izazvane kuprizonom na istom soju miševa, registrovan je zastoj u diestrusu koji traje do povratka na standardnu ishranu, kada se ponovo uočava normalan estrusni ciklus (Taylor i sar., 2010). Zanimljivo je da je kod miševa SJL/J soja zabeleženo smanjenje trajanja estrusnog ciklusa četiri nedelje nakon imunizacije i to upravo na račun diestrusa (Jaini i sar., 2015). Međutim, u pomenutoj studiji, estrusni ciklus nije praćen tokom simptomatske faze EAE-a. U modelu inflamacije uzrokovane gojaznošću takođe su uočeni produženi ciklusi (Lainez i sar., 2018). Važno je naglasiti da je u modelu EAE-a na miševima, zastoj u diestrusu uočen i kod grupe životinja injiciranih samo CFA-om (Rahn i sar., 2014). Međutim, u ogleđima koji su prethodili ovoj doktorskoj disertaciji, kod ženki pacova DA soja injiciranim samo CFA-om nisu zabeležene promene u estrusnom ciklusu (Milošević, 2016). Razlog bi mogao biti u tome što je u mišjem modelu primenjen i toksin pertuzisa, čime je potencijalno izazvana dodatna inflamacija. Generalno, promene u dinamici estrusnog ciklusa ukazuju i na promene u koncentraciji polnih hormona. Upravo je odnos između koncentracije polnih hormona tokom menstrualnog ciklusa kod pacijentkinja sa MS povezan sa brojem i veličinom demijelinizacionih lezija (Pozzilli i sar., 1999). Osim toga, kod oko 40% pacijentkinja sa MS zabeleženo je pogoršanje simptoma bolesti u predmenstrualnom periodu (Zorgdrager i De Keyser, 1997, 2002).

Rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji po prvi put ukazuju na značajno smanjenje koncentracije LH u cirkulaciji pacova oba pola tokom EAE-a, što je u skladu sa smanjenom ekspresijom *Gnrh1* kod mužjaka, odnosno *Kiss1* u hipotalamusu ženki pacova. Imajući u vidu specifične pozicije kisseptinskih i GnRH neurona u blizini cirkumventrikularnih organa, za opisane promene moglo bi da bude zaslužno izlaganje ovih neurona inflamatornim medijatorima. Naime, kao što je opisano, hipotalamus je pozicioniran u blizini OVLT i EM, koji imaju diskontinuiranu KMB, pa su populacije neurona u okolini ovih regiona podložne uticaju molekula iz generalne cirkulacije. Većina GnRH neurona koji su u blizini OVLT pruža dendrite do ovog organa (izvan KMB), i reaguje na molekule iz krvi (Herde i sar., 2011). Zatim, imajući u vidu poziciju Arc u blizini EM, koja je, zahvaljujući specifičnoj organizaciji endotela, glavno mesto razmene molekula između krvi i parenhima mozga, populacija kisseptinskih neurona koja se nalazi u ovom jedru mogla bi da ima pristup različitim molekulima iz cirkulacije (Morita-Takemura i Wanaka, 2019). Zaista, u literaturi se nailazi na više podataka koji idu u prilog tome da su populacije neurona u hipotalamusu osetljive na inflamatorne događaje. Smanjenje sekrecije GnRH kod kastriranih mužjaka pacova registrovano je u uslovima lokalne inflamacije u CNS-u – posle intracerebroventrikularne primene IL-1 β , ali i tokom sistemske inflamacije – nakon intravenske injekcije LPS-a (Rivest i Rivier, 1993). Kod ovarijektomisanih ženki pacova, smanjeni nivoi i GnRH i LH registruju se nakon primene proinflamatornih citokina, kako lokalno – perfuzijom u POA (Watanobe i Hayakawa, 2003) tako i sistemski (Yoo i sar., 1997). Osim inhibicije sekrecije GnRH, primena LPS-a dovodi i do smanjenja ekspresije *Gnrh1* kod ženki pacova (Lee i sar., 2019), i to i kod ovarijektomisanih i kod lažno operisanih životinja (Iwasa i sar., 2014). Kod kastriranih mužjaka pacova, intracerebroventrikularna injekcija IL-1 β ne dovodi do promena u transkripciji *Gnrh1* ali smanjuje efikasnost translacije (Kang i sar., 2000). Smanjenje sekrecije GnRH u uslovima inflamacije kod ženki najverovatnije je regulisano signalizacijom iz kisseptinskih neurona. Primena LPS-a na ženka pacova dovodi do smanjenja ekspresije *Kiss1* (Iwasa i sar., 2008), koje je kod ženki pacova je korelirano sa smanjenjem ekspresije *Gnrh1* i smanjenom koncentracijom

LH u serumu (Iwasa i sar., 2014). Jaki imunogeni, kao što je LPS, kod mužjaka pacova takođe izazivaju smanjenje ekspresije *Kiss1* (Castellano i sar., 2010). Osim toga, inflamacija u hipotalamusu uzrokovana gojaznošću dovodi do smanjenja ekspresije *Gnrh1* samo kod mužjaka miševa ali ne i kod ženki (Lainez i sar., 2018). Zajedno, ovi podaci ukazuju na to da su sistemi ovih neurona osetljivi kako na lokalnu tako i na sistemsku inflamaciju.

S tim u vezi, ovde prikazani rezultati ukazuju na prisustvo inflamacije u hipotalamusu tokom EAE-a. Treba istaći da su u beloj i sivoj masi hipotalamusa pacijenata sa MS uočene demijelinizacione lezije (Huitinga i sar., 2001; Vercellino i sar., 2009), čak i tokom remisije bolesti (Qiu i sar., 2011). Postojanje lezija u hipotalamusu kod pacijenata sa MS povezano je sa kaheksijom (Kamalian i sar., 1975), hiperprolaktinemijom (Kira i sar., 1991) i hipotermijom (Weiss i sar., 2009), a uočeno je i kod pacijenata sa seksualnom disfunkcijom (Foster i sar., 2003). Osim toga, metaboličke promene u hipotalamusu kod pacijenata sa MS korelirane su sa težinom bolesti (Kantorová i sar., 2017). Međutim, u istraživanjima u EAE modelu, na hipotalamus do sada nije obraćana posebna pažnja. U tom smislu, povećanje ekspresije gena za vimentin i GFAP na početku i vrhuncu EAE-a, nedvosmisleno ukazuje da tokom simptomatske faze bolesti dolazi do aktivacije astrocita u hipotalamusu, budući da ovi proteini intermedijarnih filamenata citoskeleta predstavljaju markere reaktivne astroglioze (Pekny i Pekna, 2004; Pekny i sar., 2016). U saglasnosti sa opisanim rezultatima, povećanje ekspresije *Gfap* zabeleženo je i u hipotalamusu miševa sa EAE-om (Wu i sar., 2013). Imajući u vidu da vimentin učestvuje i u aktivaciji mikroglije (Jiang i sar., 2012), uz CD68 (Böttcher i sar., 2019), povećanje njihove genske ekspresije ukazuje na to da u hipotalamusu mužjaka i ženki pacova pored aktivacije astrocita, dolazi i do aktivacije mikroglije. Prethodno je povećanje ekspresije *Cd68* uočeno u kičmenoj moždini kod ženki DA pacova u svim fazama EAE-a (Jakovljevic i sar., 2019). Aktivacija glijških ćelija u hipotalamusu tokom EAE-a je verovatno razlog i za snažnu indukciju *Ccl2* iRNK. Pokazano je da se ovaj hemokin tokom EAE-a oslobađa nakon aktivacije astrocita (Moreno i sar., 2014), kao i prilikom aktivacije mikroglije/makrofaga (Pilipović i sar., 2020). S druge strane, u CSF pacijenata sa MS smanjena je koncentracija CCL2 (Sørensen i sar., 2004). Zabeleženo povećanje genske ekspresije proinflamatornog citokina IL-1 β u hipotalamusu tokom početka i vrhunca EAE-a bi moglo značiti da je hipotalamus tokom simptomatske faze bolesti podložan infiltraciji imunskih ćelija. Naime, prolazak imunskih ćelija kroz KMB predstavlja signal za produkciju IL-1 β (Lévesque i sar., 2016). Kod miševa sa EAE-om, cirkumventrikularni organi hipotalamusa registrovani su kao mesta ulaska imunskih ćelija u CNS, pri čemu dolazi do indukcije ekspresije MHC molekula i aktivacije mikroglije (Schulz i Engelhardt, 2005). Osim što je ključan za patogenezu EAE-a, IL-1 β je detektovan i u lezijama kod pacijenata sa MS (Lin i Edelson, 2017). Ovde prikazani rezultati pokazuju i značajnu indukciju ekspresije *Spp1*, gena za osteopontin. U patologiji MS/EAE-a, osteopontin ima različite uloge i složen mehanizam delovanja, ali se generalno smatra proinflamatornim molekulom (Braitch i Constantinescu, 2010). Osteopontin-pozitivni astrociti i/ili mikroglija uočeni su u neposrednoj okolini perivaskularnih inflamatornih lezija kod miševa i pacova sa EAE-om (Chabas i sar., 2001). Povećana količina osteopontina registrovana je i u kičmenoj moždini i različitim regionima mozga pacova DA soja sa hronično-relapsnim EAE-om, ali promene u hipotalamusu nisu prijavljene (Jakovac i sar., 2017). Dodatno, osteopontin je prisutan u makrofagima aktivnih demijelinizacionih lezija kod pacijenata sa MS, kao i u astrocitima u okolini tih lezija (Chabas i sar., 2001), a povećana koncentracija ovog molekula u cerebrospinalnoj tečnosti označena je kao indikatori aktivnosti/težine bolesti kod pacijenata sa različitim tipovima MS (Börnsen i sar., 2011).

Povećanje ekspresije gotovo svih ispitanih proinflamatornih faktora na početku EAE-a sugeriše da se inflamacija u CNS-u dešava pre kliničkih manifestacija bolesti, na šta ukazuju i literaturni podaci. Na primer, događaji koji su povezani sa povećanjem ekspresije IL-1 β su

zabeleženi u prekliničkoj fazi bolesti kod miševa sa EAE-om (McCandless i sar., 2009), dok je povećanje ekspresije CCL2 takođe pre pojave simptoma EAE-a registrovano u mozgu ženki DA pacova (Hasseldam i sar., 2016). Imajući u vidu kompleksnu organizaciju hipotalamusa i njegovu ulogu u regulaciji brojnih funkcija, potrebna su detaljnija ispitivanja koja bi ukazala na tačna mesta inflamacije u hipotalamusu u ovde opisanom EAE modelu.

Zastoj u diestrusu uočen u ovde prikazanim eksperimentima korelira sa smanjenjem telesne mase tokom simptomatske faze bolesti. Gubitak telesne mase povezan je sa promenama u estrusnom ciklusu kod različitih sojeva pacova, pri čemu je pokazano da su sojevi pacova ukrštanih u srodstvu podložniji takvim promenama (Tropp i Markus, 2001). Energetski metabolizam je povezan sa učestalošću pulseva LH i promenama u dinamici menstrualnog ciklusa i kod žena (Koltun i sar., 2020), a poznato je da su stanja koja se karakterišu izrazitim hroničnim gladovanjem, poput anoreksije nervoze, povezana sa amenoreom kod žena. U ogleđima opisanim u ovoj disertaciji, smanjenje telesne mase i zastoj u diestrusu dešavaju se paralelno sa nishodnom regulacijom ekspresije *Kiss1* u hipotalamusu kod ženki, koja je uočena tokom trajanja EAE-a. Kispeptinski neuroni su osetljivi na metaboličke signale sa periferije, poput leptina, grelina i insulina, kao i na oreksigene i anoreksigene neuropeptide produkovane u Arc (Harter i sar., 2018). Kod adultnih ženki glodara, smanjenje ekspresije kispeptina registrovano je u uslovima kako negativnog tako i pozitivnog energetskog balansa (Wahab i sar., 2018). U nedavnom istraživanju, već nakon tri dana gladovanja kod ženki miševa je registrovan zastoj u diestrusu, koji se dešava paralelno sa smanjenom signalizacijom u obe populacije kispeptinskih neurona (Kreisman i sar., 2021). Prethodno je u modelu gojaznosti uočeno da uticaj metaboličkog statusa na kispeptinske neurone u AVPV kod ženki miševa nije direktan, za razliku od dejstva na Arc (Quennell i sar., 2011). Iako se pretpostavlja da neurokinin B i dinorfin takođe imaju ulogu u odgovoru HPG ose na metaboličke promene (Manfredi-Lozano i sar., 2018), u ovim eksperimentima nije zabeležena promena ekspresije ovih gena tokom EAE-a, odnosno u vreme kada je uočen zastoj u diestrusu, uz smanjenje telesne mase. Zanimljivo je da kod mužjaka pacova akutna inflamacija u hipotalamusu, uzrokovana injekcijom LPS-a, izaziva smanjenje ekspresije *Kiss1* u Arc, ali bez anoreksigenih efekata (Castellano i sar., 2010). Dakle, mehanizmi dejstva metaboličkih signala na regulaciju HPG ose bi takođe mogli biti polno-specifični.

Na nivou hipofize se kod pacova sa EAE-om takođe uočava polno-specifičan obrazac ekspresije gena karakterističnih za gonadotrope – kod mužjaka je ekspresija gena za gonadotropinske subjedinice nepromenjena, dok se kod ženki uočava promena ekspresije sva tri gena. S druge strane, ekspresija *Gnrhr* je smanjena kod pacova oba pola, iako je kod ženki to smanjenje izraženije. Promene u ekspresiji gena u hipofizi najverovatnije su posledica opisanih promena na nivou hipotalamusa. U modelu gladovanja na ženkama miševa, smanjenje ekspresije *Kiss1* u AVPV i Arc praćeno je smanjenjem ekspresije *Cga*, *Lhb* i *Gnrhr*, za razliku od ekspresije *Fshb* (Kreisman i sar., 2021), što je u skladu sa ovde predstavljenim rezultatima. Takođe, na gonadotropima *in vitro* je pokazano da se ekspresija *Cga*, *Gnrhr* i *Fshb* značajno smanjuje u odsustvu GnRH (Janjic i sar., 2019). Dakle, smanjenje ekspresije *Gnrhr* kao i smanjenje koncentracije LH u serumu pacova oba pola tokom EAE-a ukazuju i na promene u obrascu sekrecije GnRH. S obzirom na to da je kod ženki smanjena ekspresija *Kiss1*, to bi se moglo odraziti na učestalost sekrecije GnRH, dok bi kod mužjaka amplituda pulseva mogla biti promenjena kao posledica smanjene ekspresije *Gnrh1*. Imajući u vidu da je smanjenje ekspresije *Cga* i *Lhb* registrovano samo kod ženki, moguće je da je za ekspresiju ovih gena u gonadotropima važnija učestalost, a ne amplituda pulseva GnRH iz hipotalamusa. Prethodno je pokazano da ekspresija *Lhb* ne prati promene u ekspresiji *Kiss1* i *Gnrh1* kod mužjaka miševa (Luque i sar., 2007), što je u skladu sa rezultatima ove disertacije.

Bez obzira na inflamaciju na vrhuncu EAE-a, ovde je utvrđeno da je sposobnost hipotalamusa i gonadotropa adenohipofize da odgovore na adekvatan stimulus očuvana. Poznato je da centralna i sistemska primena Kp-10 izaziva oslobađanje LH kod pacova (Pheng i sar., 2009; Thompson i sar., 2004). Koncentracija LH, izmerena nakon tretmana sa Kp10 ostaje u okviru fizioloških vrednosti kod obe grupe tretiranih životinja, a takođe se ne razlikuje između zdravih i paralizovanih životinja, kod pacova oba pola. To znači da primena Kp-10 ne izaziva povećanje koncentracije LH iznad fiziološkog opsega, ali je delotvorna u indukciji sekrecije LH kod mužjaka i ženki na vrhuncu bolesti. Činjenica da nije registrovan značajan porast koncentracije LH u odnosu na fiziološke vrednosti bi mogla da se objasni vremenskom tačkom u kojoj je merena koncentracija LH. Naime, slične doze Kp10 kod mužjaka pacova dovode do značajnog povećanja koncentracije LH koje je najuočljivije 30 minuta nakon tretmana, dok se već posle sat vremena registruju vrednosti u okviru fiziološkog opega (Pheng i sar., 2009). Suprafiziološke doze BA izazivaju polno-specifičan odgovor kod životinja na vrhuncu EAE-a. Ovaj tretman dovodi do izraženog oslobađanja LH i kod ženki i kod mužjaka pacova. Međutim, smanjena koncentracija LH je uočena u serumu tretiranih mužjaka na vrhuncu EAE-a u odnosu na tretirane kontrolne mužjake, dok ovakva razlika nije nađena kod ženki pacova. Imajući u vidu da buserelin i GnRH podjednako efikasno stimulišu oslobađanje LH (de Koning i sar., 1984) i da ovako visoke doze imaju potencijal da izazovu rapidno pražnjenje sadržaja LH iz gonadotropa (Koiter i sar., 1984), ovakvi rezultati mogli bi da znače da je kod mužjaka na vrhuncu EAE-a narušena sinteza ovog proteina ili njegovo skladištenje.

