



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Др Јасмина З. Сретеновић**

**Имунохистохемијске карактеристике и редокс статус  
хипофизно-гонадалног система након апликације  
анаболичког стероида перипуберталним и адултним  
мушјацима пацова**

**Докторска дисертација**

**Ментор: др сци. мед. Зоран Милосављевић, ванредни професор**

**Крагујевац, 2019. година**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>	
Име и презиме: Јасмина З. Сретеновић	
Датум и место рођења: 19.10.1985. Краљево	
Садашње запослење: Асистент на предмету Физиологија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу	
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>	
Наслов: Имунохистохемијске карактеристике и редокс статус хипофизно-гонадалног система након апликације анаболичког стероида перипуберталним и адултним мужјацима пацова	
Број страница: 217	
Број слика: 25 слика, 11 табела, 42 графикона	
Број библиографских података: 247	
Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за кардиоваскуларна истраживања, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу	
Научна област (УДК): Медицина, Физиологија	
Ментор: Проф. др Зоран Милосављевић	
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>	
Датум пријаве теме: 30.01.2017. године	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-689/24 од 05.07.2017. године	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник</li><li>2. Проф. др Сузана Пантовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан</li><li>3. НС Верица Милошевић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан</li></ol>	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Сузана Пантовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник</li><li>2. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан</li><li>3. НС Верица Милошевић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан</li></ol>	
Датум одбране дисертације:	

## Сажетак

**Увод:** Анаболички андрогени стероиди (ААС) представљају синтетске деривате мушког полног хормона тестостерона. Током последњих неколико деценија, злоупотреба ААС постала је широко распрострањена међу професионалним али и међу рекреативним спортистима. Последњих година, нандролон деканоат представља један од најчешће злоупотребљаваних ААС у спорту.

**Циљ:** Циљ овог истраживања био је да се испитају ефекти хроничне примене нандролон деканоата и тренинга пливањем на хистоморфометријске параметре гонадотропних ћелија хипофизе, хистолошке промене на тестисту, скелетном мишићу и масном ткиву, као и на редокс статус код перипуберталних и адултних мужјака пацова.

**Материјал и методе:** У студију су укључене 64 животиње мушког пола (по 32 животиње за сваку старосну групу) старости 5 недеља (перипубертални) и старости 10 недеља (адултни) сврстаних у 4 испитиване групе: контролна група - (Т-Н-), група која прима стероиде (Т-Н+), група која тренира пливање (Т+Н-) и група која тренира пливање и прима стероиде (Т+Н+). Животиње које су примале стероиде добијале су једном недељно нандролон деканоат у дози од 20 mg/kg телесне масе, субкутано. Животиње које су тренирале пливање, сваког дана су пивале 1сат /5 дана у недељи. Након завршеног четворонедељног експерименталног процеса, животиње су жртвоване. Изолована ткива хипофизе, тестиса, скелетног мишића и масног ткива рутински су обрађивана и припремљена према стандардним хистолошким протоколима. У прикупљеним узорцима крви, одређиване су вредности тестостерона, LH, FSH, лептина, инсулина као и про-оскидативни маркери и ензими система антиоксидативне заштите.

**Резултати:** Наши резултати су показали да третман нандролон деканоатом значајно смањује волуменску густину гонадотропних ћелија хипофизе у обе испитиване старосне популације. Број ћелија LH ћелија хипофизе на  $\text{mm}^2$  значајно је смањен након самосталне и удружене примене нандролон и тренинга пливањем у адултној популацији мужјака. Серумске вредности LH и FSH хормона снижене су након третмана нандролоном, док су истовремено вредности тестостерона у крви повишене. Експресија андрогеног рецептора у тестису смањена је након третмана нандролоном. У обе испитиване старосне популације примећено је највеће повећање дијаметра и површине скелетног мишића након удружене примене нандролон деканоата и тренинга пливањем. У Т+Н+ групи уочено је највеће смањење дијаметра и површине пресека адипоцита као и серумских вредности лептина. Повећање вредности прооксидативних маркера и у ткиву и у крви уочено је након примене нандролон.

**Закључак:** Нандролон деканоат самостално и у комбинацији са тренингом пливањем снижава хистоморфометријске параметре гонадотропних ћелија хипофизе, експресију андрогеног рецептора у тестису, серумске вредности LH, FSH хормона и лептина, док истовремено повећава концентрацију тестостерона и дијаметар скелетних мишићних ћелија.

**Кључне речи:** нандролон, тренинг, хипофиза, скелетни мишић, тестис

## **Abstract**

**Introduction:** Anabolic androgenic steroids (AAS) are synthetic derivatives of the male sex hormone testosterone. During the last few decades, the abuse of AAS has become widespread among professional as well as recreational sportsman. In recent years, nandrolone decanoate has been one of the most frequently abused AASs in sports.

**Aim:** The aim of this study was to investigate the effects of the chronic administration of nandrolone decanoate and swimming training on histomorphometric parameters of the pituitary gonadotrophic cells, histological changes in the testis, skeletal muscle and fat tissue as well as redox status in peripubertal and adult male rats.

**Material and methods:** The study included 64 male rats (32 animals per age group) 5 weeks old (peripubertal) and 10 weeks old (adults) divided into 4 experimental groups: control group - (T-N-), the group that received steroids (T-N+), swimming training group (T+N-) and swimming training with steroid administration group (T+N+). The steroid receiving animals, weekly received nandrolone decanoate in a dose of 20 mg/kg b.w, subcutaneously. Rats that trained by swimming, swam every day 1 hour, 5 days a week. After completing the four-week experimental protocol, rats were sacrificed. Isolated pituitary gland, testicles, skeletal muscle and fat tissue were routinely processed and prepared according to standard histological protocols. In the collected blood samples, the values of testosterone, LH, FSH, leptin, insulin, pro-oxidative markers and enzymes of the antioxidant defense system were determined.

**Results:** Our results have shown that the treatment with nandrolone decanoate significantly reduces the volume density of pituitary gonadotropic cells in both populations. Number of LH pituitary cells per mm<sup>2</sup> was significantly decreased after nandrolone treatment alone or combined with swimming training in adult rats. Serum levels of LH and FSH hormone were decreased after treatment with nandrolone while levels of testosterone were increased. Expression of androgenic receptor in testes were decreased after treatment with nandrolone. In both population the largest increase of cross-section area and diameter of skeletal muscle cells was observed after combined administration of nandrolone and swimming training. The largest decrease of the diameter and cross-section areas of the adipocytes and serum level of leptin was observed in T+N+ group. The increased blood and tissue levels of pro-oxidative markers was observed after treatment with nandrolone.

**Conclusion:** Nandrolone decanoate alone or combined with swimming training decreases histomorphometric parameters of pituitary gonadotrophic cells, expression of androgenic receptors in testes, serum levels of LH, FSH hormones and leptin. Increase of the blood testosterone levels and size of skeletal muscle cells can also be observed.

**Key words:** nandrolone, training, pituitary, skeletal muscle, testis

## Захвалница

*Првенствено желим да се захвалим свом ментору проф.др Зорану Милосављевићу на несебично пруженој помоћи, подрици а највише на стрпљењу приликом извођења докторске дисертације.*

*Изузетну завлалност дугујем проф.др Владимиру Јаковљевићу на великој подрици и помоћи. Желим да се захвалим проф. Јакољевићу што ми је пружио прилику да будем део његовог истраживачког тима и што ми је омогућио да се стручно усавришавам на чему сам му неизмерно захвална.*

*Посебну захвалност дугујем проф.др Верици Милошевић на неизмерној подрици и помоћи коју ми је прижила приликом израде докторске дисертације. Захвална сам јој на свим саветима, стручном усмеравању и знању које ми је пружила. Велико задовољство ми је било сарађивати са проф. Верицом.*

*Срдачно се захваљујем својим колегама из лабораторије за кардиоваскуларну физиологију проф.др Владимиру Живковићу, доц.др Ивану Срејовићу, доц.др Тамари Николић Турнић, доц.др Исидори Милосављевић, доц.др Јовани Јоксимовић Јовић, асс. мр пх Катарини Радоњић, асс. мр пх Маји Савић, асс. мр пх Јовани Јеремић на великој помоћи у експерименталном раду. Посебну захвалност дугујем драгим нашим лаборантима Љиљани Ђоковић и Предрагу Равићу.*

*Захваљујем се и проф.др Сузани Пантовић на стручним саветима и на пруженој помоћи и подрици.*

*Такође, захваљујем се проф. др Гвоздену Росићу и доц. др Драгици Селаковић на великој подрици коју су ми пружили и што су увек пријатељски и колегијално излази ми у сусрет кад год је било потребно.*

*Захваљујем се колегама са „Института за биолошка истраживања Синиша Станковић“ Владимиру Ајјановићу и Наташи Ристић на несебичној, стручној помоћи око извођења имухистохемијског дела истраживања.*

*Посебну захвалност дугујем својим родитељима на стрпљењу, љубави и неизмерној подрици коју су ми пружили на овом нимало лакој путу до успеха. Морам да признам да је ово наш заједнички успех, јер без ваше подршке и помоћи не бих успела.*

**ХВАЛА ВАМ!!!**

# САДРЖАЈ

## 1. УВОД

1.1. Анаболички стероиди	2
1.1.2 Најчешће коришћени анаболички андрогени стероиди	2
1.1.3 Историјат настанка и учесталост коришћења ААС	3
1.1.4 Нандролон деканоат	5
1.1.5 Индикације за употребу нандролон деканоата	6
1.1.6 Лекови који нису одобрени од стране (FDA) агенције за храну и лекове	7
1.1.7 Начин и дужина узимања анаболичких стероида	7
1.1.8 Нежељени ефекти злоупотребе анаболичких андрогених стероида (ААС) на органске системе	8
1.2 Хипофиза	10
1.2.1. LH и FSH ћелија хипофизе	11
1.2.2. Хипоталамо-хипофизно-гонадална осовина	12
1.2.3. Ефекти FSH на сперматогенезу	17
1.3. Физичка активност	18
1.3.1. Врсте физичке активности	18
1.3.2. Утицај физичке активности на мушке полне хормоне	19
1.3.3. Ефекат примене ААС и тренинга на полне хормоне	21
1.3.4. Физиологија тестостерона	21
1.4. Грађа тестиса	22
1.4.1. Ефекти примене ААС и физичке активности на тестис	25
1.4.2. Андрогени рецептор (AR) у тестису	26
1.5. Мишићно ткиво	27
1.5.1. Ефекти примене ААС на мишићни систем	27
1.5.2. Ефекти тестостерона на настанак хипертрофије мишића	28
1.5.3. Ефекти примене нандролон деканоата и тренинга на колаген у скелетном мишићу	28
1.5.4. Ефекти примене нандролон и тренинга на васкуларни профил у	29

скелетном мишићу	
1.6. Масно ткиво	32
1.7. Оксидациони стрес	33
<b>2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА</b>	<b>38</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>	
3.1. Експериментални протокол	40
3.2. Хистолошка бојења	43
3.3 Хистолошка бојења хипофизе	43
3.3.1 Имунохистохемијско обележавање LH ћелија хипофизе	43
3.3.2. Имунохистохемијско обележавање FSH ћелија хипофизе	43
3.3.3. Стереолошка и морфометријска анализа	44
3.3.4. Одређивање волуменске густине ћелија хипофизе	44
3.3.5. Одређивање броја ћелија на mm <sup>2</sup>	45
3.3.6. Имунофлуоресцентно обележавање LH и FSH ћелија хипофизе	45
3.3.7. Одређивање релативног интензитета флуоресценце	46
3.4. Хистолошко бојење за тестис	47
3.4.1. Морфометријска анализа тестиса	47
3.4.2. Обележавање андрогеног рецептора на тестису	48
3.5. Хистолошка бојања за скелетни мишић	48
3.5.1. Имунохемијско обележавање везивног ткива - колагена (Masson trichrome бојење)	49
3.5.2. Имунохистохемијско обележавање васкуларног ендотелијалног фактора раста (VEGF)	50
3.5.3. Хистохемијско бојење за визуелизацију васкуларног ткивног профила (Novelli)	51
3.6. Хистолошко бојење за масно ткиво	51
3.7. Биохемијске анализе	51
3.7.1. Одређивање концентрације фоликулостимулишућег хормона (FSH) у серуму	51
3.7.2. Одређивање концентрације фоликулостимулишућег хормона (LH) у серуму	52

3.7.3. Одређивање концентрације тестостерона у серуму	52
3.7.4. Одређивање концентрације лептина у серуму	52
3.7.5. Одређивање концентрације инсулина у серуму	53
3.7.6. Одређивање концентрације глукозе у крви	53
3.8. Редокс статус	53
3.8.1. Одређивање вредности индекса липидне пероксидације (TBARS)	53
3.8.2. Одређивање вредности нитрита (NO <sub>2</sub> -)	54
3.8.3. Одређивање вредности супероксид анјон радикала (O <sub>2</sub> -)	55
3.8.4. Одређивање вредности водоник пероксида (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	56
3.8.5. Одређивање вредности каталазе (CAT)	57
3.8.6. Одређивање вредности супероксид дизмутазе (SOD)	57
3.8.7. Одређивање вредности редукованог глутатиона (GSH)	57
3.8.8. Одрђивање маркера оксидативног стреса у ткиву тестиса	58
3.9. Статистичка обрада података	58
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b>	
4.1. Телесна маса	61
4.1.1. Утицај примена нандролон деканоата самостално и у комбинацији са тренингом на телесну масу перипуберталних животиња	61
4.1.2. Утицај примена нандролон деканоата и тренинга на телесну масу адултних животиња	64
4.2. Хипофиза	69
4.2.1 Промене у хипофизи перипуберталних и адултних мужјака пацова након хроничне апликације нандролон деканоата и тренинга пливањем	69
4.2.2. Морфолошке, имунохистохемијске и имунофлуоресцентне карактеристике гонадотропних ћелија (LH и FSH) хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова	72
4.2.2.1. Лутеинизирајуће ћелије хипофизе – LH	72
4.2.2.2 Волуменска густина LH ћелија хипофизе	72
4.2.2.3. Број LH ћелија на mm <sup>2</sup>	74
4.2.2.4. Интензитет имунофлуоресцентног сигнала LH ћелија хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова.	77



4.2.2.5. LH серумске вредности	81
4.2.3. Фоликулостимулирајуће ћелије хипофизе – FSH	82
4.2.3.1. Волуменска густина FSH ћелија хипофизе	82
4.2.3.2. Број FSH ћелија хипофизе на mm <sup>2</sup>	85
4.2.3.3. Интензитет имунофлуоресцентног сигнала имунообележених FSH ћелија хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова	89
4.2.3.4. FSH серумске вредности	92
4.3. Тестис	94
4.3.1. Морфометријска анализа тестиса	96
4.3.2. Дијаметар семеног каналића	99
4.3.3. Површина семеног каналића	100
4.3.4. Површина интерстицијумског простора тестиса	103
4.3.5. Андрогени рецептор	105
4.3.6. Тестостерон серумске вредности	110
4.4. Скелетни мишић	111
4.4.1. Морфометријски параметри скелетног мишића	111
4.4.2. Дијаметар уздужног пресека мишићних ћелија квадрицепса	112
4.4.3. Површине попречног пресека мишићних ћелија квадрицепса	113
4.4.4. Морфометријска анализа колагених влакана у скелетном мишићу	115
4.4.5. Еритроцитни депои у скелетном мишићу	121
4.4.6. Васкуларни ендотелијални фактора раста (VEGF) у скелетном мишићу	124
4.5. Масно ткиво	129
4.5.1. Дијаметар адипоцита	129
4.5.2. Површина адипоцита	133
4.5.3. Вредности лептина у плазми	136
4.5.4. Вредности гликемије	138
4.5.5. Серумске вредности инсулина	139
4.6. Редокс статус	140
4.6.1 Системски редокс статус	140
4.6.2. Индекс липидне пероксидације – TBARS	140

4.6.3. Водоник пероксид - $H_2O_2$	142
4.6.4. Супероксид анјон радикал - $O_2^-$	143
4.6.5. Нитрити - $NO_2^-$	145
4.6.6. Маркери антиоксидативне заштите	146
4.6.7. Каталаза (CAT)	147
4.6.8. SOD – супероксид дисмутаза	148
4.6.9. GSH- редуковани глутатион	149
4.7. Ткивни редокс статус	151
4.7.1. Индекс липидне пероксидације - TBARS	152
4.7.2. Нитрити - $NO_2^-$	154
4.7.3. Каталаза (CAT)	156
4.7.4. Супероксид дисмутаза - SOD	158
4.7.5. Редуковани глутатион - GSH	160
<b>5. ДИСКУСИЈА</b>	
5.1. Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на телесну масу пацова	164
5.2 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на хипофизу пацова	165
5.2.1 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на LH и FSH ћелије хипофизе	166
5.3 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на тестис пацова	170
5.3.1 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на серумске вредности тестостерона	175
5.4 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на скелетни мишић	177
5.5 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на дијаметар и површину адипоцита	182
5.6 Ефекат примене нандролон деканоат и тренинга пливањем на редокс статус	184
5.6.1 Ефекат примене нандролон деканоат и тренинга пливањем на системски редокс статус	184

5.6.2 Ефекат примене нандролон деканоат и тренинга пливањем на редокст статус у ткиву тестиса	187
6. ЗАКЉУЧЦИ	194
7. ЛИТЕРАТУРА	195

**1.**

**Увод**

## 1.1 Анаболички стероиди

Анаболички андрогени стероиди су група природних и синтетских једињења која су по својој хемијској структури слична холестеролу. Најпознатији анаболички стероид је тестостерон, природни мушки гонадотропни хормон кога првенствено синтетишу Лејдигове ћелије тестиса док се једним делом његови прекурсорни стварају у адреналном кортексу. Малу количину тестостерона могу да синтетишу и јајници код жена. (1)

Анаболички стероиди (познати и као андрогени стероиди) су синтетички деривати тестостерона. У последњих неколико деценија су предмет повећаног интересовања пре свега због незаконите употребе анаболичких стероида, која је све популарнија поготово у спорту. Постоје 2 групе анаболичких стероида: 1) 17 алфа-алкилних деривата: нпр., оксандролон, оксиметолон и флуоксиместерон; и 2) деривати 17 бета естара: нпр., тестостерон ципионат, тестостерон енантат, тестостерон хептилат, тестостерон пропионат, нандролон деканоат, нандролон фенпропионат и дромостанолон. Нандролон фенпропионат је C18 андрогени анаболички стероид и био је један од првих анаболичких стероида који се користио као допинг агент професионалних спортиста 1960-их. Међународни олимпијски комитет (ИОС) забранио је употребу ААС на Олимпијади 1974. године (2).

### 1.1.2. Најчешће коришћени анаболички андрогени стероиди

Орална примена 17 $\alpha$ -алкил деривати	Парантерална примена 17 $\beta$ -естри деривати
Метандростенолон	Естри тестостерона: енантат, пропионат,
Метилтестостерон	Естри нандролона: деканоат, фенилпропионат
Оксандролон	Болденон
Оксиметолон	Метенолон
Станозолол	Тренболон
Етилестренол	Станозолол
Флуоксиместрон	Дромостанолон
Даназол	

У табели 1. наведен је начин примене најчешће коришћених анаболичких андрогених стероида (3).

Ендогени андрогени одговорани су за раст и развој полних органа код мушкараца и одржавање секундарних полних карактеристика. Ови стероиди као што су тестостерон и дихидротестостерон и синтетички анаболички стероиди своје ефекте остварују специфичним везивањем и активирањем андрогених рецептора. У скелетним мишићима, анаболички стероиди регулишу транскрипцију циљних гена који контролишу акумулацију ДНК у скелетним мишићима потребним за раст мишића. Такође, регулишу и повећавају број андрогених рецептора, чиме се доприноси повећању величине и снаге мишића и омогућава већи интензитет тренинга. Андрогени имају стимулативни ефекат на мозак кроз своје различите ефекте на неуротрансмитере централног нервног система, антагонистички делују на глукокортикоиде и стимулишу осовину хормона раста и инсулин-налик фактора раста-1 (IGF-1) (2).

### 1.1.3. Историјат настанка и учесталост коришћења ААС

Прекретница на пољу научног истраживања андрогена, била је 1927. година, јер је те године изолован тестостерон. *Fred Koch*, професор органске хемије са Универзитета у Чикагу, дошао је на идеју да екстрахује тестостерон из тестиса бикова. *Koch* је радио експерименте на животињама и показао да лек може довести до маскулинизације код кастрираних пилића и агресивно понашање код кокошака и женки телади (4).

Синтетски тестостерон откривен је 1935. године. *Leopold Ruzicka*, хемичар који води порекло са простора бивше Југославије, био је у стању да промени молекулску структуру холестерола, и да продукује синтетски тестостерон. У то време, истраживања која су вршена на људима, показала су да синтетски тестостерон доводи до промене у изгледу тела код младих мушкараца. Наиме, они су приметили да мишићи груди и раменог појаса након третмана синтетским тестостероном постају знатно већи и јачи, али у то време научници нису знали да синтетски тестостерон може довести до убрзане синтезе мишићних протеина (4).

Према литературним подацима, анаболички стероиди први пут су коришћени у Другом светском рату, када су дати немачким војницима у циљу повећања њихове

агресивности (5). Прва употреба ААС код спортиста забележена је 1954. године од стране руских атлетичара. Амерички тимски лекар је приметио употребу стероида међу атлетичарима крајем 1950-тих година и након тога одлучено је да се спроводе тестирања међу америчким атлетичарима на присуство анаболичких андрогених стероида (ААС) у крви. Од тог периода па све до данас, ААС постају све популарнији међу атлетичарима. У почетку су анаболичке стероиде користили углавном дизајнери тегова, да би се касније употреба стероида проширала и међу фудбалерима, пливачима и на друге спортове. Да је употреба ААС попримила епидемијске размере показано је на Пан америчким играма које су одржане 1983. године у Каракасу у Венецуели. Током тих игара, чак 19 спортиста је било позитивно на ААС након чега су они били дисквалификовани са такмичења (5).

Према подацима из анкете која је спроведена међу националном домаћинством на тему злоупотребе лекова из 1991. године показа је да више од 100.000 људи у Сједињеним Америчким Државама користе анаболичке стероиде и да их је за живота користило 0.9% мушкараца и 0.1% жена. Упркос чињеници да су анаболички андрогени стероиди стављени на Списак III контролисаних супстанци још 1990. године, новија сазнања показују све учесталију употребу стероида. Тренутне процене показују да негде око 3.000.000 Американаца користе ААС (3).

За разлику од европских и америчких земаља, литературних података о злоупотреби ААС међу Азијским становништвом има јако мало. Разлог томе може бити културолошке природе јер људи из европских и америчких земаља имају културолошко истицање мишићавости за разлику од Азијског становништва (6).

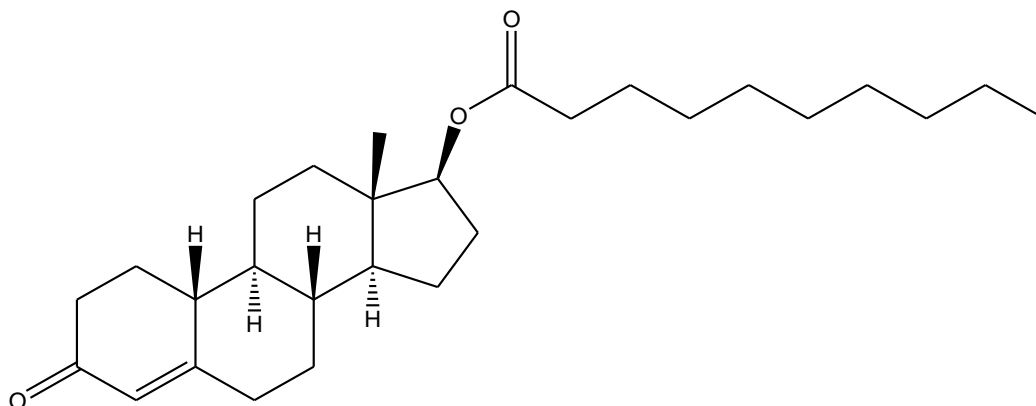
Преваленца коришћења анаболичких стероида (ААС) варира у зависности од испитиване популације. Међу адолесцентима, учесталост коришћења ААС је између 0.8% и 36% док је код одраслих индивидуа који посећују фитнес центре учесталост коришћења између 14% и 22% (7).

Нажалост, иако се зна да и у Србији велики број како професионалних тако и рекреативних спортиста користи анаболичке стероиде, ми за сада немамо тачан податак колики проценат становништва злоупотребљава ову врсту „лекова“.

#### 1.1.4. Нандролон деканоат

Нандролон деканоат је дериват 19-нортестостерона (слика 1). Нандролон је синтетисан 1950. и 1953. године (8). Структурно, нандролон је хемијско једињење које припада другој класи ААС који се од тестостерона разликује по томе што у положају угљениковог атома C19 на месту где се налази метил група (CH<sub>3</sub>) извршена је супституција водониковим атомом. Супституција водониковим атомом доводи до продужења времена његовог полуживота изван оног што је допринела само естерификација. Естерификацијом хидроксидне групе (ОН) на положају угљениковог атома C17 нандролон са деканоанског киселином настаје нандролон деканоат. Нандролон је по хемијском саставу сличан мушком полном хормону тестостерону, али за разлику од њега има појачану анаболичку а смањену андрогену активност. Нандролон деканоат је споро делујући анаболички стероид, који је дизајниран посебно у сврху повећања мишићне масе. Након инјектовња, нандролон се полако елиминише из крви са временом полуживота од 6 дана. У крви, естри се брзо хидролизују у нандролон са временом полуживота од 1 сата или мање. Комбиновани процес хидролизе, дистрибуције и елиминације нандролон има просечно време полуживота приближнио око 4 сата. Овај анаболик делује тако што промовише задржавање азота у мишићима, што доводи до повећања величине мишића, и обезбеђује ослобађање болова у зглобовима промовишући синтезу колагена и побољшање минерализације костију. Нандролон фенилпропионат такође узрокује повећање раста мишића, стимулацију апетита и повећање производње црвених крвних зрнаца (2). У данашње време, нандролон деканоат је један од најчешће злоупотребљаваних анаболичких стероида међу адолесцентима, младим спортистима и рекреативцима (9,10).





Слика 1. Хемијска структура нандролон деканоата

### 1.1.5. Индикације за употребу нандролон деканоата

Нандролон деканоат најчешће се користи у терапији следећих болести:

1. Рефракторног дефицита црвених крвних ћелија- анемије
2. Карцинома дојке
3. Наследни ангиоедема
4. Дефицита антитромбина III
5. Вишка фибриногена
6. Успорен раст
7. Тарнеров синдром
8. Профилакса у лечењу наследног ангиоедема (2)
9. Остеопороза (у случајевима када је естрогенска терапија контраиндикувана)
10. Акутна бубрежна инсуфицијенција, хронична бубрежна инсуфицијенција, анемија која је настала као последица хроничне бубрежне инсуфицијенције.

11. Код пацјената који су дуго на терапији кортикостероидима

### **1.1.6. Лекови који нису одобрени од стране (FDA) агенције за храну и лекове**

Нандролон деканоат се користи у дози од 100 mg недељно за комфорност и ублажавање болова у зглобовима, док се дозе у опсегу од 200 mg до 400 mg недељно користе за повећање раста мишића и физичких перформанси. За добијање жељених резултата код професионалних спортиста, дизача тегова и бодибилдера сматра се да је идеално користити нандролон у трајању од десет до дванаест недеља (2).

### **1.1.7. Начин и дужина узимања анаболичких стероида**

Начин администрације анаболичких андрогених стероида је различит. Могу бити апликовани оралним путем, парентералним путем у виду интрамускуларних инјекција и трансдермално у виду фластера и површинских гелова. Већина истраживања показала је да је најчешћи временски период узимања анаболичких андрогених стероида ААС у периоду од 4-12 недеља (што представља један стероидни циклус). Након завршетка једног циклуса следи период „чишћења“ у трајању од 4-6 недеља (табела 2). Постоје литературни подаци који показују да један део корисника ААС користи ове супстанце мање од шест месеци годишње док их други део корисника конзумира дуже од шест месеци годишње (11, 12). Такође, постоји и податак да од 100 испитаника чак 3 испитаника користе стероиде чак 52 недеље у континуитету (11).

Табела 2. У табели је приказан режим узимања анаболичких андрогених стероида (ААС), комбинација анаболика која се најчешће примењује, њихова доза, начин примене као и дужина коришћења (3).

	ААС	Доза	Начин примене	Дужина трајања (недеља)
Циклус за почетнике	Нандролон Метандростенолон	200 mg/недељно 25 mg/дневно	интрамускуларно	4-6
Циклус за мишићну масу	Нандролон Сустенон	400 mg/недељно 500 mg/недељно	интрамускуларно	4-6
Циклус за дефиницију мишића	Нандролон Тестостерон-пропионат Станозолол	400 mg/недељно 300 mg/недељно 150 mg/недељно	интрамускуларно	4-6
Циклус „чишћења“	/	/	/	4

### 1.1.8. Нежељени ефекти злоупотребе анаболичких андрогених стероида (ААС) на органске системе

Злоупотреба анаболичких андрогених стероида (ААС) изазива штетене ефекте на многе органске системе.

На кардиоваскуларни систем делују тако што доводе до настанка коронарне болести, кардиомиопатије, хипертензије (у мање од 3% случајева) (2), хипертрофије леве коморе, тромбозе (12), задебљања интравентрикуларног септума, а имају и про-атерогени ефекат.

На ендокрини и метаболички систем делују тако што доводе до смањења серумских вредности HDL холестерола (мање од 6%), хиперлипидемије (мање од 6%),

хипокалијемije, повећања серумских вредности триглицерида, повећања вредности естрадиола у плазми, гинекомастија (мање од 3%), смањења либида (мање од 3%), смањења телесне масе (2) или смањења толеранције на глукозу (12)

Код гастроинтестиналног система примена анболичких стероида доводи до настанка гингивитиса (мање од 9%), до иритације уста (мање од 9%), до повећања серумских вредности билирубина, смањења апетита, дисгеузије, гастроинтестиналног рефлукса и гастроинтестиналног крварења (2), хепатоцелуларног оштећења, пелиозе јетре, холестазае, хепатоцелуларног аденома, хепатоцелуларног карцинома. (12)

Када је у питању мушки репродуктивни систем коришћење ААС доводи до настанка бенигне хипертрофије простате у 12% случајева, карцинома простате (мање од 3%), атрофије тестиса (мање од 6%), олигоспермије, азоспермије, хипогонадизама, простатитиса, импотенције, приапизма, инфекција уринарног тракта, инконтиненције урина (2,12)

У женском репродуктивном систему примена ААС доводи до поремећаја менструалног циклуса, до атрофије утеруса, атрофије дојки, хипертрофије клиториса, тератогености (12), као и повећаног раста пубичних длака,

На уринарни систем, анаболички андрогени делују тако што доводе до настанка дизурије, хематурије (2), акутног отказивање бубрега, мембранозно-пролиферативног гломерулонефритиса, Вилмс-овог тумор као и фокалне сегменталне гломерулосклерозе (12)

На мишићно коштани систем делују тако што доводе до настанка мијалгије (у мање од 3% случајева), руптуре тетива, хемартрозе, преурањеног затварања епифиза, бола у екстремитетима, абнормалног раста костију, (2)

Код нервног система коришћење ААС доводи до емоционалне лабилности, до поремећаја расположења, аносмије, главобоље, депресије, нервозе, несанице, насиља и агресивног понашања (2), психозе, зависности (12)

Нежељени ефекти које изазива примена ААС може изазвати на кожи јесу пликови (12%), акне (мање од 8%), контактни дерматитис, буле, кожни осип и пруритус (2),

хирзуитизам, алопеција, ћелавост мушког типа (12), фурункули, уртикариа на месту апликовања, масна кожа, масна коса.

На бубрег делују тако што доводе до повећања нивоа креатинина у серуму и учесталости уринирања.

Нежељени ефекат који је карактеристичан за злоупотребу нандролон деканоата код мушкараца јесте поремећај ејакулације и еректилна дисфункција док код жена изазива појаву хирзуитизма и продубљивање гласа (2).

## 1.2 Хипофиза

Хипофиза је ендокрина жлезда која се налази у турском седлу сфеноидне кости и обавијена је фиброзном капсулом којом је одвојена од периоста. Преко петељке (*infundibulum*), хипофиза је повезана са хипоталамусом. Ембрионално, хипофиза води порекло делом од ектодерма усне дупље, а делом од нервног гребена. Због двоструког ембрионалног порекла, хипофиза се састоји из два дела, аденохипофизе и неурохипофизе, који су морфолошки и функционално различите (13).

Аденохипофиза се састоји од три дела; *pars distalis*, *pars tuberalis* и *pars intermedia*.

Предњи режањ (*pars distalis*) је највећи део аденохипофизе и чини око 75% масе хипофизе. Ћелије овог режња, на основу афинитета према бојама којима се могу обојити, деле се на хромофобне и два типа хромофилних ћелија - базofilне и ацидофилне ћелије према њиховом афинитету за киселе и базне боје. Имајући у виду ултраструктурне карактеристике, имунохистохемијска својства и природу секретованих хормона, односно, на које циљне органе ови хормони делују, ацидофилне ћелије се деле на соматотропне (садрже хормон раста (GH)) и мамотропне (садрже пролактин (PRL) док базofilним ћелијама припадају тиреотропне (садрже тиреостимулишући хормон (TSH)), гонадотропне (садрже фоликулостимулишући (FSH) и лутеинизирајући (LH) хормон) и фоликулостелатне. У хромофобне ћелије аденохипофизе спадају кортикотропне (секретују адреностимулирајући хормон (ACTH) и прекурсорске (13).

*Pars tuberalis* је део аденохипофизе који окружује инфудибулум хипофизе и левкастог је облика. Већина ћелија у овом делу излучује гонадотропине (LH и FSH), при чему ове ћелије формирају траке дуж крвних судова (13).

*Pars intermedia* се развија од дорзалног дела Раткеовог шпага. Код човека, овај део хипофизе је рудиментиран, саграђен је од трака и фоликула базofilних ћелија које садрже секреторне грануле. Ове ћелије врше продукцију алфа меланостимулирајућег хормона ( $\alpha$ -MSH) (13).

Неурохипофиза, састоји се од *pars nervosa* и неуралне петелке и састоји се од 100.000 немијелизованих аксона, секреторних неурона чија се тела налазе у супраоптичком и пара вентрикуларном једру хипоталамуса. Секреторни неурони имају способност спровођења акционог потенцијала, али им је Нислова супстанца боље развијена због биосинтезе неуросекрета. Неуросекрет се транспортује дуж аксона и накупља у њиховим проширеним крајевима у *pars nervosa*. Неуросекреторни материјал садржи два хормона, вазопресин (антидиуретски хормон) и окситоцин (13).

### 1.2.1. LH и FSH ћелија хипофизе

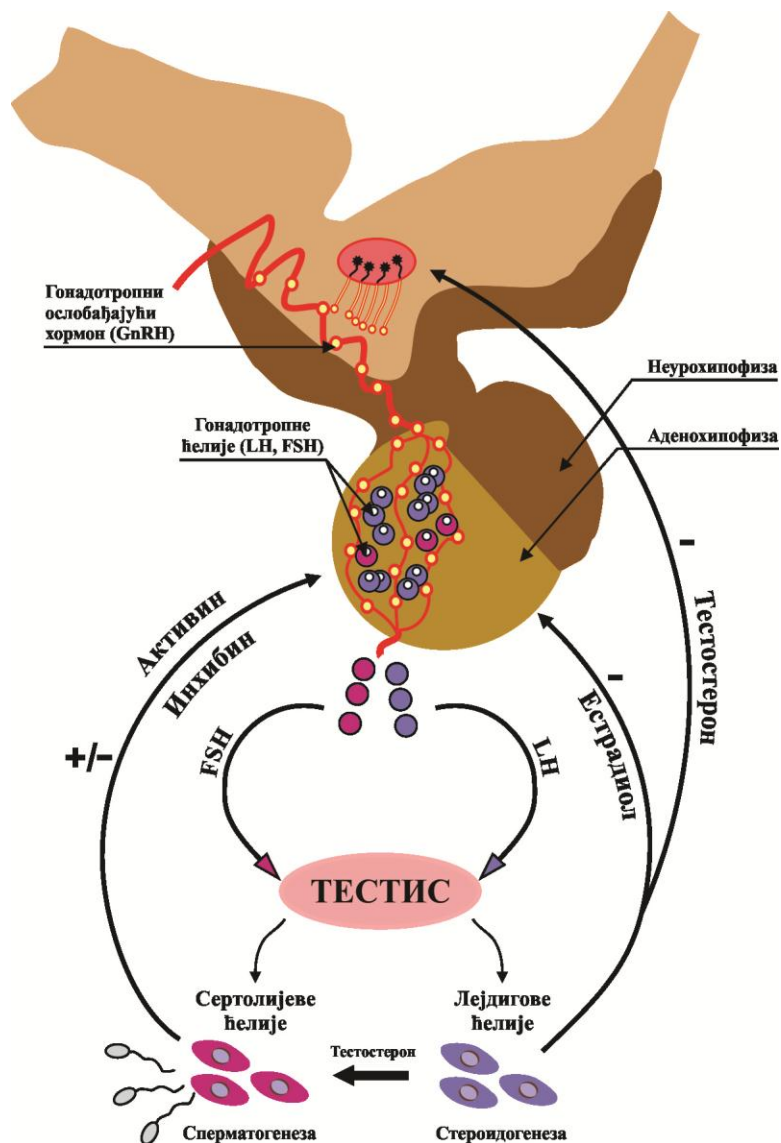
LH (лутеинизирајуће) и FSH (фоликулостимулирајуће) ћелије су гонадотропне ћелије предњег режња хипофизе које садрже мале и велике секреторне грануле димензија 250-300 nm (LH) и 500-700 nm (FSH) (10). У хипофизи адултних пацова, гонадотропне ћелије садрже и мале и велике секреторне грануле и више или мање дилатирани цистерне гранулираног ендоплазматичног ретикулума који садржи средње густу супстанцу. Голџи апарат је добро развијен и у њему се формирају карактеристичне формације малих и великих секреторних гранула (14).

Познато је да хипоталамус и полни хормони имају главну улогу у регулацији секреције лутеинизирајућег (LH) и фоликулостимулирајућег (FSH) хормона предњег режња хипофизе. Механизам регулације је врло сложен, јер се појављује секреција гонадотропина која је контролисана интеракцијом са полним хормонима као и самим хормонима хипоталамуса који су у стању да ослободе, у зависности од ситуације и LH и

FSH. За сада још увек није могуће објаснити механизам који доводи до интеракције између полних хормона и хипоталамичко ослобађајућег хормона који регулише секрецију LH и FSH (16).

### **1.2.2. Хипоталамо-хипофизно-гонадална осовина**

Гонадотропни хормони LH и FSH синтетисани су и секретовани од стране гонадотропних LH и FSH ћелија аденохипофизе. Оба хормона су гликопротеини који се састоје из две субјединице  $\alpha$ - субјединице (chorionic gonadotropin alpha (CGA)) и  $\beta$ - субјединице (FSH- $\beta$  and LH- $\beta$ ). Ови хормони неопходни су и имају комплементарну улогу у репродукцији сисара (16). Код мушкараца, LH хормон стимулише продукцију андрогена ослобођених из Лејдигових ћелија тестиса док FSH делује на примарне сперматоците индукујући њихову мејотичку деобу. Овај хормон такође утиче на Сертолијеве ћелије тестиса тако што везивањем за свој рецептор на базалном домену ћелије подстиче продукцију андроген-везујућег протеина. Овај протеин затим транспортује и концентрише тестотерон у лумену семиниферног каналића и на тај начин отпочиње процес сперматогенезе. Ослобађање ова два хормона из гонадотропних ћелија хипофизе је под контролом гонадотропног рилизинг хормона (GnRH) кога лучи хипоталамус. GnRH се ослобађа у пулсевима, а природа ових пулсева (амплитуда и фреквенција) утиче на динамику синтезе и секреције LH и FSH. Брзи пулсеви (нпр. на 30 минута) фаворизују ослобађање LH, док спорији пулсеви (нпр. на 2-4 сата) фаворизују ослобађање FSH (16, 17, 18). Променама у пулсативном секретовању GnRH могу се обаснити разлике у секрецији LH и FSH. Код глодара је показано да ослобађање FSH не зависи од пулсативног ослобађања GnRH у тој мери колико зависи ослобађање LH. Ови хормони механизмом негативне повратне спреге делују на хипофизу и хипоталамус и регулишу вредности гонадотропина. Андрогени, механизмом негативне повратне спреге сузбијају секрецију LH и FSH и њихово примарно место деловања у хипоталамусу доводећи до супресије ослобађања GnRH (16). GnRH везује се за рецептор који се налази на површини гонадотропних ћелија и активира фосфолипазу C која ће повећати продукцију диацил глицерола (DAG) и инозитол-3-фосфата (IP<sub>3</sub>) (16).



Слика 2. Схематски приказ регулације секреције гонадотропних хормона у физиолошким условима.

Репродуктивну функцију код људи регулише хипоталамо-хипофизно-гонадална осовина (Слика 2). Међу главним играчима ове осовине су хипофизни гонадотропини, фоликуло-стимулишући хормон (FSH) и лутеинизујући хормон (LH), који заједно са хорионским гонадотропином (CG), синтетисаним од стране плаценте и тиреостимулишућим хормоном који је произведен у тиреотропним ћелијама, формирају породицу гликопротеинских хормона (GPH). Сви GPH су хетеродимерни протеини који се састоје од заједничке  $\alpha$ -подјединице некваљентно повезане са  $\beta$ -



подјединицом, која је структурно и функционално јединствена за сваког члана породице гликопротеинских хормона (19, 20). Обе подјединице показују N-везане олигосахаридне ланце, чији се број разликује у зависности од специфичности GPH и који играју кључну улогу у одређивању неколико функција протеина, укључујући полувреме у циркулације ( $t_{1/2}$ ), *in vivo* биоактивност, и ефикасност да активирају свој сродни рецептор у циљној ћелији (21-24). Производња и секреција гонадотропина хипофизе регулисана је акцијом неколико хипоталамичких, хипофизних и гонадних хормона који модулишу транскрипциону активацију њихових субјединичких гена (25,26) транслацију одговарајућих mRNA и секретовање зрелог гонадотропина (19, 23, 25).

Гонадотропини се везују за њихове сродне рецепторе (LHr и FSHr) у тестисима ради стимулације различитих биолошких ефеката. У тестисима, FSH хормон регулише број Сертолијевих ћелија, сазревање и функцију и а самим тим (синергијски са тестостероном) и оптималан развој германитивних ћелија (27-29). Под дејством FSH, Сертолијеве ћелије пружају физичку и метаболичку потпору за диференцијацију герминативних ћелија, мејозу и трансформацију у сперматозоу (27). Упркос овоме, улога FSH-а као најважнијег фактора сперматогенезе код људи је и даље контроверзна, јер мушкарци са мутацијом гена која изазива инактивацију FSH рецептора поседују одређени ниво сперматогенезе и чак могу бити плодни (30). Ова запажања снажно указују да су и FSH и тестостерон неопходни код човека да промовишу нормалну продукцију сперматозоида (19). У интерстицијумском простору тестиса, LH је укључен у сазревање Лејдигових ћелија, преживљавање и пролиферацију, као и у стимулацији производње андрогена (углавном тестостерона) промовишући мобилизацију холестерола (19). StAR (стероидогени акутни регулаторни протеин) је такође један од веома важних молекула који олакшава пренос холестерола од спољашње до унутрашње митохондријалне мембране (19, 31-33). Под гонадотропинском стимулацијом гонаде такође производе нестероидне (полипептидне) факторе, као што су инхибини и активини, који заједно са стероидним хормонима, који су синтетисани као одговор на гонадотропине, регулишу функцију хипоталамичко-гонадотропне јединице (19, 34).

Контрола синтезе и секреције LH и FSH је сложена и укључује координирану интеракцију између гонада, хипофизе и хипоталамуса. Хипоталамичка компонента представља GnRH, декапептид који се синтетише специјализованим неуронима претежно локализованим у аркуатном једру медиобазалног хипоталамуса и преоптичном подручју предњег хипоталамуса. Аксони ових неурона пројектовани су у различите регионе мозга, где GnRH делује као неуротрансмитер или неуромодулатор репродуктивног понашања, или на средњу еминенцију, где GnRH улази у порталну циркулацију да би стигао до гонадотропних ћелија хипофизе (19). Ослобађање GnRH у циркулацију хипофизног портала се јавља на пулсатни начин (35-37) епизодична секреција GnRH је фино регулисана координисаним интеракцијама између хипоталамичких неурона аркуатног једра које коекспримира кеспептине, неурокинин Б и динорфин (KNDу неурони) и неурона који производе GnRH. Неурокинин Б и динорфин функционишу узајамно као главни позитивни и негативни регулатори епизодног ослобађања кеспептина, који је, пак, ефектор овог неуронског комплекса за стимулацију неуросекреторне активности GnRH неурона путем интеракције са својим сродним рецептором, (KISS1R) (38). У гонадотропним ћелијама, GnRH комуницира са својим сродним рецепторима (GnRHR) како би индуковао експресију гена као и стимулацију-секреције гонадотропина (39). Заправо, GnRH-регулисана експресија  $\alpha$ - и  $\beta$ -подјединица гонадотропина даје јединствен геномски потпис за функционалне гонадотропе (19).

Гонадотропни рилизинг хормон делује преко GnRH рецептора тип 1. Када се хормон веже за рецептор на гонадотропним ћелијама доводи до стимулације фосфолипазе С, до активације протеин киназе С и мобилизације  $Ca^{+2}$ . Последица активације протеин киназних путева и калцијумских ефектора као што је калмодулин, утиче на егзоцитозу гонадотропина (40).

Различита регулације синтезе и секреције лутеинизирајућег и фолукулостимулишућег хормона модулирана је фреквенцијом пулса ослобађања гонадотропног рилизинг хормона из хипоталамуса као и пратећим ефектима полних хормона и нестероидних фактора. За разлику од LH, који се ускладиштен у комплексним секреторним гранулама, секретован у пулсевима и повезан са отпуштањем из гонадотропних ћелија у средњем циклусу након стимулације са GnRH, FSH се

транспортује до плазма мембране у везикулама, а затим се ослобађа у циркулацију. Тако је секреција FSH конститутивна, док је LH секреција регулисана од стране гонадотропног релизинг хормона GnRH. Неколико студија је показало да иако преовладава конститутивна (базална) компонента секреције FSH, нискофреквентна стимулација GnRH доводи до случајног ослобађања FSH у дискретним импулсима (41-43). Осим поменутих механизма регулације у култури хипофизних ћелија пацова, откривени су активини, инхибини и фолистатини и њихове способности да регулишу FSH секрецију али не и LH секрецију. *In vivo* студије на пацовима потврдиле су стимулаторни ефекат активина и инхибиторни ефекат инхибина и фолистатина на ослобађање FSH (16). Код мушкараца, ослобађање LH у пулсевима, може да се детектује још у раном детињству, нарочито током првих 3-6 месеци након рођења али и у детињству. Значајне промене у секрецији LH дешавају се две године пре почетка пубертета. Од средине детињства, па све до одрасле доби, степен продукције LH прогресивно расте и прати је скромни пораст фреквенције пулса (16). Код мушкараца, GnRH различито контролише ослобађање FSH и LH у феталном животу, раном детињству, пубертету и одраслом добу (44). Учесталост и амплитуда LH импулса се повећава од периода препубертета ка пубертету, док FSH остаје константан (45). Истраживања на здравим и хипогонадалним препуберталним дечама показала су да су и тестиси такође укључени у регулацију FSH, али не и LH током периода препубертета (46). Код одраслих мушкараца, LH импулси (пулсеви) се јављају отприлике на сваких 55 мин. (47, 48) док синтезу и секрецију FSH накнадно регулише неколико фактора укључујући активин А, инхибин Б и концентрација естрадиола, (19, 49, 50). Тестостерон представља главну покретачку силу која регулише производњу LH, директно или путем ароматизације до естрадиола (19, 49, 50).

Ћелије хипофизе имају ту способност да генеришу волтажно-сензитивне, јонске канале у плазма мембрани, и то својство деле са неуронима, мишићним ћелијама и одређеним сензорним ћелијама (51). Калцијум који представља примарни интрацелуларни сигнални молекул (52) контролише фузију секреторних везикула са плазма мембраном да би се ослободили хормони из ендокриних ћелија хипофизе (52, 53). Овај процес се назива регулисана егзоцитоза и посредован је комплексном протеинском машинеријом. Улазак јона  $Ca^{2+}$  повезан је са настанком конформационих промена цитоскелета гонадотропних ћелија са последичним активирањем егзоцитозе хормона. У регулисаној егзоцитози

повећање концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  јона је потребно за: прајмирање секреторних везикула, што се дешава у временском периоду од неколико десетина секунди, и за покретање фузије која се јавља у року од наредне 1-2 секунде (53). У овоме је један од битних фактора и близина извора калцијума. Што је мања удаљеност између извора  $\text{Ca}^{2+}$  и секреторних везикула, то је брже и излучивање. Како су ћелије предњег режња хипофизе ексцитабилне и имају волтаж-зависне калцијумске канале (VGCC), изгледа да контрола фреквенције окидања  $\text{Ca}^{2+}$  зависних акционих потенцијала игра улогу у базалној и стимулисаној секрецији (51, 54). У одсуству спонтане електричне активности, стационарно уношење  $\text{Ca}^{2+}$  могуће је и преко VGCCs, а показано је и да подржава спонтану секреторну активност (55). Испорука хормона хипофизе до циљних органа јесте ограничена споријим транспортом кроз циркулацију, за разлику од неурона, где се сигнална трансдукција у синапси може појавити за мање од милисекунде (56). Ипак, мало је вероватно да је егзоцитозни механизам неуроендокриних ћелија суштински спор, пошто је максимална брзина егзоцитозе забележена у хромафинским ћелијама (57) и биполарним неуронима (58) јако слична. Вероватно је неуроендокрина секреција спорија од неуралне секреције, зато што волтаж-зависни калцијумски канали (VGCC) и грануле нису ближе колокализирани. Таква ситуација је присутна и код гонадотропних ћелија хипофизе код којих је  $\text{Ca}^{2+}$  рецептор постављен дубље у цитоплазми. Предност такве локације рецептора је да се може користити  $\text{Ca}^{2+}$  из интрацелуларног складишта како и из VGCCs и преносити сигнал из оба  $\text{Ca}^{2+}$  извора поспешујући егзоцитозу гранула (51).

### 1.2.3. Ефекти FSH на сперматогенезу

Функција FSH је суштински део комплексне хипоталамо-хипофизно гонадалне осовине и њених механизма за контролу механизма повратне спреге у регулацији функције тестиса. FSH из хипофизе даје индиректну структурну и метаболичку подршку за развој сперматогонија у сперматиде преко свог мембранског рецептора који је локализован у Сертолијевим ћелијама. Фоликулостимулирајући хормон игра кључну улогу у одређивању броја Сертолијевих ћелија а самим тим и њихове способности да одржавају сперматогенезу. Поред пролиферације и диференцијације Сертолијевих ћелија, FSH регулише структурне гене који су укључени у организацију спојева између самих ћелија, као и гене који су потребни за метаболизам и транспорт регулаторних и

нутритивних супстанци од Сертолијевих до геминитивних ћелија. Иако FSH није обавезан услов за завршетак сперматогенезе код глодара, његов недостатак, доводи до значајног смањења квалитета сперме (59).

Студије на анималним моделима показују да се Сертолијеве ћелије размножавају до коначног броја и разликују се током живота. У периоду пре пубертета, заједно са повећањем FSH секреције, експресија фоликулостимулирајућег рецептора (FSH-r) почиње да флукутира заједно са стадијумом сперматогенезе. Ово је повезано са сазревањем Сертолијеве ћелијске популације и завршетком првог циклуса сазревања сперме. У постпуберталним тестисима, FSH заједно са тестостероном подстиче Сертолијеве ћелије да пропагирају матурацију герминитивних ћелија, односно да обезбеде антиапоптотске факторе преживљавања и да регулишу адхезионе комплексе између герминитивних ћелија и Сертолијевих ћелија (59).

### **1.3. Физичка активност**

#### **1.3.1. Врсте физичке активности**

Физичка активност може побољшати физичке перформансе, кардиоваскуларну функцију и мишићну снагу (60). Постоје два различита типа физичког тренинга: аеробан тренинг и анаеробан тренинг, иако ни за једну од ове две врсте тренинга не може да се сматра чисто аеробном или анаеробном у погледу снабдевања енергијом (60). Аеробни тренинг обично укључује периоде континуираног тренинга (нпр. возња бициклом или трчање) (60). За разлику од аеробног тренинга, анаеробни тренинг укључује тренинг (нпр. подизање тегова, тренинг отпорности или спринтовање) високог интензитета за кратко време изнад је анаеробног прага (60). Тренинг издржљивости мишићне снаге се често успешно користи да би се повећала снага код старијих особа (61). Тренинг издржљивости мишића укључује вежбе које комбинују концентричне контракције (скраћивање мишића) и ексцентричне контракције (мишићно продужење) (62,63).

### 1.3.2. Утицај физичке активности на мушке полне хормоне

За сада се мало зна како физичка активност делује на хипофизно-гонадалну осовину, али постоје подаци који указују на то да она доводи до промена нивоа полних хормона. Подаци у литератури су контрадикторни јер су утврђени како пораст тако и пад нивоа тестостерона у зависности од врсте физичке активности (63-65). Код мушкараца, полне хормоне углавном излучују тестиси и надбубрежна жлезда. 'Андропауза' код мушкараца карактерише постепено смањење укупне количине и биодоступности тестостерона због смањеног броја Лејдигових ћелија тестиса и губитка њиховог секреторног капацитета, као и због старосног пораста епизодне и стимулације гонадотропне секреције. Код здравих мушкараца, средња вредност нивоа укупног циркулишућег тестостерона смањује се за око 30% у периоду између 25 и 75 године живота, а због истовременог дејства тестостерона са сексуалним хормон везујућим глобулином (SHBG), чији се капацитет везивања повећава са старењем, средње вредности слободног циркулишућег тестостерона снижене су за 50% током овог периода живота (63). Неколико студија бавило се ефектима физичког тренинга на вредности полних хормона и показали су да и акутна и хронична физичка активност доводи до промена нивоа полних хормона. Током трчања маратона и трчања на трендмил траци по Брусовом протоколу дошло је до смањења серумских нивоа тестостерона. Супротно овоме, литературни подаци показују да током спринта (који се састојао од 10 поновљених циклуса спринта од по 30 секунди са оптерећем од 150% радног капацитета) долази до пораста вредности укупног циркулишућег тестостерона, слободног тестостерона и дихидротестостерона (DHT) код младих мушкараца (63, 64). *Sato* и сарадници су такође испитивали ефекте прогресивног максималног интензитета физичког тренинга на ерго бициклу и показали су да након 20 минута од почетка тренинга долази до повећања нивоа циркулишућег тестостерона да би се након 10 минута од завршетка тренинга на ерго бициклу, вредности циркулишућег тестостерона вратиле на почетне вредности. Два сата пролонгираног вежбања доводи до пораста серумских вредности тестостерона за 18-25% (63, 64).

Различити програми тренинга отпора могу мењати акутни профил концентрације тестостерона и хормона раста у крви након завршетка тренинга. Тренинг издрживости

који је високог интензитета, који активира велику мишићну масу и захтева да за кратак временски период (приближно 40 минута) подигне у циркулацији нивое тестостерона и хормона раста (66). Неколикио студија бавило се ефектима краткорочног и дугорочног интензивног тренинга и показано је да долази до значајног снижења концентрације укупног и слободног тестостерона као и редукције пулсаторности секреције LH и FSH (67).

У литератури нема довољно података о тачном механизму којим акутна максимална и суб-максимална физичка вежба може довести до брзог повећања концентрације тестостерона у серуму, што ће резултирати бољом адаптацијом и перформансама у мишићној активности и функционалном капацитету током физичке вежбе (68). Физичко вежбање, као и спортска такмичења делују на организам као стресогени фактор, а тестостерон вероватно делује као хомеостатски агенс, али не самостално већ заједно са низом хормона који се луче током или непосредно после физичког вежбања (69). Ендокрини одговор организма на стрес који је повезан са вежбањем у вези је са различитим факторима као што су тип, интензитет и трајање физичке активности. (67, 68, 70-72).

Ранија истраживања су показала да акутна вежба често доводи до пролазног повећања нивоа тестостерона, међутим постоје подаци који су супротни и који наводе да код спортиста који су подвргнути хроничном вежбању долази до смањење нивоа тестостерона. Уколико спортиста неисправно изводи вежбе или ако су слабо развијени тренажни програми може доћи до негативне ендокрине реакције која ће изазвати одговарајуће физиолошке последице (72). Хронична изложеност тренинзима издржљивости претераног интензитета може нарушити функционисање хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине, доводећи до значајног и трајног смањења нивоа слободног и укупног тестостерона (у стању мировања), често остајући унутар физиолошког опсега (73-75) уз истовремено повећање нивоа LH. Овако добијен клинички и биохемијски фенотип назива се хипогонадизам настао као последица вежбања (*exercise-hypogonadal male condition*). Ово стање је дефинисао *Hackney* са својим колегама (73,74). Патофизиологија овог стања није у потпуности разјашњена, али се сматра да је могући

оксидач оваквог одговора повећана секреција пролактина и инхибиторни ефекти на секрецију LH путем грелина и лептина (67).

### 1.3.3. Ефекат примене ААС и тренинга на полне хормоне

Анаболички андрогени стероиди и вежбе издржљивости могу изазвати промене у хипоталамо хипофизно-гонадалној осовини. Промене које настају, укључују првенствено смањење вредности укупних и слободних нивоа циркулишућег тестостерона као и лутеинизирајућег и фоликулостимулишућег хормона. Овакви ефекти настали су као резултат дејства негативне повратне спреге андрогена на HPG осу (76). Примена ААС самостална као и удружена са тренингом доводи до повећања серумских вредности тестостерона (77). До повећања серумских вредности тестостерона доводи и вежбање. Студија *Fry-a* и *Lohnes-a* показала је да физичке вежбе могу изазвати висок одговор тестостерона и самим тим да доведу до настанка хипертрофије мишића код спортиста (78). Одређени литературни подаци показују да примена нандролоне доводи до смањења тестостерона, андростендиона и FSH као и односа тестостерон/естрадиол. Серумске вредности естрадиола, SHBG, LH хормона остају при томе непромењене. Претпоставља се да долази до инхибиторног ефекта апликованог нандролоне на секрецију тестостерона из Лејдигових ћелија тестиса. Смањен ниво андростендиона настаје услед смањене секреције тестостерона, док пораст нивоа естрогена настаје као последица периферне ароматизације нандролоне до естрогена (79). Резултати неколико студија показују да примена високих доза нандролоне у дужем временском периоду доводи до смањења вредности LH, FSH и тестостерона. (80, 81). Супротно овоме, резултати других студија показали су да примена нандролон деканоата доводи до пораста вредности тестостерона (77, 82, 83) и смањења вредности LH и FSH.

### 1.3.4. Физиологија тестостерона

Тестостерон је примарно мушки полни хормон кога синтетишу Лејдигове ћелије тестиса. У различитим фазама живота, тестостерон има различите функције. У периоду ембрионалног развоја, дејство андрогена је главно за развој мушког фенотипа (84). У периоду пубертета, тестостерон је одговоран за настанак примарних и секундарних сексуалних карактеристика које дечаке претварају у мушкарце. Такође, тестостерон



учествује у регулацији многих физиолошких процеса код одраслих мушкараца, укључујући метаболизам протеина мишића, сексуалне и когнитивне функције, еритропоезу, регулацију нивоа липида у плазми као и метаболизам костију (85). Одрастао мушкарац дневно производи отприлике 7 mg тестостерона, што би на годишњем нивоу износило око 2500 mg тестостерона, односно 130 g тестостерона мушкарац синтетише до 75 године живота (86). Физиолошке вредности тестостерона у плазми, код мушкараца, крећу се у рангу од 300-1000 ng/dl (87), међутим, са старењем вредности тестостерона опадају тако да мушкарац са 80 година има вредности тестостерона у плазми приближно 50% од вредности коју је имао у узрасту од 20 година (88). Код жена, циркулишуће вредности тестостерона су обично око 10% од вредности тестостерона које су физиолошке код мушкараца (3, 84).

#### 1.4. Грађа тестиса

Тестис одраслих сисара, је сложен орган који има своју егзокрину и ендокрину функцију (89). Морфолошки и функционално тестис се састоји из два дела:

1. Семених каналића који се састоје из јединственог семиниферног епитела и лумена. У епителу семених каналића налазе се две врсте ћелија: сперматогоније и Сертолијеве ћелије које пружају подршку германитивним ћелијама, а имају улогу у вршењу фагоцитозе и секреције течности која помаже транспорту сперме (90). Ламина проприа семених каналића изграђена је од танког слоја фиброзног везивног ткива у коме се налазе фибробласти и миофибробласти који својом контракцијом омогућавају покретљивост тубула и истискивање непокретних сперматозоида према правим тубулима
2. Интерстицијума, који садржи ћелије и влакна везивног ткива, крвне и лимфне судове и Лејдигове ћелије које су главни извор андрогена (91)

**Сертолијеве ћелије** су јако битне за функционисање тестиса. Ове ћелије су издуженог пирамидалног облика, немају способност пролиферације, тако да је њихов број током живота сталан. База ћелије је приљубљена уз базалну ламину док им врхови проминирају у лумен семеног каналића. Садрже велику количину агранулираног ендоплазматичног ретикулума (ЕР), мало гранулираног ЕР, добро развијен Голџијев

комплекс, митохондрије и лизозоме. Једро је троугластог облика и садржи бројне инвагинације док је нуклеолус истакнут (13). Сертолијеве ћелије имају бројне функције које су јако битне за герминативни епител:

#### Потпорна, нутритивна, заштитна и регулација исхране сперматозоида

Ћелије герминативне лозе међусобно су повезане цитоплазматским мостићима. Овако повезаним ћелијама, физички потпору дају бројни цитоплазматски продужетци Сертолијевих ћелија. Имајућу у виду да су сперматоцити, сперматиде и сперматозоиди изоловани од директног снабдевања крвљу посредством крвно-тестисне баријере, герминативне ћелије зависе од Сертолијевих ћелија које омогућавају размену хранљивих материја и метаболита (13).

#### Фагоцитоза

Током процеса спермиогенезе, вишак цитоплазме сперматиде одбацују у облику резидуалних тела. Уклањање резидуалне цитоплазме сперматиде дешава се при крају процеса спермиогенезе, а предходи дефинитивном уобличавању сперматозоида и њиховом ослобађању у лумен семене цевчице.

#### Секреција

Сертолијеве ћелије непрестано секретују течност у лумен семених каналића која је неопходна за транспорт и преживљавање сперматозоида. Под контролом фоликулостимулирајућег хормона, Сертолијеве ћелије експримирају андроген везујући протеин (ABP) који служи за концентрисање тестостерона у семеним каналићима, где је неопходан за процес сперматогенезе. Ове ћелије имају способност да претворе тестостерон у естрадиол, а такође излучују и полипептид инхибин, који механизмом негативне повратне спреге смањује синтезу и излучивање фоликулостимулирајућег хормона (FSH) предњег режња хипофизе.

#### Крвно-тестисна баријера

Постојање баријере између крви и семеног епитела изнад нивоа сперматогонија је кључно за заштиту ових ћелија од дејства имунског система. Капилари који се налазе у

тестису су фенестрираног типа и омогућавају пролазак великих молекула. Постојање оклудентних слојева између Сертолијевих ћелија, формира баријеру која спречава транспорт великих молекула кроз просторе између Сертолијевих ћелија. На овај начин, ћелије каснијих фаза сперматогенезе остају заштићене од потенцијалног цитотоксичног ефекта лимфоцита који ове ћелије, због њихове касне диференцијације, сматрају страних ткивом (13).

У **германитивном епителу** константно се продукују мушки гамети процесом сперматогенезе, која представља процес матурације и диференцијације мушких полних ћелија. Ћелије које се стварају овим процесом, распоређене су у одељцима и то сперматогоније које су локализоване периферно, док су сперматозоиди локализовани у лумену семеног каналића. Од периода пубертета, сперматогоније почињу да пролиферишу процесом митозе при чему се стварају сперматогоније типа А и сперматогоније типа Б. Сперматогоније типа Б пролазе кроз стадијуме матурације и диферентују се у примарне сперматоците. Примарни сперматоцит под дејством FSH улази у прву мејотску деобу и настаје секундарни сперматоцит, који улази у другу мејотску деобу и ствара сперматиде што представља завршну фазу спермицитогенезе. Спермиогенеза представља процес диференцијације сперматиде у сперматозоиде (92).

Између семених каналића (семиниферних тубула) налази се **интерстицијум**. Интерстицијум представља растресито везивно ткиво у коме се налазе фибробласти, миофибробласти, колагена влакна, макрофаги, мастоцити, мрежа крвних и лимфних судова и нерви. У интерстицијуму се налазе Лејдигове ћелије које могу бити локализоване самостално или у групама, али су готово увек у блиској вези са крвно - лимфном капиларном мрежом и нервима. Овалног и полигоналног су облика са гранулисаним цитоплазмом, једро им је округлог облика са једним или два једарцета. Лејдигове ћелије синтетишу мушки полни хормон тестостерон. Цитоплазма Лејдигових ћелија богата је органелама (глатки ендоплазматични ретикулум (glER), митохондрије са тубуларним кристама), а такође, у цитоплазми могу да се уоче и липидне капљице, гликоген, липофусцинске грануле и Reinke-ови кристали. Лејдигове ћелије, као и друге стероид-продукујуће ћелије, имају мање развијен гранулирани ендоплазматични ретикулум чија је главна улога да синтетише интраћелијске ензиме

неопходне за синтезу тестостерона из холестерола. Лејдигове ћелије секретују тетостерон још током раног феталног живота, а затим пролазе кроз период инактивности од 5. месеца феталног живота. Инактивне Лејдигове ћелије је тешко разликовати од фибробласта. Након вишка гонадотропне стимулације у пубертету, Лејдигове ћелије поново постају андроген-секреторне ћелије и остају активне током целог живота (92).

#### 1.4.1. Ефекти примене ААС и физичке активности на тестис

Егзогено дати синтетски деривати тестостерона делују на хипоталамо-хипофизну гонадалну осовину механизмом негативне повратне спреге и на тај начин доводе до инхибиције секреције и LH и FSH. Иако су вредности андрогена у серуму нормалне до повишене, настале као последица употребе андрогених анаболичких стероида, те концентрације нису довољне за нормално одвијање сперматогенезе. Коришћење ААС код мушкараца, доводи до настанка хипогонадотропије, хипогонадизма, атрофије тестиса и азоспермије (93). Неplодност, која је настала као последица коришћења ААС манифестује се у виду азоспермије и олигоспермије са абнормалношћу у морфологији и покретљивости сперматозоида. Након престанка коришћења ААС, долази до побољшања квалитета сперматозоида у периоду од 4 месеца. Међутим, ефекат коришћења ААС на сперматогенезу може да перзистира и до 3 године од момента престанка коришћења у складу са ниским серумским вредностима тестостерона, LH и FSH (93).

Ефекти комбиноване примене ААС и интензивног физичког тренинга на репродуктивну функцију још увек нису довољно истражени. *Zamow* и сарадници испитивали су ефекте примене високих доза нандролон деканоата самостално и у комбинацији са тренингом на ултраструктурне промене на тестису. Показали су да комбинована примена нандролонa и тренинга доводи смањења броја Лејдигових ћелија, крвних судова и фибробласта, а такође су приметили да су интерстицијумски простори проширени. У семеним каналићима, самостално примењен нандролон и његова комбинација са тренингом довела је до задебљања базалне мембране са неправилним мултиламинарним таласастим изгледом. Сперматогоније су мале и равне, а присутни су и знаци дегенерације. У сперматоцитима уочена је апоптоза, док су сперматиде садржале више везикула, вакуола и густих тела (94).

Физичко вежбање може утицати на репродуктивну функцију човека, на сексуално понашање и/или на плодност, и то на позитиван и на негативан начин. Код мушкараца, сексуалне и сперматогенетске функције могу се одржати или побољшати адекватном физичком активношћу, међутим, након претеране физичке активности са или без злоупотребе забрањених супстанци може доћи до промена у сексуалности и/или фертилности мушкараца (67, 94, 95, 96). Као фактор ризика за настанак неколико хроничних болести и стања, између осталог и за настанак сексуалне дисфункције код мушкараца, сматра се да је одговорна смањена физичка активност (97-99). Физичка активност и ниво физичке спремности повезани су са квалитетом еректилне функције (99-101). Поред промене начина живота, као један вид терапије у третману еректилне дисфункције, јесте физичка активност. Вежбање доводи до повећања биорасположивости азот монооксида (NO) и повећава број ендотелних прогениторских ћелија, док се истовремено смањује концентрација маркера оксидативног стреса (102) и експресија TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  и IL-6, чиме долази до побољшања ендотелне функције (103) што последично доводи до смањења ризика за настанак еректилне дисфункције (67).

#### **1.4.2. Андрогени рецептор (AR) у тестису**

Андрогени рецептор припада групи нуклеарних рецептора и налази се у цитоплазми и једру ћелија циљних ткива и познат је још и под скраћеницом NR3C4. Тестостерон врши своју активност преко андрогеног рецептора. Када се тестостерон веже у цитоплазми за андрогени рецептор долази до њихове транслокације у једро и последичне активације DNK и транскрипције специфичних протеина, са различитом модификацијом интраћелијске активности (93). Андрогени рецептор (AR), налази се у мушком репродуктивном систему, скелетним мишићима, кожи, јетри, бубрезима, мозгу и адипоцитима (104, 105). У феталном тестису, тестостерон доводи до повећања броја андрогених рецептора повећавајући број ћелија које садрже андрогени рецептор, али такође доводи и до повећања броја рецептора у свакој појединачној ћелији (93).

У адултним тестисима, андрогени рецептор налази се у једру Сертолијевих ћелија, перитубуларним миоидним ћелијама, интерстицијалним Лејдиговим ћелијама и у једрима малих артериола. А такође је, у Сертолијевим ћелијама, примећена локализација AR

рецептора само у специфичним стадијумима сперматогеног циклуса у тубулама сперматогених стадијума од II-VII (106).

Код фетуса и неонаталних тестиса, андрогени рецептор AR локализован је само у једру просперматогонија. Од 14-ог дана живота, AR рецептор локализован је у сперматогонијама, Сертолијевим ћелијама, перитубуларним миодним ћелијама и Лејдиговим ћелијама (107).

### **1.5. Мишићно ткиво**

Мишићно ткиво изграђено је од миоцита. Мишићне ћелије удружене су везивом које их окружује, крвним судовима и нервима које чине функционалне средине односно мишиће. Скелетно мишићно ткиво изграђено је попречно пругастих мишићног ткива. Ово ткиво сачињава негде око 40% телесне масе. Ћелије скелетног мишићног ткива су цилиндричног облика, дугачке и танке због чега се и називају мишићна влакна. Сваку мишићну ћелију окружује слој растреситог везива које се назива ендомизијум. У ендомизијуму се налазе крвни и лимфни капилари и гранчице периферних нерава, као и фиброцити и мастоцити који утичу на пермеабилност капилара. Већи број мишићних снопова окружен ендомизијумом формира сноп - фасцикулус. Мишићни снопови садрже омотач који се назива перимизијум који је изграђен од густог везивног ткива. Мишић се састоји од већег броја фасцикулуса који су окружени зајеничким омотачем – епимизијумом који је изграђен од густог везивног ткива. На епимизијум налаже фасција која омотава појединачне мишиће а изграђена је од слоја фиброзног везива. Већи крвни судови и нерви, гранају се у епимизијуму док њихови ситнији огранци пролазе кроз перимизијум а најситнији капилари и појединачна нервна влакна одлазе до ендомизијума. Капилари су континуираног типа (13).

#### **1.5.1. Ефекти примене ААС на мишићни систем**

Скелетни мишић је примарно циљно ткиво на који коришћење ААС изазива анаболички ефекат. Физиолошки активност одвија се везивањем хормона за интрацелуларни протеин у циљном ткиву. Комплекс хормон рецептор затим се транслоцира на место везивања на хроматину промовишући транскрипцију гена, а касније и синтезу mRNA (108). Било да тренирају или не, примена супрафизиолошке дозе

тестостерон енантата код мушкараца у периоду од 10 до 20 недеља доводи до повећања телесне масе, величине и снаге мишића. У којој мери ће бити испољен анаболички ефекат тестостерона, зависи првенствено од дозе. До повећање снаге и масе мишића долази само када дамо дозу тестостерона од 300 mg (и више) недељно (3).

### **1.5.2. Ефекти тестостерона на настанак хипертрофије мишића**

Анаболички андрогени стероиди имају изузетно моћни ефекат на настанак мишићне хипертрофије. Тестостерон, код младих мушкараца, има ту способност да може довести до настанка хипертрофије мишића било да се узима самостално или у комбинацији са тренингом (109). Висока анаболичност тестостерона зависи од одређених фактора. Због своје хемијске природе, тестостерон као стероидни хормон, може врло лако да прође кроз липидни двослој сарколеме где формира комплекс са цитосолним или нуклеарним андрогеним рецептором и тиме започињу транскрипцију гена (110). Андрогени рецептор се састоји из три подјединице: 1. С терминални домен који се везује за лиганд (нпр. тестостерон), 2. Централни домен којим се веже за ДНК и 3. N терминални домен који регулише транскрипцију (111). Када се лиганд веже за андрогени рецептор, рецептор се тада трансформише, димеризују се, транслоцира се у једро где се везује за елементе одговора андрогена као хомодимер (110). Активацијом елемената андрогеног одговора, стимулише се транскрипција циљаних протеина директно повезаних са порастом протеина (нпр. Миозински тешки ланци (МНС)). Фармаколошке дозе тестостерона повећавају степен синтезе мишићних протеина (112). Постоје подаци који показују да тестостерон повећава интраћелијско искоришћавање аминокиселина и тако стимулише синтезу протеина (112).

### **1.5.3. Ефекти примене нандролон деканоата и тренинга на колаген у скелетном мишићу**

Скелетни мишић је високо адаптивбилно ткиво. Адаптација мишића на физичку активност укључује регулацију активности сателитских ћелија, миогенезу и ангиогенезу, ширење ткива и алтерацију потпорних структура. Хипертрофија мишића настаје као одговор на вежбу са оптерећењем, док губитак мишићне масе настаје током дужег периода неактивности. Екстрацелуларни матрикс (ЕСМ), игра важну улогу у адаптацији

скелетних мишића на различите физиолошке стимулансе (113) тако да је реструктурирање ЕСМ-а неопходно за раст мишића. Реструктурирање ЕСМ је важно и за ангиогенезу јер је деградација протеина базалне мембране под дејством протеаза неопходна за ангиогенезу која је настала као последица физичке активности (58). У скелетном мишићу, функције екстрацелуларног матрикса скелетног мишића су одржавање мишића, миогенеза, регенерација и реинервација, адаптација на тренинг и атрофија након периода неактивности мишића. Хомеостаза екстрацелуларног матрикса захтева константну регулацију (синтезу и деградацију) екстрацелуларних компоненти, акумулацијом екстрацелуларног матрикса који доводи до повећања колагених депозита (114, 115).

#### **1.5.4. Ефекти примене нандролоне и тренинга на васкуларни профил у скелетном мишићу**

Равнотежа између периферних и централних утицаја на крвоток одређује прокрвљеност мишића. Проширење капиларне мреже настаје као последица ангиогенезе, односно представља стварање нових капилара из већ постојећих (116). Физиолошка ангиогенеза представља неравнотежу између метаболичких захтева ткива и перфузионог капацитета саме васкулатуре (117). Бројни су фактори који утичу на промену васкуларног ремоделовања (116). Неки од фактора су :

- Shear stress – механички стрес
- Cell stretch – истезање мишићних влакана
- **VEGF – васкуларни ендотелијални фактор раста**
- MMP – матриксне металопроотеиназе
- NO/eNOS – азот монооксид/ендотелијална азот монооксид синтаза (116)

Процес ангиогенезе разликује се од процеса васкулогенезе. Процес васкулогенезе односи се на стварање де ново васкулатуре из прекурсорских ћелија док процес ангиогенезе представља стварање нових капилара из већ постојећих. Ангиогенеза може да се јави и у неким физиолошким условима и то код вежбања, развоја плаценте и оваријалног циклуса. За настанак ангиогенезе одговорна су два механизма: интусепција (intussusception) и гранање (sprouting). Интусепција јесте процес раздвајања једног крвог суда из ког настану два крвна суда. Наиме, долази до уздужног раздвајања капилара на луминалној



страни. Ендотелијалне ћелије, које се налазе интралуминално, активирају се и доводе до формирања две цеви кроз које може да прође крв. Гранање крвног суда се односи на процес у коме се активирани ендотелијални ћелије ограниче од постојећих капилара протежући се кроз околну матрикс како би формирале солидну ћелијску траку. Ова структура од ендотелијалних ћелија трансформише се у цев и причврћује се за околну екстрацелуларну матрикс. На овакав начин формирана цев, мора да се врати у капиларно корито спајајући се са другим капиларом или венком и тек онда постаје функционалан капилар (116).

Аеробни капацитет вежбања зависи од количине допремљеног кисеоника који може да задовољи метаболичке потребе мишића у току тренинга (118). Способност усмеравања оксигенисане крви контрахованом мишићу током периода интензивног тренинга кључни је фактор у постизању максималног капацитета вежбања (119, 120). Кључни елемент за обезбеђивање адекватне количине  $O_2$  за митохондрије у ћелијама мишића јесте број околних капилара. Током вежбања, количина допремљеног кисеоника се повећава због брзог пораста перфузије у процесу који се назива хиперемиа индукована вежбањем (119-121).

Капацитет капиларног снабдевања веома је важна одредница мере максималног протока кисеоника у скелетним мишићима. Скелетни мишић има ту могућност да прилагођава своју капиларну мрежу у неким стањима као што су физичке вежбе, одмор, исхемија и старење (122, 123). Промене капиларне мреже у старости су детаљно истражене, међутим резултати који се односе на морфолошке промена микроваскуларног корита су контрадикторни. У студијама на животињама, једни аутори наводе да са старењем може доћи до повећања (124), други до смањења (123- 125), док трећи наводе да нема промене у броју и калибру капилара (126-131).

Различите морфометријске и стереолошке технике користе се за процену капиларизације, а најчешће коришћени и прихваћени индекси за квантификацију капилара у мишићима су капиларна густина и однос капилар-vlakно. Капиларна густина можда и није погодан маркер за процену капиларног снабдевања код старих животиња зато што овај индекс зависи од величине мишићних влакана (130), а такође и однос капилара и влакана може да зависи од броја мишићних влакана. Стари пацови имају широк опсег

величина мишићних влакана због атрофије и хипертрофије мишићних влакана (130), тако да величину појединачних мишићних влакана треба узети у обзир. Без обзира да ли капиларно снабдевање остаје не промењено или не, молекуларни механизми који су укључени у промене капиларне мреже са старењем још увек нису довољно разјашњени (132). У одржавању васкуларне хомеостазе, важну улогу има баланс ткива између проангиогених и антиангиогених фактора (132). Један од ангиогених фактора јесте и VEGF.

Васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF) јесте митоген за васкуларне ендотелијалне ћелије артерија, капилара и вена. Постоје чак литературни подаци који подвлаче чињеницу да VEGF-а представља фактор преживљавања ендотелијалних ћелија у *in vivo* и *in vitro* условима (133). Он је потентни митоген ендотелних ћелија који је укључен у ангиогени одговор који настаје и као последица тренинга. Неколико студија бавило се ефектима тренинга на VEGF. Тренинг издржљивости, у хуманој популацију, у периоду од 4 недеље доводи до пораста капиларне мреже и пролазне пролиферације ендотелних ћелија у скелетном мишићу (134). Пораст густине капиларне мреже примећен је и у студијама других аутора. Тренинг пливањем код пацова, у трајању од 4 недеље (135), као и тренинг вожње бициклом у трајању од 5 недеља, код мушкараца (136), довео је до пораста VEGF-а. Експресија VEGF-а зависи од врсте мишићних влакана, интензитета и врсте тренинга (136). Тренинг издржљивости повећава густину капиларне мреже и доводи до повећаног протока крви у мишићна влакна (136). Иако у литератури постоје подаци који указују на то да тренинг индукује васкуларну неоформацију, тачан механизам којим доводи до пораста капиларне неоформације, за сад није утврђен (137). Познато је да је предуслов за започињање процеса ангиогенезе деградације базалне мембране капилара и ремоделирање екстрацелуларног матрикса до чега може доћи услед снажних контракција мишића. Штавише, повећан проток кроз капиларну мрежу изазива стрес и даје стимулус за продукцију азот-моноксида што доводи до ангиогенезе. VEGF има важну улогу у ангиогенези. Везивањем за рецепторе на ендотелним ћелијама капилара он изазива пролиферацију и миграцију ћелија кроз активирање потентне тирозин-киназа сигналне каскаде која на крају доводи до експресије неколико гена између којих је за ангиогенезу најзначајнији ген за eNOS (ендотелијална азот-моксид синтаза) (116). Везу између апликације ААС и VEGF-а испитивао је *Paschoal* који је показао да коришћење ААС

самостално или у комбинацији са тренингом доводи до смањења генске експресије VEGF-a (137). Међутим, у литератури могу да се нађу и подаци који показују да тренинг самостално или у комбинованој примени са нандролон деканоатом доводи до пораста серумских вредности VEGF-a, док самостално примењен нандролон доводи до смањења његових вредности (138).

## 1.6. Масно ткиво

Масно ткиво представља врсту везивног ткива које је специјализовано да складишти липиде. Изграђено је од масних ћелија које су организоване у мање и веће групе. Постоје две врсте масног ткива: жуто (бело) и мрко масно ткиво које се разликују по својој структури, дистрибуцији, боји, инервацији као и по метаболичкој активности (13).

Жуто масно ткиво изграђено је од жутих масних ћелија – адипоцита. Адипоцити садрже једну велику масну кап у којој су депоновани триглицериди. Ове ћелије су пречника од 50-150  $\mu\text{m}$ , округлог облика уколико су појединачне а полигоналног облика уколико су у групама. Највећи део адипоцита сачињава масна кап док је цитоплазма са органелама потиснута ка периферији у виду прстена. Масна кап нема мембрану али је од цитосола изолована мрежом актинских филамената. На плазмалемии адипоцита налазе се бројни рецептори за инсулин, норепинерфин, хормон раста и за глукокортикоиде. Ови хормони поспешују унос и ослобађање масних киселина и глицерола. Жуто масно ткиво пресецају широке септе и деле га на широке лобулусе. Кроз септе, пролазе нерви и крвни судови који се у лобулусу гранају на богату мрежу континуираних капилаара. Масно ткиво има и улогу секреторног органа. Масно ткиво синтетише неколико молекула који се преносе путем крви или остају везани за ендотел капилаара који су смештени око адипоцита (нпр. липопротеинска липаза) (13). **Лептин** је једна од највише испитиваних материја коју стварају адипоцити. Лептин има улогу у регулацији количине масног ткива у телу и у контроли уноса хране. Своје дејство испољава у хипоталамусу и као резултат тог дејства долази до смањења уноса хране и повећања потрошње енергије (92). Када је откривен лептин, променило се знање о енергетској хомеостази и поглед на масно ткиво. Масно ткиво не представља само енергетске депое већ представља прави ендокрини орган (139). Нивои лептина у циркулацији корелирају са количином телесне масноће,

одражавајући енергетски статус, а има и важну улогу у регулацији енергетске хомеостазе, неуроендокриних и имунолошких функција, метаболизма глукозе, липида и костију (140-142).

Лептин је 167-аминокиселински пептид који се углавном налази у белом масном ткиву. Поред масног ткива, лептин се налази и у другим ткивима као што су плацента, млечна жлезда, јајници, скелетни мишићи, желудац, хипофиза и лимфно ткиво (143). Нивои лептина у циркулацији, мењају се приликом промене калоријског уноса хране, тако да у периоду гладовања долази до изузетно смањених вредности (144,145). Овај хормон излучује се пулсативно, приказујући циркадијски ритам, при чему је излучивање лептина на најнижем нивоу средином поподнева, а највише у поноћ. И гојазне и мршаве особе имају сличан пулсативни начин секреције лептина, међутим, гојазне особе имају већу амплитуду пулсне секреције (146). Сексуални дизморфизам утиче на нивое лептина. Код жена, у периоду после менопаузе ниво лептина опада. Жене имају више нивое лептина од мушкараца, што указује на важну улогу полних хормона (147). Подкожна маст производи више лептина него висцерална маст, и можда то једним делом и доприноси већем нивоу лептина код жена у односу на мушкарце. На регулацију нивоа лептина утичу полни хормони, инсулин, глукокортикоиди, катехоламини и цитокини (148). Лептин учествује у регулацији метаболизма липида тј. у стимулацији оксидације масних киселина (149), тако што врши активацију АМПК (АМР-активирана протеин киназа) у скелетним мишићима и спречава акумулацију липидних метаболита који су повезани са липотоксичношћу (150). Лептин утиче и на хомеостазу глукозе преко инсулина. Лептин доводи до инхибиције експресије гена за инсулин и глукозом стимулисану секрецију инсулина (151,152). Различите студије на анималним моделима, показале су да лептин штити  $\beta$  ћелије панкреаса од липотоксичности (148,153-155).

### 1.7. Оксидациони стрес

Оксидативни стрес је дефинисан као неравнотежа између повећања производње реактивних кисеоничних врста и способности биолошких система за детоксификовање реактивних интермедијара или за поправку штете коју изазивају оксидативни радикали. Оксиданти, које се назвају још и реактивне врсте кисеоника (ROS), производе живи организми из молекуларног кисеоника насталог као резултат нормалног ћелијског

метаболизма. Осим ендогених оксиданата, егзогени оксиданти као што су загађивачи ваздуха, дим цигарете, јони тешких метала и јонизујуће зрачење доприносе редуковању (регулацији редукције и оксидирајући) ћелијског статуса. Редокс стање је критично за функцију ћелија и органа. Реактивне врсте кисеоника представљају високо реактивне молекуле (156). Нормално су укључени у функционисање физиолошких ћелијских процеса, међутим, у високим концентрацијама могу довести до оштећења ћелијских структура као што су угљени хидрати, нуклеинске киселине, липиди и протеине и да промене њихове функције (156-159). Антиоксиданти су обично ефикасни у блокирању штетних ефеката реактивних кисеоничних врста (ROS). Међутим, у неким патолошким условима, услед преоптерећености антиоксидативног система, настаје оксидативни стрес и повреда (156).

Скоро све ћелије живих организама нормално производе реактивне кисеоничне врсте (ROS) (160). Оксидациони стрес настаје као последица неравнотеже између прооксидационих једињења и антиоксидативне одбране, међутим овај концепт је редефинисан и у новије време назива се "поремећај редокс сигнала и контроле" (161,162). Молекули реактивних кисеоничних врста (ROS) могу жестоко реаговати са саставним деловима ћелије. Повећање производње или смањење детоксикације доводи до повећане расположивости ROS-а која може изазвати оксидативне модификације DNK, протеина и липида. На овакав начин настале структурне промене у биомолекулама могу довести до промене ћелијске функције и ћелијских процеса и самим тим играју важну улогу у низу различитих болести и дегенеративних стања (161,162).

Оксидативни стрес настаје као последица настанке дисбаланса (неравнотеже) између производње реактивних кисеоничних врста (ROS) и способности детоксикације реактивних интермедијатора или поправљања насталог оштећења адекватном антиоксидативном одбраном. Овакав дисбаланс између производње и детоксикације реактивних кисеоничних врста, може довести до оштећења свих ћелијских компоненти, укључујући протеине, липиде, угљене хидрате и нуклеинске киселине (163,164). Препознато је да оксидативни стрес укључен у многе физиолошке процесе (нпр. старење и вежбање) и патолошке процесе (болести), укључујући инфламацију, кардиоваскуларне и неуродегенеративне болести и рак (163, 164).

Ефекат који вежбање изазива на редокс статус је веома сложен процес и зависи од старосне доби, пола и нивоа утренираности, као и од интензитета и трајања вежбања. Вежба умереног интензитета има корисне ефекте на оксидативни стрес и здравље, међутим, акутне и напорне аеробне и анаеробне вежбе могу да изазову прекомерну производњу реактивних кисеоничних врста (ROS) (164). Иако вежбање доводи до повећаног стварања реактивних кисеоничних врста, према теорији хормиса, исти стимуланс који изазива вежбање чини се да је неопходан за побољшање регулације ендogene антиоксидативне одбране. Ова хипотеза сугерише да реаговање организма на поновљено повећање производње ROS-а настало као последица вежбања укључује одређене адаптивне механизме. Конкретно, хормеза изазива упоређивање антиоксиданта, помак ка мањој околини, индукујући повећану отпорност на стрес, што у крајњој линији доводи до побољшаног животног века (165). Исти адаптивни одговор и детоксикацијску функцију имају антиоксидативни ензими супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPk), глутатион-редуктаза, глутатион-С-трансфераза и неензимски антиоксиданати као што су витамини Е, А, С, глутатион (GSH) и мокраћна киселина. Ови антиоксиданси, учествују у превенцији прекомерног стварања ROS и у вези су са побољшањем перформанси, превенцијом старења и патолошким ризиком код професионалних спортиста (164, 165).

У стању мировања, редокс статус најчешће је мањи код спортиста него код седентарних појединаца, међутим одређени литературни подаци указују на то да редокс статус код спортиста може бити повишен или непромењен (166, 167). Многе варијабле јасно утичу на ове резултате, а најважније варијабле које утичу на ове резултате су разлике у дизајну истраживања (нпр. интензитет вежби) и различите методе које се користе за процену статуса оксидационог стреса (166). Неколико студија показало је нижи оксидативни одговор код спортиста него код неутренираних индивидуа у стању мировања. Убрзо након вежбања, нивои малондиалдехида (MDA), протеин карбонила и 8-хидроксидоксигуанозина били нижи код утренираних спортиста у поређењу са неутренираним особама, док је активност SOD-а била виша код спортиста у поређењу са седентарним појединцима (168, 169). Насупрот томе, нивои антиоксидативних ензима, као што су каталаза и GPx, били су већи него код седентарних појединаца, иако су ове

промене биле специфичне за спорт и везане за физички статус и ниво тренинга спортиста (164, 170).

Познато је да злоупотреба ААС доводи до нарушавања редокс хомеостазе. Бројни су литературни подаци о штетним ефектима злоупотребе ААС на редокс статус многих органских система. Патофизиолошки процеси на срцу, јетри и бубрезима углавном су повезани са оксидационим стресом (162). Одређене студије су показале да третман нандролон деканоатом доводи до смањења антиоксидативних ензима и то каталазе и SOD (162), док третман станозололом повећава нивое каталазе, GPx и липидних пероксида у ткиву јетре (171). У ткиву срца, нандролон доводи до пораста слободног малонилалдехида (MDA) (172) док у ткиву тестиса нандролон повећава ниво индекса липидне пероксидације (TBARS) али не утиче значајно на промене вредности редукованог глутатиона (GSH) (173).

**2.**

**Циљ истраживања**



## Циљеви истраживања

### Главни циљ

Испитивање морфолошких промена које настају током адаптације хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине услед самосталне или комбиноване примене нандролон деканоата и физичке активности код мужјака пацова различите старосне доби.

### Специфични циљеви

1. Испитати морфофункционалне и стереолошке карактеристике FSH, LH ћелија хипофизе и тестиса младих и адултних мужјака пацова;
2. Испитати хистоморфометријске карактеристике скелетног мишића и масног ткива;
3. Утврдити серумске вредности фоликулостимулирајућег, лутеинизирајућег хормона, тестостерона, лептина;
4. Испитати учешће различитих параметара оксидативног стреса (нитрита ( $\text{NO}^-$ ), супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) као и антиоксидативних ензима типа каталазе (CAT), супероксид-дисмутазе (SOD) и глутатиона (GSH);
5. Утврдити корелацију између про-оксидативних и антиоксидативних параметара и хистолошких одлика FSH и LH ћелија;
6. Утврдити вредности гликемије и инсулинемије наше
7. Упоредити добијене резултате према старосној доби пацова.

**3.**

# **Материјал и методе**

### 3.1. Експериментални протокол

Све експерименталне процедуре и биохемијске анализе изведене су у Институту за физиологију, у лабораторији за кардиваскуларну физиологију „Факултета медицинских наука“ Универзитета у Крагујевцу док је хистолошка обрада ткивних узорака и њихова анализа изведена у „Институту за хистологију“ „Факултета медицинских наука“ Универзитета у Крагујевцу и у „Институту за биолошка истраживања Синиша Станковић“ Универзитета у Београду. Истраживање је спроведено у складу са Директивама Савета Европе (*European Council Directive, 86/609/EEC*) и принципима Добре лабораторијске праксе (2004/9/ЕС, 2004/10/ЕС) и одобрено од стране Етичког комитета за добробит експерименталних животиња, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу (број 01-14606 од 7.12.2016.године.).

У нашем истраживању користили смо мужјаке пацова *Wistar albino* соја, као најоптималнији модел за испитивану проблематику. Животиње су подељене у две старосне групе, перипуберталне старости 5 недеља, просечне телесне масе 100-130g и адултне старости 10 недеља, просечне телесне масе 200-250g. Пацови су чувани у плексиглас-транспарентним кавезима, 4 животиње по кавезу, са дном обложеном шушком, са слободним приступом храни и води (*ad libitum*) и константним амбијенталним условима (температура  $21\pm 2$  °C; влажност  $55\pm 5$  %; циклус светло-тама на 12 h са почетком светлог периода у 8:00 h). Истраживање је обухватило 64 мужјака пацова који су били подељени према старосној доби у 2 групе - перипубертални и адултни пацови од којих је свака обухватила по 4 групе (8 животиња у свакој испитиваној групи) и то:

1. Животиње које не тренирају и не примају нандролон деканоат (контролна група);
2. Животиње које не тренирају и примају нандролон деканоат у виду депо препарата (nandrolone decanoate - 20 mg/kg, *s.c.*, у трајању од 4 недеље);
3. Животиње које тренирају пливање у трајању од 1 сата дневно (5 дана у недељи) и не примају нандролон деканоат;

4. Животиње које тренирају пливање у трајању од 1 сата дневно (5 дана у недељи) и примају нандролон деканоат у виду депо препарата (nandrolone decanoate - 20 mg/kg, s.c., у трајању од 4 недеље).

Табела 3. У табели су представљене скраћене ознаке експерименталних група.

Ознаке група	Групе
<b>T-N-</b>	Контролна група
<b>T-N+</b>	Самостална примена нандролона
<b>T+N-</b>	Самостално тренинг
<b>T+N+</b>	Тренинг у комбинацији са нандролоном

Пре почетка, али и током истраживачког периода, све животиње биле су под сталним мониторингом при чему се недељно пратила телесна маса сваке животиње. Животиње које су тренирале пливање, сваког дана су пливале у 9h ујутру, пет дана у недељи, сат времена дневно. Температура воде била је 37°C. Пливање је спроведено у посебно конструисаном стакленом базену за пацове димензија 120x80x50 cm (дужина, висина, ширина), у коме је дубина воде 60 cm при чему су тренинг пливањем обављале по две групе истовремено уз стално надгледање и контролу температуре водене средине. Тренинг пливањем састојао се од периода адаптације на пливање у трајању од недељу дана и експерименталног периода у трајању од 4 недеље. Током периода адаптације на пливање, групе које пливају првог дана су пливале 20 минута. Трајање пливања постепено се повећавало сваког дана за 10 минута, да би се на крају петог дана достигло пливање у трајању од 60 минута. Након периода адаптације, животиње су свакодневно пливале, сат времена дневно, пет дана у недељи. Групе животиња које нису пливале потапане су у воду исте температуре (током 1 минута) у истом периоду трајања протокола како би се искључио фактор стреса изазван пливањем експерименталних животиња. Животиње које су примале нандролон деканоат (DECA DURABOLIN<sup>®</sup>, Organon, Holand) једном недељно су добијале субкутану инјекцију у дози од 20 mg/kg телесне масе.

Након завршеног четворонедељног третмана нандролон деканоатом и тренингом, животиње су жртвоване на гиљотини у кетамин-ксилазин (Ketamin 10%, CP-PHARMA,

Burgdorf, Germany; 100 mg/kg.; Xyla, Interchemie, Holland; 10 mg/kg) интраперитонеалној анестезији, при чему су узети узорци крви и ткива. Узорци крви који су прикупљани у епруветама без цитрата одстојали су 30 мин на собној температури, а затим су центрифугирани (15 мин на 3000 обртаја), након чега се издвојио серум, док крв која је скупљана у епруветама са цитратом, центрифугирана је (10 мин на 3000 обртаја) при чему су се извојили еритроцити од плазме. Исталожени еритроцити су ресуспендовани и три пута испрани физиолошким раствором уз центрифугирање 10 мин на 3000 обртаја, а затим замрзнути на  $-20^{\circ}\text{C}$  до анализе. Из серума су одређиване вредности тестостерона, FSH, LH и лептина, док су се из узорка плазме одређивале вредности маркера оксидативног стреса ( $\text{NO}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ , TBARS,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) а из узорка еритроцита вредности антиоксидативних ензима (CAT, SOD, GSH).

Изоловане хипофизе, тестиси (леви тестис узет је за хистолошку анализу док је десни тестис узет за одређивање ткивног оксидационог стреса), скелетни мишић (квадрицепс) и масно ткиво пацова прво су измерени а након тога је уследила обрада узетих ткива и органа по специјалним протоколима за хистолошку анализу. Узети органи прво су фиксирани у 4% неутралном параформалдехиду (PFA) на собној температури током 24h. По завршеној фиксацији, узорци ткива су дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (30%, 50%, 70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калуљени у парапласту. Попречни серијски пресеци, дебљине 5  $\mu\text{m}$  за тестис, скелетни мишић и масно ткиво и 3  $\mu\text{m}$  за хипофизу, сечени су на ротационом микротому (RM 2125RT Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Добијени пресеци сушили су се на собној температури неколико дана, након тога су депарафинисани у ксилолу и рехидрирани у опадајућим концентрацијама алкохола (100%, 96% и 70%), испирани у води, а потом бојени *Haematoxylin*-ом по *Mayer*-у, и 2% раствором еозина. Након бојења монтирани су на плочице са DPX-ом и покривени покровном љуспицом. Пресеци ткива анализирани су на светлосном микроскопу Olympus BX51 на великом увећању.

За имунохистохемијско бојење ткива, серијски резови дебљине 5  $\mu\text{m}$  и 3  $\mu\text{m}$ , монтирани су на посебне високо адхерентне плочице *UltraSuperFrost*. У ткиву хипофизе обележаване су фоликулостимулирајуће ћелије (FSH) и лутеинизирајуће (LH) ћелије применом специфичних примарних антитела ( $\beta\text{FSH}$  и  $\beta\text{LH}$ ), на ткиву тестиса обележен је

андрогени рецептор док је на скелетном мишићу обележен васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF).

## 3.2. Хистолошка бојења

### 3.3. Хистолошка бојења хипофизе

#### 3.3.1 Имунохистохемијско обележавање LH ћелија хипофизе

LH ћелије хипофизе обележаване су специфичним имунохистохемијским бојењем. Серијски пресеци хипофизе дебљине 3  $\mu\text{m}$  прво су депарафинисани и рехидрирани кроз опадајуће концентрације етанола (100% -70%) а затим испирани у дестилованој води. Након тога, ткивни пресеци испирани су у фосфатном пуферу (PBS) у трајању од 5 минута након чега је уследило блокирање ендogene пероксидазе у 0,3% водоник пероксиду раствореном у метанолу у трајању од 15 минута. Ткивни пресеци су испирани у PBS у трајању од 5 минута, затим су инкубирани са нормалним свињским серумом (1:100) у трајању од сат времена на собној температури. Након тога пресеци су инкубирани са примарним антителом (1:500) (*National Institit of Healt, Bethesda, Md., USA*) и остављени преко ноћи на собној температури. Следећег дана, пресеци хипофиза испрани су у PBS-у 5 минута, након чега је уследила инкубација секундарним антителом у трајању од сат времена. Везујућа места на пресецима визуелизована су са 0,05% диаминобензидином (DAB; Serva, Heidelberg, Germany), након чега су пресеци хипофиза контрастирани *Haematoxylin*-ом, рехидрирани у растућим концентрацијама алкохола (70%-100%), просветљени у ксилолу и монтирани са DPX (Sigma-Aldrich, Co., USA). Негативне контроле добијене су заменом примарног антитела за PBS. Као резултат добијене су браон обојене LH ћелије хипофизе (174, 175).

#### 3.3.2. Имунохистохемијско обележавање FSH ћелија хипофизе

FSH ћелије хипофизе обележаване су специфичним имунохистохемијским бојењем. Серијски пресеци хипофизе дебљине 3 $\mu\text{m}$  прво су депарифинисани и рехидрирани кроз опадајуће концентрације етанола (100% -70%) а затим испирани у дестилованој води. Након тога су ткивни пресеци испирани у фосфатном пуферу (PBS) у

трајању од 5 минута након чега је уследило блокирање ендogene пероксидазе у 0,3% водоник пероксиду ратвореном у метанолу у трајању од 15 минута. Ткивни пресеци су испирани у PBS-у у трајању од 5 минута, затим су инкубирани са нормалним свињским серумом (1:100) у трајању од сат времена на собној температури. Након тога пресеци су инкубирани са примарним антителима (1:300) (*National Institit of Healt, Bethesda, Md., USA*) и остављени преко ноћи на собној температури. Пресеци хипофизе испирани су у PBS- у 5 минута, након чега је уследила инкубација секундарним антителима у трајању од сат времена. Везујућа места на пресецима визуелизована су са 0,05% диаминобензидином (DAB; Serva, Heidelberg, Germany), након чега су пресеци хипофиза контрастирани хематокилином, рехидрирани у растућим концентрацијама алкохола (70%-100%), просветљени у ксилолу и монтирани са DPX (Sigma-Aldrich, Co., USA). Негативне контроле су добијене заменом примарног антитела за PBS. Као резултат добијене су браон обојене FSH ћелије хипофизе (174, 175).

### 3.3.3. Стереолошка и морфометријска анализа

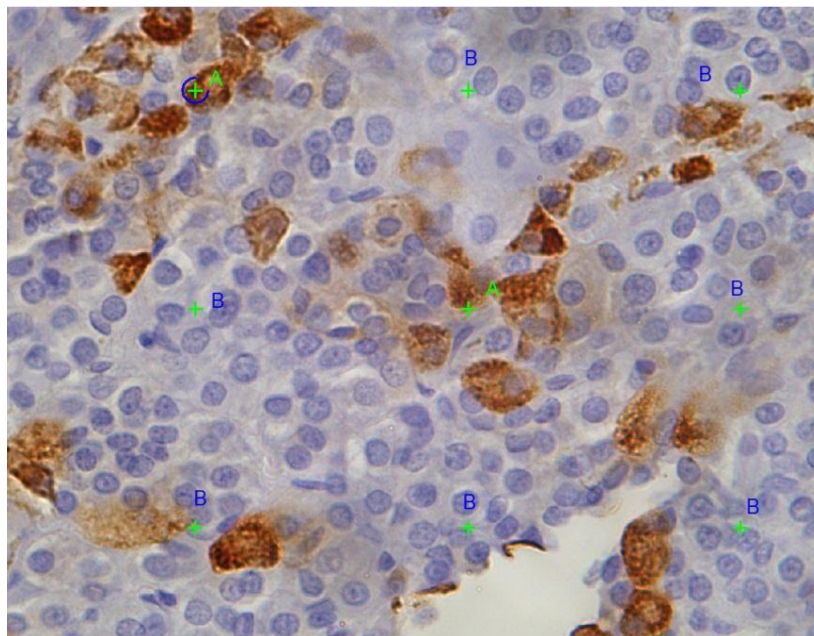
Стереолошком и морфометријском анализом хипофиза мужјака пацова, одређивана је волуменску густину LH и FSH ћелија хипофизе, као и број ћелија на  $\text{mm}^2$ . Анализа је рађена у стереолошком програму *newCAST* (*Vis-Visiopharm Integrator System, version 3.2.7.0. Visiopharm, Denmark*). За микроскоп (*Olympus BX-51, Olytpmus Europa GmbH, Germany*) је везана CCD видео камера (*PixLink*). За анализу коришћена су увеличања на објективу 40x, 400x и 630x.

### 3.3.4. Одређивање волуменске густине ћелија хипофизе

Волименска густина, односно процентуална заступљеност LH и/или FSH ћелија хипофизе у укупном волумену органа, израчунава се као количник између броја погодака на ћелију (LH и/или FSH) и укупног броја погодака на целој жлезди. Ова вредност се помножи са 100:

$$V_V = V_{\text{(погоди на ћелију)}} / V_{\text{(укупан број погодака)}} \times 100$$

Волуменска густина је релативна, бездимензиона стереолошка величина коју изражавамо у процентима.



Слика 3. На слици је приказан начин одређивања волуменске густине LH и/или FSH ћелија хипофизе. А- погоци на ћелије, Б- погоци ван ћелије.

### 3.3.5. Одређивање броја ћелија на $\text{mm}^2$

Број ћелија LH и FSH на  $\text{mm}^2$  израчунавали смо из одговарајуће формуле:

$$P_{(\text{маске})} \text{ mm}^2 : x = 1 \text{ mm}^2 : Br_{(\text{ћелија})}$$

При чему је:

$$P_{(\text{маске})} \text{ mm}^2 - \text{укупна површина пресека}$$

$Br_{(\text{ћелија})}$  – број ћелија избројан на укупној површини пресека

### 3.3.6. Имунофлуоресцентно обележавање LH и FSH ћелија хипофизе

За визуелизацију интеракције антиген-антитело коришћена је имунофлуоресцентна метода бојења. Након депарафинације у ксилолу и рехидратације у алкохолима, пресеци су испирани у фосфатном пуферу (PBS-у) у трајању од 5 минута. Након тога пресеци хипофиза инкубирани су у нормалном магарећем серуму (*Normal Donkey Serum, Sigma-Aldrich, Co., USA*) у трајању од 1 сата. Пресеке потом нисмо испирали, већ смо нанели



примарно антитело за LH (1:500) (*National Institit of Healt, Bethesda, Md., USA*) и FSH (1:300) (*National Institit of Healt, Bethesda, Md., USA*) ћелије хипофизе и оставили преко ноћи да се инкубирају на собној температури. Негативне контроле добијене су заменом примарног антитела за PBS. Следећег дана, пресеке смо испрали у PBS-у а након тога, смо их инкубирали секундарним антителом Alexa flour 488 (1:200) (*Donkey anti-Goat, Molecular Probes, Inc, USA*), које је обележено флуоросцентном бојом, у трајању од 2 сата. Уследило је испирање пресека у PBS-у у трајању од 1сата (10 x 5 мин) и монтирање покровних стакала са Moviol-ом 4-88 (*Sigma-Aldrich, Co., USA*).

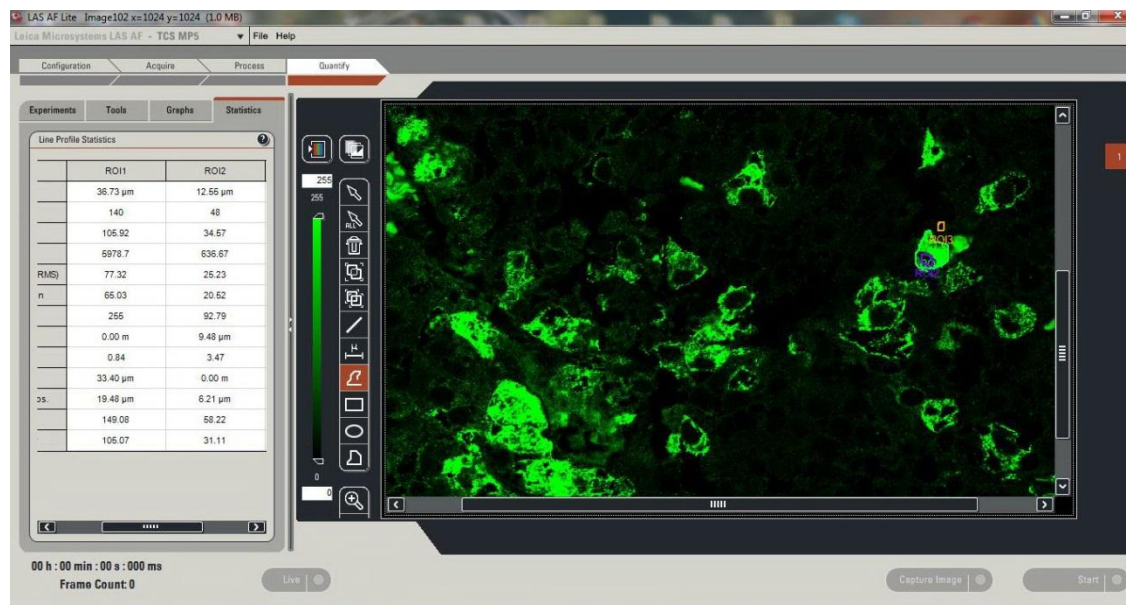
Препарати су анализирани и фотографисани на флуоросцентном микроскопу Zeiss Axiovert (*Carl Zeiss GmbH, Germany*) који је опремљен камером и EC Plan-Apochromat-ом и скенирајућег ласерског конфокалног микроскопа *Confocal Laser Scaning Microscope (CLSM)*, *Leica TCS SP5 II Basic (Leica Microsystems CMS GmbH, Germany)*. Флуоросцентна боја Alexa fluor 488 побуђује се на таласној дужини од 492 nm и уочава се на таласној дужини од 510 nm зеленог дела спектра.

### 3.3.7. Одређивање релативног интензитета флуоресценце

За одређивање интензитета флуоресцентног сигнала LH и FSH ћелија хипофизе перипуберталних и адултних мужјака пацова, користили смо конфокални ласерски скенирајући микроскоп *Confocal Laser Scaning Microscope (CLSM) Leica TSC SP5 II Basic (Leica Microsystems CMS GmbH, Germany)*. Релативни интензитет флуоресценце одређен је помоћу опције *Quantify LAS AF Lite* софтверског програма (*Leica Microsystems CMS GmbH, Germany*). Овај програм нам је омогућио да утврдимо интензитет флуоресценце у регионима од интереса. Приликом одређивања флуоросцентног сигнала, анализирали смо само ћелије у нивоу једра. Анализирали смо 100 ћелија са једром по животињи. Вредности интензитета флуоресценце израчунали смо по формули:

$$ROI = ROI_1 - \frac{(ROI_2 + ROI_3)}{2}$$

При чему је **ROI**- интегрисана густина, **ROI<sub>1</sub>**- површина анализиране ћелије, **ROI<sub>2</sub>**- површина једра и **ROI<sub>3</sub>**- вредност флуоресцентног сигнала позадине .



Слика 4. На слици је приказан начин одређивана имунофлуоресценног сигнала LH и FSH ћелија хипофизе.

### 3.4. Хистолошко бојење за тестис

#### 3.4.1. Морфометријска анализа тестиса

Морфометријском анализом одређивали смо дијаметар и површину семених каналића као и ширину интерстицијумског простора између семених каналића. Приликом квантификације узети су у обзир само перпендикуларни пресеци семених каналића док су из анализе искључени сви коси пресеци семених каналића. Добијени пресеци снимани су на микроскопу Olympus BX51 на увећању 100x, 200x и 400x. Анализа је вршена у програму за анализу слике Axiovision (Zeiss, USA), при чему је анализирано од 135 до 180 семених каналића по животињи. Површина интерстицијумског простора тестиса анализирана је у софтверском програму Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA). Резултати су представљени као проценти, при чему су вредности из контролних група обе старосне популације узимане као 100%. Поред тога за поређење између две старосне доби пацова, као контролне вредности узимане су вредности перипуберталних животиња (за сваку испитивану групу) и представљене су као 100%, док су вредности адултних животиња представљене као процентуални пораст или пад у односу на вредности перипубертални животиња.

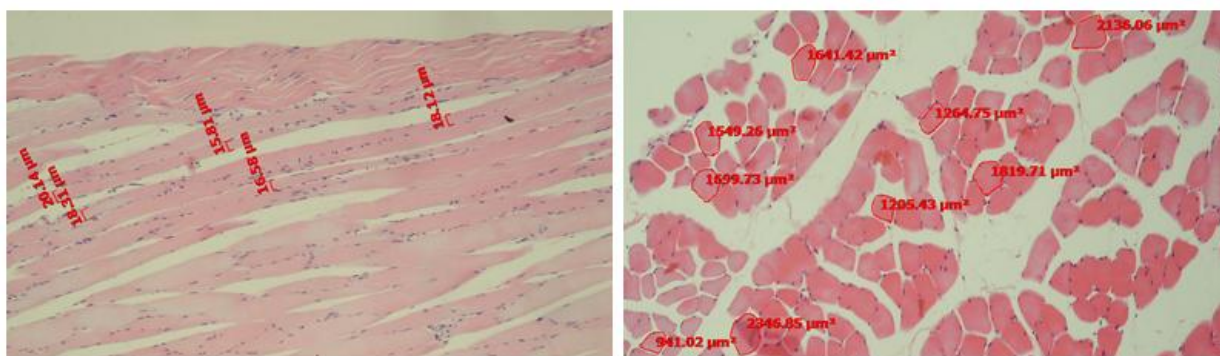
### 3.4.2. Обележавање андрогеног рецептора на тестису

За визуелизацију андрогеног рецептора на тестису користили смо специфично имунохистохемијско бојење. Пресеци тестиса дебљине 5  $\mu\text{m}$  прво су депарифинисани и рехидрирани кроз опадајуће концентрације етанола (100% -70%) а затим испирани у дестилованој води. Након тога ткивни пресеци су кувани у цитратном пуферу на  $\text{pH}=6$  на температури од 95°C у трајању од 20 минута. Уследило је хлађење узорака на собној температури у тајању од 15 минита. Узорци су испирани у текућој води у трајању 5 минута након чега уследило је блокирање ендogene пероксидазе у 0,3% водоник пероксиду раствореном у метанолу у трајању од 10 минута и испирање у PBS-у 5 минута. На пресеке смо накапали протеин блок (*Ultravision Protein Block, Thermo Scinetific, USA*) у трајању од 5 минута а након тога и примарно антитело (*Santa Cruz Biotechnology, USA*) у трајању од 30 минута. Пресеци тестиса испирани су у PBS-у (3x 5 минута) и инкубирани секундарним антителом (*Pirimary antibody amplifier Qvanto, Thermo Scientific, USA*) у трајању од 10 минута, испирани у PBS-у 5 минута након чега је додат HRP (*HRP Polymer Quanto*) у трајању од 10 минута, а након тога је уследило испираније у PBS-у 5 минута. Везујућа места на пресецима визуелизована су са 0,05% диаминобензидина (DAB; Serva, Heidelberg, Germany), након чега су пресеци тестиса контрастирани хематокилином, рехидрирани у растућим концентрацијама алкохола (70%-100%), просветљени у ксилолу и монтирани са DPX-ом (Sigma-Aldrich, Co., USA). Негативне контроле су добијене заменом примарног антитела за PBS. Као резултат добијени су браон обојени андрогени рецептори у ткиву тестиса.

### 3.5. Хистолошка бојања за скелетни мишић

За морфометријску анализу скелетног мишића користили смо стандардно хистолошко бојење Х/Е. Након депарафинизације у ксилолу и рехидратације у опадајућим концентрацијама алкохола (100%, 96% и 70%), пресеке смо бојили Мајер-овим хематоксилином у трајању од 5 минута, испрали у води а затим бојили еозином у трајању од 3 минута. Уследила је дехидратација у растућим концентрацијама алкохола (96% и 100%), просветљење у ксилолу и монтирање покровних стакала са DPX (Sigma-Aldrich, Co., USA). Добијени пресеци снимани су на микроскопу Olympus BX51 на увећању 400x. Добије слике анализирани су у програму за анализу слике Axiovision (Zeiss, USA).

Калибрисани софтвер је затим измерио површине слика које одговарају сваком специфичном морфолошком ентитету. Мерење мишићних ћелија квадрицепса вршена су на попречном пресеку и уздужном пресеку. Оба мерења изведена су на најмање 100 мишићних ћелија у сваком ткивном узорку, а просечне вредности су приказане у микрометрима или микрометрима на квадрат. Пречник лонгитудиналног пресека сваког мишићног влакна измерен је на три места и просечна вредност узета је у обзир као једна вредност (135).



Слика 5. Приказан је начин мерења дијаметра уздужног пресека скелетног мишићног влакна (лево) и површине попречног пресека скелетног мишићног влакна (десно).

### 3.5.1. Имунохемијско обележавање везивног ткива - колагена (Masson trichrome бојење)

Масон трихроматско бојење (*Masson trichrome*) је метода коју користимо када постоји потреба за разликовањем ћелија од везивног ткива. Поступак укључује депарафинизацију и рехидрацију ткива (100% - 70% етанол), испирање у дестилованој води, након чега је уследила 5-о минутна инкубација у Weigert-овом (Weigert's) хематоксилину. Након испирања у води, пресеци ткива се инкубирају у смеси 1% киселог фуксина и 1% ронсеау dexylidine у односу (1:2) у трајању од 5 минута. Уследило је вишеструко испирање ткивних пресека у дестилованој води а затим су пресеци инкубирани у 0,05% фосфомолибденској киселини у трајању од 10 минута. На крају се ткивни пресеци инкубирају у 2,5% анилин плавом у трајању од 3 минута. Пресеци се испрају неколико пута у дестилованој води, након чега следи дехидратација кроз алкохоле (96%, 100%), просветљени у ксилолу и монтирани са DPX-ом (Sigma-Aldrich, Co., USA).

Резултат бојења је тамно смеђа до црно обојена једра, цитоплазма је црвене боје и плава боја колагена. Добијени пресеци снимани су на микроскопу Olympus BX51 на увеличању 400x. Добијене слике анализирани су у софтверском програму Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) (176).

### **3.5.2. Имунохистохемијско обележавање васкуларног ендотелијалног фактора раста (VEGF)**

Васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF) обележен је имунохистохемијским бојењем. Пресеци дебљине 5  $\mu\text{m}$  су депарафинизовани у ксилолу, дехидрирани кроз опадајуће концентрације алкохола (100% - 70%), испрани у дестилованој води. Након тога је уследило демаскирање антигена у микроталасној пећници високог капацитета (750 W) током 8 мин., кувањем узорака у 0,1 М цитратном пуферу, при концентрацији РН 6.0. Затим су извађене плочице са пресецима, испране у PBS-у, потом су пресеци инкубирани у 0,3% водоник пероксиду раствореном у метанолу током 15 минута на собној температури, у циљу блокирања активности ендogene пероксидазе. Пресеци су затим третирани разблаженим нормалним свињским серумом (1:50) (DAKO, Glostrup, Denmark) у трајању од сат времена а након тога су инкубирани са поликлоналним примарним антителима против VEGF-a (1:100, abcam<sup>®</sup>, ab46154, Lot No. GR247559-1; Cambridge, MA, USA) преко ноћи на собној температури. Након испирања у PBS-у, пресеци су инкубирани помоћу поликлоналног свињског имуноглобулина против зечева/HRP- антитета коњугованог са афинитетом, антитета коњугована са пероксидазом (Code No. P0399, Lot No. 20011615; DAKO, Glostrup, Denmark) разблажена у PBS (1: 100) током сат времена на собној температури. Везујућа места на пресецима визуелизована су са 0,05% диаминобензидина (DAB; Serva, Heidelberg, Germany), након чега су пресеци контрастирани хематокилином, рехидрирани у растућим концентрацијама алкохола (70%-100%), просветљени у ксилолу и монтирани са DPX (Sigma-Aldrich, Co., USA). Негативне контроле добијене су заменом примарног антитета са PBS. Добијени пресеци снимани су на микроскопу Olympus BX51 на увеличању 400x. Добијене слике анализирани су у програму Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) (176).

### **3.5.3. Хистохемијско бојење за визуелизацију васкуларног ткивног профила (Novelli)**

Novelli је хистохемијска метода која се користи за визуелизацију васкуларног ткивног профила. Након депарафинизације и рехидрације у опадајућим концентрацијама алкола (100% - 70%) ткивни пресеци су инкубирани у топлом 1NНCl на температури од 60°C у трајању од 3 минута. Након тога су инкубирани у 1% киселом фуксину у трајању од 30 секунди и 1% светлом зеленој боји у трајању од 30 секунди. Пресеци су затим испрани у дестилованој води, дехидрирани у растућим концентрацијама алкохола (96%-100%), просветљени у ксилолу и монтирани са DPX-ом. Као резултат, добијени су љубичасто обојени еритроцити који су јасно видљиви на светло зеленој позадини (170). Добијени пресеци снимани су на микроскопу Olympus BX51 на увећању 400x. Добијене слике анализирани су у програму Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) (176).

### **3.6. Хистолошко бојење за масно ткиво**

За морфометријску анализу масног ткива користили смо стандардно хистолошко бојење Х/Е (методологија описана горе у тексту). Добијени пресеци снимани су на микроскопу Olympus BX51 на увећању 400x. Добијене слике анализирани су у програму Adiposoft – Image J (CIMA, University of Navarra, USA).

## **3.7. Биохемијске анализе**

Биохемијске анализе одређиване су из узорак серума, плазме и еритроцита. Из узорак серума одређиване су вредности хормона тестостерона, лутеинизирајућег (LH), фоликулостимулирајућег (FSH), инсулина и лептина док су из узорак плазме одређиване вредности маркера оксидативног стреса ( $\text{NO}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ , TBARS,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Из лизата еритроцита одређиване су вредности антиоксидативних ензима (CAT, SOD, GSH).

### **3.7.1. Одређивање концентрације фоликулостимулишућег хормона (FSH) у серуму**

Концентрација фоликулостимулишућег хормона (FSH) у серуму одређена је коришћењем комерцијално доступног пацовског сендрвич ELISA есеја (Elabscience ELISA кит, Кина). За микротитарску плочу везана су моноклонска антитела специфична за FSH. Апсорбанца је мерена на таласној дужини од 450 nm на ELISA читачу (Multiskan Spectrum,

Thermo Electron Corporation, Finland). Концентрација FSH у серуму изражавана је у ng/ml. Мерни опсег изражаван је у опсегу од 3.13-200 ng/ml.

### **3.7.2. Одређивање концентрације фоликулостимулишућег хормона (LH) у серуму**

Концентрација лутеинизирајућег хормона (LH) одређена је коришћењем комерцијално доступног пацовског сендрвич ELISA есеја (Elabscience ELISA кит, Кина). За микротитарску плочу везана су моноклонска антитела специфична за LH. Апсорбанца је мерена на таласној дужини од 450 nm на ELISA читачу (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finland). Концентрација LH у серуму изражавана је у mIU/ml. Мерни опсег изражаван је у опсегу од 1.56-100 mIU/ml.

### **3.7.3. Одређивање концентрације тестостерона у серуму**

Концентрација тестостерона у серуму одређена је коришћењем комерцијално доступног хуманог електрохемилуминисцентног имуно есеја ECLIA (Elecsys Testosterone II, Cobas, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) на апарату Elecsys 2010. Концентрација тестостерона у серуму изражавана је у nmol/L. Мерни опсег изражаван је у опсегу од 0.087-52 nmol/L.

### **3.7.4. Одређивање концентрације лептина у серуму**

Концентрација лептина у серуму одређена је коришћењем комерцијално доступног пацовског сендрвич ELISA есеја (EZRL-83K, EMD Milipore, Darmstadt, Germany). За микротитарску плочу везана су моноклонска антитела специфична за лептин. Стандарди познатих концентрација и узорци серума непознате концентрације лептина инкубирани су са моноклонским анти-лептинским антителом. Интензитет боје био је директно пропорционалан концентрацији лептина у узорцима серума. Апсорбанца је мерена на таласној дужини од 450 nm на ELISA читачу (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finland). Концентрација лептина у серуму изражавана је у ng/mL. Мерни опсег је од 0.2-30 ng/mL. Прецизност теста је од 100-122%.

### 3.7.5. Одређивање концентрације инсулина у серуму

Концентрација инсулина у серуму одређена је коришћењем комерцијално доступног хуманог електрохемилуминисцентног имуно есеја ECLIA (Инсулин-каталошки број: 12017547122, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) на апарату Elecsys 2010. Концентрација инсулина у серуму изражавана је у  $\mu\text{U/mL}$ . Мерни опсег изражаван је у опсегу од 0.2-1000  $\mu\text{U/mL}$

### 3.7.6. Одређивање концентрације глукозе у крви

Непосредно пре жртвовања животиње, вршена је пункција репне вене како би одредили вредност гликемије. Кап крви узета из репне вене накапана је на трачице за одређивање вредности глукозе и помоћу гликометра (ACCU-CHEK *Advantage*, Roche Diagnostics) одређена је вредности гликемије. Вредности су изражене у  $\text{nmol/l}$ .

## 3.8. Редокс статус

### 3.8.1. Одређивање вредности индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, један од маркера оксидативног стреса, одређује се преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА). За одређивање концентрације TBARS у плазми врши се специфична екстракција по следећем протоколу: у *Eppendorf* епрувете пиретира се 0.4 ml 28 % TCA и 0.4 ml плазме. Добијени узорци инкубирају се у хладном купатилу на температури од  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  у трајању од 10 минута. Након инкубације узорци се центрифугирају 10 минута на 15000  $\text{rpm}$ , да би се након центрифугирања добила одређена количина супернатанта (177).

У епрувете пипетира се 400  $\mu\text{l}$  супернатанта плазме и 100  $\mu\text{l}$  1% ТВА и 0.05 M NaOH. Као слепа проба уместо екстракта плазме користи се еквивалентна количина дестиловане воде. Узорци се инкубирају у воденом купатилу 15 минута на температури од  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Након инкубације, узорци се оставе 10 мин на собној температури да се охладе, након чега се приступа мерењу, спектрофотометријски, на таласној дужини од  $\lambda = 530\text{ nm}$ .



Концентрација ослобођених TBARS добија се на основу једначине

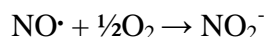
$$\text{nmol TBARS/ml плазме} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1.56 \times 1.25$$

при чему је  $A_u$  апсорбанца узорка, док је  $A_{sp}$  апсорбанца слепе пробе, док су 1.56 и 1.25 корекциони фактори за овај есеј.

### 3.8.2. Одређивање вредности нитрита ( $\text{NO}_2^-$ )

Одређивање концентрације нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у плазми врши се према следећем протоколу: у *Eppendorf* епрувете пипетира се 0.1 ml 3 M PCA, 0.4 ml 20 mM EDTA и 0.2 ml плазме. Овако добијени узорци инкубирају се у хладном курадилу на температури од  $-4^\circ\text{C}$  у трајању од 10 минута. Након инкубације, узорци се центрифугурају 10 минута на 15000 грм. Тако добијени супернатант се одлива, а након тога у добијени преципита се додаје 2 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  до  $\text{pH} = 7.4$ .

У тако добијеним узорцима екстракта плазме одређује се концентрација ослобођених нитрита спектрофотометријском реакцијом уз употребу Griess-овог реагенса (178). С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником:



ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита представља количину ослобођеног  $\text{NO} \cdot$ .

Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине, растворене у 5 % орто-фосфорној киселини (може се чувати на собној температури) и 0.1 % воденог раствора: N-(1-нафтил)-етиленамина дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на  $4^\circ\text{C}$ , због своје високе фотохемијске реактивности.

У епрувете пипетира се 0.1 ml екстракта плазме, 250  $\mu\text{l}$  свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125  $\mu\text{l}$  амонијачног пуфера ( $\text{pH} = 9.0$ ), кога сачињавају амонијум хлорид ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) и натријум тетраборат ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ). Амонијачни пуфер, који се у току припреме мора загревати, због изузетно слабе растворљивости натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба екстракта плазме користи се дестилована

вода. Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређује се на основу калибрационе криве. Калибрациона крива конструише се на основу екстинкција узорака, који у себи садрже познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са Griess-овим реагенсом у присуству пуфера. Добија се пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO<sub>2</sub> у 1 ml дестиловане воде и то: 3, 6, 12, 24μl, чиме се добија одређена концентрација нитрита. Након стабилизације боје на собној температури 5 - 10 минута приступа се спектофотометријском мерењу ослобођених нитрита на таласној дужини од λ = 550nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита, добија се на основу одређивања стандардног фактора (F):

$$F = \frac{\text{Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе}}{\text{Концентрација NaNO}_2 \text{ у стандарду}}$$

за сваки појединачни стандард (F1 - F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине. Затим се разлика екстинкција узорка и слепе пробе подели са стандардом (F):

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml екстракта} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F.$$

### 3.8.3. Одређиване вредности супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Метода за одређивање концентрације супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) у плазми заснива се на реакцији O<sub>2</sub><sup>-</sup> са нитро тетразолијум плавим (Nitro Blue Tetrazolium - NBT) до нитроформазан плавог (179). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције λ<sub>max</sub>=550 nm. Есејна смеша ("assay mixture") садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH = 8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете пипетира се 50 μl плазме и 950 μl есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо узорка плазме користи се адекватна количина дестиловане воде. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E<sub>1</sub>. Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближно исте екстинкције. Последња екстинкција се означава као E<sub>2</sub>. Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

Концентрација ослобођеног O<sub>2</sub><sup>-</sup> добија се на основу следећих једначина:

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol O}_2^-/\text{ml плазме} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05$$

### 3.8.4. Одређивање вредности водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Одређивање количине водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) заснива се на оксидацији фенол-црвеног помоћу водоник пероксида, реакцијом која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (Horse Radish Peroxidase – HRPO) (180).

У епрувете се пипетира 200  $\mu$ l плазме и 800  $\mu$ l свеже направљеног раствора фенол-црвеног (Phenol Red Solution – PRS) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH = 7), 5.5 mM D(+)-глукозе и 0.28 mM фенол-црвеног. Затим се узорцима дода 10  $\mu$ l (1:20) HRPO, који је припремљен *ex tempore*. Узорци се остављају на собној температури 10 минута, након чега се приступа спектофотометријском мерењу на таласној дужини од 610 nm. За слепу пробу уместо узорка плазме користи се адекватна количина дестиловане воде.

Концентрација ослобођеног H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у венској крви израчунава се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни (Stock) раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, уз претходну проверу концентрације (A<sub>230</sub> за 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> износи 0.810). У три епрувете пипетира се, уместо плазме, 5, 10 и 20 ml 1 mM раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 200 ml дестиловане воде, 800 ml раствора фенол-црвеног и 10 ml (1 : 20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подеси се pH > 12, помоћу 1M NaOH (10ml).

Концентрација, а затим и количина ослобођеног H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у венском ефлуенту израчунава се на основу фактора апсорбанце (F)/nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

$$F = \frac{\Delta A}{\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{cuv}}$$

На основу апсорбанце узорка (A<sub>u</sub>) на  $\lambda_{\text{max}} = 610\text{nm}$  и њеног упоређивања са слепом пробом (A<sub>sp</sub>) израчунава се финална апсорбанца (DA) (A = A<sub>u</sub> - A<sub>sp</sub>). Помоћу овако

добијене апсорбанце, фактора F и количине венског ефлуента употребљеног у есеју (200 ml) израчунава се концентрација и количина H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у плазми по формули:

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{ml плазме} = \Delta A / F$$

### 3.8.5. Одређивање вредности каталазе (CAT)

Активност каталазе у лизату еритроцита одређује се методом по *Beutler*-у (175). Ова метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на таласној дужини од 360 nm. Метода се заснива на растварању лизата еритроцита дестилованом водом у односу 1:7. Након тога, уз додатак етанола у односу 0,6:1 приступа се даљој процедури. 50 µl CAT буфера, 100 µl узорка и 1 ml 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> су пипетирани у епрувету а затим се приступа спектрометријском мерењу. (181).

### 3.8.6. Одређивање вредности супероксид дизмутазе (SOD)

Одређивање активности супероксид дизмутазе (SOD), у лизату еритроцита, врши се адреналинском методом. Ово је метода "негативног" типа, јер се прати смањење брзине аутооксидације адреналина у алкалној средини, која је зависна од O<sub>2</sub><sup>-</sup>. (176). Метода којом се мери концентрације супероксид дизмутазе се заснива на епинефрин-методи по *Beutler*-у. Спајањем 100 µl лизата еритроцита и 1 ml C-буфера отпочиње реакција која се прекида додавањем епинефрина а одређивање концентрације супероксид дизмутазе врши се спектрофотометријски на таласној дужини од 470nm (182).

### 3.8.7. Одређивање вредности редукованог глутатиона (GSH)

Ниво редукованог глутатиона (GSH) у лизату еритроцита одређује се спектрофотометријски по методи *Beutler*-а (183,184), а заснива се на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5–дитио-бис-6,2-нитробензевом киселином (DTNB). GSH се екстрахује тако што се у 0.1 ml 0.1 %EDTA дода 0.4 ml плазме и 0.75 ml раствора за преципитацију (1.67 g метафосфорне киселине, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl, допунити до 100 ml дестилованом водом; раствор је стабилан 3 недеље на +4 °C). После мешања на Vortex-

мешалици, смеша се екстрахује 15 минута на леду и центрифугира 10 минута на 4000 грм. Мерење се врши у кварцним киветама запремине 1 ml. У епрувете (12 x 100) пипетира се 300  $\mu$ l лизата еритроцита, 750  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и 100  $\mu$ l DTNB (1 mg DTNB/ml 1 % натријум цитрата). Као слепа проба користи се дестилована вода.

Количина редукованог глутатиона у лизату еритроцита одређује се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни редукованог глутатиона. У епрувете се пипетира (уместо лизата еритроцита) 15, 30, 45 и 60  $\mu$ l 1 mM раствора GSH, 300  $\mu$ l дестиловане воде. Тако се одреди концентрација нитрита у узорцима стандарда (nmol/GSH/ml). Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ .

### 3.8.8. Одрђивање маркера оксидативног стреса у ткиву тестиса

У хомогенату тестиса одређени су маркери оксидативног стреса. Након изоволовања, тестис је прво испран хладним физиолошким раствором (0,9% NaCl). Након испирања, ткиво је измерено и приступило се припреми ткива за хомогенизацију при чему је прво направљен однос ткива и одговарајућег пуфера и то у односу од 0.5 mg свежег ткива наспрам 3 ml фосфатног пуфера (PBS-*Phosphate Buffered Saline* (0.2 M PBS при pH-7.4-7.6)). Ткивни хомогенат тестиса центрифугиран је на хладној центрифуги при броју обртаја од 12000 G на температури од 4°C у трајању од 15 минута. Из издвојеног супернатанта одређена је вредност TBARS-а,  $\text{NO}_2$ -а, CAT-е, SOD-а, GSH-а. Методологија за одређивање ових параметара предходно је описана.

### 3.9. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата коришћен је статистички програм SPSS 20.0 for Windows. Од метода аналитичке статистике за поређење нумеричких обележја посматрања између две групе користиће се т-тест у случају нормалне расподеле података, или Mann-Whitney тест у случају расподеле података различите од нормалне. За поређење

просечних вредности параметарских обележја користиће се анализа вариансе (ANOVA) као и непараметарска варијанта теста по Kruskal-Wallis у зависности од расподеле података. Сви добијени резултати приказани су табеларно и/или графички. Вредност  $p < 0,05$  сматраће се статистички значајном, вредност  $p < 0,01$  високо значајном.

**4.**

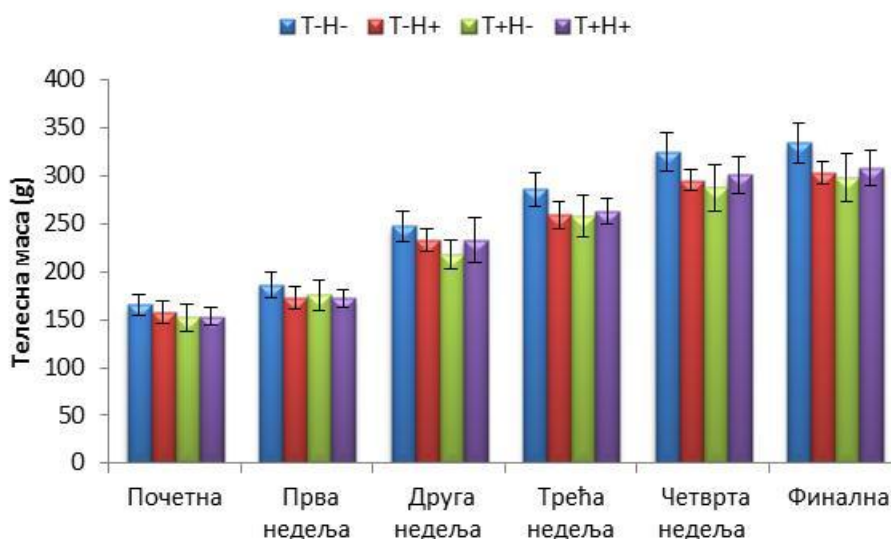
**Результати**

#### 4.1. Телесна маса

Телесна маса перипуберталних и адултних мужјака пацова након хроничне примене нандролон деканоата и тренинга пливањем праћена је по недељама. Прво мерење телесне масе било је у недељи адаптације, друго мерење вршили смо у првој експерименталној недељи, треће мерење у другој експерименталној недељи, четврто мерење у трећој експерименталној недељи, пето мерење вршено у четвртој експерименталној недељи док је последње мерење телесне масе животиња било у моменту жртвовања животиња.

##### 4.1.1. Утицај примена нандролон деканоата самостално и у комбинацији са тренингом на телесну масу перипуберталних животиња

Морфометријске карактеристике телесне масе перипуберталних животиња пре, током и након завршеног четворонедељног експерименталног процеса приказане су на графиконима 1, 2 и 3 и табели 4.



Графикон 1. Просечна телесна маса перипуберталних животиња праћена по недељама током четворонедељног експерименталног процеса (резултати су представљени као средње вредности и стандардне девијације (SD)).

Праћењем телесне масе током четворонедељног третмана нандролон деканоатом и тренингом пливањем, код перипуберталних животиња, приметили смо да је највећи

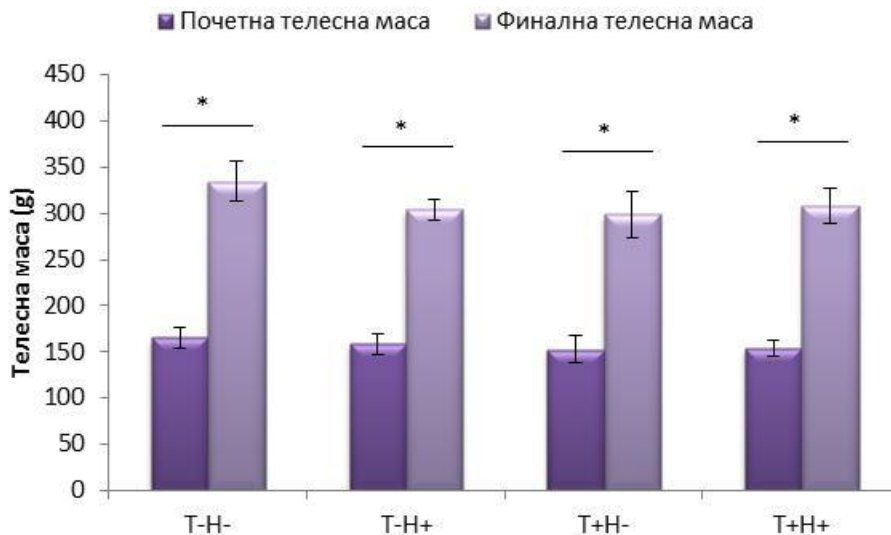


пораст телесне масе био у контролној групи а најмањи у групи која је тренирала пливање (графикон 1).

Табела 4. Процентуални пораст телесне масе перипуберталних животиња по недељама током трајања експериментаног процеса.

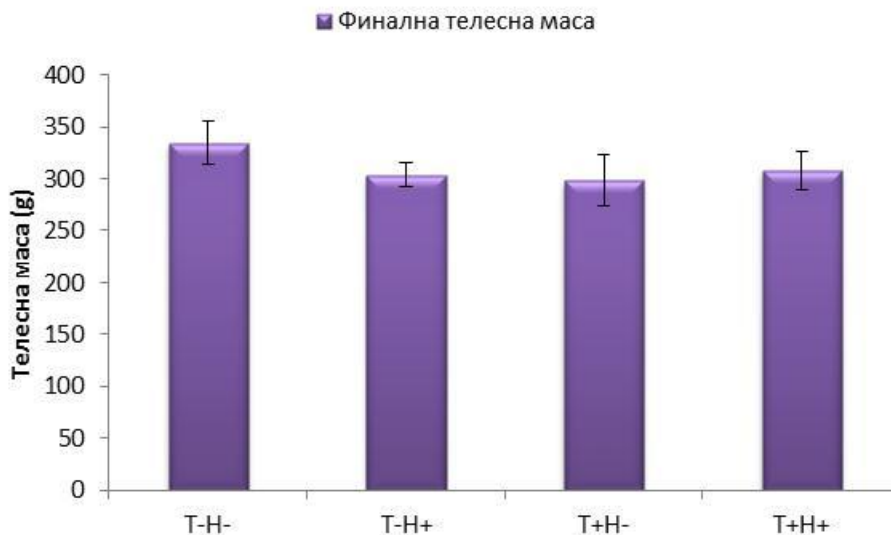
Групе	Прва недеља vs Почетна телесна маса %	Друга недеља vs Прва недеља %	Трећа недеља vs Друга недеља %	Четврта недеља vs Трећа недеља %	Финална телесна маса vs Четврта недеља %
Т-Н-	12.72	32.79	15.79	13.63	2.77
Т-Н+	9.49	34.68	11.15	13.9	2.71
Т+Н-	15.78	32.38	10.72	11.62	3.47
Т+Н+	12.42	35.46	12.87	14.44	2.32

Као што можемо видети у табели 4, у свим експерименталним групама, највећи пораст телесне масе био је у другој експерименталној недељи. У трећој експерименталној недељи највећи пораст телесне масе био је у контролној групи а најмањи у групи која је самостално тренирала пливање. У четвртој експерименталној недељи највећи пораст телесне масе био је у Т+Н+ групи док је најмањи пораст телесне масе примећен у Т+Н- групи. Поређењем телесне масе у оквиру сваке експерименталне недеље, у свим групама дошло је до значајног пораста телесне масе ( $p < 0.05$ ), једино између финалне масе и телесне масе у току четврте експерименталне недеље не постоји статистички значајан пораст телесне масе ( $p > 0.05$ ).



Графикон 2. Почетна и финална телесна маса перипуберталних животиња након четворонедељног експерименталног процеса (резултати су представљени као средње вредности и стандардне девијације (SD)).

Поређењем почетних и крајњих вредности телесне масе код перипуберталних животиња, установљен је статистички значајан пораст телесне масе у свим експерименталним групама (графикон 2). У контролној групи пораст телесне масе био је 102% ( $p < 0.05$ ), у групи која је самостално добијала нандролон пораст телесне масе био је 91 % ( $p < 0.05$ ), у групи која је тренирала пливање пораст је био 96% ( $p < 0.05$ ) а у групи које је и добијала нандролон и плувала, пораст је износио 101% ( $p < 0.05$ ).

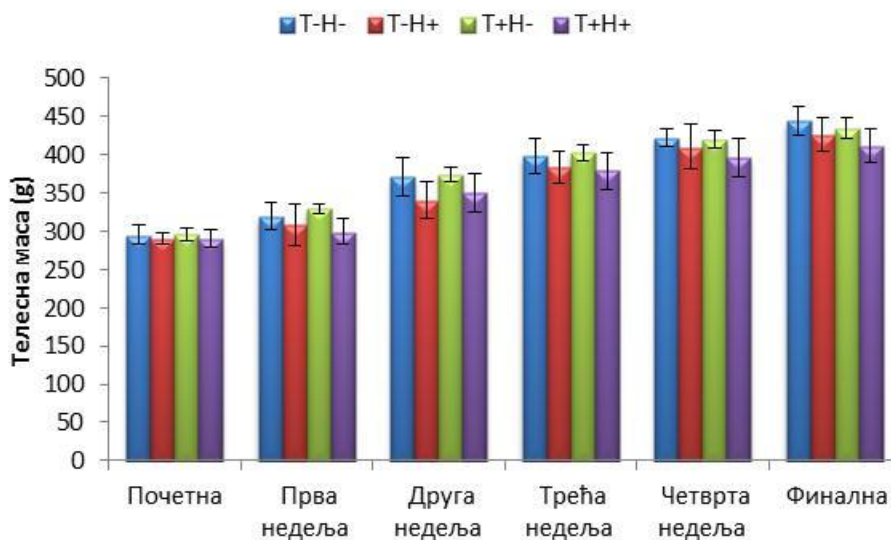


Графикон 3. Финална маса перипуберталних животиња након четворонедељног експерименталног процеса (резултати су представљени као средње вредности и стандардне девијације (SD)).

Када посматрамо само вредности финалне телесне масе након завршеног експерименталног протокола, у свим експерименталним групама дошло је до смањења телесне масе перипуберталних животиња у односу на контролну групу ( $p > 0.05$ ). Самостално примењен нандролон деканоат смањио је телесну масу за 5 % ( $p > 0.05$ ), тренинг пливањем за 9 % ( $p > 0.05$ ) док је удружена примена нандролон деканоата и тренинга пливањем довела до смањења телесне масе за 8 % ( $p > 0.05$ ) у односу на контролну групу (графикон 3).

#### 4.1.2. Утицај примена нандролон деканоата и тренинга на телесну масу адултних животиња

Морфометријске карактеристике телесне масе адултних мужјака пре, током и након завршеног четворонедељног експерименталног процеса приказане су на графиконима 4, 5 и 6 и у табели 5.



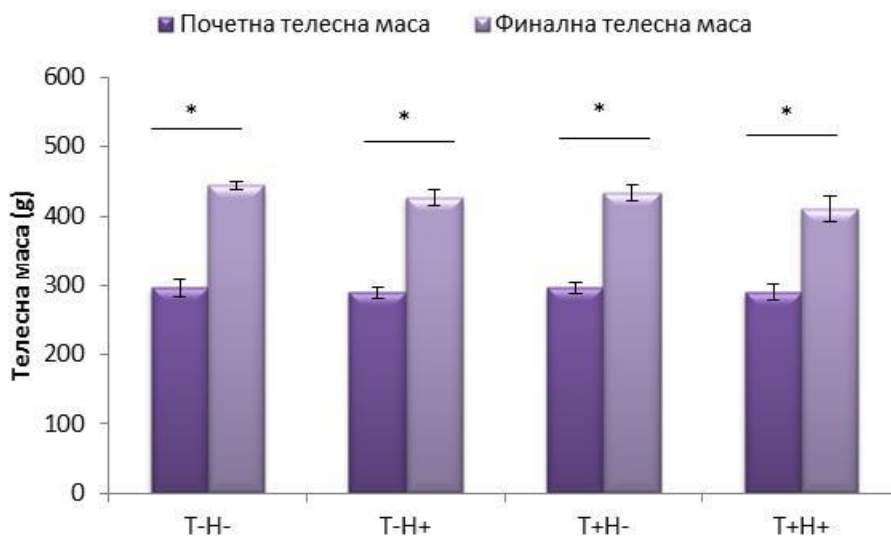
Графикон 4. Просечна телесна маса адултих животиња по недељама током четворонедељног експерименталног процеса (резултати су представљени као средње вредности и стандардне девијације (SD)).

Код адултих мужјака пацова, највећи пораст телесне масе био је у контролној групи а најмањи у групи која је тренирала пливање и добијала нандролон деканоат. У првој експерименталној недељи, највећи пораст телесне масе био је у групи која је тренирала пливање. У другој експерименталној недељи, као и у трећој и четвртој, највећи пораст телесне масе био је у T-H- и T+N- групама. У моменту жртвовања, највећи пораст телесне масе био је у контролној групи а најмањи у T+N+ групи (Графикон 4).

Табела 5. Процентуални пораст телесне масе адултних животиња по недељама током трајања експериментаног протокола.

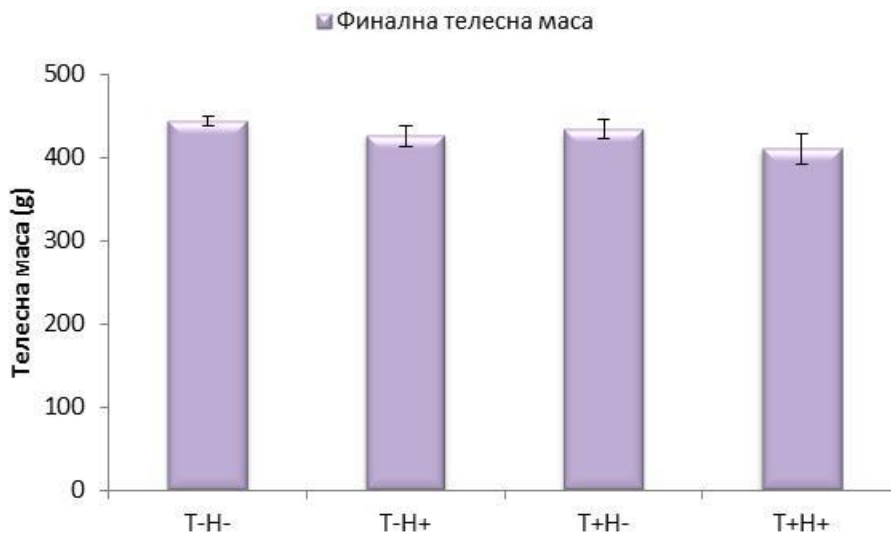
Групе	Прва недеља vs Почетна телесна маса %	Друга недеља vs Прва недеља %	Трећа недеља vs Друга недеља %	Четврта недеља vs Трећа недеља %	Финална телесна маса vs Четврта недеља %
<b>T-N-</b>	<b>10.91</b>	<b>17.77</b>	<b>7.0</b>	<b>5.8</b>	<b>3.33</b>
<b>T-N+</b>	<b>6.38</b>	<b>12.67</b>	<b>13.60</b>	<b>6.78</b>	<b>2.68</b>
<b>T+N-</b>	<b>12.41</b>	<b>11.64</b>	<b>7.75</b>	<b>4.71</b>	<b>2.37</b>
<b>T+N+</b>	<b>7.3</b>	<b>19.04</b>	<b>8.28</b>	<b>4.74</b>	<b>3.52</b>

Код адултних мужјака, највећи процентуални пораст телесне масе био је у периоду између прве и друге експерименталне недеље у T+N+ групи, док је најмањи пораст био у T+N- групи. Током периода између друге и треће експерименталне недеље, највећи пораст био је у T-N+ групи а најмањи у T-N- групи. Између четврте и треће експерименталне недеље, највећи пораст телесне масе био је у T-N+ групи док је најмањи пораст био у T+N- групи. Поређењем финалне телесне масе са масом животиња у четвртој експерименталној недељи, најмањи пораст телесне масе био је у T+N- групи а највећи у T+N+ групи (Табела 5).



Графикон 5. Почетна и финална телесна маса адултих животиња након четворонедељног експерименталног процеса (резултати су представљени као средње вредности и стандардне девијације (SD)).

Анализирајући почетне и крајње вредности телесне масе код адултих мужјака пацова, примећен је статистички значајан пораст телесне масе. Пораст телесне масе у контролној групи био је 53% ( $p > 0.05$ ), у групи која је самостално добијала нандролон 46% ( $p > 0.05$ ), трениг пливањем довео је до пораста за 44% ( $p > 0.05$ ) а код комбиноване примена нандролон декакоанта и тренинга пливањем пораст је био 50% ( $p > 0.05$ ) (Графикон 5).



Графикон 6. Финална маса адултих животиња након четворонедељног експерименталног процеса (резултати су представљени као средње вредности и стандардне девијације (SD)).

Посматрајући само финалне вредности телесне масе код адултих мужјака, у сви експерименталним групама, дошло је до смањења телесне масе у односу на контролну групу. Самостално примењен нандролон деканоат довео је до смањења телесне масе за 9 % ( $p > 0.05$ ), тренинг пливањем за 5 % ( $p > 0.05$ ) а тренинг пливањем у комбинацији са нандролоном за 6 % ( $p > 0.05$ ) (Графикон 6).

Табела 6. Упоредни процентуални пораст телесне масе перипуберталних и адултних животиња од момента уласка животиња у експеримент па све до његовог завршетка.

Групе	Финална телесна маса vs Почетна телесна маса Перипубертални %	Финална телесна маса vs Почетна телесна маса Адултни %
T-N-	102	53
T-N+	91	46
T+N-	96	44
T+N+	101	50

Као што можемо видети из табеле 6, процентуални пораст телесне масе, након завршеног четворонедељног експерименталног протокола у свим групама, код перипуберталних мужјака био је готово дупло већи у односу на вредности телесне масе код адултних мужјака.

## 4.2. Хипофиза

### 4.2.1 Промене у хипофизи перипуберталних и адултних мужјака пацова након хроничне апликације нандролон деканоата и тренинга пливањем

Маса хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова одређивана је након хроничне апликације нандролон деканоата и тренинга пливањем самостално или њихове удружене примене. Резултати су представљени у табелама 7 и 8.



Табела 7. Средње вредности телесне масе перипуберталних животиња, апсолутна маса хипофиза и релативан однос између масе хипофиза и телесне масе животиња (резултати су представљени као средње вредности и стандардне девијације (SD)).

Групе	Телесна маса g	Апсолутна маса хипофизе mg	Релативна маса хипофизе (mg%)
T-N-	334.71 ± 21.25	7.66 ± 0.53	2.28 ± 0.06
T-N+	303.57 ± 11.16	7.34 ± 0.63	2.41 ± 0.13
T+N-	298.37 ± 24.76	8.37 ± 0.55	2.81 ± 0.09
T+N+	308.12 ± 18.52	8.28 ± 0.90	2.68 ± 0.16

Самостална примена нандролоне довела је до смањења апсолутне масе хипофизе за 4.2% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. Самосталан тренинг пливањем као и у комбинацији са нандролон деканоатом, довео је до пораста масе хипофизе за 9% ( $p < 0.05$ ) и 8% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на контролну групу. Поређењем унутар експерименталних група, самосталан тренинг као и његова комбинација са нандролоном довела је до пораста апсолутне масе хипофизе за 14% ( $p < 0.05$ ) и 12% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на T-N+ групу. Тренинг пливањем довео је до повећања за 1% ( $p > 0.05$ ) у односу на T+N+ групу (Табела 7).

Релативана маса хипофизе код перипуберталних животиња, повећана је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. У T-N+ групи пораст је био 6% ( $p > 0.05$ ), у T+N- групи 28% ( $p < 0.05$ ) док је у T+N+ групи пораст био 17% ( $p < 0.05$ ) у односу на T-N- групу. Тренинг пливањем довео је до повећања релативне масе хипофизе за 17% ( $p < 0.05$ ) док је тренинг у комбинацији са нандролоном довео до повећања за 11% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон. Самосталан тренинг довео је до пораста за 5% ( $p > 0.05$ ) у односу на T+N+ групу (Табела 7).

Табела 8. Средње вредности телесне масе адултних животиња, апсолутна маса хипофиза и релативан однос између масе хипофиза и телесне масе животиња (резултати су представљени као средње вредности и стандардне девијације (SD)).

Групе	Телесна маса (g)	Апсолутна маса хипофизе (mg)	Релативна маса хипофизе (mg%)
T-N-	444.40 ± 5.36	9.15 ± 0.54	2.06 ± 0.11
T-N+	426.80 ± 22.33	8.60 ± 1.22	2.01 ± 0.22
T+N-	434.20 ± 11.48	9.63 ± 0.41	2.22 ± 0.12
T+N+	411.00 ± 31.50	9.69 ± 1.04	2.36 ± 0.16

Из табеле 8 можемо видети да је, код адултних мужјака пацова, самостална примена нандролон деканоата довела до смањења апсолутне масе хипофизе за 6% ( $p < 0.05$ ), док је тренинг пливањем повећао масу хипофизе за 5% ( $p < 0.05$ ) а тренинг у комбинацији са нандролоном довео је до повећања за 6% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну масу хипофизе. Тренинг самостално или у комбинацији са нандролоном деканоатом довео је до повећања апсолутне масе хипофизе за 12% ( $p < 0.05$ ) и 13% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на третман нандролон деканоатом. У T+N+ групи, пораст је био 0.6% ( $p < 0.05$ ) у односу на T+N- групу (Табела 8).

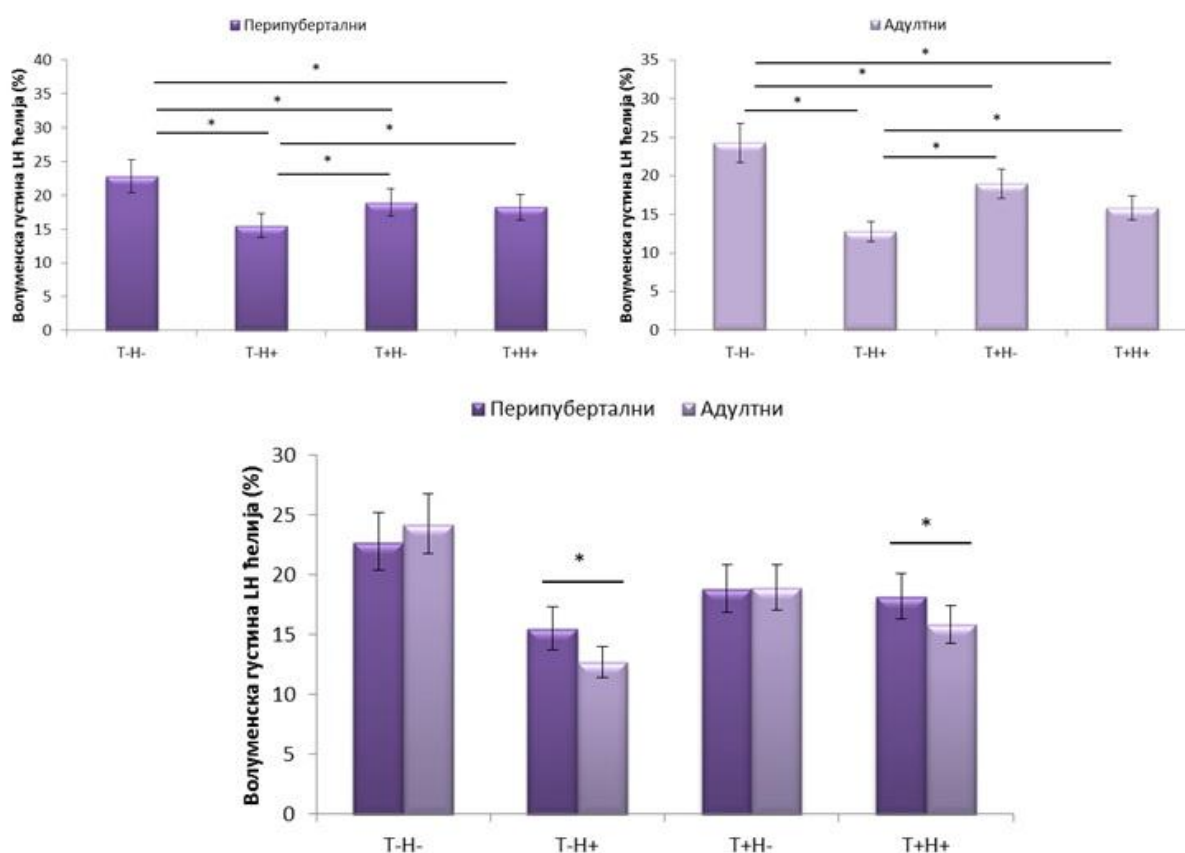
Релативна маса хипофизе код адултних мужјака, смањена је у T-N+ групи за 2.5% ( $p > 0.05$ ), док је у групама које су тренирале пливање самостално и у комбинацији са нандролон деканоатом релативна маса хипофизе повећана за 12% ( $p < 0.05$ ) и 15% ( $p < 0.05$ ) (редом) у поређењу са одговарајућим контролним вредностима. Тренинг самостално или у комбинацији са нандролоном довео је до повећања за 11% ( $p < 0.05$ ) и 13% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на самостално примењен нандролон. У T+N+ групи пораст релативне масе хипофизе био је 3% ( $p > 0.05$ ) у односу на T+N- групу (Табела 8).

## 4.2.2. Морфолошке, имунохистохемијске и имунофлуоресцентне карактеристике гонадотропних ћелија (LH и FSH) хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова

### 4.2.2.1. Лутеинизирајуће ћелије хипофизе – LH

#### 4.2.2.2 Волуменска густина LH ћелија хипофизе

Промене волуменске густине лутеинизирајућих ћелија хипофизе пратили смо након четворонедељне самосталне апликације нандролон деканоата и тренинга пливањем као и њихове удружене примене. Резултати су приказани на графикону бр. 7.



Графикон 7. Просечне вредности волуменске густине LH ћелија хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова, као и њихов међусобни однос у оквиру испитиваних старосних доби пацова (резултати су представљени као средње вредности  $\pm$ SD).

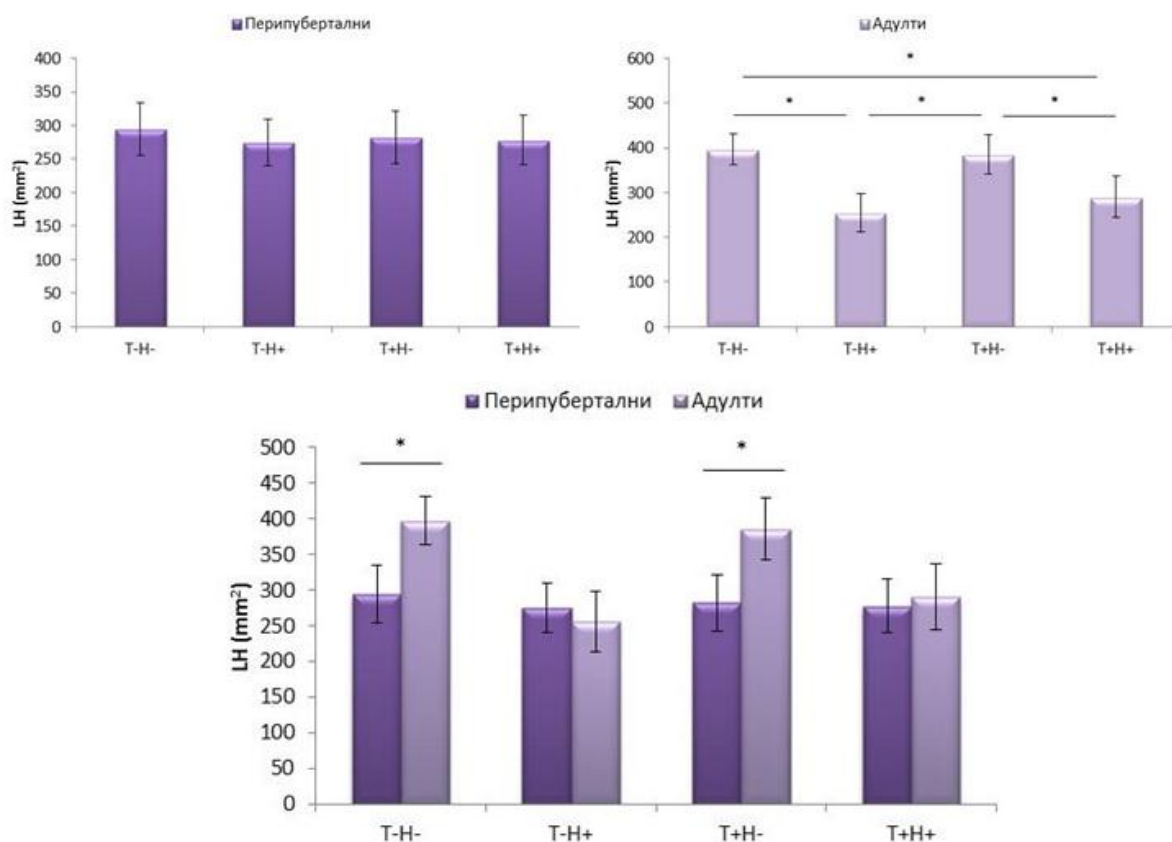
Волуменска густина ЛН ћелија хипофизе код перипуберталних животиња смањена је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. Смањење волуменске густине у Т-Н+ групи је 32% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н- групи је 18% ( $p < 0.05$ ) а у Т+Н+ групи је 20% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Тренинг пливањем као и његова комбинована примена са нандролоном, повећала је волуменску густину ЛН ћелија за 21% ( $p < 0.05$ ) и 17% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на самосталну примену нандролонa. У Т+Н+ групи дошло је до смањења за 4% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 7).