U eksperimentima opisanim u ovoj disertaciji, kod mužjaka se u svim ispitivanim fazama EAE-a uočava značajno smanjenje koncentracije testosterona u serumu, koje prati obrazac smanjenja cirkulišućeg LH. Kod muškaraca sa MS takođe je zabeleženo smanjenje koncentracije testosterona, uz smanjenu (Bove i sar., 2014; Safarinejad, 2008) ili nepromenjenu koncentraciju LH (Bove i sar., 2014; Foster i sar., 2003; Wei i Lightman, 1997). Rezultati ukazuju na to da je smanjenje koncentracije testosterona verovatno uzrokovano smanjenom koncentracijom LH. Ova tvrdnja je u suprotnosti sa nalazima Fostera i saradnika (2003), koji su uočili smanjenu koncentraciju testosterona, ali povećanu koncentraciju LH, tokom pasivno indukovanog EAE-a na miševima, i zaključili da smanjenje koncentracije testosterona potiče od inhibicije njegove sinteze u testisima. Dalji tok ovog istraživanja zato je bio usmeren na rasvetljavanje događaja u ovim žlezdama.

Uprkos značajnom smanjenju koncentracije testosterona tokom razvoja EAE-a, kod mužjaka nije zabeležena promena u masi testisa, kao ni promena u masi semenih vezikula. Uzimajući u obzir činjenicu da normalno razviće i funkcionisanje pomoćnih polnih žlezda zavisi od pristupstva, odnosno koncentracije, androgenih hormona (Mooradian i sar., 1987), uočeno smanjenje koncentracije testosterona verovatno ne traje dovoljno dugo da bi izazvalo trajne posledice na fiziologiju reproduktivnog sistema mužjaka u ovde opisanom EAE modelu. Takođe, nije uočena razlika u broju intersticijalnih ćelija između životinja na vrhuncu EAE-a i kontrolne grupe. Međutim, zabeleženo je smanjenje ekspresije INSL3 na nivou iRNK. Produkcija INSL3, za razliku od sinteze testosterona, nije akutno regulisana vezivanjem liganda za LHR (Anand-Ivell i sar., 2009; Sadeghian i sar., 2005). Međutim, tokom puberteta kod pacova, nagli porast sekrecije LH praćen je i porastom koncentracije INSL3, jer u tom periodu dolazi do LH-zavisne diferencijacije LĆ u zreli fenotip, što znači da je ekspresija INSL3 indirektni pokazatelj funkcionalnosti HPG ose (Ivell i sar., 2014). Takođe, kod pacijenata sa hipogonadotropnim hipogonadizmom utvrđeno je postojanje korelacije između koncentracija LH i INSL3, kako u slučaju netretiranih pacijenata (Johannsen i sar., 2021) tako i kod pacijenata tretiranih hCG-om tokom nekoliko meseci (Trabado i sar., 2014). Dakle, smanjenje ekspresije *Insl3* na vrhuncu EAE-a u oglecima opisanim u ovoj disertaciji verovatno je posledica smanjenja koncentracije LH u cirkulaciji, koje se uočava već na početku bolesti i moglo bi da označava promene u stopi diferencijacije ili funkcionalnosti LĆ. Zaista,

ekspresija INSL3 je smanjena tokom hiperplazije LĆ kao i u procesima njihove transformacije (Bay i sar., 2005; Ivell i Bathgate, 2002).

Promene u ekspresiji komponenata steroidogene mašinerije u testisima, registrovane u ovim eksperimentima, mogu biti posledica morfoloških i funkcionalnih promena u LĆ koje se dešavaju usled smanjene koncentracije LH u serumu. Naime, u brojnim studijama je pokazano da i kratkotrajan i dugotrajan nedostatak LH, uzrokovan hipofizektomijom (Russell i sar., 1992), primenom steroidnih implanta (Ewing i sar., 1983; Mendis-Handagama i sar., 1992) ili antiseruma za LH (Dym i Raj, 1977), dovodi do promena u veličini LĆ, površini njihove ćelijske membrane, kao i u strukturi ćelijskih organela, poput spoljašnje i unutrašnje membrane mitohondrija, glatkog i granuliranog endoplazmatičnog retikuluma, jedra i peroksizoma. Ove strukturne promene su korelirane sa smanjenom sintezom testosterona. Međutim, bez obzira na morfološke i ultrastrukturne promene, nedostatak LH ne dovodi do smanjenja ukupnog broja LĆ (Keeney i sar., 1988; Mendis-Handagama i sar., 1992; Russell i sar., 1992). Ovi podaci su u skladu i sa rezultatima o nepromenjenom broju intersticijalnih ćelija na vrhuncu EAE-a.

Osim toga, u testisima je registrovano smanjenje ekspresije *Lhcgr* tokom trajanja EAE-a. LĆ su jedine ćelije testisa koje poseduju LHR (Dufau i Catt, 1978), a ekspresija i funkcionalnost ovog receptora se smanjuju nakon hipofizektomije, dakle u uslovima nedostatka LH (Hanour i sar., 1978; Russell i sar., 1992). Budući da Russel i saradnici (1992) nisu uočili smanjenje broja receptora po jedinici površine ćelije, smanjenje broja LHR na membrani LĆ moglo bi poticati od smanjenja površine ćelijske membrane, što bi bilo u skladu sa pretpostavljenim strukturnim promenama.

Značajno smanjenje ekspresije *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1/2* i *Cyp17a1*, uočeno tokom faze atonije i paralize, osim indirektnog efekta morfoloških promena na LĆ, može takođe biti posledica direktnog efekta smanjene koncentracije LH u serumu, imajući u vidu da je ekspresija komponenata steroidogene mašinerije primarno regulisana ovim hormonom (Payne i Hales, 2004). Ekspresija StAR i CYP11A1 na nivou proteina takođe je smanjena, dok se ekspresija proteina 3 β -HSD ne menja tokom EAE-a, za razliku od smanjene genske ekspresije ovog enzima. Međutim, pokazano je da izostanak stimulacije LHR ne smanjuje stopu konverzije pregnenolona u progesteron (Wing i sar., 1984), čak ni nakon 16 nedelja (Keeney i sar., 1988). To znači da količina proteina 3 β -HSD nije narušena bez obzira na nedostatak stimulacije LHR. Iako je cAMP potreban za maksimalne nivoe rRNK enzima CYP11A1, 3 β -HSD i CYP17A1 (Payne i Sha, 1991), CYP17A1 je jedini enzim čije su ekspresija i aktivnost u potpunosti zavisne od regulacije preko cAMP (Keeney i sar., 1988; Payne i Sha, 1991; Wing i sar., 1984). Dakle, smanjena ekspresija *Cyp17a1* uočena tokom EAE-a je u skladu sa smanjenom koncentracijom LH u serumu i smanjenom ekspresijom *Lhcgr* u testisima.

Prikazani rezultati ukazuju na to da u testisima tokom EAE-a nema znakova inflamacije. Naime, poznato je da proinflamatorni citokini imaju inhibitoran uticaj na steroidogenezu. Primena TNF, IL-6 i IL-1 β smanjuje produkciju testosterona u primarnoj kulturi LĆ miša, na dozno-zavisan način (Leisegang i Henkel, 2018). Zatim, intracerebroventrikularna primena IL-1 β umanjuje stimulišuće efekte tretmana hCG-om na produkciju testosterona kod pacova (Turnbull i Rivier, 1997). Slično tome, kod pacova na kojima je primenjen LPS, zabeležen je smanjen odgovor na hCG (O'Bryan i sar., 2000), a pokazano je da bi u takvim uslovima za to mogli biti odgovorni povećani nivoi TNF i IL-6 u cirkulaciji (Rivier, 2002). Za ove efekte mogla bi biti odgovorna direktna inhibicija ekspresije/aktivnosti steroidogenih enzima proinflamatornim citokinima, što je pokazano u brojnim *in vitro* studijama pod dejstvom TNF, IL-6, IL-1 β i/ili IFN- γ i to za sve komponente steroidogene mašinerije u LĆ, u bazalnim uslovima ili nakon stimulacije hCG-om

(Hales, 2002; Herrmann i sar., 2002). Međutim, ovde nije registrovano povećanje ekspresije *Tnf*, *Ifng*, *Il1b*, *Il6* u testisima mužjaka tokom EAE-a. Osim toga, imunohistohemijsko obeležavanje ukazuje da je broj CD68⁺ ćelija u intersticijumu nepromenjen u testisima mužjaka na vrhuncu EAE-a u odnosu na kontrolne mužjake. Iako su makrofagi prisutni u testisu u normalnim fiziološkim uslovima i u tesnom su međusobno-zavisnom odnosu sa LĆ, CD68⁺ makrofagi predstavljaju populaciju poreklom od monocita regrutovanih iz cirkulacije (Hedger, 2002). U eksperimentalnom autoimunskom orhitisu, modelu inflamacije u testisu, pokazano je da su upravo CD68⁺ ćelije u intersticijumu testisa zadužene za inflamatorni odgovor u ovim uslovima (Rival i sar., 2008). Zatim, u modelu inflamacije izazvane LPS-om, CD68⁺ makrofagi eksprimiraju inducibilnu sintazu azot-monoksida, koja se smatra markerom inflamacije (Gerdprasert i sar., 2002). Uzimajući u obzir nepromenjen broj CD68⁺ makrofaga u intersticijumu testisa na vrhuncu EAE-a, kao i nisku ekspresiju proinflamatornih citokina na nivou iRNK, može se tvrditi da, u ovom modelu, inflamacija u testisu nije razlog inhibicije steroidogeneze. Suprotno ovde prikazanim rezultatima, Foster i saradnici (2003) su u pasivno indukovanom EAE-u na miševima zabeležili smanjene nivoe testosterona, povećane nivoe LH, ali i povećanu produkciju TNF i IFN- γ u splenocitima, i postavili hipotezu da proinflamatorni citokini direktnom inhibicijom na nivou testisa uzrokuju smanjenje koncentracije testosterona. Ovde navedeni podaci su, dakle, u suprotnosti sa pomenutim istraživanjem i ukazuju na to da je smanjenje koncentracije LH glavni uzročnik smanjenja koncentracije testosterona tokom EAE-a.

Takođe, može se zaključiti da ni cirkulišići citokini ne učestvuju u poremećaju steroidogeneze. Naime, nakon tretmana hCG-om nije zabeležena razlika u sekreciji testosterona između zdravih i paralizovanih mužjaka, što ponovo ukazuje na to da je smanjenje produkcije testosterona tokom EAE-a isključivo posledica smanjene koncentracije LH. Pokazano je da čak i u uslovima potpunog odustva LH, četiri nedelje nakon hipofizektomije, tretman hCG-om dovodi do povećanja produkcije testosterona, mada ispod donje granice fiziološkog opsega (Hodgson i de Kretser, 1985; Stocco i sar., 1990). Dakle, LĆ zadržavaju određenu sposobnost sinteze testosterona i kada tokom dužeg perioda odsustvuje stimulacija LHR. Osim toga, treba naglasiti da je izvesna koncentracija LH u cirkulaciji prisutna i tokom simptomske faze EAE-a. S druge strane, koncentracija testosterona, nakon tretmana sa Kp10 i BA, kod mužjaka na vrhuncu bolesti bila je značajno manja u odnosu na jednako tretirane kontrolne mužjake. Odgovor testisa u pogledu sinteze testosterona nakon tretmana agonistom GnRHR je u skladu sa rezultatima dobijenim za koncentracije LH u serumu.

Efekte tretmana hCG-om na gensku ekspresiju komponenata steroidogene mašinerije u LĆ takođe potvrđuju da je inhibicija ekspresije ovih gena, uočena tokom EAE-a, posredovana stimulacijom LHR. Dva sata posle hCG tretmana, ekspresija *Star* u LĆ na vrhuncu bolesti dostiže fiziološki nivo ekspresije, što je u skladu sa činjenicom da je ekspresija ovog gena akutno regulisana gonadotropinima (Selvaraj i sar., 2018). To nije slučaj sa ekspresijom *Cyp11a1*, što je takođe u saglasnosti sa literaturnim podacima da se ekspresija *Cyp11a1* menja sporije u odgovoru na stimualaciju LHR u odnosu na ekspresiju *Star* (Lavoie i King, 2009). U skladu sa time, 24 h od hCG tretmana, ekspresija i *Star* i *Cyp11a1* dostigla je maksimalne vrednosti i kod zdravih i kod paralizovanih mužjaka. Zanimljivo je da nakon tretmana hCG-om nije uočena promena ekspresije *Hsd3b1/2*. Na mišjim LĆ je pokazano da se stimulacija genske ekspresije β 3-HSD od strane cAMP registruje samo u slučaju kada je endogena produkcija androgena inhibirana (Payne i Sha, 1991). S obzirom na to da je ovde zabeležen porast koncentracije testosterona, to bi moglo objasniti izostanak stimulacije na nivou genske ekspresije *Hsd3b1/2*. Takođe, interesantan rezultat je povećanje ekspresije *Cyp17a1* nakon 2 h od tretmana hCG-om, a zatim smanjenje ekspresije ovog gena, zabeleženo 24 h posle tretmana. Kao što je već napomenuto, ekspresija *Cyp17a1* u potpunosti zavisi od cAMP-zavisne signalizacije (Payne i Sha, 1991), što objašnjava „brzi“ efekat tretmana.

Međutim pokazano je da je ekspresija ovog enzima inhibirana mehanizmima posredovanim sa AR (Burgos-Trinidad i sar., 1997; Hales i sar., 1987). Dakle, porast koncentracije testosterona registrovan posle tretmana hCG-om najverovatnije je odgovoran za negativnu regulaciju ekspresije *Cyp17a1* nakon 24 h. U intersticijalnim ćelijama tokom EAE-a nije registrovano značajno smanjenje ekspresije *Hsd17b3*. Ipak, posle hCG tretmana registrovano je smanjenje ekspresije *Hsd17b3*, kod kontrolnih, kao i kod životinja na vrhuncu EAE-a, i to jedino 24 h od tretmana. Ovaj rezultat je u skladu sa podacima da tretman hCG-om inhibira ekspresiju i aktivnost 17 β -HSD tek posle 12 h i kasnije (Tsai-Morris i sar., 1999). Međutim, aktivnost ovog enzima ne predstavlja ograničavajući faktor za produkciju testosterona (Kühn-Velten i Staib, 1984), što je i ovde potvrđeno. Rezultati takođe ukazuju na smanjenu ekspresiju *Scarb1* u intersticijalnim ćelijama tokom EAE-a, dok je 24 h nakon hCG tretmana uočeno povećanje ekspresije ovog gena i kod zdravih i kod paralizovanih životinja. Receptor SR-B1 je slabo ekspresiran u testisima pacova, ali njegova ekspresija je indukovana nakon tretmana hCG-om (Landschulz i sar., 1996) i to tek posle 24 h (Reaven i sar., 2000), što je potpuno u skladu sa ovde prikazanim rezultatima.

Dok je kod mužjaka tokom simptomatske faze EAE-a zabeleženo smanjenje steroidogeneze u testisima, zastoj u reproduktivnom kapacitetu ženki zasnovan je na drugačijim mehanizmima.

U ovom istraživanju, po prvi put je merena koncentracija estradiola u serumu ženki DA pacova tokom EAE-a. U saglasnosti sa ovde prikazanim rezultatima, kod ženki miševa tokom pasivno indukovano EAE-a, takođe je izmerena nepromenjena koncentracija estradiola (Foster i sar., 2003). Kada su u pitanju pacijentkinje sa MS, u literaturi se nailazi na različite podatke. Razlike u koncentraciji estradiola između pacijentkinja sa MS i zdravih žena nisu registrovane (Grinstead i sar., 1989), što je zabeleženo ili u obe faze menstrualnog ciklusa (Kempe i sar., 2018), ili samo tokom folikularne faze, dok je u lutealnoj fazi zabeležena smanjena koncentracija ovog hormona u odnosu na zdrave žene (Tomassini i sar., 2005). Suprotno, u drugim ispitivanjima nisu zabeležene razlike tokom lutealne faze, ali je smanjenje koncentracije estradiola registrovano u fazi ovulacije kod pacijentkinja sa MS u odnosu na zdrave individue (Foroughipour i sar., 2012; Guven Yorgun i Ozakbas, 2019). Dodatno, kod pacijentkinja sa aktivnijom bolešću koncentracija estradiola je značajno smanjena u odnosu na žene sa manje aktivnom MS, iako su vrednosti ovog parametra u oba slučaja bile unutar fiziološkog opsega (Sepúlveda i sar., 2016).