Код адултних животиња, волуменска густина је смањена у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. У Т-Н+ групи смањење је 48% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н- групи је 22% ( $p < 0.05$ ) док је у Т+Н+ групи смањење 35% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Поређењем унутар самих експерименталних група, у групама које су пливале самостално или у комбинацији са нандролон деканоатом дошло је до пораста волуменске густине ЛН ћелија за 49% ( $p < 0.05$ ) и 24% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на самостално примењен нандролон. Комбинована примена нандролон деканоата и тренинга довела је до смањења волуменске густине ЛН ћелија за 17% ( $p < 0.05$ ) у односу на тренинг пливањем (Графикон 7).

Посматрајући међусобни однос волуменске густине ЛН ћелија хипофизе између две испитиване старосне популације мужјака, у контролној групи дошло је до пораста волуменске густине за 6% ( $p > 0.05$ ) у адултној популацији испитиваних животиња у односу на перипуберталну популацију, у Т-Н+ групи вредност овог параметра смањена је за 18% ( $p < 0.05$ ) у адултној популацији у односу на перипуберталну популацију животиња. Тренинг пливањем није довео до значаје разлике у волуменској густини ЛН ћелија између две испитиване популације животиња, док је његова удружена примена са нандролон деканоатом смањила волуменску густину за 13% ( $p < 0.05$ ) у адулној популацији мужјака у односу на перипуберталну популацију испитиваних животиња (Графикон 7).

### 4.2.2.3. Број LH ћелија на $\text{mm}^2$

Број LH ћелија хипофизе на једном  $\text{mm}^2$  одређиван је код перипуберталних и адултних мужјака пацова након примене нандролон деканоата и тренинга пливањем. Промене броја ћелија приказан је на графикону бр. 8 и на сликама бр. 6 и бр. 7.

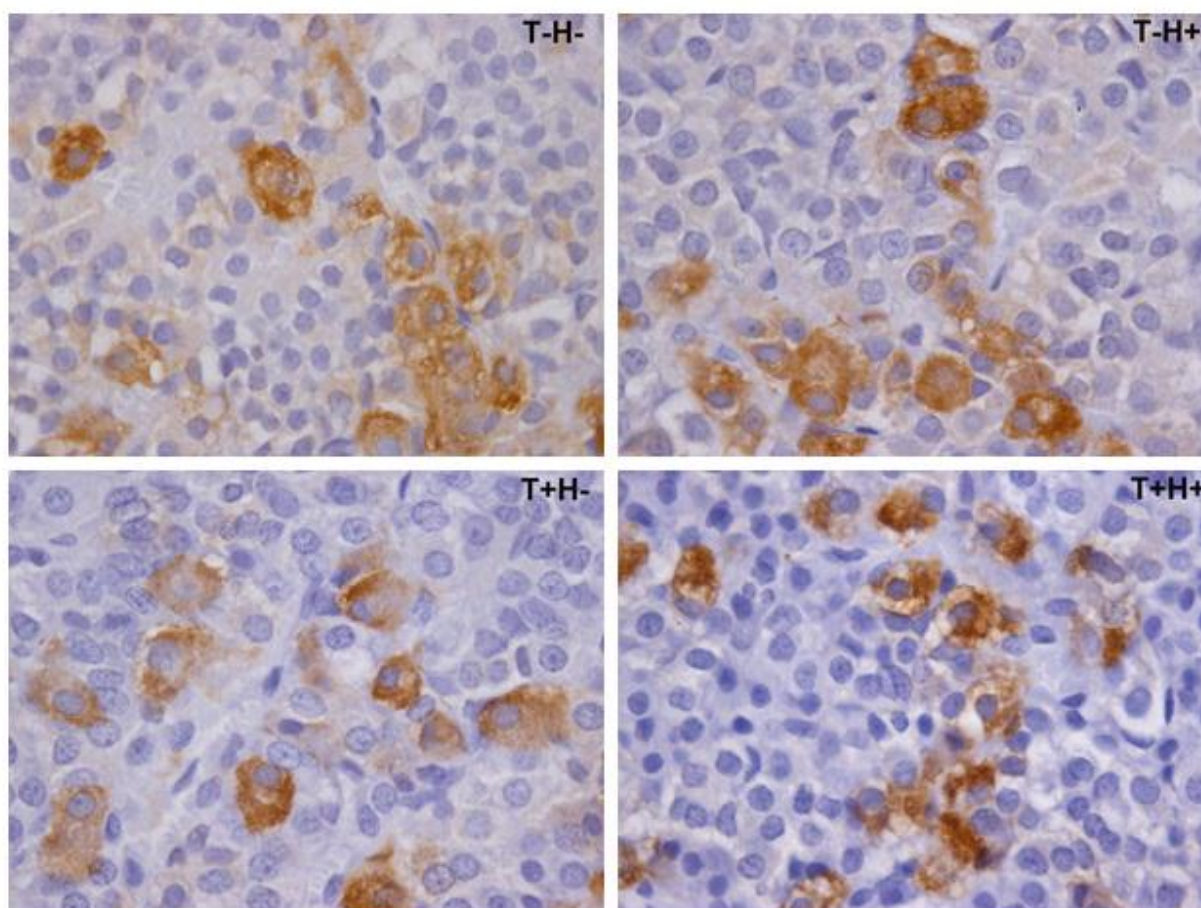


Графикон 8. Средње вредности броја LH ћелија хипофизе на  $\text{mm}^2$  код перипуберталних и адултних мужјака пацова као и међусобни однос унутар старосних група.

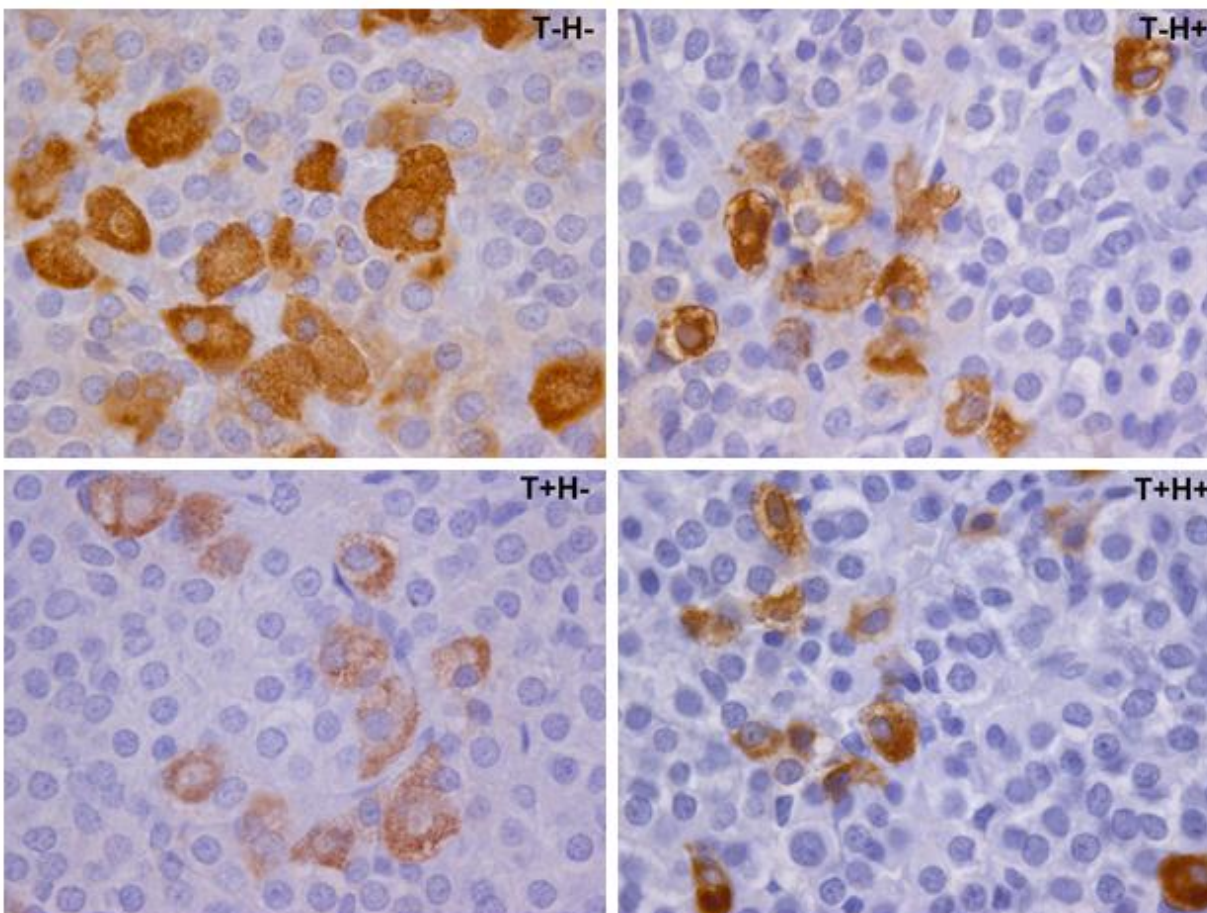
Код перипуберталних мужјака пацова, број LH ћелија на  $\text{mm}^2$  смањен је у свим експерименталним групама у односу на контролу. Смањење броја ћелија у Т-Н+ групи је 7% ( $p > 0.05$ ), у Т+Н- групи 5% ( $p > 0.05$ ) и у Т+Н+ групи 6% ( $p > 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Поређењем у оквиру експерименталних група, тренинг пливањем је довео до смањења броја ћелија за 3% ( $p > 0.05$ ) а његова удружена примена са нандролон деканоатом за 1% ( $p > 0.05$ ) у односу на самосталан третман нандролоном. У Т+Н+ групи дошло је до смањења броја ћелија на  $\text{mm}^2$  за 1% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 8).

Број LH ћелија на  $\text{mm}^2$ , код адултних пацова, смањен је за 36% ( $p < 0.05$ ) у T-H+ групи, за 3% ( $p > 0.05$ ) у T+H+ групи за 27% ( $p < 0.05$ ) у односу на T-H- групу. Тренинг пливањем повећао је број ћелија за 51% ( $p < 0.05$ ) док је тренинг удружен са третманом нандролон деканоатом довео до пораста за 14% ( $p > 0.05$ ) у односу на самосталан третман нандролон деканоатом. Третман нандролоном у комбинацији са тренингом довео је до смањења броја ћелија за 25% ( $p < 0.05$ ) у поређењу са тренингом пливањем (Графикон 8).

Посматрајући број LH ћелија на  $\text{mm}^2$  у оквиру две испитиване старосне доби пацова, приметили смо да је у T-H- групи број ћелија повећан за 35% ( $p < 0.05$ ), у T-H+ групи смањен је броја ћелија за 7% ( $p > 0.05$ ), у T+H- групи повећан је за 37% ( $p < 0.05$ ) и у T+H+ групи повећан за 4% ( $p > 0.05$ ) код адултних пацова у односу на перипуберталне мужјаке пацова. (Графикон 8)



Слика 6. Имуноцитохемијско обележавање LH ћелија хипофизе код перипуберталних мужјака пацова. (увеличање 630x).

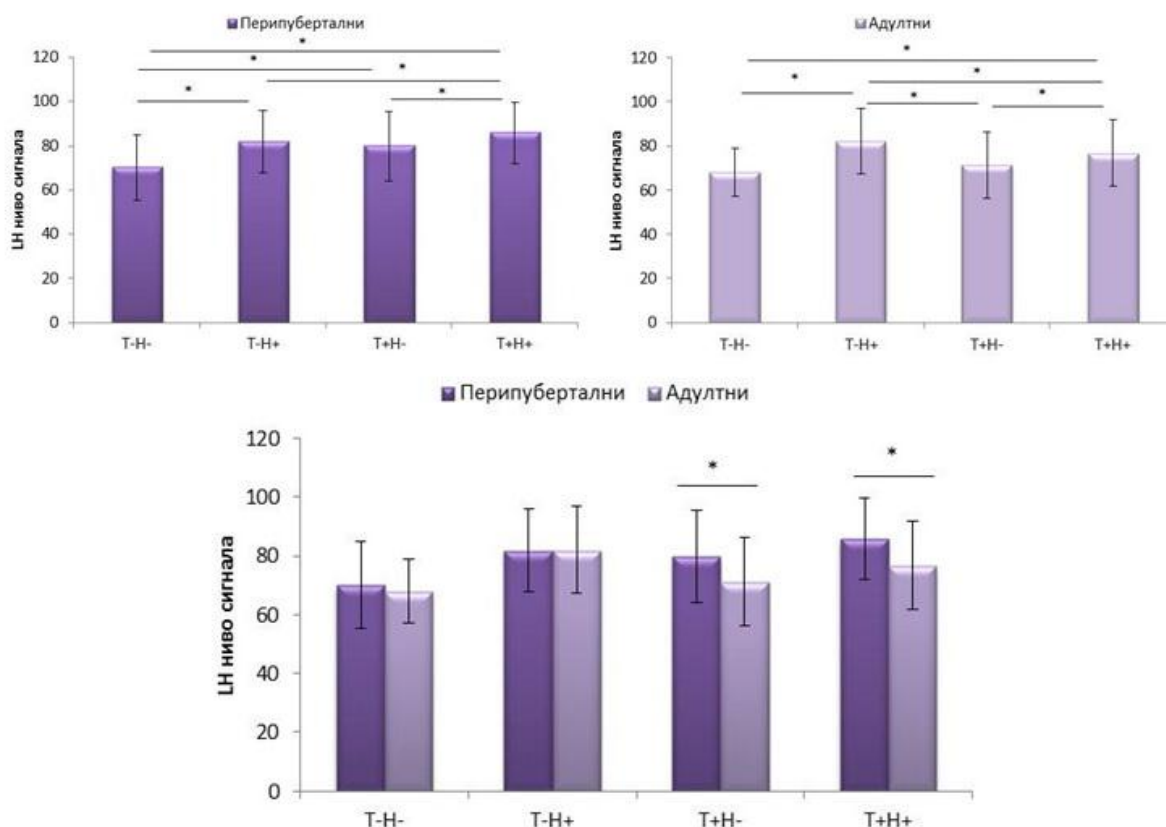


Слика 7. Имуноцитохемијско обележавање LH ћелије хипофизе код адултних мужјака пацова (Увеличање 630х).

Код обе старосне групе пацова имуноцитохемијско обележавање LH ћелија хипофизе показује доминантно дифузне цитоплазматске депозите лутеинизирајућег хормона. Ћелије су овалног или полигоналног облика са ексцентрично постављеним једром, појединачне или у мањим групама. У ћелијама са јаче LH израженом имунореактивношћу примећује се грануларна организација депозита. Ретко се у цитоплазми могу приметити перинуклеарна расветљења вакуоларног изгледа. У T+H+ и T-H+ групама адултних пацова ћелије садрже знатну количину LH депозита и имају тенденцију груписања што није верификовано у перипуберталним експерименталним групама. Код адултних пацова самостална примена нандролонa је изазвала повећање количине LH депозита (Слика 6,7).

#### 4.2.2.4. Интензитет имунофлуоресцентног сигнала LH ћелија хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова.

У имунофлуоресцентно обележеним LH ћелијама хипофизе, квантификовали смо релативни интензитет имунофлуоресцентног сигнала (РИФ). Оваквим начином квантификације, одредили смо количину самог хормона у ћелијама хипофизе. Промене релативног интензитета имунофлуоресцентног сигнала LH ћелија представљени су на графикону бр. 9, као и на сликама бр.8 и бр. 9.



Графикон 9. Средње вредности релативног интензитета флуоресцентног сигнала (РИФ-а) LH ћелија хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова као и међусобни однос у оквиру испитиваних старосних група. (Средње вредности  $\pm$  SD).

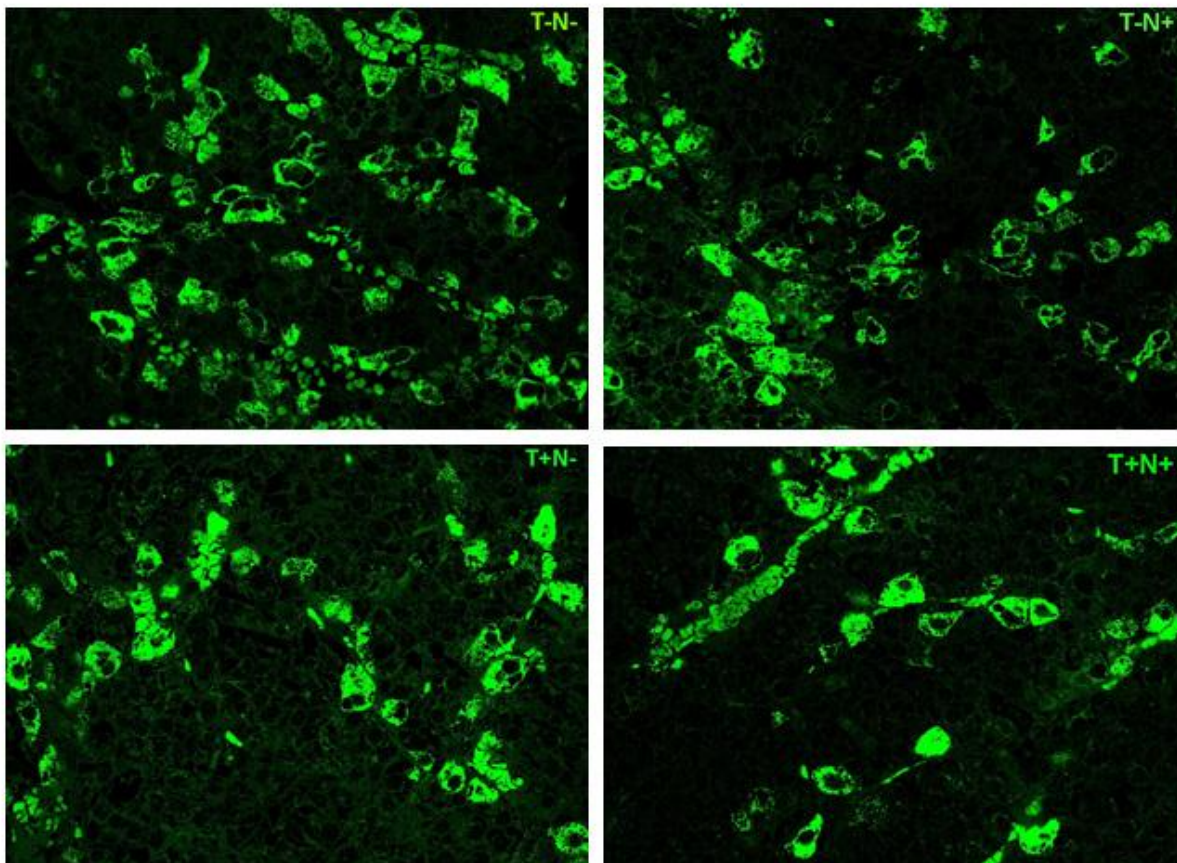
Код перипуберталних пацова, релативни интензитет флуоресцентног сигнала имунообележених LH ћелија хипофизе, статистички значајно је повишен у свим експерименталним групама ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. Самостална примена



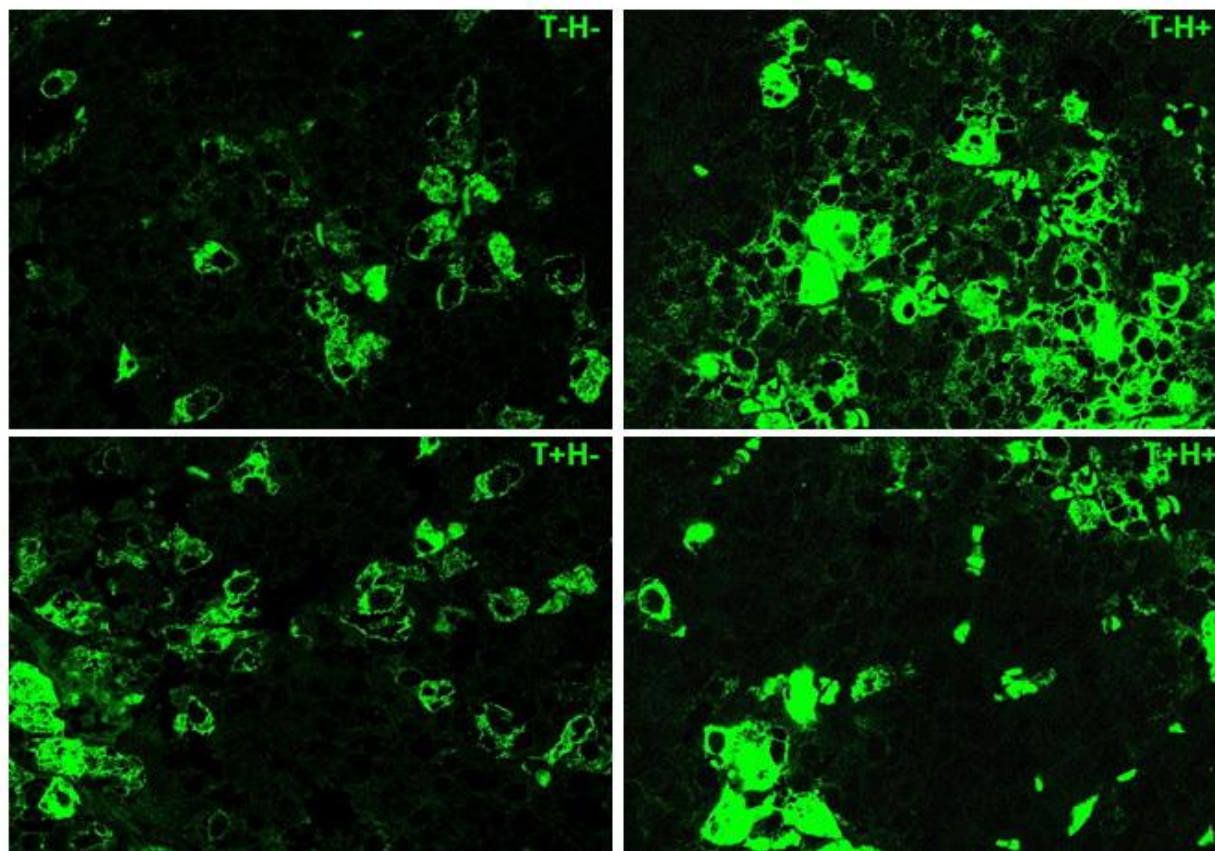
нандролон довели су до пораста сигнала за 16% ( $p < 0.05$ ), тренинг је довео до повећања интензитета РИФ-а за 13.5% ( $p < 0.05$ ), док је тренинг у комбинацији са нандролоном довео до повећања интензитета за 22% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. Поређењем унутар експерименталних група, тренинг пливањем довео је до смањења интензитета сигнала за 1% ( $p > 0.05$ ) у односу на самосталну примену нандролон, док је комбинована примена нандролон и тренинга довела до повећања интензитета имунофлуоресцентног сигнала за 5% ( $p < 0.05$ ) у односу на самосталну примену нандролон. Нандролон у комбинацији са тренингом довео је до повећања интензитета флуоресцентног сигнала за 7.5% ( $p < 0.05$ ) у односу на самосталан тренинг пливањем (Графикон 9).

У имунообележеним LH ћелијама хипофизе, код адултних мужјака пацова, у свим експерименталним групама, повећан је интензитет флуоресцентног сигнала у односу на контролну групу. Самостално примењен нандролон деканоат повећао је ниво флуоресцентног сигнала за 20% ( $p < 0.05$ ), тренинг пливањем повећао је за 4.5 % ( $p > 0.05$ ), док је тренинг у комбинацији са нандролоном повећао интензитет сигнала за 12.5% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. Тренинг пливањем смањено је за 14% ( $p < 0.05$ ) док је тренинг у комбинацији са нандролоном смањено за 7% ( $p < 0.05$ ) интензитет флуоресцентног сигнала у односу на самостално примењен нандролон. Тренинг пливањем у комбинацији са нандролоном довео је до пораста вредности за 12.5 % ( $p < 0.05$ ) у односу на тренинг пливањем (Графикон 9).

Са старењем, вредности интензитета флуоресцентног сигнала снижене су у контролној групи за 3% ( $p > 0.05$ ), код тренинга пливањем за 12% ( $p < 0.05$ ) и код тренинга пливањем у комбинацији са нандролоном за 12% ( $p < 0.05$ ) код адултних у односу на перипуберталне пацове. Између група које су самостално добијеле нандролон деканоат није дошло до значајне разлике у нивоу интензитета флуоресцентног сигнала ( $p > 0.05$ ) (Графикон 9).



Слика 8. Имунофлуоресцентно обележене LH ћелије хипофизе код перипуберталних мужјака пацова (увеличање 400x).

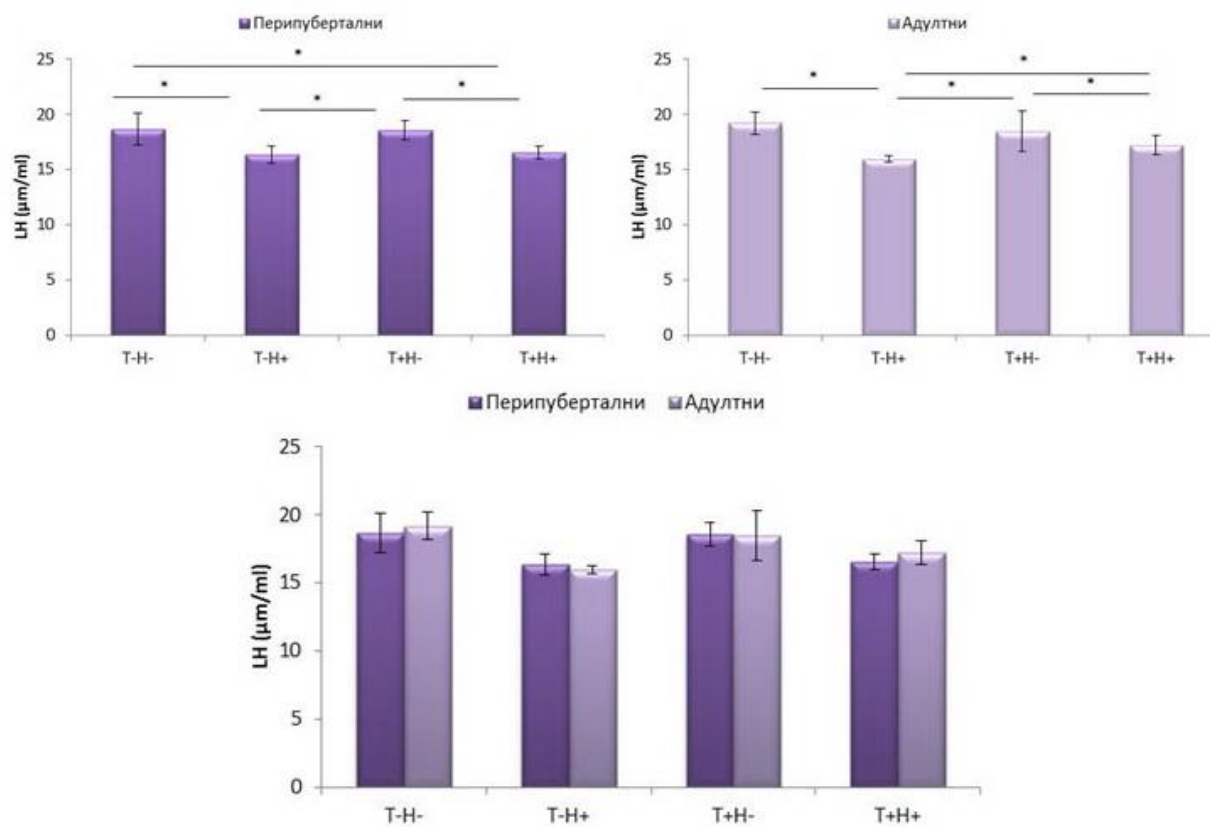


Слика 9. Имунофлуоресцентно обележене LH ћелије хипофизе код адултних мужјака пацова (увелечање 400x).

Резултати одређивања релативног интензитета флуоресцентног сигнала су у потпуној корелацији са имуноцитохемијским налазима. У T-H- групи ћелије су појединачно расуте по жлезди, са јачим а понегде и са слабијим интензитетом имунофлуоресценце. У T-H+ групи, видимо да се ћелије налазе у групама, са повећаним интензитетом сигнала у односу на контролну групу. У T+N- групи, ћелије су појединачно распоређене са појачаним интензитетом имунофлуоресценце у односу на контролну групу. У T+N+ групи, ћелије се налазе у групама, мањих су димензија у односу на контролну групу али са јаче израженим сигналом (Слике 8, 9).

#### 4.2.2.5. LH серумске вредности

У узорцима серума, одређивали смо вредности LH хормона код перипуберталних и адултних мужјака пацова. Промене серумских вредности лутеинизирајућег хормона приказан је на графикону бр.10.



Графикон 10. Серумске вредности LH хормона код перипуберталних и адултних пацова као и њихов међусобни однос између две испитиване старосне популације мужјака пацова.

Код перипуберталних мужјака пацова, самостална примена нандролон деканоата као и његова комбинована примена са тренингом, довела је до статистички значајног пада серумских вредности LH за 12% ( $p < 0.05$ ) и 11% ( $p < 0.05$ ) (редом) док је тренинг пливањем смањио вредности за 0.5% ( $p > 0.05$ ) у односу на контролну групу. Поређењем унутар самих експерименталних група, тренинг пливањем повећао је вредности за 14% ( $p < 0.05$ ) а његова комбинована примена са нандролоном довела је до пораста за 1% ( $p >$

0.05) у односу на самосталну примену нандролон деканоата. У Т+Н+ групи, смањење вредности хормона у серуму било је 11% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 10).

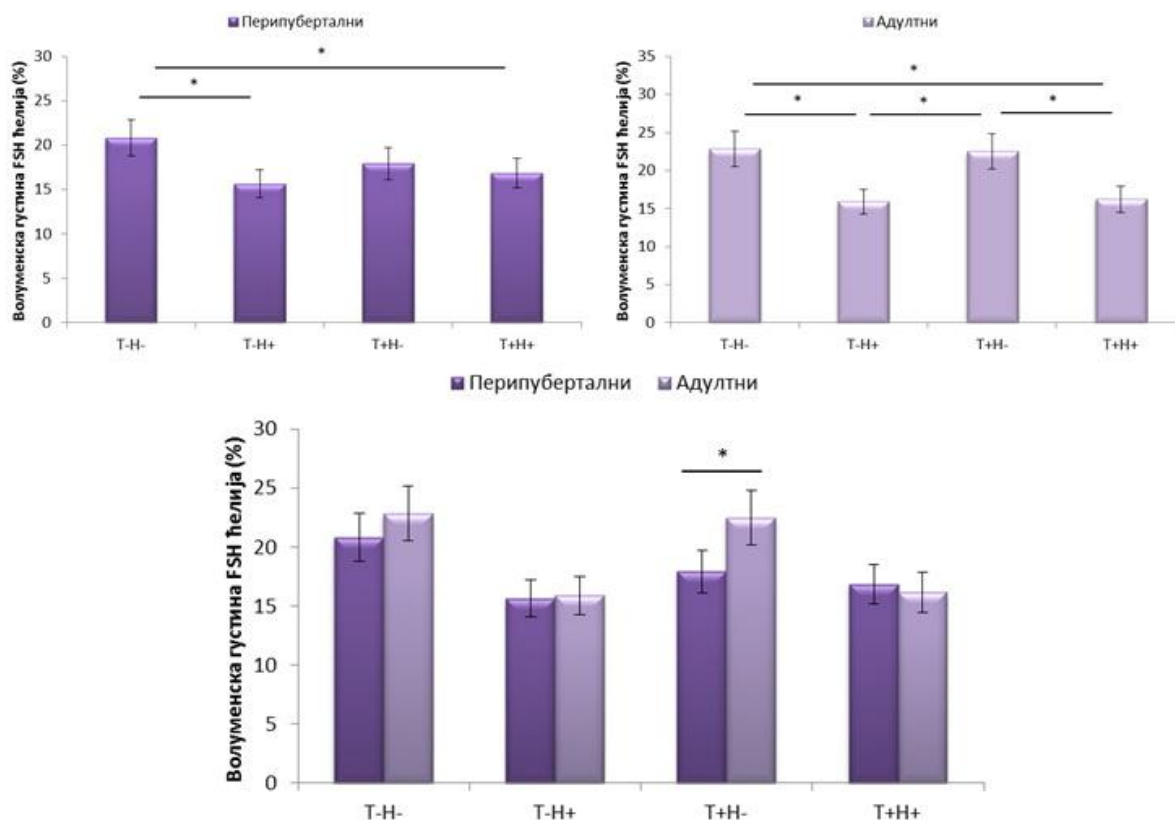
Серумске вредности ЛН код адултних мужјака пацова, у групи која је само добијала нандролон деканоат статистички значајно су снижене 17% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. У групи које је тренирала пливање дошло је до снижења вредности за 4% ( $p > 0.05$ ) док тренинг са истовременом применом нандролон деканоата смањио је вредности за 10% ( $p > 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Анализирајући вредности хормона у оквиру самих експерименталних група, примећено је да тренинг пливањем доводи до пораста ЛН хормона за 16% ( $p < 0.05$ ), док тренинг пливањем у комбинацији са нандролоном повећава вредности за 8% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон. Нандролон примењен у комбинацији са тренингом довео је до статистички значајног снижења серумских вредности хормона за 7% ( $p < 0.05$ ) у односу на тренинг пливањем (Графикон 10).

Поређењем серумских вредности ЛН хормона између две испитивање старосне популације, у контролној групи код адултних мужјака дошло је до благог повећања вредности за 3% ( $p > 0.05$ ), у групи која је самостално добијала нандролон вредности су снижене за 2% ( $p > 0.05$ ) код адултних мужјака у односу на перипуберталне. Тренинг пливањем довео је до незнатног снижења вредности од 0.5 % ( $p > 0.05$ ) док нандролон деканоат у комбинацији са тренингом повећао вредности за 4% ( $p > 0.05$ ) у адултној популацији у односу на перипуберталну (Графикон 10).

#### **4.2.3. Фоликулостимулирајуће ћелије хипофизе – FSH**

##### **4.2.3.1. Волуменска густина FSH ћелија хипофизе**

Волуменску густину FSH ћелија хипофизе одређивали смо након четворонедељне самосталне апликације нандролон деканоата и тренинга пливањем, као и њихове удружене примене код перипуберталних и адултних мужјака пацова. Промене волуменске густине FSH ћелија приказане су на графикону бр.11.



Графикон 11. Представљене су вредности волуменске густине (%) FSH ћелија хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова као и њихов међусобни однос

Волуменска густина FSH ћелија хипофизе код перипуберталних мужјака пацова смањена је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. Самостално примењен нандролон деканоат довео је до смањења волуменске густине за 25% ( $p < 0.05$ ), тренинг пливањем за 14% ( $p < 0.05$ ) а тренинг у комбинацији са нандролон деканоатом за 20% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Поређењем унутар самих експерименталних група, тренинг пливањем повећао је волуменску густину FSH ћелија за 14% ( $p < 0.05$ ) док је тренинг у комбинацији са нандролон деканоатом повећао за 8% ( $p > 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон. У Т+Н+ групи повећање волуменске густине било је 11% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 11).

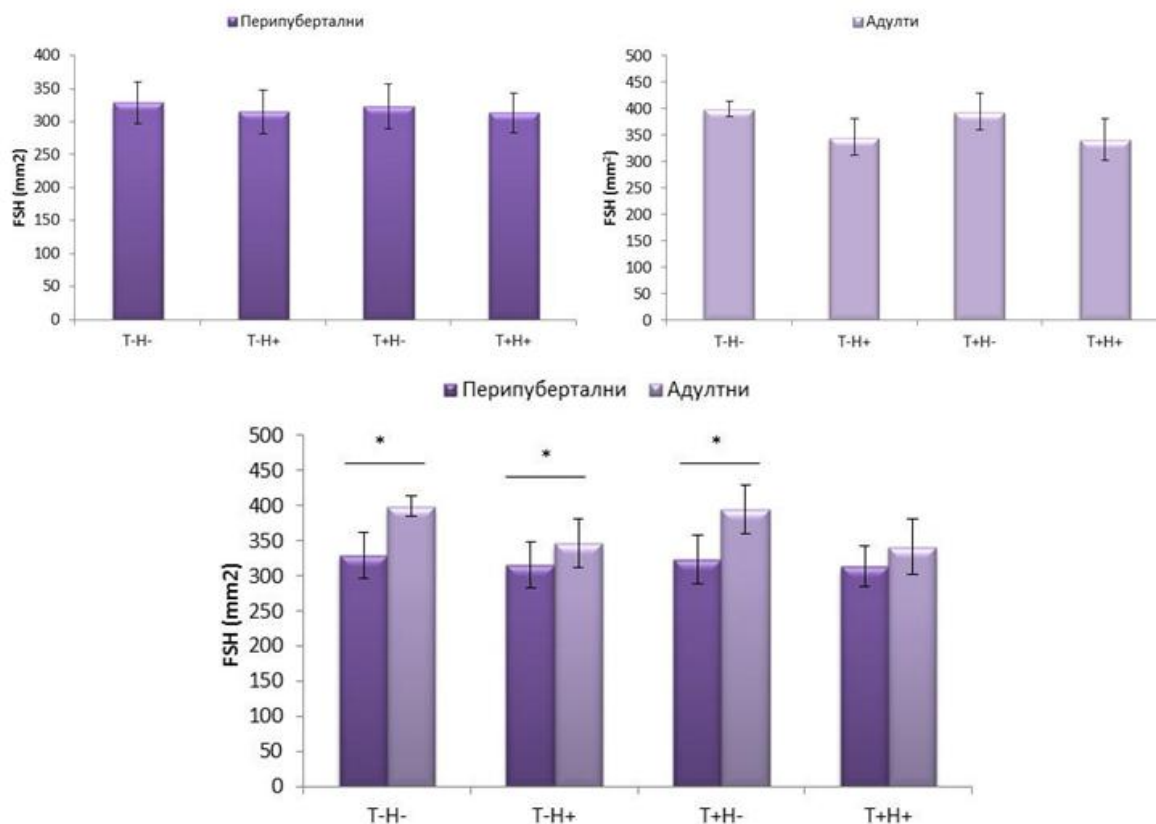
Код адултних мужјака пацова, волуменска густина је смањена у експерименталним групама у односу на контролу. Смањење волуменске густине FSH ћелија у Т-Н+ групи је

39 % ( $p < 0.05$ ), у Т+Н- групи је 5.5% ( $p > 0.05$ ) а у Т+Н+ групи је 30% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т-Н- групу. Тренинг пливањем довео је до повећања волуменске густине за 41% ( $p < 0.05$ ) док је његова удружена примена са нандролон деканоатом довела до повећања за 2% ( $p > 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон. Удружена примена нандролон деканоата и тренинга пливањем смањила је волуменску густину за 28% ( $p < 0.05$ ) у односу на тренинг пливањем (Графикон 11).

Поређењем волуменске густине између две старосне доби пацова, у контролној групи примењен је пораст за 10% ( $p > 0.05$ ) код адултних у односу на перипуберталне мужјаке. У групама које су самостално добијале нандролон деканоат, дошло је до благог повећања (од 2% ( $p > 0.05$ )) волуменске густине FSH ћелија код адултних у односу на перипуберталну популацију животиња. У групама које су тренирале пливање, у адултној популацији волуменска густина је повећана за 25.5% ( $p < 0.05$ ) у односу на перипуберталне мужјаке. У Т+Н+ групама, у адултној популацији волуменска густина је смањена за 4% ( $p > 0.05$ ) у односу на перипуберталне (Графикон 11).

#### 4.2.3.2. Број FSH ћелија хипофизе на $\text{mm}^2$

У хипофизама перипуберталних и адултних мужјака пацова, одређиван је број FSH ћелија на  $\text{mm}^2$ . Промена броја ћелија на  $\text{mm}^2$  представљен је на графикону бр. 12 и на сликама бр.10 и бр.11.



Графикон 12. Средње вредности броја FSH ћелија хипофизе на  $\text{mm}^2$  код перипуберталних и адултних мужјака пацова, као и међусобни однос у броју ћелија између две испитиване старосне групе. (Средње вредности  $\pm$  SD)

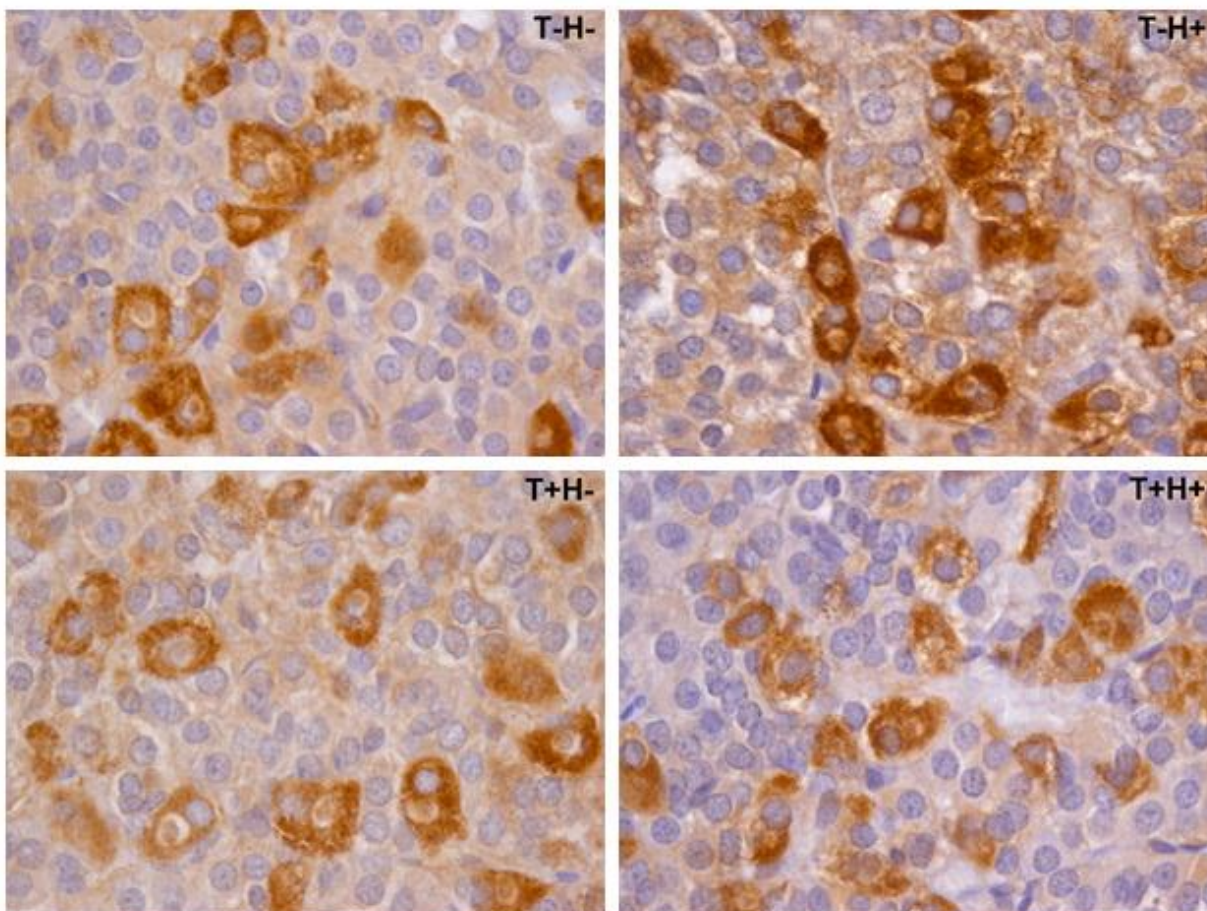
Број ћелија на  $\text{mm}^2$  код перипуберталних мужјака пацова, смањен је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. У T-N+ групи смањење је било 5% ( $p > 0.05$ ), у T+N- групи 2% ( $p > 0.05$ ), док је у T+N+ групи смањење броја ћелија на  $\text{mm}^2$  било 4% ( $p > 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Поређењем вредности између експерименталних група, тренинг пливањем довео је до повећања броја ћелија за 3% ( $p >$



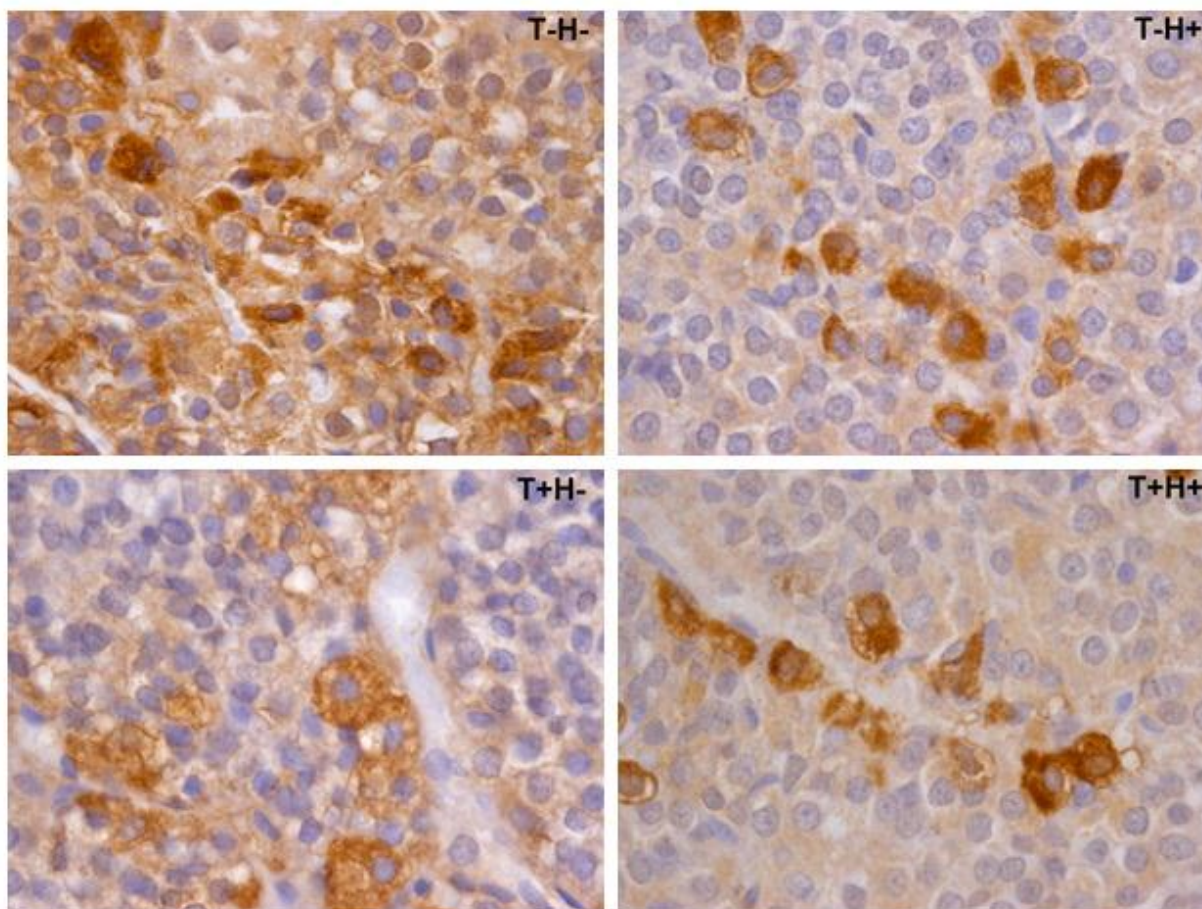
0.05) док његова комбинована примена са нандролон деканоатом смањила број ћелија на  $\text{mm}^2$  за 0.5% ( $p > 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон. У Т+Н+ групи дошло је до смањења вредности за 3% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 12).

У адултној популацији, у групама које су добијале нандролон деканоат самостално или у комбинацији са тренингом, смањен је броја ћелија на  $\text{mm}^2$  за 13% ( $p < 0.05$ ) и 15% ( $p < 0.05$ ) (редом), док је самосталан тренинг смањио вредности за 1% ( $p > 0.05$ ) у односу на број ћелија у контролној групи. Поређењем вредности унутар експерименталних група, у Т+Н- групи дошло је до повећања броја ћелија за 14% ( $p < 0.05$ ) док је у Т+Н+ групи смањење било 1% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т-Н+ групу. Нандролон деканоат примењен у комбинацији са тренингом пливањем довео је до смањења за 14% ( $p < 0.05$ ) у односу на тренинг пливањем (Графикон 12).

Поређењем броја FSH ћелија хипофизе између две испитиване старосне доби пацова, приметили смо да је у контролној групи дошло до повећања броја ћелија на  $\text{mm}^2$  за 22% ( $p < 0.05$ ), у групи која је самостално примала нандролон за 10% ( $p < 0.05$ ), у групи која је тренирала пливање за 22% ( $p < 0.05$ ) и у групи која је тренирала пливање у комбинацији са нандролоном за 9% ( $p > 0.05$ ) у адултној популацији у односу на перипуберталну (Графикон 12).



Слика 10. Имуноцитохемијски обележене FSH ћелије хипофизе код перипубертланих мужјака пацова. (увеличање 630x).

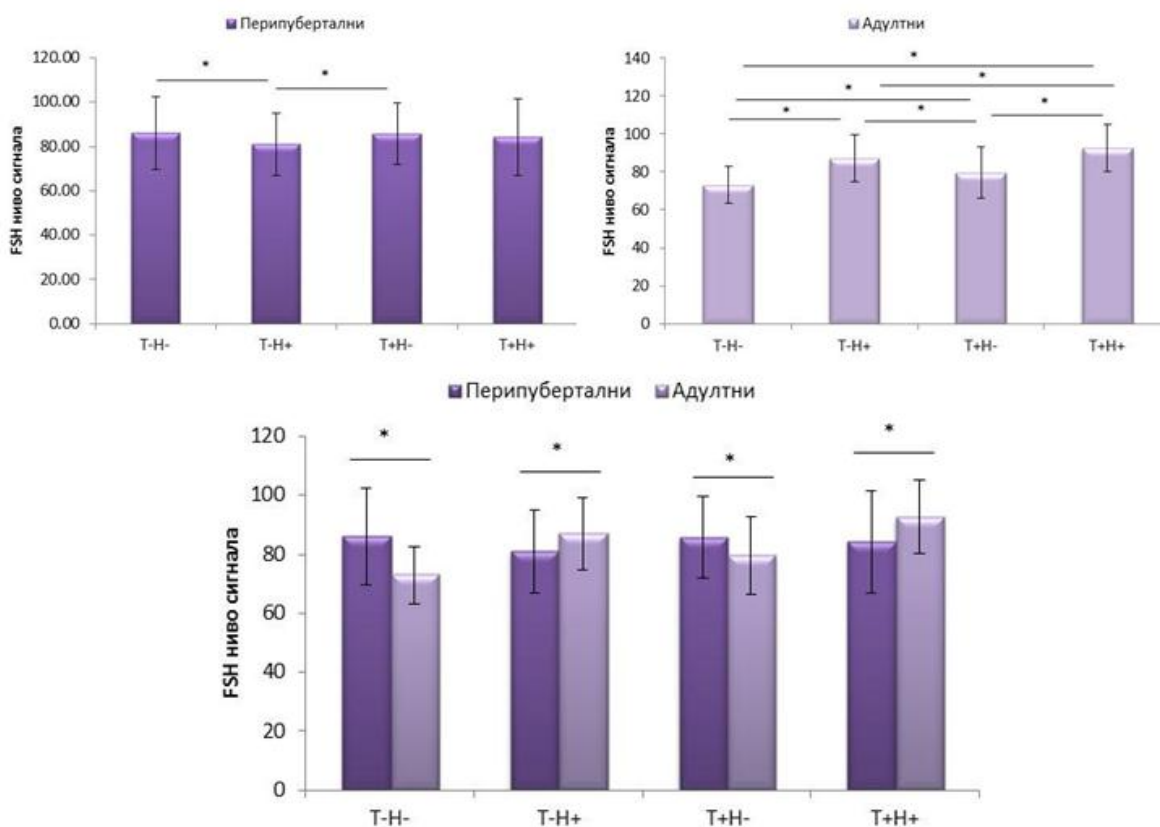


Слика 11. Имуноцитохемијски обележене FSH ћелије хипофизе код адултних мужјака пацова (увеличање 630x).

Код обе старосне групе пацова имуноцитохемијско обележавање FSH ћелија хипофизе показује дифузне цитоплазматске депозите фоликостимулишућег хормона. Ћелије су углавном полигоналног облика, често са централно постављеним једром, појединачне или у мањим групама линеарног распореда. У перипуберталној старосној групи пацова, иако постоје одређене разлике у нивоу FSH имунореактивности, микроскопски се верификује сличан налаз у свим експерименталним подгрупама. Код адултних пацова, иако морфологија FSH ћелија хипофизе не одступа од налаза у осталим групама, FSH депозити ћелија T+H+ групе су знатно гушћи и грануларног изгледа и толике су густине да одају утисак потпуне испуњености цитоплазме (Слике 10 и 11).

#### 4.2.3.3. Интензитет имунофлуоресцентног сигнала имунообележених FSH ћелија хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова.

У имунофлуоресцентно обележеним FSH ћелијама хипофизе, квантификовали смо релативни интензитет имунофлуоресцентног сигнала (РИФ). Оваквим начином квантификације, одредили смо количину FSH хормона у ћелијама хипофизе. Промене релативног интензитета имунофлуоресцентног сигнала представљен је на графикону бр. 13, као и на сликама бр.12 и бр. 13.



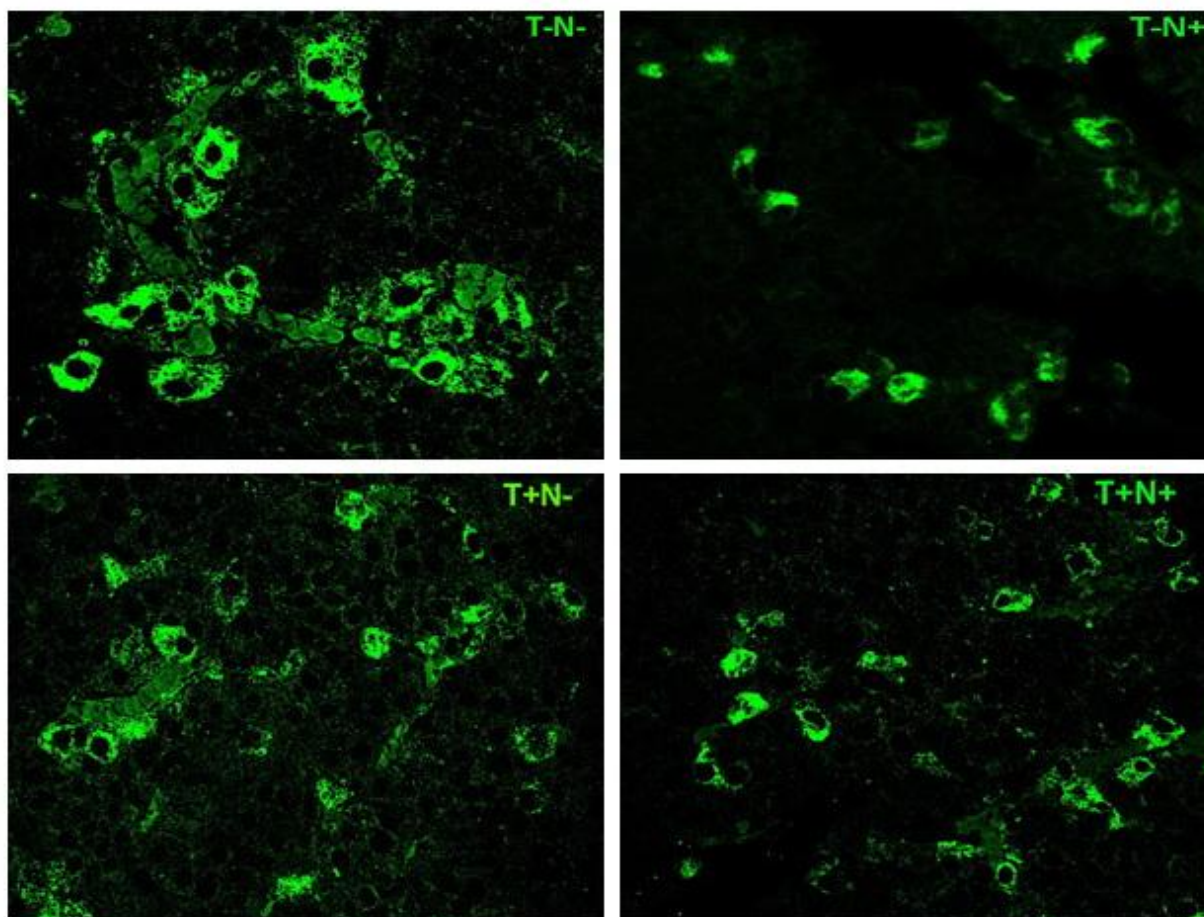
Графикон 13. Средње вредности релативног интензитета флуоресцентног сигнала (РИФ-а) FSH ћелија хипофизе код перипуберталних и адултних мужјака пацова као и међусобни однос у оквиру испитиваних старосних група. ( Средње вредности  $\pm$  SD)

Релативни интензитет флуоресцентног сигнала имунообележених FSH ћелија хипофизе код перипуберталних мужјака пацова, статистички значајно је смањен у групи која је самостално примала нандролон (6%;  $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу.

Тренинг пливањем је довео до смањења интензитета РИФ –а за 0.5% ( $p > 0.05$ ), док је тренинг у комбинацији са нандролоном довео до смањења интензитета за 2% ( $p > 0.05$ ) у односу на контролну групу. Поређењем унутар експерименталних група, тренинг пливањем довео је до повећања интензитета сигнала за 5% ( $p < 0.05$ ) у односу на самосталну примену нандролон а у односу на комбиновану примену нандролон и тренинга, повећање је било 0.9% ( $p > 0.05$ ). Нандролон у комбинацији са тренингом довео је до повећања интензитета флуоресцентног сигнала за 4% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т-Н+ групу (Графикон 13) (Слика 12).

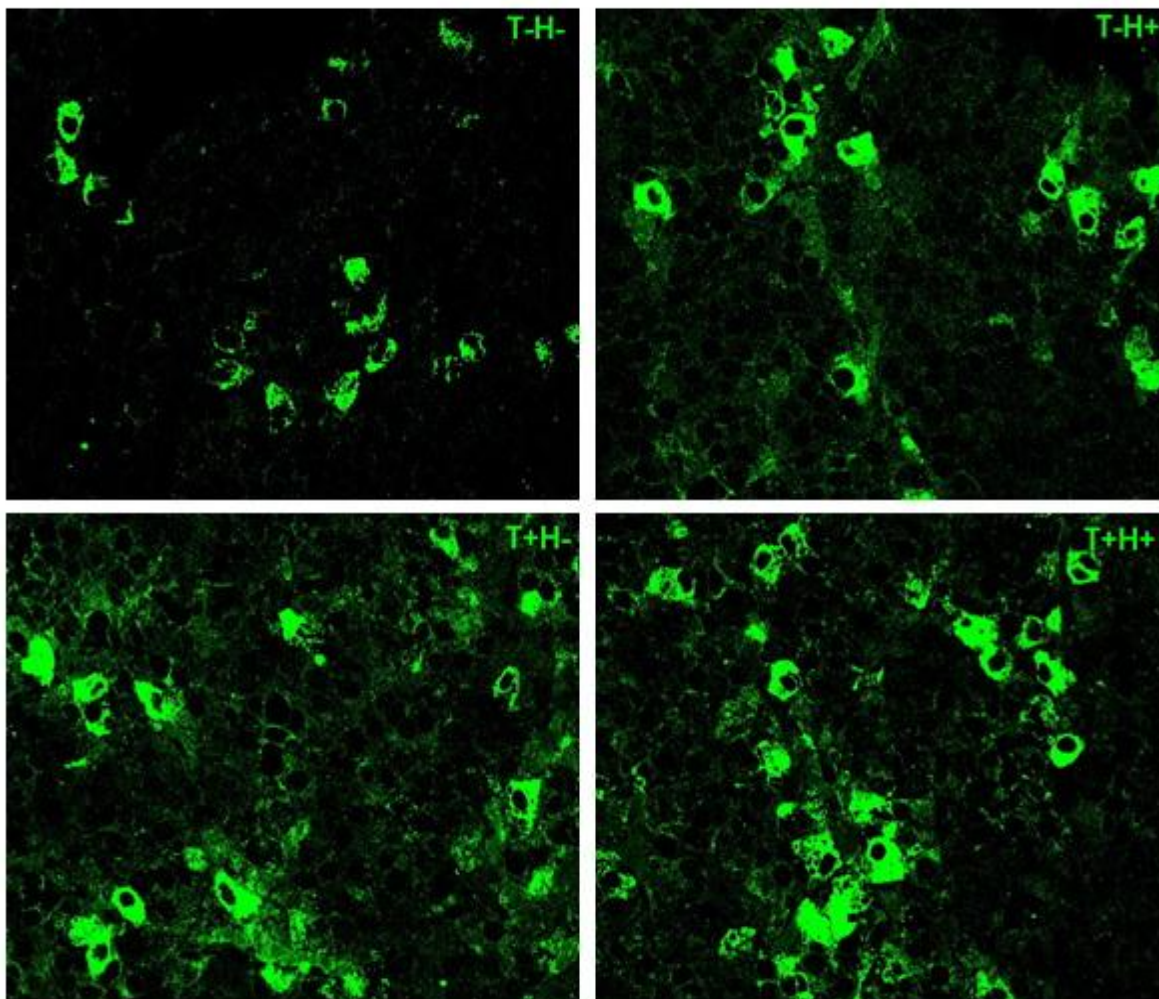
У имунообележеним FSH ћелијама хипофизе, код адултних мужјака пацова, у свим експерименталним групама дошло је до повећања флуоресцентног сигнала у односу на контролну групу. Нандролон је повећао ниво флуоресцентног сигнала за 19% ( $p < 0.05$ ), тренинг пливањем је повећао 9 % ( $p < 0.05$ ), док је тренинг у комбинацији са нандролоном повећао 27% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. Тренинг пливањем смањио је за 9% ( $p < 0.05$ ) док је тренинг у комбинацији са нандролоном повећао за 6% ( $p < 0.05$ ) интензитет флуоресцентног сигнала у односу на самостално примењен нандролон. Т+Н+ група довела је до пораста вредности за 16.5 % ( $p < 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 13) (Слика 13) .

Са старењем, вредности интензитета флуоресцентног сигнала статистички значајно су снижене у контролној групи 15% ( $p < 0.05$ ) и код тренинга пливањем 8% ( $p < 0.05$ ). Самостално примењен нандролон повећао је интензитет сигнала за 7% ( $p < 0.05$ ) док у комбинацији са тренингом, повећао за 10% ( $p < 0.05$ ) код адултних мужјака у односу на перипуберталне (Графикон 13).



Слика 12. Имунофлуоресцентно обележене FSH ћелије хипофизе код перипуберталних мужјака пацова (увеличање 400x).

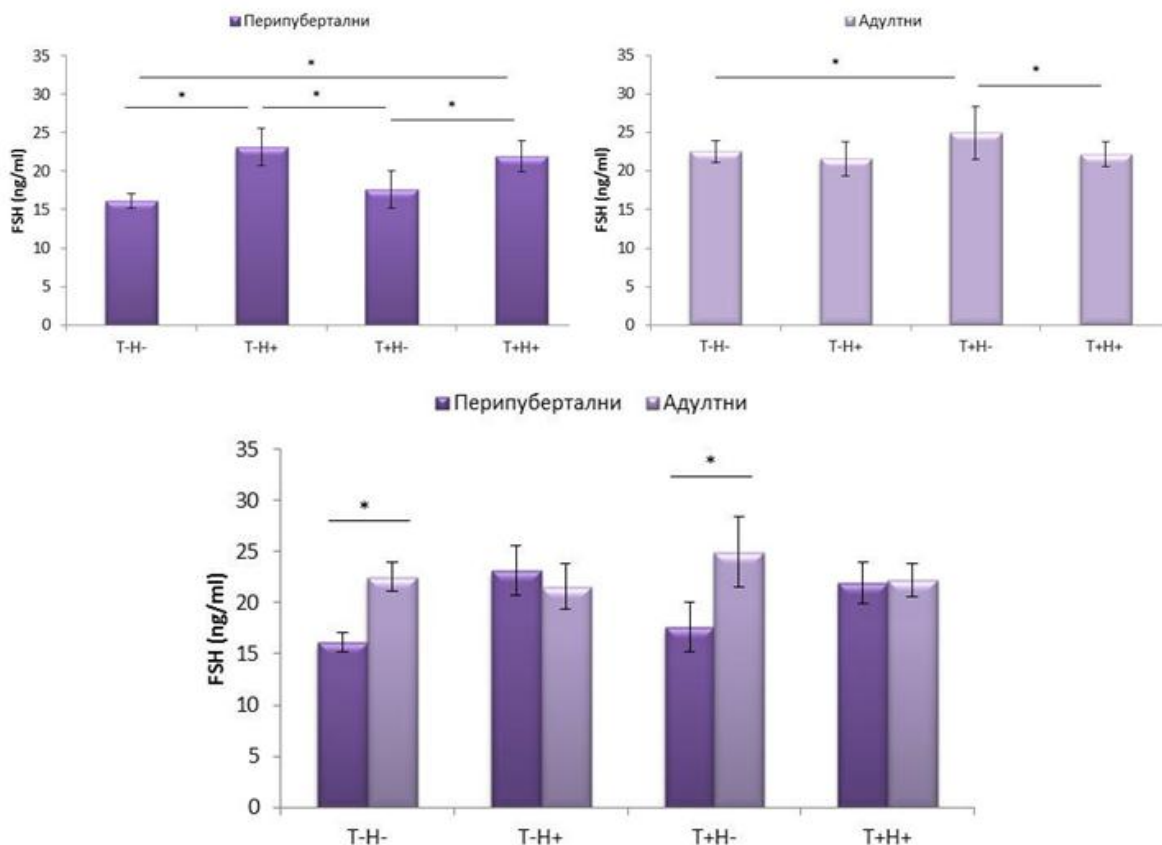
Имунофлуоресцентно обележене FSH ћелије, код перипуберталних мужјака пацова, овалног су облика са централно постављеним једром. У T-N- групи, ћелије су груписане око крвних судова са јачим и понегде слабијим сигналом. У T-N+ групи, уочава се мањи број као и мања димензија имунофлуоресцентно обележених FSH ћелија, са слабије израженим сигналом у односу на контролу. У T+N- групи, ћелије су мањих димензија, негде са јачим а негде са слабије израженим интензитетом флуоресценце у односу на контролну групу. У T+N+ групи, ћелије су појединачно расуте по жлезди са јачим а понегде и слабијим интензитетом флуоресценце али је интензитет слабије изражен у односу на контролну групу (слике 12 и 13).



Слика 13. Имунофлуоресцентно обележене FSH ћелије хипофизе код адултних мужјака пацова (увеличање 400х).

#### 4.2.3.4. FSH серумске вредности

Вредности FSH хормона код перипуберталних и адултних мужјака пацова одређивали смо у узорцима серума. Промене вредности FSH приказане су на графикону бр. 14.



Графикон 14. Серумске вредности FSH код перипуберталних и адултних мужјака пацова као и међусобни однос између две испитиване старосне популације.

Код перипуберталних мужјака пацова, серумске вредности фоликулостимулирајућег хормона повишене су у групама које су примале нандролон деканоат самостално за 43% ( $p < 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом пливањем за 36% ( $p < 0.05$ ), као и у групи која је тренирала пливање за 9% ( $p > 0.05$ ) у односу на контролну групу. Самоталан тренинг као и његова комбинација са нандролон деканоатом довела је до смањења вредности хормона за 24% ( $p < 0.05$ ) и 5% ( $p > 0.05$ ) (редом) у односу на самосталну примену нандролона. Нандролон у комбинацији са тренингом повећао је серумске вредности FSH хормона за 25% ( $p < 0.05$ ) у односу на тренинг (Графикон 14).

Код адултних пацова, примена нандролона самостално или у комбинацији са пливањем довела је до смањења серумских вредности FSH за 4% ( $p > 0.05$ ) и 1.5% ( $p > 0.05$ ) (редом), док је тренинг пливањем повећао вредности за 11% ( $p < 0.05$ ) у односу на



контролну групу. Самосталан тренинг пливањем као и његова удружена примена са нандролон деканоатом, довела је до смањења вредности овог хормона за 16% ( $p < 0.05$ ) и 3% ( $p > 0.05$ ) (редом) у односу на Т-Н+ групу. У Т+Н+ групи дошло је до смањења вредности за 11% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 14).

Поређењем унутар две испитиване старосне доби пацова, серумске вредности FSH хормона су статистички значајно повишене код адултних у односу на перипуберталне животиње, у контролној групи 40% ( $p < 0.05$ ) и групи која је само тренирала пливање 42% ( $p < 0.05$ ). Самостално примењен нандролон, довео је до пада вредности овог хормона код адултних мужјака у односу на перипуберталне мужјаке за 7% ( $p > 0.05$ ), док у групи у којој је нандролон примењен заједно са тренингом нема значајне разлике у вредности FSH код обе испитиване популације (Графикон 14).

#### 4.3. Тестис

Морфометријске параметре тестиса код перипуберталних и адултних мужјака пацова одређивали смо након хроничне апликације нандролон деканоата и тренинга пливањем самостално или њихове удружене примене.

Табела 9. Просечне вредности телесне масе перипуберталних животиња, апсолутна маса тестиса и релативан однос између масе тестиса и телесне масе животиња (резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD).

Групе	Телесна маса g	Апсолутна маса тестиса g	Релативна маса тестиса g/%
Т-Н-	334.71 $\pm$ 21.25	1.48 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.01
Т-Н+	303.57 $\pm$ 11.16	1.09 $\pm$ 0.12	0.36 $\pm$ 0.03
Т+Н-	298.37 $\pm$ 24.76	1.45 $\pm$ 0.12	0.48 $\pm$ 0.02
Т+Н+	308.12 $\pm$ 18.52	1.07 $\pm$ 0.18	0.34 $\pm$ 0.04

Код перипуберталних животиња, дошло је до промене у апсолутној маси тестиса у експерименталним групама у односу на контролну групу. Смањење масе тестиса запажено је у групама које су добијале нандролон самостално (26%;  $p < 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом пливања (28%;  $p < 0.05$ ), док је самосталан тренинг пливањем смањио масу тестиса за 2% ( $p > 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Посматрајући вредности масе тестиса у оквиру експерименталних група, тренинг је повећао апсолутну масу тестиса за 32% ( $p < 0.05$ ) а његова комбинација са нандролоном смањила је масу за 2% ( $p > 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон. Нандролон деканоат у комбинацији са тренингом смањио је вредности масе тестиса за 26% ( $p < 0.05$ ) у односу на тренинг.

Релативна маса тестиса нижа у групама које су примале нандролон самостално (19%;  $p < 0.05$ ) или комбинован са тренингом (23%;  $p < 0.05$ ), док је тренинг пливањем изазвао пораста вредности овог параметра за 9% ( $p < 0.05$ ). Тренинг пливањем довео је до повећања релативне масе тестиса за 35% ( $p < 0.05$ ) док је нандролон у комбинацији са тренингом смањио вредности за 4% ( $p > 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон. Нандролон деканоат у комбинацији са тренингом смањио је вредности релативне масе тестиса за 29% ( $p < 0.05$ ) у односу на тренинг пливањем (Табела 9).

Табела 10. Просечне вредности телесне масе адултних животиња, апсолутна маса тестиса и релативан однос између масе тестиса и телесне масе животиња након четворонедељног експерименталног процеса (резултати су представљени као средње вредности и стандардне девијације (SD)).

Групе	Телесна маса g	Апсолутна маса тестиса g	Релативна маса тестиса g/%
T-H-	444.40 ± 5.36	1.54 ± 0.12	0.35 ± 0.02
T-H+	426.80 ± 22.33	1.14 ± 0.45	0.26 ± 0.10
T+H-	434.20 ± 11.48	1.55 ± 0.05	0.36 ± 0.01
T+H+	411.00±31.50	1.42 ± 0.06	0.34 ± 0.02

Код адултних пацова, примећена је промена апсолутне масе тестиса у експерименталним групама у односу на контролу. Као и код перипуберталних, и код адултних мужјака је дошло до смањења масе тестиса у групама које су примале нандролон деканоат самостално (26%;  $p < 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом (8%;  $p > 0.05$ ) док је тренинг довео до благог пораста масе тестиса (1%;  $p > 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Тренинг пливањем самостално или комбинован са третманом нандролон деканоата довео је до повећања апсолутне масе тестиса за 36% ( $p < 0.05$ ) и 24% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на третман нандролоном. Вредности у Т+Н+ групи, смањене су за 9% ( $p < 0.05$ ) у поређу са Т+Н- групи (Табела 10).

Релативан однос између телесне масе животиња и масе тестиса, смањен је у групи која је самостално примала нандролон (26%;  $p < 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом (3%;  $p > 0.05$ ), док је у групи која је тренирала пливање дошло до пораста вредности за 3% ( $p > 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Самосталан тренинг пливањем довео је до повећања релативне масе тестиса за 38% ( $p < 0.05$ ) док је његова удружна примена са нандролон деканоатом довела до пораста за 30% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон деканоат. Нандролон деканоат у комбинацији са тренингом смањио је вредности за 6% ( $p > 0.05$ ) у односу на тренинг пливањем (Табела 10).

#### **4.3.1. Морфометријска анализа тестиса**

Морфометријском анализом тестиса, одредили смо дијаметар и површину семених каналића, као и површину интестицијумског простора тестиса након хроничне апликације нандролон деканоата и тренинга пливањем. Резултати су дати у табели бр.11, као и на графицима бр. 15, бр. 16 и бр. 17.

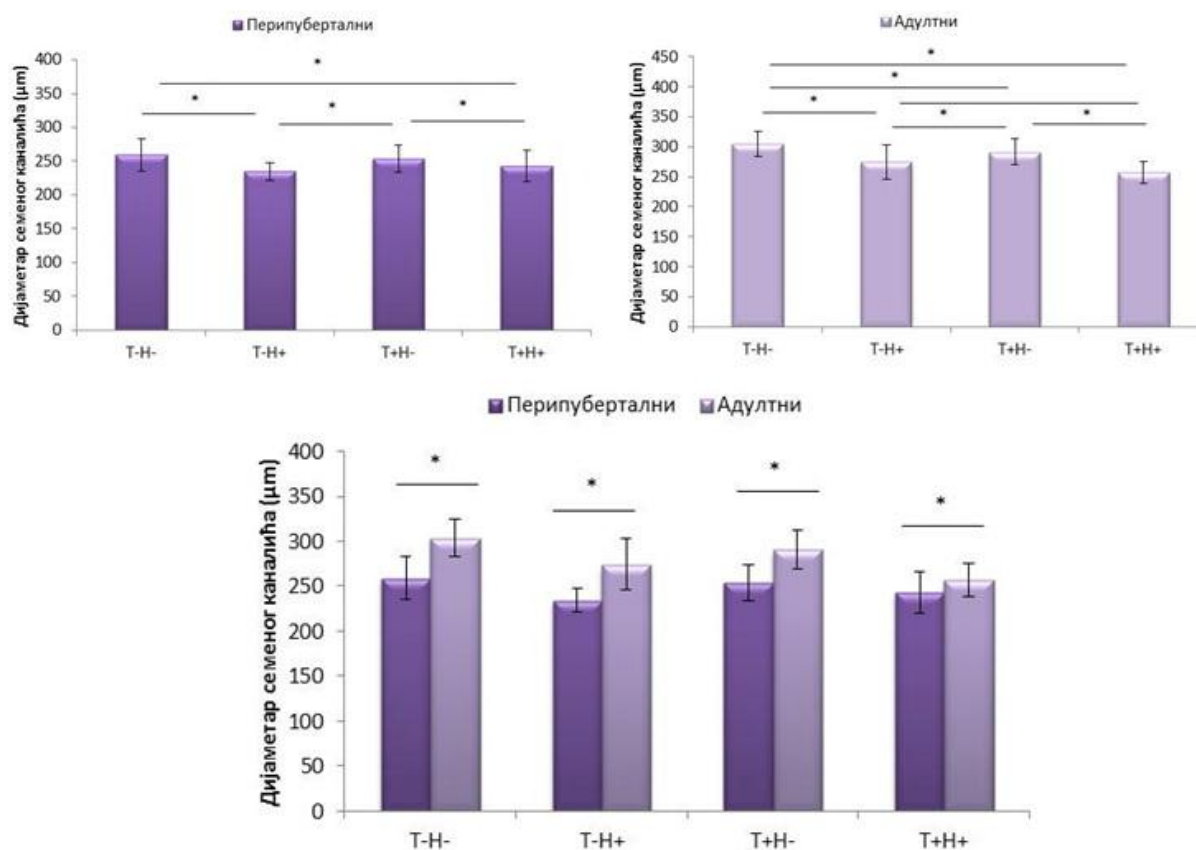
Табела 11. Најмања, највећа и просечна вредност дијаметра и површине семених каналића тестиса код перипуберталних и адултних мужјака пацова.

Групе	Дијаметар семених каналића			Површина семених каналића		
	Најмањи дијаметар $\mu\text{m}$	Највећи дијаметар $\mu\text{m}$	Просечна вредност $\mu\text{m}$	Највећа површина $\mu\text{m}^2$	Највећа површина $\mu\text{m}^2$	Просечна вредност $\mu\text{m}^2$
Т-Н- Перипубертални	212.48	300.63	259.55±23.62	41799.01	92996.28	75130.24 ± 7328.01
Т-Н+ Перипубертални	211.70	275.80	234.92±13.04	51763.91	87768.87	69259.35 ± 6977.80
Т+Н- Перипубертални	213.75	299.46	253.82±19.64	47540.25	109916.0	73856.04 ± 7725.98
Т+Н+ Перипубертални	208.71	293.69	243.46±23.40	45193.54	94145.13	65648.04 ± 7735.43
Т-Н- Адултни	263.53	342.66	304.36±20.95	80036.11	159519.2	122412.3 ± 15077.93
Т-Н+ Адултни	235.42	324.08	274.24±28.18	74359.55	135368.5	97028.96 ± 13845.76
Т+Н- Адултни	244.56	338.91	290.96±21.51	79977.43	154957.7	121263.5 ± 15302.38
Т+Н+ Адултни	212.85	295.99	257.04±18.60	60440.13	101753.8	71874.62 ± 10945.48

Као што можемо видети из табеле, вредности и површине и дијаметра семених каналића нижи су у перипуберталној популацији испитиваних животиња. Самостална примена нандролон деканота, као и његова удружена примена са тренингом пливањем, смањила је и површину и дијаметар семених каналића у односу на контролну групу и групу која је тренирала пливање.

### 4.3.2. Дијаметар семеног каналића

Морфометријском анализом, одредили смо дијаметар семеног каналића након хроничне примене нандролон деканоата и тренинга пливањем. Промене дијаметра каналића представљене су на графикаону бр. 15.



Графикон 15. Средње вредности дијаметра семеног каналића код перипуберталних, адултних мужјака пацова као и вредности дијаметра поређене у односу на испитиване старосне доби. Вредности су представљене као средње вредности  $\pm$ SD

У популацији перипуберталних пацова, дијаметар семеног каналића смањен је у свим експерименталним групама у поређењу са контролним вредностима. У T-N+ групи смањење је било 10% ( $p < 0.05$ ), у T+N- групи 2% ( $p > 0.05$ ) док је у T+N+ групи 8% ( $p < 0.05$ ). Поређењем вредности унутар самих експерименталних група, самостално примењен нандролон деканоат смањео је дијаметар семеног каналића за 8% ( $p < 0.05$ ) а његова

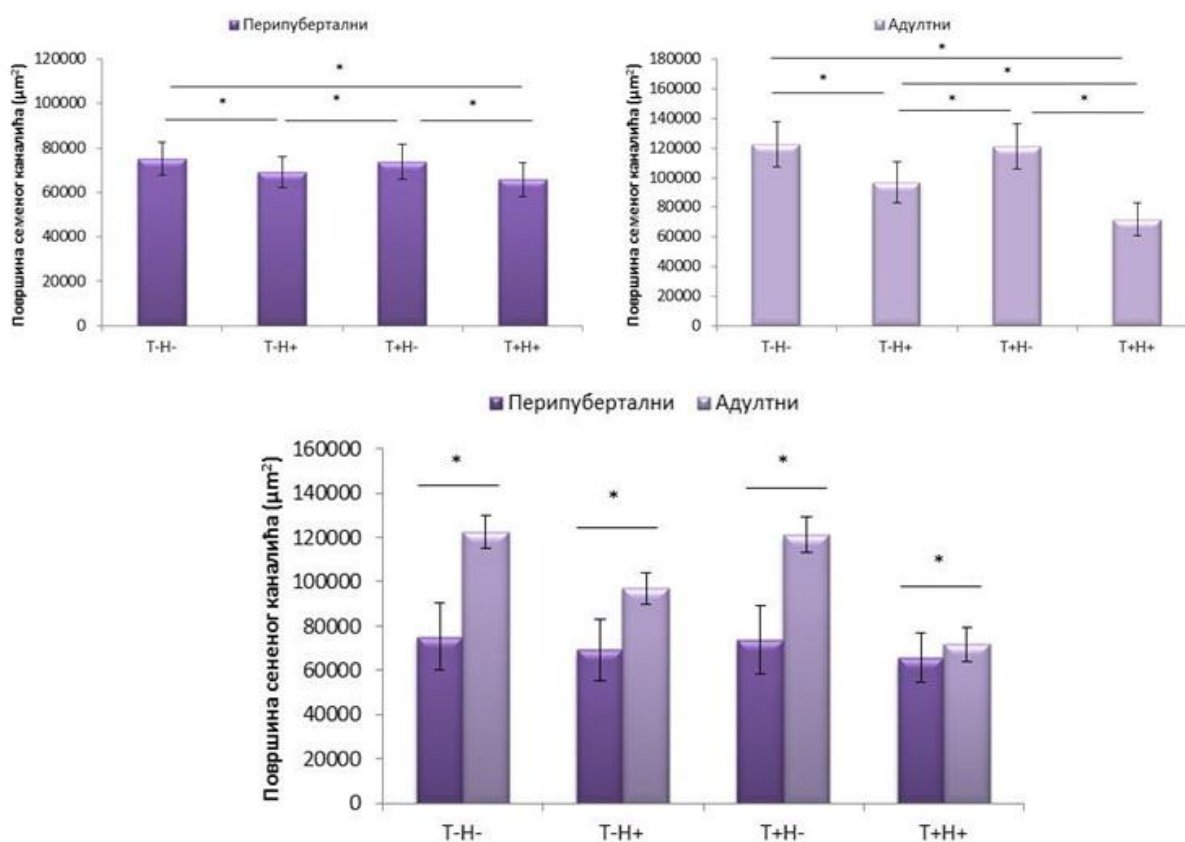
комбинована примена са тренингом пливањем за 4% ( $p > 0.05$ ) у односу на самосталан тренинг пливањем. У Т+Н+ групи дошло је пораста дијаметра семеног каналића за 4% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т-Н+ групу (Графикон 15).