S druge strane, ovde prikazani rezultati ukazuju na povećanu koncentraciju progesterona u cirkulaciji ženki pacova tokom simptomatske faze bolesti, što do sada nije zabeleženo u EAE modelu. Suprotno predstavljenim rezultatima, kod ženki pacova je tokom EAE-a uočena smanjena koncentracija progesterona, kako u akutnom (Giatti i sar., 2010), tako i u hroničnom modelu bolesti (Caruso i sar., 2010). Međutim, treba naglasiti da su ovi istraživači vršili ispitivanja u fazi proestrusa, što takođe može uticati na rezultate merenja, budući da je tada i koncentracija progesterona najviša (Butcher i sar., 1974; Smith i sar., 1975). Kao što je već rečeno, kod pacijentkinja sa MS, nisu registrovane promene u koncentraciji progesterona (Foroughipour i sar., 2012; Guven Yorgun i Ozakbas, 2019; Kempe i sar., 2018; Tomassini i sar., 2005).

Uz povećanu koncentraciju progesterona u cirkulaciji i opisani zastoj u fazi diestrusa tokom perioda paralize, morfometrijske analize tkiva ovarijuma pokazale su povećan broj atretičnih folikula kod ženki na vrhuncu bolesti, kao i sličan broj velikih žutih tela bez znakova regresije. Imajući u vidu da su ženke na vrhuncu bolesti žrtvovane u produženom diestrusu trajanja najmanje četiri dana, kao i to da kod pacova žuta tela traju veoma kratko zbog kratkog ciklusa (Stouffer i Hennebold, 2015), ovaj rezultat ukazuje na to da kod ženki dolazi do produženog održavanja žutih tela tokom simptomatske faze bolesti. To navodi na pretpostavku da se ženke pacova tokom simptomatske faze bolesti nalaze u stanju sličnom pseudotrudnoći. Pseudotrudnoća

je stanje koje se izaziva kod eksperimentalnih životinja, stimulacijom grlića materice ili parenjem sa sterilnim mužjakom tokom estrusa. Ovo stanje karakteriše se perzistentim diestrusom, povećanim brojem žutih tela, kao i povećanom koncentracijom progesterona u cirkulaciji (Everett, 1964). Povećanje koncentracije progesterona u cirkulaciji zabeleženo je od trećeg dana pseudotrudnoće kod ženki pacova, dok je koncentracija estradiola u cirkulaciji nepromenjena tokom prvih deset dana pseudotrudnoće (Welschen i sar., 1975). Ovi podaci su potpuno u skladu sa opisanim rezultatima i podržavaju hipotezu o stanju sličnom pseudotrudnoći.

U uzorcima steroida ekstrahovanih iz ovarijuma takođe je zabeležena povećana koncentracija progesterona tokom bolesti, što ukazuje na to da povećana koncentracija progesterona u cirkulaciji najverovatnije potiče iz ovarijuma. Suprotno tome, koncentracija estradiola u tkivu ovarijuma je dramatično smanjena. Povećan broj atretičnih folikula kod ženki na vrhuncu EAE-a u skladu je sa ovim rezultatom, budući da je u stanju atrezije kod koza promenjen odnos između intraovarijalnih nivoa progesterona i estradiola, i to upravo u korist progesterona (Yu i sar., 2004).

Uzrok ovakvog stanja u ovarijumima mogla bi biti smanjena koncentracija LH u cirkulaciji, registrovana na vrhuncu bolesti, budući da je za finalno sazrevanje folikula tokom gonadotropin-zavisne faze neophodan LH. Tokom pseudotrudnoće su, kao što je i ovde prikazano, registrovane smanjene koncentracije LH u serumu, ali i povećana količina FSH u cirkulaciji (Welschen i sar., 1975). U eksperimentima izvedenim tokom izrade ove doktorske disertacije, trenutno dostupnim metodama nije bilo moguće pouzdano izmeriti koncentraciju FSH u serumu, međutim zabeleženi porast ekspresije *Fshb* u adenohipofizi ukazuje na to da je verovatno povećana i sekrecija ovog hormona, budući da se FSH oslobađa konstitutivno, neposredno nakon sinteze (Anderson, 1996; Das i Kumar, 2018). Interesantno je i da je povećana koncentracija FSH zabeležena kod pacijentkinja sa MS, i to tokom lutealne faze ciklusa (Guven Yorgun i Ozakbas, 2019), kao i da je to povećanje povezano sa težinom simptoma (Foroughpour i sar., 2012).

Za održavanje žutih tela u stanju trudnoće i pseudotrudnoće kod pacova odgovoran je prolaktin (Smith i sar., 1975). Iako u ovde prikazanim ogleđima nije merena koncentracija prolaktina u cirkulaciji, ranija istraživanja su pokazala da je ovaj hormon povišen kod ženki pacova pre razvoja simptoma EAE-a (Riskind i sar., 1991). Takođe, kod pacijenata sa MS može doći do hiperprolaktinemije (Kira i sar., 1991). Prolaktin takođe pozitivno reguliše ekspresiju *StAR*, *CYP11A1* i 3β -HSD u luteinskim ćelijama (Stocco i sar., 2007). Osim toga, povećanje genske i proteinske ekspresije *StAR*, koje je zabeleženo i ovde, korelirano je sa povećanjem nivoa progesterona tokom pseudotrudnoće (Chen i sar., 1999). Dakle, povećanje koncentracije progesterona najverovatnije potiče iz luteinskih ćelija žutih tela koja se produženo održavaju zahvaljujući prolaktinu.

Osim luteinskih ćelija, folikuli takođe mogu, u manjoj meri, doprinostiti nivou progesterona, i za to bi moglo biti odgovorno dejstvo FSH. Na primer, na *granulosa* ćelijama pacova, tretman FSH-om izaziva povećanje produkcije progesterona, kao i povećanje ekspresije *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b* i *Cyp19a1* (Hasegawa i sar., 2017; Nakamura i sar., 2012), što bi bilo u skladu sa prikazanim rezultatima i pokazanim povećanjem ekspresije *Fshb*.

Zanimljivo je da je u ovarijumima zabeležen porast ekspresije *Lhcgr* na početku EAE-a, praćeno smanjenjem na vrhuncu bolesti. Ovakva dinamika ekspresije *Lhcgr* uočena je upravo u prvim danima pseudotrudnoće kod pacova (Chen i sar., 1999).

Jedini steroidogeni enzim čija je genska ekspresija značajno smanjena tokom EAE-a u ovarijumima jeste *Cyp17a1*. Ovaj rezultat, kao i odsustvo *CYP17A1*-imunopozitivnih ćelija u *theca interna* sloju u folikulima ženki na vrhuncu bolesti, u skladu su sa LH-zavisnom prirodom

regulacije ekspresije ovog enzima u *theca* ćelijama (Hillier i sar., 1994). Imajući u vidu i da je ekspresija CYP17A1 ograničavajući korak za sintezu androgenih hormona u ovarijumima, smanjenje koncentracije testosterona u ekstraktima ovarijuma, registrovano kod ženki u simptomatskoj fazi EAE-a, potvrđuje ove nalaze. Smanjenje koncentracije testosterona u ovarijumima moglo bi da objasni i smanjenu koncentraciju estradiola koja se uočava uprkos povećanoj genskoj ekspresiji aromataze – dakle smanjena dostupnost supstrata za ovaj enzim bi mogla da anulira efekte vezane za povećanje njegove ekspresije.

Sasvim suprotno nalazima vezanim za testosteron u ovarijumima, u serumu ženki registrovana je povećana koncentracija testosterona tokom simptomatske faze EAE-a. Ovaj rezultat je veoma interesantan budući da su ovarijumi jedini „klasičan“ steroidogeni organ ženki pacova u kome se može sintetisati testosteron (nadbubrežne žlezde pacova ne ekspimiraju CYP17A1; van Weerden i sar., 1992). Međutim, poznato je da i drugi organi doprinose nivou steroida u cirkulaciji, ali u znatno manjoj meri (Anuka i sar., 2013). Jedan od takvih, „neklasičnih“ steroidogenih organa je masno tkivo (Li i sar., 2015; Wagner i sar., 2022), i pokazano je da se u belom masnom tkivu pacova ekspimiraju sve komponente steroidogene mašinerije (Byeon i Lee, 2016; Wagner i sar., 2018). Budući da u ovde opisanom modelu EAE-a dolazi do značajnog smanjenja telesne mase, a ranije je pokazano da se kod miševa sa EAE-om količina belog masnog tkiva dramatično smanjuje (Bernardes i sar., 2016), postoji mogućnost da tokom lipolize dolazi do oslobađanja testosterona u cirkulaciju, s obzirom na to da je ovaj fenomen zabeležen tokom lipolize kod krava (Schuh i sar., 2022). Kada su u pitanju pacijentkinje sa MS, nailazi se na različite podatke o koncentraciji testosterona u cirkulaciji. Literatura ukazuje na to da žene sa MS imaju smanjenu koncentraciju testosterona (Tomassini i sar., 2005) i to i u folikularnoj i u lutealnoj fazi ciklusa (Foroughipour i sar., 2012). Suprotno tome, ranija istraživanja ukazuju na to da je kod žena sa MS koncentracija testosterona povećana u odnosu na zdrave individue, kao i da je koncentracija testosterona drastično veća kod pacijentkinja sa većim stepenom invaliditeta (Grinstead i sar., 1989).

Takođe, ovde treba istaći da su fiziološke koncentracije estradiola u serumu veoma niske i da je precizno merenje cirkulišućih nivoa ovog hormona metodom ELISA nepuzdano, te da je masena spektrometrija metoda izbora za ovu svrhu (Ketha i sar., 2015). Budući da ova metoda nije bila dostupna tokom istraživanja vezanih za ovu disertaciju, važno je naglasiti da rezultate koji se odnose na nivoe estradiola u cirkulaciji treba uzeti sa rezervom.

Uprkos opisanim polnim razlikama u odgovoru HPG ose na EAE, zajednička odlika za pacove oba pola je povećanje koncentracije progesterona u cirkulaciji. Povećanje progesterona moglo bi da predstavlja adaptivni mehanizam na stanje inflamacije kod pacova oba pola, i da doprinosi spontanom oporavku od bolesti. Naime, kao što je već rečeno, protektivni efekti progesterona i njegovih derivata su opisani u brojnim patološkim stanjima, uključujući i EAE (Ghoumari i sar., 2020; Sitruk-Ware i sar., 2021). Između ostalog, pokazano je da progesteron promovise prelazak mikroglije iz M1 u M2 fenotip (Aryanpour i sar., 2017), a upravo su ovi događaji povezani sa rezolucijom EAE-a u prethodnim istraživanjima naše laboratorije (Jakovljevic i sar., 2019). Međutim, što je još zanimljivije, rezultati ove disertacije ukazuju na to da je tokom EAE-a povećanje koncentracije progesterona u cirkulaciji drugačijeg porekla – kod mužjaka potiče iz nadbubrežnih žlezda, a kod ženki iz ovarijuma.

S obzirom na to da je progesteron i prekursor kortikosterona, te da je porast koncentracije progesterona u nadbubrežnim žlezdama registrovan samo kod mužjaka, u ovim ogledima je izmerena i koncentracija kortikosterona u serumu. Povećanje koncentracije ovog hormona takođe je registrovano samo kod mužjaka. Rezultati ovih analiza zajedno ukazuju na polne specifičnosti u

aktivnosti nadbubrežnih žlezda tokom EAE-a. Imajući u vidu da glukokortikoidi imaju inhibitoran uticaj na HPG osu (Phumsatitpong i sar., 2021), moguće je da su neke od polno specifičnih promena u funkcionisanju HPG ose tokom EAE-a rezultat aktivnosti nadbubrežnih žlezda kod mužjaka.

Ukupno uzevši, rezultati opisani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da tokom akutnog EAE-a, kod pacova DA soja oba pola dolazi do privremenog zastoja u reproduktivnom kapacitetu koji se zasniva na polno-specifičnim mehanizmima. Ipak, sasvim je moguće da je značaj ovih procesa jedinstven, a to je adaptacija na novonastale uslove sistemske inflamacije i očuvanje energije radi bržeg oporavka od bolesti.

VI Zaključci

Iz ovde opisanih eksperimenata i dobijenih rezultata, a u skladu sa postavljenim ciljevima ove disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Kod pacova DA soja akutni EAE ima monofazni tok koji se po većini parametara ne razlikuje između polova. Međutim, bolest se ranije razvija kod ženki, dok je maksimalna ocena težine bolesti veća kod mužjaka.
2. Tokom EAE-a dolazi do smanjenja koncentracije LH u serumu pacova oba pola. Kod ženki je ovo smanjenje prolazno i ograničeno na vrhunac bolesti, dok se kod mužjaka uočava u svim ispitivanim fazama, u skladu sa smanjenom ekspresijom *Gnrh1* u hipotalamusu i smanjenom koncentracijom testosterona u cirkulaciji, takođe u svim fazama EAE-a.
3. Tokom EAE-a kod ženki dolazi do prolaznog zastoja u fazi diestrusa, što je u skladu sa smanjenom ekspresijom *Kiss1* u hipotalamusu i smanjenjem koncentracije LH u cirkulaciji i u korelaciji je sa smanjenjem telesne mase u simptomatskoj fazi bolesti.
4. Promene u ekspresiji gena za neuropeptide koji regulišu funkcionisanje HPG ose, registrovane tokom EAE-a, jesu polno-specifične: smanjenje *Kiss1*, ali ne i *Gnrh1*, uočeno je u hipotalamusu ženki, dok je kod mužjaka registrovano smanjenje ekspresije *Gnrh1*, ali ne i *Kiss1*.
5. Na početku i na vrhuncu EAE-a dolazi do povećanja ekspresije gena za proinflamatorne medijatore koji ukazuju na prisustvo inflamacije u tkivu hipotalamusa životinja oba pola.
6. Promene u ekspresiji gena koji kodiraju subjedinice gonadotropina u adenohipofizi su polno-specifične. Smanjenje ekspresije *Lhb* i *Cga*, a povećanje ekspresije *Fshb*, uočeno je samo kod ženki, na vrhuncu bolesti. S druge strane, ekspresija *Gnrhr* smanjena je tokom EAE-a u adenohipofizi pacova oba pola, što ukazuje na poremećaj oslobađanja GnRH iz hipotalamusa.
7. Gonadotropi adenohipofize na vrhuncu EAE-a zadržavaju sposobnost odgovora na stimulaciju GnRHR. Amplituda ovog odgovora je manja kod mužjaka što ukazuje na poremećaj u sintezi i/ili skladištenju LH.
8. Inhibicija ekspresije komponenata steroidogene mašinerije u intersticijalnim ćelijama testisa na početku i/ili vrhuncu bolesti nije izazvana lokalnom inflamacijom.
9. Na vrhuncu bolesti testisi zadržavaju kapacitet maksimalnog odgovora steroidogene mašinerije na stimulaciju LHR.
10. Povećanje koncentracije progesterona u serumu ženki u skladu je sa porastom koncentracije progesterona u ekstraktima steroida ovarijuma, porastom ekspresije *Fshb* u adenohipofizi, porastom genske i proteinske ekspresije pojedinih komponenata steroidogene mašinerije i održavanjem žutih tela u ovarijumima, što zajedno sa zastojem u diestrusu ukazuje na to da EAE dovodi do stanja sličnog pseudotrudnoći.
11. Tokom simptomatske faze EAE-a, u ovarijumima dolazi do smanjenja ekspresije enzima CYP17A1, kao i do smanjenja koncentracije testosterona i estradiola u ekstraktima steroida iz ovih gonada. Uprkos tome, dolazi do povećanja koncentracije testosterona u cirkulaciji ženki tokom simptomatske faze EAE-a.
12. Porast koncentracije progesterona i kortikosterona u serumu mužjaka rezultat je pojačanog rada nadbubrežnih žlezda.

Iz svega navedenog, može se izvesti generalni zaključak:

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis akutnog monofaznog toka na pacovima DA soja dovodi do prolaznih promena u funkcionisanju HPG ose koje imaju polno-specifičan obrazac na nivou svih delova ove ose – hipotalamusa, hipofize i gonada. Iako su pojedinačne promene na nivou komponenata ove ose polno-specifične, zajedničke odlike za mužjake i ženke pacova sa EAE-om podrazumevaju inflamaciju u hipotalamusu i pad koncentracije LH u serumu. Ove promene za posledicu imaju zastoj u reproduktivnom kapacitetu koji bi mogao da predstavlja adaptivni mehanizam u cilju očuvanja energije što može doprineti bržem oporavku od bolesti.

Literatura

1. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., & Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, *271*(5248), 518-520.
2. Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., Sugiura, H., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Inoue, K., & Maeda, K. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*, *53*(2), 367-378.
3. Ahn, J. J., O'Mahony, J., Moshkova, M., Hanwell, H. E., Singh, H., Zhang, M. A., Marrie, R. A., Bar-Or, A., Sadovnick, D. A., Dunn, S. E., & Banwell, B. L. (2015). Puberty in females enhances the risk of an outcome of multiple sclerosis in children and the development of central nervous system autoimmunity in mice. *Mult Scler*, *21*(6), 735-748.
4. Ajayi, A. F., & Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res Pract*, *6*, 5.
5. Altuntas, C. Z., Daneshgari, F., Liu, G., Fabiyi, A., Kavran, M., Johnson, J. M., Gulen, M. F., Jaini, R., Li, X., Frenkl, T. L., & Tuohy, V. K. (2008). Bladder dysfunction in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, *203*(1), 58-63.
6. Ambrosini, E., Remoli, M. E., Giacomini, E., Rosicarelli, B., Serafini, B., Lande, R., Aloisi, F., & Coccia, E. M. (2005). Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*, *64*(8), 706-715.
7. Anakwe, O. O., Murphy, P. R., & Moger, W. H. (1985). Characterization of beta-adrenergic binding sites on rodent Leydig cells. *Biol Reprod*, *33*(4), 815-826.
8. Anand-Ivell, R., Heng, K., Hafen, B., Setchell, B., & Ivell, R. (2009). Dynamics of INSL3 peptide expression in the rodent testis. *Biol Reprod*, *81*(3), 480-487.
9. Anderson, L. (1996). Intracellular mechanisms triggering gonadotrophin secretion. *Rev Reprod*, *1*(3), 193-202.
10. Andric, S. A., Janjic, M. M., Stojkov, N. J., & Kostic, T. S. (2007). Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *293*(5), E1399-1408.
11. Anuka, E., Gal, M., Stocco, D. M., & Orly, J. (2013). Expression and roles of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in 'non-classical', extra-adrenal and extra-gonadal cells and tissues. *Mol Cell Endocrinol*, *371*(1-2), 47-61.
12. Arakane, F., King, S. R., Du, Y., Kallen, C. B., Walsh, L. P., Watari, H., Stocco, D. M., & Strauss, J. F., 3rd. (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem*, *272*(51), 32656-32662.
13. Aryanpour, R., Pasbakhsh, P., Zibara, K., Namjoo, Z., Beigi Boroujeni, F., Shahbeigi, S., Kashani, I. R., Beyer, C., & Zendejdel, A. (2017). Progesterone therapy induces an M1 to M2 switch in microglia phenotype and suppresses NLRP3 inflammasome in a cuprizone-induced demyelination mouse model. *Int Immunopharmacol*, *51*, 131-139.
14. Axisa, P. P., & Hafler, D. A. (2016). Multiple sclerosis: genetics, biomarkers, treatments. *Curr Opin Neurol*, *29*(3), 345-353.

15. Baker, D., & Amor, S. (2014). Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely. *Mult Scler Relat Disord*, 3(5), 555-564.
16. Bansil, S., Lee, H. J., Jindal, S., Holtz, C. R., & Cook, S. D. (1999). Correlation between sex hormones and magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 99(2), 91-94.
17. Batoulis, H., Recks, M. S., Addicks, K., & Kuerten, S. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. *Apmis*, 119(12), 819-830.
18. Bay, K., Hartung, S., Ivell, R., Schumacher, M., Jürgensen, D., Jorgensen, N., Holm, M., Skakkebaek, N. E., & Andersson, A. M. (2005). Insulin-like factor 3 serum levels in 135 normal men and 85 men with testicular disorders: relationship to the luteinizing hormone-testosterone axis. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(6), 3410-3418.
19. Bebo, B. F., Jr., Fyfe-Johnson, A., Adlard, K., Beam, A. G., Vandembark, A. A., & Offner, H. (2001). Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J Immunol*, 166(3), 2080-2089.
20. Bebo, B. F., Jr., Schuster, J. C., Vandembark, A. A., & Offner, H. (1998). Gender differences in experimental autoimmune encephalomyelitis develop during the induction of the immune response to encephalitogenic peptides. *J Neurosci Res*, 52(4), 420-426.
21. Bebo, B. F., Jr., Schuster, J. C., Vandembark, A. A., & Offner, H. (1999). Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. *J Immunol*, 162(1), 35-40.
22. Bebo, B. F., Jr., Zelinka-Vincent, E., Adamus, G., Amundson, D., Vandembark, A. A., & Offner, H. (1998). Gonadal hormones influence the immune response to PLP 139-151 and the clinical course of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 84(2), 122-130.
23. Bernardes, D., Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Karmally, S., Dellarole, A., Carvalho-Tavares, J., & Bethea, J. R. (2016). Prior regular exercise improves clinical outcome and reduces demyelination and axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem*, 136 Suppl 1, 63-73.
24. Bielecki, B., Mattern, C., Ghoumari, A. M., Javaid, S., Smietanka, K., Abi Ghanem, C., Mhaouty-Kodja, S., Ghandour, M. S., Baulieu, E. E., Franklin, R. J., Schumacher, M., & Traiffort, E. (2016). Unexpected central role of the androgen receptor in the spontaneous regeneration of myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(51), 14829-14834.
25. Bjelobaba, I., Begovic-Kupresanin, V., Pekovic, S., & Lavrnja, I. (2018). Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*, 96(6), 1021-1042.
26. Bjelobaba, I., Savic, D., & Lavrnja, I. (2017). Multiple Sclerosis and Neuroinflammation: The Overview of Current and Prospective Therapies. *Curr Pharm Des*, 23(5), 693-730.
27. Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375(6578), 296-301.
28. Bliss, S. P., Navratil, A. M., Xie, J., & Roberson, M. S. (2010). GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol*, 31(3), 322-340.

29. Börnsen, L., Khademi, M., Olsson, T., Sørensen, P. S., & Sellebjerg, F. (2011). Osteopontin concentrations are increased in cerebrospinal fluid during attacks of multiple sclerosis. *Mult Scler*, *17*(1), 32-42.
30. Böttcher, C., Schlickeiser, S., Sneeboer, M. A. M., Kunkel, D., Knop, A., Paza, E., Fidzinski, P., Kraus, L., Snijders, G. J. L., Kahn, R. S., Schulz, A. R., Mei, H. E., Hol, E. M., Siegmund, B., Glaubén, R., Spruth, E. J., de Witte, L. D., & Priller, J. (2019). Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat Neurosci*, *22*(1), 78-90.
31. Bove, R. (2016). Women's Issues in Multiple Sclerosis. *Semin Neurol*, *36*(2), 154-162.
32. Bove, R. M., Healy, B., Augustine, A., Musallam, A., Gholipour, T., & Chitnis, T. (2012). Effect of gender on late-onset multiple sclerosis. *Mult Scler*, *18*(10), 1472-1479.
33. Bove, R., & Chitnis, T. (2013). Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clin Immunol*, *149*(2), 201-210.
34. Bove, R., Malik, M. T., Diaz-Cruz, C., Chua, A., Saraceno, T. J., Bargiela, D., Greeke, E., Glanz, B. I., Healy, B. C., & Chitnis, T. (2015). The 2D:4D ratio, a proxy for prenatal androgen levels, differs in men with and without MS. *Neurology*, *85*(14), 1209-1213.
35. Bove, R., Musallam, A., Healy, B. C., Raghavan, K., Glanz, B. I., Bakshi, R., Weiner, H., De Jager, P. L., Miller, K. K., & Chitnis, T. (2014). Low testosterone is associated with disability in men with multiple sclerosis. *Mult Scler*, *20*(12), 1584-1592.
36. Bove, R., Okai, A., Houtchens, M., Elias-Hamp, B., Lugaresi, A., Hellwig, K., & Kubala Havrdová, E. (2021). Effects of Menopause in Women With Multiple Sclerosis: An Evidence-Based Review. *Front Neurol*, *12*, 554375.
37. Boyd, K. L., Muehlenbachs, A., Rendi, M. H., Garcia, R. L., & Gibson-Corley, K. N. (2018). 17 - Female Reproductive System. In P. M. Treuting, S. M. Dintzis, & K. S. Montine (Eds.), *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)* (pp. 303-334). Academic Press.
38. Bozic, I., Savic, D., Milosevic, A., Janjic, M., Laketa, D., Tesovic, K., Bjelobaba, I., Jakovljevic, M., Nedeljkovic, N., Pekovic, S., & Lavrnja, I. (2019). The Potassium Channel Kv1.5 Expression Alters During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neurochem Res*, *44*(12), 2733-2745.
39. Braitch, M., & Constantinescu, C. S. (2010). The role of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and multiple sclerosis (MS). *Inflamm Allergy Drug Targets*, *9*(4), 249-256.
40. Brambilla, R. (2019). The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol*, *137*(5), 757-783.
41. Bremer, A. A., & Miller, W. L. (2014). Chapter 13 - Regulation of Steroidogenesis. In A. Ulloa-Aguirre & P. M. Conn (Eds.), *Cellular Endocrinology in Health and Disease* (pp. 207-227). Academic Press.
42. Burgos-Trinidad, M., Youngblood, G. L., Maroto, M. R., Scheller, A., Robins, D. M., & Payne, A. H. (1997). Repression of cAMP-induced expression of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase gene (Cyp17) by androgens. *Mol Endocrinol*, *11*(1), 87-96.
43. Butcher, R. L., Collins, W. E., & Fugo, N. W. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, *94*(6), 1704-1708.

44. Butterworth, M., McClellan, B., & Allansmith, M. (1967). Influence of sex in immunoglobulin levels. *Nature*, *214*(5094), 1224-1225.
45. Byeon, H. R., & Lee, S. H. (2016). Expression of Steroidogenesis-related Genes in Rat Adipose Tissues. *Dev Reprod*, *20*(3), 197-205.
46. Caruso, D., D'Intino, G., Giatti, S., Maschi, O., Pesaresi, M., Calabrese, D., Garcia-Segura, L. M., Calza, L., & Melcangi, R. C. (2010). Sex-dimorphic changes in neuroactive steroid levels after chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem*, *114*(3), 921-932.
47. Caruso, D., Melis, M., Fenu, G., Giatti, S., Romano, S., Grimoldi, M., Crippa, D., Marrosu, M. G., Cavaletti, G., & Melcangi, R. C. (2014). Neuroactive steroid levels in plasma and cerebrospinal fluid of male multiple sclerosis patients. *J Neurochem*, *130*(4), 591-597.
48. Castellano, J. M., Bentsen, A. H., Romero, M., Pineda, R., Ruiz-Pino, F., Garcia-Galiano, D., Sánchez-Garrido, M. A., Pinilla, L., Mikkelsen, J. D., & Tena-Sempere, M. (2010). Acute inflammation reduces kisspeptin immunoreactivity at the arcuate nucleus and decreases responsiveness to kisspeptin independently of its anorectic effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *299*(1), E54-61.
49. Chabas, D., Baranzini, S. E., Mitchell, D., Bernard, C. C., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Sobel, R. A., Lock, C., Karpuz, M., Pedotti, R., Heller, R., Oksenberg, J. R., & Steinman, L. (2001). The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science*, *294*(5547), 1731-1735.
50. Chaffin, C. L., & Vandevoort, C. A. (2013). Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: a comparative perspective. *Exp Biol Med (Maywood)*, *238*(5), 539-548.
51. Chen, P., Zhao, X., Guan, X., & Chen, H. (2019). Origin and regulation of stem Leydig cells in the adult testis. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, *6*, 49-53.
52. Chen, Y. J., Feng, Q., & Liu, Y. X. (1999). Expression of the steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone receptor and their regulation by tumor necrosis factor alpha in rat corpora lutea. *Biol Reprod*, *60*(2), 419-427.
53. Chitnis, T. (2013). Role of puberty in multiple sclerosis risk and course. *Clin Immunol*, *149*(2), 192-200.
54. Chitnis, T. (2018). The role of testosterone in MS risk and course. *Mult Scler*, *24*(1), 36-41.
55. Chu, F., Shi, M., Zheng, C., Shen, D., Zhu, J., Zheng, X., & Cui, L. (2018). The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, *318*, 1-7.
56. Clark, B. J. (2016). ACTH Action on StAR Biology. *Front Neurosci*, *10*, 547.
57. Clark, B. J., Wells, J., King, S. R., & Stocco, D. M. (1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem*, *269*(45), 28314-28322.
58. Clarke, I. J. (2010). Whatever way weight goes, inflammation shows. *Endocrinology*, *151*(3), 846-848.
59. Clarkson, J., & Herbison, A. E. (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, *147*(12), 5817-5825.

60. Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Moreno, A. S., Colledge, W. H., & Herbison, A. E. (2008). Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci*, *28*(35), 8691-8697.
61. Collongues, N., Patte-Mensah, C., De Seze, J., Mensah-Nyagan, A. G., & Derfuss, T. (2018). Testosterone and estrogen in multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutics. *Expert Rev Neurother*, *18*(6), 515-522.
62. Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*, *372*(9648), 1502-1517.
63. Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M. M., Cortinovis-Tourniaire, P., & Moreau, T. (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med*, *339*(5), 285-291.
64. Confavreux, C., Vukusic, S., & Adeleine, P. (2003). Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*, *126*(Pt 4), 770-782.
65. Connelly, M. A., & Williams, D. L. (2003). SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. *Trends Endocrinol Metab*, *14*(10), 467-472.
66. Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, *164*(4), 1079-1106.
67. Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol*, *43*(6), 776-793.
68. Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F., & Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*, *85*(1), 36-42.
69. Coss, D. (2018). Regulation of reproduction via tight control of gonadotropin hormone levels. *Mol Cell Endocrinol*, *463*, 116-130.
70. Craig, J., Orisaka, M., Wang, H., Orisaka, S., Thompson, W., Zhu, C., Kotsuji, F., & Tsang, B. K. (2007). Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Front Biosci*, *12*, 3628-3639.
71. Dalal, M., Kim, S., & Voskuhl, R. R. (1997). Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J Immunol*, *159*(1), 3-6.
72. D'Amico, E., Zanghì, A., Burgio, G., Chisari, C. G., Condorelli, R. A., La Vignera, S., Calogero, A. E., & Patti, F. (2020). Gonadal Steroids and Sperm Quality in a Cohort of Relapsing Remitting Multiple Sclerosis: A Case-Control Study. *Front Neurol*, *11*, 756.
73. Das, N., & Kumar, T. R. (2018). Molecular regulation of follicle-stimulating hormone synthesis, secretion and action. *J Mol Endocrinol*, *60*(3), R131-r155.
74. De Giglio, L., Marinelli, F., Barletta, V. T., Pagano, V. A., De Angelis, F., Fanelli, F., Petsas, N., Pantano, P., Tomassini, V., & Pozzilli, C. (2017). Effect on Cognition of Estroprogestins Combined with Interferon Beta in Multiple Sclerosis: Analysis of Secondary Outcomes from a Randomised Controlled Trial. *CNS Drugs*, *31*(2), 161-168.

75. de Koning, J., Tijssen, A. M., Koiter, T. R., Schuiling, G. A., & van Rees, G. P. (1984). Comparison between the biological effects of LH-RH and buserelin on the induction of LH release from hemipituitary glands of female rats in vitro. *Life Sci*, *34*(20), 1937-1943.
76. Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., & Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, *18*(1), 21-29.
77. D'Hooghe M, B., Haentjens, P., Nagels, G., D'Hooghe, T., & De Keyser, J. (2012). Menarche, oral contraceptives, pregnancy and progression of disability in relapsing onset and progressive onset multiple sclerosis. *J Neurol*, *259*(5), 855-861.
78. Didier, N., Romero, I. A., Créminon, C., Wijkhuisen, A., Grassi, J., & Mabondzo, A. (2003). Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem*, *86*(1), 246-254.
79. Dimitrijević, M., Kotur-Stevuljević, J., Stojić-Vukanić, Z., Vujnović, I., Pilipović, I., Nacka-Aleksić, M., & Leposavić, G. (2017). Sex Difference in Oxidative Stress Parameters in Spinal Cord of Rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Relation to Neurological Deficit. *Neurochem Res*, *42*(2), 481-492.
80. Dufau, M. L., & Catt, K. J. (1978). Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary. *Vitam Horm*, *36*, 461-592.
81. Dunn, S. E., Gunde, E., & Lee, H. (2015). Sex-Based Differences in Multiple Sclerosis (MS): Part II: Rising Incidence of Multiple Sclerosis in Women and the Vulnerability of Men to Progression of this Disease. *Curr Top Behav Neurosci*, *26*, 57-86.
82. Durán-Pastén, M. L., & Fiordelisio, T. (2013). GnRH-Induced Ca(2+) Signaling Patterns and Gonadotropin Secretion in Pituitary Gonadotrophs. Functional Adaptations to Both Ordinary and Extraordinary Physiological Demands. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *4*, 127.
83. Dym, M., & Raj, H. G. (1977). Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. *Biol Reprod*, *17*(5), 676-696.
84. Ebling, F. J., & Cronin, A. S. (2000). The neurobiology of reproductive development. *Neuroreport*, *11*(16), R23-33.
85. Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*, *30*(6), 624-712.
86. El-Etr, M., Rame, M., Boucher, C., Ghoumari, A. M., Kumar, N., Liere, P., Pianos, A., Schumacher, M., & Sitruk-Ware, R. (2015). Progesterone and nestorone promote myelin regeneration in chronic demyelinating lesions of corpus callosum and cerebral cortex. *Glia*, *63*(1), 104-117.
87. Engelhardt, B. (2006). Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm (Vienna)*, *113*(4), 477-485.
88. Engler, J. B., Kursawe, N., Solano, M. E., Patas, K., Wehrmann, S., Heckmann, N., Lühder, F., Reichardt, H. M., Arck, P. C., Gold, S. M., & Friese, M. A. (2017). Glucocorticoid receptor in T cells mediates protection from autoimmunity in pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(2), E181-e190.
89. Everett, J. W. (1964). CENTRAL NEURAL CONTROL OF REPRODUCTIVE FUNCTIONS OF THE ADENOHYPHYSIS. *Physiol Rev*, *44*, 373-431.