У популацији адултних пацова, дијаметар семеног каналића смањен је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. У групи која је самостално добијала нандролон деканоат дијаметар каналића смањен је за 10% ( $p < 0.05$ ), у групи која је тренирала пливање за 4% ( $p > 0.05$ ), у групи која је и тренирала и примала нандролон деканоат за 15% ( $p < 0.05$ ). Поређењем вредности унутар експерименталних група, самостално примењен нандролон деканоат као и његова удружена примена са тренингом пливањем, смањила је дијаметар семеног каналића за 6% ( $p > 0.05$ ) и 12% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на самосталан тренинг пливањем. Нандролон у комбинацији са тренингом пливањем смањио је дијаметар за 6% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон (Графикон 15).

Поређењем вредности између две старосне доби пацова, у адултној популацији вредности су значајно повишене у односу на перипиберталну популацију пацова. У Т-Н- групи за 17% ( $p < 0.05$ ), у Т-Н+ групи за 17% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н- групи за 15% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н+ групи за 6% ( $p < 0.05$ ) (Графикон 15).

### 4.3.3. Површина семеног каналића

Промене површине семених каналића, након завршеног четворонедељног експерименталног протокола, одредили смо морфометрисјком методом. Резилтати су представљени на графикону бр.16.



Графикон 16. Средње вредности површине семеног каналића код перипуберталних, адултних мужјака пацова као и вредности површине поређене у односу на испитиване старосне доби. Вредности су представљене као средње вредности  $\pm$ SD

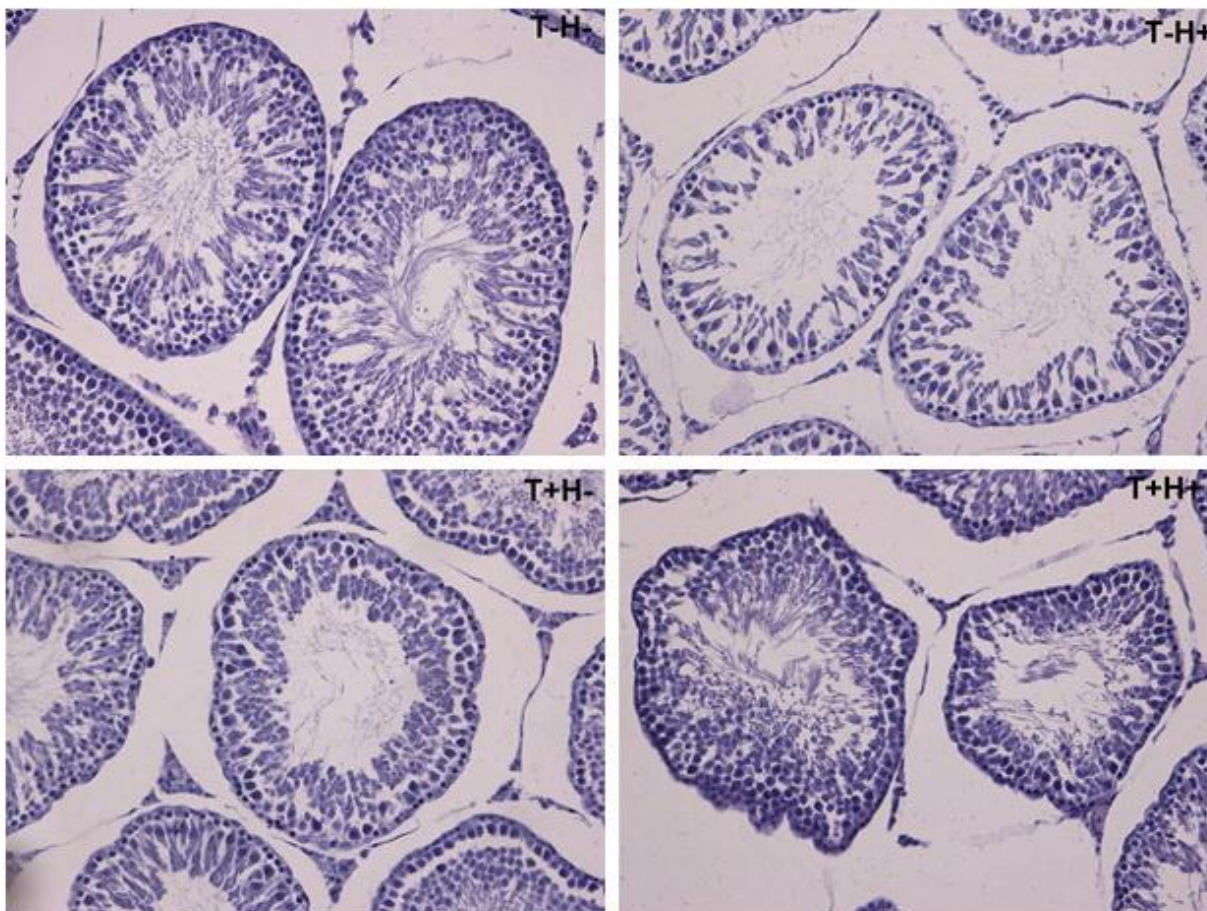
Код перипуберталних мужјака пацова, површина семеног каналића смањена је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. Самостално примењен нандролон деканоат смањео је површину за 8% ( $p < 0.05$ ), тренинг пливањем за 2% ( $p > 0.05$ ) а његова комбинована примена са нандролон деканоатом за 13% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Посматрајући вредности унутар самих експерименталних група, самостално примењен нандролон смањео је површину семеног каналића за 6% ( $p < 0.05$ )

док је његова комбинација са тренингом смањила површину каналића за 12% ( $p < 0.05$ ) у односу на тренинг пливањем. У Т+Н+ групи, површина каналића смањена је за 5% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т-Н+ (Графикон 16).

Код адултних мужјака пацова, површина семеног каналића смањена је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. У групи која је самостално добијала нандролон деканоат површина семеног каналића смањена је за 21% ( $p < 0.05$ ), у групи која је тренирала пливање за 0.5% ( $p > 0.05$ ), у групи која је и тренирала пливање и примала нандролон деканоат за 41% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Поређењем вредности унутар експерименталних група, самостално примењен нандролон деканоат као и његова комбинација са тренингом пливањем, смањила је површину семеног каналића за 25% ( $p < 0.05$ ) и 41% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на самосталан тренинг пливањем. Нандролон у комбинацији са тренингом смањео је површину каналића за 26% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон деканоат (Графикон 16).

Посматрајући вредности површине семеног каналића у односу на две испитиване популације мужјака пацова, у перипуберталној популацији вредности су значајно снижене у односу на адултну популацију. У Т-Н- групи за 62% ( $p > 0.05$ ), у Т-Н+ групи за 40% ( $p > 0.05$ ), у Т+Н- групи за 64% ( $p > 0.05$ ), у Т+Н+ групи за 9% ( $p > 0.05$ ) (Графикон 16).



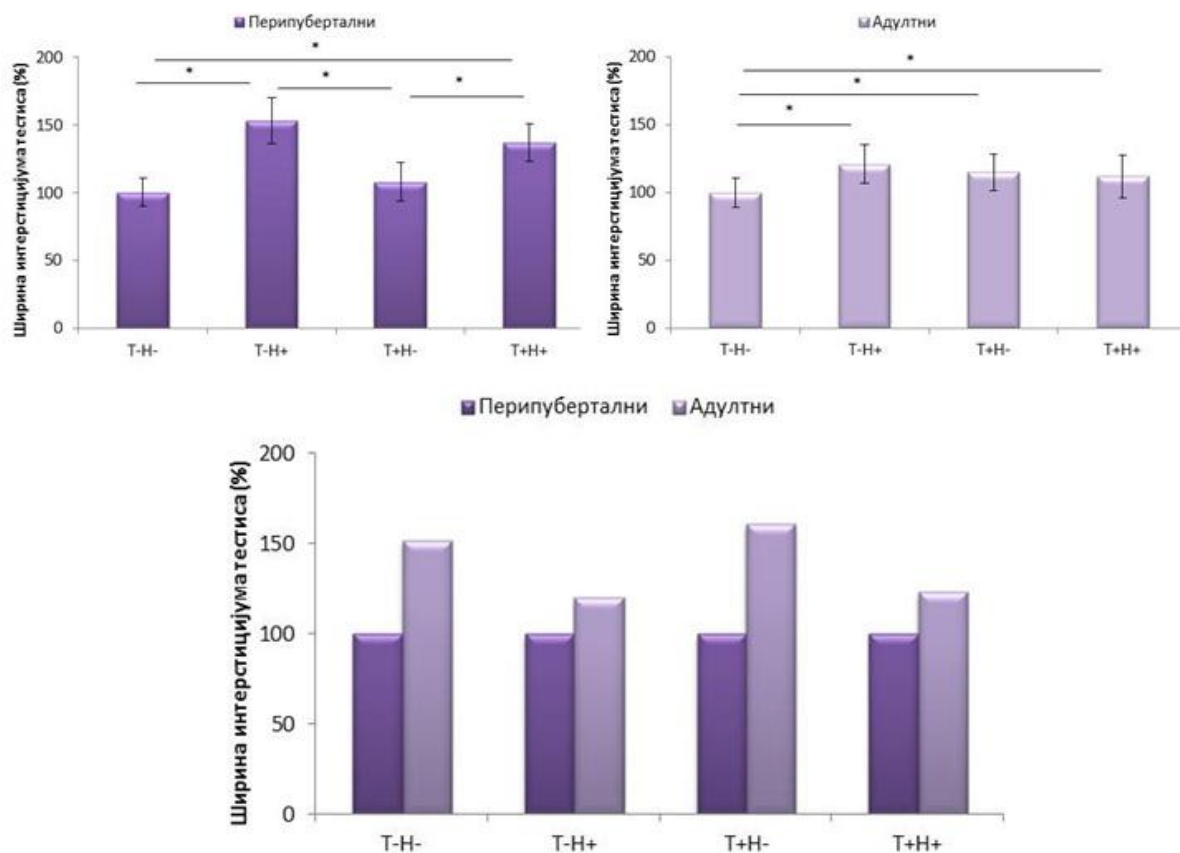


Слика 14. Ткивни пресек тестиса код перипуберталних пацова. Увеличање 200x

На попречном пресеку тестиса код перипуберталних мужјака, у контролној групи не уочавају се промене у морфологији тестиса. Највеће промене у морфолошкој грађи тестиса уочене су након третмана нандролон деканоатом. Фотографије тестиса показују дегенеративне промене које се на целуларном нивоу најчешће исказују као некроза сперматогонија са пикнозом једра, згрушавањем сперматозоида као и на неким препаратима конгестија васкуларног корита интерстицијума тестиса. Самостално примењен нандролон смањило је величину семених каналића и довео до проширење интерстицијумског простора. Такође, уочава се и смањење висине епитела у самом семеном каналићу тестиса. Тренинг пливања није довео до промене у морфолошкој грађи тестиса. Удružена примена нандролона и тренинга пливањем, довела је до смањење и дијаметра семеног каналића као и проширење интерстицијума тестиса (Слика 14).

#### 4.3.4. Површина интерстицијумског простора тестиса

Површину интерстицијумског простора, након четворонедељног експерименталног протокола, одредили смо морфометријском методом. Резултати промене површине интерстицијума представљени су на графикаону бр.17.



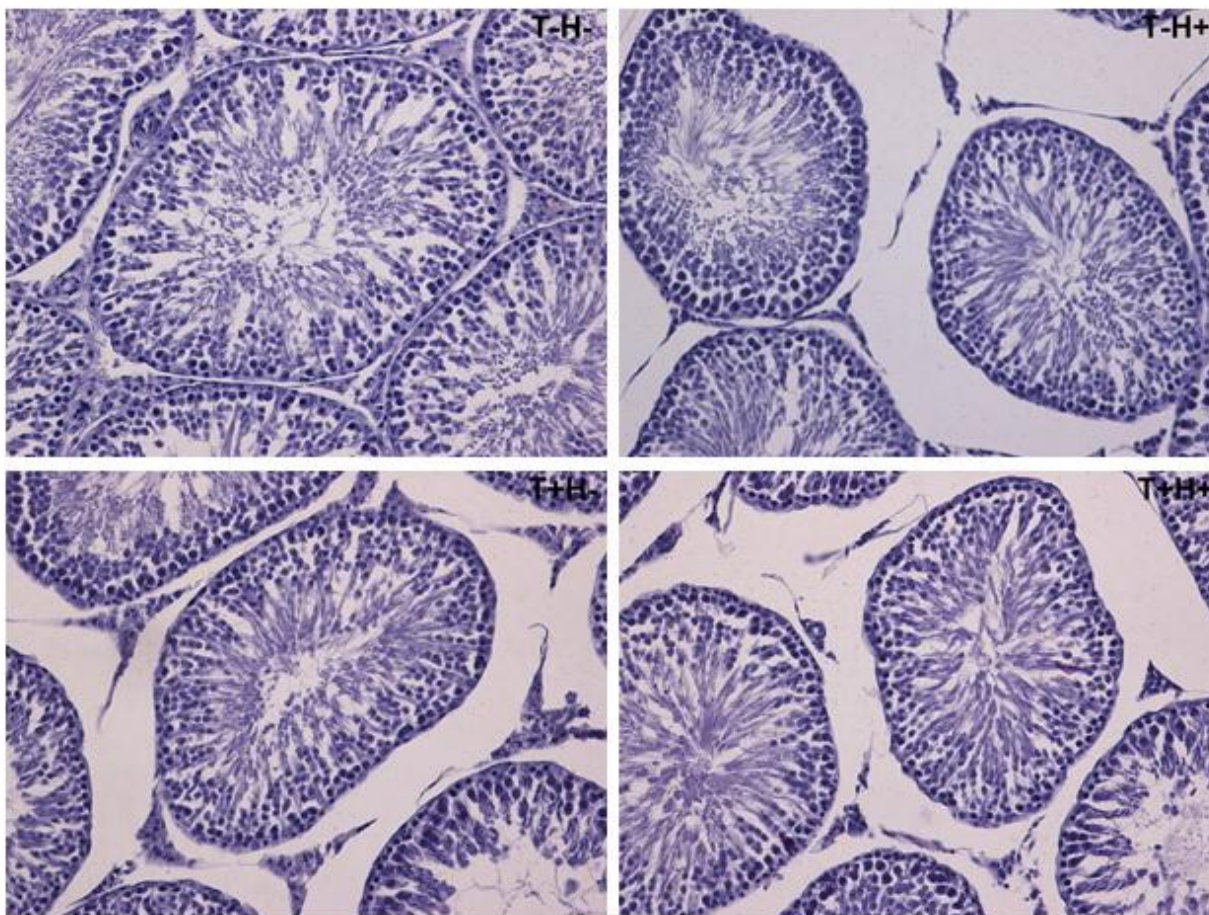
Графикон 17. Површина интерстицијумског простора тестиса код перипуберталних и адултних мужјака пацова, као и њихов међусобни однос. Вредности су представљене као средње процентуалне вредности  $\pm$  SD.

Код перипуберталних мужјака пацова, интерстицијумски простор између семених каналића повећан је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. У T-N+ групи пораст је био 53% ( $p < 0.05$ ), у T+N- групи 8% ( $p < 0.05$ ), у T+N+ групи 37% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Самостална примена нандролон деканоата повећала је површину интерстицијумски простор тестиса за 41% ( $p < 0.05$ ) у односу на

самосталан тренинг док је у односу на комбиновану примена нандролон са тренингом повећао за 12% ( $p < 0.05$ ). Тренинг самостално смањено је интерстицијумски простор за 21% ( $p < 0.05$ ) у односу на његову комбиновану примену са нандролоном (Графикон 17).

У адултној популацију мужјака пацова, интерстицијум тестиса повећан је у свим експерименталним групама. Самостално примењен нандролон деканоат повећао је површину интерстицијума за 21% ( $p < 0.05$ ), самосталан тренинг за 15% ( $p < 0.05$ ) док је комбинована примена нандролон деканоата и тренинга пливањем повећала за 12% ( $p < 0.05$ ) површину интерстицијума у односу на контролне вредности. Поређењем између експерименталних група у Т+Н- групи, интерстицијум је смањен за 5% ( $p < 0.05$ ) док је у Т+Н+ групи смањен за 8% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т-Н+ групу. У Т+Н- групи интерстицијум је повећан за 3% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т+Н+ групу (Графикон 17).

Поређењем површине интерстицијумског простора између две испитиване старосне популације животиња, код адултних мужјака, интерстицијумски простор је повећан у односу на перипуберталне. У Т-Н- групи за 52%, Т-Н+ групи за 20%, у Т+Н- групи за 61%, у Т+Н+ групи за 23% (Графикон 17).

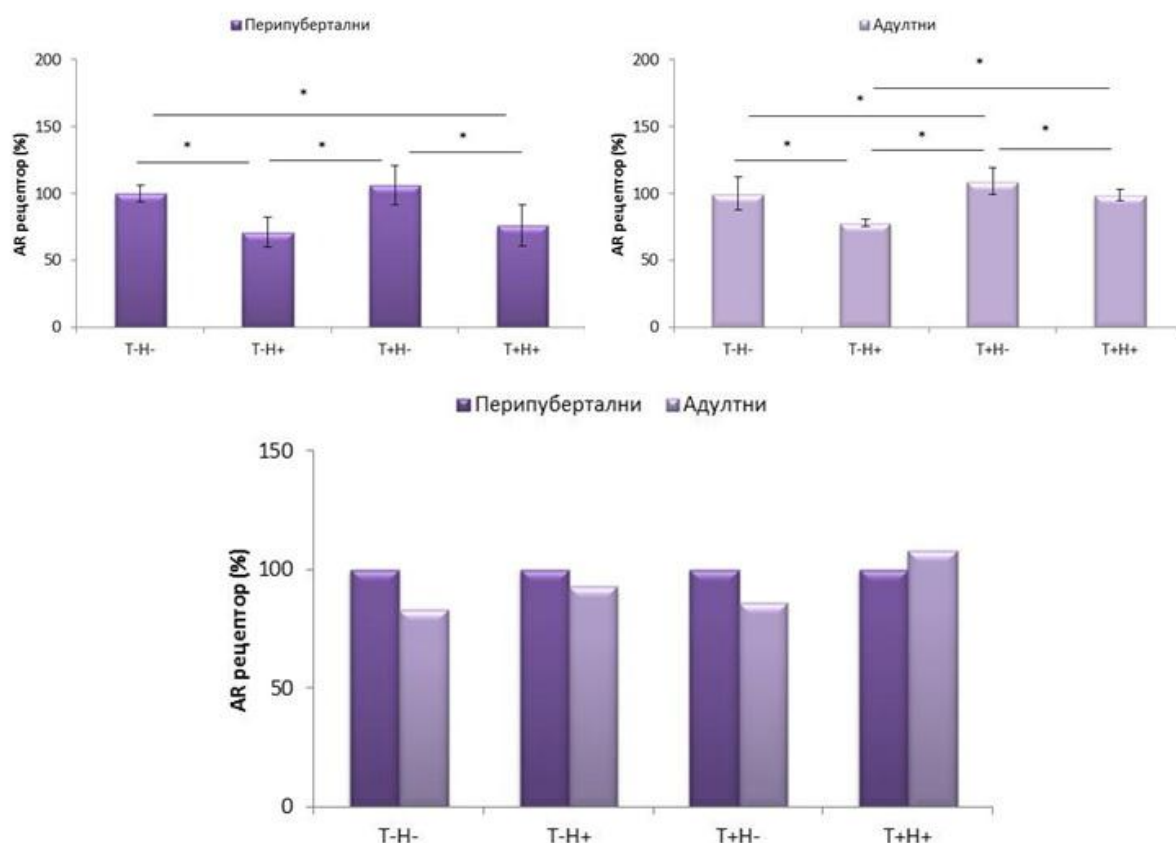


Слика 15. Ткивни пресек тетсиса код адултних мужјака. Увеличање 200х.

На сликама попречног пресека ткива тетсиса код адултних мужјака у Т-Н- групи не уочавају се промене у структури тетсиса. У групама које су третиране нандролон деканоатом самостално или удружене са тренингом пливањем уочава се смањење дијаметра семених каналића и проширење интерстицијумског простора. У Т+Н- групи уочавамо само проширење интерстицијумског простора у поређењу са контролом (Слика 15).

#### 4.3.5. Андрогени рецептор

Квантификацију андрогеног рецептора одредили смо након хроничне апликације нандролон деканоата и тренинга пливањем код перипуберталних и адултних мужјака пацова. Промене количине андрогеног рецептора приказане су на графикону бр. 18 и на сликама бр. 13 и бр. 14.

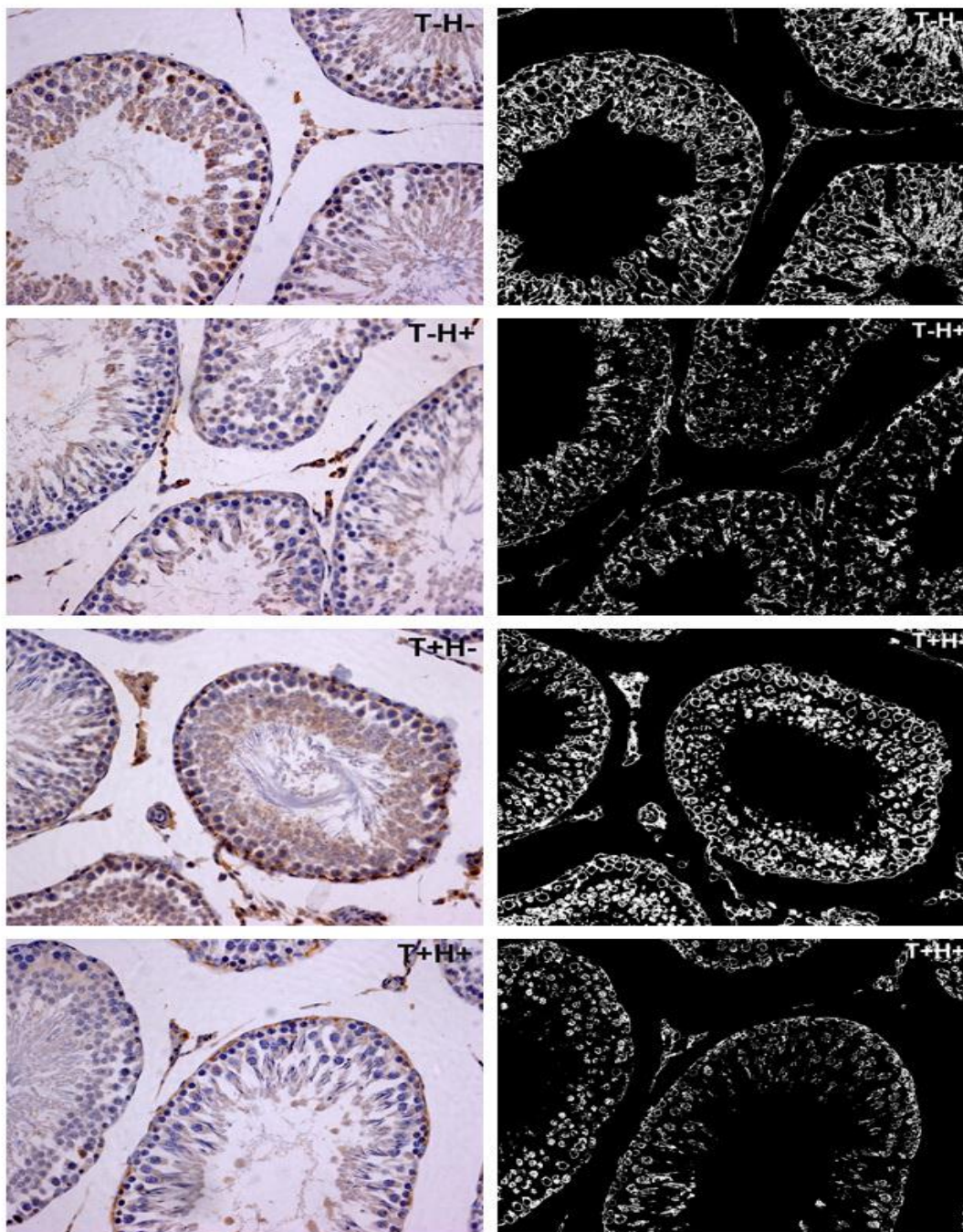


Графикон 18. Морфометријска анализа андрогеног рецептора у тестису код перипуберталних и адултних пацова као и међусобно поређење вредности андрогеног рецептора у односу на испитиване старосне доби пацова (средње процентуалне вредности ±SD)

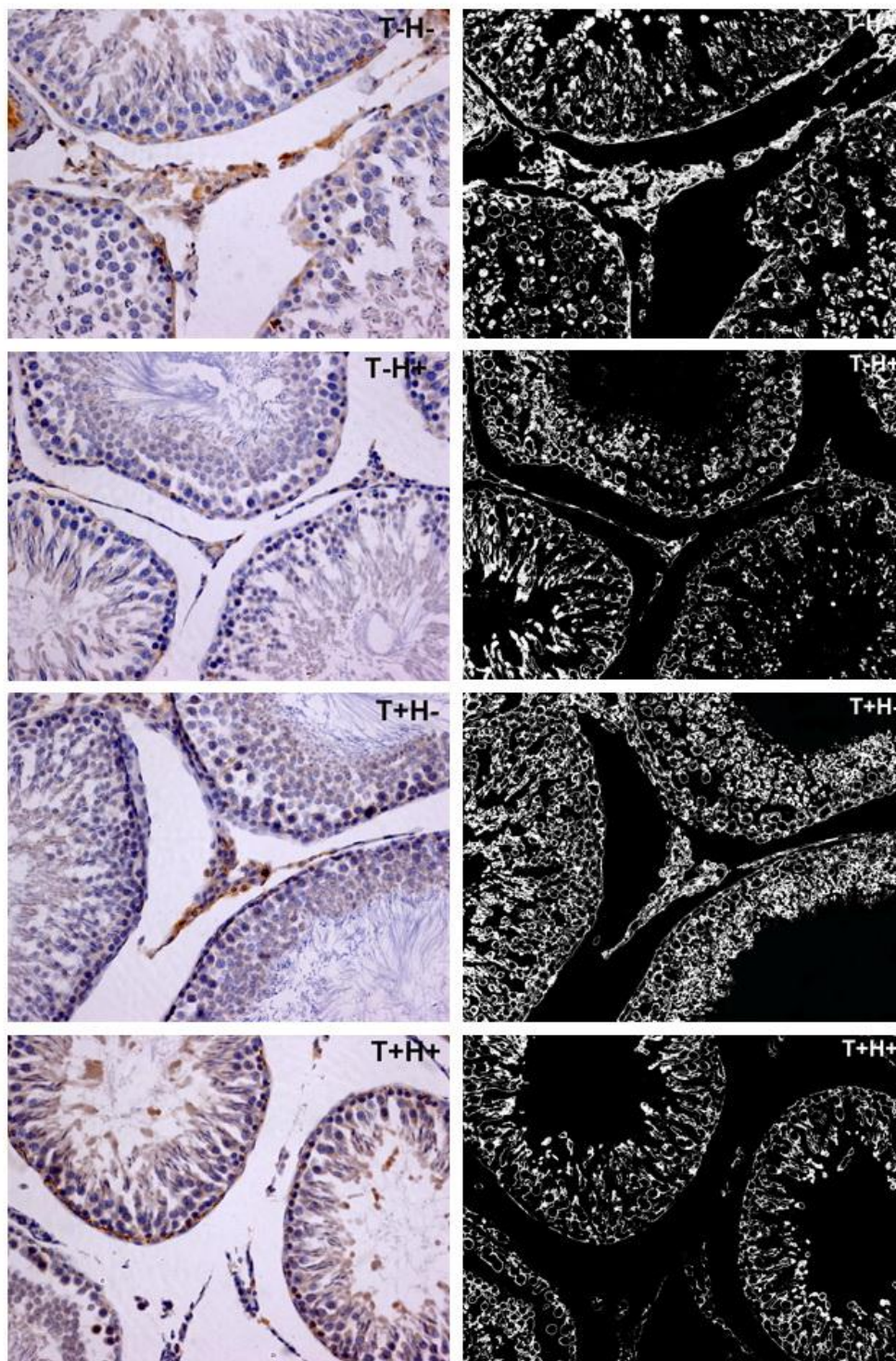
У перипуберталној популацији испитиваних животиња, количина андрогеног рецептора у експерименталним групама промењена је у односу на контролну групу. Самостално примењен нандролон, смањило је имунореактивност андрогеног рецептора за 29% ( $p < 0.05$ ), самосталан тренинг повећао је имунореактивност рецептора за 6% ( $p > 0.05$ ) док је комбинована примена нандролон деканоата и тренинга пливањем, смањила за 24% ( $p < 0.05$ ) ниво имунореактивности андрогеног рецептора у односу на контролне вредности. Поређењем између експерименталних група, тренинг пливањем повећао је имунореактивност рецептора за 50% ( $p < 0.05$ ) и 39% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон и његову комбиновану примену са тренингом пливањем (редом). У T+N+ групи, број је повећан за 8% ( $p < 0.05$ ) у односу на T-N+ групу (Графикон 18).

Код адултних мужјака, ниво имунореактивности андрогеног рецептора је промењен у експерименталним групама односу на контролу. У Т-Н+ групи имунореактивност рецептора смањена је за 22% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н+ групи за 1% ( $p < 0.05$ ) док је у Т+Н- групи ниво имунореактивности рецептора повећан за 9% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т-Н- групу. Самостално примењен нандролон деканоат смањео је имунореактивност рецептора за 28% ( $p < 0.05$ ) и 21% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу и Т+Н+ групу (редом). Тренинг пливањем повећао је имунореактивност рецептора за 10% ( $p < 0.05$ ) у односу на комбиновану примену нандролон деканоата и тренинга пливањем (Графикон 18).

Поређењем вредности између две старосне групе пацова, у адутној популацији мужјака ниво имунореактивности андрогеног рецептора, смањен је у Т-Н- групи за 17%, у Т-Н+ групи за 7%, у Т+Н- групи за 14% док је у Т+Н+ групи повећана имунореактивност рецептора за 8% у односу на перипуберталну популацију мужјака (Графикон 18).



Слика 16. Имуноцитохемијско обележавање андрогеног рецептора на тестису (лево). Маске сегментисаних AR позитивних регија код перипуберталних мужјака пацова (десно) (увеличање 200x).



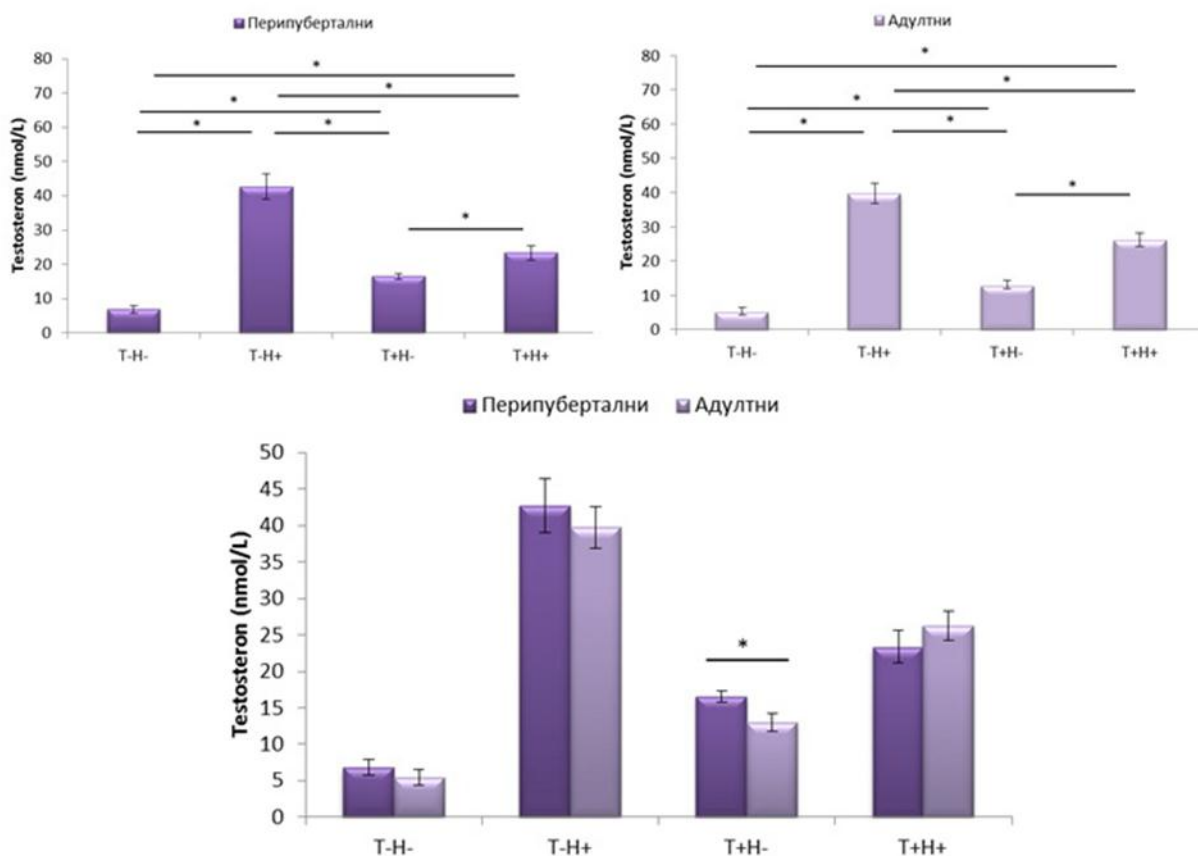
Слика 17. Имуноцитохемијско бојење андрогеног рецептор на тестису (лево). Маске сегментисаних AR позитивних регија код адултних мужјака пацова (десно) (увеличање 200x).



Имунореактивност на андрогени рецептор (AR) у ткиву тестиса су на нашем материјалу показале Сертолијеве, Лејдигове и перитубуларне миоидне ћелије. За разлику од Лејдигових и миоидних ћелија где су депозити AR локализовани дифузно по цитоплазми, код Сертолијевих ћелија је уочљив потпуно другачији образац локализације. Имунореактивност на AR верификована је искључиво у нуклеарном региону. Герминативне ћелије тестиса су по правилу биле негативне на AR (слике 16,17).

#### 4.3.6. Серумске вредности тестостерона

Вредности тестостерона код перипуберталних и адултних мужјака пацова одређивали смо у узорцима серума. Промене серумских вредности тестостерона приказани су на графикону број 19.



Графикон 19. Серумске вредности тестостерона код перипуберталних, адултних мужјака пацова као и вредности овог хормона поређене у односу на испитиване старосне доби. Вредности су представљене као средње вредности  $\pm$ SD

Серумских вредности тестостерона, код перипуберталних мужјака пацова, повишене су у свим експерименталним групама ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. Повећање вредности тестостерона у Т-Н+ групи је 524% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н- групи је 141% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н+ групи је 240% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Поређењем између експерименталних група, самосталан тренинг пливањем као и његова комбинација са нандролон деканоатом смањила је вредности хормона за 61% ( $p < 0.05$ ) и 45% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на самостално примењен нандролон. У Т+Н+ групи, пораст вредности хормона је 41% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 19).

Код адултних мужјака, тестостерон је повишен у Т-Н+ групи за 636% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н- групи за 141% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н+ групи за 386% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т-Н- групу. Самосталан тренинг пливањем као и његова комбинована примена са нандролон деканоатом, довела је до смањења вредности овог хормона за 67% ( $p < 0.05$ ) и 34% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на Т-Н+ групу. У Т+Н+ групи дошло је до повећања вредности тестостерона за 101% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 19).

Поређењем између испитиваних старосних доби пацова, вредности овог хормона, снижене су у адултној популацији у односу на перипуберталну и то у Т-Н- за 21% ( $p > 0.05$ ), у Т-Н+ за 7% ( $p > 0.05$ ) и у Т+Н- групи за 21% ( $p < 0.05$ ). Једино је у Т+Н+ групи тестостерон повишен у адултној популацији у односу на перипуберталну за 12% ( $p > 0.05$ ) (Графикон 19).

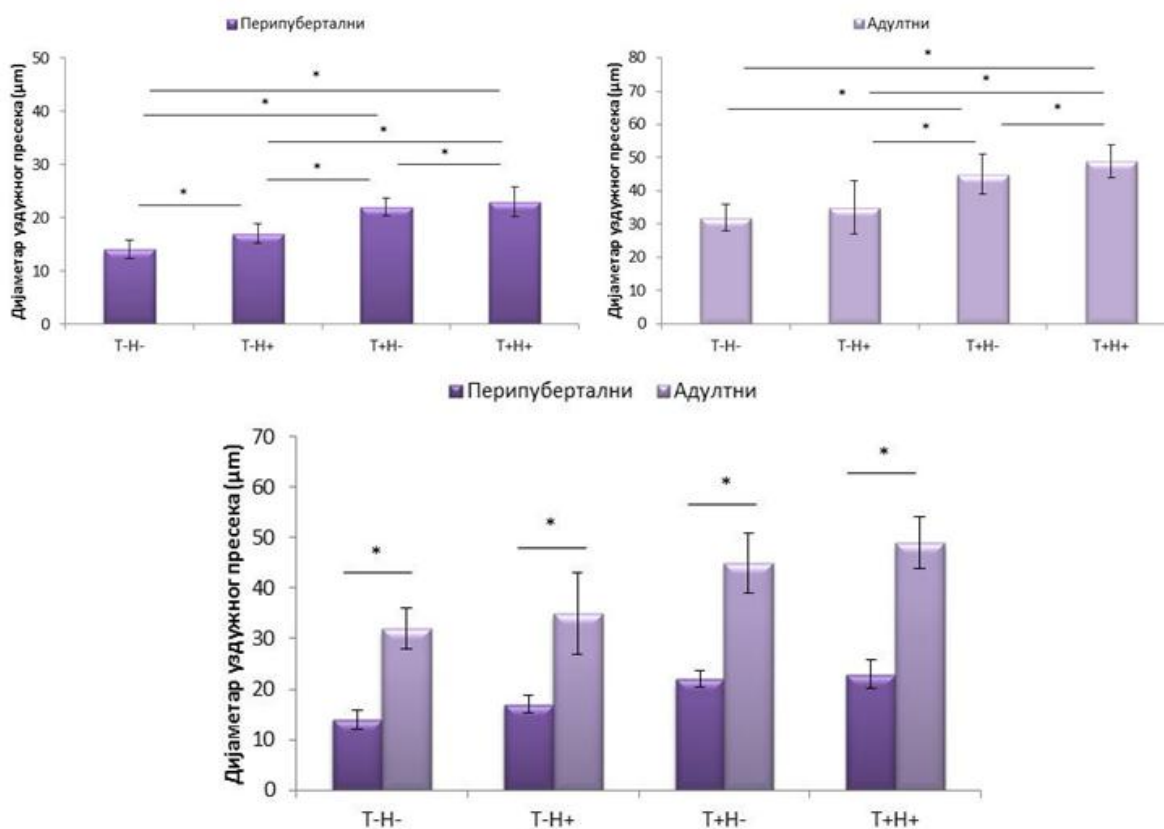
#### **4.4. Скелетни мишић**

##### **4.4.1. Морфометријски параметри скелетног мишића**

Морфометријска анализа мишићних ћелија, обављена је како би се проценио ефекат самосталне примене нандролон деканоата, самосталног тренинга као и њихова удружена примена на димензије ћелија скелетних мишића. У нашем експерименту узимали смо квадрицепс као модел за анализу скелетног мишића.

#### 4.4.2. Дијаметар уздужног пресека мишићних ћелија квадрицепса

Морфометријском анализом уздужног пресека квадрицепса, одредили смо промене дијаметар скелетне мишићне ћелије након четворнедељног експерименталног протокола. Резултати су приказани на графикону бр. 20.



Графикон 20. Средње вредности дијаметра уздужног пресека скелетног мишића код перипуберталних, адултних мужјака као и њихов међусобни однос између испитиваних старосних доби. Вредности су представљене као средње ± SD.

Дијаметар уздужног пресека мишићних ћелија квадрицепса код перипуберталних пацова повећан је ( $p < 0.05$ ) у свим експерименталним групама у поређењу са контролном групом. Самостална примена нандролонa довела је до повећања дијаметра за 21% ( $p < 0.05$ ). Сам тренинг пливањем, изазвао је повећање од 57% ( $p < 0.05$ ), док је комбинација нандролон деканоата и тренинга довела до повећања уздужног пресека мишићних ћелија

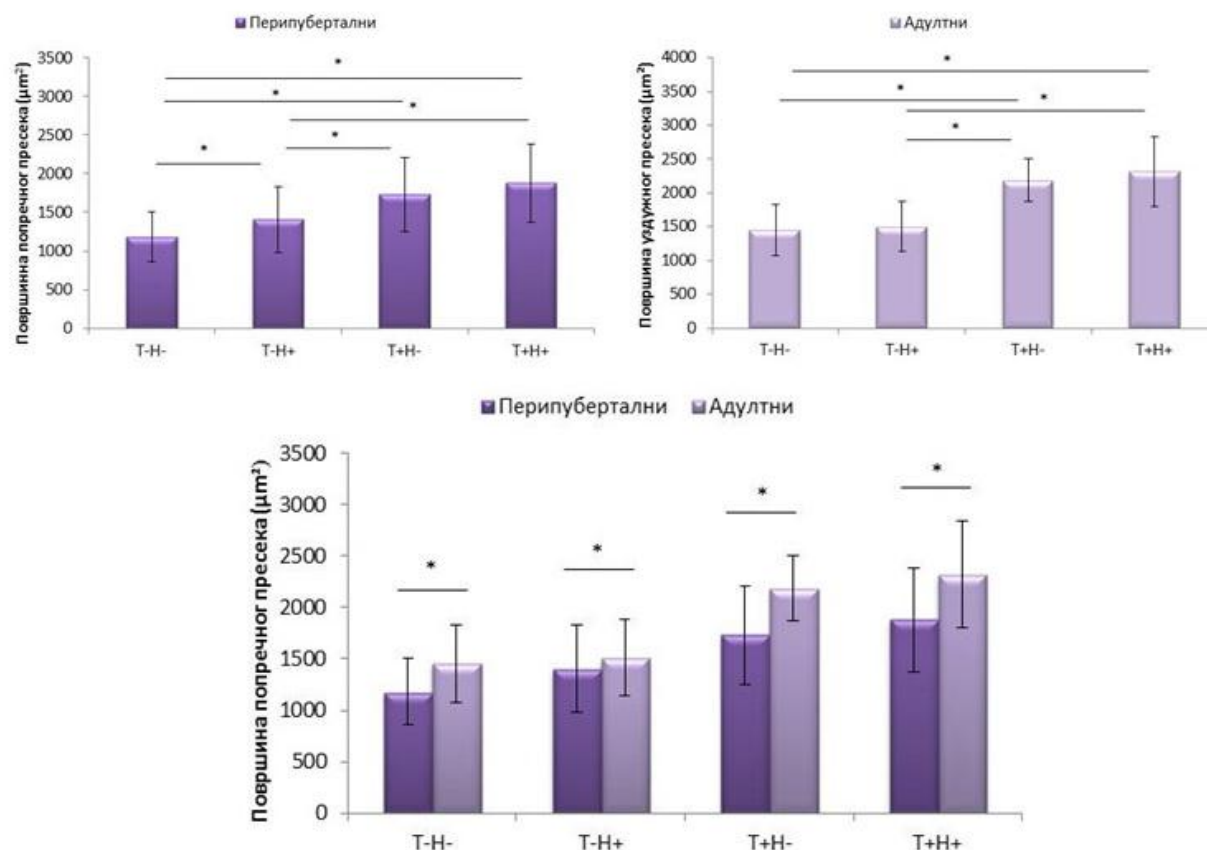
квадрицепса за 64 % ( $p < 0.05$ ) у поређењу са контролним вредностима. Самостално тренинг довео је до пораста дијаметра за 29% ( $p < 0.05$ ) док је тренинг у комбинацији са нандролоном довео до пораста за 35% ( $p < 0.05$ ) у односу на групу која је самостално примала нандролон. T+N+ у односу на T+N- довео је до пораста за 4% ( $p > 0,05$ ) (Графикон 20).

Код адултних мужјака пацова, дијаметар уздужног пресека је повећан у свим експерименталним групама у односу на контролу, али само у T-N + групи ( $p > 0.05$ ) повећање није статистички значајно. Самостална примена нандролона повећала је за 9%, тренинг пливањем је повећао за 40% ( $p < 0.05$ ), а комбинација нандролон деканоата и тренинга повећала је за 43% ( $p < 0.05$ ) дијаметар уздужног пресека мишићне ћелије квадрицепса. Тренинг пливањем довео је до пораста дијаметра мишићне ћелије за 28% а тренинг у комбинацији са нандролоном повећао је дијаметар за 40% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон. T+N+ у односу на T+N - групу доводи до повећања за 8% ( $p > 0,05$ ) (Графикон 20).

Посматрајући дијаметар уздужног пресека мишићне ћелије, са старењем се дијаметар повећава. У свим групама дошло је до пораста дијаметра. У контролној групи, пораст је био 128% ( $p < 0.05$ ), у групи која је самостално примала нандролон, пораст је био 105% ( $p < 0.05$ ). Сам тренинг довео је до пораста за 104% ( $p < 0.05$ ) а тренинг у комбинацији са нандролоном повећао је дијаметар ћелија квадрицепса за 113% ( $p < 0.05$ ) код адултних у односу на перипуберталне мужјаке (Графикон 20).

#### **4.4.3. Површине попречног пресека мишићних ћелија квадрицепса**

Промену површине попречног пресека скелетне мишићне ћелије, код перипуберталних и адултних мужјака пацова након хроничног третмана нандролон деканоатом и тренингом пливањем, одређена је морфометријском анализом. Резултати су приказани на графикону бр. 21.



Графикон 21. Средње вредности површине попречног пресека мишићних ћелија квадрицепса код перипуберталних и адултних мужјака као и њихов међусобни однос. Вредности су представљене као средње  $\pm$  SD.

Након завршеног експерименталног процеса, код перипуберталних пацова, дошло је до пораста површине попречног пресека мишићних ћелија квадрицепса. Нандролон је индуковао повећање од 19%, тренинг је довео до повећања од 47% ( $p < 0.05$ ), а нандролон у комбинацији са тренингом индуковао је повећање од 59% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролу. Поређењем између експерименталних група, примећено је да Т+Н- и Т+Н+ доводе до пораста површине попречног пресека за 23% ( $p < 0.05$ ), односно 33% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон. Т+Н+ у односу на Т+Н- довео је до пораста за 8% ( $p > 0,05$ ) (Графикон 21).

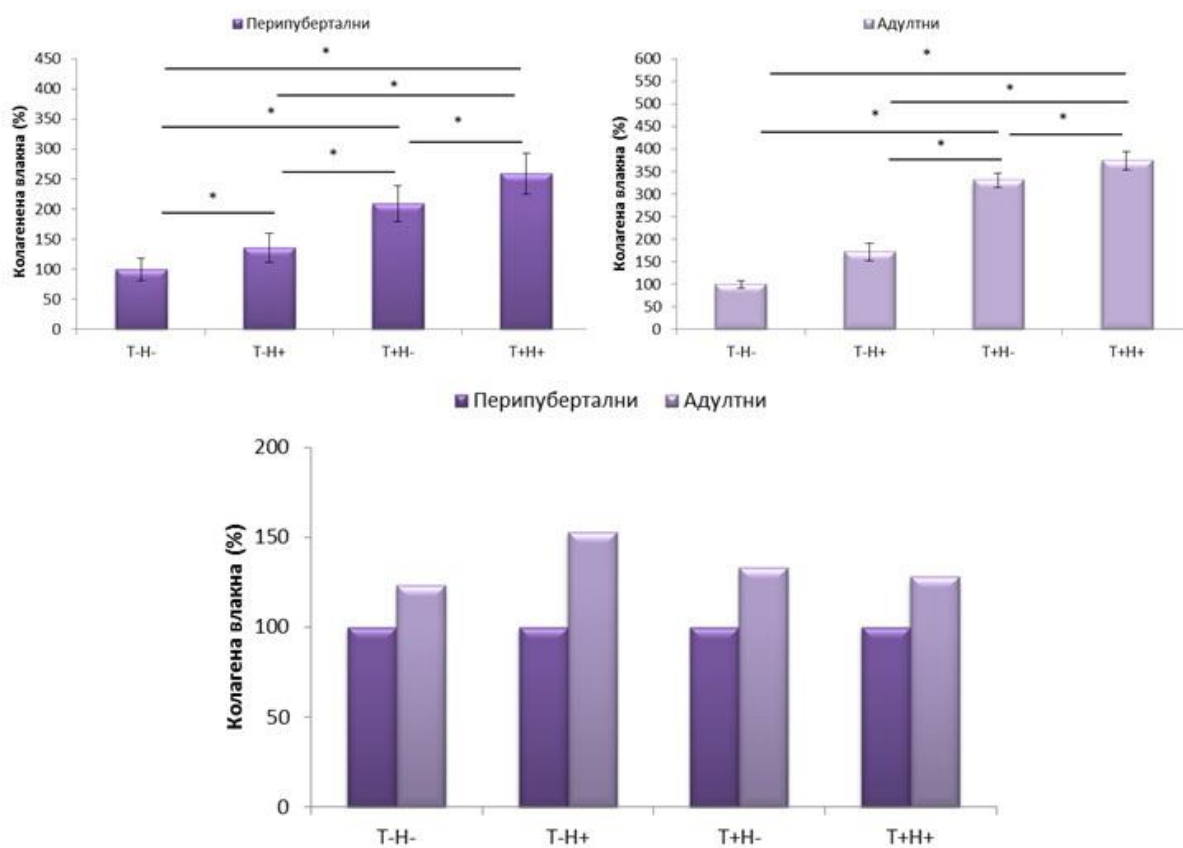
Код адултих пацова, површина попречног пресека значајно је повећана у свим групама осим у Т-Н + групи где повећање није било статистички значајно. Самостална примена нандролона индукује повећање од 4% ( $p > 0,05$ ), тренинг самостално повећава

50% ( $p < 0.05$ ) док нандролон у комбинацији са тренингом доводи до повећања 59% ( $p < 0.05$ ). Тренинг самостално или у комбинацији са нандролоном доводи до повећања површине попречног пресека мишићних ћелија квадрицепса за 44% ( $p < 0.05$ ) и 53% ( $p < 0.05$ ) (редом). Т+Н+ у односу на Т+Н- доводи до повећања за 5 % ( $p > 0,05$ ) (Графикон 21).

Са старењем, повећава се и површина попречног пресека мишићних ћелија квадрицепса. У контролној групи дошло је до пораста за 23% ( $p < 0.05$ ), у групи која примала нандролон пораст је био 7 % ( $p < 0.05$ ), тренинг је довео до пораста за 26% ( $p < 0.05$ ), док је комбинована примена нандролон деканоата и тренинга довела до пораста површине за 23% ( $p < 0.05$ ) код адултних животиња у односу на перипуберталне (Графикон 21).

#### **4.4.4. Морфометријска анализа колагених влакана у скелетном мишићу**

Промену количине колагених влакана у мишићним ћелијама квадрицепса, код перипуберталних и адултних мужјака пацова, квантификовали смо након завршетка четворонедељног експерименталног протокола. Резултати су приказани на графикону бр. 22 и на сликама бр. 18 и бр. 19.



Графикон 22. Процентуална заступљеност колагених влакана у скелетном мишићу код перипуберталних и адултних мужјака пацова као и њихов међусобни однос. Вредности су представљене као средње процентуалне вредности  $\pm$  SD

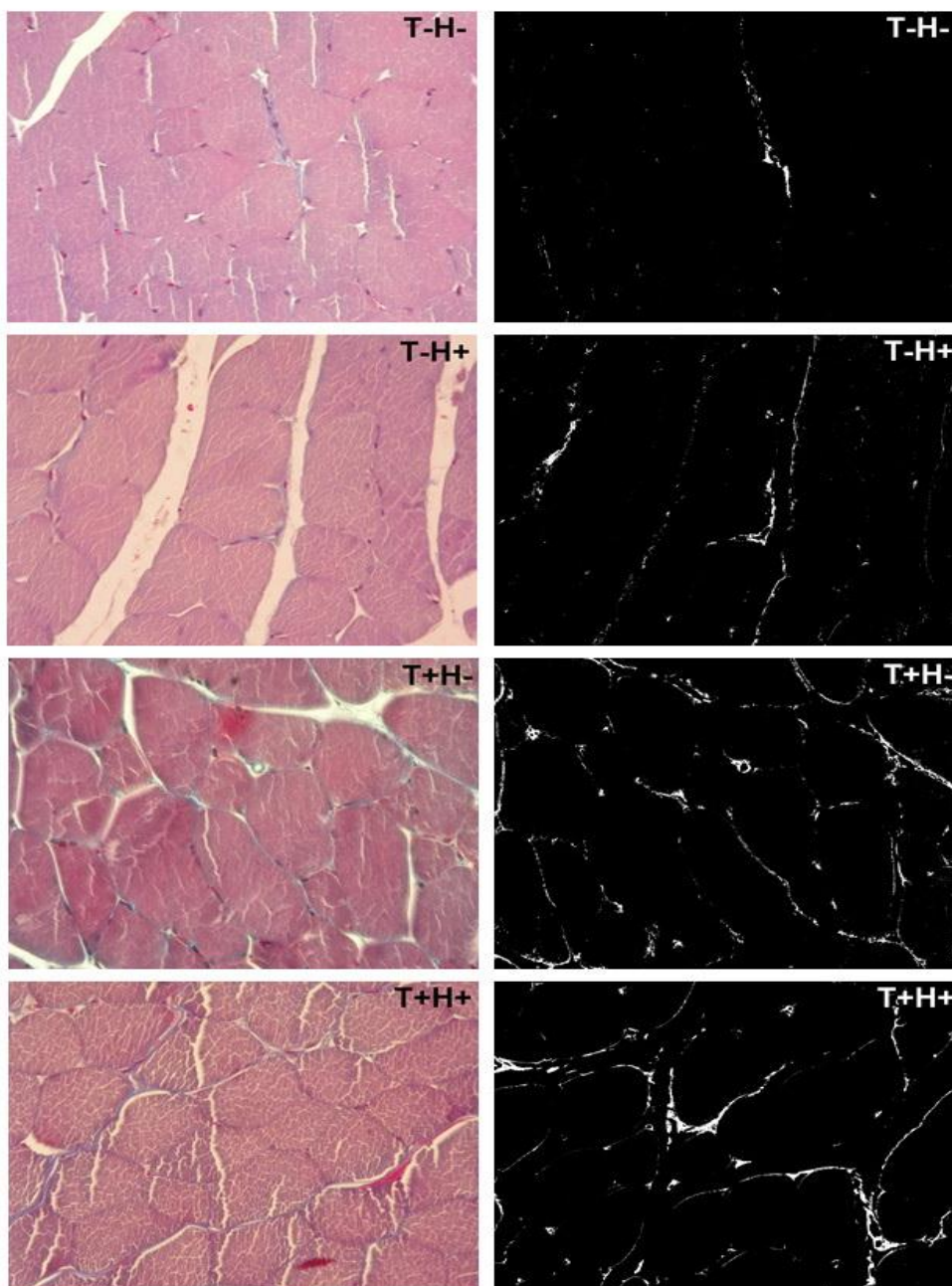
На крају експеримента, код перипуберталних животиња, количина колагених влакана повећана је у свим експерименталним групама у поређењу са контролом. Повећање површине колагених влакана у Т-Н+ групи било је 36 % ( $p < 0.05$ ), у Т+Н- групи је 109 % ( $p < 0.05$ ), у Т+Н+ групи је 159% ( $p < 0.05$ ). Поређењем унутар експерименталних група, тренинг пливањем самостално и удружен са нандролоном довео је до повећања количине колагена за 54 % ( $p < 0.05$ ) и 90 % ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на самостално примењен нандролон. У Т+Н+ групи количина колагена се повећала за 24% у ( $p < 0.05$ ) односу на Т+Н- групу (Графикон 22).

Код адултних мужјака пацова, количина колагених влакана, повећана је у експерименталним групама у односу на контролне вредности. Самостално примењен

нандролон деканоат повећао је количину колагених влакана за 72% ( $p < 0.05$ ), тренинг пливањем за 231% ( $p < 0.05$ ) док је комбинована примена нандролон деканоата и тренинга пливањем повећала количину колагена за 274% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Поређењем вредности унутар експерименталних група, тренинг пливањем повећао је количину колагена за 34% ( $p < 0.05$ ) док је његова комбинована примена са нандролом деканоатом повећала вредности овог параметра за 59% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон деканоат. Комбинована примена нандролон и тренинга довела је до повећања за 19% ( $p < 0.05$ ) у односу на тренинг пливањем (Графикон 22).

Поређење количине колагених влакана између перипуберталних и адултних мужјака пацова, у адултној популацији вредности су повећане у односу на перипуберталне. У Т-Н- групи повећање је било 23%, у Т-Н+ групи за 53%, у Т+Н- групи за 33%, у Т+Н+ групи за 28% (Графикон 22).

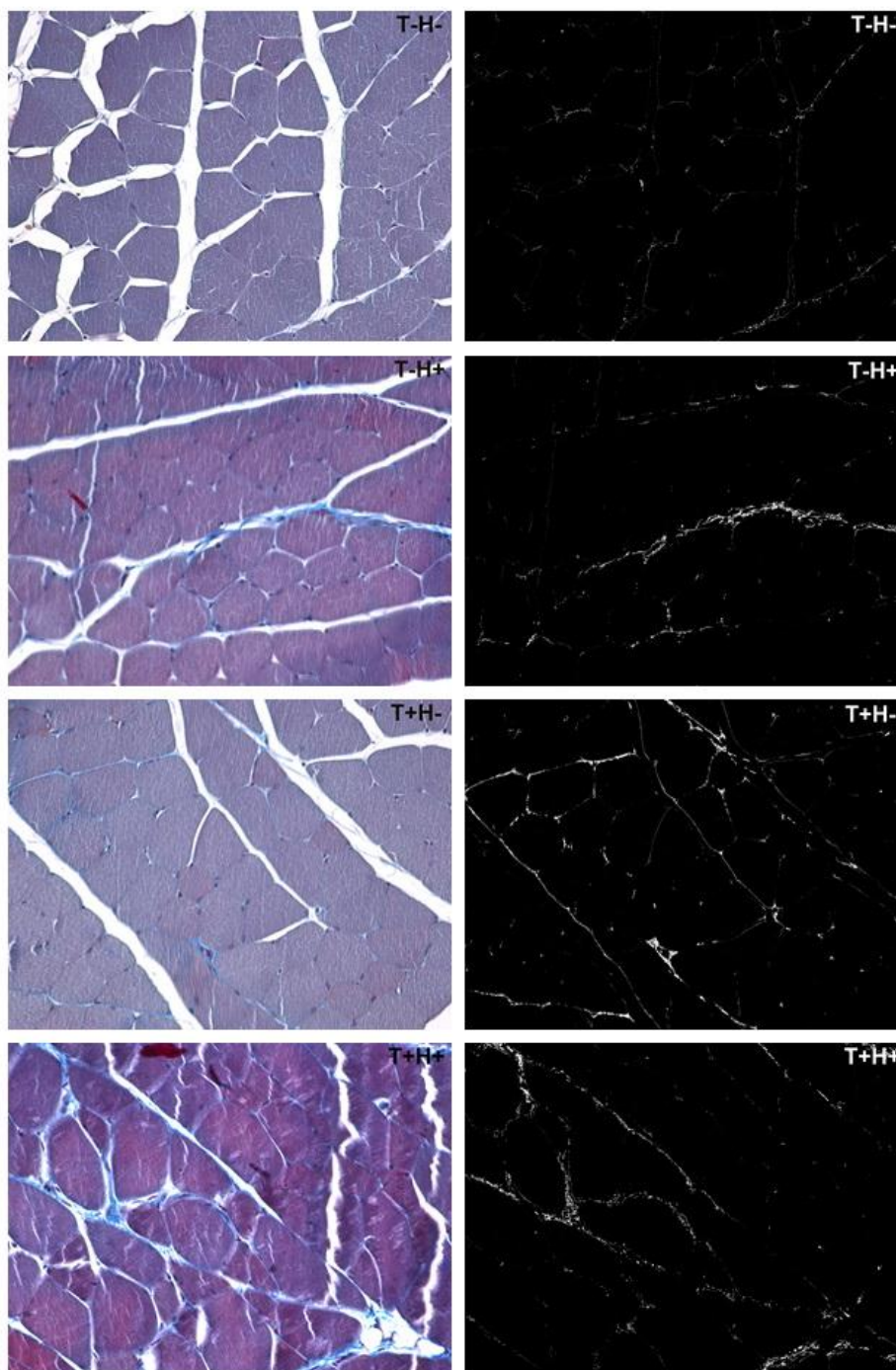




Слика 18. Хистохемијски обележени депозити колагених влакана Masson trichrome-атским бојењем (лево). Маске сегментисаних обележених колагених влакана (десно) код перипуберталних мужјака пацова (увеличање 200x).

У контролној групи перипуберталних пацова, депозити колагена су слабо изражени, ендомизијална влакна су танка и дискретна што можемо видети и на одговарајућој маски.

У Т-Н+ групи, депозити колагена у перимизијуму су нешто јаче изражени у односу на контролу. У Т+Н- групи, дошло је до значајног повећања количине колагених влакана доминантно како у ендомизијуму, али добрим делом и у перимизијуму скелетног мишића. Јасно се на микрофотографијама и сегментираним маскама ове групе може уочити да је знатно већи проценат мишићних ћелија обавијен дебљим влакнима. Овај ефекат је посебно изражен у Т+Н+ групи. Задебљала колагена влакна перимизијума обухватају танке снопове од по неколико удружених ћелија, док се количина ендомизијалних влакана није знатно увећала у односу на Т+Н- групу (слика 15).

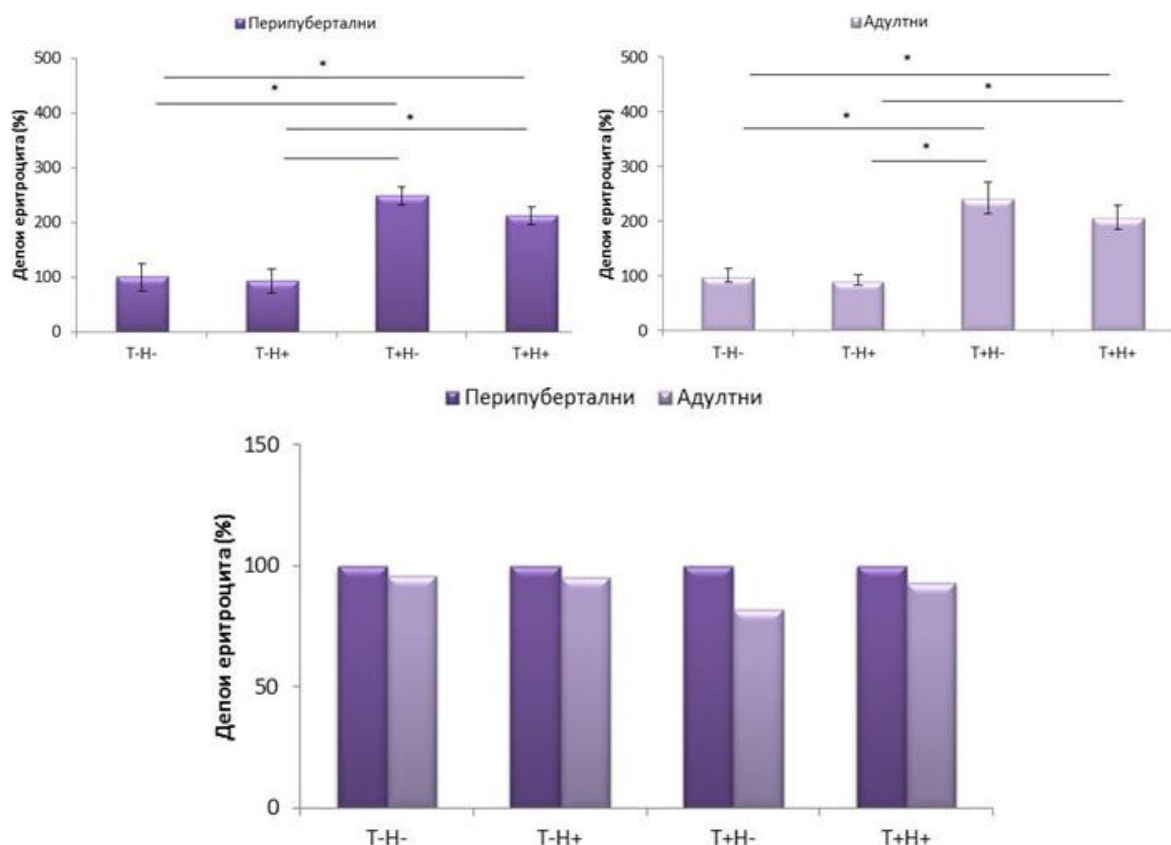


Слика 19. Хистохемијски обележени депозити колагених влакана Masson trichrome-атским бојењем (лево). Маске сегментисаних обележених колагених влакана (десно) код адултних мужјака пацова (увеличање 200x).

Хистохемијска и морфометријска анализа колагених влакана у скелетном мишићу код адултних пацова показује сличан резултат као у перипуберталној групи. У контролној групи ендомизијална колагена влакна су нежна и танка, док је перимизијум једва видљив на сегментисаним маскама депоа колагена. У групи животиња које су третиране само нандролоном дошло је до задебљања колагених влакана доминантно у перимизијуму, док је ендомизијум углавном непромењен. Готово супротан налаз је верификован у Т+Н- групи где је дошло до задебљања ендомизијума, док је перимизијум сличног састава као и код контролне групе. У Т+Н+ групи видљиво је значајније увећање количине колагена и у ендомизијуму и у перимизијуму (слике 18, 19).

#### **4.4.5. Еритроцитни депои у скелетном мишићу**

У мишићном ткиву квадрицепса, квантификовали смо еритроцитне депое код перипуберталних и адултних мужјака пацова након хроничне апликације нандролон деканоата и тренинга пливањем. Промене вредности еритроцитних депоа приказани су на графикону бр. 23 и на сликама бр. 20 и бр. 21.



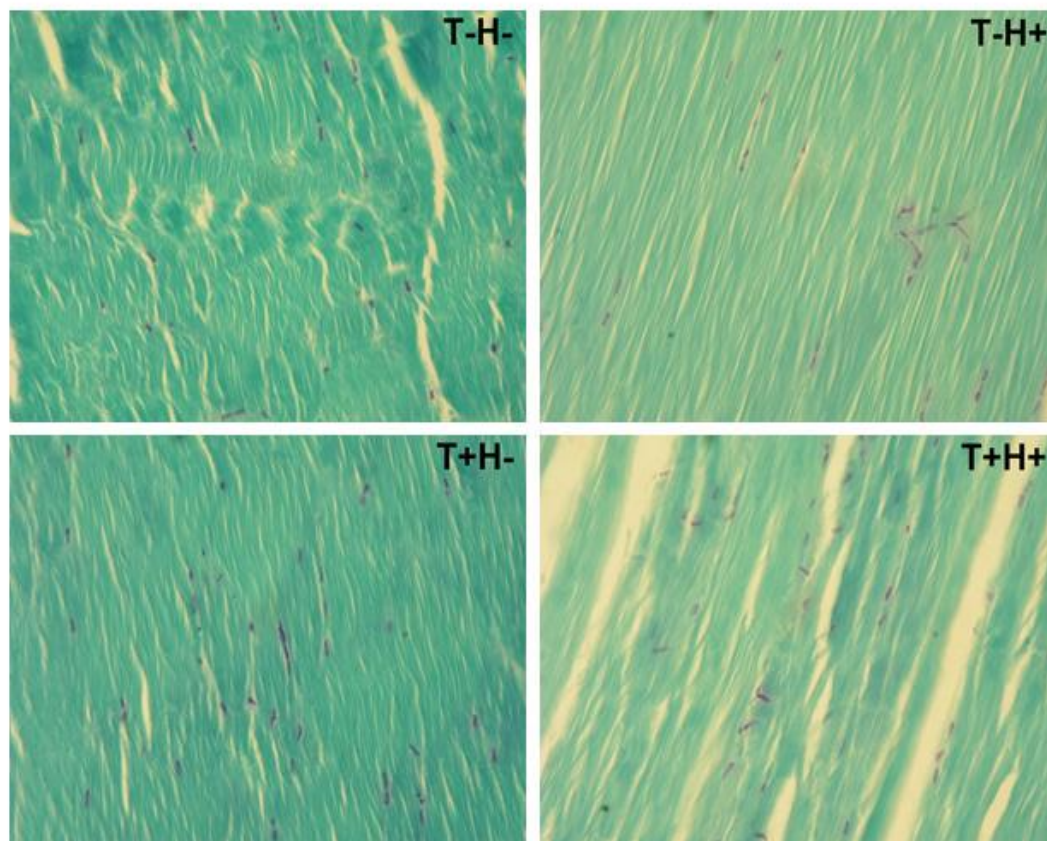
Графикон 23. Вредности депоа еритроцита у скелетном мишићу код перипуберталних и адултних мужјака пацова, као и међусобни однос између испитиваних старосних доби. Вредности су представљене као средње процентуалне вредности  $\pm$  SD.

Код перипуберталних мужјака, самостална примена нандролоне довела је до смањења еритроцитних депоа за 7% у односу на контролу, док је тренинг пливањем сам или у комбинацији са нандролоном довео до повећања еритроцитних депоа за 149% ( $p < 0.05$ ) и 112% ( $p < 0.05$ ) (редом). Тренинг пливањем довео је до повећања депоа еритроцита за 167% ( $p < 0.05$ ) док је тренинг у комбинацији са нандролоном довео до повећања за 127% ( $p < 0.05$ ) у односу на самосталну примену нандролоне. Комбинована примена нандролоне и тренинга повећала је количину еритроцита у мишићима за 17% ( $p < 0.05$ ) (Графикон 23).

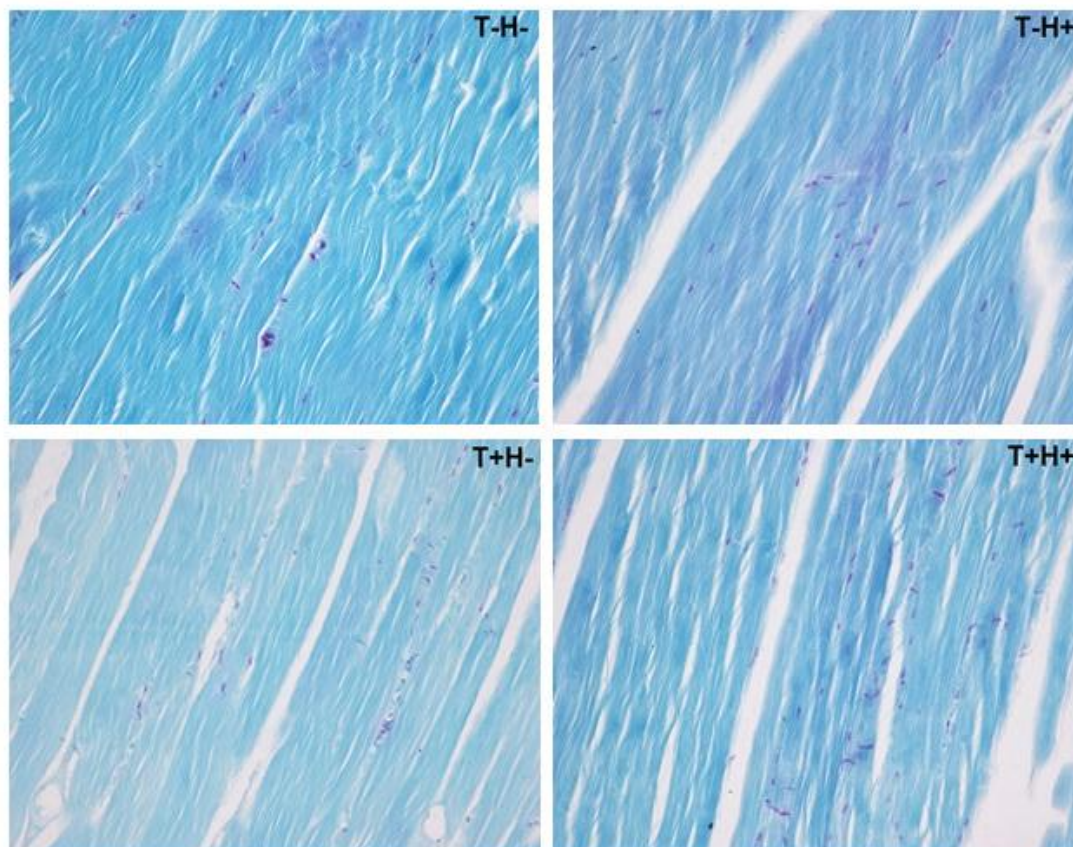
Код адултних мужјака пацова, самостално примењен нандролон деканоат довео је до смањења еритроцитних депоа за 8% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т-Н- групу, док је тренинг

пливањем самостално (142%;  $p < 0.05$ ) или у комбинованој примени са нандролон деканоатом (107%;  $p < 0.05$ ) повећао количину еритроцитних депоа у односу на контролне вредности. Поређењем у оквиру самих експерименталних група, самосталан тренинг пливањем повећо је количину еритроцитних депоа за 133% ( $p < 0.05$ ) а његова комбинована примена са нандролон деканоатом за 124% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон деканоат. У T+N+ групи дошло је до смањења за 4% ( $p > 0.05$ ) у односу на T+N- групу (Графикон 23).

Поређењем између две старосне доби пацова, смањење еритроцитних депоа у T-N- групи је 4%, у T-N+ групи је 5%, T+N- групи је 18%, у T+N+ групи је 7% код адултних мужјака пацова у односу на перипуберталне мужјаке (Графикон 23).



Слика 20. Хистохемијски обележени еритроцити у скелетном мишићу код перипуберталних пацова (увеличање 200x).

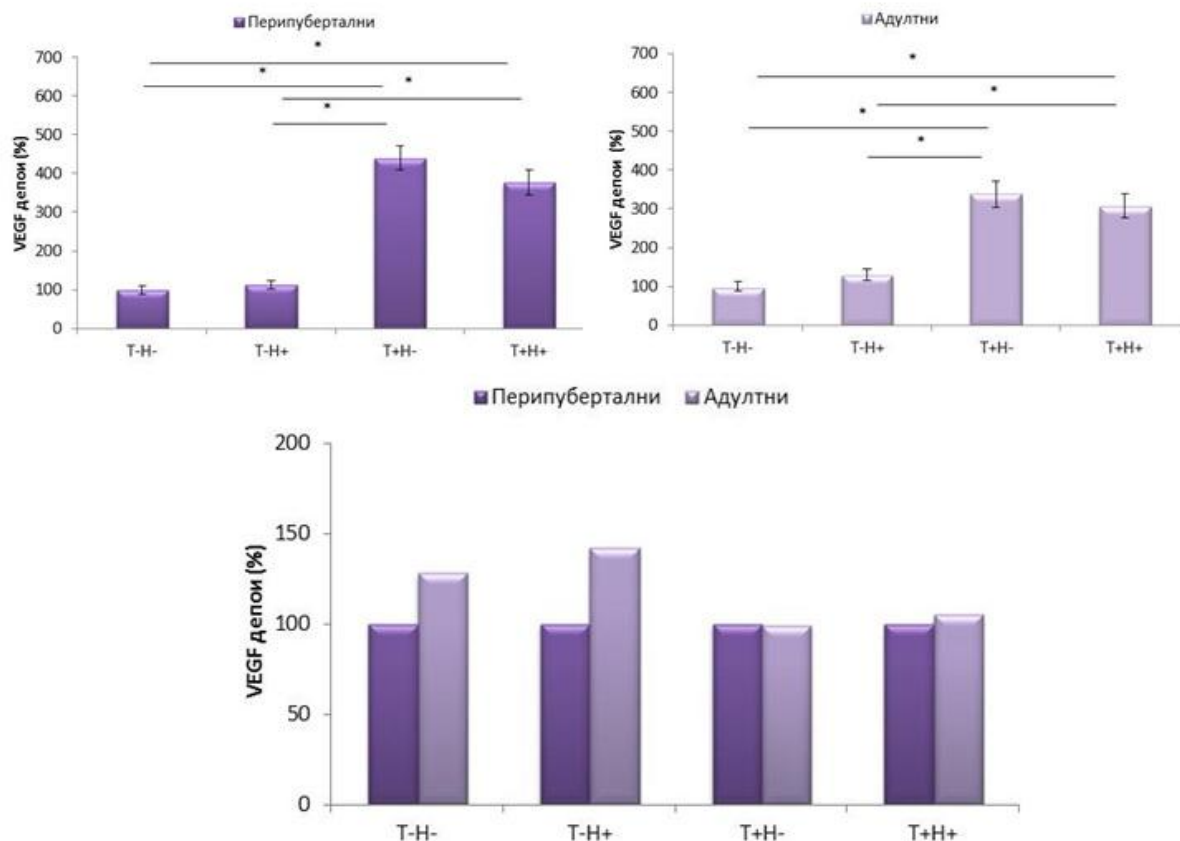


Слика 21. Хистохемијски обележени еритроцити у скелетном мишићу код адултних мужјака пацова (увеличање 200x).

Хистохемијска Новели метода показује еритроцитне депозите у скелетном мишићном ткиву пацова који одговарају нивоу прокрвљености мишића. Јасно је видљиво да су депои еритроцита израженији у групама које су биле изложене тренингу у обе старосне категорије. Појачана разгранатост и већа заступљеност крвних судова је приметна у овим групама (слика18,19).

#### 4.4.6. Васкуларни ендотелијални фактора раста (VEGF) у скелетном мишићу

Васкуларни ендотелијални фактора раста, као један од маркера ангиогенезе која настаје услед прекомерне физичке активности, одредили смо у мишићним ћелијама квадрицепса код перипуберталних и адултних мужјака након завшеног експерименталног процеса. Морфометријском методом, квантификовали смо промене количине VEGF депоа као и број имунопозитивних ћелија у мишићу квадрицепса. Резултати су представљени на графикону бр. 24 и бр. 25 и на сликама бр. 22 и бр. 23.



Графикон 24. Средње вредности депоа VEGF-а код перипуберталних и адултних мужјака као и међусобни однос између две испитиване старосне доби пацова. Вредности су представљене као средње вредности (изражене у %)  $\pm$ SD.

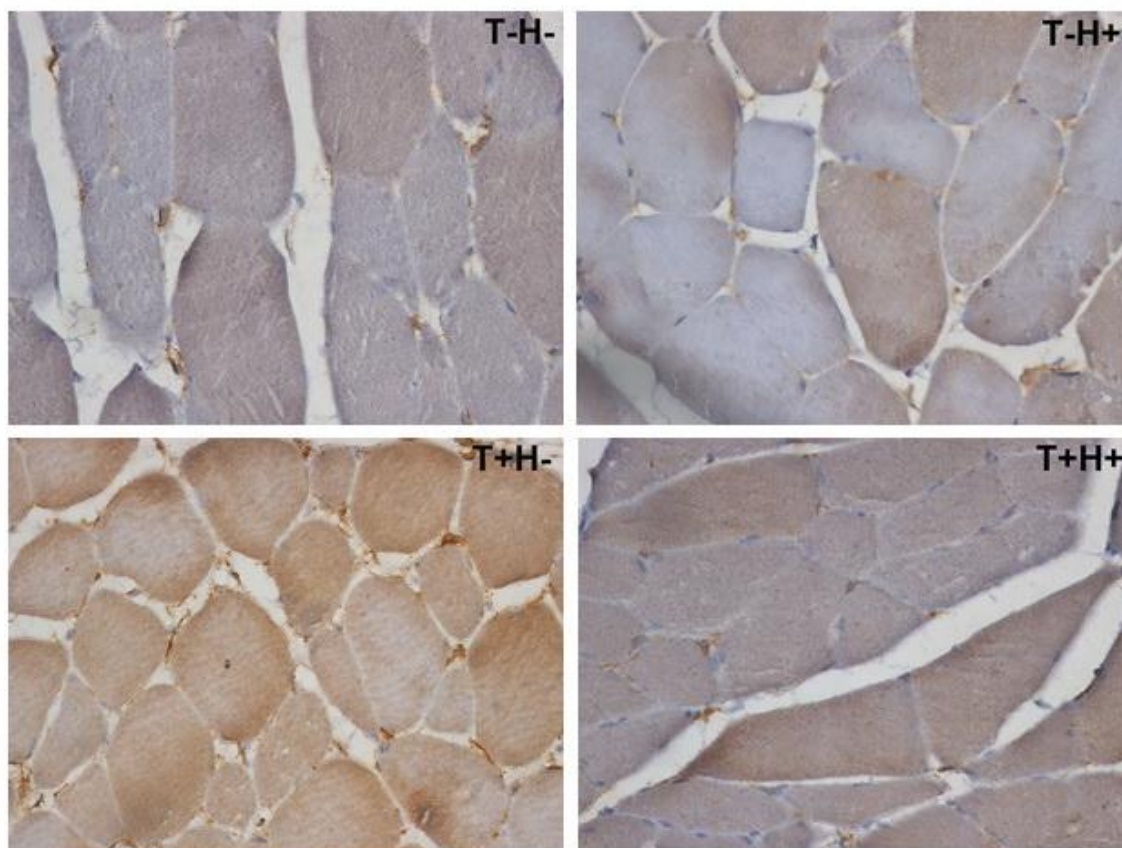
Код перипуберталних мужјака, депои VEGF-а повећани су у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. Пораст VEGF-а у T-N+ групи је 13 % ( $p > 0.05$ ), у T+N- групи је 339 % ( $p < 0.05$ ), а у T+N+ групи 277 % ( $p < 0.05$ ). Поређењем у оквиру експерименталних група, тренинг је довео до пораста количине VEGF-а за 272 % ( $p < 0.05$ ), а тренинг у комбинацији са нандролоном за 219 % ( $p < 0.05$ ), у односу на самосталну примену нандролона. Тренинг пливањем у комбинацији са нандролоном довео је до смањења количине VEGF-а у скелетном мишићу за 16 % ( $p > 0.05$ ), у односу на самосталан тренинг пливањем (Графикон 24).