90. Ewing, L. L., Wing, T. Y., Cochran, R. C., Kromann, N., & Zirkin, B. R. (1983). Effect of luteinizing hormone on Leydig cell structure and testosterone secretion. *Endocrinology*, *112*(5), 1763-1769.
91. Fillmore, P. D., Blankenhorn, E. P., Zachary, J. F., & Teuscher, C. (2004). Adult gonadal hormones selectively regulate sexually dimorphic quantitative traits observed in experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol*, *164*(1), 167-175.
92. Foley, G. L. (2001). Overview of male reproductive pathology. *Toxicol Pathol*, *29*(1), 49-63.
93. Foroughipour, A., Norbakhsh, V., Najafabadi, S. H., & Meamar, R. (2012). Evaluating sex hormone levels in reproductive age women with multiple sclerosis and their relationship with disease severity. *J Res Med Sci*, *17*(9), 882-885.
94. Foster, S. C., Daniels, C., Bourdette, D. N., & Bebo, B. F., Jr. (2003). Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, *140*(1-2), 78-87.
95. Fugger, L., Friese, M. A., & Bell, J. I. (2009). From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*, *9*(6), 408-417.
96. Garay, L., Gonzalez Deniselle, M. C., Gierman, L., Lima, A., Roig, P., & De Nicola, A. F. (2010). Pharmacotherapy with 17 β -estradiol and progesterone prevents development of mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Horm Mol Biol Clin Investig*, *1*(1), 43-51.
97. Garay, L., Gonzalez Deniselle, M. C., Lima, A., Roig, P., & De Nicola, A. F. (2007). Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *107*(3-5), 228-237.
98. Garay, L., Gonzalez Deniselle, M. C., Meyer, M., Costa, J. J., Lima, A., Roig, P., & De nicola, A. F. (2009). Protective effects of progesterone administration on axonal pathology in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res*, *1283*, 177-185.
99. Gatson, N. N., Williams, J. L., Powell, N. D., McClain, M. A., Hennon, T. R., Robbins, P. D., & Whitacre, C. C. (2011). Induction of pregnancy during established EAE halts progression of CNS autoimmune injury via pregnancy-specific serum factors. *J Neuroimmunol*, *230*(1-2), 105-113.
100. Gerdprasert, O., O'Bryan, M. K., Muir, J. A., Caldwell, A. M., Schlatt, S., de Kretser, D. M., & Hedger, M. P. (2002). The response of testicular leukocytes to lipopolysaccharide-induced inflammation: further evidence for heterogeneity of the testicular macrophage population. *Cell Tissue Res*, *308*(2), 277-285.
101. Ghomari, A. M., Abi Ghanem, C., Asbelaoui, N., Schumacher, M., & Hussain, R. (2020). Roles of Progesterone, Testosterone and Their Nuclear Receptors in Central Nervous System Myelination and Remyelination. *Int J Mol Sci*, *21*(9).
102. Giatti, S., Caruso, D., Boraso, M., Abbiati, F., Ballarini, E., Calabrese, D., Pesaresi, M., Rigolio, R., Santos-Galindo, M., Viviani, B., Cavaletti, G., Garcia-Segura, L. M., & Melcangi, R. C. (2012). Neuroprotective effects of progesterone in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroendocrinol*, *24*(6), 851-861.
103. Giatti, S., D'Intino, G., Maschi, O., Pesaresi, M., Garcia-Segura, L. M., Calza, L., Caruso, D., & Melcangi, R. C. (2010). Acute experimental autoimmune encephalomyelitis induces sex dimorphic changes in neuroactive steroid levels. *Neurochem Int*, *56*(1), 118-127.

104. Giatti, S., Rigolio, R., Diviccaro, S., Falvo, E., Caruso, D., Garcia-Segura, L. M., Cavaletti, G., & Melcangi, R. C. (2020). Sex dimorphism in an animal model of multiple sclerosis: Focus on pregnenolone synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *199*, 105596.
105. Giatti, S., Rigolio, R., Romano, S., Mitro, N., Viviani, B., Cavaletti, G., Caruso, D., Garcia-Segura, L. M., & Melcangi, R. C. (2015). Dihydrotestosterone as a Protective Agent in Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neuroendocrinology*, *101*(4), 296-308.
106. Gilli, F., DiSano, K. D., & Pachner, A. R. (2020). SeXX Matters in Multiple Sclerosis. *Front Neurol*, *11*, 616.
107. Glatigny, S., & Bettelli, E. (2018). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb Perspect Med*, *8*(11).
108. Gold, S. M., Chalifoux, S., Giesser, B. S., & Voskuhl, R. R. (2008). Immune modulation and increased neurotrophic factor production in multiple sclerosis patients treated with testosterone. *J Neuroinflammation*, *5*, 32.
109. Goldman, J. M., Laws, S. C., Balchak, S. K., Cooper, R. L., & Kavlock, R. J. (2000). Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Crit Rev Toxicol*, *30*(2), 135-196.
110. Gonzalez-Iglesias, A. E., & Bertram, R. (2014). Chapter 2 - The Molecular Cell Biology of Anterior Pituitary Cells. In A. Ulloa-Aguirre & P. M. Conn (Eds.), *Cellular Endocrinology in Health and Disease* (pp. 19-39). Academic Press.
111. Goodman, R. L., Herbison, A. E., Lehman, M. N., & Navarro, V. M. (2022). Neuroendocrine control of gonadotropin-releasing hormone: Pulsatile and surge modes of secretion. *J Neuroendocrinol*, *34*(5), e13094.
112. Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., Seminara, S., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, *145*(9), 4073-4077.
113. Graves, J. S., Henry, R. G., Cree, B. A. C., Lambert-Messerlian, G., Greenblatt, R. M., Waubant, E., Cedars, M. I., Zhu, A., Bacchetti, P., Hauser, S. L., & Oksenberg, J. R. (2018). Ovarian aging is associated with gray matter volume and disability in women with MS. *Neurology*, *90*(3), e254-e260.
114. Grinsted, L., Heltberg, A., Hagen, C., & Djursing, H. (1989). Serum sex hormone and gonadotropin concentrations in premenopausal women with multiple sclerosis. *J Intern Med*, *226*(4), 241-244.
115. Grosse, R., Schmid, A., Schöneberg, T., Herrlich, A., Muhn, P., Schultz, G., & Gudermann, T. (2000). Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to G(q/11) proteins. *J Biol Chem*, *275*(13), 9193-9200.
116. Guven Yorgun, Y., & Ozakbas, S. (2019). Effect of hormonal changes on the neurological status in the menstrual cycle of patient with multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*, *186*, 105499.
117. Hales, D. B. (2002). Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol*, *57*(1-2), 3-18.
118. Hales, D. B., Sha, L. L., & Payne, A. H. (1987). Testosterone inhibits cAMP-induced de Novo synthesis of Leydig cell cytochrome P-450(17 alpha) by an androgen receptor-mediated mechanism. *J Biol Chem*, *262*(23), 11200-11206.

119. Hall, J. E. (2019). Chapter 7 - Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle. In J. F. Strauss & R. L. Barbieri (Eds.), *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)* (pp. 149-166.e145). Elsevier.
120. Han, S. Y., McLennan, T., Czieselsky, K., & Herbison, A. E. (2015). Selective optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(42), 13109-13114.
121. Hanour, F., Sanchez, P., Cathiard, A. M., & Saez, J. M. (1978). Gonadotropin receptor regulation in hypophysectomized rat Leydig cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *81*(2), 547-551.
122. Harness, J., & McCombe, P. A. (2001). The effects of pregnancy on myelin basic protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: suppression of clinical disease, modulation of cytokine expression in the spinal cord inflammatory infiltrate and suppression of lymphocyte proliferation by pregnancy sera. *Am J Reprod Immunol*, *46*(6), 405-412.
123. Harter, C. J. L., Kavanagh, G. S., & Smith, J. T. (2018). The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *J Endocrinol*, *238*(3), R173-r183.
124. Hasegawa, T., Kamada, Y., Hosoya, T., Fujita, S., Nishiyama, Y., Iwata, N., Hiramatsu, Y., & Otsuka, F. (2017). A regulatory role of androgen in ovarian steroidogenesis by rat granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *172*, 160-165.
125. Hasseldam, H., Rasmussen, R. S., & Johansen, F. F. (2016). Oxidative damage and chemokine production dominate days before immune cell infiltration and EAE disease debut. *J Neuroinflammation*, *13*(1), 246.
126. Hedger, M. P. (2002). Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J Reprod Immunol*, *57*(1-2), 19-34.
127. Hedger, M. P. (2015). Chapter 19 - The Immunophysiology of Male Reproduction. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (pp. 805-892). Academic Press.
128. Heesen, C., Gold, S. M., Huitinga, I., & Reul, J. M. (2007). Stress and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis - a review. *Psychoneuroendocrinology*, *32*(6), 604-618.
129. Herbison, A. E. (2015). Chapter 11 - Physiology of the Adult Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (pp. 399-467). Academic Press.
130. Herbison, A. E. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol*, *12*(8), 452-466.
131. Herbison, A. E. (2021). The dendron and episodic neuropeptide release. *J Neuroendocrinol*, *33*(11), e13024.
132. Herde, M. K., Geist, K., Campbell, R. E., & Herbison, A. E. (2011). Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. *Endocrinology*, *152*(10), 3832-3841.
133. Herrmann, M., Scholmerich, J., & Straub, R. H. (2002). Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann N Y Acad Sci*, *966*, 166-186.

134. Hillier, S. G., Whitelaw, P. F., & Smyth, C. D. (1994). Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol*, *100*(1-2), 51-54.
135. Hodgson, Y. M., & de Kretser, D. M. (1982). Serum Testosterone response to single injection of hCG ovine-LH and LHRH in male rats. *Int J Androl*, *5*(1), 81-91.
136. Hodgson, Y. M., & de Kretser, D. M. (1985). Testosterone response of cryptorchid and hypophysectomized rats to human chorionic gonadotrophin (hCG) stimulation. *Aust J Biol Sci*, *38*(4), 445-455.
137. Hoffman, G. E., Le, W. W., Murphy, A. Z., & Koski, C. L. (2001). Divergent effects of ovarian steroids on neuronal survival during experimental allergic encephalitis in Lewis rats. *Exp Neurol*, *171*(2), 272-284.
138. Huitinga, I., De Groot, C. J., Van der Valk, P., Kamphorst, W., Tilders, F. J., & Swaab, D. F. (2001). Hypothalamic lesions in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, *60*(12), 1208-1218.
139. Hussain, R., Ghomari, A. M., Bielecki, B., Steibel, J., Boehm, N., Liere, P., Macklin, W. B., Kumar, N., Habert, R., Mhaouty-Kodja, S., Tronche, F., Sitruk-Ware, R., Schumacher, M., & Ghandour, M. S. (2013). The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination. *Brain*, *136*(Pt 1), 132-146.
140. Hutson, J. C. (1992). Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell Tissue Res*, *267*(2), 385-389.
141. Ibanez, C., Shields, S. A., El-Etr, M., Baulieu, E. E., Schumacher, M., & Franklin, R. J. (2004). Systemic progesterone administration results in a partial reversal of the age-associated decline in CNS remyelination following toxin-induced demyelination in male rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *30*(1), 80-89.
142. Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(2), 125-138.
143. Irwig, M. S., Fraley, G. S., Smith, J. T., Acohido, B. V., Popa, S. M., Cunningham, M. J., Gottsch, M. L., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, *80*(4), 264-272.
144. Ito, A., Bebo, B. F., Jr., Matejuk, A., Zamora, A., Silverman, M., Fyfe-Johnson, A., & Offner, H. (2001). Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol*, *167*(1), 542-552.
145. Ivell, R., & Bathgate, R. A. (2002). Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3). *Biol Reprod*, *67*(3), 699-705.
146. Ivell, R., Heng, K., & Anand-Ivell, R. (2014). Insulin-Like Factor 3 and the HPG Axis in the Male. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *5*, 6.
147. Ivell, R., Wade, J. D., & Anand-Ivell, R. (2013). INSL3 as a biomarker of Leydig cell functionality. *Biol Reprod*, *88*(6), 147.
148. Iwasa, T., Matsuzaki, T., Murakami, M., Shimizu, F., Kuwahara, A., Yasui, T., & Irahara, M. (2008). Decreased expression of kisspeptin mediates acute immune/inflammatory stress-induced suppression of gonadotropin secretion in female rat. *J Endocrinol Invest*, *31*(7), 656-659.

149. Iwasa, T., Matsuzaki, T., Tungalagsuvd, A., Munkhzaya, M., Kawami, T., Niki, H., Kato, T., Kuwahara, A., Uemura, H., Yasui, T., & Irahara, M. (2014). Hypothalamic Kiss1 and RFRP gene expressions are changed by a high dose of lipopolysaccharide in female rats. *Horm Behav*, *66*(2), 309-316.
150. Jablonka-Shariff, A., Pearl, C. A., Comstock, A., & Boime, I. (2008). A carboxyl-terminal sequence in the lutropin beta subunit contributes to the sorting of lutropin to the regulated pathway. *J Biol Chem*, *283*(17), 11485-11492.
151. Jaini, R., Altuntas, C. Z., Loya, M. G., & Tuohy, V. K. (2015). Disruption of estrous cycle homeostasis in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, *279*, 71-74.
152. Jakovac, H., Grubić Kezele, T., Šučurović, S., Mulac-Jeričević, B., & Radošević-Stašić, B. (2017). Osteopontin-metallothionein I/II interactions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience*, *350*, 133-145.
153. Jakovljevic, M., Lavrnja, I., Bozic, I., Milosevic, A., Bjelobaba, I., Savic, D., Sévigny, J., Pekovic, S., Nedeljkovic, N., & Laketa, D. (2019). Induction of NTPDase1/CD39 by Reactive Microglia and Macrophages Is Associated With the Functional State During EAE. *Front Neurosci*, *13*, 410.
154. Jakovljevic, M., Lavrnja, I., Bozic, I., Savic, D., Bjelobaba, I., Pekovic, S., Sévigny, J., Nedeljkovic, N., & Laketa, D. (2017). Down-regulation of NTPDase2 and ADP-sensitive P2 Purinoceptors Correlate with Severity of Symptoms during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Cell Neurosci*, *11*, 333.
155. Jansson, L., Olsson, T., & Holmdahl, R. (1994). Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. *J Neuroimmunol*, *53*(2), 203-207.
156. Janjic, M. M., Prévède, R. M., Fletcher, P. A., Sherman, A., Smiljanic, K., Abebe, D., Bjelobaba, I., & Stojilkovic, S. S. (2019). Divergent expression patterns of pituitary gonadotropin subunit and GnRH receptor genes to continuous GnRH in vitro and in vivo. *Sci Rep*, *9*(1), 20098.
157. Jiang, S. X., Slinn, J., Aylsworth, A., & Hou, S. T. (2012). Vimentin participates in microglia activation and neurotoxicity in cerebral ischemia. *J Neurochem*, *122*(4), 764-774.
158. Jo, Y., King, S. R., Khan, S. A., & Stocco, D. M. (2005). Involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent kinase in steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid biosynthesis in Leydig cells. *Biol Reprod*, *73*(2), 244-255.
159. Johannsen, T. H., Ljubcic, M. L., Young, J., Trabado, S., Petersen, J. H., Linneberg, A., Albrethsen, J., & Juul, A. (2021). Serum insulin-like factor 3 quantification by LC-MS/MS in male patients with hypogonadotropic hypogonadism and Klinefelter syndrome. *Endocrine*, *71*(3), 578-585.
160. Kaiser, U. B., Jakubowiak, A., Steinberger, A., & Chin, W. W. (1997). Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology*, *138*(3), 1224-1231.
161. Kamalian, N., Keeseey, R. E., & ZuRhein, G. M. (1975). Lateral hypothalamic demyelination and cachexia in a case of "malignant" multiple sclerosis. *Neurology*, *25*(1), 25-30.