Депои VEGF-а у скелетном мишићу, код адултних мужјака пацова, повећани су у свим експерименталним групама у односу на контролу. Самостално примењен нандролон повећао је депое VEGF-а за 30% ( $p < 0.05$ ), тренинг пливањем за 238% ( $p < 0.05$ ), а њихова

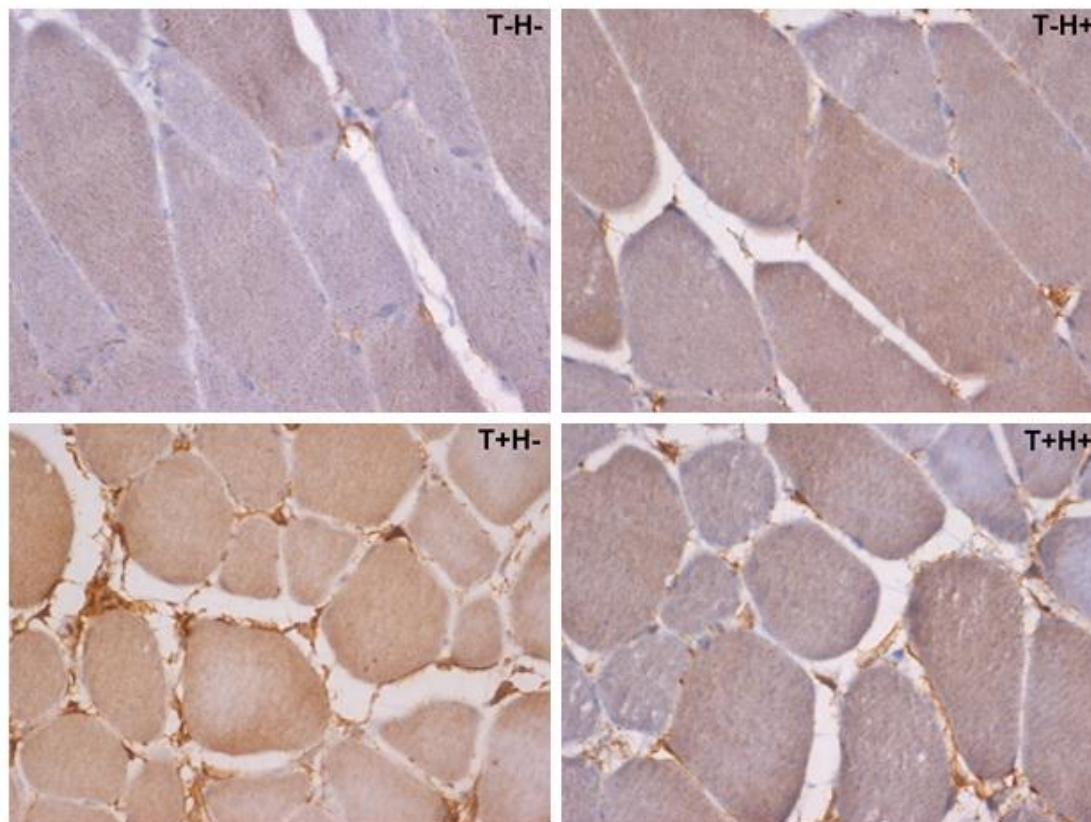


комбинована примена за 207% ( $p < 0.05$ ), у односу на контролне вредности. Поређењем унутар експерименталних група, тренинг пливањем повећао је количину депоа VEGF-а за 160% ( $p < 0.05$ ) док је његова истовремена примена са нандролон деканоатом овај параметар повећала за 136% ( $p < 0.05$ ), у односу на самосталну примену нандролонa. У T+N+ групи, вредности VEGF-а су смањене за 10% у односу на T+N- групу (Графикон 24).

Посматрајући вредности VEGF-а између две испитиване старосне популације мужјака, у контролној групи вредности су повећане за 28%, у групи која је самостално добијала нандролон деканоат за 42%, у групи која је истовремено приманала нандролон и тренирала пливање за 5% у адултној популацији животиња у односу на перипуберталну. Једино у групи која је тренирала пливање дошло је до смањења вредности овог фактора за 1% код адултних у односу на перипуберталне мужјаке (Графикон 24).



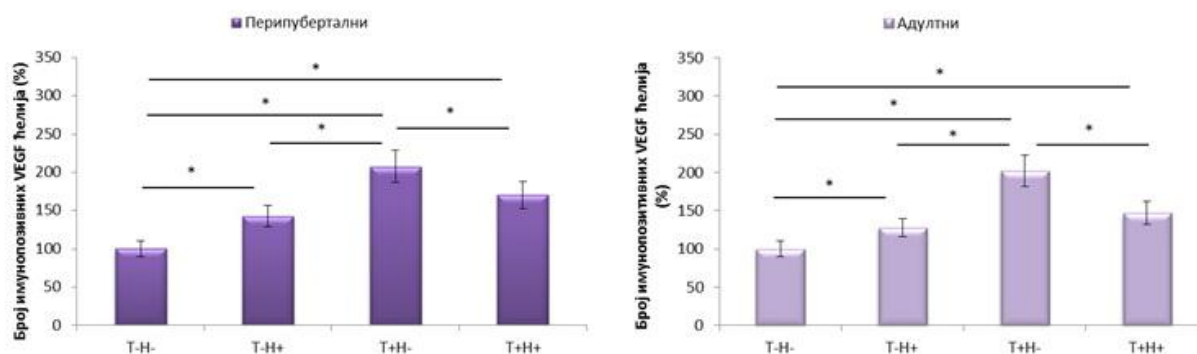
Слика 22. Имунохистохемијско обележен васкуларни ендотелијални фактор раста VEGF-а у скелетном мишићу код перипуберталних мужјака пацова (увеличање 200x).



Слика 23. Имунохистохемијски обележен васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF) у скелетном мишићу код адултних мужјака пацова (увеличање 200x).

У биопсијама мишића квадрицепса пацова свих екперименталних група VEGF имунореактивност је детектована како у микроваскуларном кориту, тако и у већем или мањем броју скелетних мишићних ћелија. Ендотелне ћелије у свим екперименталним групама показују снажну експресију VEGF -а са тамним и густим цитоплазматским депозитима овог пептида. Са друге стране, скелетна мишићна влакна показују или нешто нижи интензитет експресије или имунореактивност на ВЕГФ потпуно недостаје. У зависности од екперименталне групе количина VEGF-а и његова дистрибуција варира. Код обе старосне категорије животиња контролна група као и групе које су третиране само нандролоном имају нижи проценат имунореактивних ћелија са нижим нивоом експресије овог сигналног пептида. Насупрот овоме, код обе старосне категорије пацова увиђа се значајно повећање нивоа експресије а истовремено и проценат имунорекативних ћелија у овом групама показује значајни пораст у поређењу са контролама. Уколико је експресија

VEGF-а присутна у цитоплазми скелетног мишићног влакна најчешће је локализована дифузно али са тенденцијом концентрације у периферним зонама ћелије, поготово оних које су у непосредној близини елемената микроваскуларног корита (слике 22, 23).



Графикон 25. Број имунообележених VEGF ћелија у скелетном мишићу у перипуберталној и адултној популацији мужјака. Вредности су представљене као средње вредности (изражене у %)  $\pm$  SD.

У перипуберталној популацији испитиваних животиња, сви експериментални протоколи повећали су број имунообележених VEGF ћелија у скелетном мишићу. Самостално примењен нандролон деканоат повећао је број VEGF ћелија за 42.5% ( $p < 0.05$ ) док је његова удружена примена са тренингом пливањем повећала за 70% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Највеће повећање било је у групи која је самостално тренирала (107%;  $p < 0.05$ ). Поређењем између експерименталних група самосталан тренинг довео је до повећања имунообележених ћелија у скелетном мишићу за 65% ( $p < 0.05$ ) док је његова удружена примена са нандролон деканоатом повећала за 27.5% ( $p < 0.05$ ) у односу на самосталан нандролон. У T+N+ групи, број имунообележених VEGF ћелија смањен је за 37.5% ( $p < 0.05$ ) у односу на T+N- групу (Графикон 25).

У адултној популацији испитиваних животиња, број имунообележених VEGF ћелија повећан након третмана нандролон и тренинга пливањем. Највеће повећање било је након самосталног тренинга пливањем и то 102% ( $p < 0.05$ ). Самостално примењен нандролон деканоат повећао је број ћелија за 28% ( $p < 0.05$ ) док је његова удружена примена са тренингом повећала за 42% ( $p < 0.05$ ). Анализирајући број ћелија између самих експерименталних група, уочавамо да је тренинг повећао број ћелија за 74% ( $p < 0.05$ ) док

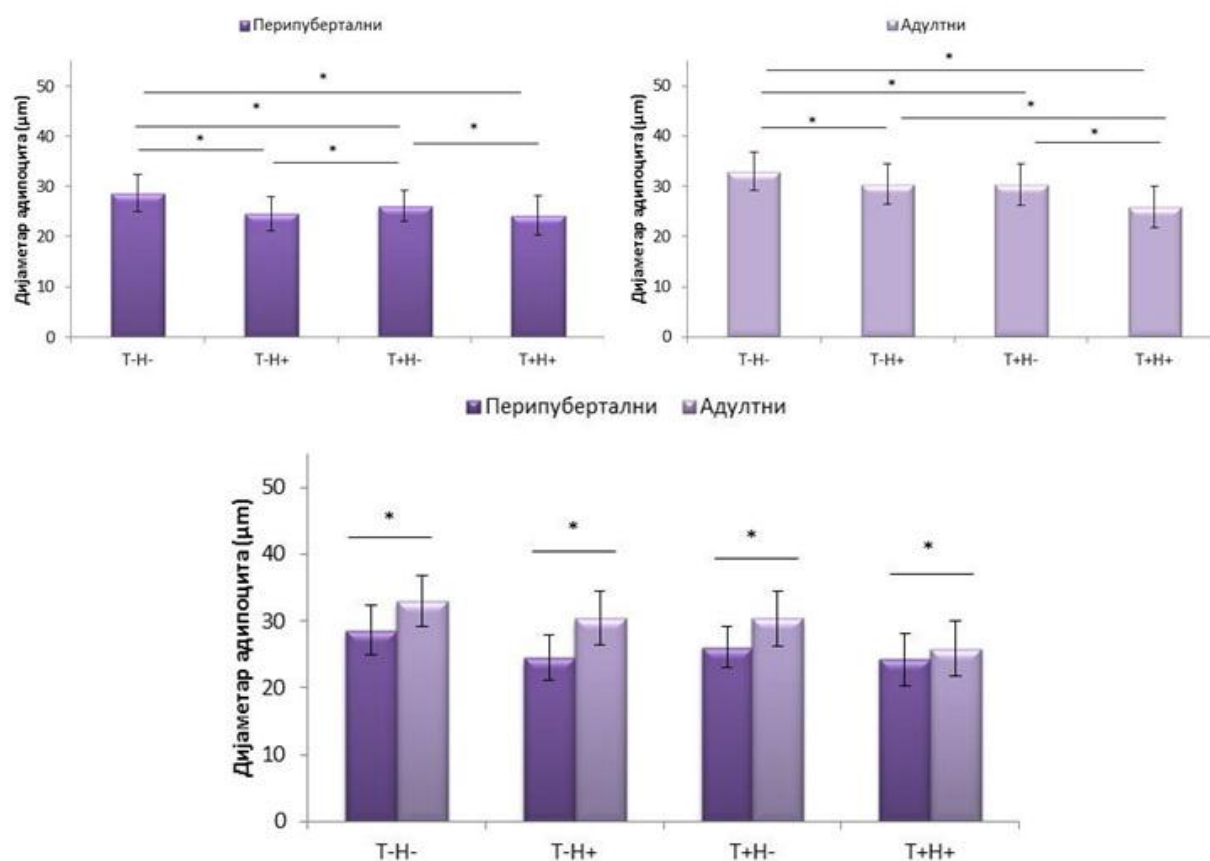
је његова комбинација са нандролоном повећала за 19% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т-Н+ групу. Смањење броја ћелија у Т+Н+ групи било је 55% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 25).

#### **4.5. Масно ткиво**

Након завршеног експерименталног протокола, анализирали смо абдоминално масно ткиво и том приликом одредили смо дијаметар и површину масне ћелије.

##### **4.5.1. Дијаметар адипоцита**

Морфометријском методом, квантификовали смо промене дијаметра масне ћелије (адипоцита) код перипуберталних и адултних мужјака након четворонедељне администрације нандролон деканоата и тренинга. Резултати су представљени на графикону бр. 26 и сликама бр. 24 и бр. 25.



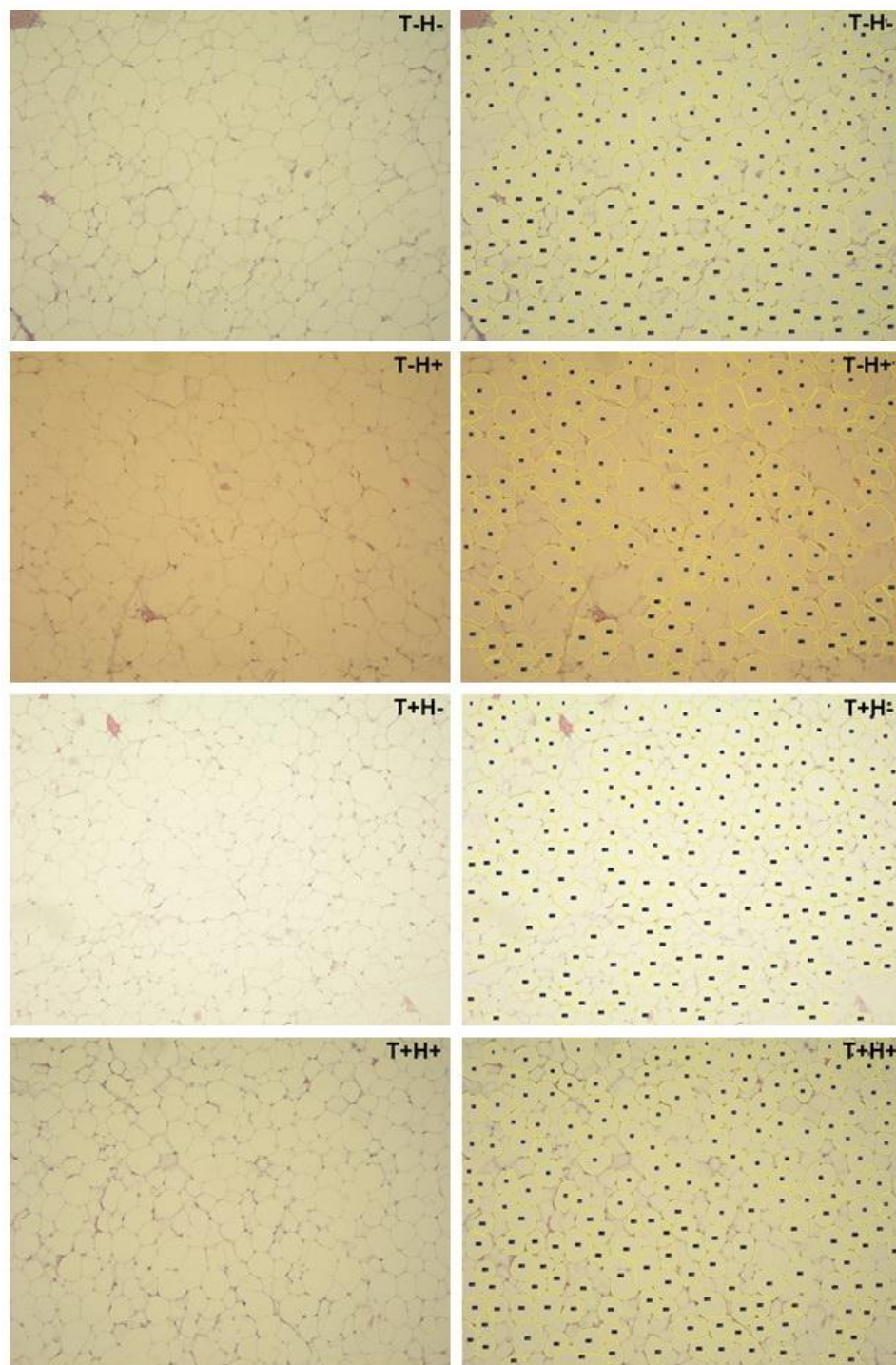
Графикон 26. Просечне вредности дијаметра масних ћелија код перипуберталних и адултних пацова као и њихов међусобни однос по старости. Вредности су представљене као средње  $\pm$  SD.

Дијаметар адипоцита код перипуберталних животиња смањен је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу и то смањење је статистички значајно. Самостална примена надролоне довела је до смањења дијаметра за 14 % ( $p < 0.05$ ), тренинг је смањив дијаметар за 9 % ( $p < 0.05$ ) док је њихова комбинована примена смањила дијаметар адипоцита за 15 % ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Поређењем између експерименталних група, тренинг је довео до повећања дијаметра за 6 % ( $p < 0.05$ ) а његова комбинација са надролоном до смањења за 1 % ( $p > 0.05$ ) у односу на T-N+ групу. У T+N+ групи дошло је до смањења овог дијаметра масних ћелија за 7% ( $p < 0.05$ ) у односу на T+N- групу (Графикон 26).

Код адултних животиња, дијаметар адипоцита је значајно снижен у свим експерименталним групама ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. Самостално примењен

нандролон смањио је дијаметар за 8% ( $p < 0.05$ ), тренинг пливањем смањио је за 8% ( $p < 0.05$ ), док је комбинована примена нандролона са тренингом довела до смањења за 22% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролу. Поређењем унутар експерименталних група, нандролон у односу на Т+Н- довео до пораста за 0,2% ( $p > 0.05$ ) док је у односу на Т+Н+ групу смањио дијаметар за 15% ( $p < 0.05$ ). Комбинована примена нандролона са тренингом довела је до смањења дијаметра адипоцита за 15% ( $p > 0.05$ ) у односу на тренинг пливањем (Графикон 26).

Поређењем дијаметра адипоцита између две старосне доби пацова, код адултних животиња у односу на перипуберталне дошло је до пораста дијаметра масних ћелија у Т-Н- групи за 15% ( $p < 0.05$ ), у Т-Н+ групи за 24% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н- групи за 17% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н+ групи за 7% ( $p < 0.05$ ) (Графикон 26).



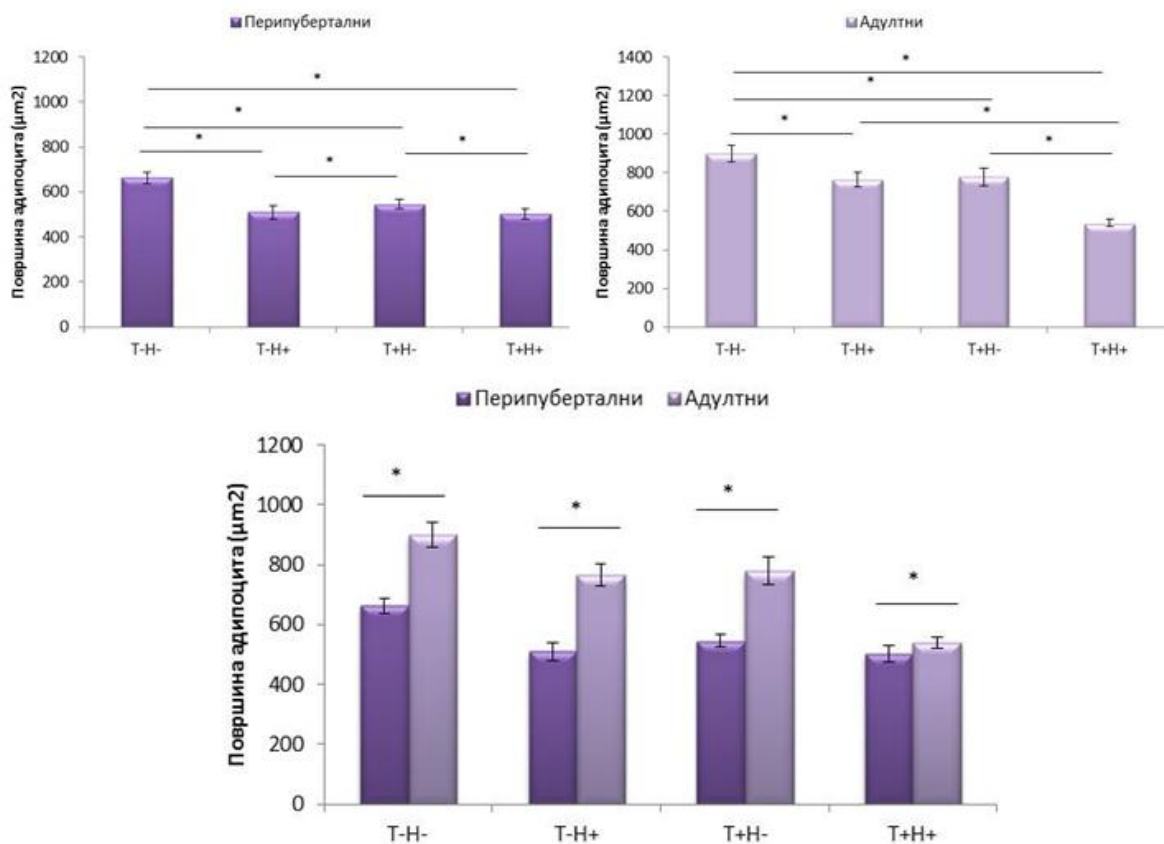
Слика 24. Масно ткиво код перипуберталних животиња, X&E бојење (лево) и одговарајуће морфометријске маске (десно) (увеличање 400x).

На слици масног ткива код перипуберталних пацова, нема промене у морфологији адипоцита. У T-H+, T+H- и T+H+ групама можемо видети, из одговарајућих слика са

маскама за квантификацију, да је дошло до смањења дијаметра адипоцита што је последица снижења нивоа триглицерида у саставу масне капи (Слика 24).

#### 4.5.2. Површина адипоцита

Промене површине адипоцита код перипуберталних и адултних мужјака одредили смо након завршетка експерименталног протокола. Резултати су представљени на графикону бр. 27 као и на сликама бр. 22 и бр. 23.



Графикон 27. Просечне вредности величине масних ћелија код перипуберталних и адултних пацова као и њихов међусобни однос по старости

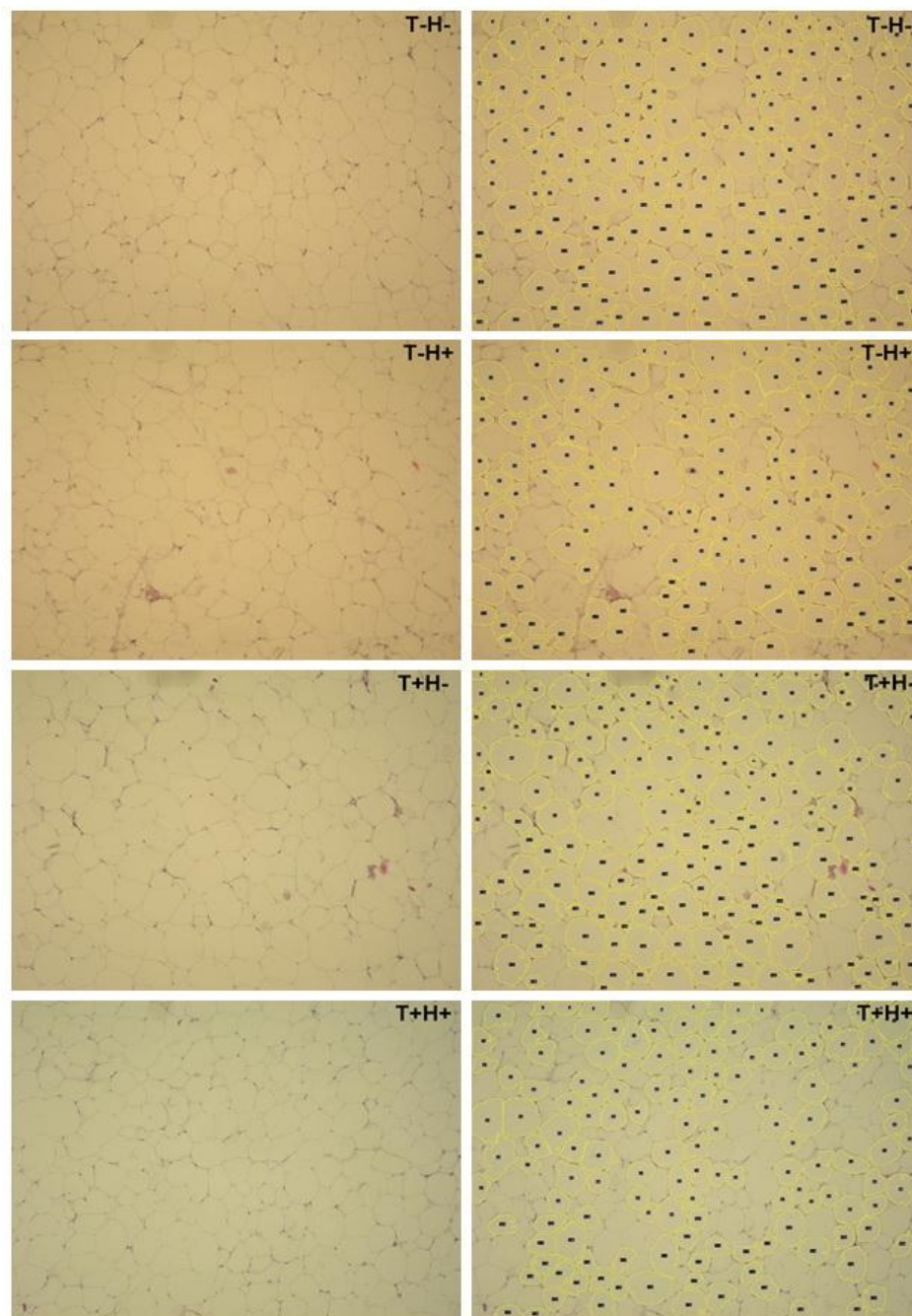
Површина адипоцита код перипуберталних животиња смањена је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу и то смањење је статистички значајно. Самостална примена надролоне довела је до смањења површине пресека адипоцита за 23 % ( $p < 0.05$ ), тренинг је смањио дијаметар за 18 % ( $p < 0.05$ ) док је њихова комбинована примена смањила дијаметар адипоцита за 24 % ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Поређењем између експерименталних група, тренинг је довео до



повећања површине адипоцита за 7% ( $p < 0.05$ ) а његова комбинована примена са нандролоном до смањења за 1.5 % ( $p > 0.05$ ) у односу на Т-Н+ групу. Т+Н+ група довела је до смањења овог параметра за 8 % ( $p < 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 27).

Код адултних животиња, површина адипоцита смањена је у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. Самостално примењен нандролон довео је до смањења површине адипоцита за 16 % ( $p < 0.05$ ), тренинг пливањем смањио је за 14 % ( $p < 0.05$ ), док је њихова комбинована примена смањила површину адипоцита за 40 % ( $p < 0.05$ ). Поређењем између експерименталних група, тренинг је довео до повећања површине адипоцита за 2 % ( $p > 0.05$ ) а његова комбинација са тренингом до повећања за 30 % ( $p < 0.05$ ) у односу на Т-Н+ групу. У Т+Н+ групи дошло је до пораста површине адипоцита за 31 % ( $p < 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 27).

Поређењем вредности површине адипоцита између адултних и перипуберталних мужјака, приметили смо да су код адултних мужјака вредности значајно порасле у односу на вредности перипуберталних мужјака и то у Т-Н- групи за 35 % ( $p < 0.05$ ), у Т-Н+ групи за 49 % ( $p < 0.05$ ), у Т+Н- групи за 42 % ( $p < 0.05$ ), у Т+Н+ групи за 7 % ( $p < 0.05$ ) (Графикон 27).

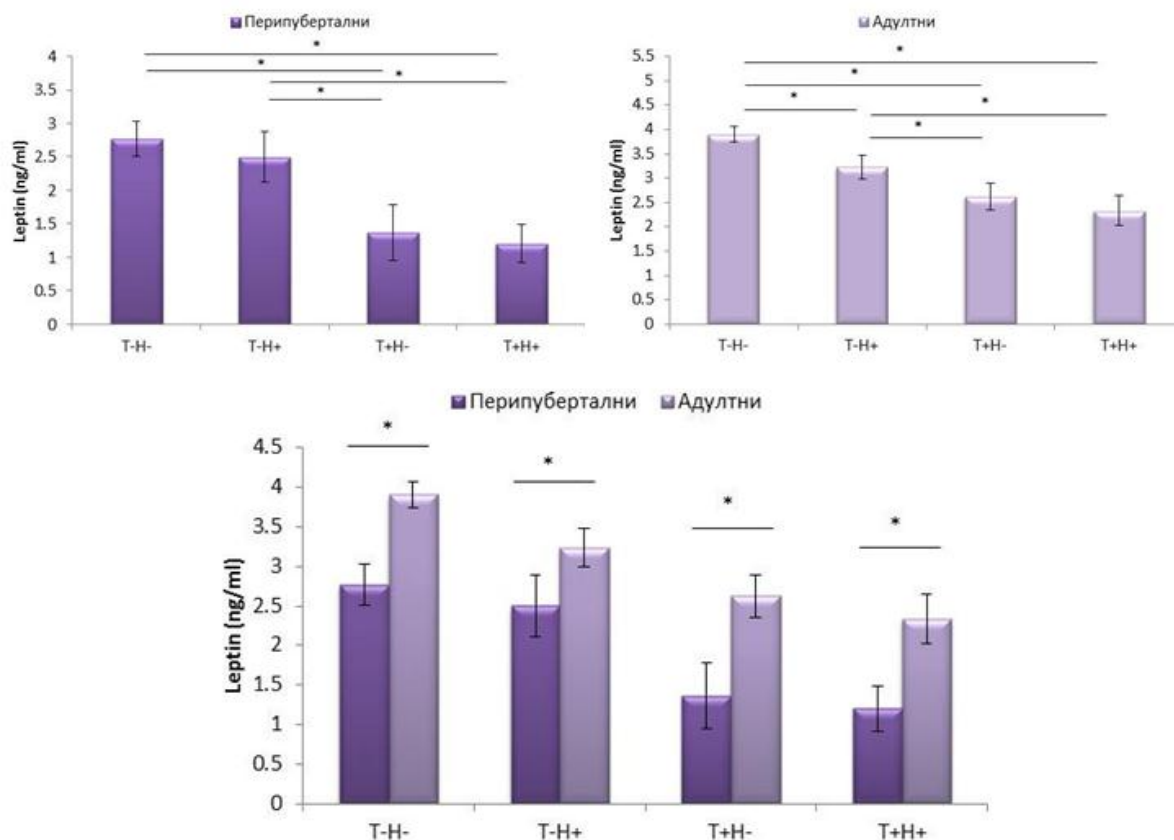


Слика 25. Масно ткиво код адултних животиња, Х&Е бојење (лево) и одговарајуће морфометријске маске (десно) (увеличање 400х).

Као и код перипуберталних пацова, и код адултних нема промене у морфологији адипоцита. Као што видимо из одговарајућих маски са квантификацијом, примена нандролоне самостално, тренинг самостално као њихова комбинована примена смањила је дијаметар адипоцита (Слика 25).

### 4.5.3. Вредности лептина у плазми

У узорцима серума, пратили смо промене вредности лептина код перипуберталних и адултних животиња након завршеног експерименталног протокола.



Графикон 28. Просечне вредности лептина у плазми код перипуберталних и адултних мужјака пацова као и међусобни однос између испитиваних старосних доби. (Средње вредности  $\pm$ SD)

Код перипуберталних мужјака пацова, вредности лептина у плазми смањене су у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. У групи која је самостално примала нандролон деканоат смањене су вредности лептина за 10% ( $p < 0.05$ ), самосталан тренинг пливањем и његова комбинација са нандролон деканоатом смањила је вредности за 51% ( $p > 0.05$ ) и 57% ( $p > 0.05$ ) (редом) у односу на контролну групу. Поређењем унутар самих експерименталних група, тренинг пливањем довео је до смањења вредности лептина за 45% ( $p > 0.05$ ), а нандролон деканоат у комбинацији са тренингом смањено је за

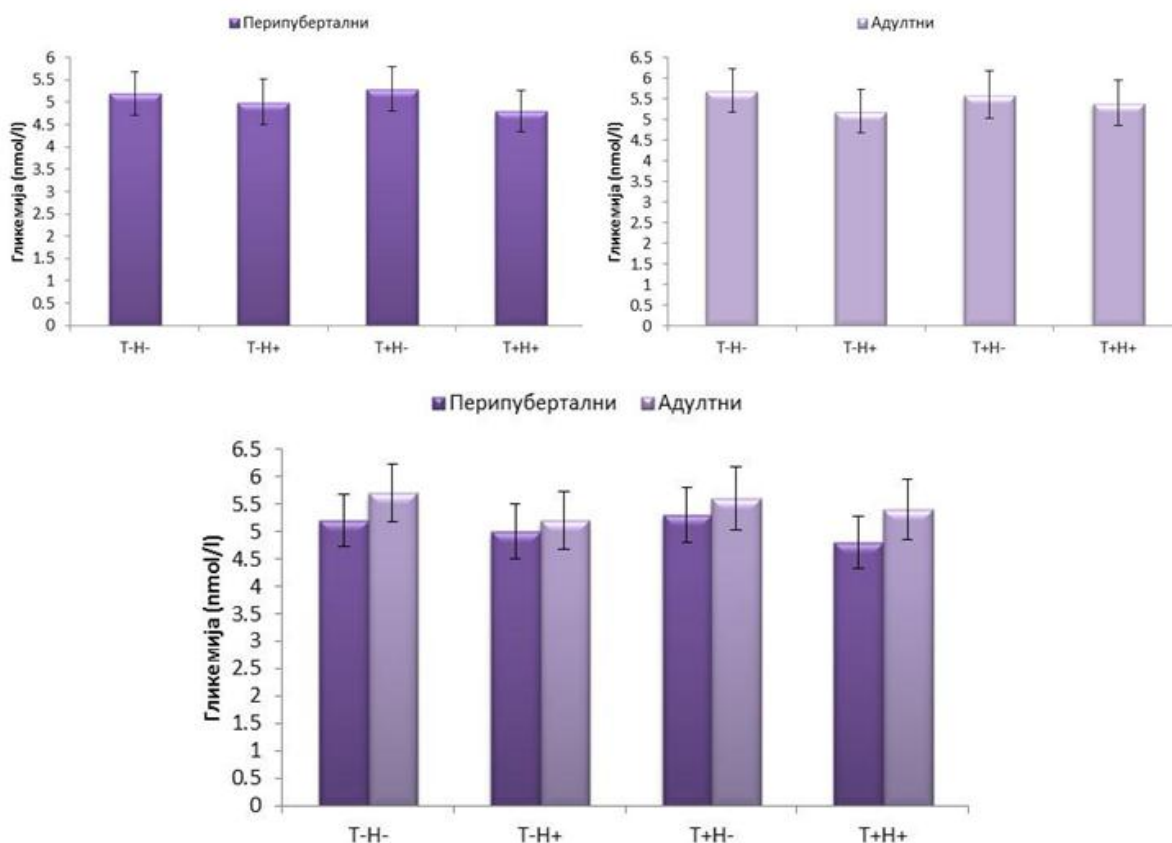
52% ( $p > 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон. У Т+Н+ групи смањене су вредности за 12% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 28).

Код адултних мужјака пацова, вредности лептина снижене су у експерименталним групама у односу на контролне вредности. Самостална примена нандролон деканоата смањила је вредности лептина за 17% ( $p > 0.05$ ), тренинг пливањем за 33% ( $p > 0.05$ ) док је њихова комбинована примена смањила вредности за 40% ( $p > 0.05$ ). Тренинг пливањем смањило је вредности лептина за 19% ( $p > 0.05$ ), док је његова комбинована примена са нандролон деканоатом смањила вредности лептина за 28% ( $p > 0.05$ ) у односу на групу која је самостално добијала нандролон деканоат. У Т+Н+ групи дошло је до смањења вредности за 11% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 28).

Поређењем вредности лептина између две испитиване старосне доби пацова, приметили смо да су вредности лептина значајно повишене у адултној популацији мужјака у односу на перипубертану популацију. Пораст вредности лептина у контролној групи био је 41% ( $p > 0.05$ ), у групи која је самостално добијала нандролон деканат је 29% ( $p > 0.05$ ), у групи која је тренирала пливање за 91% ( $p > 0.05$ ), а у групи која је и тренирала пливање и добијала нандролон деканоат за 94% ( $p > 0.05$ ) (Графикон 28).

#### 4.5.4. Вредности гликемије

Промене вредности гликемије наше одредили смо након завршеног експерименталног протокола од четири недеље.



Графикон 29. Просечне вредности гликемије код перипуберталних, адултних мужјака пацова као и однос вредности гликемије између две испитиване старосне популације. Вредности су представљене као средње  $\pm$  SD.

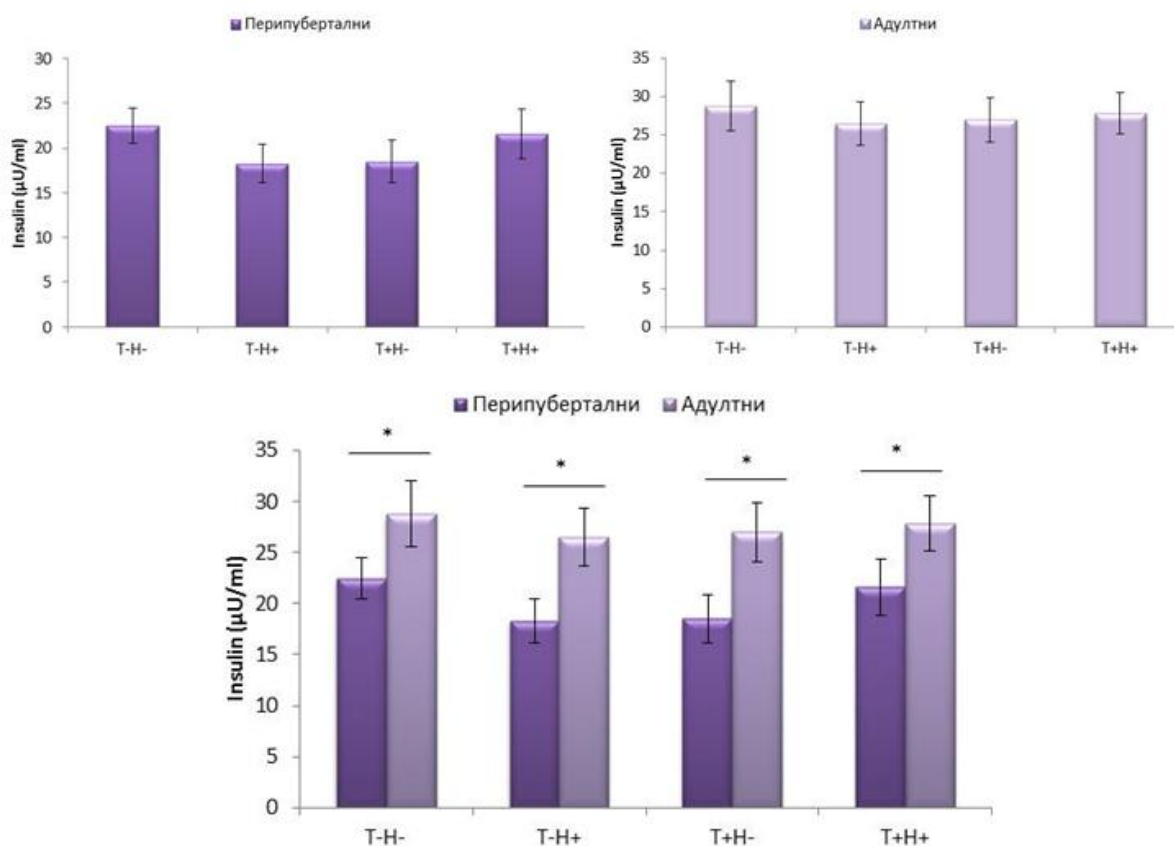
Код перипуберталних мужјака пацова, вредности гликемије снижене су у групама које су добијале нандролон деканоат самостално или у комбинацији са тренингом пливањем али то снижење није статистички значајно. Тренинг пливањем није довео до промена вредности гликемије у односу на контролну групу (Графикон 29).

Као и код перипуберталних пацова, и код адултних животиња није дошло до значајне промене у вредности гликемије између контролне групе и експерименталних група (Графикон 29).

Посматрајући вредности гликемије између две испитиване старосне доби пацова, видимо да су вредности гликемије код адултних мужјака пацова повишене, али не значајно, у свим испитиваним групама у односу на перипуберталне мужјаке (Графикон 29).

#### 4.5.5. Серумске вредности инсулина

У узорцима серума перипуберталних и адултних животиња пратили смо промене вредности инсулина након хроничне администрације нандролон деканоата и тренинга пливањем.



Графикон 30. Просечне вредности серумског нивоа инсулина код перипуберталних и адултних мужјака пацова као и међусобни однос између две испитиване старосне доби

У перипуберталној популацији животиња, вредности инсулина у серуму смањене су у групи која је самостално добијала нандролон деканоат и у групи која је тренира пливање у односу на контролну групу. У Т+Н+ групи није дошло до значајне разлике у вредностима инсулина у односу на Т-Н- групу (Графикон 30).

У адултној популацији животиња, вредности инсулина снижене су у свим експерименталним групама у односу на контролне вредности (Графикон 30).

Поређењем вредности инсулина између две испитиване старосне доби пацова, у адултној популацији вредности инсулина су биле значајно повишене у односу на перипуберталну популацију животиња. У Т+Н+ групи повећање вредности је било за 28% ( $p < 0.05$ ), у Т-Н+ групи за 45% ( $p < 0.05$ ), у Т+Н- групи за 46% ( $p < 0.05$ ) и у Т+Н+ групи за 29% ( $p < 0.05$ ) (Графикон 30).

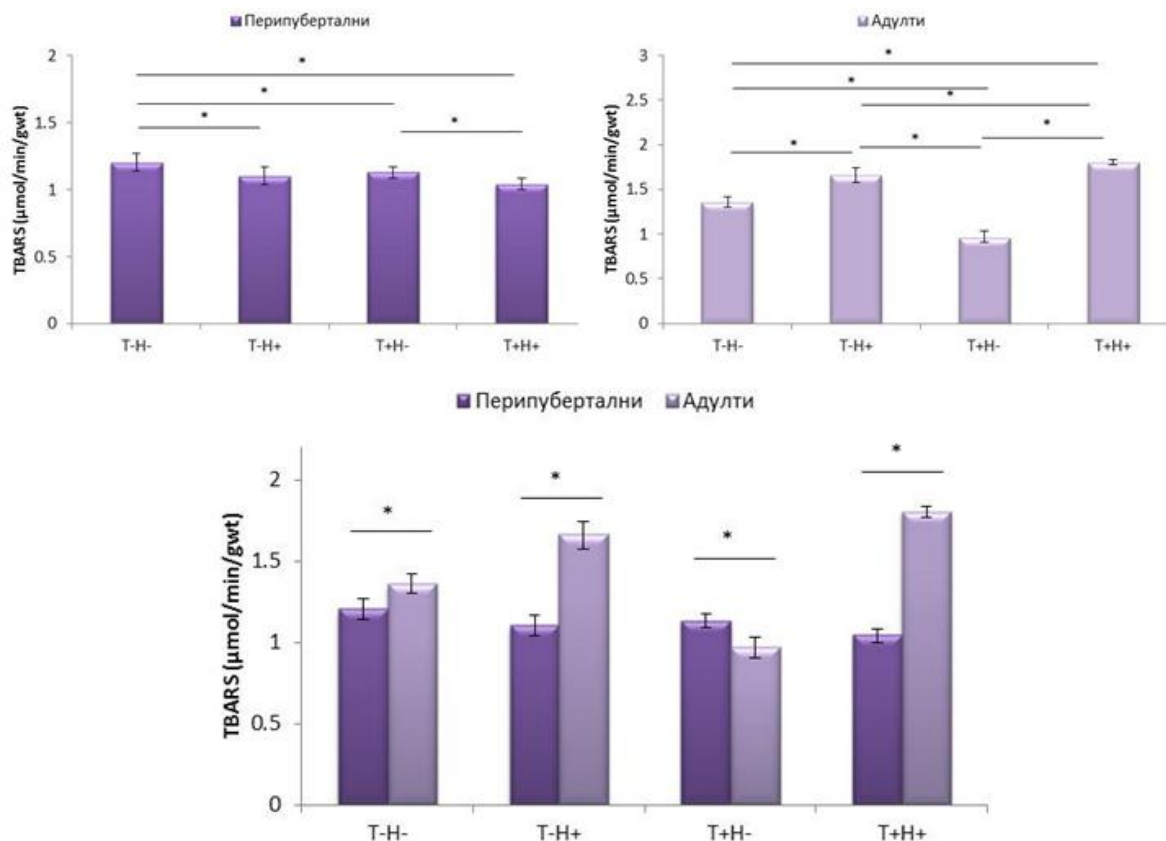
## **4.6. Редокс статус**

### **4.6.1 Системски редокс статус**

Промене прооксидативних маркера након хроничне примене нандролон деканоата и тренинга пливањем код перипуберталних и адултних животиња приказани су на графицима бр. 31, 32, 33 и 34.

### **4.6.2. Индекс липидне пероксидације - TBARS**

Промене индекс липидне пероксидације, који је мерен као TBARS, код перипуберталних и адултних животиња након четворонедељног експерименталног протокола приказан је на графикону бр. 31.



Графикон 31. Предстваља просечне вредности TBARS-a код припуберталних и адултних животиња као и њихов међусобни однос

Код перипуберталних животиња, индекс липидне пероксидације (TBARS) статистички значајно је снижен у свим експерименталним групама ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. Поређењем унутар експерименталних група, дошло је до пада TBARS-a у групама које су примале нандролон ( $p > 0.05$ ) у односу на групу која је само тренирала пливање, али је само у T+N+ ( $p < 0.05$ ) групи смањење индекса липидне пероксидације значајно (Графикон 31).

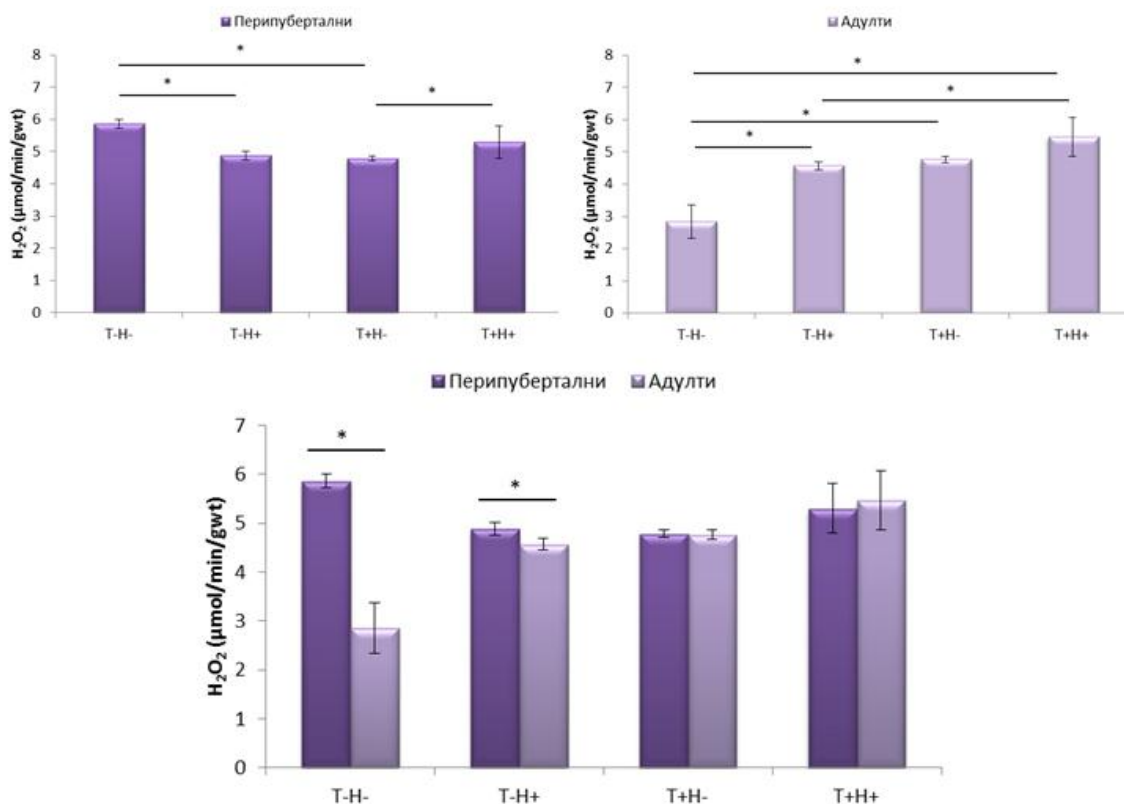
Код адултних мужјака, вредности индекса липидне пероксидације статистички је значајно повишен у групама које су примале нандролон самостално ( $p < 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом ( $p < 0.05$ ). Тренинг пливањем ( $p < 0.05$ ), довео је до значајног смањења TBARS-a у односу на T-N- групу. Поређењем унутар експерименталних група, сам тренинг је довео до смањења овог параметра у односу на T-N+ ( $p < 0.05$ ) и T+N+ ( $p < 0.05$ ) групе (Графикон 31).



Са старањем, примећено је да постоји значајна разлика у оквиру свих испитиваних група ( $p < 0.05$ ). У групама Т-Н-, Т-Н+, Т+Н+ код адултних животиња дошло је до пораста вредности TBARS-а у односу на перипуберталне. Међутим, у групи које је само тренирала пливање, дошло је до пада вредности овог параметра код адултних животиња у односу на перипуберталне (Графикон 31).

#### 4.6.3. Водоник пероксид - $H_2O_2$

Промене вредности водоник пероксида након хроничне апликације нандролон деканоата и тренинга пливањем код перипуберталних и адултних мужјака приказан је на графикону бр 32.



Графикон 32. Просечне вредности  $H_2O_2$  а код припуберталних и адултних животиња као и међусобни однос између две испитиване старосне доби. (Средње вредности  $\pm$ SD)

Вредности водоник пероксида код перипуберталних животиња, снижене су свим експерименталним групама у односу на контролну групу. У Т-Н+ ( $p < 0.05$ ) и Т+Н- ( $p <$

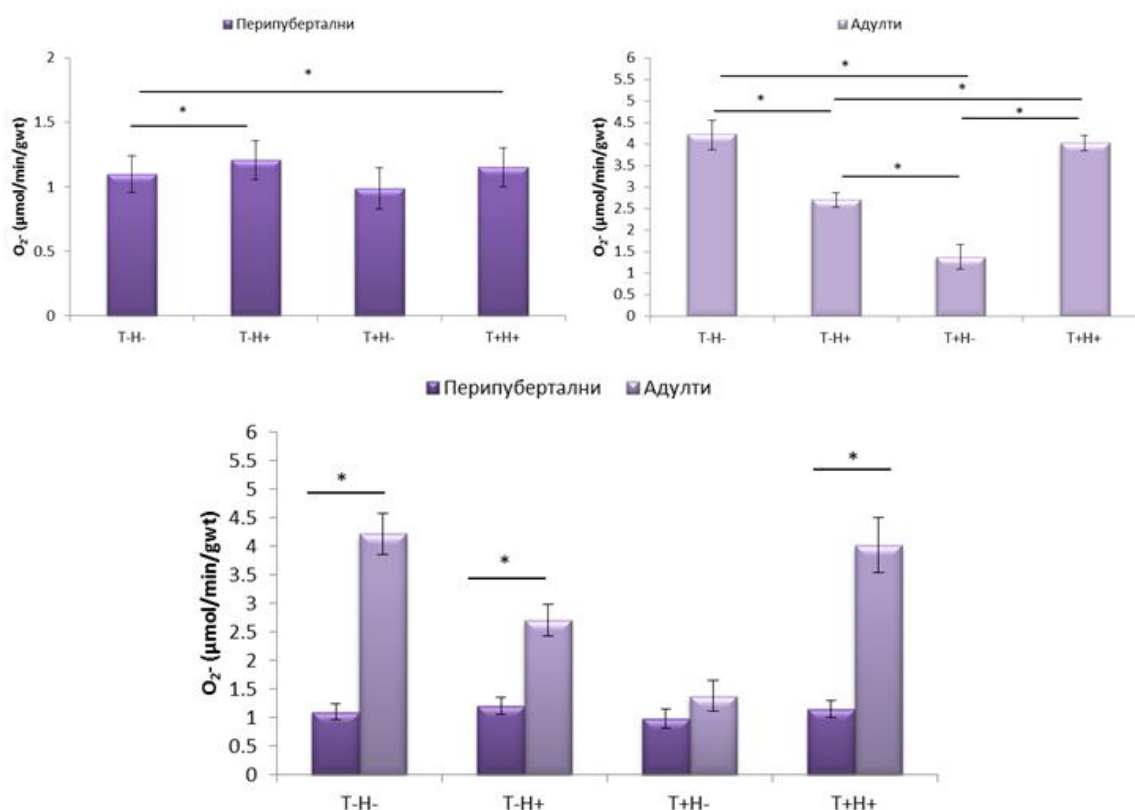
0.05) групама, то снижење је статистички значајно изузев у T+N+ ( $p > 0.05$ ) групи где смањење ових вредности није значајно у односу на контролне вредности. Самостално тренинг довео је до пада ових вредности у односу на T+N+ ( $p < 0.05$ ) групу (Графикон 32).

Код адулта, вредности  $H_2O_2$  значајно су повишене у свим експерименталним групама ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. Вредности овог параметра повишени су у групама које су тренирале пливање самостално ( $p > 0.05$ ) или у комбинацији са нандролон деканоатом ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон (Графикон 32).

Са старењем, вредности овог параметра значајно се снижавају у контролној групи ( $p < 0.05$ ) и групи која је самостално примала нандролон ( $p < 0.05$ ) код адултних животиња у односу на перипуберталне. У групама које су тренирале пливање ( $p > 0.05$ ), није дошло ни какви промена вредности  $H_2O_2$ . Нандролон примењен заједно са тренингом ( $p > 0.05$ ) довео је до благог пораста вредности у адултној популацији у односу на перипуберталну (Графикон 32).

#### **4.6.4. Супероксид анјон радикал - $O_2^-$**

Промене супероксид анјон радикала код перипуберталних и адултних мужјака након завршеног експерименталног протокола приказан је на графикону бр. 33.



Графикон 33. Просечне вредности  $O_2^-$  а код припуберталних и адултних животиња као и њихов међусобни однос

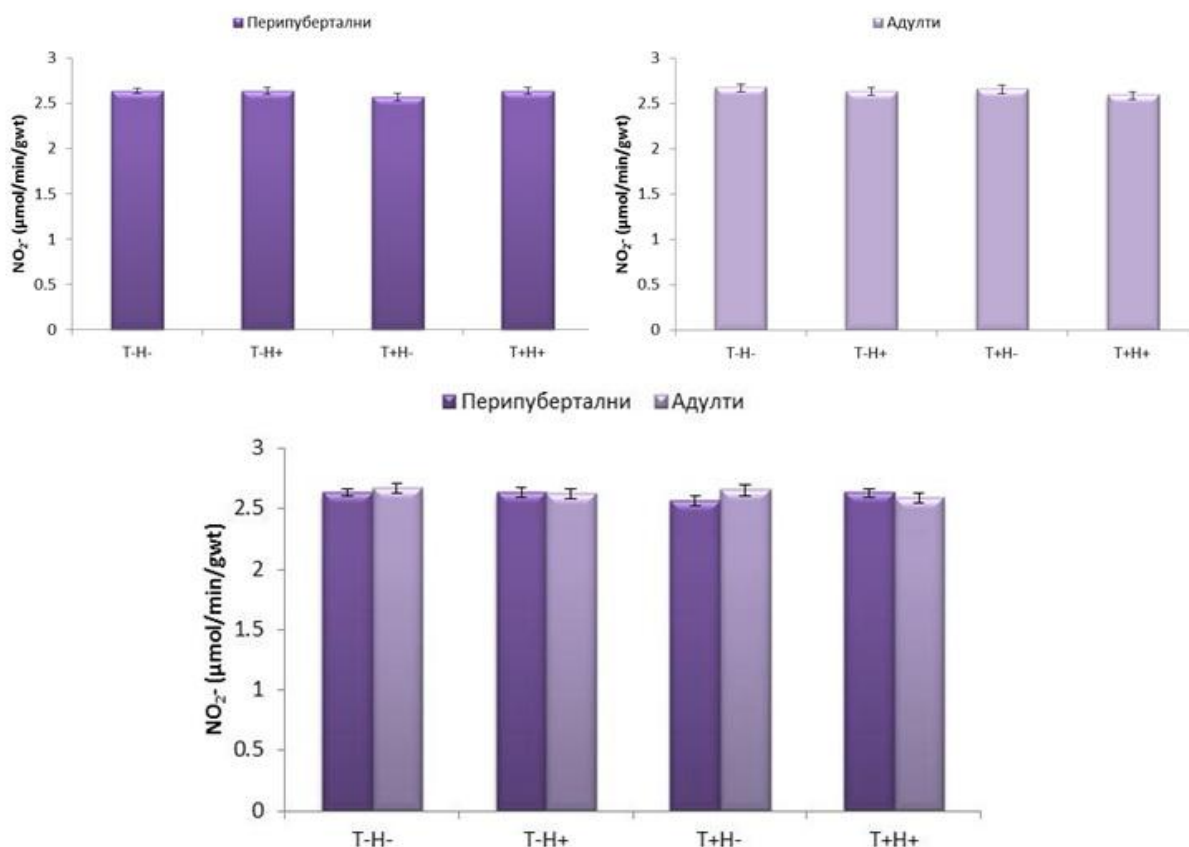
У перипуберталној популацији животиња, вредности супероксид анјон радикала, повишене су у групама које су примале нандролон самостално ( $p > 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом ( $p > 0.05$ ) у односу на контролну групу. Тренинг пливањем, довео је до снижења вредности у односу на контролну групу ( $p > 0.05$ ), као и у односу на групе које су примале нандролон деканоат самостално ( $p > 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом ( $p > 0.05$ ) (Графикон 33).

У адултној популацији животиња, вредности су снижене у свим експерименталним групама у односу на контролну. Самостално примењен нандролон, значајно је снижен у односу на Т-Н- ( $p < 0.05$ ) и Т+Н+ ( $p < 0.05$ ) групе. Тренинг пливањем, значајно је смањено вредности  $O_2^-$  у односу на Т-Н- ( $p < 0.05$ ), Т-Н+ ( $p < 0.05$ ) и Т+Н+ ( $p < 0.05$ ) групе (Графикон 33).

Поређењем по старости, у адултној популацији мужјака пацова, вредности  $O_2$  значајно су повишене ( $p < 0.05$ ) у свим испитиваним групама у односу на перипуберталну. Једино тренинг пливањем ( $p > 0.05$ ) није довео до значајног повећања супероксид анјон радикала у адултној популацији у односу на перипуберталну (Графикон 33).

#### 4.6.5. Нитрити - $NO_2^-$

Промене вредности нитрити након хроничне администрације нандролон деканоата и тренинга код перипуберталних и адултних пацова приказане су на графикону бр.34.



Графикон 34. Просечне вредности нитрита код припуберталних и адултних животиња као и међусобни однос између испитиваних старосних доби

Нитрити у перипуберталној популацији, нису значајно промењени у групама које су примале нандролон самостално ( $p > 0.05$ ) или у комбинацији са пливањем ( $p > 0.05$ ), једино је тренинг пливањем ( $p > 0.05$ ) довео до смањења вредности нитрита али то

смањење није значајно у односу на контролне вредности. Тренинг пливањем смањио је вредности нитрита у односу на самостално примењен нандролон ( $p > 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом ( $p > 0.05$ ) (Графикон 34).

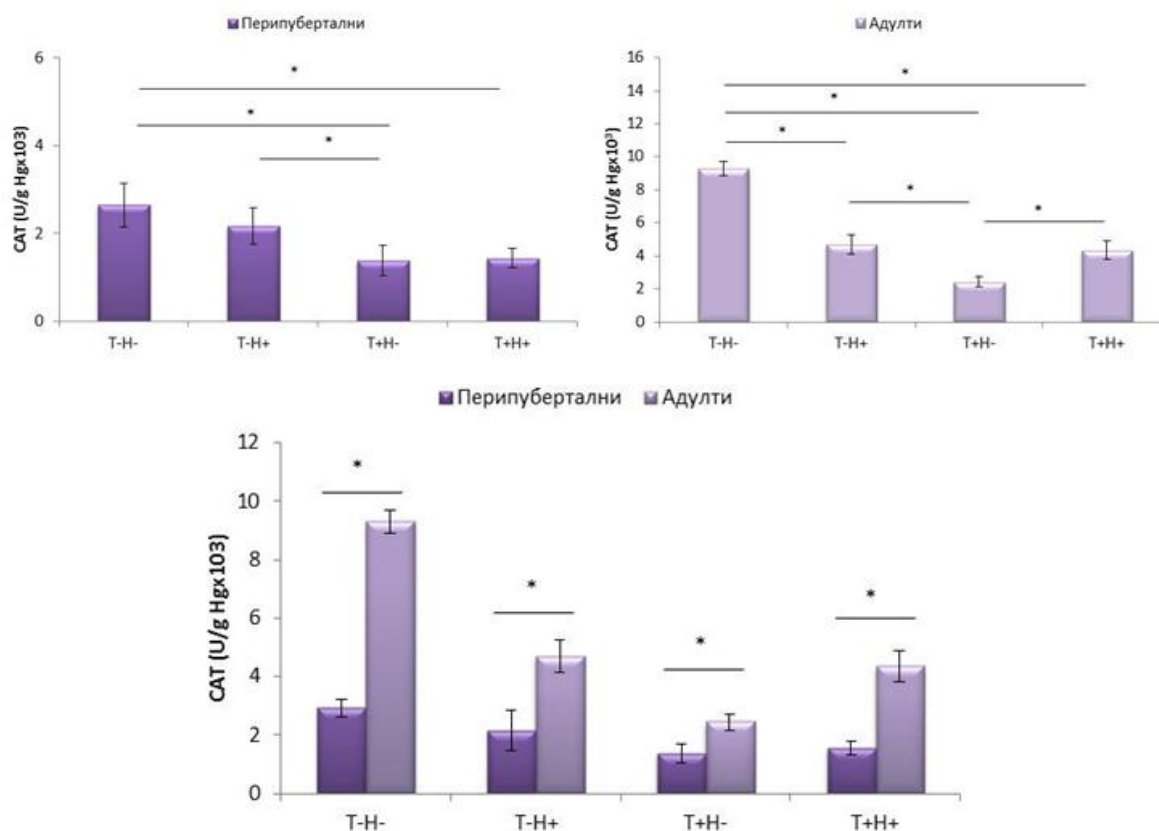
Вредности нитрита у адултној популацији животиња, смањење су у свим експерименталним групама ( $p > 0.05$ ) у односу на контролну. Самостално примењен нандролон или у комбинацији са пливањем, довео је до пада вредности у односу на Т-Н- ( $p > 0.05$ ) и Т+Н- ( $p > 0.05$ ) групе (Графикон 34).

Поређењем вредности нитрита у оквиру две испитиване старосне доби пацова, у адултној популацији дошло је по пораста вредности у контролној групи и у групи која је тренирала пливање, док је у групама које су примале нандролон деканоат самостално или у комбинацији са тренингом пливањем дошло до смањења вредности у односу на перипуберталну популацију (Графикон 34).

#### **4. 6.6. Маркери антиоксидативне заштите**

Промене маркера антиоксидативне заштите након самосталне примене нандролон деканоата и тренинга као и њихове комбиноване примена код перипубертални и адултних мужјака пацова и њихов међусобни однос поређен по старосној доби приказан је на графицима бр. 35, 36 и 37.

## 4.6.7. Каталаза (CAT)



Графикон бр 35. Просечне вредности CAT код перипуберталних и адултних животиња као и међусобни однос у унутар испитиваних старосних доби. (Средње вредности  $\pm$ SD)

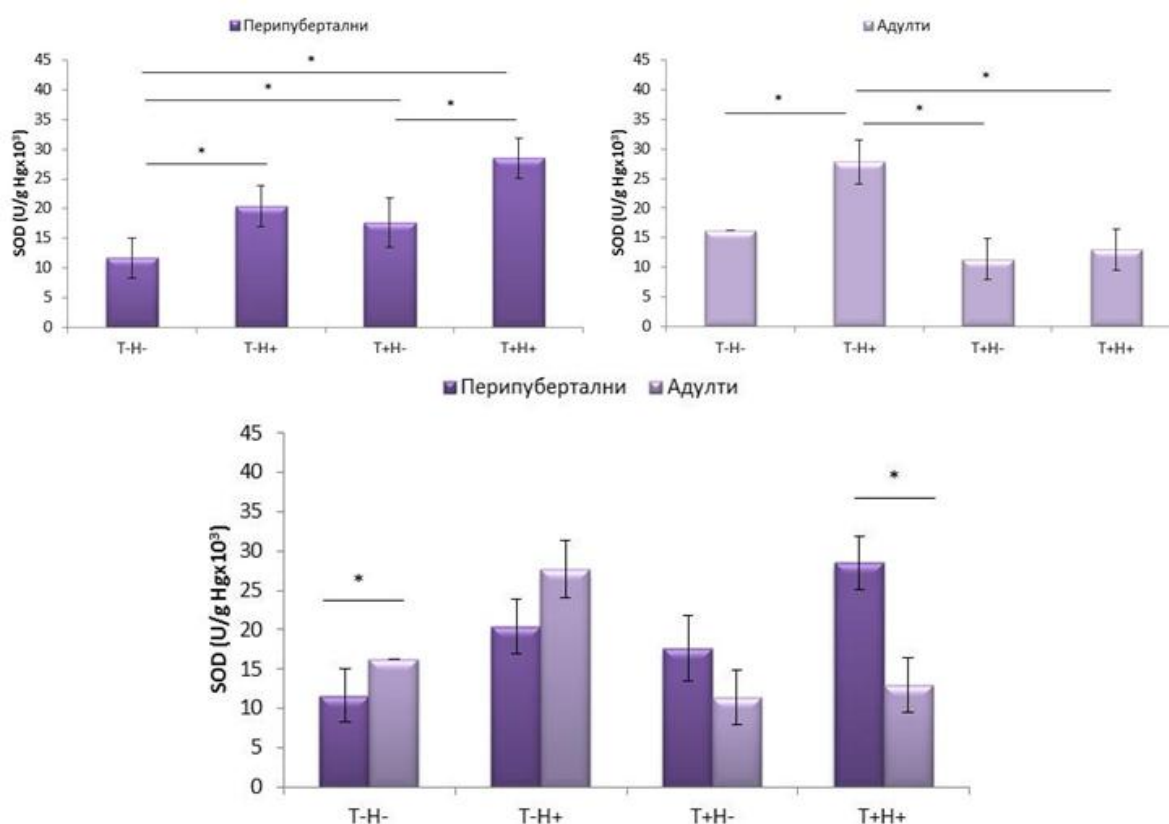
Вредности каталазе код перипуберталних животиња снижене су у свим експерименталним групама ( $p < 0.05$ ), једино самостално примењен нандролон није статистички значајно је снижен у односу на контролну групу ( $p > 0.05$ ). Тренинг пливањем смањило је вредности каталазе у односу на самостално примењен нандролон деканоат ( $p > 0.05$ ) и у односу на његову комбиновану примену са тренингом ( $p > 0.05$ ). Нандролон деканоата у комбинацији са тренингом пливањем, смањило је вредности у односу на самостално примењен нандролон ( $p > 0.05$ ) (Графикон 35).

У адултној популацији, вредности каталазе снижене су у свим експерименталним групама ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Поређењем унутар експерименталних

група, тренинг пливањем значајно је смањио вредности каталазе у односу на самостално примењен нандролон ( $p < 0.05$ ) и у комбинацији са пливањем ( $p < 0.05$ ). Између група које су примале нандролон самостално или у комбинацији са тренингом нема значајне разлике ( $p > 0.05$ ) (Графикон 35).

Поређењем вредности каталазе у оквиру две испитиване старосне доби пацова, вредности су статистички значајно повишене у свим групама у адултној популацији ( $p < 0.05$ ) у односу на перипуберталну. Најниже вредности каталазе, примећене су у групама које су тренирале пливање и у перипуберталној и у адултној популацији мужјака пацова (Графикон 35).

#### 4.6.8. SOD – супероксид дисмутаза



Графикон бр 36. Просечне вредности SOD код перипуберталних и адултних животиња као и међусобни однос у унутар испитиваних старосних доби. (Средње вредности  $\pm$ SD)

Вредности супероксид дисмутазе, у перипуберталној популацији, повишене су у свим експерименталним групама ( $p < 0.05$ ) у односу на контролну групу. Поређењем између експерименталних група, самостално примењен нандролон повишен је у односу на Т+Н- групу ( $p > 0.05$ ) а снижен у односу на Т+Н+ групу ( $p > 0.05$ ). Тренинг пливањем је довео до значајног снижења вредности у односу на Т+Н+ групу ( $p < 0.05$ ) (Графикон 36).

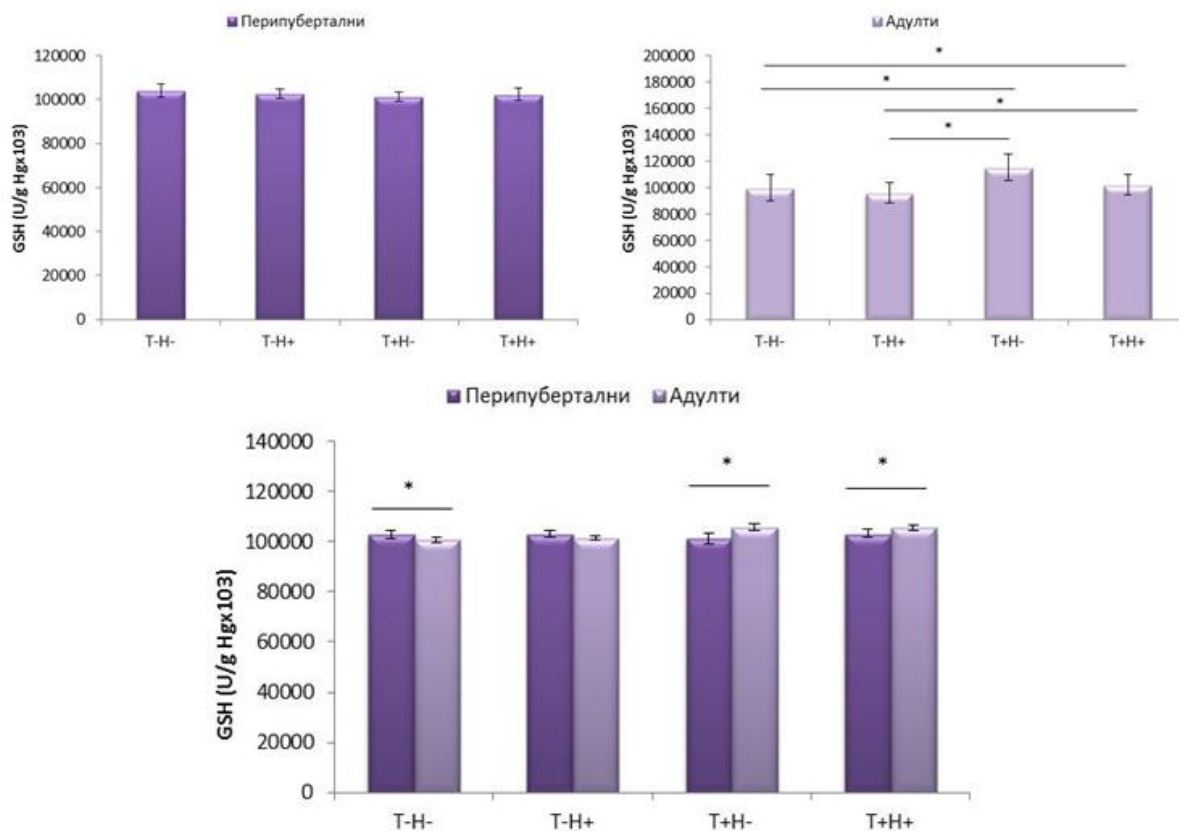
У адултној популацији, самостална примена нандролон деканоата ( $p < 0.05$ ) значајно је довела до пораста вредности SOD у односу на контролну групу. Тренинг пливањем ( $p < 0.05$ ) као и његова комбинација са нандролоном ( $p < 0.05$ ), довела је до смањења вредности у односу на самостално примењен нандролон. У Т+Н+ групи дошло је до пораста вредности у односу на Т+Н- групу ( $p > 0.05$ ) (Графикон 36).

Поређењем вредности супероксид дисмутазе у оквиру две испитиване старосне доби пацова, приметили смо да су у адултној популацији у Т-Н- ( $p > 0.05$ ) и Т-Н+ ( $p > 0.05$ ) групи вредности повишене у односу на перипуберталну популацију пацова. У групама које су тренирале пливање самостално ( $p > 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом ( $p < 0.05$ ) дошло је до пада вредности овог параметра у адултној у односу на перипуберталну популацију (Графикон 36).

#### **4.6.9. GSH- редуковани глутатион**

Промене вредности редукованог глутатиона након хроничне апликације нандролон деканоата и тренинга код перипуберталних и адултних мужјака приказан је на графикону бр. 37.





Графикон 37. Просечне вредности GSH код перипуберталних и адултних животиња као и међусобни однос у унутар испитиваних старосних доби. (Средње вредности  $\pm$  SD)

Вредности редукованог глутатиона код перипуберталних животиња снижене су у свим експерименталним групама ( $p > 0.05$ ) у односу на контролу. Самосталан тренинг пливањем смањило је вредности у односу на самостално примењен нандролон деканоат ( $p > 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом ( $p > 0.05$ ). Самостално примењен нандролон деканоат повећао је вредности глутатиона у односу на његову комбинацију са тренингом ( $p > 0.05$ ) (Графикон 37).

У адултној популацији пацова, самостална примена нандролонa ( $p > 0.05$ ) довела је до благог пада вредности GSH у односу на контролну групу. Тренинг самостално ( $p < 0.05$ ) или у комбинацији са пливањем ( $p < 0.05$ ) довео је до пораста у односу на контролну групу. Највише вредности редукованог глутатиона примећене су у групи која је тренирала пливање. Тренинг пливањем повећао је вредности у односу на самостално примењен

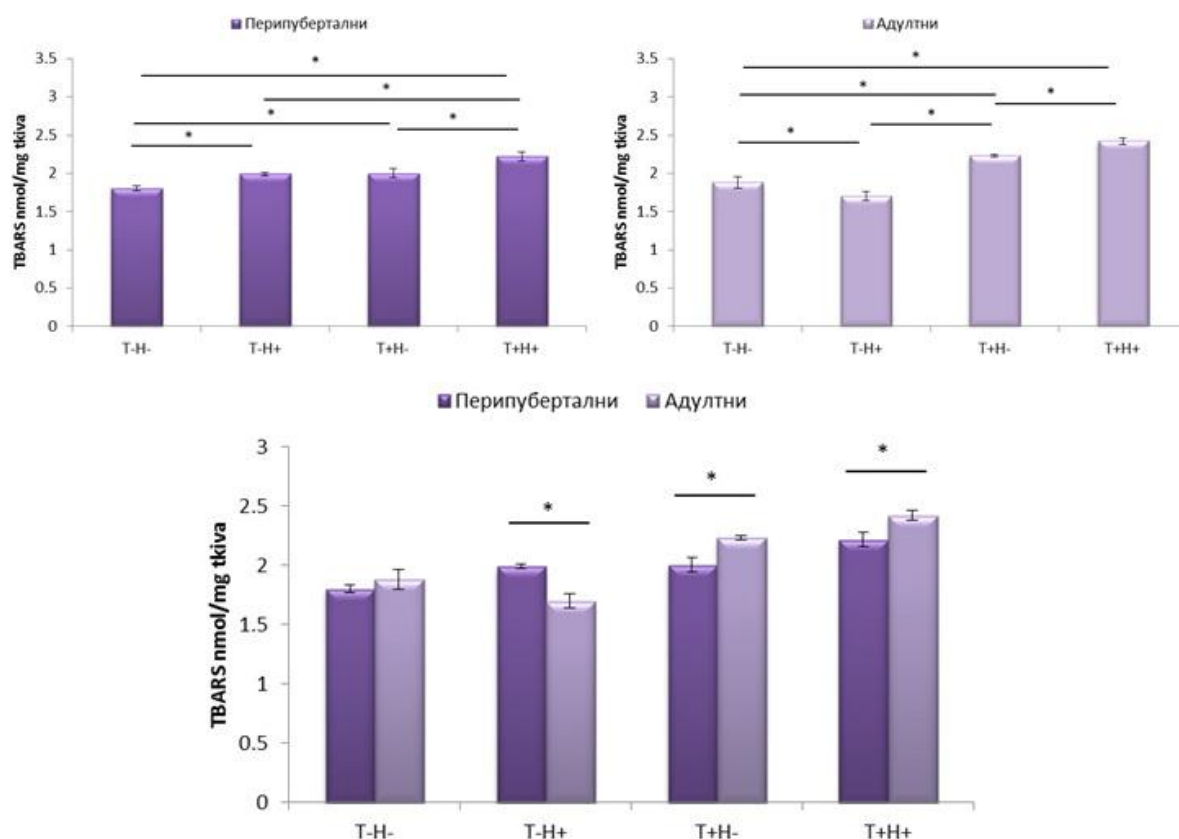
нандролон ( $p < 0.05$ ) или у комбинацији са тренингом ( $p > 0.05$ ). Вредности каталазе у Т+Н+ групи ( $p < 0.05$ ) повишене су у односу на Т-Н+ групу (Графикон 37).

Са старењем, вредности редукованог глутатиона снижене су у контролној групи ( $p < 0.05$ ) и групи која је самостално добијала нандролон деканоат ( $p > 0.05$ ), док су вредности повишене су у групама које су тренирале пливање самостално ( $p < 0.05$ ) или у комбинацији са нандролоном ( $p < 0.05$ ) код адултних пацова у односу на перипуберталне (Графикон 37).

#### **4.7. Ткивни редокс статус**

Промене вредности ткивног редокс статуса из узорка хомогената тестиса након четворонедељног експерименталног протокола код перипуберталних и адултних мужјака пацова приказане су на графицима бр. 38, 39, 40, 41 и 42.

## 4.7.1. Индекс липидне пероксидације - TBARS

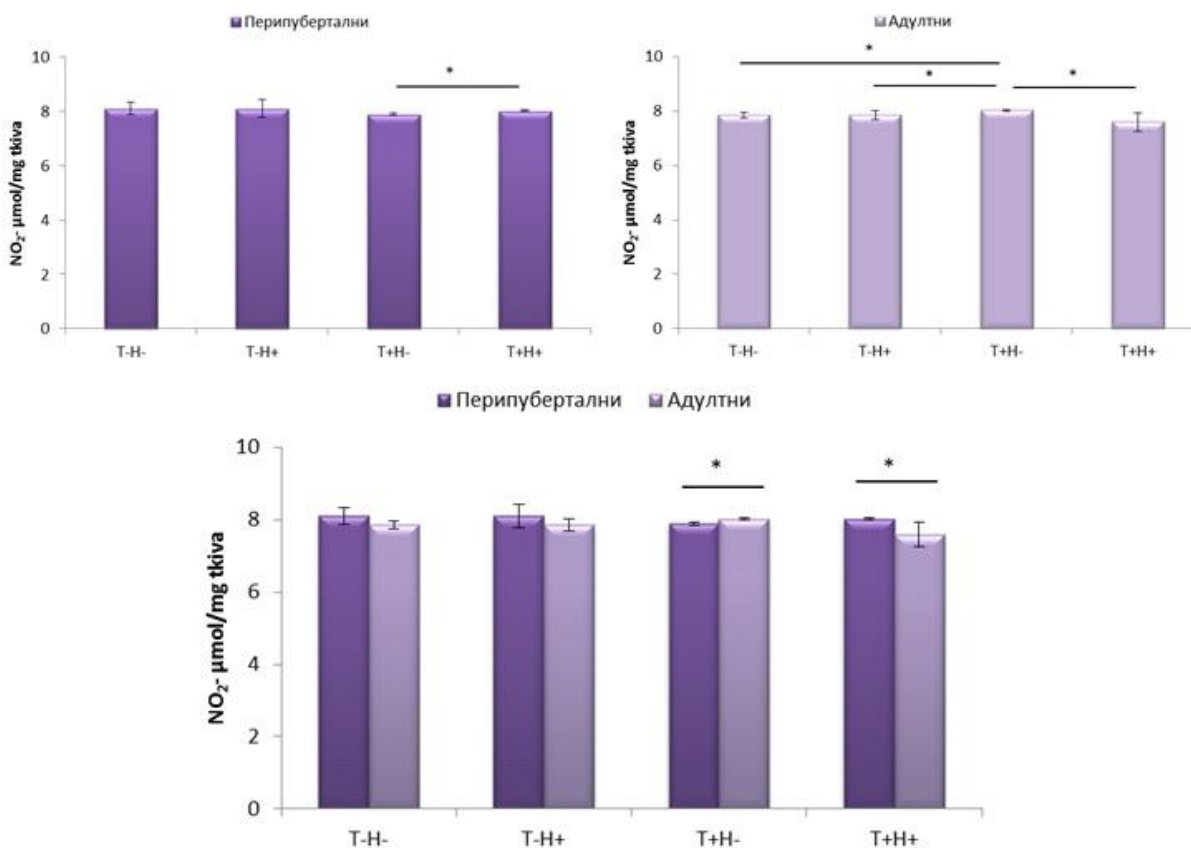


Графикон бр 38. Просечне вредности TBARS-а код перипуберталних и адултних мужјака као и међусобни однос у унутар испитиваних старосних доби животиња. (Средње вредности  $\pm$ SD)

Ткивне вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) у перипуберталној популацији мужјака пацова, значајно је повишен у свим експерименталним групама у односу на контролне вредности ( $p < 0.05$ ). Самостално примењен нандролон деканоат повећао је вредности за 10% ( $p < 0.05$ ), самостално тренинг за 11% ( $p < 0.05$ ) док је њихова удружена примена довела до пораста за 23% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Нандролон деканоат смањило је вредности за 0.5% ( $p > 0.05$ ) у односу на самостално примењен тренинг а за 10% ( $p < 0.05$ ) у односу на њихову комбиновану примену. Удружена примена нандролона и тренинга пливањем довела је до повећања вредности за 11% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен тренинг (Графикон 38).

У адултној популацији мужјака пацова дошло је до промене вредности TBARS-а у свим експерименталним групама у односу на контролну групу. Самостално примењен нандролон деканоат довео је до смањења вредности TBARS-а за 9.5% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролу. За разлику од нандролонa, самостално примењен тренинг као и његова комбинована примена са нандролоном довела је до пораста вредности за 19% ( $p < 0.05$ ) и 29% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на контролне вредности. Самостално примењен тренинг повећао је вредности за 31% ( $p < 0.05$ ), док је његова комбинована примена са нандролоном повећала за 42% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон деканоат. Удružена примена нандролонa и тренинга повећала је индекс липидне пероксидације за 8.5% ( $p < 0.05$ ) у односу на самосталан тренинг (Графикон 38).

Поређењем вредности TBARS-а између две испитиване популације животиња, примећујемо да су вредности TBARS-а повишене у T-H- групи за 4% ( $p > 0.05$ ), у T+H- групи за 11.5% ( $p < 0.05$ ) и у T+H+ групи за 9% ( $p < 0.05$ ) у адултној популацији у односу на перипуберталну. Једино је у T-H+ групи TBARS снижен за 15% ( $p < 0.05$ ) у адултној популацији у односу на перипуберталну (Графикон 38).

4.7.2. Нитрити -  $\text{NO}_2$ .

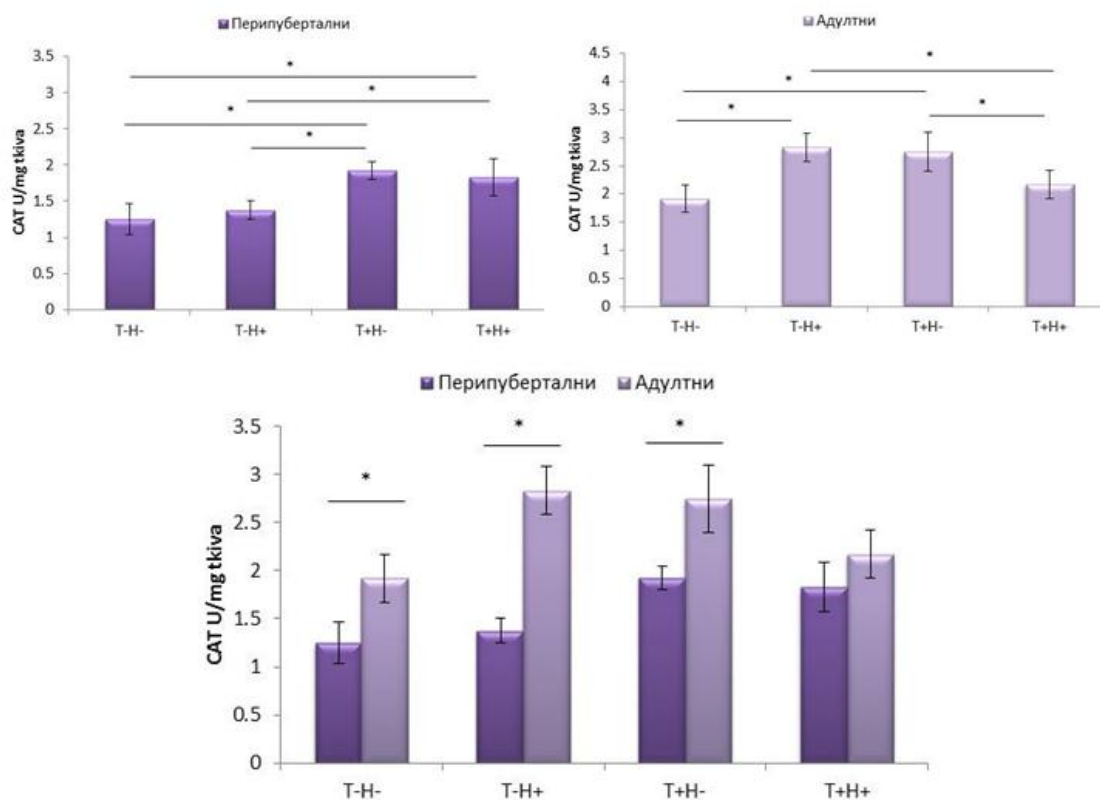
Графикон бр 39. Просечне вредности нитрита код перипуберталних и адултних мужјака као и међусобни однос у унутар испитиваних старосних доби животиња. (Средње вредности  $\pm$ SD).

Вредности нитрита код перипуберталних мужјака нису значајно промењени у експерименталним групама у односу на контролу. Самостално примењен нандролон није довео до промена вредности нитрита у односу на контролне вредности. Тренинг пливањем смањило је вредности за 3% ( $p > 0.05$ ), док је његова комбинована примена са нандролон деканоатом смањила за 1% у односу на Т-Н- групу. Поређењем унутар самих експерименталних група самостално примењен нандролон повећао је вредности нитрита у односу на тренинг за 3% ( $p > 0.05$ ) и 1% ( $p > 0.05$ ) у односу на њихову удружену примену. У Т+Н+ групи, вредности су повећане за 2% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 39).

Као и у перипуберталној популацији мужјака, вредности нитрита нису значајно промењене ни у адултној популацији у односу на контролне вредности. У Т-Н+ групи нема никакве разлике у вредностима нитрита у односу на Т-Н- групу. У Т+Н- групи дошло је пораста вредности за 2% ( $p < 0.05$ ) а у Т+Н+ групи до смањења за 3% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т-Н- групу. У Т+Н- групи вредности су повишене за 2% ( $p < 0.05$ ) а у Т+Н+ групи су снижене за 3% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т-Н+ групу. У Т+Н+ групи вредности су смањене за 5% ( $p < 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 39).

Поређењем вредности између перипуберталне и адултне популације, вредности нитрита снижене су у Т-Н- групи за 3% ( $p > 0.05$ ), у Т-Н+ групи за 3% ( $p > 0.05$ ), у Т+Н+ групи за 5% ( $p < 0.05$ ), док су у Т+Н+ групи вредности повишене за 2% ( $p < 0.05$ ) у адултној популацији у односу на перипуберталну (Графикон 39).

## 4.7.3. Каталаза (CAT)



Графикон 40. Просечне вредности каталазе код перипуберталних и адултних мужјака као и међусобни однос у унутар испитиваних старосних доби животиња. (Средње вредности  $\pm$ SD)

Вредности каталазе код перипуберталних животиња повишене су у свим експерименталним групама у односу на контролу. Самостално примењен нандролон довео је до пораста за 10% ( $p > 0.05$ ), тренинг за 54% ( $p < 0.05$ ) а њихова удружена примена за 46% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Тренинг пливањем као и његова удружена примена са нандролоном довела је до пораста вредности за 40% ( $p < 0.05$ ) и 34% ( $p < 0.05$ ) (редом) у односу на самостално примењен нандролон деканоат. Удружена примена нандролона и тренинга довела је до смањења вредности каталазе за 4% ( $p > 0.05$ ) у односу на самосталан тренинг (Графикон 40).

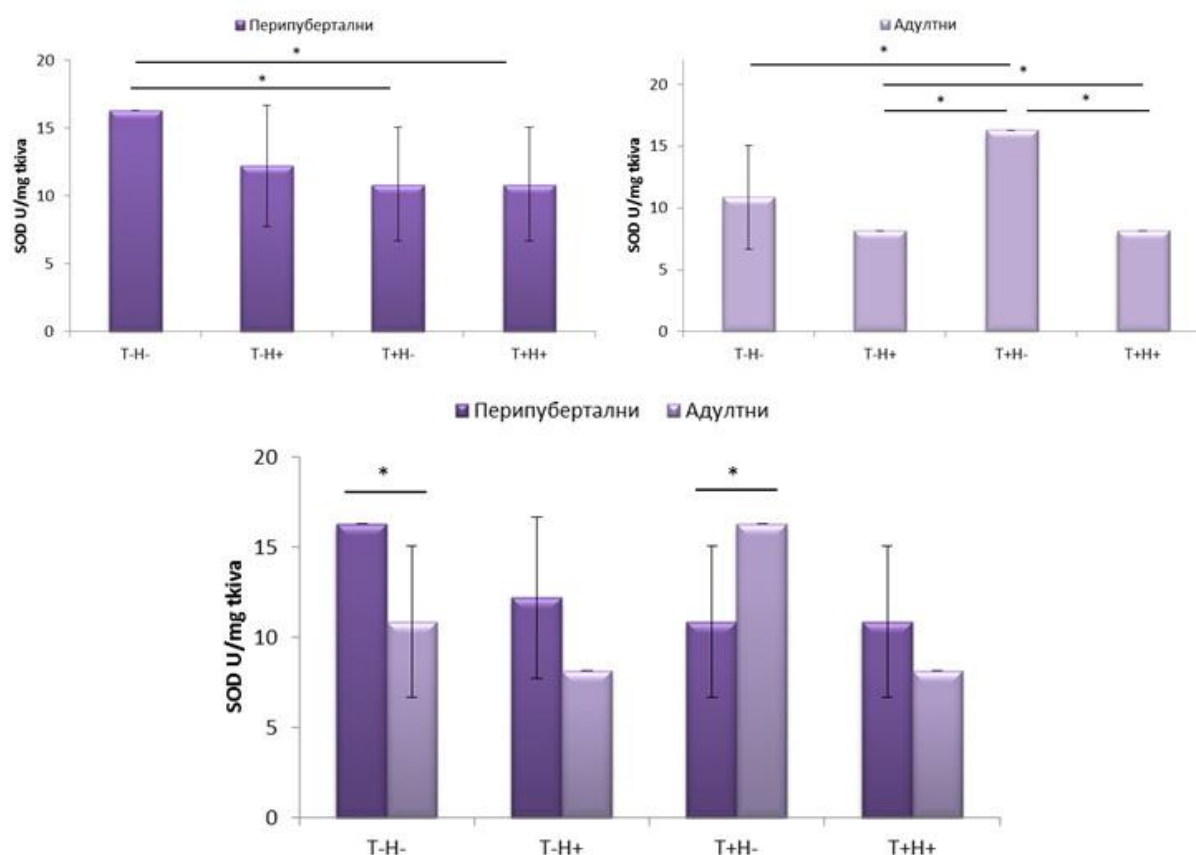
Код адултних мужјака, каталаза је такође повишена у свим експерименталним групама у поређењу са контролним вредностима. У T-N+ групи пораст је 47% ( $p < 0.05$ ), у

T+N- групи је 44% ( $p < 0.05$ ), у T+N+ групи је 13% ( $p > 0.05$ ) у односу на T-N- групу. Поређењем унутар самих експерименталних група, самосталан тренинг као и његова удружена примена са нандролоном довела је до самњења вредности за 3% ( $p > 0.05$ ) и 23% ( $p < 0.05$ ) (редом) у поређењу са T-N+ групом. У T+N+ групи`вредности каталазе смањене су за 21% ( $p < 0.05$ ) у односу на T+N- групу (Графикон 40).

Са старењем вредности каталазе значајно се повећавају у свим испитиваним групама. У T-N- групи пораст каталазе је 53% ( $p < 0.05$ ), у T-N+ групи је 107% ( $p < 0.05$ ), у T+N- групи је 43% ( $p < 0.05$ ), у T+N+ групи је 19% ( $p > 0.05$ ) у адултној у односу на перипуберталну популацију (Графикон 40).



## 4.7.4. Супероксид дисмутаза - SOD



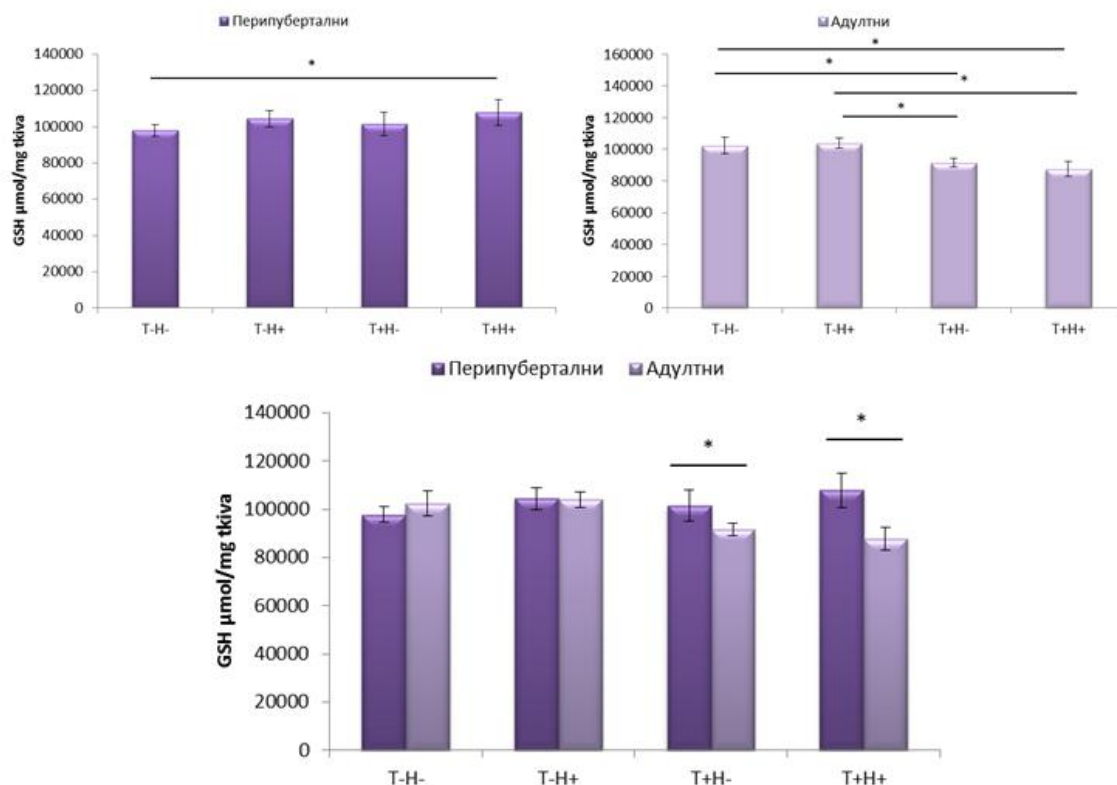
Графикон 41. Просечне ткивне вредности SOD-а код перипуберталних и адултних мужјака као и међусобни однос у унутар испитиваних старосних доби животиња. (Средње вредности  $\pm$ SD)

Супероксид дисмутаза смањена је у свим експерименталним групама код перипуберталних мужјака. У T-N+ групи смањење је 25% ( $p > 0.05$ ), док је у групама T+N- и T+N+ смањење идентично и износи 33% ( $p < 0.05$ ) у поређењу са T-N- групом. Гледајући вредности SOD-а између експерименталних група, примећујемо да је и самосталан тренинг као и његова удружена примена са нандролон деканоатом довела до смањења вредности за 11% ( $p > 0.05$ ) у односу на самостално апликован нандролон деканоат. Између T+N- и T+N+ групе не постоји никаква разлика у вредностима супероксид дисмутазе (Графикон 41).

У адултној популацији, такође постоје разлике у вредности SOD-а између експерименталних група и контролних вредности. У групама којима је апликован нандролон самостално и у комбинацији са тренингом вредности су снижене за 25% ( $p > 0.05$ ), док је самосталан тренинг довео до повећања вредности за 50% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Између T+N+ групе и T-N+ групе нема разлике јер су вредности SOD-а идентичне. Трениг пливањем довео је до пораста вредности за 100 % ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално примењен нандролон као и у односу на његову комбиновану примену са тренингом (Графикон 41).

Гледајући вредности супероксид дисмутазе између две испитиване популације, можемо приметити да у групама T-N-, T-N+, T+N+ дошло до смањења вредности и то за 33% ( $p < 0.05$ ), 33% ( $p > 0.05$ ) и 25% ( $p > 0.05$ ) (редом) у адултној популацији у односу на перипуберталну. Једино је самостално тренинг довео до пораста вредности SOD-а код адултних пацова и то за 50% ( $p < 0.05$ ) у односу на перипуберталне пацове (Графикон 41).

## 4.7.5. Редуковани глутатион - GSH



Графикон 42. Просечне вредности GSH-a код перипуберталних и адултних мужјака као и међусобни однос у унутар испитиваних старосних доби животиња. (Средње вредности  $\pm$ SD).

Вредности редукованог глутатиона код перипуберталних мужјака повишене су у експерименталним групама у односу на контролну групу. Самостално апликован нандролон довео је до пораста вредности за 7% ( $p > 0.05$ ), тренинг пливањем за 4% ( $p > 0.05$ ) док је највеће повећање примећено у групи која је и тренирала и примала нандролон и то за 10% ( $p < 0.05$ ) у односу на контролне вредности. Тренинг је довео до смањења вредности за 3% ( $p > 0.05$ ) у односу на T-N+, а за 6% ( $p > 0.05$ ) у односу на T+N+ групу. Удружена примена нандролона и тренинга довела је до пораста вредности GSH за 3% ( $p > 0.05$ ) у односу на самостално апликован нандролон (Графикон 42).

Код адултних мужјака, вредности GSH разликују се у односу на вредности код перипуберталних мужјака. У овој популацији мужјака, самостално примењен нандролон

довео је до пораста вредности за 2% ( $p > 0.05$ ). За разлику од самостално примењеног нандролонa, његова комбинована примена са тренингом довела је смањења вредности за 11% ( $p < 0.05$ ) док је сам тренинг смањио вредности за 14% ( $p < 0.05$ ) у поређењу са контролним вредностима. Самосталан тренинг као и његова удружена примена са нандролоном довела је до смањења вредности за 12% ( $p < 0.05$ ) и 16% ( $p < 0.05$ ) у односу на самостално апликован нандролон деканоат. У Т+Н+ групи дошло је до смањења за 4% ( $p > 0.05$ ) у односу на Т+Н- групу (Графикон 42).

Посматрајући вредности GSH између перипуберталне и адултне попуације мужјака, приметили смо да је у Т-Н- групи пораст био 5% ( $p > 0.05$ ), у групи Т-Н+ смањење је било 0.5% ( $p > 0.05$ ), у Т+Н- групи смањење је било 10% ( $p < 0.05$ ) а у Т+Н+ групи смањење је било 19% ( $p < 0.05$ ) у адултној у односу на перипуберталну популацију мужјака (Графикон 42).

**5.**

**Дискусија**

## 5. Дискусија

У неколико последњих деценија злоупотреба ААС је попримила готово епидемијске размере како међу професионалим тако и међу рекреативним спортистима. Иако је Међународни Олимпијски Комитет забранио употребу нандролон деканоата још 1976 године, овај анаболички стероид је данас један од најчешће злоупотребљаваних ААС. С друге стране, бављење спортом је постала масовна појава и представља важан део савременог начина живота. Бројни су позитивни ефекти које изазива активан начин живота, али у професионалном па чак и у аматерском спорту влада правило да се мора победити по сваку цену. Овакав приступ је довео до тога да све већи број спортиста, како међу адултном популацијом тако и међу адолесцентном популацијом, узима ААС, желећи да за кратак временски период постигне што боље физичке перформансе. Имајући ове чињенице у виду, наша студија је дизајнирана тако да се прате ефекти четворонедељне примене нандролон деканоата на експерименталним животињама, што аналогно код људи одговара једном „стероидном“ циклусу (3). Оваквим дизајном студије, желели смо да покажемо да коришћење супрафизиолошких доза ААС, чак и у само једном „стероидном циклусу“ може изазвати одређене штетне ефекте на организам човека. Као експериментални модел тренинга одлучили смо се за пливање јер пацови имају природну способност пливања, а како су мотивисани да избегну давање на овај начин је обезбеђен тренинг високог нивоа физичког напора. У литератури су описани ефекти ААС на хипофизно-гонадалну осовину међутим, за сада нема довољно података о ефектима самосталне и удружене примена ААС и тренинга пливањем на хистоморфометрију и функцију гонадотропних ћелија хипофизе. Такође је познато да злоупотреба ААС изазива одређене промене на семиниферним каналићима тестиса, међутим нема података да ли и у којој мери интензиван тренинг самостално може изазвати морфофункционалне промене на овим структурама. Са друге стране, снажан адаптациони процес хипертрофије скелетних мишића који се јавља као последица апликације ААС и тренинга представља један од водећих разлога за злоупотребу ове групе лекова међу адолесцентима и одраслима у професионалном и рекреативном спорту што представља сигнификантан патофизиолошки, али и психосоцијални проблем. Уношење високих доза анаболичких стероида у дужем временском периоду ремети, како смо раније навели, структуру и

функцију бројних органа и ткива, али основни циљ ове студије је био да се прецизно дефинишу и квантификују ефекти ААС на гонадотропне ћелије хипофизе, семиниферне каналиће тестиса, масно ткиво, скелетне мишиће, као и да се одреди ниво оксидативног стреса који настаје овом злоупотребом.

### 5.1 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на телесну масу пацова

У студији је показано да самостална примена нандролон деканоата, самосталан тренинг као и њихова удружена примена доводи до значајног пораста **телесне масе** у односу на почетне вредности како у перипуберталној тако и у адултној популацији испитиваних животиња. Повећање финалне телесне масе у односу на почетне вредности у перипуберталној популацији било је двоструко веће него повећање телесне масе код адулте популације животиња, што је и очекивани резултат имајући у виду претходна истраживања.

Посматрајући вредности телесне масе животиња на крају четворонедељног експерименталног протокола, у свим експерименталним групама дошло је до смањења телесне масе у односу на контролне групе. Овај резултат је у складу са литературним подацима. *Rocha* и сарадници навели су да је до смањења телесне масе након примене нандролон деканоата у комбинацији са тренингом пливањем дошло због смањења интраперитонеалне масти (185). *Hassan u Kamal* су у њиховом истраживању у ком су животиње добијале нандролон деканоат 2 пута недељно у дози од 5mg/kg телесне масе у трајању од 6 недеља и симултано тренирале пливањем такође показали релативно смањење телесне масе животиња. И они су дошли до закључка да је до смањења телесне масе у експерименталним групама у односу на контролну групу дошло због смањења интраперитоненеалног масног ткива (77). С друге стране, *Yu-Yahiro* и сарадници, у студији у којој су давали нандролон деканоат женкама пацова у дози од 100 mg/kg недељно у периоду од 6 недеља, наводе да је до смањења телесне масе животиња дошло због смањеног апетита што су потврдили мерењем остатака хране након оброка (186). Иако у литератури доминира мишљење идентично резултатима ове студије, постоји и налаз *Kochakian*-а и сарадника везан за истраживање у којем је тестостерон пропионат аплициран пацовима што је довело је до повећања телесне масе животиња (187). У циљу одређивања тачног разлога за смањење телесне масе експерименталних животиња ова

студија је одредила и морфометријске карактеристике адипоцита абдоминалног масног ткива као и нивоа лептина у крви животиња. Доказано је смањење волумена испитиваних масних ћелија што је последица убрзања метаболизма и елиминације триглицерида из масног ткива. Готово идентично је и мишљење *Beutel-a* и сар., у студији у којој су применили и ниске (18.5 mg/kg недељно) и високе дозе (20 mg/kg недељно) станозолола током периода од осам недеља (188).

## 5.2 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на хипофизу пацова

Апсолутна **маса хипофизе** сама по себи не спада у веома важне налазе будући да нема литературних података да маса ове ендокрине жлезде увек и директно корелира са њеном функцијом тј. нивоима хормона у крви. Ово је понајвише због тога што промена масе хипофизе може да буде последица различитих процеса који не морају увек бити повезани са променом волуменске густине секреторно активних ћелија. У овој студији је утврђено да је самостална примена нандролон деканоата у обе испитиване старосне популације пацова довела до њеног смањена. Сличан налаз су објавили и *Gerez* и сарадници у свом истраживању на женкама пацова које су добијале нандролон деканоат у периоду од 3 недеље у дози од 3 mg/kg једном недељно (189), као и *Šošić-Jurjević* и сарадници (190) и *Ajdzanović* и сарадници (191) који су такође показали да третман тестостероном код орхидектомисаних пацова доводи до смањења апсолутне масе хипофизе у односу на контролне вредности (190, 191). Сличан налаз су објавили и *Ristić* и сарадници који су испитивали ефекте третмана тестостероном на масу хипофизе код орхидектомисаних пацова (174). Ови резултати показују да тестостерон значајно смањује волуменску и оптичку густину гонадотропних ћелија хипофизе, тј. повећање нивоа тестостерона код орхидектомисаних пацова након третмана тестостероном последично је довео до смањења величине и броја гонадотропних ћелија. Овакав резултат јесте директна потврда да полни хормони утичу на функцију али и морфометријске карактеристике гонадотропних ћелија и то механизмом негативне повратне спреге (174). Подаци из литературе показују да код пацова, експресија андрогеног рецептора у гонадотропним ћелијама хипофизе указује на директну активност полних хормона на нивоу гонадотропних ћелија (192). Без обзира да ли делује на хипофизном или хипоталамусном нивоу, тестостерон доводи до супресије функције LH и FSH ћелија хипофизе (193). Овакав



механизам дејства стероида на ћелије хипофизе у потпуности објашњава резултате ове студије везане за смањење масе хипофизе након апликације нандролонa. Са друге стране, самосталан тренинг пливањем као и његова удружена примена са нандролон деканоатом довела је до потпуно супротног налаза тј. значајног повећања масе хипофизе у овој студији. Литературни подаци везани за овакав ефекат самосталног тренинга на масу хипофизе не постоје. Чињеница је да је у овој студији ниво тестостерона у крви код животиња које су само тренирале снижен, што је потврђено и у истраживању *Manna* и сар. (194). Они су овај ефекат објаснили прерасподелом крви у току и након тренинга тј. повећаном прокрвљеношћу скелетних мишића са последичним смањењем протока у тестисима и самим тим нижим нивоима тестостерона (194). Примењујући аналогију са претходним објашњењем, може се закључити да нижи нивои серумског тестостерона показују слабији ефекат негативне повратне спреге на гонадотропне ћелије хипофизе и самим тим изостанак смањења масе ове жлезде или чак и њено повећање.

### 5.2.1 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на LH и FSH ћелије хипофизе

У овом истраживању, сви експериментални протоколи довели су до значајног смањења волуменске густине гонадотропних ћелија хипофизе у обе испитиване старосне популације пацова. Најизраженије смањење волуменске густине примећено је у групама које су самостално добијале нандролон деканоат и у перипуберталној и у адултној, док је најмање снижење примећено у групама које су самостално тренирале пливање. Праћењем вредности овог параметра између две испитиване старосне популације, уочавамо да је једино у контролној групи у адултној популацији, волуменска густина **LH ћелија** повећана у односу на перипуберталну. Самостално примењен нандролон као и његова удружена примена са тренингом, смањила је волуменску густину у адултној популацији у поређењу са вредностима волуменске густине у перипуберталној популацији испитиваних животиња. Тренинг пливањем није утицао на промену волуменске густине између две испитиване старосне популације пацова.

У перипуберталној популацији испитиваних животиња ниједан експериментални протокол није довео до промене броја LH ћелија на  $\text{mm}^2$ . Међутим, у адулној популацији испитиваних животиња дошло је до значајног смањења броја LH ћелија на  $\text{mm}^2$  након самосталног третмана нандролон деканоатом и/или његове удружене примене са

тренингом пливањем. Самосталан тренинг пливањем није утицао на промену броја LH ћелија на  $\text{mm}^2$ . Праћењем броја LH ћелија у ове две испитиване старосне популације животиња, уочавамо да је у адултној популацији број ћелија значајно већи у контролној групи и групи која је тренирала пливање у односу на перипуберталну популацију. Супротном овоме, у адултној популацији у групама које су самостално или у комбинацији са тренингом добијеле нандролон деканоат, број LH ћелија је смањен у поређењу са бројем ћелија у перипуберталној популацији пацова. У перипуберталној популацији величина и изглед саме ћелије није промењена, међутим, у адултној популацији испитиваних животиња јасно се уочава смањење облика и величине ћелије након третмана нандролоном. Овакав резултат нам показује да егзогено дати анаболички стероиди имају негативнији и штетнији ефекат на старију испитивану популацију док млађа популација испитиваних животиња готово да није погођена штетним ефектом.

Још један параметар који смо пратили у нашој студији јесте и одређивање нивоа имунофлуоресцентног сигнала. На овај начин покушали смо да квантификујемо количину самог хормона у гонадотропним LH ћелијама хипофизе. Резултати у нашој студији су показали да је ниво имунофлуоресцентног сигнала расте након свих експерименталних протокола у обе испитиване старосне популације пацова и да је пораст вредности најизраженији након самостале примене нандролон деканоата. Поређењем нивоа сигнала између испитиваних старосних доби, уочавамо да су вредности имунофлуоресцентног сигнала више у перипуберталној попуацији у односу на адултну популацију пацова. Једино у групама које су самостално добијале нандролон деканоат није дошло до промена вредности овог параметра.

У нашој студији, самостално примењен нандролон деканоат као и његова удружена примена са тренингом пливањем довела је до смањења вредности LH хормона у обе испитиване популације животиња. Тренинг пливањем није значајно утицао на промену серумских вредности лутеинизирајућег хормона. Праћењем вредности овог хормона између испитиваних старосних популација животиња уочавано да са старењем не долази до значајних промена вредности овог хормона. Смањење вредности LH хормона након применен нандролон настао је као последица смањене активности хипоталамо хипофизно гонадалне осовине услед нарушавања физиолошког функционисања

механизма негативне повратне спреге. Овакав резултат је у складу са литературним подацима (80). *Shahraki* је показао да примена нандролонa у периоду од 8 недеља смањује дупло вредности LH хормона у односу на почетне (80). Супротно нашем резултату, *Bijlsma* наводи да вредности LH хормона остају непромењене након примене нандролон деканоата (79). *Manna* је показао да тренинг пливањем у трајању од 3h значајно смањује ниво LH хормона, што је складу са нашим резултатом (194).

Резултати волуменске густине **FSH ћелија** хипофизе смањени су у свим експерименталним групама у обе испитиване популације пацова. Динамика промена волуменске густине FSH ћелија у адултној популацији готово да прати исти тренд промена као код вредности волуменске густине LH ћелија. У перипуберталној популацији животиња самостално и удружено примењен нандролон значајно су смањили волуменску густину FSH ћелија. Изгледа да примена нандролонa има подједнако штетан утицај на FSH ћелије као и на LH ћелије и да су подједнако погођени штетним ефектима и млађе и старије популације. Праћењем вредности волуменске густине између испитиваних старосних доби пацова, уочавамо да је једино удружена примена нандролонa и тренинга пливањем довела до смањења овог параметра у адултној популацији. У осталим групама, волуменска густина је повећана у адултној популацији у односу на перипуберталну.

Ниједан примењен експериментални протокол, у перипуберталној популацији испитиваних животиња, није довео до промена броја FSH ћелија на  $\text{mm}^2$ . Број ћелија у адултној популацији пацова, смањен је након самосталне и удружене примене нандролонa, док тренинг значајно не утиче на промену броја ћелија. Посматрајући вредности броја ћелија унутар испитиваних старосних група пацова, уочавамо да су у адултној популацији вредности броја ћелија на  $\text{mm}^2$  знатно веће у поређењу са вредностима перипуберталних животиња.

Ниво имунофлуоресцентног сигнала FSH ћелија у перипуберталној популацији смањен је у групама које су добијале нандролон док тренинг није утицао на промену нивоа сигнала. Супротно оваквом резултату, у адултној популацији испитиваних животиња имунофлуоресцентни сигнал повећан је у свим експерименталним групама а највеће повећање примењено је након удружене примене нандролон деканоата и тренинга. Праћењем вредности имунофлуоресцентног сигнала унутар старосних доби пацова, уочили

смо да је дошло до значајних промена. У контролној групи и у групи која је тренирала пливање, вредности сигнала снижене су у адултној популацији животиња у односу на перипуберталну. Супротно овоме, у адултној популацији животиња, интензитет имунофлуоресценце повећан је након самосталне и удружене примене нандролон деканоат и тренинга у поређењу са вредностима овог параметра у перипуберталној популацији животиња.

Сви експериментални протоколи у перипуберталној популацији испитиваних животиња повећали су вредности FSH хормона и то повећање нарочито је изражено након самосталне и удружене примене нандролон и тренинга пливањем. У адултној популацији, једино је тренинг пливањем повећао вредности овог хормона док хроничан третман нандролоном самостално или у комбинацији са тренингом, смањује вредности FSH хормона. Са старењем, уочавамо да вредности FSH хормона расту у контролној групи и у групи која је тренирала пливање. *Shahraki* је показао да нандролон смањује и вредности FSH хормона што је у складу са нашим резултатима (80) а овакав резултат добио је и *Nagata* у чијој студији су пастуви третирани нандролоном (81). *Manna* је у свом истраживању показао да тренинг пливањем смањује вредности FSH хормона, што се делимично слаже са нашим резултатом (194).

Генерално гледано, самостална и удружена примена нандролон деканоата и тренинга пливањем изазива одређене штетне ефекте на LH и FSH ћелије хипофизе. Егзогено дат анаболички стероид смањио је волуменску густину гонадотропних ћелија, као и број ћелија на  $\text{mm}^2$  и то смањење израженије је у адулној популацији животиња. Такође је утицао и на изглед и величину ових ћелија, где јасно можемо видети да су ћелије мањих димензија и да су интензивније обојене. Интензитет флуоресцентног сигнала повећан је након примене нандролон што указује на то да су гонадотропне ћелије испуњене LH/FSH хормоном. У нашој студији серумске вредности ова два хормона смањена су након примене нандролон. Ћелије хипофизе појачано синтетишу ове хормоне, међутим, за сада се не зна тачан механизам који доводи до пораста секреције хормона у самој ћелији уз истовремено постојање блокаде ослобађања хормона из ћелије. Аутори се слажу да примена анаболичких стероида доводи до пораста нивоа имунофлуоресцентног сигнал, али за сада је непознат механизам који доводи до оваквог

резултата. *Noguchi* је у култури ћелија испитивао ефекте примене тестостерона на секрецију FSH ћелија мужјака пацова. Резултат који је том приликом добио, указује на то да стимулација секреције FSH хормона (у *in vitro* условима) која је изазвана применом тестостерона није настала као последица повећања броја FSH ћелија које излучују FSH, већ је последица повећања излучивања из сваке појединачне FSH ћелије (195). Вероватно, је и за пораст имунофлуоресцентног сигнала LH ћелија одговорно појачана секреција појединачних LH ћелија која настала као последица примене нандролон деканоата, као што је случај и за FSH ћелије.

### 5.3 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на тестис пацова

Када је у питању **маса тестиса**, у обе испитиване популације пацова у овој студији дошло је до промене масе тестиса у свим експерименталним групама. У адултној популацији пацова, маса тестиса је била нешто виша него код перибурталних што је и очекивано имајући у виду да су у питању старије животиње, са већом телесном масом. У нашој студији, самостално примењен нандролон деканоат довео је до смањења масе тестиса у обе испитиване старосне популације пацова и то смањење је било идентично (26%). Смањење масе тестиса настао је као последица атрофије тестиса услед примене стероида. Овај резултат је у сагласности са резултатима других аутора. *Ahmed* је у својој студији, у којој су адултни мужјаци добијали дозу нандролон деканоата од 10 mg/kg телесне масе, једном недељно у трајању од 8 недеља добио резултат који је у складу са нашим. У његовој студији је смањење масе тестиса било готово 28% (196). *Mesbah* је у свом истраживању давао ниску 3mg/kg и високу дозу 10 mg/kg телесне масе нандролон деканоат у трајању од 14 недеља и добио је резултат који је у сагласности са нашим резултатима. Интересантно је то, што је ниска (3mg/kg) доза нандролон деканоата за разлику од високе (10 mg/kg) дозе довела до већег смањења масе тестиса (24% насупрот 13%). Овакав резултат показује да висока доза нандролон деканоата за разлику од ниске дозе има директан заштитни ефекат на репродуктивне органе и спречава већи настанак атрофије тестиса (197).

Тренинг пливањем довео је до повећања релативне масе тестиса и у перипуберталој и у адултној популацији испитиваних животиња. Овакав резултат се разликује од резултата других студија. *Manna* је у својој студији испитивао ефекте четворонедељног тренинг

пливањем на морфо-функцију тестиса. Животиње су пливале 5 дана у недељи, 3 сата дневно, под оптерећењем од 3% телесне масе. У њиховој студији, релативна маса тестиса смањена је 34% након тренинга пливањем (194), што се разликује од нашег резултата где је примећен благ пораст вредности релативне масе тестиса. У другом истраживању Manna је пратио ефекте тренинга пливања у трајању од 1 сата, 2 сата и 3 сата на масу тестиса и показао да пливање доводи до смањења масе тестиса без обзира на дужину тренинга (198), што такође није у сагласности са нашим резултатом.

*Rodrigues* и сарадници су испитивали ефекте примене нандролон деканоат (2 x 0.5 mg/kg) и тренинга на трендмил траци (5недеља/1h дневно/1km/h) као и ефекте детренинга (4 недеље). Њихови резултати су показали да је пето недељни тренинг довео до повећања масе тестиса док је самостално примењен нандролон као и његова удружена примена довела до смањења масе тестиса. Детренинг од четири недеље довео је до смањења масе тестиса у свим групама у поређењу са вредностима масе тестиса у односу на вредности на крају експерименталног периода од 5 недеља. Овакав резултат указује да је дошло до атрофије тестиса која је настала као последица примена ААС (199).

Генерално гледано, маса тестиса углавном зависи од масе сперматогених ћелија у склопу семеног каналића, стога смањење масе тестиса може да укаже на постојање токсичног ефекта на тестис и на поремећај андрогеног статуса (200). Смањење тежине тестиса може настати и као последица смањења тестостерона, апоптозе сперматогених ћелија, смањење сперматогенезе као и инхибиција производње сперме (173). Смањење масе тестиса који је настало услед примене нандролон деканоата, настало је као последица негативне повратне спреге између гонадотропних ћелија хипофизе и тестиса и последично су довели до локалног супресивног ефекта на тестис (201).

**Дијаметар семених каналића тестиса**, представља морфометријски параметар, који се у истраживањима, укључујући испитивање функције тестиса, користи као индикатор сперматогене активности (89). Између дијаметра семеног каналића и сперматогене активности, постоји позитивна корелација (89). У нашој студији, дијаметар семеног каналића, смањен је у свим експерименталним групама и у перипуберталној и у адултној популацији испитиваних животиња. Самостално примењен нандролон као и његова удружена примена са тренингом пливањем значајно је смањила дијаметар семеног

каналића у обе испитиване старосне популације. Тренинг пливањем није значајно утицао на промену овог параметра. Праћењем вредности дијаметра између старосних доби пацова, можемо приметити да је у адултној популацији дијаметар значајно већи у односу на перипуберталну популацију. *Kahal* је испитивао ефекте примене супрафизиолошке дозе нандролон деканоата на тестис мишева након месец, два месеца и три месеца примене нандролон као и након периода паузе од месец и по дана (202). Дијаметар семеног каналића смањен је након третмана нандролоном, што је у складу са нашим резултатом. Такође је приметио, да након шест недеља од престанка коришћења нандролон, долази до реверзије структурних промена семеног каналића, али не у потпуности (202). *Ferrari* и сарадници су такође добили резултат који је у сагласности са резултатом добијеним у нашој студији. Они су показали да нандролон самостално или у комбинацији са тренингом на трендмил траци, смањује дијаметар семеног каналића тестиса (89). Предпостављају да је овакав резултат настао као последица смањења сперматогене активности и да овај анаболички стероид изазива смањење броја герминативних ћелија последично смањујуће ефикасност сперматогенезе (89). Резултате који се разликују од наших добио је *Noorafshan*. Он је у својој студији испитивао ефекте примене ниске и високе дозе нандролон деканоата на морфометрију тестиса. Животиње су добије нандролон у дози од 3mg/kg и 10mg/kg у трајању од 14 недеља а након тога су остављене 14 недеља без третмана и након тога су жртвоване. У њиховој студији дијаметар семених калића незнатно је био повећан након третмана ниском као и високом дозом нандролон (203). Генерално смањење дијаметра (као и површине ткивног пресека) семиниферних каналића које као налаз доминира и у овој, као и у другим студијама се повезује са снижењем броја ћелија које учествују у сперматогенези. Може се из овог релативно једноставног параметра и из налаза серумских нивоа тестостерона у испитиваним групама животиња које су примале ААС закључити да егзогени стероиди и директно, дејством на семени епител али и преко ендокриних механизма повратне спреге између хипофизе и тестиса директно утичу на осиромашење ћелијске популације семених каналића. Интересантан је налаз који говори да и након више недеља не долази до потпуне реституције популације ћелија семеног епитела што само говори у прилог чињеници да су ендокрини механизми укључени у регулисање сперматогенезе осетљиви и лако подложни штетним утицајима са дуготрајним последицама. Штавише, смањење дијаметра и површине семеног каналића,

као и повећање површине интерстицујумског простора тестиса након примене нандролон деканоата говори у прилог настанка озбиљне атрофије тестиса примарно због смањења сперматогенезе, али касније и апоптозе сперматогених ћелија (173). Слично употреби ААС, интензиван тренинг самостално доводи до снижења промера каналића. Будући да у овом случају нема директног штетног дејства ААС-а очигледно је, према налазима ове студије у смислу пораста маркера оксидационог стреса, да управо окидање тог механизма тј. оксидативног стреса ремети стероидогенезу и сперматогенезу у тестису (194). Потпуно је логично да смањење промера семиниферних тубула доводи до повећања волумена интерстицијума тестиса, а директан разлог за утврђивање овог параметра је била намера да се упореде добијене процентуалне вредности ради елиминације грешке приликом мерења великог броја узорака.

Сви примењени експериментални протоколи изазвали су одређене морфолошке промене на тестису које су у сагласности са литературним подацима. Самостално примењен нандролон деканоат као и његова симултана примена са нандролон деканоатом изазвала је атрофију тестиса (смањење дијаметра и површине и висине епитела семеног каналића). На препаратима тестиса након самосталне примене нандролон, као што је већ наведено у склопу резултата могу се микроскопски верификовати дегенеративни ефекти примене нандролон попут некрозе, нуклеарне пикнозе и коагулације сперматозоида. Објашњење за овакав ефекат нандролон може се, осим поремећаја хипофизно-гонадалне осовине, наћи и у чињеници да овај стероид изазива поремећај активности неколико важних ензима попут 17beta-HSD и 3betaHSD али такође и у чињеници да он изазива оштећење ДНК преко антиоксиданата и вектора апоптозе (202). Посебно може бити интересантан налаз загушења микроваскулатурног корита у тестису јер је раније показано да секреторне ћелије тестиса немају значајну могућност депоновања тестостерона (194). Будући да је овај хормон липосолубилан он лако напушта ћелију и његова концентрација у крви у великој мери зависи од самог протока кроз тестис (194). Како је раније показано (194) продужена физичка активност може довести до снижења протока крви кроз тестис по имајући у виду горе наведено и наше налазе ова релативно једноставна појава може дати снижење тестостерона у крви и последично негативе ефекте на сперматогенезу. У студији *Tahtamouni*-ја и сарадника показано је да третман нандролоном и у ниској и високој дози доводи до атрофије која је условљена малим бројем герминативних ћелија у



семеним каналићима са велим фокалним површинама а такође је примећено и смањење сперматозоа у лумену семеног каналића што указује на смањење процеса сперматогенезе (173). У појединим семеним каналићима примећен је поремећај архитектуре семеног епитела (173). *Kahal* је показао да хронична примена високих доза нандролон деканоата у трајању од 3 месеца код мишева доводи до дегенеративних промена и дезорганизације хистолошке структуре семених каналића која се огледа у постојању некрозе, васкуларне конгестије, пикнозе једра некротизираних германитивних ћелија (202). Након периода престанка третмана нандролоном у трајању од 6 недеља уочено је побољшање хистолошких промене али не и потпуни опоравак од штетног утицаја примене нандролон (202). *Manna* је показао да интензивно вежбање (пливање) доводи до поремећаја сперматогенезе који се огледа у смањењу броја различитих генерација германитивних ћелија у стадијуму 7 сперматогеног циклуса (194). Сперматогена инхибиција штетно утиче на сперматогенезу и стероидогенезу.

Андрогено дејство у тестисима као и у другим ткивима посредовано је преко транскрипционе активације **андрогеног рецептора** (173). Тестостерон се селективно везује за базални домен Сертолијеве ћелије која га након тога транспортује и концентрише у лумену семиниферног тубула да би овај хормон преко андрогеног рецептора лоцираног у једрима семених ћелија довео до поменуте транскрипционе активације што води до отпочињања и одржавања процеса сперматогенезе као и до инхибиције апоптозе герминативних ћелија. У нашој студији, имунопозитивност на андрогени рецептор (AR) у тестису показале су Лејдигове ћелије, Сертолијеве ћелије као и миоидне перитубуларне ћелије. Сви експериментални протоколи, у обе испитиване старосне популације пацова довели су до промене количине андрогеног рецептора у тестису. Хроничан третман нандролон деканоатом као и његова удружена примена са тренингом довела је до смањења количине андрогеног рецептора у обе испитиване старосне популације пацова. Хроничан тренинг самостално резултирао је повећањем експресије андрогеног рецептора у ткиву тестиса. Количина андрогеног рецептора смањена је након самосталне примене нандролон деканоата у перипуберталној популације животиња за 29% док је у адултној смањење 28%. Овакав резултат је у складу са резултатима других аутора (173). *Tahtamouni* и сарадници у својој студији испитивали су промене количине андрогеног рецептора у тестису након 14-тно недељне примене нандролон деканоата у ниској дози (3 mg/kg) и

високој дози (10 mg/kg). Резултат који су том приликом добили, показали су да ниска доза нандролон деканоата смањује количину AR за 32% док висока доза смањује 47% експресију AR. У њиховој студији, имунопозитивност на AR показале су само Сертолијеве ћелије (173). Губитак AR активности у Сертолијевим ћелијама доводи до поремећаја сперматогенезе који би резултирао непотпуном мејозом и колапсом сперматоцита у хаплоидне сперматиде. Смањење броја Сертолијевих ћелија које експримирају AR може да буде разлог застоја сазревања као и атрофије тестиса (173).

### **5.3.1 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на серумске вредности тестостерона**

Сви експериментални протоколи и у перипуберталној и адултној популацији испитиваних животиња, довели су до промена серумских вредности тестостерона. Повећање серумских вредности тестостерона, примењено је у свим експерименталним групама у обе испитиване старосне популације пацова. Самостално примењен нандролон довео је до највећег повећања тестостерона у обе испитиване популације животиња. Праћењем вредности овог хормона између испитиваних старосних популација животиња, јасно можемо видети да се са старењем вредности хормона снижавају. Самостално примењен нандролон деканоат у перипуберталној популацији испитиваних животиња као и у адултној популацији животиња довео је до повећања серумских вредности тестостерона. Овакав резултат је у складу са резултатима других аутора. *Hassan u Kamal* су у свом истраживању које су спроводили на пацовима који су примали нандролон деканоат два пута недељно у дози од 5 mg/kg у трајању од 6 недеља и тренирали скакање у базен у трајању од 6 недеља показали да је дошло до пораста вредности тестостерона након самосталне примене нандролон деканоата (77). Такође, *Selakovic* и сарадници су показали да шестонедељни тренинг пливањем и шестонедељна примена нандролон у дози од 20 mg/kg доводи до пораста вредности овог хормона (83). Супротно од наших резултата, *Grevik* и сарадници у свом истраживању у ком су пратили ефекат примене једне дозе ND од 150 mg у хуманој популацији, показали су да и само једна примењена доза овог анаболика доводи до смањења серумских вредности тестостерона (204). *Ristić* и сарадници су такође навели да примена тестостерона код орхидектомисаних пацова доводи по значајног повећања серумских вредности тестостерона (174). Тренинг

пливањем довео је до повећања вредности тестостерона у обе испитиване популације животиња, с тим што је у перипуберталној популацији пораст вредности био израженији у односу на адултну. Овакав резултат је у складу са литературним подацима (77, 83).

Хронична изложеност тренинзима издржљивости може нарушити функционисање хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине, што доводи до значајног и упорног смањења базалног нивоа слободног и укупног тестостерона, често остајући унутар физиолошког распона, без истовременог повећања нивоа LH (67). *Eliakim* и *Nemet* су испитавали ефекте вежбања на репродуктивни систем мушкараца и показали су да у зависности од интензитета, трајања активности, нивоа фитнес спреме појединца као и од његовог нутритивниог статуса зависе и ефекти на репродуктивну осовину (205). Краткотрајно и интензивно аеробно и анаеробно вежбање доводи до пораста вредности тестостерона док продужено умерено и интензивно вежбање доводи до иницијалног (почетног) пораста вредности тестостерона које ће касније бити праћено падом вредности све до или испод почетних вредности. Тренинг вежбањем, најчешће резултира смањењем серумских вредности тестостерона (205). *Vaamonde* и сарадници у њиховом истраживању које су спроводили у хуманој популацији показали су да тренинг издржљивости у трајању од годину дана доводи до пораста вредности овог хормона у односу на мушкарце који нису тренирали (206).

У нашој студији, удружена примена нандролон деканоата довела је до повећања вредности тестостерона у обе испитиване старосне популације пацова. Овакав резултат је делимично у складу са литературним подацима. Вредности тестостерона у раније описаној студији *Hassan u Kamal* – а и *Selakovic* и сарадника повећане су у свим експерименталним групама док су највише вредности примећене у групи која је и тренирала пливање и добијала нандролон деканоат (77,83) што се разликује од резултата у нашој студији где је и у перипуберталној и у адултној популацији испитиваних животиња, где је највиша вредност тестостерона била у групи која је самостално добијала нандролон деканоат. Нажалост, у литератури постоји мало података са којим бисмо могли да упоредимо овакав резултат. Имајући у виду да су у нашој студији смањене вредности LH хормона након удружене примене нандролон и тренинга, а знамо да LH хормон делује на Лејдигове ћелије тестиса да стимулише продукцију тестостерона, може бити једно од објашњења за

овакав резултат. Овакав резултат може бити и последица ниског нивоа лучења тестостерона, који се настао као последица смањеног дотока крви услед тренинга издржљивости (194).

#### **5.4 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на скелетни мишић**

Познато је да администрација ААС-а може повећати синтезу протеина миофибрила, што последично доводи до повећања мишићне масе (207, 208). То је показано и у овој студији, јер смо показали да су и површина попречног пресека као и дијаметар уздужног пресека мишићних ћелија квадрицепса, повећане у свим експерименталним групама. Занимљиво је да само примена нандролона узрокује значајно нижу хипертрофију скелетних мишића него сама физичку активност. Чини се да стероидна акција преко нуклеарног андрогеног рецептора није толико ефикасна као физички стимуланс за раст мишића. Слични налази су објављени у недавној студији где је верификована значајна разлика (веома слична нашим резултатима) код површине попречног пресека ћелија скелетних мишића само између стероида и самих група тренинга (209). Иако постоје одређене разлике у дизајну студије, општи закључак подржава наше налазе о овом питању.

Са старењем, површина као и дијаметар скелетног мишића се повећава. Овакав резултат је у складу са резултатима других аутора. *Hipple u Vogell* испитивали су ефекте старења на величину мишићног влакна код мишева старости 8 месеци (млади адулти) и 28-30 месеци (средовечни) старости (129). Вршили су морфометријско испитивање *m. Soleus*-а, *m. Gastrocnemius*-а (црвена и бела мишићна влакна) и показали су да је површина попречног пресека скелетних мишићних ћелија у белим влакнима *m. Gastrocnemius*-а смањена (%) код средовечних животиња у односу на младе адулте. За разлику од белих мишићних влакана *m. Gastrocnemius*-а, површина попречног пресека црвених мишићних влакана *m. Gastrocnemius*-а (28%) као и попречни пресек *m. Soleus*-а (12%) је повећана код средовечних пацова у односу на младе адулте (129). Дијаметар мишићних ћелија у белим влакнима *m. Gastrocnemius*-а смањен је код средовечних животиња док је у црвеним влакнима *m. Gastrocnemius*-а и у *m. Soleus*-у повећан код средовечних животиња у односу на младе адулте (129). Одржање величине мишићних влакана *m. Soleus*-а код средовечних животиња вероватно јесте последица утицаја повећања телесне масе овог постуралног

мишића са старењем (повећана телесна маса која се супроставља ефекту смањене физичке активноати) док повећање величине мишићних ћелија у склопу црвених влакана *m. Gastrocnemius*-а може бити компензација за повећану телесну масу уколико је овај регион регрутован да помогне *m. Soleus*-у у одржавању постуралног става. Смањена величина мишићних ћелија у белим влакнима *m. Gastrocnemius*-а старијих животиња последица је смањене физичке активности (129, 210).

Поред структуралне улоге, ендомизијски, перимизијски и фасцијални **колаген** важан је за дистрибуцију и преношење силе која је створена контракцијом мишићних ћелија. До одређеног нивоа, повећање садржаја колагена, који се лако може видети у мишићном ткиву активних спортиста као последица напорне вежбе (211), приписује се стварању јачих и боље циљаних сила контракције (212-214), али превелик депозит колагена показује супротне ефекте. У нашој студији епимизијални депозит колагена значајно је порастао код третмана нандролоном и још више након физичке активности, док су највише вредности биле примећене код пацова изложених комбинованом приступу. Разумно је веровати да снажна ендомизијална фиброза коју смо запазили у поменутој групи животиња припада нежељеним ефектима хроничне примене високе дозе нандролоне, обзиром да овај анаболички стероид изазива слично повећање садржаја колагена у мишићима код крава (215). Када је у питању самосталан тренинг и наши и литературни подаци говоре у прилог томе да је депоновање колагена појачано. *Hjorth* и сар. су пријавили двоструко увећање колагена (216), док је *Carroll* и сар. пронашао троструко већи садржај колагена у гастрокнемиусу, што је у корелацији са нашим налазима (217). Механизам мишићне фиброзе изазване нандролоном, па и тренингом још није у потпуности разјашњен. Иако је потпуно логично да тензилне силе које се јављају у мишићном ткиву услед контракција у току тренинга изазивају појачано депоновање колагена од стране фибробласта везивних омотача мишића, када је у питању исти ефекат произведен дејством ААС неки аутори тврде да у срчаном мишићу оксидациони стрес и запаљенски цитокини могу покренути пролиферативне и фибротичне путеве који могу довести до повећаног садржаја колагена (218, 219). Највероватније је да исти или веома слични механизам доприноси фибрози и у скелетним мишићима.

**Степен васкуларизације мишића** квадрицепса у нашој студији индиректно је процењен на основу Новелли хистохемијског бојења, док је потенцијал ангиогенезе назначен са VEGF-ом имунохистохемијском детекцијом. Васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF) представља ангиогени фактор који има улогу у одржавању васкуларне хомеостазе (132) а такође се сматра и фактором преживљавања ендотелијалних ћелија у условима *in vivo* и *in vitro* (133). Ангиогенеза представља формирање нових капилара насталих из већ постојећих (116). Формирање нових капилара одвија се на два начина, механизмом интусепције или ницањем новог капилара (116). Изражена капиларна мрежа и снажна VEGF експресија унутар мишићног ткива квадрицепса, као и повећање броја имунопозитивних скелетних мишићних ћелија на VEGF могу се верификовати само након тренинга пливањем или у комбинацији са апликацијом нандролон деканоата код перипуберталних и адолтних пацова. Утврђено је да VEGF представља главни проангиогени фактор код скелетних мишића, који је повећан код младих мушкараца током првих недеља тренинга за аеробне вежбе, док се након тога враћа на базални ниво (220). У ствари, механички стимулус изазван активном контракцијом мишића доводи до повећања нивоа VEGF-а мишића (220, 221). Такође је пријављено да само тренинг индукује повећање капиларне мреже мишића (222). Сличан, али нешто јачи ефекат је примећен при тренингу у комбинацији са ААС. Налази *Neto* и *Gama* потврђују резултате у нашег експеримента (223). Са друге стране, неки аутори указују да ААС могу инхибирати VEGF експресију и на тај начин угрозити ангиогенезу (137, 224). У Овој студији је доказано да само тренинг индукује настанак повећаних депоа еритроцита, као и повећање VEGF експресије (2 пута и 3 пута) и броја имунопозитивних ћелија (2 пута у обе испитиване старосне популације), док је самостална примена нандролона довела је до нешто нижих вредности ових параметара, чак и у поређењу са контролама. Ово је у складу са подацима које су објавили *Paschoal* и сарадници који се односе на смањење експресије VEGF-а и поремећај васкулатуре што је изазвано анаболичким стероидима (137). *Hassan u Kamal* су такође у својој студији пратили ефекте самосталне и комбиноване примене нандролона и тренинга на серумске вредности VEGF и показали да самостална примена нандролона смањује серумске вредности VEGF-а док самосталан тренинг како и његова удружена примена са нандролоном повећава вредности VEGF-а. (78). Познато је да смањени парцијални притисак кисеоника у активним мишићима током вежбања може

повећати експресију фактора индукције хипоксије који стимулише транскрипцију VEGF гена у срчаном мишићу (225). VEGF може да омогући и олакша мобилизацију ендотелних прогениторних ћелија из косне сржи (226), за које је познато да имају велику способност да доведу до неоваскуларизације (227). Ангиогенеза која је настала у срцу пацова након тренинга и примена ААС зависила је од доступности васкуларног ендотелијалног фактора раста у одговору на повећану потребу миокарда срца за кисеоником коју је изазвала хипертрофија срца (77). Слично овоме *Wagatsuma* је у својој студији испитивао ефекте краткотрајног тренинга пливањем (шест тренинга у трајању од 50 минута дневно) на експресију VEGF гена у срцу мишева и показали су да чак и краткотрајан тренинг пливањем доводи до повећања експресије гена за VEGF и то за више од 2 пута (228). *Husein* и сар. су такође показали да краткотрајан тренинг пливањем повећава експресију mRNA VEGF-а за око 2 пута у срцу пацова (229). Иако су сва наведена истраживања обављена на срчаном мишићном ткиву, слични или исти механизми делују и на скелетни мишић.

Тренинг пливањем довео је до највећег повећања броја имунопозитивних VEGF-а ћелија у скелетним мишићним ћелијама квадрицепса што је у корелацији са предходно описаним резултатом који се односи на повећање капиларне прокрвљености скелетног мишића односно на повећање експресије VEGF-а у скелетном мишићу. Овакав резултат је директа потврда ангиогенезе која је настала као последица тренинга. *Amaral* и сарадници показали су да ангиогенеза која је настала услед трчања на трендмл траци зависи од доступности VEGF-а (117). Тренинг код пацова (116, 117), а такође и у хуманој популацији (116, 117) доводи до Ур-регулације VEGF-а. За сада не постоји јасна веза између тренажног стимулуса (начина и дужине тренирања), ангиогенезе и Ур-регулације VEGF-а (116). Међутим, изгледа да се Ур-регулације VEGF-а примарно одиграва у влакнима која активно утичу на процес ангиогенезе (116). Одређени литературни подаци указују на то да је VEGF укључен у рани процес ангиогенезе која је условљена вежбањем (117, 230). Међутим, тренинг у дужем временском периоду доводи до смањења генске експресије за VEGF-а (117, 230). На настанак ангиогенезе, значајну улогу има и повећање генске експресије за eNOS (ендотелијална азот-моноксид синтаза) (116). Вежбање доводи до пораста mRNA eNOS (231). Ово може утицати на процес ангиогенезе зато што азот моноксид има битну улогу сигналној каскади VEGF-а (116). Инхибиција азот монооксида

смањује ангиогени одговор. Активирање VEGF-а преко VEGFR2 (VEGF- рецептора тип 2) доводи до настанка потпуног ангиогеног одговора (116). Активација VEGFR2 доводи до продукције азот монооксида преко ендотелијалне азот-моксид синтазе мобилизацијом калцијума из екстрацелуларних складишта (116, 232). Одређени литературни подаци показују да тренинг издржљивости (као што је пливање, трчање...) доводи до повећања капиларности у скелетном мишићу (116). С друге стране, тренинг високог отпора може довести до смањења капиларности скеленог мишића а разлог томе јесте повећање површине мишићних влакана (116). Међутим, други литературни податак показује да тренинг који се састоји из више поновљених мишићних контракција (начин на који тренирају бодибилдери) не доводи до смањења капиларности мишића (116). Нажалост, доступна литература јако је сиромашна подацима који се односе на ефекте удружене примене ААС и тренинга на настанак ангиогенезе у скелетном мишићу као и на број имунопозитивних VEGF-а ћелија. С тим у вези, можемо рећи да је ово, можда, једна од првих студија која се бавила свеобухватним ефектима ангиогенезе на скелетни мишић.

Са старењем, вредности **еритроцитних депоа** су смањени у адултној популацији у односу на перипуберталну, док су VEGF депои у скелетном мишићу повећани у контролној групи и групи која је самостално добијала нандролон деканоат у адултној популацији мужјака у односу на перипуберталне мужјаке. Овакви контрадикторни резултати су описани и у ранијим студијама. Поједини аутори наводе да са старењем долази до повећања капиларизације (124), други до смањења (123-124), а трећи да не постоји никаква разлика у капиларизацији скелетног мишића (126-131). Разлог оваквог резултата јесте и различит начин квантификације броја капилара у скелетном мишићу (132).

*Wagatsuma* је такође испитивао ефекте старења на генску експресију фактора одговорних за настанак ангиогенезе у скелетним мишићима (*m. gastrocnemius*) и везу између нивоа њихове експресије и капиларног снабдевања код женки мишева. У студију су укључене женке мишева старости 2.5 месеца, 6 месеци и 22 месеца и одређивана је генска експресија VEGF-а. Резултати су показали да са старењем није дошло до промене у капиларном снабдевању међутим, дошло је до смањења генске експресије VEGF-а у



гастрокнемијусу и то смањење је најизраженије било код женки старости 22 месеца у поређењу са женама старости 2.5 и 6 месеци старости (132).

*Hepple* и *Vogell* испитивали су ефекте старења на величину мишићног влакна као и на капиларно снабдевање код различитих врста скелтних мишића. У студију су били укључени пацови старости 8 месеци (млади адулти) и 28-30 месеци (средовечни) и морфометријској анализи подвргнути су *m. Soleus*, *m. Gastrocnemius* (црвена и бела мишићна влакна). Њихови резултати показали су да је број капилара око мишићних влакана у белим мишићним влакнима *m. Gastrocnemius*-а и у *m. Soleus*-у био смањен код средовечних животиња док је у црвеним влакнима *m. Gastrocnemius*-а био повећан код средовечних животиња у односу на младе адулте. Капиларна густина значајно је повећана у белим мишићним влакнима *m. Gastrocnemius*-а код средовечних животиња док је у црвеним влакнима *m. Gastrocnemius*-а и *m. Soleus*-у смањена код средовечних животиња у односу на младе адулте (129).

Као што је и у овој студији утврђено, сви напред наведени резултати подвлаче важност VEGF-а у контроли квантитета мишићног капиларног корита чије су карактеристике пресудно важне за процесе хипертофије мишића будући да је она заснована на повећаној синтези миофибриларних протеина што изискује додатно допремање како кисеоника тако и градивних материја.

### **5.5 Ефекат примене нандролон деканоата и тренинга на дијаметар и површину адипоцита**

Бело масно ткива представља енергетски резервоар нашег организма а адипоцити су једине ћелије које су специјализоване за складиштење триглицерида без липотоксичности (199). У овој студији, дијаметар, као и површина ткивног пресека адипоцита смањена је у свим експерименталним групама у обе испитиване популације животиња у односу на контролне вредности. Оба испитивана параметра масних ћелија, значајно су повишена у адултној популацији испитиваних животиња у односу на перипуберталну, што је и очекиван резултат. Највеће смањење дијаметра и површине адипоцита примећено је након удружене примене нандролон деканоата и тренинга пливањем у обе испитиване старосне популације. Резултати студије *Foletto* и сарадника у складу су са нашим резултатом. Он су потврдили да и сама примена нандролон као и

самостално тренинг на трендмил траци смањује дијаметар адипоцита, а да њихова удружена примена доводи до највећег смањења, и да је настала као последица синергистичког деловања нандролонa и тренинга (233), што је показано и у овој студији. *Rodrigues* и сарадници у својој студији спороведеној на мужјацима пацова који су добијали нандролон деканоат 2 пута недељно у дози 0.5 mg/kg и трчали на трендмил траци у трајању од сат времена у току 4 недеље, показали су да је највећи дијаметар адипоцита био је у групи која је само тренирала, док је најмањи просечан дијаметар адипоцита верификован у групи која је добијала само нандролон деканоат (199). У нашој студији у перипуберталној популацији мужјака пацова најнижи дијаметар био у групи која је добијала нандролон деканоат док је у адултној популацији најнижа вредност дијаметра адипоцита примећена у групи која је и пливала и примала нандролон деканоат (199). Јасно је да вежбање побољшава мобилизацију липида, односно, врши стимулацију липолизе масног ткива посредством липолитичких хормона током дуготрајног вежбања. Вежбање високог интензитета доводи до повећања серумских вредности катехоламина, већег енергетског дефицита и потрошње енергије у мировању (234). Неки истраживачи наводе да смањење масног ткива које је настало као последица тренинга, уствари представља неуравнотеженост између липолизе и липогенезе (199, 235).

Лептин је хормон који се ствара у ћелијама масног ткива – адипотима и има улогу у регулацији телесног масног ткива, у контроли уноса хране, оксидацијом липида и енергетском хомеостазом. Вредности лептина добијене у овој студији, снижене су у свим примењеним експерименталним протоколима у обе старосне популације а највеће снижење примећено је у групама које су удружено примале нандролон деканоат и тренирале пливање. Међутим, у доступној литератури готово и да нема података о ефектима самосталне и удружене примене нандролонa и тренинга на вредности лептина. Наиме, *Alsiö* је у свом истраживању показао да ниска доза нандролон деканоата од 3 mg/kg не доводи до смањења вредности лептина у плазми док висока доза од 10 mg/kg смањује ниво лептина у крви (236), што смо и ми потврдили у овом истраживању. Тренинг пливањем значајно је смањио ниво лептина у обе испитиване популације животиња. *Zhao* је испитивао ефекте тренинга издржљивости на вредности лептина и показао да тренинг трчања на трендмил траци значајно смањује ниво лептина (237). *Yasari* је такође показао да тренинг издржљивости смањује нивое лептина у плазми уз истовремено смањење

генске експресије лептинског рецептора у јетри (238). Најниже вредности лептина биле су након удружене примене нандролон деканоата и тренинга пливањем што је и очекиван резултат. Нажалост, у литератури нема сличних студија на основу који можемо да упоредимо овакав резултат. Имајући у виду да је у овој студији најнижи дијаметар као и површина адипоцита била након удружене применен нандролон деканоата и тренинга пливањем и да су вредности лептина у овој групи најниже можемо закључити да су ови резултати у корелацији. Овакав резултат настао је као последица липолизе услед истовремене примене овог анаболичког стероида и тренинга.

## **5.6 Ефекат примене нандролон деканоат и тренинга пливањем на редокс статус**

Циљ овог дела истраживања био је да се испита улога маркера оксидативног стреса у условима хроничне примене нандролон деканоата и тренинга на системски и ткивни редокс статус. Одређивањем вредности прооксидативних маркера супероксида анјон радикала ( $O_2^-$ ), водоник пероксида ( $H_2O_2$ ), нитрита ( $NO_2^-$ ), индекса липидне пероксидације (који је мерен као TBARS), као и антиоксидативних маркера супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT) и редукованог глутатиона (GSH) желели смо да сазнамо да ли самостална примена нандролон деканоата, самостално тренинг пливањем као и њихова удружена примена изазива штетне ефекте на системски и ткивни редокс статус.

### **5.6.1 Ефекат примене нандролон деканоат и тренинга пливањем на системски редокс статус**

Праћењем промене вредности индекса липидне пероксидације уочавамо да су сви експериментални протоколи довели до промена вредности овог маркера. У перипуберталној популацији животиња сви експериментални протоколи довели су до повећања TBARS-а у поређењу са контролним вредностима. У адултној популацији испитиваних животиња, самостално примењен нандролон смањив је вредности док су самосталан тренинг као и његова удружена примена са нандролоном повећала вредности овог параметра. Праћењем вредности TBARS-а између испитиваних старосних доби пацова, уочавамо да са старењем, вредности индекса липидне пероксидације у адултној популацији виши је у односу на перипуберталну популацију. Једино је самостално примењен нандролон значајно смањив вредност индекса липидне пероксидације у

адултној популацији. Изгледа, да самостално примењен нандролон деканоат као и његова комбинација са тренингом изазива мање промене TBARS-а у перипуберталној популацији, за разлику од адултне где је значајно уочено повећање индекса липидне пероксидације. Овакав резултат је у сагласности са резултатом других аутора (239). *Nikolic* и сардници испитивали су ефекте хроничне примене нандролона и тренинга на оксидациони стрес и њихови резултат је показао примена нандролона индукује повећање индекса липидне пероксидације (239). *Tahernejad* је у својој студији пратио ефекте осмо недељне примене ниске и високе дозе станозолола и тренинга издржљивости на вредности MDA и показао је примена станозолола доводи до пораста вредности што је у сагласности са нашим резултатом (240). *Peu* је пратио ефекте промене вредности TBARS-а у ткиву јетре након хроничне примене станозолола и тренинга на трендмилу и добио је резултате идентичне као и ми у нашој студији. Међутим, он је такође показао да овај протокол не доводи до промена нивоа TBARS-а у узорку серума, у скелетном и срчаном мишићу (171).

Други параметар који смо пратили јесу нитрити ( $\text{NO}_2^-$ ). Ниједан примењен експериментални протокол у нашој студији није значајно утицао на промену вредности нитрита и сваки је довео до минималних снижења вредности у обе испитиване популације пацова. Посматрајући вредности нитрита са старењем, уочавамо да једино тренинг пливањем значајно повећава вредности нитрита док самостално примењен нандролон и његова удружена примена са тренингом смањује вредности овог параметра. Резултат који смо добили у нашој студији у сагласности је са резултатом друге студије (239).

Још један прооксидативни маркер који смо пратили у нашој студији јесте и супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^-$ ). У перипуберталној популацији животиња самостална као и удружена примена нандролон деканоата и тренинга пливањем довео је до значајног пораста вредности док је самосталан тренинг пливањем смањио вредности  $\text{O}_2^-$  у односу на контролне вредности. Супротно овоме, сви експериментални протоколи, у адултној популацији испитиваних животиња, значајно су смањили вредности овог прооксиданса у односу на контролу. Праћењем промена овог параметра у оквиру испитиваних старосних доби пацова, уочавамо да се са старењем значајно повећавају вредности супероксид анјон радикала. Овакав резултат је у складу са подацима из литературе (239).

У нашој студији, између осталог, пратили смо промене вредности и водоник пероксида. Сви експериментални протоколи, у перипуберталној популацији животиња, довели су до смањења вредности док су, у адултној популацији испитиваних животињиња, довели до пораста вредности водоник пероксида. Са старењем, уочавамо да су у контролној групи и у групи која је примала нандролон деканоат вредности овог прооксиданса значајно ниже. Можемо видети да тренинг пливањем не доводи до промена вредности водоник пероксида између испитиваних старосних доби. Удružена примена нандролонa и пливања минимално је подигла вредности водоник пероксида у адултној популацији испитиваних животиња. Супротно нашем резултату, студија *Nikolic* и сарадника показала је да третман нандролоном и тренингом од 2, 3 и 4 недеље не доводи до промена вредности водоник пероксида (238), што се разликује од нашег резултата где у перипуберталној популацији постоји пад а у адултној популацији пораст овог маркера.

Један од ензима система антиоксидативне заштите који смо испитивали у нашој студији је каталаза. Наши резултати јасно показују да сви експериментални протоколи, у обе испитиване старосне популације, снижили вредности овог антиоксидаса и да је тај тренд снижења готово исти у обе испитиване старосне популације. Из резултата добијених у нашој студији, можемо видети да се са старењем значајно повећавају вредности каталазе. Овакав резултат је у супротности са резултатом друге студије (239,171). Четворо недељна примена нандролон деканоата и тренинга пливањем, повећала је вредности каталазе, што није случај у нашој студији где је примећено смањење каталазе у свим експерименталним групама у обе испитиване старосне популације животиња (239). Самостална и удružена примена станозолола и тренинга повећава вредности каталазе, док самосталан тренинг смањује нивое овог антиоксидативног ензима (171).

У перипуберталној популацији животиња, вредности супероксид дисмутазе повећане су у свим експерименталним групама. У адултној популацији животиња, самостално примењен нандролон деканоат значајно је повећао вредности SOD док је самосталан тренинг пливањем као и његова комбинација са нандролоном, смањила вредности овог антиоксиданса. Праћењем вредности између испитиваних старосних доби пацова, уочавамо да самосталан тренинг пливањем и његова удružена примена смањују вредности док самостално примењен нандролон повећава вредности супероксид

дисмутазе. Овакав резултат је делимично у сагласности са резултатима друге студије (90). *Peu* је такође добио резултат који у сагласности са нашим. Третман станозололом самостално или у комбинацији са тренингом, повећао је вредности SOD-а док је тренинг смањио активност овог ензима (171).

Наши резултати су показали да вредности редукованог глутатиона у перипуберталној популацији остају не промењене након самостално примењеног третмана нандролоном, самосталног тренинга као и њихове комбиноване примене. У адутној популацији, једино је самосталан тренинг пливањем повећао вредности овог параметра. Праћењем вредности глутатиона између испитиваних старосних доби пацова, уочавамо да тренинг пливањем самостално или удружен са применом нандролоне доводи до пораста вредности у адутној популацији. Студија *Nikolic* и колега добила је резултат који се делимично разликује од нашег, где је удружена примена нандролоне и тренинга довела до пораста глутатиона док је самосталан тренинг смањио вредности (239). Резултати које је *Peu* добио у његовој студији разликују се од нашег резултата. Наиме, у његовој студији највећи пораст глутатиона уследио је након комбиноване употребе станозолола и тренинга, док је у нашој студији самосталан тренинг највише утицао на пораст вредности овог антиоксиданса (171).

### **5.6.2 Ефекат примене нандролон деканоат и тренинга пливањем на редокст статус у ткиву тестиса**

Смањење нивоа антиоксидативних ензима у ткиву доводи по настанка про-оксидационог стања. Про-оксидационо стање настаје као последица повећања нивоа реактивних кисеоничних врста у самој ћелији. Реактивне кисеоничне врсте доводе до оштећења свих ћелијских структура, укључујући и мембране липида, тако да индекс липидне пероксидације представља и један од маркера оксидационог стреса (241, 242). У литератури постоји јако мало података о ефектима самосталне примене нандролон деканоата, самосталног тренинга пливањем као и њихове удружене примене на вредности индекса липидне пероксидације у ткиву тестиса.

Наши резултати су показали да је самостално примењен нандролон деканоат у перипуберталној популацији пацова довео до пораста вредности TBARS-а док је у

адултној популацији довео до смањења вредности овог маркера. Такође, наши резултати су показали да су вредности TBARS-а са старењем, значајно се смањују. Наши резултати нису у потпуности у сагласности са резултатима других аутора. *Tahtamouni* и сарадници у свом истраживању у којем су пацовима старости између 3 и 4 месеца, апликовали нандролон деканоат у дози од 3 mg/kg и 10 mg/kg једном недељно у трајању од 14 недеља, показали су да је дошло до пораста вредности TBARS-а и након примене ниске дозе али и високе дозе нандролона (173). *Chainy* је у свом истраживању показао да и ниска доза од 0.1 mg/kg и висока доза од 10 mg/kg телесне масе тестостерон пропионата доводи до повећања индекса липидне пероксидације у ткиву тетиса (241). *Ahmed* је у свом истраживању у ком су животиње добијале нандролон деканоат у дози од 10 mg/kg у трајању од 8 недеља показао да су ткивне вредности MDA повишене за готово 80% (196). Разлог оваквих резултата може бити различит експериментални протокол, узимајући у обзир и старосну доб пацова као и временски период апликовања нандролона. *Mohamed* је такође, показао да и ниска и висока доза нандролонона повећавају вредности MDA, који могу настати као последица повећање производње слободних радикала (243).

Тренинг пливањем довео је до пораста вредности индекса липидне пероксидације. Повећање индекса липидних пероксида било је израженије у адултној популацији него у перипуберталној. Овакав резултат је у сагласности са резултатом других аутора. *Manna* и сарадници испитивали су ефекте четворонедељног тренинга пливањем на вредности индекса липидних пероксида мерених као малондиалдехид (MDA). У њиховој студији, тренажни протокол се састојао од свакодневног пливања у трајању од 3h дневно, 5 дана у недељи. Животиње су свакодневно пливале под оптерећењем од 3% телесне масе. Њихови резултати су показали да је тренинг пливањем довео до повећања вредности MDA (194). Повећање вредности индекса липидних пероксида, у ткиву тестиса, може бити резултат инхибиције стероидних ензима који је настао као последица интензивног тренинга (244). Наш резултат је показао, да без обзира на дужину трајања пливања (1h наспрам 3h), доводи до готово истих промена на ткиву тестиса.

Удружена примена нандролон деканоата и тренинга пливањем довела је до значајног пораста вредности индекса липидне пероксидације и у перипуберталној и у адултној популацији испитиваних животиња. Праћењем вредности овог маркера између

испитиваних старосних популација животиња, можемо видети да једино самостална примена нандролон доводи до смањења TBARS-а у адултној популацији док су вредности овог маркера повећање у осталим група у адултној популацији.

Вредности нитрита у ткиву тестиса нису значајно промењене ни у перипуберталној ни у адултној популацији испитиваних животиња. Самостално примењен нандролон деканоат није довео до значајне промене вредности нитрита, у ткиву тестиса, ни у перипуберталној ни у адултној популацији испитиваних животиња. Овакав резултат није у складу са резултатима других аутора.

*Ahmed* је испитивао ефекте самосталне примене нандролон деканота и таурина као и њихове удружене ефекте на морфолошке промене и оксидациони статус тестиса. Самостално примењен нандролон довео је до пораста вредности азотних оксида (NO) који су мерени као укупни нитрати/нитрити за 42% што је супротно од нашег резултата где смо ми добили смањење вредности за 3% у перипуберталној популацији док у адултној популацији није било разлике. Повећање NO у тестису, може да се објасни повећањем азот оксид синтазе која је индукована применом нандролон. Азот оксид инхибира стероидогенезу као и секрецију тестостерона (196).

Ткивне вредности супероксид дисмутазе промењене су у обе испитиване старосне популације. У перипуберталној популацији испитиваних животиња, сви експериментални протоколи довели су до смањења вредности овог ензима у односу на контролне вредности. Међутим, у адултној популацији животиња, самостално примењен нандролон деканоат као и његова удружена примена са тренингом пливањем смањила је вредности овог ензима а самосталан тренинг пливањем значајно је повећао вредности у односу на остале експерименталне групе. Интересантно је то да уколико посматрамо вредности SOD између старосних група, можемо видети да је само тренинг пливањем у адултној популацији повећао вредности док су у осталим групама вредности овог ензима ниже у адултној популацији у односу на перипуберталну популацију испитиваних животиња.

Самостално примењен нандролон деканоат довео је до смањења вредности SOD –а и у перипуберталној и у адултној ( по 25% у обе старосне групе) популацији испитиваних животиња. Овакав резултат је у складу са резултатима других аутора (196, 243). *Ahmed* и



сарадници су показали да примена нандролон деканоата у дози од 10мг/кг у трајању од 8 недеља доводи до смањења ткивних вредности SOD –а за 46% у односу на контролне вредности. Инхибиција ткивне SOD активности може да резултира акумулацијом супероксид анјон радикала а касније и липидне пероксидације (196, 245). Mohamed је такође показао да и ниска и висока доза доводе до значајно смањења супероксид дисмутазе (23% наспрам 45%) (243).

Тренинг пливањем повећао је вредности супероксид дисмутазе у адултној популацији (50%) док је у перипуберталној довео до смањења вредности за 33%. *Manna* је у својој студији показа да је тренинг пливањем у адултној популацији довео до смањења вредности SOD –а што је у супротности са нашим резултатом (194). Овакав резултат може бити због различитог експерименталног протокола.