162. Kang, S. S., Kim, S. R., Leonhardt, S., Jarry, H., Wuttke, W., & Kim, K. (2000). Effect of interleukin-1beta on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in castrated male rats. *J Neuroendocrinol*, *12*(5), 421-429.
163. Kantorová, E., Poláček, H., Bittšanský, M., Baranovičová, E., Hnilicová, P., Čierny, D., Sivák, Š., Nosál, V., Zeleňák, K., & Kurča, E. (2017). Hypothalamic damage in multiple sclerosis correlates with disease activity, disability, depression, and fatigue. *Neurol Res*, *39*(4), 323-330.
164. Kaprara, A., & Huhtaniemi, I. T. (2018). The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism*, *86*, 3-17.
165. Karpus, W. J. (2020). Cytokines and Chemokines in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*, *204*(2), 316-326.
166. Keeney, D. S., Mendis-Handagama, S. M., Zirkin, B. R., & Ewing, L. L. (1988). Effect of long term deprivation of luteinizing hormone on Leydig cell volume, Leydig cell number, and steroidogenic capacity of the rat testis. *Endocrinology*, *123*(6), 2906-2915.
167. Keith, A. B. (1978a). Effect of pregnancy on experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs and rats. *J Neurol Sci*, *38*(3), 317-326.
168. Keith, A. B. (1978b). Sex difference in Lewis rats in the incidence of recurrent experimental allergic encephalomyelitis. *Nature*, *272*(5656), 824-825.
169. Kempe, P., Eklund, D., Hallin, A., Hammar, M., Olsson, T., Brynhildsen, J., & Ernerudh, J. (2018). Immune profile in relation to sex steroid cyclicity in healthy women and women with multiple sclerosis. *J Reprod Immunol*, *126*, 53-59.
170. Ketha, H., Girtman, A., & Singh, R. J. (2015). Estradiol assays--The path ahead. *Steroids*, *99*(Pt A), 39-44.
171. Khurana, S. R., Bamer, A. M., Turner, A. P., Wadhwani, R. V., Bowen, J. D., Leipertz, S. L., & Haselkorn, J. K. (2009). The prevalence of overweight and obesity in veterans with multiple sclerosis. *Am J Phys Med Rehabil*, *88*(2), 83-91.
172. Kim, R. Y., Hoffman, A. S., Itoh, N., Ao, Y., Spence, R., Sofroniew, M. V., & Voskuhl, R. R. (2014). Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, *274*(1-2), 53-61.
173. Kim, S., Liva, S. M., Dalal, M. A., Verity, M. A., & Voskuhl, R. R. (1999). Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease: implications for multiple sclerosis. *Neurology*, *52*(6), 1230-1238.
174. Kipp, M., van der Star, B., Vogel, D. Y., Puentes, F., van der Valk, P., Baker, D., & Amor, S. (2012). Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord*, *1*(1), 15-28.
175. Kira, J., Harada, M., Yamaguchi, Y., Shida, N., & Goto, I. (1991). Hyperprolactinemia in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, *102*(1), 61-66.
176. Knoblaugh, S. E., True, L., Tretiakova, M., & Hukkanen, R. R. (2018). 18 - Male Reproductive System. In P. M. Treuting, S. M. Dintzis, & K. S. Montine (Eds.), *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)* (pp. 335-363). Academic Press.

177. Koiter, T. R., van der Schaaf-Verdonk, G. C., Kuiper, H., Pols-Valkhof, N., & Schuiling, G. A. (1984). A comparison of the LH-releasing activities of LH-RH and its agonistic analogue busserelin in the ovariectomized rat. *Life Sci*, 34(16), 1597-1604.
178. Koltun, K. J., De Souza, M. J., Scheid, J. L., & Williams, N. I. (2020). Energy Availability Is Associated With Luteinizing Hormone Pulse Frequency and Induction of Luteal Phase Defects. *J Clin Endocrinol Metab*, 105(1), 185-193.
179. Kotani, M., Detheux, M., Vandenberghe, A., Communi, D., Vanderwinden, J. M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S. N., Vassart, G., & Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*, 276(37), 34631-34636.
180. Kreisman, M. J., Tadrousse, K. S., McCosh, R. B., & Breen, K. M. (2021). Neuroendocrine Basis for Disrupted Ovarian Cyclicity in Female Mice During Chronic Undernutrition. *Endocrinology*, 162(8).
181. Kühn-Velten, N., & Staib, W. (1984). Inhibition of 17 beta-hydroxysteroid-oxidoreductase activity in purified rat Leydig cells by single injection of human choriogonadotrophin. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 105(4), 571-576.
182. Kunkl, M., Frasca, S., Amormino, C., Volpe, E., & Tuosto, L. (2020). T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells*, 9(2).
183. Kurth, F., Luders, E., Sicotte, N. L., Gaser, C., Giesser, B. S., Swerdloff, R. S., Montag, M. J., Voskuhl, R. R., & Mackenzie-Graham, A. (2014). Neuroprotective effects of testosterone treatment in men with multiple sclerosis. *Neuroimage Clin*, 4, 454-460.
184. La Marca, A., & Volpe, A. (2006). Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol (Oxf)*, 64(6), 603-610.
185. La Perle, K. M. D., & Dintzis, S. M. (2018). 15 - Endocrine System. In P. M. Treuting, S. M. Dintzis, & K. S. Montine (Eds.), *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)* (pp. 251-273). Academic Press.
186. Lainez, N. M., Jonak, C. R., Nair, M. G., Ethell, I. M., Wilson, E. H., Carson, M. J., & Coss, D. (2018). Diet-Induced Obesity Elicits Macrophage Infiltration and Reduction in Spine Density in the Hypothalami of Male but Not Female Mice. *Front Immunol*, 9, 1992.
187. Landschulz, K. T., Pathak, R. K., Rigotti, A., Krieger, M., & Hobbs, H. H. (1996). Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest*, 98(4), 984-995. <https://doi.org/10.1172/jci118883>
188. Langer-Gould, A., Garren, H., Slansky, A., Ruiz, P. J., & Steinman, L. (2002). Late pregnancy suppresses relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for a suppressive pregnancy-related serum factor. *J Immunol*, 169(2), 1084-1091.
189. Langer-Gould, A., Smith, J. B., Albers, K. B., Xiang, A. H., Wu, J., Kerezsi, E. H., McClearn, K., Gonzales, E. G., Leimpeter, A. D., & Van Den Eeden, S. K. (2020). Pregnancy-related relapses and breastfeeding in a contemporary multiple sclerosis cohort. *Neurology*, 94(18), e1939-e1949.
190. Langer-Gould, A., Smith, J. B., Hellwig, K., Gonzales, E., Haraszti, S., Koebnick, C., & Xiang, A. (2017). Breastfeeding, ovulatory years, and risk of multiple sclerosis. *Neurology*, 89(6), 563-569.

191. Lara, H. E., Dissen, G. A., Leyton, V., Paredes, A., Fuenzalida, H., Fiedler, J. L., & Ojeda, S. R. (2000). An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology*, *141*(3), 1059-1072.
192. Lassmann, H. (2018). Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *8*(3).
193. Lassmann, H. (2019). The changing concepts in the neuropathology of acquired demyelinating central nervous system disorders. *Curr Opin Neurol*, *32*(3), 313-319.
194. Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, *133*(2), 223-244.
195. Lavoie, H. A., & King, S. R. (2009). Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med (Maywood)*, *234*(8), 880-907.
196. Lavrnja, I., Bjelobaba, I., Stojiljkovic, M., Pekovic, S., Mostarica-Stojkovic, M., Stosic-Grujicic, S., & Nedeljkovic, N. (2009). Time-course changes in ectonucleotidase activities during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurochem Int*, *55*(4), 193-198.
197. Lee, C. Y., Li, S., Li, X. F., Stalker, D. A. E., Cooke, C., Shao, B., Kelestimur, H., Henry, B. A., Conductier, G., KT, O. B., & Clarke, I. J. (2019). Lipopolysaccharide reduces gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) gene expression: role of RFamide-related peptide-3 and kisspeptin. *Reprod Fertil Dev*, *31*(6), 1134-1143.
198. Leisegang, K., & Henkel, R. (2018). The in vitro modulation of steroidogenesis by inflammatory cytokines and insulin in TM3 Leydig cells. *Reprod Biol Endocrinol*, *16*(1), 26.
199. Lévesque, S. A., Paré, A., Mailhot, B., Bellver-Landete, V., Kébir, H., Lécuyer, M. A., Alvarez, J. I., Prat, A., de Rivero Vaccari, J. P., Keane, R. W., & Lacroix, S. (2016). Myeloid cell transmigration across the CNS vasculature triggers IL-1 β -driven neuroinflammation during autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Exp Med*, *213*(6), 929-949.
200. Levine, J. E. (2015). Chapter 26 - Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (pp. 1199-1257). Academic Press.
201. Levine, J. E., & Duffy, M. T. (1988). Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats. *Endocrinology*, *122*(5), 2211-2221.
202. Li, J., Papadopoulos, V., & Vihma, V. (2015). Steroid biosynthesis in adipose tissue. *Steroids*, *103*, 89-104.
203. Libert, C., Dejager, L., & Pinheiro, I. (2010). The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol*, *10*(8), 594-604.
204. Lin, C. C., & Edelson, B. T. (2017). New Insights into the Role of IL-1 β in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *J Immunol*, *198*(12), 4553-4560.
205. Liu, J., Rone, M. B., & Papadopoulos, V. (2006). Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *J Biol Chem*, *281*(50), 38879-38893.
206. Liva, S. M., & Voskuhl, R. R. (2001). Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J Immunol*, *167*(4), 2060-2067.

207. Lorentzen, J. C., Andersson, M., Issazadeh, S., Dahlman, I., Luthman, H., Weissert, R., & Olsson, T. (1997). Genetic analysis of inflammation, cytokine mRNA expression and disease course of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *J Neuroimmunol*, *80*(1-2), 31-37.
208. Loveland, K. L., Klein, B., Pueschl, D., Indumathy, S., Bergmann, M., Loveland, B. E., Hedger, M. P., & Schuppe, H. C. (2017). Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *8*, 307.
209. Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sørensen, P. S., Thompson, A. J., Wolinsky, J. S., Balcer, L. J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B., Jr., Calabresi, P. A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R. J., Freedman, M. S., Goodman, A. D., Inglese, M., Kappos, L., Kieseier, B. C., Lincoln, J. A., Lubetzki, C., Miller, A. E., Montalban, X., O'Connor, P. W., Petkau, J., Pozzilli, C., Rudick, R. A., Sormani, M. P., Stüve, O., Waubant, E., & Polman, C. H. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, *83*(3), 278-286.
210. Luque, R. M., Kineman, R. D., & Tena-Sempere, M. (2007). Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology*, *148*(10), 4601-4611.
211. Macció, D. R., Calfa, G., & Roth, G. A. (2005). Oral testosterone in male rats and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation*, *12*(4), 246-254.
212. Macció, D. R., Ditamo, Y., Degano, A. L., & Roth, G. A. (2004). Interaction between gonadal steroids and neuroimmune system in acute experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in Wistar rats. *Autoimmunity*, *37*(1), 17-25.
213. MacKenzie-Graham, A., Brook, J., Kurth, F., Itoh, Y., Meyer, C., Montag, M. J., Wang, H. J., Elashoff, R., & Voskuhl, R. R. (2018). Estriol-mediated neuroprotection in multiple sclerosis localized by voxel-based morphometry. *Brain Behav*, *8*(9), e01086.
214. Magoffin, D. A. (2005). Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol*, *37*(7), 1344-1349.
215. Magyari, M., & Koch-Henriksen, N. (2022). Quantitative effect of sex on disease activity and disability accumulation in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *93*(7), 716-722.
216. Malik, M. T., Healy, B. C., Benson, L. A., Kivisakk, P., Musallam, A., Weiner, H. L., & Chitnis, T. (2014). Factors associated with recovery from acute optic neuritis in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, *82*(24), 2173-2179.
217. Manfredi-Lozano, M., Roa, J., & Tena-Sempere, M. (2018). Connecting metabolism and gonadal function: Novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of puberty and fertility. *Front Neuroendocrinol*, *48*, 37-49.
218. Manna, P. R., Chandrala, S. P., Jo, Y., & Stocco, D. M. (2006). cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. *J Mol Endocrinol*, *37*(1), 81-95.
219. Manna, P. R., Dyson, M. T., & Stocco, D. M. (2009). Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol Hum Reprod*, *15*(6), 321-333.

220. Marck, C. H., Neate, S. L., Taylor, K. L., Weiland, T. J., & Jelinek, G. A. (2016). Prevalence of Comorbidities, Overweight and Obesity in an International Sample of People with Multiple Sclerosis and Associations with Modifiable Lifestyle Factors. *PLoS One*, *11*(2), e0148573.
221. Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*, *62*(4a), 609-614.
222. Marques, P., Skorupskaite, K., Rozario, K. S., Anderson, R. A., & George, J. T. (2000). Physiology of GnRH and Gonadotropin Secretion. In K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, N. Kapoor, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Sahay, A. S. Shah, F. Singer, M. A. Sperling, C. A. Stratakis, D. L. Trencé, & D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc.
223. Maserà, S., Cavalla, P., Prosperini, L., Mattioda, A., Mancinelli, C. R., Superti, G., Chiavazza, C., Vercellino, M., Pinessi, L., & Pozzilli, C. (2015). Parity is associated with a longer time to reach irreversible disability milestones in women with multiple sclerosis. *Mult Scler*, *21*(10), 1291-1297.
224. Massilamany, C., Thulasingham, S., Steffen, D., & Reddy, J. (2011). Gender differences in CNS autoimmunity induced by mimicry epitope for PLP 139-151 in SJL mice. *J Neuroimmunol*, *230*(1-2), 95-104.
225. Matejuk, A., Adlard, K., Zamora, A., Silverman, M., Vandembark, A. A., & Offner, H. (2001). 17 beta-estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mRNA expression in the central nervous system of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*, *65*(6), 529-542.
226. Matsushima, G. K., & Morell, P. (2001). The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*, *11*(1), 107-116.
227. Maynard, R. L., & Downes, N. (2019a). Chapter 18 - Male Reproductive System. In R. L. Maynard & N. Downes (Eds.), *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research* (pp. 207-217). Academic Press.
228. Maynard, R. L., & Downes, N. (2019b). Chapter 19 - Female Reproductive Tract. In R. L. Maynard & N. Downes (Eds.), *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research* (pp. 219-229). Academic Press.
229. McArdle, C. A., & Roberson, M. S. (2015). Chapter 10 - Gonadotropes and Gonadotropin-Releasing Hormone Signaling. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (pp. 335-397). Academic Press.
230. McCandless, E. E., Budde, M., Lees, J. R., Dorsey, D., Lyng, E., & Klein, R. S. (2009). IL-1R signaling within the central nervous system regulates CXCL12 expression at the blood-brain barrier and disease severity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, *183*(1), 613-620.
231. McClain, M. A., Gatson, N. N., Powell, N. D., Papenfuss, T. L., Gienapp, I. E., Song, F., Shawler, T. M., Kithcart, A., & Whitacre, C. C. (2007). Pregnancy suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis through immunoregulatory cytokine production. *J Immunol*, *179*(12), 8146-8152.
232. McCombe, P. A. (2018). The Short and Long-Term Effects of Pregnancy on Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Clin Med*, *7*(12).

233. McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, *21*(2), 200-214.
234. Mecha, M., Carrillo-Salinas, F. J., Mestre, L., Feliú, A., & Guaza, C. (2013). Viral models of multiple sclerosis: neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's virus. *Prog Neurobiol*, *101-102*, 46-64.
235. Mendis-Handagama, S. M., Watkins, P. A., Gelber, S. J., & Scallen, T. J. (1992). Leydig cell peroxisomes and sterol carrier protein-2 in luteinizing hormone-deprived rats. *Endocrinology*, *131*(6), 2839-2845.
236. Mertin, L. A., & Rumjanek, V. M. (1985). Pregnancy and the susceptibility of Lewis rats to experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci*, *68*(1), 15-24.
237. Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Ma, D., Hendrick, A. G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R. R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M. B., Colledge, W. H., Caraty, A., & Aparicio, S. A. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(5), 1761-1766.
238. Metzger-Peter, K., Kremer, L. D., Edan, G., Loureiro De Sousa, P., Lamy, J., Bagnard, D., Mensah-Nyagan, A. G., Tricard, T., Mathey, G., Debouverie, M., Berger, E., Kerbrat, A., Meyer, N., De Seze, J., & Collongues, N. (2020). The TOTEM RRMS (Testosterone Treatment on neuroprotection and Myelin Repair in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis) trial: study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Trials*, *21*(1), 591.
239. Miller, W. L. (2013). Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*, *379*(1-2), 62-73.
240. Mills Ko, E., Ma, J. H., Guo, F., Miers, L., Lee, E., Bannerman, P., Burns, T., Ko, D., Sohn, J., Soulika, A. M., & Pleasure, D. (2014). Deletion of astroglial CXCL10 delays clinical onset but does not affect progressive axon loss in a murine autoimmune multiple sclerosis model. *J Neuroinflammation*, *11*, 105.
241. Milošević, A. (2016). *Ekspresija kispeptina u hipotalamusu ženki pacova tokom eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa* [Master rad, Univerzitet u Beogradu]. Beograd.
242. Mooradian, A. D., Morley, J. E., & Korenman, S. G. (1987). Biological actions of androgens. *Endocr Rev*, *8*(1), 1-28.
243. Moreno, M., Bannerman, P., Ma, J., Guo, F., Miers, L., Soulika, A. M., & Pleasure, D. (2014). Conditional ablation of astroglial CCL2 suppresses CNS accumulation of M1 macrophages and preserves axons in mice with MOG peptide EAE. *J Neurosci*, *34*(24), 8175-8185.
244. Morgan, B. P., Gommerman, J. L., & Ramaglia, V. (2020). An "Outside-In" and "Inside-Out" Consideration of Complement in the Multiple Sclerosis Brain: Lessons From Development and Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*, *14*, 600656.
245. Morita-Takemura, S., & Wanaka, A. (2019). Blood-to-brain communication in the hypothalamus for energy intake regulation. *Neurochem Int*, *128*, 135-142.
246. Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2015). The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev*, *36*(5), 564-591.
247. Muir, A. I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N. A., Michalovich, D., Moore, D. J., Calamari, A., Szekeres, P. G., Sarau, H. M., Chambers, J. K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J. E., Middleton, S. E., Darker, J. G., Larminie, C. G., Wilson, S., Bergsma, D. J., Emson, P., Faull, R., Philpott,

- K. L., & Harrison, D. C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem*, 276(31), 28969-28975.
248. Nacka-Aleksić, M., Djikić, J., Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Kosec, D., Bufan, B., Arsenović-Ranin, N., Dimitrijević, M., & Leposavić, G. (2015). Male rats develop more severe experimental autoimmune encephalomyelitis than female rats: sexual dimorphism and diergism at the spinal cord level. *Brain Behav Immun*, 49, 101-118.
249. Nagae, M., Uenoyama, Y., Okamoto, S., Tsuchida, H., Ikegami, K., Goto, T., Majarune, S., Nakamura, S., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Kobayashi, K., Inoue, N., & Tsukamura, H. (2021). Direct evidence that KNDy neurons maintain gonadotropin pulses and folliculogenesis as the GnRH pulse generator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(5).
250. Nakamura, E., Otsuka, F., Inagaki, K., Miyoshi, T., Matsumoto, Y., Ogura, K., Tsukamoto, N., Takeda, M., & Makino, H. (2012). Mutual regulation of growth hormone and bone morphogenetic protein system in steroidogenesis by rat granulosa cells. *Endocrinology*, 153(1), 469-480.
251. Naor, Z. (2009). Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol*, 30(1), 10-29.
252. Narayan, P., Ulloa-Aguirre, A., & Dias, J. A. (2019). Chapter 2 - Gonadotropin Hormones and Their Receptors. In J. F. Strauss & R. L. Barbieri (Eds.), *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)* (pp. 25-57.e15). Elsevier.
253. Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., & Weinshenker, B. G. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 343(13), 938-952.
254. O'Shaughnessy, P. (2015). Chapter 14 - Testicular Development. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (pp. 567-594). Academic Press.
255. O'Bryan, M. K., Schlatt, S., Phillips, D. J., de Kretser, D. M., & Hedger, M. P. (2000). Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology*, 141(1), 238-246.
256. Oduwole, O. O., Huhtaniemi, I. T., & Misrahi, M. (2021). The Roles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited. *Int J Mol Sci*, 22(23).
257. Oldfield, B. J., & McKinley, M. J. (2015). Chapter 15 - Circumventricular Organs. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System (Fourth Edition)* (pp. 315-333). Academic Press.
258. O'Loughlin, E., Madore, C., Lassmann, H., & Butovsky, O. (2018). Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8(2).
259. Pachner, A. R. (2011). Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 24(3), 291-299.
260. Palaszynski, K. M., Liu, H., Loo, K. K., & Voskuhl, R. R. (2004). Estriol treatment ameliorates disease in males with experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 149(1-2), 84-89.
261. Palaszynski, K. M., Loo, K. K., Ashouri, J. F., Liu, H. B., & Voskuhl, R. R. (2004). Androgens are protective in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 146(1-2), 144-152.

262. Pangas, S. A., & Rajkovic, A. (2015). Chapter 21 - Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (pp. 947-995). Academic Press.
263. Papenfuss, T. L., Rogers, C. J., Gienapp, I., Yurrita, M., McClain, M., Damico, N., Valo, J., Song, F., & Whitacre, C. C. (2004). Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. *J Neuroimmunol*, *150*(1-2), 59-69.
264. Park, O. K., & Ramirez, V. D. (1989). Spontaneous changes in LHRH release during the rat estrous cycle, as measured with repetitive push-pull perfusions of the pituitary gland in the same female rats. *Neuroendocrinology*, *50*(1), 66-72.
265. Patel, R., Moore, S., Crawford, D. K., Hannsun, G., Sasidhar, M. V., Tan, K., Molaie, D., & Tiwari-Woodruff, S. K. (2013). Attenuation of corpus callosum axon myelination and remyelination in the absence of circulating sex hormones. *Brain Pathol*, *23*(4), 462-475.
266. Payne, A. H., & Hales, D. B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*, *25*(6), 947-970.
267. Payne, A. H., & Sha, L. L. (1991). Multiple mechanisms for regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5---delta 4-isomerase, 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450, and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells. *Endocrinology*, *129*(3), 1429-1435.
268. Pedersen, T., & Peters, H. (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil*, *17*(3), 555-557.
269. Pekny, M., & Pekna, M. (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*, *204*(4), 428-437.
270. Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhäuser, C., Lee, J. M., Parpura, V., Hol, E. M., Sofroniew, M. V., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol*, *131*(3), 323-345.
271. Pheng, V., Uenoyama, Y., Homma, T., Inamoto, Y., Takase, K., Yoshizawa-Kumagaye, K., Isaka, S., Watanabe, T. X., Ohkura, S., Tomikawa, J., Maeda, K., & Tsukamura, H. (2009). Potencies of centrally- or peripherally-injected full-length kisspeptin or its C-terminal decapeptide on LH release in intact male rats. *J Reprod Dev*, *55*(4), 378-382.
272. Phumsatitpong, C., Wagenmaker, E. R., & Moenter, S. M. (2021). Neuroendocrine interactions of the stress and reproductive axes. *Front Neuroendocrinol*, *63*, 100928.
273. Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Prijić, I., Jasnić, N., & Leposavić, G. (2020). Propranolol diminished severity of rat EAE by enhancing immunoregulatory/protective properties of spinal cord microglia. *Neurobiol Dis*, *134*, 104665.
274. Plant, T. M. (2012). A comparison of the neuroendocrine mechanisms underlying the initiation of the preovulatory LH surge in the human, Old World monkey and rodent. *Front Neuroendocrinol*, *33*(2), 160-168.
275. Polanczyk, M., Zamora, A., Subramanian, S., Matejuk, A., Hess, D. L., Blankenhorn, E. P., Teuscher, C., Vandenbark, A. A., & Offner, H. (2003). The protective effect of 17beta-estradiol on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated through estrogen receptor-alpha. *Am J Pathol*, *163*(4), 1599-1605.

276. Pozzilli, C., De Giglio, L., Barletta, V. T., Marinelli, F., Angelis, F. D., Gallo, V., Pagano, V. A., Marini, S., Piattella, M. C., Tomassini, V., & Pantano, P. (2015). Oral contraceptives combined with interferon β in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2(4), e120.
277. Pozzilli, C., Falaschi, P., Mainero, C., Martocchia, A., D'Urso, R., Proietti, A., Frontoni, M., Bastianello, S., & Filippi, M. (1999). MRI in multiple sclerosis during the menstrual cycle: relationship with sex hormone patterns. *Neurology*, 53(3), 622-624.
278. Pozzilli, C., Tomassini, V., Marinelli, F., Paolillo, A., Gasperini, C., & Bastianello, S. (2003). 'Gender gap' in multiple sclerosis: magnetic resonance imaging evidence. *Eur J Neurol*, 10(1), 95-97.
279. Prevot, V. (2015). Chapter 30 - Puberty in Mice and Rats. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (pp. 1395-1439). Academic Press.
280. Qiu, W., Raven, S., Wu, J. S., Bundell, C., Hollingsworth, P., Carroll, W. M., Mastaglia, F. L., & Kermode, A. G. (2011). Hypothalamic lesions in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82(7), 819-822.
281. Quennell, J. H., Howell, C. S., Roa, J., Augustine, R. A., Grattan, D. R., & Anderson, G. M. (2011). Leptin deficiency and diet-induced obesity reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. *Endocrinology*, 152(4), 1541-1550. Rabchevsky, A. G., Degos, J. D., & Dreyfus, P. A. (1999). Peripheral injections of Freund's adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis. *Brain Res*, 832(1-2), 84-96. Rahn, E. J., Iannitti, T., Donahue, R. R., & Taylor, B. K. (2014). Sex differences in a mouse model of multiple sclerosis: neuropathic pain behavior in females but not males and protection from neurological deficits during proestrus. *Biol Sex Differ*, 5(1), 4.
282. Ramagopalan, S. V., Valdar, W., Criscuoli, M., DeLuca, G. C., Dymont, D. A., Orton, S. M., Yee, I. M., Ebers, G. C., & Sadovnick, A. D. (2009). Age of puberty and the risk of multiple sclerosis: a population based study. *Eur J Neurol*, 16(3), 342-347.
283. Ransohoff, R. M. (2012). Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci*, 15(8), 1074-1077.
284. Reaven, E., Zhan, L., Nomoto, A., Leers-Sucheta, S., & Azhar, S. (2000). Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis. *J Lipid Res*, 41(3), 343-356.
285. Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 378(2), 169-180.
286. Riskind, P. N., Massacesi, L., Doolittle, T. H., & Hauser, S. L. (1991). The role of prolactin in autoimmune demyelination: suppression of experimental allergic encephalomyelitis by bromocriptine. *Ann Neurol*, 29(5), 542-547.
287. Rival, C., Theas, M. S., Suescun, M. O., Jacobo, P., Guazzone, V., van Rooijen, N., & Lustig, L. (2008). Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. *J Pathol*, 215(2), 108-117.
288. Rivers, T. M., Sprunt, D. H., & Berry, G. P. (1933). OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J Exp Med*, 58(1), 39-53.
289. Rivest, R. W. (1991). Sexual maturation in female rats: hereditary, developmental and environmental aspects. *Experientia*, 47(10), 1027-1038.

290. Rivest, S., & Rivier, C. (1993). Centrally injected interleukin-1 beta inhibits the hypothalamic LHRH secretion and circulating LH levels via prostaglandins in rats. *J Neuroendocrinol*, *5*(4), 445-450.
291. Rivier, C. (2002). Inhibitory effect of neurogenic and immune stressors on testosterone secretion in rats. *Neuroimmunomodulation*, *10*(1), 17-29.
292. Rochfort, K. D., Collins, L. E., McLoughlin, A., & Cummins, P. M. (2016). Tumour necrosis factor- α -mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6. *J Neurochem*, *136*(3), 564-572.
293. Rone, M. B., Fan, J., & Papadopoulos, V. (2009). Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta*, *1791*(7), 646-658.
294. Runmarker, B., & Andersen, O. (1995). Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis. *Brain*, *118* (Pt 1), 253-261.
295. Russell, D. W., & Wilson, J. D. (1994). Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem*, *63*, 25-61.
296. Russell, L. D., Corbin, T. J., Ren, H. P., Amador, A., Bartke, A., & Ghosh, S. (1992). Structural changes in rat Leydig cells posthypophysectomy: a morphometric and endocrine study. *Endocrinology*, *131*(1), 498-508.
297. Sadeghian, H., Anand-Ivell, R., Balvers, M., Relan, V., & Ivell, R. (2005). Constitutive regulation of the *Ins13* gene in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, *241*(1-2), 10-20.
298. Saez, J. M. (1994). Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev*, *15*(5), 574-626.
299. Safarinejad, M. R. (2008). Evaluation of endocrine profile, hypothalamic-pituitary-testis axis and semen quality in multiple sclerosis. *J Neuroendocrinol*, *20*(12), 1368-1375.
300. Sato, J., Hashimoto, S., Doi, T., Yamada, N., & Tsuchitani, M. (2014). Histological characteristics of the regression of corpora lutea in wistar hannover rats: the comparisons with sprague-dawley rats. *J Toxicol Pathol*, *27*(2), 107-113.
301. Savarin, C., Hinton, D. R., Valentin-Torres, A., Chen, Z., Trapp, B. D., Bergmann, C. C., & Stohlman, S. A. (2015). Astrocyte response to IFN- γ limits IL-6-mediated microglia activation and progressive autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*, *12*, 79.
302. Schally, A. V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R. M., Matsuo, H., Redding, T. W., & Debeljuk, L. (1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun*, *43*(2), 393-399.
303. Schuh, K., Häussler, S., Sadri, H., Prehn, C., Lintelmann, J., Adamski, J., Koch, C., Frieten, D., Ghaffari, M. H., Dusel, G., & Sauerwein, H. (2022). Blood and adipose tissue steroid metabolomics and mRNA expression of steroidogenic enzymes in periparturient dairy cows differing in body condition. *Sci Rep*, *12*(1), 2297.
304. Schulz, M., & Engelhardt, B. (2005). The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Res*, *2*, 8.

305. Scott, H. M., Mason, J. I., & Sharpe, R. M. (2009). Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev*, *30*(7), 883-925.
306. Segal, B. M. (2019). The Diversity of Encephalitogenic CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis and Its Animal Models. *J Clin Med*, *8*(1).
307. Selvaraj, V., Stocco, D. M., & Clark, B. J. (2018). Current knowledge on the acute regulation of steroidogenesis. *Biol Reprod*, *99*(1), 13-26.
308. Sen, M. K., Almuslehi, M. S. M., Shortland, P. J., Coorsen, J. R., & Mahns, D. A. (2020). Revisiting the Pathoetiology of Multiple Sclerosis: Has the Tail Been Wagging the Mouse? *Front Immunol*, *11*, 572186.
309. Sepúlveda, M., Ros, C., Martínez-Lapiscina, E. H., Solà-Valls, N., Hervàs, M., Llufríu, S., La Puma, D., Casals, E., Blanco, Y., Villoslada, P., Graus, F., Castelo-Branco, C., & Saiz, A. (2016). Pituitary-ovary axis and ovarian reserve in fertile women with multiple sclerosis: A pilot study. *Mult Scler*, *22*(4), 564-568.
310. Setchell, B. P., & Breed, W. G. (2006). CHAPTER 17 - Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. In J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (pp. 771-825). Academic Press.
311. Sicotte, N. L., Giesser, B. S., Tandon, V., Klutch, R., Steiner, B., Drain, A. E., Shattuck, D. W., Hull, L., Wang, H. J., Elashoff, R. M., Swerdloff, R. S., & Voskuhl, R. R. (2007). Testosterone treatment in multiple sclerosis: a pilot study. *Arch Neurol*, *64*(5), 683-688.
312. Sicotte, N. L., Liva, S. M., Klutch, R., Pfeiffer, P., Bouvier, S., Odesa, S., Wu, T. C., & Voskuhl, R. R. (2002). Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol*, *52*(4), 421-428.
313. Simerly, R. B. (2015). Chapter 13 - Organization of the Hypothalamus. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System (Fourth Edition)* (pp. 267-294). Academic Press.
314. Sitruk-Ware, R., Bonsack, B., Brinton, R., Schumacher, M., Kumar, N., Lee, J. Y., Castelli, V., Corey, S., Coats, A., Sadanandan, N., Gonzales-Portillo, B., Heyck, M., Shear, A., Blaise, C., Zhang, H., Sheyner, M., García-Sánchez, J., Navarro, L., El-Etr, M., De Nicola, A. F., & Borlongan, C. V. (2021). Progress in progestin-based therapies for neurological disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, *122*, 38-65.
315. Sloka, J. S., Pryse-Phillips, W. E., & Stefanelli, M. (2006). The relation between menarche and the age of first symptoms in a multiple sclerosis cohort. *Mult Scler*, *12*(3), 333-339.
316. Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, *146*(9), 3686-3692.
317. Smith, J. T., Dungan, H. M., Stoll, E. A., Gottsch, M. L., Braun, R. E., Eacker, S. M., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2005). Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*, *146*(7), 2976-2984.
318. Smith, M. S., Freeman, M. E., & Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, *96*(1), 219-226.