Самостално примењен нандролон деканоат довео је до повећања вредности каталазе у обе испитиване популације, с тим што је у адултној популацији повећање израженије у односу на перипуберталну. *Chainy* и сарадници у својој студији добили су резултат који је у супротности од нашег резултата. Они су у својој студији испитивали ефекте 15-о дневне примене ниске (0.1 mg/kg) и високе дозе (10 mg/kg) тестостерон пропионана на антиоксидативни систем тестиса показали да и ниска и висока доза доводе до смањења нивоа каталазе у тестису (241).

У нашој студији, тренинг пливањем довео је до повећања ткивних вредности каталазе у обе испитиване популације животиња. Супротно оваквом резултату, тренинг пливањем од 3h довео је до смањења вредности САТ у ткиву тестиса (194).

Сви примењени експериментални протоколи довели су до повећања ткивних вредности редукованог глутатиона у перипуберталној популацији животиња. У адултној популацији, самостално примењен нандролон повећао је вредности док је тренинг самостално или удружен са нандролоном смањивао вредности овог антиоксиданса. Са старењем, сам нандролон није довео до промене вредности. Међутим, сам тренинг као и његова комбинација са нандролоном смањила је вредности глутатиона у ткиву тестиса у адултној популацији у односу на перипуберталну популацију животиња.

Самостално примењен нандролон деканоат довео је до повећања вредности GSH у обе испитиване старосне популације. Овакав резултат је у сагласности са нашим резултатом. *Tahtamouni* је показао да је примена нандролона и у високој (10 mg/kg) и у ниској (3mg/kg) дози довела до повећања вредности GSH и да је повећање GSH израђеније након примене ниске дозе нандролона (3mg/kg) (173). ААС настоје да повећањем анаболичког ефеката превазиђу катаболичке путеве и на тај начин повећа анаболичке путеве тако да се могућност настанка оксидативног стреса може повећати (173). *Ahmed* је показао да нандролон у дози од 10 мг/кг у трајању од 8 недеља доводи до смањења ткивних вредности GSH за 48% (196) што је супротно од резултата који смо ми добили у нашој студији. Глутатион је ендогени антиоксиданс који има улогу да уклони слободне радикале а самим тим и да регулише редокс статус ћелија (196). Смањење вредности GSH може да се сматра маркером оксидационог стреса (196, 246). Смањење вредности GSH могу довести и до смањења сперматогенезе зато што Сертолијеве ћелије метаболишу GSH до аминокиселина које се користе у процесу сперматогенезе (196, 247).

Тренинг пливањем довео је до повећања вредности GSH у перипуберталној популацији испитиваних животиња док су вредности GSH снижене у адулној популацији. Овакав резултат је у сагласности са резултатом који је добио *Mann-a* у својој студији (194). GSH има улогу ћелијској антиоксидативној заштити, а најважнија улога му је да уклони водоник пероксид и органске пероксиде. Смањење вредности GSH нам указује на повећану производњу слободних радикала (241), што се поклапа са нашим резултатом.

На основу свега изнетог, можемо закључити да су подаци везани за оксидациони статус контрадикторни. Једни аутори наводе да исти третмани доводе до промена оксидационог статуса, други да нема никаквих промена. Постоје чак и подаци који показују да исти експериментални протокол изазива различите ефекте на ткивне и системске вредности маркера редокс статуса. Изгледа да промене редокс статуса зависе индивидуално од животиње до животиње јер чак и исти експериментални протокол изазива различите промене редокс статуса.

На основу нашег резултата можемо да закључимо да нандролон самостално или у удруженој примени са тренингом пливањем има благ про-оксидациони ефекат, док хроничан тренинг пливањем има позитивне ефекте на антиоксидациони систем заштите.

Наш резултат је показао да промене редокс статус свако утиче на репродуктивну функцију што је у сагласности са литературним податком где се сугерише, да оксидациони стрес има једну од најважнијих улога у настанку репродуктивне дисфункције (194).

**6.**

**Закључци**

1. Хронична примена нандролон деканота и тренинга пливањем, самостално или њихова комбинована примена, смањује имунохистоморфометријске параметре LH и FSH ћелија, повећава серумске нивое FSH у перипуберталној популацији, али снижава секрецију LH у овом експерименталном моделу.
2. На ткиво тестиса нандролон самостално делује тако што успорава сперматогенезу, изазива атрофичне промене у семеном епителу уз апоптозу семиниферних ћелија. Комбинација са тренингом само појачава тај ефекат. Смањење масе тестиса, као и смањење дијаметра и површине семних каналића уз повећање интерстицијумског простора тестиса потврђује настанак атрофије тестиса услед примене овог стероида.
3. Супрафизиолошка доза нандролон деканоата примењена самостално изазива благу хипертрофију скелетних мишића. Једино у комбинацији са тренингом, нандролон изазива значајан степен хипертрофије. Што је још важније, злоупотреба ААС, чак и у високим дозама, не даје значајну разлику у пречнику мишићних ћелија у односу на тренинг. С друге стране, повећана акумулација колагена и смањење капиларне мреже као резултат хроничне злоупотребе нандролон у дужем временском периоду, може довести до структурних промена ткива скелетних мишића, до смањења физичких перформанси и укупне снаге.
4. Смањење волумена масних ћелија као и нивоа лептина настаје након самосталне и примене нандролон деканота али највеће смањење примећено је након удружене примене са тренингом што показује њихово синергистичко дејство на липолизу у масном ткиву.
5. Системски редокс статус у нашој студији, показао је да тренинг има антиоксидативни ефекат, док нандролон самостално или у удруженој примени имају благ про-оксидативни ефекат. Повећање редокс статуса у ткиву тестиса, може бити један од разлога за настанак поремећаја репродуктивне функције тестиса.

**7.**

# **Литература**

## Литература

1. Lukas SE. Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. *Trends Pharmacol Sci.* 1993 Feb;14(2):61-8.
2. Kavitha Ganesan; Mark V. Pellegrini. *Anabolic Steroids .StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018*
3. Evans NA. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am J Sports Med.* 2004 Mar;32(2):534-42.
4. Kremenik M, Onodera S, Nagao M, Yuzuki O, Yonetani S. A historical timeline of doping in the Olympics ( Part 1 1896-1968). *Kawasaki Journal of Medical Welfare* 2006 12 (1): 19-28.
5. Haupt HA, Rovere GD. Anabolic steroids: a review of the literature *Am J Sports Med.* 1984 Nov-Dec;12(6):469-84.
6. Kanayama G, Hudson JI, Pope HG Jr. Illicit anabolic-androgenic steroid use. *Horm Behav.* 2010 Jun;58(1):111-21
7. Andrews MA, Magee CD, Combest TM, Allard RJ, Douglas KM. Physical Effects of Anabolic-androgenic Steroids in Healthy Exercising Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *Curr Sports Med Rep.* 2018 Jul;17(7):232-241
8. Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids *Clin Ther.* 2001 Sep;23(9):1355-90.
9. Barone R, Pitruzzella A, Marino Gammazza A, Rappa F, Salerno M, Barone F, Sangiorgi C, D'Amico D, Locorotondo N, Di Gaudio F, Cipolloni L, Di Felice V, Schiavone S, Rapisarda V, Sani G, Tambo A, Cappello F, Turillazzi E, Pomara C. Nandrolone decanoate interferes with testosterone biosynthesis altering blood–testis barrier components. *J Cell Mol Med.* 2017 Aug; 21(8): 1636–1647.
10. Busardò FP, Frati P, Sanzo MD1, Napoletano S, Pinchi E, Zaami S, Fineschi V. The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2015 Jan;13(1):122-31
11. Evans NA. Gym & tonic: a profile of 100 male steroid users. *Br J Sports Med.* 1997;31:54-58.
12. Turillazzi E1, Perilli G, Di Paolo M, Neri M, Riezzo I, Fineschi V. Side effects of AAS abuse: an overview. *Mini Rev Med Chem.* 2011 May;11(5):374-89

13. Andjelković Z, Somer LJ, Perović M, Avramović V, Milenkova Lj, Kostovska N, Petrović A. *Histološka građa organa*. Prvo izdanje (2001)
14. Kinji Inoue and Kazumasa Kurosumi. Ultrastructural immunocytochemical localization of LH and FSH in the pituitary of the untreated male rat *Cell Tissue Res*. 1984;235(1):77-83.
15. Schally AV, Kastin AJ, Arimura A. Hypothalamic follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)-regulating hormone: structure, physiology, and clinical studies. *Fertil Steril*. 1971 Nov;22(11):703-21.
16. Bernard DJ, Fortin J, Wang Y, Lamba P. Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertil Steril*. 2010 May 15;93(8):2465-85
17. Ferris HA, Shupnik MA. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. *Biol Reprod* 2006;74:993–8.
18. Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Griffin ML, Kelch RP. GnRH pulses—the regulators of human reproduction. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1993;104:31–46
19. Ulloa-Aguirre A, Lira-Albarrán S. Clinical Applications of Gonadotropins in the Male *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;143:121-174
20. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu RevBiochem*. 1981;50:465–495.
21. Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damian-Matsumura P, Timossi C. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *ArchMed Res*. 2001;32:520–532.
22. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, Nayudu P. Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *BiolReprod*. 2003;69:379–389.
23. Bousfield GR, Dias JA. Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates. *Rev EndocrMetabDisord*. 2011;12:289–302.
24. Ulloa-Aguirre A, Midgley Jr AR, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *EndocrRev*. 1995;16:765–787.
25. Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *ReprodBiomed Online*. 2000;1:48–62.



26. Bernard DJ, Fortin J, Wang Y, Lamba P. Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertil Steril*. 2010;93:2465–2485.
27. Tarulli GA, Stanton PG, Meachem SJ. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol Reprod*. 2012;87:13.
28. Walker WH, Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. 2005;130:15–28.
29. Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 2003;125:769–784.
30. Tapanainen JS, Aittomaki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet*. 1997;15: 205–206.
31. Shiraishi K, Ascoli M. Lutropin/choriogonadotropin stimulate the proliferation of primary cultures of rat Leydig cells through a pathway that involves activation of the extracellularly regulated kinase 1/2 cascade. *Endocrinology*. 2007;148:3214–3225.
32. Tai P, Shiraishi K, Ascoli M. Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor inhibits apoptosis of immature Leydig cells in primary culture. *Endocrinology*. 2009;150:3766–3773.
33. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*. 2011;32:81–151.
34. Gregory SJ, Kaiser UB. Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Semin Reprod Med*. 2004;22:253–267.
35. Knobil E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res*. 1980;36:53–88.
36. Wildt L, Hausler A, Marshall G, et al. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 1981;109:376–385.
37. Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res*. 1991;47:155–187.

38. Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *HumReprodUpdate*. 2014;20:485–500.
39. Ciccone NA, Kaiser UB. The biology of gonadotroph regulation. *CurrOpinEndocrinol Diabetes Obes*. 2009;16:321–327.
40. Armstrong SP1, Caunt CJ, Fowkes RC, Tsaneva-Atanasova K, McArdle CA. Pulsatile and sustained gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor signaling: does the Ca<sup>2+</sup>/NFAT signaling pathway decode GnRH pulse frequency? *J Biol Chem*. 2009 Dec 18;284(51):35746-57
41. Padmanabhan V, McFadden K, Mauger DT, Karsch FJ, Midgley Jr AR. Neuroendocrine control of follicle-stimulating hormone (FSH) secretion. I. Direct evidence for separate episodic and basal components of FSH secretion. *Endocrinology*. 1997;138:424–432.
42. Veldhuis JD, Carlson ML, Johnson ML. The pituitary gland secretes in bursts: appraising the nature of glandular secretory impulses by simultaneous multiple-parameter deconvolution of plasma hormone concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:7686–7690.
43. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Johnson ML, Lizarralde G. Twenty-four-hour rhythms in plasma concentrations of adenohipophyseal hormones are generated by distinct amplitude and/or frequency modulation of underlying pituitary secretory bursts. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71:1616–1623.
44. Wu FC, Butler GE, Kelnar CJ, Huhtaniemi I, Veldhuis JD. Ontogeny of pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from midchildhood, through puberty, to adulthood in the human male: a study using deconvolution analysis and an ultrasensitive immunofluorometric assay. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81: 1798–1805.
45. Dunkel L, Alfthan H, Stenman UH, Tapanainen P, Perheentupa J. Pulsatile secretion of LH and FSH in prepubertal and early pubertal boys revealed by ultrasensitive timeresolved immunofluorometric assays. *PediatrRes*. 1990;27:215–219.
46. Dunkel L, Alfthan H, Stenman UH, Perheentupa J. Gonadal control of pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in prepubertal boys evaluated by ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assays. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70:107–114.

47. Urban RJ, Kaiser DL, van Cauter E, Johnson ML, Veldhuis JD. Comparative assessments of objective peak-detection algorithms. II. Studies in men. *Am J Physiol.* 1988;254:E113–E119.
48. Veldhuis JD, Evans WS, Urban RJ, Rogol AD, Johnson ML. Physiologic attributes of the luteinizing hormone pulse signal in the human. Cross-validation studies in men. *JAndrol.* 1988;9:69–77.
49. Hayes FJ, Pitteloud N, DeCruz S, Crowley Jr WF, Boepple PA. Importance of inhibin B in the regulation of FSH secretion in the human male. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5541–5546
50. Schnorr JA, Bray MJ, Veldhuis JD. Aromatization mediates testosterone's short-term feedback restraint of 24-hour endogenously driven and acute exogenous gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in young men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2600–2606.
51. Zorec R. Calcium signaling and secretion in pituitary cells. *Trends Endocrinol Metab.* 1996 Dec;7(10):384-8
52. Stojilkovic SS1. Pituitary cell type-specific electrical activity, calcium signaling and secretion. *Biol Res.* 2006;39(3):403-23
53. MARTIN TF. Tuning exocytosis for speed: Fast and slow modes. *Biochim Biophys Acta* 2003.1641: 157-165
54. Ozawa S, Sand O: 1986. Electrophysiology of excitable endocrine cells. *Physiol Rev* 66:887-951.
55. Zorec R, Sikdar SK, Mason wr: 1991. Increased cytosolic calcium stimulates exocytosis in bovine lactotrophs: direct evidence from changes in membrane capacitance. *J Gen Physiol* 97:473--497.
56. Katz B: 1966. *Nerve, Muscle and Synapse.* New York, McGraw-Hill, p 115.
57. Heinemann C, Chow RH, Neher E, Zucker RS: 1994. Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged  $Ca_{2+}$ . *Biophys J* 67:2546--2557.
58. Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G: 1994. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371:513-515.

59. Oduwole OO, Peltoketo H, Huhtaniemi IT. Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Dec 14;9:763
60. Radtke T, Nolan SJ, Hebestreit H, Kriemler S: Physical exercise training for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 6:CD002768.
61. Trappe S, Godard M, Gallagher P, Carroll C, Rowden, Porter D: Resistance training improves single muscle fiber contractile function in older women. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281:C398–C406.
62. Kraemer RR, Castracane VD: Endocrine alterations from concentric vs. eccentric muscle actions: a brief review. *Metabolism* 2015; 64: 190–201
63. Janssen JA. Impact of Physical Exercise on Endocrine Aging. *Front Horm Res*. 2016;47:68-81. doi: 10.1159/000445158.
64. Sato K, Iemitsu M. Exercise and sex steroid hormones in skeletal muscle. (2015) *J Steroid Biochem Mol Biol*. 145:200-5.
65. Stokes KA, Gilbert KL, Hall GM, Andrews RC, Thompson D. (2013) Different responses of selected hormones to three types of exercise in young men. *Eur J Appl Physiol*. 113(3):775-83
66. West DW, Phillips SM. Anabolic processes in human skeletal muscle: restoring the identities of growth hormone and testosterone. *Phys Sportsmed*. 2010 Oct;38(3):97-104
67. Sansone A, Sansone M, Vaamonde D, Sgrò P, Salzano C, Romanelli F, Lenzi A, Di Luigi L. Sport, doping and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Nov 12;16(1):114
68. Sgrò P., Romanelli F., Felici F., Sansone M., Bianchini S., Buzzachera C. F., Baldari C., Guidetti L., Pigozzi F., Lenzi A., Di Luigi L. Testosterone responses to standardized short-term sub-maximal and maximal endurance exercises: issues on the dynamic adaptive role of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2014;37(1):13–24. doi: 10.1007/s40618-013-0006-0.
69. Viru M, Hackney AC, Karelson K, Janson T, Kuus M, Viru A. Competition effects on physiological responses to exercise: performance, cardiorespiratory and hormonal factors. *Acta Physiol Hung*. 2010;97(1):22–30. doi: 10.1556/APhysiol.97.2010.1.3
70. Di Luigi L, Guidetti L, Baldari C, Romanelli F. Heredity and pituitary response to exercise-related stress in trained men. *Int J Sports Med*. 2003;24(8):551–558. doi: 10.1055/s-2003-43266.

71. Minetto MA, Paccotti P, Borrione P, Massazza G, Ventura M, Termine A, Di Luigi L, Pigozzi F, Angeli A. Effects of the training status on the hormonal response and recovery from high-intensity isokinetic exercise: comparisons between endurance-trained athletes and sedentary subjects. *J Sports Med Phys Fitness*. 2006;46(3):494–500.
72. Hackney AC, Lane AR. Exercise and the regulation of endocrine hormones. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;135:293–311. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.07.001
73. Hackney A. C. Effects of endurance exercise on the reproductive system of men: The “exercise-hypogonadal male condition” *Journal of Endocrinological Investigation*. 2008;31(10):932–938. doi: 10.1007/BF03346444. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
74. Hackney AC, Moore AW, Brownlee KK. Testosterone and endurance exercise: development of the “exercise-hypogonadal male condition” *Acta Physiol Hung*. 2005;92(2):121–137. doi: 10.1556/APhysiol.92.2005.2.3. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
75. Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: a randomized controlled study. *J Endocrinol*. 2009;200(3):259–271. doi: 10.1677/JOE-08-0477.
76. Shokri S, Aitken RJ, Abdolvahhabi M, Abolhasani F, Ghasemi FM, Kashani I, Ejtemaimehr S, Ahmadian S, Minaei B, Naraghi MA, Barbarestani M. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010 Apr;106(4):324-30
77. Hassan AF, Kamal MM. Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2013 Jan;7(1):47-60.
78. Fry AC, Lohnes CA. Acute testosterone and cortisol responses to high power resistance exercise. *Fiziol chelovka*. 2010;36(4):102–106
79. Bijlsma JW, Duursma SA, Thijssen JH, Huber O. Influence of nandrolondecanoate on the pituitary-gonadal axis in males. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1982 Sep;101(1):108-12.

80. Shahraki MR1, Mirshekari H2, Shahraki AR3. Chronic Administration of High Doses of Nandrolone Decanoate on the Pituitary-Gonadal Axis in Male Rats. *Int J High Risk Behav Addict*. 2015 Sep 15;4(3):e24419
81. Nagata S, Kurosawa M, Mima K, Nambo Y, Fujii Y, Watanabe G, Taya K. (1999) Effects of anabolic steroid (19-nortestosterone) on the secretion of testicular hormones in the stallion. *J Reprod Fertil*. 115(2):373-9.
82. Takahashi M, Tatsugi Y, Kohno T. (2004) Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rat. *Endocr J*. 51(4):425-34
83. Selakovic D, Joksimovic J, Zaletel I, Puskas N, Matovic M, Rosic G. The opposite effects of nandrolone decanoate and exercise on anxiety levels in rats may involve alterations in hippocampal parvalbumin-positive interneurons. *PLoS One*. 2017 Dec 12;12(12):e0189595
84. Wilson JD. Androgens. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, eds. *Goodman and Gilman's Experimental Basis of Therapeutics*. New York, NY: McGraw-Hill; 1996:1441-1457.
85. Bhasin S, Storer TW, Berman N, et al. The effects of supraphysiological doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Eng J Med*. 1996;335:1-6.
86. Bardin CW. The anabolic action of testosterone. *N Eng J Med*. 1996;335:52.
87. Bagatell CJ, Bremner WJ. Androgens in men—uses and abuses. *N Eng J Med*. 1996;334:707-714.
88. Snyder PJ, Peachey H, Hannoush P, et al. Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2647-2653.
89. Fernanda Ferrari F, Marcela de Paiva Foletto M, Solange Marta Franzói de Moraes, Sidney Barnabé Peres, Tânia Mara Segatelli, Cecília Edna Mareze da Costa Testis morphophysiology of rats treated with nandrolone decanoate and submitted to physical training *Acta Scientiarum. Health Sciences* 2013: v. 35, (2): 161-167
90. RUSSELL, L. D.; SINHÁ-HIKIM, A. P.; ETTLIN, R. A.; CLEGG, E. D. Evaluation of the testis: histological and histopathological. Clearwater: Cache River Press, 1990.
91. ROOIJ, D. G. Stem cells in the testis. *Internacional Journal of Experimental Pathology*, v. 79, n. 2, p. 67-80, 1998.

92. Ross M et al. *Histology – A text and atlas*. Fourth Edition
93. Dohle GR, Smit M, Weber RF. Androgens and male fertility. *World J Urol*. 2003 Nov;21(5):341-5
94. Naraghi MA, Abolhasani F, Kashani I, Anarkooli IJ, Hemadi M, Azami A, Barbarestani M, Aitken RJ, Shokri S.
95. Zeinab H, Zohreh S, Samadaee Gelehkolaee K. Lifestyle and outcomes of assisted reproductive techniques: a narrative review. *Glob J Health Sci*. 2015;7(5):11–22. doi: 10.5539/gjhs.v7n5p11
96. Vaamonde D., Algar-Santacruz C., Abbasi A., García-Manso J. M. Sperm DNA fragmentation as a result of ultra-endurance exercise training in male athletes. *Andrologia*. 2017;50(1):e12793. doi: 10.1111/and.1279
97. Jozkow P, Medras M, Lwow F, Zagrodna A, Slowinska-Lisowska M. Associations between physical activity and semen quality in young healthy men. *Fertil Steril*. 2017;107(2):373–378
98. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol*. 2012;2(2):1143–1211.
99. Sgrò P., Di Luigi L. Sport and male sexuality. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2017;40(9):911–923. doi: 10.1007/s40618-017-0652-8
100. Agostini LC, Netto JM, Miranda MV, Jr, Figueiredo AA. Erectile dysfunction association with physical activity level and physical fitness in men aged 40-75 years. *Int J Impot Res*. 2011;23(3):115–121. doi: 10.1038/ijir.2011.15.
101. Maiorino MI, Bellastella G, Esposito K. Lifestyle modifications and erectile dysfunction: what can be expected? *Asian J Androl*. 2015;17(1):5–10.
102. Richter B, Niessner A, Penka M, Grdic M, Steiner S, Strasser B, Ziegler S, Zorn G, Maurer G, Simeon-Rudolf V, et al. Endurance training reduces circulating asymmetric dimethylarginine and myeloperoxidase levels in persons at risk of coronary events. *Thromb Haemost*. 2005;94(6):1306–1311.
103. Ribeiro F, Alves AJ, Duarte JA, Oliveira J. Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation? *Int J Cardiol*. 2010;141(3):214–221. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.09.548

104. Sjöqvist F1, Garle M, Rane A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society *Lancet*. 2008 May 31;371(9627):1872-82
105. Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids *Clin Ther*. 2001 Sep;23(9):1355-90.
106. Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology*. 1994 Sep;135(3):1227-34.
107. Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H. Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec*. 1996 Jul;245(3):509-18.
108. Bahrke MS, Yesalis CE. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Dec;4(6):614-20.
109. Bhasin S, Storer TW, Berman N, et al. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med*. 1996;335(1):1-7.
110. Sheffield-Moore M. Androgens and the control of skeletal muscle protein synthesis. *Ann Med*. 2000;32(3):181-186.
111. Chen Y, Zajac JD, MacLean HE. Androgen regulation of satellite cell function. *J Endocrinol*. 2005;186(1):21-31.
112. West DW, Phillips SM. Anabolic processes in human skeletal muscle: restoring the identities of growth hormone and testosterone. *Phys Sportsmed*. 2010 Oct;38(3):97-104.
113. Goody MF, Sher RB, Henry CA. Hanging on for the ride: adhesion to the extracellular matrix mediates cellular responses in skeletal muscle morphogenesis and disease. *Dev Biol*. 2015;401:75-91
114. Hjorth M1, Norheim F2, Meen AJ2, Pourteymour S2, Lee S2, Holen T2, Jensen J3, Birkeland KI4, Martinov VN2, Langleite TM5, Eckardt K2, Drevon CA2, Kolset SO2. The effect of acute and long-term physical activity on extracellular matrix and serglycin in human skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2015 Aug;3(8). pii: e12473
115. Martinez-Huenchullan, S., McLennan, S.V., Verhoeven, A., Twigg, S.M., Tam, C.S., 2017. The emerging role of skeletal muscle extracellular matrix remodelling in obesity and exercise. *Obes. Rev*. 18, 776-790.



116. Prior BM, Yang HT, Terjung RL. "What makes vessels grow with exercise training?". *Journal of Applied Physiology*. 2004. 97 (3): 1119–28).
117. Amaral SL, Papanek PE, and Greene AS. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Sep;281(3):H1163-9.
118. Roca J, Hogan MC, Story D, Bebout DE, Haab P, Gonzalez R, Ueno O, Wagner PD. Evidence for tissue diffusion limitation of  $\dot{V}O_2$  max in normal humans. *J Appl Physiol* 67: 291–299, 1989.
119. Clifford PS, Hellsten Y. Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 97: 393–403, 2004.
120. Maxwell AJ, Schauble E, Bernstein D, Cooke JP. Limb blood flow during exercise is dependent on nitric oxide. *Circulation* 98: 369–374, 1998
121. Knapp AE<sup>1</sup>, Goldberg DI, Delavari H<sup>1</sup>, Trisko BM<sup>1</sup>, Tang K<sup>1</sup>, Hogan MC<sup>1</sup>, Wagner PD<sup>1</sup>, Breen EC<sup>2</sup>. Skeletal myofiber VEGF regulates contraction-induced perfusion and exercise capacity but not muscle capillarization in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016 1;311(1):R192-9
122. Hudlicka, O., Brown, M., Egginton, S., 1992. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol. Rev.* 72, 369–417.
123. Degens, H., 1998. Age-related changes in the microcirculation of skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 454, 343–348.
124. Davidson, Y.S., Clague, J.E., Horan, M.A., Pendleton, N., 1999. The effect of aging on skeletal muscle capillarization in a murine model. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 54, B448–B451.
125. Haidet, G.C., Parsons, D., 1991. Reduced exercise capacity in senescent beagles: an evaluation of the periphery. *Am. J. Physiol.* 260, H173–H182.
126. Boreham, C.A., Watt, P.W., Williams, P.E., Merry, B.J., Goldspink, G., Goldspink, D.F., 1988. Effects of ageing and chronic dietary restriction on the morphology of fast and slow muscles of the rat. *J. Anat.* 157, 111–125.
127. Brown, M., 1987. Change in fibre size, not number, in ageing skeletal muscle. *Age Ageing* 16, 244–248.

128. Brown, M., Ross, T.P., Holloszy, J.O., 1992. Effects of ageing and exercise on soleus and extensor digitorum longus muscles of female rats. *Mech. Ageing Dev.* 63, 69–77.
129. Hepple, R.T., Vogell, J.E., 2004. Anatomic capillarization is maintained in relative excess of fiber oxidative capacity in some skeletal muscles of late middle-aged rats. *J. Appl. Physiol.* 96, 2257–2264.
130. Kano, Y., Shimegi, S., Furukawa, H., Matsudo, H., Mizuta, T., 2002. Effects of aging on capillary number and luminal size in rat soleus and plantaris muscles. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 57, B422–B427.
131. Mitchell, M.L., Byrnes, W.C., Mazzeo, R.S., 1991. A comparison of skeletal muscle morphology with training between young and old Fischer 344 rats. *Mech. Ageing Dev.* 58, 21–35.
132. Wagatsuma A. Effect of aging on expression of angiogenesis-related factors in mouse skeletal muscle. *Exp Gerontol.* 2006 41(1):49-54
133. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Jun;280(6):C1358-66
134. Asano T , Kaneko E , Shinokazi S , Imai Y , Shibayama M , Chiba T , Ai M , Kawakami A , Asaoka H , Nakayama T , Mano Y , Shimokado K . Hyperbaric oxygen induces basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor expression, and enhances blood perfusion and muscle regeneration in mouse ischemic hind limbs . *Circ J* 2007 ; 71 : 405 – 411
135. Sretenovic J1, Ajdzanovic V2, Zivkovic V1, Srejovic I1, Corbic M3, Milosevic V4, Jakovljevic V5, Milosavljevic Z6. Nandrolone decanoate and physical activity affect quadriceps in peripubertal rats *Acta Histochem.* 2018. 120(5):429-437
136. Brown MD , Hudlicka O . Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: Involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* 2003 ; 6 : 1 – 14
137. Paschoal M, de Cássia Marqueti R, Perez S, Selistre-de-Araujo HS. Nandrolone inhibits VEGF mRNA in rat muscle. *Int J Sports Med.* 2009 Nov;30(11):775-8
138. Hassan AF1, Kamal MM. Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. *Int J Health Sci (Qassim).* 2013 Jan;7(1):47-60.

139. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425–32.
140. Dalamaga M, Chou SH, Shields K, et al. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: Current evidence and therapeutic perspectives. *Cell metabolism*. 2013;18(1):29–42.
141. Moon HS, Dalamaga M, Kim SY, et al. Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals. *Endocrine reviews*. 2013;34(3):377–412.
142. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*. 2015 Jan;64(1):24-34
143. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, et al. Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2002;26(11):1407–33.
144. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England journal of medicine*. 1996;334(5):292–5.
145. Chan JL, Heist K, DePaoli AM, et al. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(9):1409–21.
146. Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, et al. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nature medicine*. 1997;3(5):575–9.
147. Rosenbaum M, Leibel RL. Clinical review 107: Role of gonadal steroids in the sexual dimorphisms in body composition and circulating concentrations of leptin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(6):1784–9
148. Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiology & behavior*. 2004;81(2):223–41
149. Lee Y, Yu X, Gonzales F, et al. Ppar alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(18):11848–53
150. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating amp-activated protein kinase. *Nature*. 2002;415(6869):339–43

151. Lee Y, Yu X, Gonzales F, et al. Ppar alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(18):11848–53
152. Cases JA, Gabriely I, Ma XH, et al. Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo. *Diabetes*. 2001;50(2):348–52
153. Wang MY, Chen L, Clark GO, et al. Leptin therapy in insulin-deficient type i diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(11):4813–9
154. Lee Y, Ravazzola M, Park BH, et al. Metabolic mechanisms of failure of intraportally transplanted pancreatic beta-cells in rats: Role of lipotoxicity and prevention by leptin. *Diabetes*. 2007;56(9):2295–301
155. Lee YH, Magkos F, Mantzoros CS, et al. Effects of leptin and adiponectin on pancreatic beta-cell function. *Metabolism: clinical and experimental*. 2011;60(12):1664–72
156. Sahiner UM1, Birben E1, Erzurum S2, Sackesen C3, Kalayci Ö1. Oxidative stress in asthma: Part of the puzzle. *Pediatr Allergy Immunol*. 2018 Dec;29(8):789-800
157. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1-40.
158. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*. 1999;424(1-2):83-95.
159. Wang M, Dhingra K, Hittelman WN, Liehr JG, de Andrade M, Li D. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996;5(9):705-710.
160. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 722–728.
161. Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C849–C868 10.1152/ajpcell.00283.2008
162. Frankenfeld SP, Oliveira LP, Ortenzi VH, Rego-Monteiro IC, Chaves EA, Ferreira AC, Leitão AC, Carvalho DP, Fortunato RS The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male Wistar rats. *PLoS One*. 2014 Sep 16;9(9):e102699

163. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
164. Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 2015 Jul-Aug;31(7-8):916-22
165. Vassalle C, Pingitore A, De Giuseppe R, Vigna L, Bamonti F. Biomarkers to estimate bioefficacy of dietary/supplemental antioxidants in sports. In press in *antioxidants in Sport Nutrition*". Ed CRC Press/Taylor & Francis Group, 2014;16:255-72
166. Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gend Med* 2008;5:218-28.
167. Falone S, Mirabilio A, Pennelli A, Cacchio M, Di Baldassarre A, Gallina S, Passerini A, Amicarelli F. Differential impact of acute bout of exercise on redox- and oxidative damage-related profiles between untrained subjects and amateur runners. *Physiol Res* 2010;59:953-61.
168. Vassalle C, Lubrano V, L'Abbate A, Clerico A. Determination of nitrite plus nitrate and malondialdehyde in human plasma: analytical performance and the effect of smoking and exercise. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:802-9.
169. Ortenblad N, Madsen K, Djurhuus MS. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am J Physiol* 1997;272:1258-63.
170. Dékány M, Nemeskéri V, Györe I, Harbula I, Malomsoki J, Pucsok J. Antioxidant status of interval-trained athletes in various sports. *Int J Sports Med* 2006;27:112-6.
171. Pey A, Saborido A, Blázquez I, Delgado J, Megías A. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003 87(4-5):269-77
172. Pergolizzi B, Carriero V, Abbadessa G, Penna C, Berchiolla P, De Francia S, Bracco E, Racca S. Subchronic nandrolone administration reduces cardiac oxidative markers during restraint stress by modulating protein expression patterns. *Mol Cell Biochem*. 2017 Oct;434(1-2):51-60

173. Tahtamouni, L.H., Mustafa, N.H., Hassan, I.M., Ahmad, I.M., Yasina, S.R., Abdallaa, M.Y., Nandrolone decanoate administration to male rats induces oxidative stress, seminiferous tubules abnormalities, and sperm DNA fragmentation. *Jord. J. Biol. Sci.* 2010 3, 165–174.
174. Ristić N, Ajdžanović V, Petrović-Kosanović D, Miler M, Ušćebrka G, Milošević V. IMMUNOHISTOMORPHOMETRIC CHANGES OF THE PITUITARY GONADOTROPIC CELLS AFTER TESTOSTERONE APPLICATION IN A RAT MODEL OF THE ANDROPAUSE *Mac Vet Rev* 2019; 42 (1): 5-13
175. Medigović I, Manojlović-Stojanoski M, Trifunović S, Ristić N, Milošević V, Zikić D, Nestorović N. Effects of genistein on gonadotropic cells in immature female rats. *Acta Histochem.* 2012 May;114(3):270-5.
176. Ajdžanović, V., Jarić, I., Miler, M., Filipović, B., Šošić-Jurjević, B., Ristić, N., Milenkovic, D., Milošević, V. Diosgenin-caused changes of the adrenal gland histological parameters in a rat model of the menopause. *Acta Histochem.* 2017 119, 48-56.
177. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358, 1979.
178. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and  $\square^{15}N$  nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138, 1982.
179. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA (ed): *Handbook of methods for oxygen radical research*, CRC Press, Inc, Boca Raton, pp. 123-132, 1999.
180. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38(1-2): 161-70, 1980.
181. Beutler E. Catalase. In: Beutler E. *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton 1982; p.105-6.
182. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175, 1972.
183. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. Glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882–888

184. Beutler, E. 1975. Reduced glutathione (GSH). In *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Edited by Beutler, E. Grune and Stratton, New York. pp. 112-114
185. Rocha, F.L., Carmo, E.C., Roque, F.R., Hashimoto, N.Y., Rossini, L.V., Frimm, C., Aneas, I., Neagro, C.E., Krieger, J.E., Oliveira, E.M., 2007. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circulation Physiol.* 2007; 293, H3575-H3583.
186. Yu-Yahiro, J.A., Michael, R.H., Nasrallah, D.V., Schofield, B. Morphologic and histologic abnormalities in female and male rats treated with anabolic steroids. *Am J Sports Med.* 1989; 17, 686-689.
187. Kochakian CD, Robertson E, Bartlett MN. Sites and nature of protein anabolism stimulated by testosterone propionate in the rats. *Am J Physiol* 1950 163: 332–346
188. Beutel, A., Bergamaschi, C.T., Campos, R.R.. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005. 93, 43-48.
189. Gerez JR, Frei F, Camargo IC. Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. *Contraception.* 2005 Jul;72(1):77-80.
190. Šošić-Jurjević B, Filipović B, Renko K, Miler M, Trifunović S, Ajdžanović V, Köhrle J, Milošević V. Testosterone and estradiol treatments differently affect pituitary-thyroid axis and liver deiodinase 1 activity in orchidectomized middle-aged rats. *Exp Gerontol.* 2015 Dec;72:85-98
191. Ajdžanović V, Jarić I, Živanović J, Filipović B, Ristić N, Miler M, Milošević V. Testosterone application decreases the capacity for ACTH and corticosterone secretion in a rat model of the andropause. *Acta Histochem.* 2015 Jul;117(6):528-35
192. Okada, Y., Fujii, Y., Moore, J.P., Jr., Winters, S.J. (2003). Androgen receptors in gonadotrophs in pituitary cultures from adult male monkeys and rats. *Endocrinology.* 144, 267-273.
193. Lindzey, J., Wetsel, W.C., Couse, J.F., Stoker, T., Cooper, R., Korach, K.S. (1998). Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wildtype and estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* 139, 4092-40101.

194. Manna I, Jana K, Samanta PK. Effect of intensive exercise-induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders in mature male Wistar strain rats: a correlative approach to oxidative stress. *Acta Physiol Scand*. 2003 May; 178(1):33-40
195. Noguchi K, Arita J, Nagamoto A, Hosaka M, Kimura F. A quantitative analysis of testosterone action on FSH secretion from individual pituitary cells using the cell immunoblot assay. *J Endocrinol*. 1996 Mar;148(3):427-33.
196. Ahmed MA. Amelioration of nandrolone decanoate-induced testicular and sperm toxicity in rats by taurine: effects on steroidogenesis, redox and inflammatory cascades, and intrinsic apoptotic pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Feb 1;282(3):285-96
197. Mesbah S.F, Shokri S, Karbalay-Doust S, Mirkhani H. The Effect of Nandrolone Decanoate on the Body, Testis and Epididymis Weight and Semen Parameters in Adult Male Rats. *Iran J Med Sci* 2007; 32(2): 93-99.
198. Manna I, Jana K, Samanta PK. Effect of different intensities of swimming exercise on testicular oxidative stress and reproductive dysfunction in mature male albino Wistar rats. *Indian J Exp Biol*. 2004 Aug;42(8):816-22
199. Rodrigues JM, Oliveira VP, P Furlan J, Munhoz AC, S Rempel MR, Brito MN, Brito NA, Pedrosa MM, M Costa CE. Immediate and residual effects of low-dose nandrolone decanoate and treadmill training on adipose and reproductive tissues of male Wistar rats *Arch Physiol Biochem*. 2017 May;123(2):68-77
200. Biswas, N.M., Sengupta, R., Chatopadhyay, G.R., Choudhury, A., Sarkar, M., Effect of ethanol on cadmium-induced testicular toxicity in male rats. *Reprod. Toxicol*. 2001 15, 699–704.
201. Holma, P.K.. Effects of an anabolic steroid (metandienone) on spermatogenesis. *Contraception* 1977 15, 151–162.
202. Kahal A, Allem R. Reversible effects of anabolic steroid abuse on cyto-architectures of the heart, kidneys and testis in adult male mice. *Biomed Pharmacother*. 2018 Oct;106:917-922.
203. Noorafshan, A., Karbalay-Doust, S., Ardekani, F.M., 2005. High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. *APMIS* 113, 122–125.



204. Gårevik N, Börjesson A, Choong E, Ekström L, Lehtihet M. Impact of single-dose nandrolone decanoate on gonadotropins, blood lipids and HMG CoA reductase in healthy men. *Andrologia*. 2016 Jun;48(5):595-600
205. Eliakim A, Nemet D. Exercise and the male reproductive system *Harefuah*. 2006 Sep;145(9):677-81, 702, 701
206. Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Barrera N, Vaamonde-Lemos R. Physically active men show better semen parameters and hormone values than sedentary men. *Eur J Appl Physiol*. 2012 Sep;112(9):3267-73
207. Schroeder, E.T., Terk, M., Sattler, F.R. Androgen therapy improves muscle mass and strength but not muscle quality: results from two studies *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003. 285, E16-E24.
208. Venken, K., Movérare-Skrtic, S., Kopchick, J.J., Coschigano, K.T., Ohlsson, C., Boonen, S., Bouillon, R., Vanderschueren, D. Impact of androgens, growth hormone, and IGF-I on bone and muscle in male mice during puberty. *J. Bone Miner. Res.* 2007. 22, 72-82.
209. Krause Neto W, Silva WA, Ciena AP, Nucci RAB, Anaruma CA, Gama EF. Effects of Strength Training and Anabolic Steroid in the Peripheral Nerve and Skeletal Muscle Morphology of Aged Rats. *Front Aging Neurosci.* 2017 Jun 30;9:205
210. Hepple RT, Ross KD, and Rempfer AB. Fiber atrophy and hypertrophy in skeletal muscles of late middle aged Fischer 344x Brown Norway F1-hybrid rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2004 59: 108–117
211. Miller, B.F., Olesen, J.L., Hansen, M., Døssing, S., Cramer, R.M., Welling, R.J., Langberg, H., Flyvbjerg, A., Kjaer, M., Babraj, J.A., Smith, K., Rennie, M.J. Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. *J. Physiol.* 2005. 567, 1021-33.
212. Purslow, P.P. Muscle fascia and force transmission. *J. Bodyw. Mov. Ther.* 2010. 14, 411-417.
213. Yucesoy, C.A., 2010. Epimuscular myofascial force transmission implies novel principles for muscular mechanics. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 38, 128-134.
214. Findley, T., Chaudhry, H., Dhar, S., 2015. Transmission of muscle force to fascia during exercise. *J. Bodyw. Mov. Ther.* 19, 119-123.

215. Cranwell, C.D., Unruh, J.A., Brethour, J.R., Simms, D.D., 1996. Influence of steroid implants and concentrate feeding on carcass and longissimus muscle sensory and collagen characteristics of cull beef cows. *J. Anim. Sci.* 74,1777-1783.
216. Hjorth M, Norheim F, Meen AJ, Pourteymour S, Lee S, Holen T, Jensen J, Birkeland KI, Martinov VN, Langleite TM, Eckardt K, Drevon CA, Kolset SO. 2015 The effect of acute and long-term physical activity on extracellular matrix and serglycin in human skeletal muscle. *Physiol Rep.* 3(8). pii: e12473
217. Carroll CC, Martineau K, Arthur KA, Huynh RT, Volper BD, Broderick TL., 2015. The effect of chronic treadmill exercise and acetaminophen on collagen and cross-linking in rat skeletal muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 308(4):R294-9
218. Vasilaki F, Tsitsimpikou C, Tsarouhas K, Germanakis I, Tzardi M, Kavvalakis M, Ozcagli E, Kouretas D, Tsatsakis AM., 2016. Cardiotoxicity in rabbits after long-term nandrolone decanoate administration. *Toxicol Lett.* 241:143-51
219. Tofighi A, Shirpoor M, Ansari MHK, Shirpoor A, Zerehpooosh M., 2017. The effect of nandrolone treatment with and without enforced swimming on histological and biochemical changes in the heart and coronary artery of male rats. *Anatol J Cardiol.* 3:176-183
220. Gavin, T.P., Ruster, R.S., Carrithers, J.A., Zwetsloot, K.A., Kraus, R.M., Evans, C.A., Knapp, D.J., Drew, J.L., Mc Cartney, J.S., Garry, J.P., Hickner, R.C., 2007. No difference in the skeletal muscle angiogenic response to aerobic exercise training between young and aged men. *J. Physiol.* 585, 231–239.
221. Hoffner, L., Nielsen, J.J., Langberg, H., Hellsten, Y., 2003. Exercise but not prostanoids enhance levels of vascular endothelial growth factor and other proliferative agents in human skeletal muscle interstitium. *J. Physiol.* 550, 217–225
222. Soares, J.M., 1992. Effects of training on muscle capillary pattern: intermittent vs continuous exercise. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 32, 123-127.
223. Neto, W.K., Gama, E.F., 2017. Strength training and anabolic steroid do not affect muscle capillarization of middle-aged rats. *Rev. Bras. Med. Esporte* 23, doi.org/10.1590/1517-869220172302157902.
224. Shikatani, E.A., Trifonova, A., Mandel, E.R., Liu, S.T., Roudier, E., Krylova, A., Szigiato, A., Beaudry, J., Riddell, M.C., Haas, T.L., 2012. Inhibition of proliferation,

- migration and proteolysis contribute to corticosterone-mediated inhibition of angiogenesis. *PLoS One* 7, e46625.
225. Oladipupo S1, Hu S, Kovalski J, Yao J, Santeford A, Sohn RE, Shohet R, Maslov K, Wang LV, Arbeit JM. VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 9;108(32):13264-9
226. Aicher A1, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005 Mar;45(3):321-5.
227. Urbich C1, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):343-53.
228. Wagatsuma A, Tamaki H, Ogita F. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in heart tissue following short-term swimming training. *International Journal of Sport and Health Science* 2005 (3):91-99
229. Husain K. Physical conditioning modulates rat cardiac vascular endothelial growth factor gene expression in nitric oxide-deficient hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 6;320(4):1169-74.
230. Richardson RS1, Wagner H, Mudaliar SR, Saucedo E, Henry R, Wagner PD. Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Aug;279(2):H772-8.
231. Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, and Terjung RL. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003. 284: H1668–H1678.
232. Cunningham SA, Tran TM, Arrate MP, Bjercke R, and Brock TA. KDR activation is crucial for VEGF165-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1999. 276: C176–C181.
233. Marcela de Paiva Foletto, Fernanda Ferrari, Sidney Barnabé Peres, Solange Marta Franzói de Moraes, Tânia Mara Segatelli and Cecília Edna Mareze-da-Cost Effects of anabolic steroid treatment associated with physical training in adipose tissue of male Wistar rats. *Acta Scientiarum Health Science* 2015 37(1):19
234. Pi-Sunyer FX, Woo R. (1985). Effect of exercise on food intake in human subjects. *Am J Clin Nutr*, 42:983–90

235. Nicklas BJ. (1997). Effects of endurance exercise on adipose tissue metabolism. *Exerc Sport Sci Rev*, 25:77–103.
236. Alsjö J1, Birgner C, Björkblom L, Isaksson P, Bergström L, Schiöth HB, Lindblom J. Impact of nandrolone decanoate on gene expression in endocrine systems related to the adverse effects of anabolic androgenic steroids *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009 Nov;105(5):307-14
237. Zhao J1, Tian Y, Xu J, Liu D, Wang X, Zhao B. Endurance exercise is a leptin signaling mimetic in hypothalamus of Wistar rats. *Lipids Health Dis*. 2011, 10:225
238. Yasari S1, Wang D, Prud'homme D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM. Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor-a, -b, and, -e in rats *Mol Cell Biochem*. 2009 Apr;324(1-2):13-20
239. Nikolic T, Zivkovic V, Jevdjevic M, Djuric M, Srejovic I, Djuric D, Jeremic N, Djuric D, Bolevich S, Jakovljevic V. The effects of chronic administration of nandrolone decanoate on redox status in exercised rats. *Mol Cell Biochem*. 2016 Jan;411(1-2):95-105
240. Tahernejad Z, Baghshani H, Rashidlamir A. Blood biochemical and oxidant/antioxidant alterations following stanozolol treatment along with resistance training in rats. *Andrologia*. 2017 49(2). doi: 10.1111/and.12613.
241. Chainy, G.B.N., Samantaray, S. & Samanta, L. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. *Andrology* 1997. 29, 343–349.
242. Kappus H (1985) Lipid peroxidation: mechanism, analysis, enzymology and biological relevance. In: *Oxidative stress*. Sies H (ed) Academic Press, London, pp 273-310.
243. Mohamed HM, Mohamed MA. Effect of different doses of nandrolone decanoate on lipid peroxidation, DNA fragmentation, sperm abnormality and histopathology of testes of male Wister rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2015 Jan;67(1):1-11
244. Debnath, D. & Mandal, T.K. . Study of quinalphos (an environmental oestrogenic insecticide) formulation (Ekalux 25 E. C.)-induced damage of the testicular tissues and antioxidant defense systems in Sprague–Dawley albino rats. *J Appl Toxicol* 2000 20, 197–204.
245. Mruk, D.D., Silvestrini, B., Mo, M.Y., Cheng, C.Y. Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* 2002 65, 305–311.

246. Bray, T.M., Taylor, C.G., 1993. Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71, 746–751.
247. Kaneko, T., Iuchi, Y., Kobayashi, T., Fujii, T., Saito, H., Kurachi, H., Fujii, J., 2002. The expression of glutathione reductase in the male reproductive system of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis. *Eur. J. Biochem.* 269, 1570–1578.

## Биографија

Др Јасмина Сретеновић је рођена 19. 10. 1985. године у Краљеву. Завршила основну и средњу медицинску школу у Краљеву. Уписала Медицински факултет 2004. године, завршила марта 2012. године, са просечном оценом 8,55. Након завршених основних студија уписала прву годину Докторских академских студија, изборно подручје – Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Током студија била је студент демонстратор 5. година на предмету Хистологија и ембриологија од школске 2005/2006 до 2009/2010 године. Учествовала је на студентским конгресима у земљи и иностранству. Међународну професионалну праксу у оквиру размене студената у трајању од месец дана обавила је на клиници за дерматовенерологију „А. Сигрос“ у Атени, септембра 2008.

Од септембра 2013. волонтерски је укључена у научно- истраживачки рад у оквиру лабораторије за Физиологију, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Од маја 2014. године ради као сарадник у настави за ужу научну област Физиологија на свим студијским програмима Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, док је у јуну 2016. године изабрана за асистента. У јуну 2017 године, пријавила је тему докторске дисертације под називом: „Имунохистохемијске карактеристике и редокс статус хипофизно-гонадалног системама након апликације анаболичког стероида перипуберталним и адултним мужјацима пацова“. Има објављених 7 радова, од којих су 4 рада објављена у међународним часописима са SCI листе, а 3 рада су објављена у часописима од националног значаја.

Положен стручни испит 25.03.2013.

## Библиографија

1. Ksenija Vucicevic, Vladimir Jakovljevic, **Jasmina Sretenovic**, Natasa Tosic, Tatjana Kostic, Irena Glumac, Milica Colovic, Natasa Colovic, Sonja Pavlovic, Teodora Karan-Djurasevic. Expression of the BCL2 gene in chronic lymphocytic leukemia patients, *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 2015;16(3):187-191.
2. Radojevic-Popovic R, Zivkovic V, Jeremic N, **Sretenovic J**, Velicanin N, Bradic J, Jakovljevic V. An evaluation of the redox state in professional scuba divers. *Undersea Hyperb Med*, 2015 Sep-Oct, 42(5):409-16
3. **Jasmina Sretenovic**, Vladimir Zivkovic, Ivan Srejevic, Zoran Milosavljevic. The effects of high doses of nandrolone decanoate on cardiac muscle tissue. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 2016; 17 (4): 303-308
4. Miroljub Trifunovic, Ljubica Zivic, Marija Draskovic, Milena Corbic, **Jasmina Sretenovic**. Is there a relationship between audiogram shape and the intensity and duration of tinnitus? *Ser J Exp Clin Res* 2018; 19 (3): 237-242
5. **Sretenovic J**, Ajdzanovic V, Zivkovic V, Srejevic I, Corbic M, Milosevic V, Jakovljevic V, Milosavljevic Z. Nandrolone decanoate and physical activity affect quadriceps in peripubertal rats. *Acta Histochemica* 2018 Jul;120(5):429-437
6. Bradic J, Jeremic N, Petkovic A, Jeremic J, Zivkovic V, Srejevic I, **Sretenovic J**, Matic S, Jakovljevic V, Tomovic M1. Cardioprotective effects of Galium verum L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem*. 2019 Jan 11:1-8.
7. Radonjic T, Rankovic M, Ravic M, Zivkovic V, Srejevic I, Jeremic J, Jeremic N, **Sretenovic J**, Matic S, Jakovljevic V, Nikolic Turnic T. The Effects of Thiamine Hydrochloride on Cardiac Function, Redox Status and Morphometric Alterations in Doxorubicin-Treated Rats. *Cardiovasc Toxicol*. 2019 Jul 3. doi: 10.1007/s12012-019-09536-7

# ПРИЛОГ

## 8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

ТД

Монографска публикација

Тип записа:

ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:

ВР

Докторска дисертација

Аутор:

АУ

Јасмина Сретеновић

Ментор/коментор:

МН

Проф. др Зоран Милосављевић

Наслов рада:

НР

Имунохистохемијске карактеристике и редокс статус хипофизно-гонадалног



система након апликације анболичког  
стероида перипуберталним и адултним  
мужјацама пацова

Језик публикације:

ЈП

Српски (ћирилица)

Језик извода:

ЈИ

Српски

Земља публикавања:

ЗП

Република Србија

Уже географско подручје:

УГП

Шумадија, Србија

Година:

ГО

2019

Издавач:

ИЗ

Ауторски репринт

Место и адреса:

МС

34000 Крагујевац, Светозара Марковића 69

Физичи опис рада:

ФО

217/11/42/25/247

Научна област:

Медицина

Научна дисциплина:

ДИ

Експериментална физиологија

Предметна одредница/ кључне речи

ПО

Анаболички андрогени стероиди, тренинг,  
хипофиза, скелетни мишић, тестис

УДК

**Чува се:  
ЧУ**

**У библиотеци Факултета медицинских наука,  
Универзитета у Крагујевцу, Република Србија**

**Важна напомена:  
МН**

**Извод:  
ИД**

Увод: Анаболички андрогени стероиди (ААС) представљају синтетске деривате мушког полног хормона тестостерона. Током последњих неколико деценија, злоупотреба ААС постала је широко распрострањена међу професионалним али и међу рекреативним спортистима. Последњих година, нандролон деканоат представља један од најчешће злоупотребљаваних ААС у спорту.

Циљ: Циљ овог истраживања био је да се испитају ефекти хроничне примене нандролон деканоата и тренинга пливањем на хистоморфометријске параметре гонадотропних ћелија хипофизе, хистолошке промене на тестисту, скелетном мишићу и масном ткиву, као и на редокс статус код перипуберталних и адултних мужјака пацова.

Материјал и методе: У студију су укључене 64 животиње мушког пола (по 32 животиње за сваку старосну групу) старости 5 недеља (перипубертални) и старости 10 недеља (адултни) сврстаних у 4 испитиване групе: контролна група - (Т-Н-), група која прима стероиде (Т-Н+), група која тренира пливање (Т+Н-) и група која тренира пливање и прима стероиде (Т+Н+). Животиње које су примале стероиде добијале су једном недељно нандролон деканоат у дози од 20 mg/kg телесне масе, субкутано. Животиње које су тренирале пливање, сваког дана су пливале 1 сат /5 дана у недељи. Након

завршеног четворонедељног експерименталног процеса, животиње су жртвоване. Изолована ткива хипофизе, тестиса, скелетног мишића и масног ткива рутински су обрађивана и припремљена према стандардним хистолошким протоколима. У прикупљеним узорцима крви, одређиване су вредности тестостерона, LH, FSH, лептина, инсулина као и про-оскидативни маркери и ензими система антиоксидативне заштите.

Резултати: Наши резултати су показали да третман нандролон деканоатом значајно смањује волуменску густину гонадотропних ћелија хипофизе у обе испитиване старосне популације. Број ћелија LH ћелија хипофизе на  $mm^2$  значајно је смањен након самосталне и удружене примене нандролона и тренинга пливањем у адултној популацији мужјака. Серумске вредности LH и FSH хормона снижене су након третмана нандролоном, док су истовремено вредности тестостерона у крви повишене. Експресија андрогеног рецептора у тестису смањена је након третмана нандролоном. У обе испитиване старосне популације примећено је највеће повећање дијаметра и површине скелетног мишића након удружене примене нандролон деканоата и тренинга пливањем. У T+N+ групи уочено је највеће смањење дијаметра и површине пресека адипоцита као и серумских вредности лептина. Повећање вредности прооксидативних маркера и у ткиву и у крви уочено је након примене нандролона.

Закључак: Нандролон деканоат самостално и у комбинацији са тренингом пливањем снижава хистоморфометријске параметре гонадотропних ћелија хипофизе, експресију андрогеног рецептора у тестису, серумске

вредности LH, FSH хормона и лептина, док истовремено повећава концентрацију тестостерона и дијаметар скелетних мишићних ћелија.

**Датум прихватања теме од стране ННВ:** 07.06.2017. година  
ДП

**Датум одбране:**  
ДО

**Чланови комисије:**  
КО

- 1. Проф. др Сузана Пантовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник**
- 2. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан**
- 3. НС Верица Милошевић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду за ужу научну област цитологија, члан**

## 8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

**Accession number:**

**ANO**

**Identification number:**

**INO**

**Documentation type:**

**DT**

**Monographic publication**

**Type of record:**

**TR**

**Textual material, printed**

**Contents code:**

**CC**

**PhD thesis**

**Author:**

**AU**

**Jasmina Sretenović**

**Menthor/co-mentor**

**MN**

**Prof. Zoran Milosavljević, MD, PhD**

**Title:**

**TI**

**Immunohistochemical characteristics  
and redox state of the pituitary-gonadal  
system after administration of anabolic  
steroid to peripubertal and adult rats**

**Language of text:**

**LT**

**Serbian (cyrilic)**

<b>Language of abstract:</b>	<b>Serbian/English</b>
<b>Country of publication:</b>	<b>Republic of Serbia</b>
<b>CP</b>	
<b>Locality of publication:</b>	<b>Šumadija municipality</b>
<b>LP</b>	
<b>Publication year:</b>	<b>2019</b>
<b>PY</b>	
<b>Publisher:</b>	<b>Author's reprint</b>
<b>PU</b>	
<b>Publication place:</b>	<b>34000 Kragujevac,</b>
	<b>Svetozara Markovića Street 69</b>
<b>PP</b>	
<b>Physical description</b>	<b>247/11/42/25/247</b>
<b>PD</b>	
<b>Scientific field:</b>	<b>Experimental physiology</b>
<b>SF</b>	
<b>Scientific discipline:</b>	<b>Medicine</b>
<b>SD</b>	
<b>Subject/key words:</b>	<b>Anabolic androgenic steroids, training,</b>
	<b>pituitary, skeletal muscle, testis</b>
<b>SKW</b>	
<b>UDC</b>	
<b>Holding data:</b>	<b>Library of Faculty of Medical sciences,</b>
	<b>University of Kragujevac, Republic of Serbia</b>
<b>Note:</b>	
<b>N</b>	

**Abstract:**  
**AB**

**Introduction:** Anabolic androgenic steroids (AAS) are synthetic derivatives of the male sex hormone testosterone. During the last few decades, the abuse of AAS has become widespread among professional as well as recreational sportsman. In recent years, nandrolone decanoate has been one of the most frequently abused AASs in sports.

**Aim:** The aim of this study was to investigate the effects of the chronic administration of nandrolone decanoate and swimming training on histomorphometric parameters of the pituitary gonadotrophic cells, histological changes in the testis, skeletal muscle and fat tissue as well as redox status in peripubertal and adult male rats.

**Material and methods:** The study included 64 male rats (32 animals per age group) 5 weeks old (peripubertal) and 10 weeks old (adults) divided into 4 experimental groups: control group - (T-N-), the group that received steroids (T-N+), swimming training group (T+N-) and swimming training with steroid administration group (T+N+). The steroid receiving animals, weekly received nandrolone decanoate in a dose of 20 mg/kg b.w, subcutaneously. Rats that trained by swimming, swam every day 1 hour, 5 days a week. After completing the four-week experimental protocol, rats were sacrificed. Isolated pituitary gland, testicles, skeletal muscle and fat tissue were routinely processed and prepared according to standard histological protocols. In the collected blood samples, the values of testosterone, LH, FSH, leptin, insulin, pro-oxidative markers and enzymes of the

antioxidant defense system were determined.

Results: Our results have shown that the treatment with nandrolone decanoate significantly reduces the volume density of pituitary gonadotropic cells in both populations. Number of LH pituitary cells per mm<sup>2</sup> was significantly decreased after nandrolone treatment alone or combined with swimming training in adult rats. Serum levels of LH and FSH hormone were decreased after treatment with nandrolone while levels of testosterone were increased. Expression of androgenic receptor in testes were decreased after treatment with nandrolone. In both population the largest increase of cross-section area and diameter of skeletal muscle cells was observed after combined administration of nandrolone and swimming training. The largest decrease of the diameter and cross-section areas of the adipocytes and serum level of leptin was observed in T+N+ group. The increased blood and tissue levels of pro-oxidative markers was observed after treatment with nandrolone.

Conclusion: Nandrolone decanoate alone or combined with swimming training decreases histomorphometric parameters of pituitary gonadotrophic cells, expression of androgenic receptors in testes, serum levels of LH, FSH hormones and leptin. Increase of the blood testosterone levels and size of skeletal muscle cells can also be observed.



**Defended on:**

**DE**

**1. Prof. Suzana Pantović, associate professor of Faculty of Medical Science, University of Kragujevac, Scientific domein: Physiology, president**

**2. Prof. Vladimir Jakovljević, full professor of Faculty of Medical Science, University of Kragujevac, scientific domain: Physiology, member**

**3. Verica Milošević, full research professor, Insitute for biological research „Siniša Stanković“, domain: Citology, member**

**Thesis defended board**

**(Degree/name/surname/title/faculty)**

**DB**

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Јасмина Сретеновић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

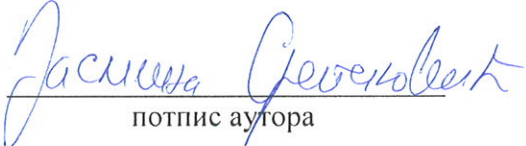
Имунохистохемијске карактеристике и редокс статус хипофизно-гонадалног система након апликације анаболичког стероида перипуберталним и адултним мужјацима пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, \_\_\_\_\_ године,

  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Јасмина Сретеновић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Имунохистохемијске карактеристике и редокс статус  
хипофизно-гонадалног система након апликације анаболичког стероида  
перипуберталним и адултним мужјацима пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

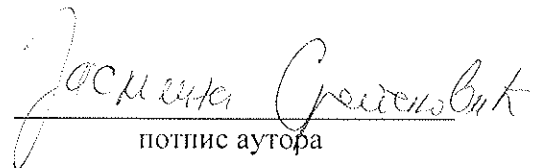
не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

  
потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



## Nandrolone decanoate and physical activity affect quadriceps in peripubertal rats



Jasmina Sretenovic<sup>a</sup>, Vladimir Ajdzanovic<sup>b</sup>, Vladimir Zivkovic<sup>a</sup>, Ivan Srejovic<sup>a</sup>, Milena Corbic<sup>c</sup>, Verica Milosevic<sup>b,\*</sup>, Vladimir Jakovljevic<sup>a,d</sup>, Zoran Milosavljevic<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> Department of Cytology, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>c</sup> Clinic of Neurology, KRH Klinikum Agnes Karll Laatzen, Hannover, Germany

<sup>d</sup> Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia

<sup>e</sup> Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Nandrolone  
Physical activity  
Quadriceps  
Rat  
Histomorphometry

### ABSTRACT

Anabolic androgenic steroids (AASs) are synthetic analogs of testosterone often used by athletes to increase the skeletal muscle mass. Our goal was to examine the effects of physical activity and physical activity combined with supraphysiological doses of nandrolone on functional morphology of the quadriceps muscle. The study included 32 peripubertal Wistar rats, divided into 4 groups: control (T-N-), nandrolone (T-N+), physical activity (T+N-) and physical activity plus nandrolone (T+N+) groups. The T+N- and T+N+ group swam for 4 weeks, 1 h/day, 5 days/week. The T-N+ and T+N+ groups received nandrolone decanoate (20 mg/kg b.w.) once per week, subcutaneously. Subsequently, the rats were sacrificed and muscle specimens were prepared for the processing. Tissue sections were histochemically and immunohistochemically stained, while the image analysis was used for quantification. Longitudinal diameter of quadriceps muscle cells was increased for 21% in T-N+, for 57% in T+N- and for 64% in T+N+ group while cross section muscle cell area was increased in T-N+ for 19%, in T+N- for 47% and in T+N+ group for 59%, compared to the control. Collagen fibers covered area was increased in T-N+ group for 36%, in T+N- for 109% and in T+N+ group for 159%, compared to the control. Erythrocyte depots were decreased in T-N+ group and increased in T+N- and T+N+ group, in comparison with T-N-. VEGF depots were increased in all treated groups. Chronic administration of supraphysiological doses of AASs alone or in combination with physical activity induces hypertrophy and significant changes in the quadriceps muscle tissue structure.

### 1. Introduction

The anabolic androgenic steroids (AASs) include testosterone and its numerous synthetic analogs and they are frequently misused by athletes with intention of enhancing their physical performance (Riezzo et al., 2011; Hassan and Kamal, 2013; Nikolic et al., 2015; Piacentino et al., 2015). Nandrolone decanoate (ND) is an anabolic steroid and like the other AASs, was developed in order to maximize anabolic effects (such as muscle growth, protein synthesis and erythropoiesis) and minimize the androgenic ones (Tylicki et al., 2007; Frankenfeld et al., 2014; Piacentino et al., 2015; Frati et al., 2015). These substances can be administered either orally, parenterally, transdermally (by topical gels or patches) or subcutaneously (by implantable pellets) (Evans, 2004; Frati et al., 2015). Most often, athletes use nandrolone in oral or injectable form (Kohler and Lambert, 2002).

Administered androgens that bind to the nuclear androgen receptors (AR), are translocated into the nucleus and regulate the transcription of the group of genes which ultimately leads to increased muscle protein synthesis and muscle growth (Fragkaki et al., 2009; Frati et al., 2015). Studies show that nuclear ARs can be up-regulated when exposed to AASs, while the number and density of ARs is increased by strength training (Evans, 2004). The androgens and training combined complement each other in the mechanisms of the ARs up-regulation, and the strength of these effects is largely determined by the exercise program, sex and age of the athlete as well as the type of AASs misuse (short- or long-term) (Vingren et al., 2010).

Despite the fact that the International Olympic Committee (IOC) prohibited the use of nandrolone in 1976 (Kohler and Lambert, 2002; Evans, 2004), AASs are being abused by competitive and recreational athletes. This is especially related to the bodybuilders and power lifters

\* Corresponding author at: Department of Cytology, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade, Despot Stefan Blvd. 142, 11060 Belgrade, Serbia.  
E-mail address: [dimi@ibiss.bg.ac.rs](mailto:dimi@ibiss.bg.ac.rs) (V. Milosevic).

who aim to improve physical appearance or enhance performance by increasing muscle mass and strength (Bhasin et al., 1996; Nieschlag and Vorona, 2015; Sretenovic et al., 2016). In praxis, the doses that they use are up to 10 and even 100 times higher than the therapeutic dose (TD) (Yesalis and Bahrke, 1995; Frankenfeld et al., 2014). Consequences of such AASs abuse are various and depend on dosage, type, frequency and model of use (Riezzo et al., 2011), but extremely high doses can cause acute or chronic adverse side effects in almost all major tissues and organs (Fragkaki et al., 2009; Karila et al., 2004).

It is reported that administration of AASs in puberty leads to early epiphyseal closure and deficit of growth, testicular atrophy, infertility, impotence, prostate hypertrophy, as well as prostate and liver tumors (Rodrigues et al., 2017). In adults, usage of supraphysiological doses of testosterone in combination with strength training leads to marked growth in triceps and quadriceps diameter (Bhasin et al., 1996), but long-term abuse of the AASs can lead to structural and functional alteration of the liver and sometimes even hepatocellular adenoma can occur (Ferrari et al., 2013). Hypertrophy of the left ventricle with disproportional accumulation of extracellular collagen and interstitial fibrosis (Takahashi et al., 2004; Tanno et al., 2011; Hassan and Kamal, 2013; Franquni et al., 2013; Sretenovic et al., 2016) is also detected, as well as higher risk of prostate cancer, impotence and morphological changes in testis (Ferrari et al., 2013). Specific mechanisms of all of these adverse effects are not yet clearly understood, but certain studies suggest that misuse of the AASs is followed by premature death rate (due to suicide, acute myocardial infarction or hepatic coma) in power lifters, that is almost 4 times higher than in normal population (Pärssinen and Seppälä, 2002).

Effects of high doses of AASs on the skeletal muscle hypertrophy, as mentioned above, have been known for a long time, but there are only a few reports in the available literature with comprehensive histomorphometric results concerning the side-effects of AASs and/or training on the skeletal muscle cells morphology, connective tissue composition and the changes of vascularization of the muscle. Most of the reports suggest that chronic use of AASs increases muscle diameter and muscle cell diameter (Venken et al., 2007), but the collagen dynamics in striated muscle is quite poorly described in the literature. In fact, couple of studies in which this matter was addressed had opposite results. Karpakka et al. (1992) reported that AASs significantly decreased the concentration of hydroxyproline e.g. collagen synthesis, while Pärssinen et al. (2000) reported the decrease of degradation with increase of production of collagen type I, in this context. On the other hand, investigators agree that training alone increases collagen type I production in skeletal muscle tissue (Hjorth et al., 2015; Carroll et al., 2015; Martinez-Huenchullan et al., 2017). When it comes to the changes of the vascularization in striated muscle after chronic AASs misuse, it should be noted that Paschoal et al. (2009) reported that AASs inhibit the vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression and impair the angiogenesis. VEGF is a potent mitogen of endothelial cells and it has been shown that endurance training induces capillary growth within angiogenic response to exercise (Prior et al., 2003; Waters et al., 2004). Also, Shikatani et al. (2012) suggested that corticosterone inhibits migration and proliferation of endothelial cells thus limiting the angiogenesis.

Although the amount of data regarding the effects of AASs on muscle tissue rapidly increases, there are still controversies and some unknown aspects in this field. Moreover, the synergistic impact of AASs and the physical load has been poorly investigated. Having in mind that the abuse of AASs has become more frequent among young sportsmen in recent decades, the aim of our study was to identify the effects of supraphysiological doses of nandrolone decanoate (DECA DURABOLIN<sup>®</sup>, Organon, Holland) alone, physical activity alone or their combination on the functional morphology of the quadriceps muscle in peripubertal rats.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental animals, study design and organ extraction

Study included 32 peripubertal (5 weeks old) male Wistar albino rats, weighing 150–200 g, that were bred at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. Rats were housed in collective cages (four rats *per* cage). The room temperature was kept at  $23 \pm 1$  °C with 12:12h light and dark cycles. Food and water are provided *ad libitum*.

The rats were randomly divided into four groups:

- 1 T-N-, sedentary rats with no administration of nandrolone decanoate and physical activity (control group),
- 2 T-N+, sedentary rats with s.c. administration of nandrolone decanoate depot (DECA DURABOLIN<sup>®</sup>, Organon, Holland; 20 mg/kg b.w.) during a period of 4 weeks (nandrolone group),
- 3 T+N-, physically active rats (swimming 1 h/day, 5 days *per* week, for 4 weeks) with no administration of nandrolone decanoate (the group that had physical activity),
- 4 T+N+, physically active rats (swimming 1 h/day, 5 days *per* week) with s.c. administration of nandrolone decanoate depot (DECA DURABOLIN<sup>®</sup>, Organon, Holland; 20 mg/kg b.w.) during a period of 4 weeks (the group that had physical activity and was treated with nandrolone).

The initial and final body weights (BW) were measured. During the experiment, the swimming was performed in a glass pool, measuring  $120 \times 50 \times 80$  cm (length/width/height), in which the depth of the water was 60 cm. The first week represented the period of adaptation to swimming in which the rats started with 10 min of continuous swimming. Afterwards, swimming time was increased for 10 min every day, until 60 min mark was reached at the end of the fifth day (Nakao et al., 2000). After a period of adaptation, the experimental period started, during which rats were swimming 1 h *per* day, 5 days *per* week, for four weeks. The swimming was performed every day at 9 a.m. Water temperature was 37 °C. Upon expiry of the experimental period, the rats were sacrificed. Precisely, in order to avoid the effect of acute swimming, the rats were sacrificed 48 h after the last swimming exercise. After short-term ketamine (Ketamin 10%, CP-PHARMA, Burgdorf, Germany; 100 mg/kg b.w.) and xilazid (Xyla, Interchemie, Holland; 10 mg/kg b.w.) anesthesia, the animals were premedicated with heparin as an anticoagulant and sacrificed by cervical dislocation (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986 UK). Their quadriceps muscles were surgically removed for the further examination. All research procedures were carried out in accordance with the European Council Directive (86/609/EEC) as well as the principles of Good Laboratory Practice (2004/9/EC, 2004/10/EC), and were approved by the Ethics Committee for the Welfare of Experimental Animals, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, Serbia (No. 01-14606, from 7. XII 2016).

### 2.2. Tissue processing, histochemistry, immunohistochemistry and image analysis

The samples of rat quadriceps muscles were fixed in 4% formalin for 24 h, dehydrated in a series of increasing concentrations of ethanol (50%–100%), enlightened in xylol and embedded in Histowax<sup>®</sup> (Histolab Product AB, Göteborg, Sweden). Molded blocks of skeletal muscle were cut on a rotational microtome (RM 2125RT Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and 5 µm thick sections were prepared for further quantitative and qualitative histomorphological analyses. The sections were stained with standard H&E (enabling visualization of the tissue structures and some rougher orientation), Masson-Trichrome dye that enables collagen detection, as well as with Novelli staining and VEGF immunostaining, appropriate for the vascularization

imprint display.

Masson trichrome staining is an adequate method when there is a need to label the collagen fibers in connective tissue. Although Picrosirius-red staining is more widely used, the final results of both methods are identical (Chen et al., 2011). Masson staining method results in dark brown to black stained nuclei, reddish muscle cell cytoplasm and blue stain of collagen. The procedure includes deparaffinization and rehydration (100%–70% ethanol, distilled water) of the tissue sections, followed by 5 min incubation in Weigert's hematoxylin. After washing in tap water, the sections were incubated in a mixture of 1% acid fuchsin and 1% ponceau dextrin (1:2) for 5 min. The next step included multiple washing of muscle sections in distilled water and their incubation in 0.05% phosphomolybdic acid for 10 min. Finally, the sections were incubated in 2.5% aniline blue (3 min), washed several times in distilled water, dehydrated and mounted in DPX (Ajdžanović et al., 2017).

Novelli histochemical staining is used for visualization of tissue vascular profile, and after the deparaffinization and rehydration of quadriceps sections involved their incubation in hot 1 N HCl (60 °C, 3 min), 1% acid fuchsin (30 s) and 1% light green (30 s), respectively. Sections were then washed in distilled water, and after the dehydration, mounting in DPX was carried out. As a result, purple erythrocytes were clearly visible against the bright green background of the quadriceps muscle fibers (Ajdžanovic et al., 2015, 2017).

VEGF in our study was localized by immunohistochemistry. For immunohistochemical staining, 5 µm thick sections of quadriceps were deparaffinized and dehydrated, followed by heat-induced antigen retrieval in a microwave on high power (750 W), for 8 min in 0.1 M citrate buffer, pH 6.0. After washing with PBS, sections were incubated with 0.3% hydrogen peroxide in methanol during 15 min at the room temperature, to block endogenous peroxidase activity. Quadriceps sections were then treated with diluted normal swine serum (1:50) (DAKO, Glostrup, Denmark) and incubated with rabbit polyclonal primary antibody raised against VEGF (1:100; abcam®, ab46154, Lot No. GR247559-1; Cambridge, MA, USA) overnight at room temperature. It should be noted that the primary antibodies used are appropriate for immunocytochemistry/immunofluorescence, immunohistochemistry (frozen and paraffin sections) and Western blot, as previously validated by abcam®, while the species reactivity includes mouse, rat and human. After rinsing in PBS, sections were incubated with polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/HRP – an affinity-isolated, peroxidase-conjugated secondary antibody (Code No. P0399, Lot No. 20011615; DAKO, Glostrup, Denmark) diluted in PBS (1:100) for 1 h at room temperature. Binding sites were visualized with 0.05% diaminobenzidine (DAB; Serva, Heidelberg, Germany), followed by counterstaining with hematoxylin and mounting in DPX (Sigma-Aldrich, Co., USA). Negative controls were obtained by replacing the primary antibody for PBS.

### 2.3. Morphometric analysis

Images of histochemically/immunohistochemically stained tissue sections were captured with digital camera attached to the Olympus BX51 microscope (Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg, Germany). Morphometric analysis was performed by calibrated Axiovision software (Zeiss, USA), as well as with Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA). Calibrated software then measured the areas of the images that correspond to each specific cytomorphological entity. Cross section area and longitudinal section diameter measurement of the quadriceps muscle cells were performed on H&E stained sections. Both measurements were performed on at least 100 muscle cells of each tissue specimen and average values were presented in micrometers or micrometers squared. Longitudinal section diameter of each muscle fiber was measured on three spots and average value was taken in account. For the analysis of collagen fibers covered area, after labeling of desired areas of the sections, segmentation of the images was

performed. Regions of interest were identified with the exclusion of the irrelevant areas. Identical procedure was conducted when erythrocyte depots and VEGF quantification were performed. During the collagen fibers covered area and VEGF quantification, blood vessel areas were excluded from the regions of interest. All measurements were defined compared to the control and were made in triplicate.

### 2.4. Statistical analysis

All data were tested and the normality of the data distribution was established using the Shapiro Wilk test. The non-parametric version of Anova test (Kruskal Wallis test) was used for statistical comparison of the data. Post-hoc test analysis was used by Mann–Whitney test for non-parametric variables. P values below 0.05 were considered statistically significant. All statistical calculations were made with the SPSS computer program, version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data are presented as means ± standard deviation (SD).

## 3. Results

### 3.1. Body weight (BW)

The initial average values of body weight of peripubertal rats were 183.57 ± 13.40 g in T-N- group, 173.90 ± 12.18 g in T-N+ group, 176.32 ± 15.92 g T+N- group and 172.82 ± 9.32 g in T+N+ group. Final average body weight of rats were 329.85 ± 16.23 g for T-N- group, 290.00 ± 8.74 g for T-N+ group, 284.01 ± 18.04 g for T+N- group and 299.37 ± 16.25 g for T+N+ group. After four weeks of experimental period, our results have shown statistically significant increase in body weight in all groups compared to the initial weight. Increases ( $p < 0.05$ ) in body weight were: in control group 76%, in T-N+ group 67%, in physically active group 61% and in T+N+ group 73%, all compared to the corresponding initial values. If we compare the final body weight after four weeks, the results show that all experimental animals were with significantly ( $p < 0.05$ ) lower body weight compared to the control. For T-N+ group this reduction measured 13%, in T+N- it was 15% and in T+N+ group the reduction amounted 10%.

### 3.2. Quadriceps histomorphometry

Striated cell morphometry was performed in order to estimate the effect of physical activity alone or in combination with nandrolone administration on quadriceps muscle cell size. The mean longitudinal section diameter after four weeks of experiment was: 14.08 ± 1.82 µm in T-N- group, 17.64 ± 1.84 µm in T-N+ group, 22.20 ± 1.77 µm in T+N- group and 23.98 ± 2.85 µm in T+N+ group. Fig. 1A illustrates the approach when measuring the longitudinal section diameter (LD). LD of peripubertal rats was increased ( $p < 0.05$ ) in all experimental groups compared to the control (Fig. 1B). Alone, nandrolone administration induced increase ( $p < 0.05$ ) for 21%, physical activity alone induced increase ( $p < 0.05$ ) for 57% and combination of nandrolone decanoate and physical activity induced increase ( $p < 0.05$ ) of quadriceps muscle cell diameter for 64%, in comparison with the control values. The largest difference of cell diameter can be observed between control and T+N- or T+N+ group (64% or 57% of increase;  $p < 0.05$ ), while the smallest difference was verified between T+N- and T+N+ group (only 4%;  $p > 0.05$ ) (Fig. 1B). The average values of cross section cell area (CSCA) were: 1177.36 ± 324.17 µm<sup>2</sup> in T-N- group, 1407.05 ± 460.42 µm<sup>2</sup> in T-N+ group, 1732.95 ± 587.06 µm<sup>2</sup> in T+N- group and 1880.07 ± 547.83 µm<sup>2</sup> in T+N+ group. After four weeks CSCA was significantly increased in all groups (Fig. 1C). Nandrolone alone induced 19% increase, physical activity alone caused 47% of increase and nandrolone in combination with physical activity induced 59% increase of CSCA, all compared to the control. Comparison between the experimental groups showed that

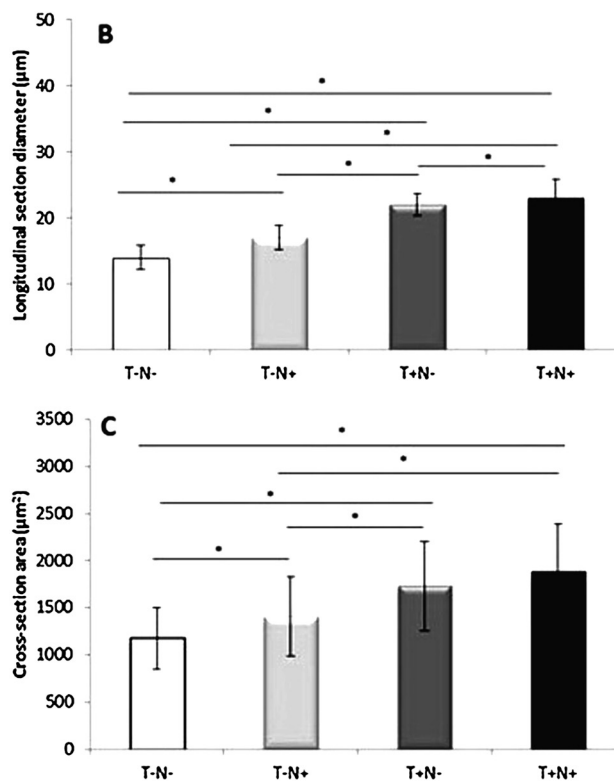
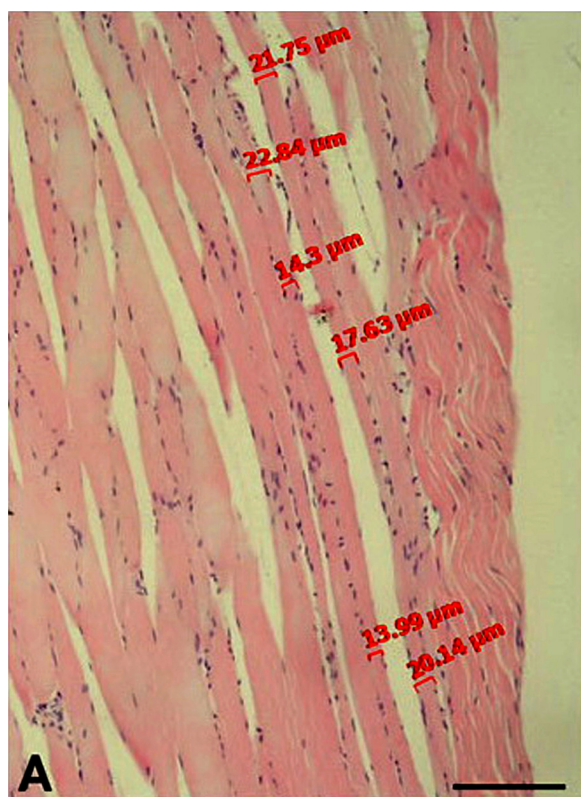


Fig. 1. A) Representative micrograph of H&E staining of the quadriceps muscle, which shows the approach when measuring the longitudinal section diameter; B) values of longitudinal section diameter and C) cross section area of quadriceps muscle cells in peripubertal rats after four weeks of experiment. All values are the means ± SD, n = 8 animals per group; \*p < 0.05 vs. the adequate group, connected by a horizontal line.

the largest difference of CSCA can be observed between T-N+ and T+N+ (33%; p < 0.05) and the lowest, non-significant difference was found between T+N- and T+N+ (8%) (Fig. 1C).