319. Soldan, S. S., Alvarez Retuerto, A. I., Sicotte, N. L., & Voskuhl, R. R. (2003). Immune modulation in multiple sclerosis patients treated with the pregnancy hormone estriol. *J Immunol*, *171*(11), 6267-6274.
320. Sørensen, T. L., Ransohoff, R. M., Strieter, R. M., & Sellebjerg, F. (2004). Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, *11*(7), 445-449.
321. Spence, R. D., & Voskuhl, R. R. (2012). Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Front Neuroendocrinol*, *33*(1), 105-115.
322. Stamatiades, G. A., & Kaiser, U. B. (2018). Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, *463*, 131-141.
323. Stocco, C., Telleria, C., & Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev*, *28*(1), 117-149.
324. Stocco, D. M., Teerds, K. J., van Noort, M., & Rommerts, F. F. (1990). Effects of hypophysectomy and human chorionic gonadotrophin on Leydig cell function in mature rats. *J Endocrinol*, *126*(3), 367-375.
325. Stocco, D. M., Wang, X., Jo, Y., & Manna, P. R. (2005). Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol*, *19*(11), 2647-2659.
326. Stojić-Vukanić, Z., Kotur-Stevuljević, J., Nacka-Aleksić, M., Kosec, D., Vujnović, I., Pilipović, I., Dimitrijević, M., & Leposavić, G. (2018). Sex Bias in Pathogenesis of Autoimmune Neuroinflammation: Relevance for Dimethyl Fumarate Immunomodulatory/Anti-oxidant Action. *Mol Neurobiol*, *55*(5), 3755-3774.
327. Stouffer, R. L., & Hennebold, J. D. (2015). Chapter 23 - Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (pp. 1023-1076). Academic Press.
328. Stys, P. K., Zamponi, G. W., van Minnen, J., & Geurts, J. J. (2012). Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*, *13*(7), 507-514.
329. Subramanian, S., Matejuk, A., Zamora, A., Vandenbark, A. A., & Offner, H. (2003). Oral feeding with ethinyl estradiol suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice and inhibits the recruitment of inflammatory cells into the central nervous system. *J Immunol*, *170*(3), 1548-1555.
330. Sumaya, C. V., Myers, L. W., & Ellison, G. W. (1980). Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Arch Neurol*, *37*(2), 94-96.
331. t Hart, B. A., Luchicchi, A., Schenk, G. J., Stys, P. K., & Geurts, J. J. G. (2021). Mechanistic underpinning of an inside-out concept for autoimmunity in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*, *8*(8), 1709-1719.
332. Taketa, Y. (2022). Luteal toxicity evaluation in rats. *J Toxicol Pathol*, *35*(1), 7-17.
333. Tanuma, N., Shin, T., & Matsumoto, Y. (2000). Characterization of acute versus chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *J Neuroimmunol*, *108*(1-2), 171-180.
334. Taylor, L. C., Gilmore, W., Ting, J. P., & Matsushima, G. K. (2010). Cuprizone induces similar demyelination in male and female C57BL/6 mice and results in disruption of the estrous cycle. *J Neurosci Res*, *88*(2), 391-402.

335. Thompson, E. L., Patterson, M., Murphy, K. G., Smith, K. L., Dhillon, W. S., Todd, J. F., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. (2004). Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol*, *16*(10), 850-858.
336. Thompson, I. R., & Kaiser, U. B. (2014). GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, *385*(1-2), 28-35.
337. Titus, H. E., Chen, Y., Podojil, J. R., Robinson, A. P., Balabanov, R., Popko, B., & Miller, S. D. (2020). Pre-clinical and Clinical Implications of "Inside-Out" vs. "Outside-In" Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. *Front Cell Neurosci*, *14*, 599717.
338. Tiwari-Woodruff, S., Morales, L. B., Lee, R., & Voskuhl, R. R. (2007). Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta ligand treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(37), 14813-14818.
339. Tomassini, V., Onesti, E., Mainero, C., Giugni, E., Paolillo, A., Salvetti, M., Nicoletti, F., & Pozzilli, C. (2005). Sex hormones modulate brain damage in multiple sclerosis: MRI evidence. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *76*(2), 272-275.
340. Trabado, S., Maione, L., Bry-Gauillard, H., Affres, H., Salenave, S., Sarfati, J., Bouvattier, C., Delemer, B., Chanson, P., Le Bouc, Y., Brailly-Tabard, S., & Young, J. (2014). Insulin-like peptide 3 (INSL3) in men with congenital hypogonadotropic hypogonadism/Kallmann syndrome and effects of different modalities of hormonal treatment: a single-center study of 281 patients. *J Clin Endocrinol Metab*, *99*(2), E268-275.
341. Tremblay, Y., & Belanger, A. (1985). Changes in plasma steroid levels after single administration of hCG or LHRH agonist analogue in dog and rat. *J Steroid Biochem*, *22*(3), 315-320.
342. Trooster, W. J., Teelken, A. W., Gerrits, P. O., Lijnema, T. H., Loof, J. G., Minderhoud, J. M., & Nieuwenhuis, P. (1996). The effect of gonadectomy on the clinical course of chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Clin Neurol Neurosurg*, *98*(3), 222-226.
343. Tropp, J., & Markus, E. J. (2001). Effects of mild food deprivation on the estrous cycle of rats. *Physiol Behav*, *73*(4), 553-559.
344. Tsai-Morris, C. H., Khanum, A., Tang, P. Z., & Dufau, M. L. (1999). The rat 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type III: molecular cloning and gonadotropin regulation. *Endocrinology*, *140*(8), 3534-3542.
345. Tsukamura, H. (2022). Kobayashi Award 2019: The neuroendocrine regulation of the mammalian reproduction. *Gen Comp Endocrinol*, *315*, 113755.
346. Turnbull, A. V., & Rivier, C. (1997). Inhibition of gonadotropin-induced testosterone secretion by the intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta in the male rat. *Endocrinology*, *138*(3), 1008-1013.
347. Uenoyama, Y., Inoue, N., Maeda, K. I., & Tsukamura, H. (2018). The roles of kisspeptin in the mechanism underlying reproductive functions in mammals. *J Reprod Dev*, *64*(6), 469-476.
348. Uenoyama, Y., Inoue, N., Pheng, V., Homma, T., Takase, K., Yamada, S., Ajiki, K., Ichikawa, M., Okamura, H., Maeda, K. I., & Tsukamura, H. (2011). Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) interaction in the median eminence of female rats: implication of axo-axonal regulation of GnRH release. *J Neuroendocrinol*, *23*(10), 863-870.

349. Valassi, E., Scacchi, M., & Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18(2), 158-168.
350. van der Star, B. J., Vogel, D. Y., Kipp, M., Puentes, F., Baker, D., & Amor, S. (2012). In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11(5), 570-588.
351. Van Kaer, L., Postoak, J. L., Wang, C., Yang, G., & Wu, L. (2019). Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. *Cell Mol Immunol*, 16(6), 531-539.
352. van Waesberghe, J. H., Kamphorst, W., De Groot, C. J., van Walderveen, M. A., Castelijns, J. A., Ravid, R., Lycklama à Nijeholt, G. J., van der Valk, P., Polman, C. H., Thompson, A. J., & Barkhof, F. (1999). Axonal loss in multiple sclerosis lesions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability. *Ann Neurol*, 46(5), 747-754.
353. van Weerden, W. M., Bierings, H. G., van Steenbrugge, G. J., de Jong, F. H., & Schröder, F. H. (1992). Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci*, 50(12), 857-861.
354. Vercellino, M., Masera, S., Lorenzatti, M., Condello, C., Merola, A., Mattioda, A., Tribolo, A., Capello, E., Mancardi, G. L., Mutani, R., Giordana, M. T., & Cavalla, P. (2009). Demyelination, inflammation, and neurodegeneration in multiple sclerosis deep gray matter. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68(5), 489-502.
355. Verdru, P., Theys, P., D'Hooghe, M. B., & Carton, H. (1994). Pregnancy and multiple sclerosis: the influence on long term disability. *Clin Neurol Neurosurg*, 96(1), 38-41.
356. Voet, S., Prinz, M., & van Loo, G. (2019). Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends Mol Med*, 25(2), 112-123.
357. Voskuhl, R. (2011). Sex differences in autoimmune diseases. *Biol Sex Differ*, 2(1), 1.
358. Voskuhl, R. R., Wang, H., Wu, T. C., Sicotte, N. L., Nakamura, K., Kurth, F., Itoh, N., Bardens, J., Bernard, J. T., Corboy, J. R., Cross, A. H., Dhib-Jalbut, S., Ford, C. C., Frohman, E. M., Giesser, B., Jacobs, D., Kasper, L. H., Lynch, S., Parry, G., Racke, M. K., Reder, A. T., Rose, J., Wingerchuk, D. M., MacKenzie-Graham, A. J., Arnold, D. L., Tseng, C. H., & Elashoff, R. (2016). Estriol combined with glatiramer acetate for women with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol*, 15(1), 35-46.
359. Vukusic, S., Ionescu, I., El-Etr, M., Schumacher, M., Baulieu, E. E., Cornu, C., & Confavreux, C. (2009). The Prevention of Post-Partum Relapses with Progestin and Estradiol in Multiple Sclerosis (POPART'MUS) trial: rationale, objectives and state of advancement. *J Neurol Sci*, 286(1-2), 114-118.
360. Wagner, I. V., Sahlin, L., Savchuk, I., Klötting, N., Svechnikov, K., & Söder, O. (2018). Adipose Tissue is a Potential Source of Hyperandrogenism in Obese Female Rats. *Obesity (Silver Spring)*, 26(7), 1161-1167.
361. Wagner, I. V., Savchuk, I., Sahlin, L., Kulle, A., Klötting, N., Dietrich, A., Holterhus, P. M., Dötsch, J., Blüher, M., & Söder, O. (2022). De Novo and Depot-Specific Androgen Production in Human Adipose Tissue: A Source of Hyperandrogenism in Women with Obesity. *Obes Facts*, 15(2), 281-291.
362. Wahab, F., Atika, B., Ullah, F., Shahab, M., & Behr, R. (2018). Metabolic Impact on the Hypothalamic Kisspeptin-Kiss1r Signaling Pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 123.
363. Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., & Baneke, P.

- (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*, 26(14), 1816-1821.
364. Watanobe, H., & Hayakawa, Y. (2003). Hypothalamic interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, mediate the endotoxin-induced suppression of the reproductive axis in rats. *Endocrinology*, 144(11), 4868-4875.
365. Wei, T., & Lightman, S. L. (1997). The neuroendocrine axis in patients with multiple sclerosis. *Brain*, 120 (Pt 6), 1067-1076.
366. Weiss, N., Hasboun, D., Demeret, S., Fontaine, B., Bolgert, F., Lyon-Caen, O., & Chabas, D. (2009). Paroxysmal hypothermia as a clinical feature of multiple sclerosis. *Neurology*, 72(2), 193-195.
367. Welschen, R., Osman, P., Dullaart, J., de Greef, W. J., Uilenbroek, J. T., & de Jong, F. H. (1975). Levels of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol-17 beta and progesterone, and follicular growth in the pseudopregnant rat. *J Endocrinol*, 64(1), 37-47.
368. Westwood, F. R. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol*, 36(3), 375-384.
369. Whitacre, C. C., Reingold, S. C., & O'Looney, P. A. (1999). A gender gap in autoimmunity. *Science*, 283(5406), 1277-1278.
370. Wiedrick, J., Meza-Romero, R., Gerstner, G., Seifert, H., Chaudhary, P., Headrick, A., Kent, G., Maestas, A., Offner, H., & Vandembark, A. A. (2021). Sex differences in EAE reveal common and distinct cellular and molecular components. *Cell Immunol*, 359, 104242.
371. Wing, T. Y., Ewing, L. L., & Zirkin, B. R. (1984). Effects of luteinizing hormone withdrawal on Leydig cell smooth endoplasmic reticulum and steroidogenic reactions which convert pregnenolone to testosterone. *Endocrinology*, 115(6), 2290-2296.
372. Winnall, W. R., & Hedger, M. P. (2013). Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: a new regulatory model. *J Reprod Immunol*, 97(2), 147-158.
373. Wood, J. R., & Strauss, J. F., 3rd. (2002). Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*, 3(1), 33-46.
374. Wootla, B., Eriguchi, M., & Rodriguez, M. (2012). Is multiple sclerosis an autoimmune disease? *Autoimmune Dis*, 2012, 969657.
375. Wray, S. (2010). From nose to brain: development of gonadotrophin-releasing hormone-1 neurones. *J Neuroendocrinol*, 22(7), 743-753.
376. Wrotek, S., Rosochowicz, T., Nowakowska, A., & Kozak, W. (2014). Thermal and motor behavior in experimental autoimmune encephalitis in Lewis rats. *Autoimmunity*, 47(5), 334-340.
377. Wu, X., Hsueh, H., Kastin, A. J., Mishra, P. K., & Pan, W. (2013). Upregulation of astrocytic leptin receptor in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Mol Neurosci*, 49(3), 446-456.
378. Yates, M. A., Li, Y., Chlebeck, P., Proctor, T., Vandembark, A. A., & Offner, H. (2010). Progesterone treatment reduces disease severity and increases IL-10 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 220(1-2), 136-139.

379. Yi, W., Schlüter, D., & Wang, X. (2019). Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity. *Brain Behav Immun, 80*, 10-24.
380. Yoo, M. J., Nishihara, M., & Takahashi, M. (1997). Tumor necrosis factor-alpha mediates endotoxin induced suppression of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rat. *Endocr J, 44*(1), 141-148.
381. Ysrraelit, M. C., & Correale, J. (2019). Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology, 156*(1), 9-22.
382. Ysrraelit, M. C., & Correale, J. (2021). Impact of Andropause on Multiple Sclerosis. *Front Neurol, 12*, 766308.
383. Yu, Y. S., Sui, H. S., Han, Z. B., Li, W., Luo, M. J., & Tan, J. H. (2004). Apoptosis in granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors. *Cell Res, 14*(4), 341-346.
384. Zhao, S., Zhu, W., Xue, S., & Han, D. (2014). Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol, 11*(5), 428-437.
385. Ziehn, M. O., Avedisian, A. A., Dervin, S. M., Umeda, E. A., O'Dell, T. J., & Voskuhl, R. R. (2012). Therapeutic testosterone administration preserves excitatory synaptic transmission in the hippocampus during autoimmune demyelinating disease. *J Neurosci, 32*(36), 12312-12324.
386. Zirkin, B. R., & Papadopoulos, V. (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod, 99*(1), 101-111.
387. Zorgdrager, A., & De Keyser, J. (1997). Menstrually related worsening of symptoms in multiple sclerosis. *J Neurol Sci, 149*(1), 95-97.
388. Zorgdrager, A., & De Keyser, J. (2002). The premenstrual period and exacerbations in multiple sclerosis. *Eur Neurol, 48*(4), 204-206.

Biografija autorke

Ana Milošević rođena je 14.10.1992. u Beogradu, gde je završila osnovnu školu „Bora Stanković“ i Treću beogradsku gimnaziju. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisala je 2011. godine, a završila 2015. godine sa prosečnom ocenom 8,97. Master akademske studije upisala je 2015. godine na istom fakultetu, na modulu Neurobiologija, a master rad pod nazivom “Ekspresija kispeptina u hipotalamusu ženki pacova tokom eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa” odbranila je 2016. godine sa ocenom 10 i time završila master studije sa prosečnom ocenom 9,50. Iste godine upisala je Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, modul Eksperimentalna neurobiologija.

Ana se kao master studentkinja 2015. godine priključila Laboratoriji za neurohemiju Odeljenja za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Zaposlena je na Institutu za biološka istraživanja “Siniša Stanković” od aprila 2018. godine kao istraživač pripravnik, a zvanje istraživač saradnik stekla je u februaru 2021. godine. Dobitnica je jednomesečne prakse na Univerzitetu u Torinu, Italija, gde je boravila tokom februara 2024. godine baveći se metodom masene spektrometrije.

Ana Milošević je kao prvi autor objavila tri publikacije (jednu iz kategorije M21a i dve iz kategorije M21), a kao koautor pet publikacija u međunarodnim časopisima (tri iz kategorije M21 i dve iz kategorije M22) i jedan revijski rad u vrhunskom nacionalnom časopisu (M51), kao i brojna kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja. Dodatno, učestvovala je u organizaciji nekoliko događaja naučno-popularnog karaktera - Nedelji svesti o mozgu, Festivalu nauke, Noći istraživača. S tim u vezi, Ana je koautorica naučno-popularne publikacije ZooMozgologija (2019) u izdanju Društva za neuronauke Srbije, pripremljene kao deo promocije kongresa Federacije evropskih društava za neuronauke. Takođe, bila je instruktor na histološko-imunohistohemijskoj radionici „*Stain the brain*“ održanoj na Biološkom fakultetu u februaru 2019. godine. Članica je Društva za neuronauke Srbije, Federacije evropskih društava za neuronauke i Srpskog društva za molekularnu biologiju.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана А.Милошевић

број индекса Б3007/2016

Изјављујем

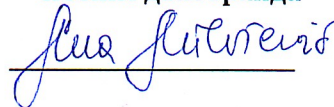
да је докторска дисертација под насловом

Утицај експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса на
хипоталамо-хипофизно-гонадну осу код *Dark Agouti* пацова оба пола

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

У Београду, 10.7.2024.

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана А. Милошевић

Број индекса Б3007/2016

Студијски програм Биологија - Експериментална неуробиологија

Наслов рада Утицај експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса на
хипоталамо-хипофизно-гонадну осу код Dark Agouti пацова оба пола

Ментори др Ивана Бјелобаба и др Данијела Лакета

Потписани/а Ана А. Милошевић

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

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

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

У Београду, 10.7.2024.

Потпис докторанда

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса на
хипоталамо-хипофизно-гонадну осу код *Dark Agouti* пацова оба пола

која је моје ауторско дело.

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

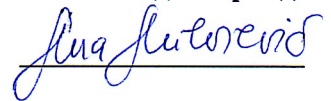
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

У Београду, 10.7.2024.

Потпис докторанда



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