### 3.3. Collagen fibers covered area analysis

At the end of the experiment, collagen fibers covered area was increased in all experimental groups compared to the control (blue deposits between the reddish muscle fiber bundles at Masson trichrome stained sections (Fig. 2A–D) or white surfaces at segmented images; Fig. 2E–H)). Image analysis revealed significance of differences between the groups (Fig. 2I). In the control and T-N+ group, some delicate and thin collagen fibers were interspersed between the muscle cells. An 36% increase (p < 0.05) of collagen fibers covered area was verified in T-N+ group, compared to the control values (Fig. 2A–B, E–F, I). This endomysial collagen deposits were much thicker and more intense stained in the physically active animals. Quantification of the collagen covered area on the Masson trichrome stained tissue sections showed that the highest amount of collagen was present in T+N+ treated animals (159% increase (p < 0.05) compared to the controls), while physical activity alone induces 109% increase (p < 0.05) in comparison with the control group (Fig. 2A–D, E–H, I). Similar findings were observed when perimysial collagen was investigated. Comparison between experimental groups showed that the largest difference of collagen fibers covered area can be observed between T-N+ and T+N+ (90%; p < 0.05) (Fig. 2B–D, F–H, I) and the lowest difference was found between T+N- and T+N+ (24%; p < 0.05) (Fig. 2C–D, G–H, I). Comparison of collagen covered area between the experimental groups showed that physical activity alone when compared to nandrolone alone and their combination in comparison with nandrolone alone increased (p < 0.05) this parameter for 54% and 24%, respectively (Fig. 2B–C, F–G; C–D, G–H, I).

### 3.4. Erythrocyte depots

Erythrocyte depots in the quadriceps muscle tissue were identified and subjected to the quantification upon the Novelli histochemical staining (purple collections at the bright green background of the quadriceps muscle fibers; Fig. 3A–D). Results of quantification showed that T-N+ animals expressed the reduction of erythrocyte depots by 7% (p > 0.05) compared to the control group. Also, T+N+ rats showed diminished erythrocyte depots compared to T+N- group (17%; p > 0.05) (Fig. 3E). Animals exposed to physical activity and nandrolone showed increased erythrocyte depots by 112% (p < 0.05) compared to the controls. Largest difference (167%; p < 0.05) of erythrocyte depots can be observed in the muscle tissue between the rats from T+N- and T+N+ groups. Physical activity alone caused increase of these depots for 149% (p < 0.05) compared to the control value (Fig. 3E).

### 3.5. VEGF depots

Immunolocalization of VEGF depots within the quadriceps muscle tissue (brown fields at light blue background) of control and experimental groups of rats is shown in Fig. 4A–D. Very similar to the results trend related to erythrocyte depots, the VEGF expression in quadriceps tissue was the most prominent in T+N- animals (Fig. 4C, F). The administration of nandrolone when combined with physical activity decreased (p < 0.05) the VEGF amount for 16%, compared to physical activity alone (Fig. 4F). Although the trend of the results was quite similar to the erythrocyte depots appearance, the degree of differences between the experimental groups was much higher. Physical activity alone led to 339% VEGF expression increase (p < 0.05) compared to the control, while the combination of physical activity and nandrolone led to increase (p < 0.05) of 277% of the same parameter, in comparison with the controls (Fig. 4F). Also, physical activity alone



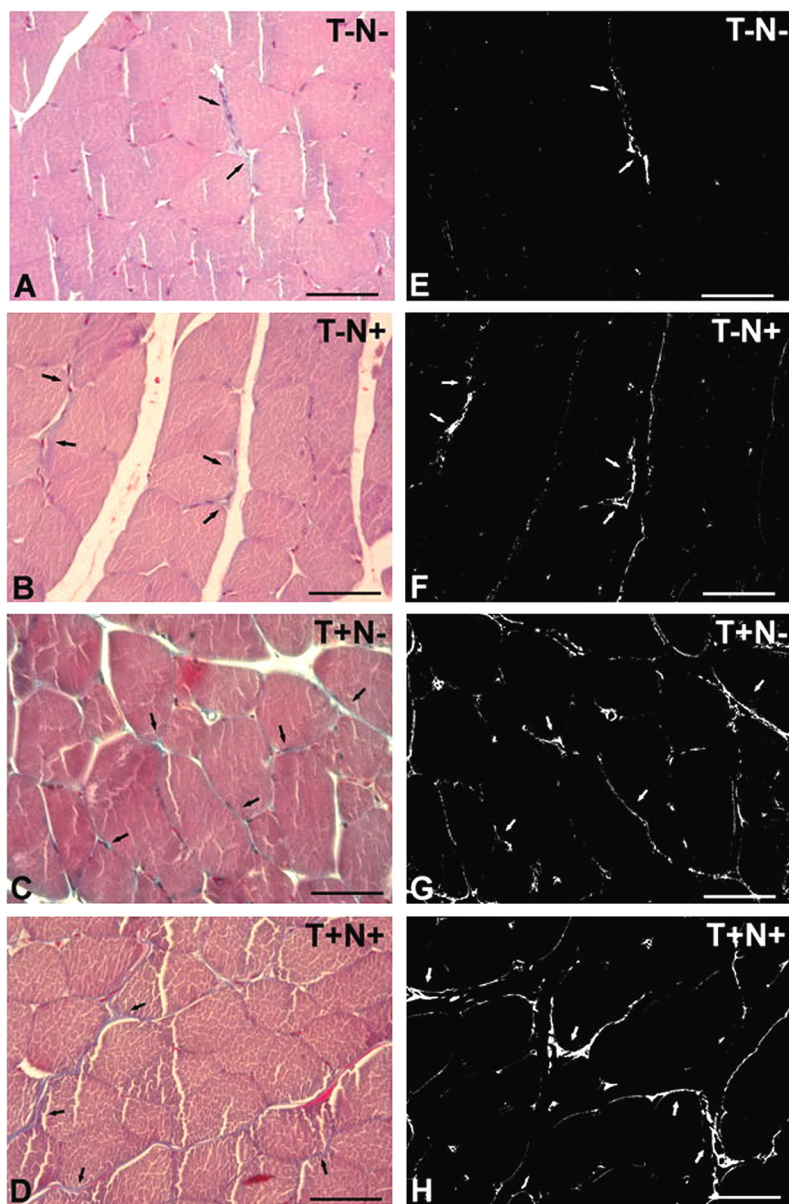
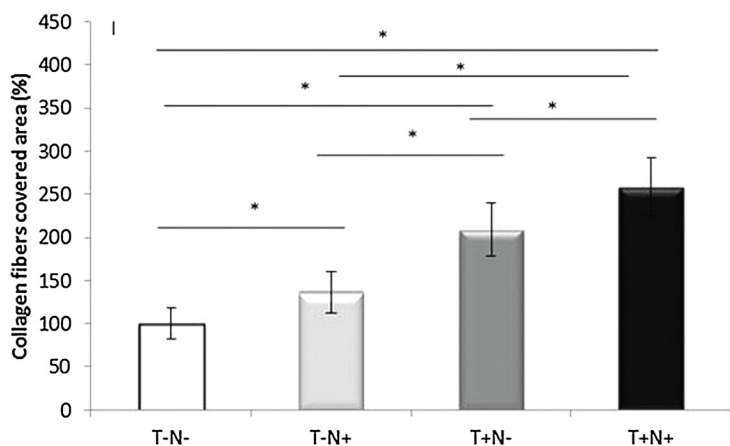


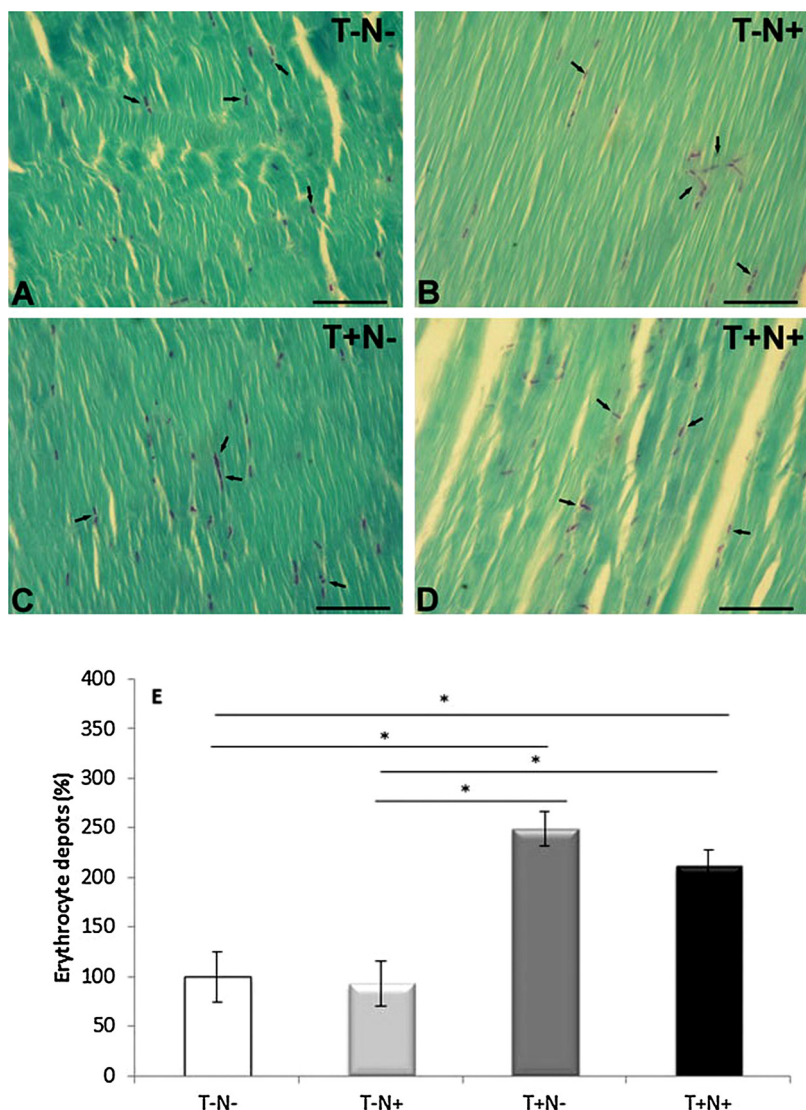
Fig. 2. Representative micrographs of Masson trichrome stained, rat quadriceps muscle sections A–D) and the corresponding segmented images E–H) (objective magnification 40 ×, bar = 25 μm; arrows are pointing out the collagen fibers). A, E) Control (T-N-) group, B, F) nandrolone (T-N+) group, C, G) physically active (T+N-) group and D, H) physically active, nandrolone-treated (T+N+) group. Graph (I) displays quantification of collagen fibers covered area (%) for the control and experimental groups. All values are the means ± SD, n = 8 animals per group; \*p < 0.05 vs. control (T-N-) group. (For interpretation of the references to colour in the text, the reader is referred to the web version of this article.)



increased ( $p < 0.05$ ) VEGF expression by 272% compared to nandrolone alone whereas their combination increased ( $p < 0.05$ ) the same parameter by 219% in comparison with nandrolone alone (Fig. 4F).

#### 4. Discussion

Anabolic androgenic steroids (AASs), for the past 40 years have been widely used among professional and amateur athletes with



**Fig. 3.** Representative micrographs of Novelli stained, rat quadriceps muscle sections (objective magnification 40×, bar = 25 μm; arrows are pointing out the erythrocyte depots). A) Control (T-N-) group, B) nandrolone (T-N+) group, C) physically active (T+N-) group and D) physically active, nandrolone-treated (T+N+) group. Graph (E) displays erythrocyte depots (%) – related quantitative data for the control and experimental groups. All values are the means ± SD, n = 8 animals per group; \*p < 0.05 vs. control (T-N-) group. (For interpretation of the references to colour in the text, the reader is referred to the web version of this article.)

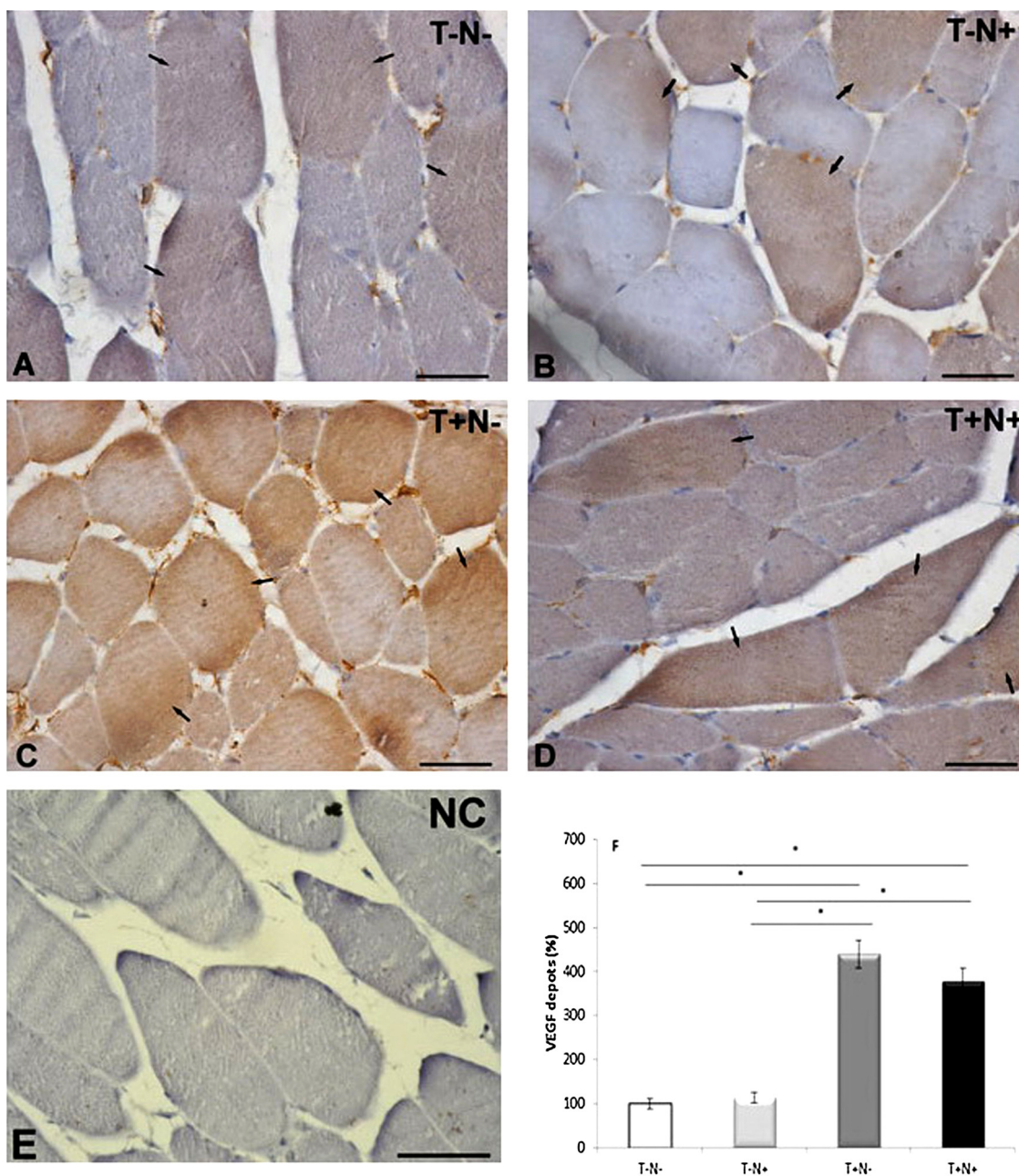
intention to quickly gain muscle mass and improve physical performance. These drugs were primarily designed to promote growth of skeletal muscles. The degree of muscle growth depends on dose, type and duration of treatment (Nikolic et al., 2015). Nandrolone decanoate is a derivate of 19-nortestosterone and is one of the most popular AAS among the athletes. They use nandrolone alone or in combination with other AAS and the most frequent applied doses are in range of 200–400 mg, weekly in cycles of 4–6 weeks (Evans, 2004).

In our study, we investigated the effects of nandrolone decanoate and physical activity alone or in combination on functional morphology of the quadriceps muscle in peripubertal male rats. Physical activity that rats were exposed to in our experiment belongs to the endurance exercise training (Sugizaki et al., 2006), since swimming represents one of the common ways of rats movement in their natural habitat. Identical exercise pattern was selected by the authors of several similar studies that included animal training and steroid administration (Nakao et al., 2000; Sugizaki et al., 2006; Naraghi et al., 2010; de Almeida Chuffa et al., 2011; Nikolic et al., 2015; Selakovic et al., 2017).

In our study we showed that chronic administration of nandrolone decanoate and physical activity (swimming), alone or in combination,

causes a significantly less body weight gain compared to the control group. This result is in line with the literature data (Rocha et al., 2007; Hassan and Kamal, 2013). Rocha et al. (2007) stated that the body weight decrease, upon anabolic steroids application along with training, was due to the reduction of intraperitoneal fat. Some other investigators reported that decrease in body weight of steroid-treated rats was maybe due to reduced appetite (Yu-Yahiro et al., 1989). Beutel et al. (2005), in the study in which they administered low and high doses of stanozolol for a period of eight weeks, showed that both, low and high doses of used synthetic steroid, will lead to a reduction of body weight in the animals.

It is well known that the AASs administration can increase a myofibril protein synthesis, which leads to increase of the muscle mass and strength (Schroeder et al., 2003; Venken et al., 2007). This is proven in our study also, because we detected that both CSCA and LD of the quadriceps muscle cells were increased in all experimental groups. Interestingly, nandrolone administration alone caused a significantly lower skeletal muscle hypertrophy than physical activity alone. It seems that the steroid action via nuclear androgenic receptor is not as effective as the physical stimuli for the muscle growth. Similar findings were



**Fig. 4.** Representative micrographs of VEGF immunostained, rat quadriceps muscle sections (objective magnification 40 ×, bar = 25 μm; arrows are pointing out the VEGF depots). A) Control (T-N-) group, B) nandrolone (T-N+) group, C) physically active (T+N-) group, D) physically active, nandrolone-treated (T+N+) group and E) negative control (NC). Graph F) displays VEGF depots (%) – related quantitative data for the control and experimental groups. All values are the means ± SD, n = 8 animals per group; \*p < 0.05 vs. control (T-N-) group. (For interpretation of the references to colour in the text, the reader is referred to the web version of this article.)

reported in a recent study where significant difference in CSCA of the skeletal muscle cells between steroid alone and training alone group was verified (Krause Neto et al., 2017). Although there are some differences in the study design, general conclusion supports our findings on this matter.

Beside the structural role, the skeletal muscle endomysial, perimysial and fascial collagen is important for the distribution and transmission of the force which is created by muscle cell contraction. To a certain limit, increase of the collagen content, which can be readily seen in the muscle tissue of active athletes as a consequence of strenuous exercise (Miller et al., 2005), is attributed to generate the stronger and better aimed contraction forces (Purslow, 2010; Yucesoy, 2010; Findley et al., 2015), but excessive deposition of collagen shows the opposite

effects. In our study, the epimysial deposition of collagen significantly rose with nandrolone treatment and even more after the physical activity, while the highest values were observed in the rats subjected to a combined approach. It is reasonable to believe that the endomysial fibrosis we observed, at least partly manifests the adverse effects of chronic high-dose nandrolone administration, given the reported, anabolic steroid-caused increase of muscle collagen content in cows (Cranwell et al., 1996). The concrete mechanism of nandrolone-induced fibrosis is not quite well understood, yet. Authors argue that oxidative stress and inflammatory cytokines may trigger proliferative and fibrotic pathways that can lead to increased collagen content in the cardiac muscle tissue (Vasilaki et al., 2016; Tofighi et al., 2017). Most probably, the same mechanisms contribute to the fibrosis in the skeletal muscle.

Regarding training alone, Hjorth et al. (2015) reported twofold up-regulation of both fibrillar and network collagens, while Carroll et al. (2015) found threefold higher collagen content in gastrocnemius of Wistar rats after 8 weeks of treadmill training, which is in correlation with our findings.

The degree of vascularization of the quadriceps muscle in our study was indirectly assessed by virtue of Novelli histochemical staining, while the angiogenesis potential was indicated with VEGF immunohistochemical detection. Pronounced capillary network and strong VEGF expression within quadriceps muscle tissue are observable after physical activity alone, or in combination with nandrolone application to our peripubertal rats. VEGF has been found to be the major proangiogenic factor in skeletal muscle, which is elevated in young men during the first weeks of aerobic exercise training, while returns to the baseline afterwards (Gavin et al., 2007). Actually, the mechanical stimulus induced by active muscle contraction leads to increased muscle interstitium VEGF levels (Hoffner et al., 2003; Gavin et al., 2007). It was also reported that training alone induces increase of the striated muscle capillary network (Soares, 1992). Some similar, but a bit stronger effect was observed upon the training combined with AAS (Neto and Gama 2017), all of which explain the realized scenario in our experimental setup. However, some data suggest that AASs can inhibit the VEGF expression and thus impair the angiogenesis (Paschoal et al., 2009; Shikatani et al., 2012). We proved that the exercise alone induced the most prominent erythrocyte depots as well as VEGF expression increase (2-fold and 3-fold respectively), but administration of nandrolone alone led to some lower values of these parameters, even compared to the controls. The latter is in line with the observation of Paschoal et al. (2009) pertinent to anabolic steroid-induced decrease of VEGF expression and impaired vasculature, which is undesirable in muscle remodeling and performance.

Generally, our study demonstrated that supraphysiological doses of nandrolone decanoate alone promote mild skeletal muscle hypertrophy, but only in combination with the physical activity the hypertrophy degree is significant. More importantly, we showed that the (ab)use of AASs, even in high doses, does not give a significant difference in muscle cell diameter compared to the training alone. On the other hand, increased collagen deposition and reduction of capillary network, as a result of chronic (ab)use of supraphysiological doses of nandrolone, may in a longer period lead to structural changes in skeletal muscle tissue, diminished performance and overall strength.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Science, Education and Technological Development of the Republic of Serbia, Grant numbers 175043 and 173009. The Ministry's involvement was only of financial nature.

## References

Ajdzanović, V., Jarić, I., Živanović, J., Filipović, B., Ristić, N., Miler, M., Milošević, V., 2015. Testosterone application decreases the capacity for ACTH and corticosterone secretion in a rat model of the andropause. *Acta Histochem.* 117, 528–535.

Ajdzanović, V., Jarić, I., Miler, M., Filipović, B., Šošić-Jurjević, B., Ristić, N., Milenković, D., Milošević, V., 2017. Diosgenin-caused changes of the adrenal gland histological parameters in a rat model of the menopause. *Acta Histochem.* 119, 48–56.

Beutel, A., Bergamaschi, C.T., Campos, R.R., 2005. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93, 43–48.

Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Callegari, C., Clevenger, B., Phillips, J., Bunnell, T.J., Tricker, R., Shirazi, A., Casaburi, R., 1996. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N. Engl. J. Med.* 335, 1–7.

Carroll, C.C., Martineau, K., Arthur, K.A., Huynh, R.T., Volper, B.D., Broderick, T.L., 2015. The effect of chronic treadmill exercise and acetaminophen on collagen and

cross-linking in rat skeletal muscle and heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 308, R294–299.

Chen, J., Lee, S.K., Abd-Elgaliel, W.R., Liang, L., Galende, E.Y., Hajjar, R.J., Tung, C.H., 2011. Assessment of cardiovascular fibrosis using novel fluorescent probes. *PLoS One* 6, e19097.

Cranwell, C.D., Unruh, J.A., Brethour, J.R., Simms, D.D., 1996. Influence of steroid implants and concentrate feeding on carcass and longissimus muscle sensory and collagen characteristics of cull beef cows. *J. Anim. Sci.* 74, 1777–1783.

de Almeida Chuffa, L.G., de Souza, R.B., Frei, F., de Fátima Paccola Mesquita, S., Camargo, I.C., 2011. Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morphometrical assessment in adult rat uterus. *Anat. Rec. (Hoboken)* 294, 335–341.

Evans, N.A., 2004. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am. J. Sports Med.* 32, 534–542.

Ferrari, F., de Paiva Foletto, M., Franzói de Moraes, S.M., Peres, S.B., Segatelli, T.M., Mareze da Costa, C.E., 2013. Testis morphophysiology of rats treated with nandrolone decanoate and submitted to physical training. *Acta Sci. Health Sci.* 35, 161–167.

Findley, T., Chaudhry, H., Dhar, S., 2015. Transmission of muscle force to fascia during exercise. *J. Bodyw. Mov. Ther.* 19, 119–123.

Fragkaki, A.G., Angelis, Y.S., Koupparis, M., Tsantili-Kakoulidou, A., Kokotos, G., Georgakopoulos, C., 2009. Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities. Applied modifications in the steroidal structure. *Steroids* 74, 172–197.

Frankenfeld, S.P., de Oliveira, L.P., Ignacio, D.L., Coelho, R.G., Mattos, M.N., Ferreira, A.C., Carvalho, D.P., Fortunato, R.S., 2014. Nandrolone decanoate inhibits gluconeogenesis and decreases fasting glucose in Wistar male rats. *J. Endocrinol.* 220, 143–153.

Franquini, J.V., do Nascimento, A.M., de Lima, E.M., Brasil, G.A., Heringer, O.A., Cassaro, K.O., da Cunha, T.V., Musso, C., Silva Santos, M.C., Kalil, I.C., Endringer, D.C., Boëchat, G.A., Bissoli, N.S., de Andrade, T.U., 2013. Nandrolone decanoate determines cardiac remodeling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. *Steroids* 78, 379–385.

Frati, P., Busardo, F.P., Cipolloni, L., Dominicus, E.D., Fineschi, V., 2015. Anabolic androgenic steroids (AAS) related deaths: autaptic, histopathological and toxicological findings. *Curr. Neuropharmacol.* 13, 146–159.

Gavin, T.P., Ruster, R.S., Carrithers, J.A., Zwetsloot, K.A., Kraus, R.M., Evans, C.A., Knapp, D.J., Drew, J.L., Mc Cartney, J.S., Garry, J.P., Hickner, R.C., 2007. No difference in the skeletal muscle angiogenic response to aerobic exercise training between young and aged men. *J. Physiol.* 585, 231–239.

Hassan, A.F., Kamal, M.M., 2013. Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. *Int. J. Health Sci. (Qassim)* 7, 47–60.

Hoffner, L., Nielsen, J.J., Langberg, H., Hellsten, Y., 2003. Exercise but not prostanoids enhance levels of vascular endothelial growth factor and other proliferative agents in human skeletal muscle interstitium. *J. Physiol.* 550, 217–225.

Hjorth, M., Norheim, F., Meen, A.J., Pourteymour, S., Lee, S., Holen, T., Jensen, J., Birkeland, K.I., Martinov, V.N., Langleite, T.M., Eckardt, K., Drevon, C.A., Kolset, S.O., 2015. The effect of acute and long-term physical activity on extracellular matrix and serglycin in human skeletal muscle. *Physiol. Rep.* 3, e12473.

Karila, T., Hovatta, O., Seppälä, T., 2004. Concomitant abuse of anabolic androgenic steroids and human chorionic gonadotropin impairs spermatogenesis in power athletes. *Int. J. Sports Med.* 25, 257–263.

Karpakka, J.A., Pesola, M.K., Takala, T.E., 1992. The effects of anabolic steroids on collagen synthesis in rat skeletal muscle and tendon. A preliminary report. *Am. J. Sports Med.* 20, 262–266.

Kohler, R.M., Lambert, M.I., 2002. Urine nandrolone metabolites: false positive doping test? *Br. J. Sports Med.* 36, 325–329.

Krause Neto, W., Silva, W.A., Ciena, A.P., Nucci, R.A.B., Anaruma, C.A., Gama, E.F., 2017. Effects of strength training and anabolic steroid in the peripheral nerve and skeletal muscle morphology of aged rats. *Front. Aging Neurosci.* 9, 205.

Martinez-Huenchullan, S., McLennan, S.V., Verhoeven, A., Twigg, S.M., Tam, C.S., 2017. The emerging role of skeletal muscle extracellular matrix remodeling in obesity and exercise. *Obes. Rev.* 18, 776–790.

Miller, B.F., Olesen, J.L., Hansen, M., Døssing, S., Crameri, R.M., Welling, R.J., Langberg, H., Flyvbjerg, A., Kjaer, M., Babraj, J.A., Smith, K., Rennie, M.J., 2005. Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. *J. Physiol.* 567, 1021–1033.

Nakao, C., Ookawara, T., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Miyazaki, H., Haga, S., Sato, Y., Ji, L.L., Ohno, H., 2000. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J. Appl. Physiol.* 88, 649–654.

Naraghi, M.A., Abolhasani, F., Kashani, I., Anarkooli, I.J., Hemadi, M., Azami, A., Barbarestani, M., Aitken, R.J., Shokri, S., 2010. The effects of swimming exercise and supraphysiologic doses of nandrolone decanoate on the testis in adult male rats: a transmission electron microscope study. *Folia Morphol. (Warsz)* 69, 138–146.

Neto, W.K., Gama, E.F., 2017. Strength training and anabolic steroid do not affect muscle capillarization of middle-aged rats. *Rev. Bras. Med. Esporte* 23. <http://dx.doi.org/10.1590/1517-869220172302157902>.

Nieschlag, E., Vorona, E., 2015. Doping with AAS: adverse effects on non-reproductive organs and function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16, 199–211.

Nikolic, T., Zivkovic, V., Jevdjivic, M., Djuric, M., Srejovic, I., Djuric, D., Jeremic, N., Djuric, D., Bolevich, S., Jakovljevic, V., 2015. The effects of chronic administration of nandrolone decanoate on redox status on exercised rats. *Mol. Cell Biochem.* 411, 95–105.

Pärssinen, M., Karila, T., Kovanen, V., Seppälä, T., 2000. The effect of supraphysiological

- doses of anabolic androgenic steroids on collagen metabolism. *Int. J. Sports Med.* 21, 406–411.
- Pärssinen, M., Seppälä, T., 2002. Steroid use and long-term health risks in former athletes. *Sports Med.* 32, 83–94.
- Paschoal, M., de Cássia Marqueti, R., Perez, S., Selistre-de-Araujo, H.S., 2009. Nandrolone inhibits VEGF mRNA in rat muscle. *Int. J. Sports Med.* 30, 775–778.
- Piacentino, D., Kotzalidis, G.D., Del Casale, A., Aromatario, M.R., Pomara, C., Girardi, P., Sani, G., 2015. Anabolic-androgenic steroid use and psychopathology in athletes. A systematic review. *Curr. Neuropharmacol.* 13, 101–121.
- Prior, B.M., Lloyd, P.G., Yang, H.T., Terjung, R.L., 2003. Exercise-induced vascular remodeling. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 31, 26–33.
- Purslow, P.P., 2010. Muscle fascia and force transmission. *J. Bodyw. Mov. Ther.* 14, 411–417.
- Riezzo, I., De Carlo, D., Neri, M., Nieddu, A., Turillazzi, E., Fineschi, V., 2011. Heart disease induced by AAS abuse, using experimental mice/rats models and the role of exercise-induced cardiotoxicity. *Med. Chem.* 11, 409–424.
- Rocha, F.L., Carmo, E.C., Roque, F.R., Hashimoto, N.Y., Rossini, L.V., Frimm, C., Aneas, I., Neagro, C.E., Krieger, J.E., Oliveira, E.M., 2007. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H3575–H3583.
- Rodrigues, J.M., Oliveira, V.P.P., Furlan, J., Munhoz, A.C., Rempel, M.R.S., Brito, M.N., Brito, N.A., Pedrosa, M.M., Costa, C.E.M., 2017. Immediate and residual effects of low-dose nandrolone decanoate and treadmill training on adipose and reproductive tissues of male Wistar rats. *Arch. Physiol. Biochem.* 123, 68–77.
- Schroeder, E.T., Terk, M., Sattler, F.R., 2003. Androgen therapy improves muscle mass and strength but not muscle quality: results from two studies. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E16–E24.
- Selakovic, D., Joksimovic, J., Zaletel, I., Puskas, N., Matovic, M., Rosic, G., 2017. The opposite effects of nandrolone decanoate and exercise on anxiety levels in rats may involve alterations in hippocampal parvalbumin-positive interneurons. *PLoS One* 12, e0189595.
- Shikatani, E.A., Trifonova, A., Mandel, E.R., Liu, S.T., Roudier, E., Krylova, A., Szgiato, A., Beaudry, J., Riddell, M.C., Haas, T.L., 2012. Inhibition of proliferation, migration and proteolysis contribute to corticosterone-mediated inhibition of angiogenesis. *PLoS One* 7, e46625.
- Soares, J.M., 1992. Effects of training on muscle capillary pattern: intermittent vs continuous exercise. *J. Sports Med. Phys. Fit.* 32, 123–127.
- Sretenovic, J., Zivkovic, V., Srejovic, I., Milosavljevic, Z., 2016. The effects of high doses of nandrolone decanoate on cardiac muscle tissue. *Ser. J. Exp. Clin. Res.* 17, 303–308.
- Sugizaki, M.M., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, R.F., Padovani, C.R., Bruno, A., Nascimento, A.F., Aragon, F.F., Novelli, E.L., Cicogna, A.C., 2006. Exercise training increases myocardial inotropic response in food restricted rats. *Int. J. Cardiol.* 112, 191–201.
- Takahashi, M., Tatsugi, T., Kohno, T., 2004. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rat. *Endocr. J.* 51, 425–434.
- Tanno, A.P., das Neves, V.J., Rosa, K.T., Cunha, T.S., Giordano, F.C., Calil, C.M., Guzzoni, V., Fenandes, T., de Oliveira, E.M., Novaes, P.D., Irigoyen, M.C., Moura, M.J., Marcondes, F.K., 2011. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. *Life Sci.* 24, 631–637.
- Tylicki, A., Kawalko, A., Sokolska, J., Strumilo, S., 2007. Effect of anabolic steroid nandrolone deaconate on enzymes in the heart, liver and muscle of rats and rat's electrophysiology. *Horm. Metab. Res.* 39, 268–272.
- Tofighi, A., Shirpoor, M., Ansari, M.H.K., Shirpoor, A., Zerehpooosh, M., 2017. The effect of nandrolone treatment with and without enforced swimming on histological and biochemical changes in the heart and coronary artery of male rats. *Anatol. J. Cardiol.* 3, 176–183.
- Vasilaki, F., Tsitsimpikou, C., Tsarouhas, K., Germanakis, I., Tzardi, M., Kavvalakis, M., Ozcagli, E., Kouretas, D., Tsatsakis, A.M., 2016. Cardiotoxicity in rabbits after long-term nandrolone decanoate administration. *Toxicol. Lett.* 241, 143–151.
- Venken, K., Movérare-Skrtic, S., Kopchick, J.J., Coschigano, K.T., Ohlsson, C., Boonen, S., Bouillon, R., Vanderschueren, D., 2007. Impact of androgens, growth hormone, and IGF-I on bone and muscle in male mice during puberty. *J. Bone Miner. Res.* 22, 72–82.
- Vingren, J.L., Kraemer, W.J., Ratamess, N.A., Anderson, J.M., Volek, J.S., Maresh, C.M., 2010. Testosterone physiology in resistance exercise and training: the up-stream regulatory elements. *Sports Med.* 40, 1037–1053.
- Waters, R.E., Rotevatn, S., Li, P., Annex, B.H., Yan, Z., 2004. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 287, C1342–C1348.
- Yucesoy, C.A., 2010. Epimuscular myofascial force transmission implies novel principles for muscular mechanics. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 38, 128–134.
- Yu-Yahiro, J.A., Michael, R.H., Nasrallah, D.V., Schofield, B., 1989. Morphologic and histologic abnormalities in female and male rats treated with anabolic steroids. *Am. J. Sports Med.* 17, 686–689.
- Ysalis, C.E., Bahrke, M.S., 1995. Anabolic-androgenic steroids. *Curr. Issues Sports Med.* 19, 326–340.



## Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury

Jovana Bradic, Nevena Jeremic, Anica Petkovic, Jovana Jeremic, Vladimir Zivkovic, Ivan Srejovic, Jasmina Sretenovic, Stevan Matic, Vladimir Jakovljevic & Marina Tomovic

To cite this article: Jovana Bradic, Nevena Jeremic, Anica Petkovic, Jovana Jeremic, Vladimir Zivkovic, Ivan Srejovic, Jasmina Sretenovic, Stevan Matic, Vladimir Jakovljevic & Marina Tomovic (2019): Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury, Archives of Physiology and Biochemistry, DOI: [10.1080/13813455.2018.1551904](https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1551904)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1551904>



Published online: 11 Jan 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 1



View Crossmark data [↗](#)

## Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury

Jovana Bradic<sup>a</sup> , Nevena Jeremic<sup>a</sup> , Anica Petkovic<sup>a</sup>, Jovana Jeremic<sup>a</sup>, Vladimir Zivkovic<sup>b</sup>, Ivan Srejavic<sup>b</sup> , Jasmina Sretenovic<sup>b</sup>, Stevan Matic<sup>c</sup>, Vladimir Jakovljevic<sup>b,d</sup> and Marina Tomovic<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>b</sup>Faculty of Medical Sciences, Department of Physiology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>c</sup>Department of Pathology, Clinical Centre of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>d</sup>Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia

### ABSTRACT

The aim of our study was to determine a chemical composition of methanol extract of *Galium verum* as well as to assess its effects on functional recovery and redox status of isolated rat heart after ischemia. Rats were divided into control and *G. verum* group, which included animals treated with 500 mg/kg of methanol extract of *G. verum* for 28 days. Parameters of heart function and oxidative stress markers were estimated. Cell morphology was evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. Our results demonstrated for the first time that *G. verum* extract preserved cardiac contractility, systolic, and diastolic function as well as structural damage of the heart after ischemia. Furthermore, *G. verum* extract modulated the activity of antioxidant enzymes and alleviated the production of pro-oxidants.

### ARTICLE HISTORY

Received 25 July 2018  
Accepted 19 November 2018  
Published online 14 December 2018

### KEYWORDS

*Galium verum*; ischemia-reperfusion injury; rat heart; oxidative stress

## 1. Introduction

Nowadays acute myocardial infarction remains a leading cause of hospital admissions and mortality worldwide. Early restoration of blood flow by thrombolytic therapy or primary percutaneous coronary artery angioplasty presents the current therapeutic strategy of a great importance for reducing the size of myocardial infarct (Xia *et al.* 2016). Nevertheless, the reversal of oxygen to oxygen-starved myocardium during reperfusion paradoxically exacerbates tissue injury caused by hypoxic stress. This phenomenon, known as ischemia/reperfusion (I/R) injury, is a frequent clinical problem and it has been a focus of considerable research efforts for more than four decades (Kalogeris *et al.* 2016). Among myriad of mechanisms underlying I/R injury, overwhelming oxidative/nitrosative stress, calcium overload, and pronounced inflammatory response has been considered to mostly contribute to myocardial damage (Kalogeris *et al.* 2012). Early studies were mostly oriented on ischemic preconditioning as a manoeuvre for myocardial protection in which heart is exposed to brief episodes of I/R prior myocardial infarct induced by prolonged ischemia. On the other hand, certain non-ischemic, non-hypoxic stimulus, such as pharmacological agents applied before ischemia may mimic the signaling induced by ischemic preconditioning, thus leading to alleviation of the deleterious effects of I/R injury (Li *et al.* 2015).

Numerous data support the fact that medicinal plants enriched with polyphenols possess the potential to attenuate harmful effects of acute myocardial infarction, thus justifying its traditional use in the prevention of cardiovascular diseases.

Inhibition of reactive oxygen species (ROS) overproduction with antioxidants present in plant extracts may be prominent endpoint target of cardioprotection (Akhlaghi and Bandy 2009, Barteková *et al.* 2010). *Galium verum* L. is a perennial herbaceous plant belonging to the *Rubiaceae* family, widely used throughout history for treatment and prophylaxis of various diseases and conditions (Lakić *et al.* 2010). Several classes of bioactive compounds have been isolated from this plant species so far: phenols, iridoid glycosides, anthraquinones, and triterpenes, as well as small amounts of tannins, saponins, essential oils, etc (Demirezer *et al.* 2006, Lakić *et al.* 2010). *G. verum* has been renowned in traditional medicine since ancient time for its effectiveness as sedative, spasmolytic, anti-cancer, cardioprotective agent, etc (Demirezer *et al.* 2006, Lakić *et al.* 2010, Milic *et al.* 2013). Phytochemical investigations have revealed a chemical composition of this plant and confirmed antioxidant activity *in vitro*, however its biological effects, especially on cardiac function and oxidative stress are not fully clarified (Lakić *et al.* 2010, Vlase *et al.* 2014).

Regarding all above-presented data, the aim of our study was to determine the content of total phenols and flavonoids of methanol extract of *G. verum* as well as to assess its effects on functional recovery and redox status of isolated rat heart after ischemia.

## 2. Materials and methods

This investigation was performed at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. The study protocol

was approved (17 March 2017) and performed in accordance with the regulatives of the Faculty's Ethical committee for the welfare of laboratory animals and principles of the Good laboratory practice and European Council Directive (86/609/EEC).

### 2.1. Plant material and extract preparation

The whole plant *G. verum* was collected on 5 July 2017 in the village Dobroselica, on the southern cliff of the Mt Zlatibor (GPS coordinates: 43°42'59.99"N and 19°41'59.99"E). Identification and classification of the plant material were performed by professor Snezana Vukojicic at the Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Kragujevac and at the Institute of Botany and Botanical garden "Jevremovac," University of Belgrade. Voucher specimens are deposited in Herbarium of the Institute of Botany and Botanical garden "Jevremovac" with number 17417. The collected material was dried under the shade and powdered (sieve 0.75). Methanol extract was prepared extracting 100 g of aerial part of plant with 500 ml of methanol by heat reflux extraction, at temperature of 90°C, in a duration of 2 h (Hijazi *et al.* 2015). The mixture was filtered through filter paper (Whatman, No.1). Dry extract was obtained by evaporation under reduced pressure (RV05 basic IKA, Germany). The residue (17.07 g) was stored in a dark glass bottle at +4°C for further processing. In order to feed the animals, *G. verum* extract was daily dissolved in the water just before administered to experimental animals.

### 2.2. Determination of the total phenolic and flavonoid contents

Folin-Ciocalteu's method was used in determining the concentrations of total phenolic content of methanol extract (Singleton *et al.* 1999). Total phenolic content was expressed as mg gallic acid equivalents per gram of crude extract (mg GA/g extract). Total flavonoid content of the tested extract was determined following a previously reported method (Brighente *et al.* 2007). Total flavonoid content was expressed as milligram of quercetin equivalent per gram of extract (mg of quercetin equivalent/g of extract).

### 2.3. Animals and experimental design

Twenty *Wistar albino* rats (males, 8 weeks old, body weight 200±50 g) were included in the study. The animals consumed commercial rat food (20% protein rat food, Veterinary institute Subotica, Serbia) *ad libitum* and were housed at temperature of 22±2°C, with 12 h of automatic illumination daily. The rats were divided into two groups:

- **Control group** – rats that drank only tap water.
- ***G. verum* group** – rats that drank tap water containing 500 mg/kg of methanol extract of *G. verum* for 28 days.

A day after accomplishing 28-day drinking protocol after a short-term ketamine/xylozine-induced narcosis, rats were

sacrificed by decapitation. The chest was then opened via midline thoracotomy. The hearts were immediately removed and immersed in cold saline and were then attached on a cannula of the *Langendorff* perfusion apparatus to provide retrograde perfusion under constant coronary perfusion pressure CPP=70 cmH<sub>2</sub>O. Krebs–Henseleit buffer was used for retrograde perfusion (in mmol/l: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.7, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glucose 11, and pyruvate 2). The buffer was balanced with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, with a pH of 7.4 and a temperature of 37°C. After placing the sensor in the left ventricle, the following parameters of myocardial function have been continuously measured: maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max), minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min), systolic left ventricular pressure (SLVP), diastolic left ventricular pressure (DLVP), and heart rate (HR). Coronary flow (CF) was measured flowmetrically.

Following the establishment of heart perfusion, the hearts were stabilised within 30 min. In both groups, after stabilisation period, hearts were subjected to global ischemia (perfusion was totally stopped) for 20 min, followed by 30 min of reperfusion. In the period of reperfusion (30 min), all cardiodynamic parameters and CF were measured in intervals of 5 min (RP1–RP7).

### 2.4. Biochemical analysis in heart tissue and coronary venous effluent

#### 2.4.1. Coronary venous effluent

Coronary venous effluent was collected in point of stabilisation (S), in first point of reperfusion (R1) and on every 5 min in period of reperfusion (R1–R7). The following oxidative stress parameters were determined spectrophotometrically (Shimadzu UV 1800, Japan) using collected samples of the coronary venous effluent: the index of lipid peroxidation, measured as thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), levels of superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### 2.4.2. Heart tissue preparation

After accomplishing experiments, hearts from all animals were frozen at -80°C, and then a 0.5 section of each tissue was homogenised in 5 ml phosphate buffer pH 7.4 using an electrical homogeniser, on ice. Then tissue homogenates were centrifuged at 1200 × *g* for 20 min at 4°C. The resulting supernatants were isolated and stored at -80°C until determination of biochemical parameters. Index of lipid peroxidation as well as parameters of antioxidant defence system such as reduced glutathione (GSH), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) were determined in heart tissue.

#### 2.4.3. Determination of the index of lipid peroxidation measured as TBARS

The degree of lipid peroxidation in the coronary venous effluent and heart tissue was estimated by measuring TBARS, using 1% thiobarbituric acid in 0.05 NaOH, which was



incubated with the coronary effluent or heart tissue at 100 °C for 15 min and measured at 530 nm. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe (Ohkawa *et al.* 1979).

#### 2.4.4. Nitrite determination ( $\text{NO}_2^-$ )

Nitric oxide (NO) decomposes rapidly to form stable nitrite/nitrate products. The  $\text{NO}_2^-$  level was measured and used as an index of NO production, using Griess's reagent. A total of 0.5 ml of perfusate was precipitated with 200  $\mu\text{L}$  of 30% sulphosalicylic acid, vortexed for 30 min, and centrifuged at  $3000 \times g$ . Equal volumes of the supernatant and Griess's reagent (containing 1% sulphanilamide in 5% phosphoric acid/0.1% naphthalene ethylenediamine-dihydrochloride) were added, incubated for 10 min in the dark and measured at 543 nm.  $\text{NO}_2^-$  levels were calculated using sodium nitrite as the standard (Green *et al.* 1982).

#### 2.4.5. Superoxide anion radical determination ( $\text{O}_2^-$ )

Superoxide anion radical concentrations were measured using the nitro blue tetrazolium reagent in TRIS buffer (assay mixture) with coronary venous effluent. The measurement was performed at a wavelength of 530 nm. The Krebs–Henseleit solvent was used as the blank control (Auclair and Voisin 1985).

#### 2.4.6. Hydrogen peroxide determination ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

The measurement of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was based on the oxidation of phenol red by  $\text{H}_2\text{O}_2$  in a reaction catalysed by horseradish peroxidase (Pick and Keisari 1980). Two hundred microlitres of perfusate was precipitated using 800 ml of freshly prepared phenol red solution; 10  $\mu\text{L}$  of (1:20) horseradish peroxidase (made immediately before use) was subsequently added. For the blank probe, an adequate volume of Krebs–Henseleit solution was used instead of coronary venous effluent. The level of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was measured at 610 nm.

#### 2.4.7. Determination of reduced glutathione (GSH)

The level of reduced glutathione was determined based on GSH oxidation with 5,5-dithio-bis-6,2-nitrobenzoic acid using the method reported by Beutler *et al.* (1963). Detection was performed at 420 nm. The amount of GSH was expressed as nmol/g tissue.

#### 2.4.8. Determination of antioxidant enzymes (SOD, CAT)

SOD activity was determined by the epinephrine method of Beutler. Homogenate of heart tissue was mixed with carbonate buffer, and then epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm. The amount of SOD was expressed as U/g tissue (Beutler 1984). CAT activity was determined according to Aebi. Diluted homogenate of heart tissue (1:7 v/v) was treated with chloroform–ethanol (0.6:1 v/v). CAT buffer, prepared sample, and 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  was used for determination. Detection was performed at 360 nm. The amount of CAT was expressed as U/g tissue (Aebi 1984).

## 2.5. Histological analysis

In order to evaluate the effects of *G. verum* on cell morphology after ischemia hematoxylin-eosin staining (HE) was performed for hearts according to the previously reported method (Zhang 2016).

## 2.6. Statistical analysis

IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows was used for statistical analysis of data within control and *G. verum* group. Three measured points were statistically analysed: first point was stabilisation (S), second was the first and the last point of 30 min reperfusion period (R1 and R7). Values were expressed as mean  $\pm$  standard error. Distribution of data was checked by Shapiro–Wilk test. Data were analysed using a one-way analysis of variance and the *post hoc* Bonferroni test for multiple comparisons. Values of  $p < .05$  were considered to be statistically significant, while values of  $p < .01$  were considered to be high statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Total phenolic and total flavonoid contents

Total phenolic and flavonoid content of methanol extract of *G. verum* is shown in Table 1.

### 3.2. Body weight (BW) and heart weight (HW) measurement

Values of BW, HW, and BW to HW ratio in both groups of rats are shown in Table 2. Statistically significant difference in the values of these parameters was not observed between groups.

### 3.3. Cardiodynamic parameters

#### 3.3.1. Maximum rate of left ventricular pressure development (dp/dt max)

In the control group, there was a significant increase in dp/dt max in the first point of reperfusion (RP1) in comparison to the stabilisation period and last moment of reperfusion (RP7). Markedly lower value of this parameter was observed in RP7 compared to the values before ischemia. In a group who received *G. verum* an increase in dp/dt max was noticed

**Table 1.** Total phenol and flavonoid content of aerial part of methanol extract of *G. verum*.

Total phenol content <sup>a</sup>	27.26 $\pm$ 1.90
Total flavonoid content <sup>b</sup>	65.10 $\pm$ 5.81

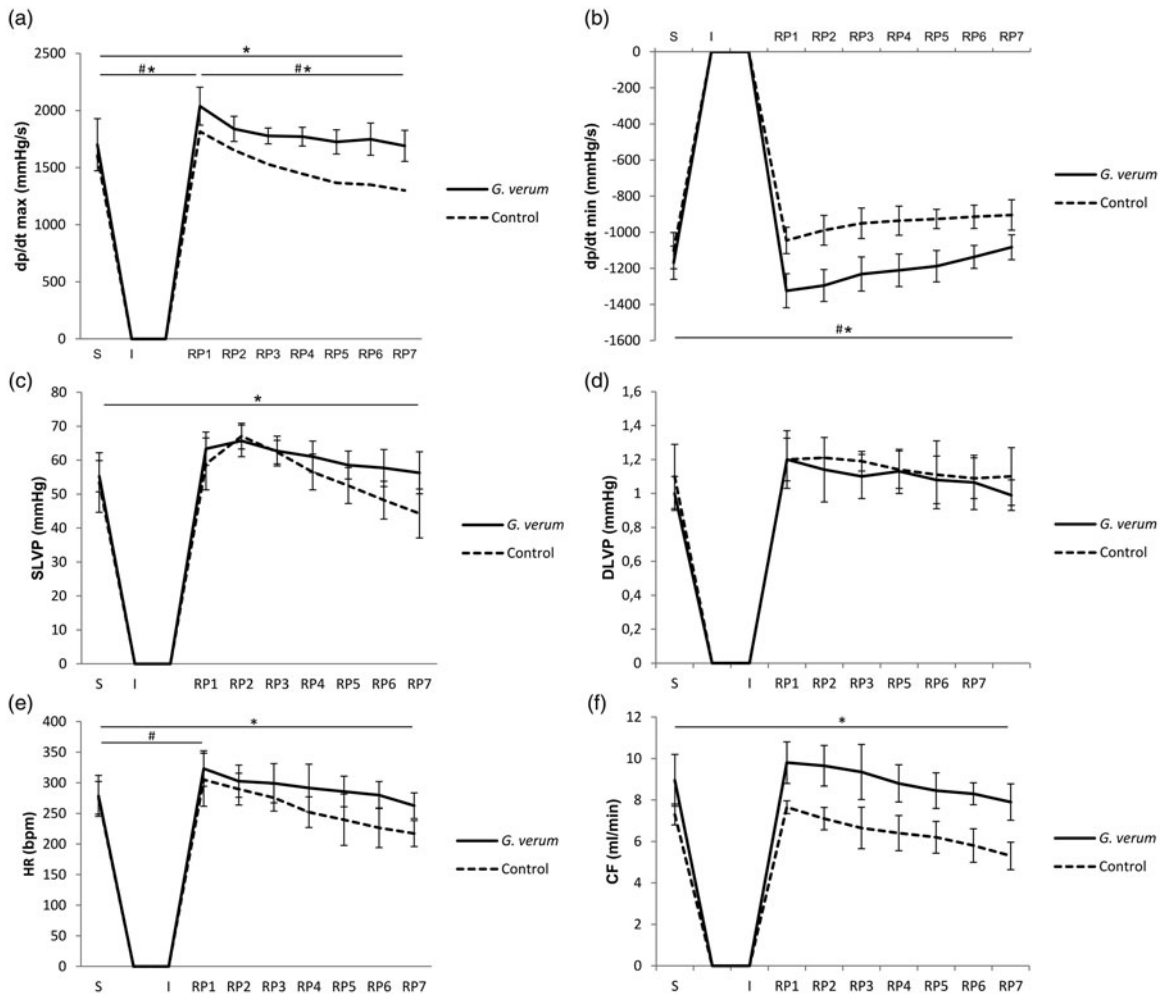
Values are means of three biological replicates  $\pm$  SD. DE: dry extract.

<sup>a</sup>mg gallic acid equivalent (GAE)/g DE.

<sup>b</sup>mg quercetin equivalent/g DE.

**Table 2.** Body and heart weight measurements presented as mean  $\pm$  SD.

	BW (g)	Heart weight (g)	BW to HW ratio
Control	319.83 $\pm$ 21.23	1.13 $\pm$ 0.04	354.65 $\pm$ 16.05
<i>G. verum</i>	336.75 $\pm$ 37.78	1.25 $\pm$ 0.1	376.63 $\pm$ 41.83



**Figure 1.** Cardiodynamic parameters in healthy and *G. verum* treated rats. (a) comparison between groups in the value of dp/dt max, (b) comparison between groups in the value of dp/dt min, (c) comparison between groups in the value of SLVP, (d) comparison between groups in the value of DLVP, (e) comparison between groups in the value of HR, (f) comparison between groups in the value of CF. \*Statistical significance at the level of  $p < 0.05$  within control group; #statistical significance at the level of  $p < 0.05$  within *G. verum* group; data are presented as means  $\pm$  SD. S: stabilisation; I: ischemia; R1–R7: every 5 min of reperfusion.

in the first minute of reperfusion compared to stabilisation value and value in RP7, while values of this parameter at the end of reperfusion were similar to those before ischemia (Figure 1(a)).

### 3.3.2. Minimum rate of left ventricular pressure development (dp/dt min)

More negative values of dp/dt min were reached at the end of reperfusion in comparison to stabilisation in group treated with *G. verum*, while in control group at the last point of reperfusion dp/dt min value was more positive when compared to the values before ischemia (Figure 1(b)).

### 3.3.3. Systolic blood pressure in the left ventricle (SLVP)

A significant drop in SLVP was observed in control group at the last point of reperfusion when compared to stabilisation period, while in experimental group SLVP value remained constant during the observed period (Figure 1(c)).

### 3.3.4. Diastolic left ventricular pressure

Value of DLVP did not vary within both groups during the observed points of interest (Figure 1(d)).

### 3.3.5. Heart rate

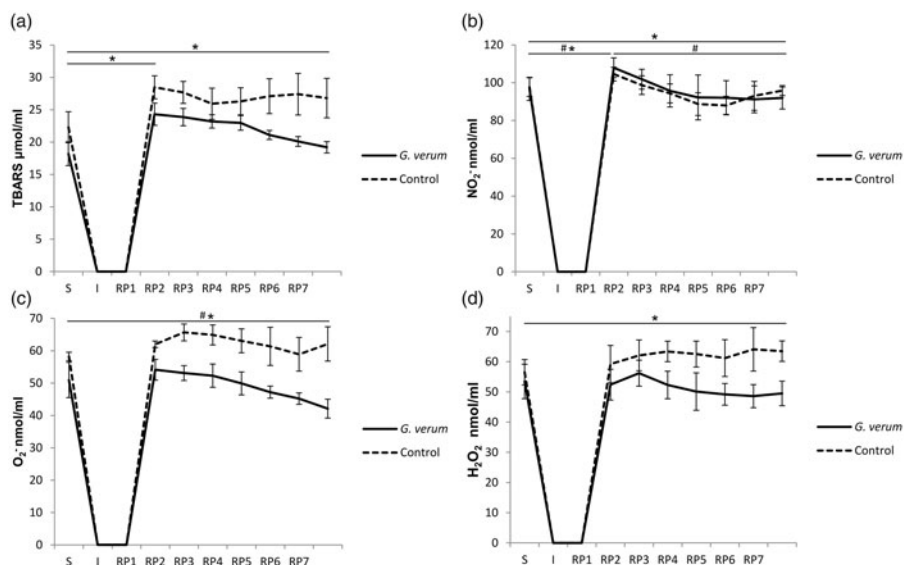
At the end of recovery period in control group, HR was a significantly decreased in comparison to the values in stabilisation. Furthermore, a rise in the value of HR was noticed at first point of reperfusion (R1) compared to stabilisation point in group who received *G. verum*, while at the end of 30 min reperfusion value of HR returned to the value detected before ischemia (Figure 1(e)).

### 3.3.6. Coronary flow

CF remained constant in experimental group during the observed period, while in control there was a prominent decrease at the last point of reperfusion when compared to stabilisation period (Figure 1(f)).

**Table 3.** Percent difference in absolute values of cardiodynamic parameters between control and *G. verum* group.

<i>G. verum</i> vs control	(%) increase in stabilisation	(%) increase in RP1	(%) increase in RP7
dp/dt max	+6.01%	+12.22%	+29.95%
dp/dt min	+6.07%	+26.66%	+19.6%
SLVP	+3.48%	+7.65%	+27.09%
DLVP	-0.06%	+0.04%	-0.01%
HR	+1.18%	+5.98%	+20.93%
CF	+22.6%	+28.11%	+49.05%

**Figure 2.** Oxidative stress markers in coronary venous effluent in healthy and *G. verum* treated rats. (a) comparison between groups in the value of TBARS, (b) comparison between groups in the value of  $\text{NO}_2^-$ , (c) comparison between groups in the value of  $\text{O}_2^-$ , (d) comparison between groups in the value of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . \*Statistical significance at the level of  $p < 0.05$  within control group; #statistical significance at the level of  $p < 0.05$  within *G. verum* group; data are presented as means  $\pm$  SD. S: stabilisation; I: ischemia; R1–R7: every 5 min of reperfusion.

Percentage changes in the values of cardiodynamic parameters induced by *G. verum* extract treatment in comparison to control group are shown in Table 3.

### 3.4. Biochemical analysis

#### 3.4.1. Index of lipid peroxidation (measured as TBARS)

The index of lipid peroxidation in coronary venous effluent did not differ significantly in the experimental group, while in control group there was a rise in the first minute of reperfusion and at the end of recovery period compared to the values in stabilisation (Figure 2(a)). There was no change in lipid peroxidation in both control and experimental hearts (Figure 3(a)).

#### 3.4.2. Level of nitrites ( $\text{NO}_2^-$ )

In the control group, there was an increase in  $\text{NO}_2^-$  production at the first and at the last point of recovery period in comparison to stabilisation. In the group treated with *G. verum*, higher generation of  $\text{NO}_2^-$  was noticed in the first minute of reperfusion when compared to stabilisation and the end of reperfusion (Figure 2(b)).

#### 3.4.3. Level of superoxide anion radical ( $\text{O}_2^-$ )

At the end of reperfusion a significantly increased level of  $\text{O}_2^-$  was observed in the control group in comparison to the

level before ischemia. On the contrary in *G. verum* group significantly diminished production of this pro-oxidant was noticed at the end of recovery period compared to stabilisation (Figure 2(c)).

#### 3.4.4. Level of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

The level of  $\text{H}_2\text{O}_2$  did not vary significantly within the experimental group, while in the control group, enhance in production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was found at the last point reperfusion in comparison to values before ischemia (Figure 2(d)).

Percentage changes in the levels of measured pro-oxidants induced by *G. verum* extract treatment in comparison to control group are shown in Table 4.

#### 3.4.5. Parameters of antioxidant defence system

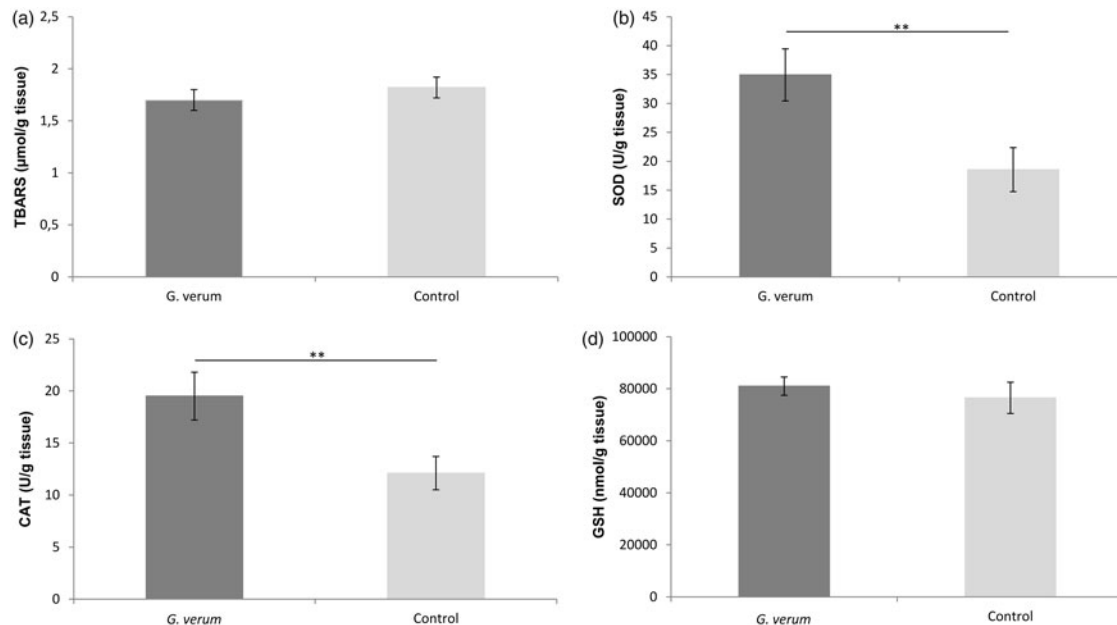
The activities of SOD and CAT were significantly higher in the group treated with *G. verum* in comparison to the control group, while the level of GSH was similar in both observed groups (Figure 3(b–d)).

### 3.5. Histopathological results

In the control group, most of the cardiac muscle fibers were hyper eosinophilic with loss of nucleus and transverse striation, followed by contraction bands. Additionally, edema and vacuolation of muscle fibers were observed. On the

**Table 4.** Percent difference in values of oxidative stress parameters between control and *G. verum* group.

<i>G. verum</i> vs control	(%) increase in Stabilisation	(%) increase in RP1	(%) increase in RP7
TBARS	-18.39%	-14.63%	-28.36%
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-5.07%	+ 3.24%	-4.12%
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-12.49%	-12.78%	-32.06%
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-5.39%	-11.46%	-22.05%



**Figure 3.** Parameters of oxidative stress and antioxidant defence system in heart tissue in healthy and *G. verum* treated rats. (a) Comparison between groups in the value of TBARS, (b) comparison between groups in the value of CAT, (c) comparison between groups in the value of SOD, (d) comparison between groups in the value of GSH. \*Statistical significance at the level of  $p < 0.05$  within control group; #statistical significance at the level of  $p < 0.05$  within *G. verum* group; data are presented as means  $\pm$  SD. S: stabilisation; I: ischemia; R1–R7: every 5 min of reperfusion.

other hand, muscle fibers in the group treated with *G. verum* were hyper eosinophilic and moderately edematous and there were no loss of nucleus and transverse striation (Figure 4).

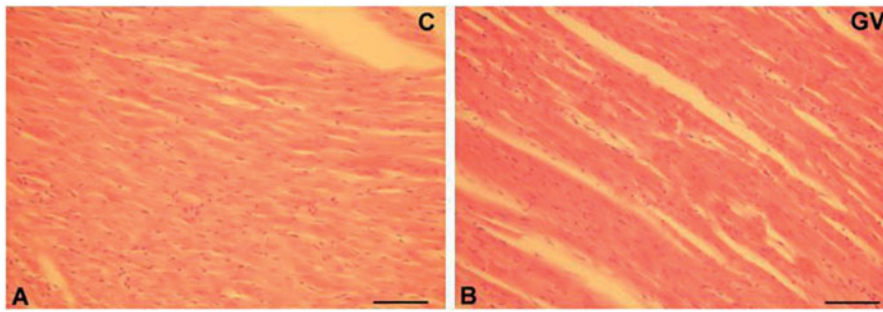
#### 4. Discussion

Oxidative stress and prominent inflammatory response, characterised by infiltration of proinflammatory neutrophils to ischemic tissue, remain one of a critical factors contributing to myocardial damage (Kalogeris *et al.* 2012). Therefore possible targets for pharmacological preconditioning may be cellular and enzymatic sources of ROS overproduction, as well as several inflammatory mediators. Polyphenols, as a class of naturally occurring compounds present in fruits, plants, etc are under intense investigation due to its antioxidant, anti-thrombogenic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic properties (Panche *et al.* 2016). Numerous researches have confirmed the protective effects of plant extracts against reperfusion-induced heart damage, mainly attributed to antioxidant and anti-inflammatory potential of polyphenols and flavonoids (a vast group of polyphenols) (Akhlaghi and Bandy 2009). In that sense, the purpose of our study was to perform chemical analysis of *G. verum* extract and reveal its effects on functional recovery and redox status of heart after ischemia.

Cardiodynamic parameters detected in our research refer to the functional characteristics of the heart, specifically the

left ventricle and its systolic and diastolic function. Therefore the effects of *G. verum* extract on measured cardiodynamic variables, as well as cardiac redox state, reflects its potential therapeutic role in a model of pharmacological preconditioning.

Our results clearly show that cardiodynamic parameters in control conditions were substantially reduced during reperfusion compared to values before ischemia. We obtained depression of cardiac function and impaired inotropic and lusitropic properties of the heart, as well as disturbed coronary circulation and HR, thus confirming that I/R injury is related to myocardial tissue dysfunction. On the other hand, 4 weeks treatment with *G. verum* extract did not only preserve contractile power of the heart, but even improved it, as evidenced by increase in dp/dt max values at the end of reperfusion compared to the values before ischemia. Additionally, administration of *G. verum* significantly restored lusitropic property of myocardium and led to the recovery of systolic and diastolic function in comparison to hearts in control conditions. Restoration of flow was noticed in first minutes of reperfusion and it was followed by a slow continuous drop over 30 min reperfusion period, so at the end of recovery period it returned to the values observed before ischemia. The similar dynamic during reperfusion was noticed in terms of contractility force, thus suggesting that vasculature dilated in accordance with the demands of myocardial contraction. Insignificantly altered HR in rats who



**Figure 4.** Histopathological changes in the rat heart (magnification,  $\times 400$ ): (A) control group; (B) *G. verum* group.

received *G. verum* provided sufficient time for myocardium to contract strongly.

To our best knowledge, there are no evidence regarding the effects of *G. verum* on myocardial function so far and mechanisms included in its cardioprotective potential are open to discussion. Besides the traditional use of medicinal plants rich in polyphenols as preventive agents for cardiovascular diseases, a lot of epidemiological, *in vitro* and *in vivo* studies have confirmed their capacity to improve recovery of heart after infarction (Akhlaghi and Bandy 2009). It has been reported that chlorogenic acid, which was previously identified in high concentration in *G. verum* extract, led to a better myocardial contractility response in a model of ischemic hearts (Kanno *et al.* 2013, Mocan *et al.* 2016). These biomolecule, as well as other polyphenols found in smaller quantity in *G. verum* extract, may activate endothelial nitric oxide synthase and consequently enhance NO synthesis and release. Increased NO simultaneously with diminished ROS levels may be one of possible explanation for preserved coronary vasodilatory response in a group treated with *G. verum* extract. On the contrary, if there is high level of ROS, increased NO production will result in the formation of peroxynitrite, that is, in oxidative/nitrative tissue injury, which would further damage heart (Wang *et al.* 2011, Duarte *et al.* 2014). Taking into consideration results of previously published studies related to the role of different phenols on functional properties of heart, we may speculate that effects of *G. verum* extract are attributed to the additive and synergistic effects of all present phenols.

In the second part of present investigation, we aimed to estimate whether effects of *G. verum* extract are mediated via change in antioxidant capacity and generation of pro-oxidants. Under normal physiological conditions, there is a balance between continuously produced pro-oxidants and antioxidant system that counterbalances the effects of oxidants (Birben *et al.* 2012). Nevertheless, it has been proposed that re-introduction of oxygen during early phase of reperfusion induces oxygen generation, leading to a destruction of proteins, nucleic acids, carbohydrates, lipids, and finally cell death (Kalogeris *et al.* 2012).

Analysis of pro-oxidants in the coronary venous effluent refers to the oxidative stress in the endocardium of the left ventricle and endothelium of the coronary circulation. Our results illustrated that I/R injury was related to increased oxidative stress, as evidenced by markedly higher TBARS,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{O}_2^-$ , and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in coronary venous effluent at the end of

reperfusion compared to stabilisation, while *G. verum* pretreatment led to the decrease of  $\text{O}_2^-$ . Additionally, *G. verum* extract prevented ischemia-induced lipid peroxidation in heart tissue, thus maintaining membrane integrity.

Regarding the components of antioxidant defence system, myocardial SOD and CAT activity were higher in *G. verum* group, while the level of GSH was similar between groups. Enhanced CAT activity may be an explanation for the absence of rise in  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in *G. verum* pretreated group, since this enzyme catalyses the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen. Furthermore increased activity of SOD, a major component of antioxidant defence systems against  $\text{O}_2^-$ , is supported by a decline in  $\text{O}_2^-$  that we detected. It may be hypothesised that unaltered coronary vasodilatory response accompanied with a drop in  $\text{O}_2^-$  may be a consequence of interaction between increased NO responsible for regulation of CF with the overproduced  $\text{O}_2^-$ , resulting in the generation of toxic peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Polyphenols, including flavonoids, are renowned for great antioxidant potential, which enables them to scavenge suddenly generated ROS during restoration of flow. Furthermore, polyphenols activate endogenous antioxidant defence system, particularly SOD and CAT, resulting in attenuation of oxidative stress-induced tissue damage (Mattera *et al.* 2017). As a consequence, the structural and functional integrity of cardiomyocytes is maintained. Moreover, it has been proved that mechanisms through which polyphenols protect myocardium from oxidative damage involve preservation of mitochondrial function, inhibition of xanthine oxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH) oxidase, as well as chelation of iron ions which catalyse several free radical-generating reactions (Debnath *et al.* 2014). Impact on transcription-mediated signaling is responsible for the long-lasting antioxidative effects of these natural molecules (Mattera *et al.* 2017). Generally viewed, observed effects of *G. verum* extract on cardiac redox status are probably consequence of additive and synergistic antioxidant activities of all present bioactive natural compounds.

Histological analyses indicate that ischemia altered structure of the heart, which could be partially alleviated with *G. verum* pretreatment. *G. verum* consumption prevented loss of nucleus and transverse striation of myocardial muscle fibers, which were prominent in the control hearts. Within first minutes of flow restoration "contraction band necrosis" may occur, which was found in hearts underwent I/R, while in the

experimental group this phenomenon was not present (Kalogeris *et al.* 2016). Additionally, pronounced vacuolation of cells in the control group may be a consequence of acting free radicals. Results of morphological analysis are in accordance with measured cardiodynamic parameters, thus suggesting that *G. verum* has the potential to preserve both function and structure of the heart under ischemic conditions.

Our study demonstrates for the first time that *G. verum* extract preserved cardiac contractile function, systolic and diastolic function and alleviated the deterioration of coronary circulation after ischemia. Additionally *G. verum* consumption prevented the structural damage of the heart. Furthermore, *G. verum* tended to modulate the activity of myocardial antioxidant enzymes and decrease the generation of pro-oxidants, thus mitigating oxidative stress-induced heart dysfunction. Promising potential of *G. verum* in the present study in a model of pharmacological preconditioning may be a starting point for further researches which would fully clarify its effects on cardiac function and redox status in various models of I/R injury. Additionally, studies oriented on isolation and characterisation of the antioxidants present in *G. verum* extract are certainly necessary for better understanding the mechanisms through which this plant species triggers cardioprotection.

## Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Funding

The authors would like to express gratitude to the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for Grant No. JP 06/17.

## ORCID

Jovana Bradic  <http://orcid.org/0000-0001-5388-6085>  
 Nevena Jeremic  <http://orcid.org/0000-0002-5284-8180>  
 Ivan Srejovic  <http://orcid.org/0000-0002-3835-1856>

## References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Akhlaghi, M., and Bandy, B., 2009. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46 (3), 309–317.
- Auclair, C., and Voisin, E., 1985. Nitroblue tetrazolium reduction. In: R.A. Greenvald, ed. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, FL: CRC Press, 123–132.
- Barteková, M., *et al.*, 2010. Acute treatment with polyphenol quercetin improves postischemic recovery of isolated perfused rat hearts after global ischemia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88 (4), 465–471.
- Beutler, E., 1984. Superoxide dismutase. In: E. Beutler, ed. *Red cell metabolism a manual of biochemical methods*. Philadelphia, PA: Grune & Stratton, 83–85.
- Beutler, E., Duron, O., and Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882–888.
- Birben, E., *et al.*, 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5 (1), 9–19.
- Brighente, I.M.C., *et al.*, 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, 45 (2), 156–161.
- Debnath, J., and Nath, L. K., 2014. A review on pathophysiology of ischemic-reperfusion injury of heart and ameliorating role of flavonoids and polyphenols. *Journal of medicinal plants research*, 8, 607–614.
- Demirezer, L.O., *et al.*, 2006. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *Verum*. *Turkish journal of chemistry*, 30, 525–534.
- Duarte, J., Francisco, V., and Perez-Vizcaino, F., 2014. Modulation of nitric oxide by flavonoids. *Food & function*, 5 (8), 1653–1668.
- Green, L.C., *et al.*, 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, 126 (1), 131–138.
- Hijazi, A., *et al.*, 2015. Effect of different ethanol concentrations, using different extraction techniques, on the antioxidant capacity of Lebanese *Eryngium creticum*. *Journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences*, 3, 262–271.
- Kalogeris, T., *et al.*, 2012. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology*, 298, 229–317.
- Kalogeris, T., *et al.*, 2016. Ischemia/reperfusion. *Comprehensive physiology*, 7 (1), 113–170.
- Kanno, Y., *et al.*, 2013. Chlorogenic acid attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *International heart journal*, 54 (3), 176–180.
- Lakić, N., *et al.*, 2010. Antioxidant properties of *Galium verum* L. (Rubiaceae) extracts. *Central European journal of biology*, 5, 331–337.
- Li, W., *et al.*, 2015. Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats. *Experimental and therapeutic medicine*, 10 (6), 2197–2205.
- Mattera, R., *et al.*, 2017. Effects of polyphenols on oxidative stress-mediated injury in cardiomyocytes. *Nutrients*, 9 (5). doi:10.3390/nu9050523
- Milic, P., *et al.*, 2013. Antioxidant activity of *Galium mollugo* L. extracts obtained by different recovery techniques. *Hemijaska Industrija*, 67 (1), 89–94.
- Mocan, A., *et al.*, 2016. Phytochemical investigations on four *Galium* species (Rubiaceae) from Romania. *Farmacia*, 64, 95–99.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95 (2), 351–358.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., and Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
- Pick, E., and Keisari, Y., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of immunological methods*, 38 (1–2), 161–170.
- Singleton, V., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152–175.
- Vlase, L., Mocan, A., and Hanganu, D., 2014. Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four *Galium* species (Rubiaceae). *Digest journal of nanomaterials and biostructures*, 9, 1085–1094.
- Wang, C.Z., *et al.*, 2011. Botanical flavonoids on coronary heart disease. *The American journal of Chinese medicine*, 39 (4), 661–671.
- Xia, Z., Li, H., and Irwin, M.G., 2016. Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans. *British journal of anaesthesia*, 117, ii44–ii62.
- Zhang, Y., 2016. Total flavonoid extract from *Coreopsis tinctoria* Nutt. protects rats against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Iranian journal of basic medical sciences*, 19, 1016–1023.

## An evaluation of the redox state in professional scuba divers

Radmila Radojevic-Popovic<sup>1</sup>, Vladimir Zivkovic<sup>2</sup>, Nevena Jeremic<sup>3</sup>, Jasmina Sretenovic<sup>2</sup>, Nevena Velicanin<sup>2</sup>, Jovana Bradic<sup>2</sup>, Vladimir Jakovljevic<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Special Hospital for Hyperbaric Medicine, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

CORRESPONDING AUTHOR: Prof. Vladimir Lj. Jakovljevic, M.D., Ph.D. – [drvladakbg@yahoo.com](mailto:drvladakbg@yahoo.com)

---

### ABSTRACT

Taking into consideration limited data regarding molecular interactions during and after diving, this investigation was intended to determine the oxidative status of divers before and after scuba diving by monitoring the oxidative status parameters. The prevalence study included a group of 32 male professional police scuba divers,  $32 \pm 5.1$  years old. The examination took place twice: in a resting state before scuba diving and immediately after the dive (to 30 meters for 30 minutes). The oxidative status of the scuba divers was determined by measuring levels of the following oxi-

dativ stress markers: the index of lipid peroxidation (measured as TBARS), nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Statistically significant increases in levels of  $\text{NO}_2^-$  and TBARS were observed after the dive, while there were no statistically relevant changes in levels of  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , SOD and CAT. Our results have shown that a dive with these characteristics only slightly disturbs redox homeostasis, without serious intermolecular changes that can lead to prominent oxidative stress.

---

### INTRODUCTION

Since the development of self-contained underwater breathing apparatus (scuba) in the 1940s, millions of people have been involved in diving for both professional and recreational purposes [1]. Sport or recreational scuba diving refers to diving to a depth of not more than 40 meters, using only compressed air or nitrox (a mixture of nitrogen and oxygen) with no more than 40% oxygen as a breathing gas, and having direct vertical access to the surface, without a decompression stop.

Technical scuba diving usually requires a mandatory decompression stop upon surfacing and/or the use of multiple gas mixtures such as trimix (a mixture of nitrogen, oxygen and helium), heliox (a mixture of helium and oxygen) or nitrox (a mixture of nitrogen and oxygen) as breathing media [2].

Recreational diving is a popular sport, although the human ability to stay in and under water is severely limited physiologically [3]. It exposes individuals to

environmental stresses such as increased ambient pressure, a raised partial pressure of oxygen ( $\text{O}_2$ ), increased resistance to movement, added weight and the drag of diving equipment, cold stress, and a higher breathing resistance [4]. The safety of scuba diving has been greatly improved through the development of better equipment and diving procedures [5].

Hyperoxia and hyperbaria during scuba diving could increase reactive oxygen species (ROS) production and thereby induce oxidative stress [6]. Oxidative stress, defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses [7], play an important role in many physiological and pathological conditions [8].

Literature data have shown that scuba diving can induce an antioxidant response in plasma and erythrocytes by increasing the erythrocytes' glutathione peroxidase activity (GPx), plasma superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities [8,9].

---

KEYWORDS: sports medicine, scuba diving, professional scuba divers, oxidative stress, free radicals, tests

Some studies found that plasma malondialdehyde (MDA) levels, as markers of cellular damage, remained unchanged after a diving session [5,8], while another study revealed an increase in its levels [9]. Data on the effects of scuba diving on lipid peroxidation are also controversial. It was reported that scuba diving led to a significant increase in the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [10]. However, in another investigation, scuba diving did not induce an increase of lipid peroxidation [11]. Hyperoxia associated with scuba diving leads to increased lymphocyte hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production, nitric oxide ( $\bullet NO$ ) synthesis and anti-oxidant enzyme adaptations [12].

Given the fact that most of our limited knowledge regarding the connection between scuba diving and oxidative stress was gathered from volunteers, the aim of this study was to evaluate the influence of scuba diving on oxidative status markers in healthy male professional police scuba divers.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

The prevalence study included 32 professional police divers during the training process – the dive training at sea. All examinees were male,  $32 \pm 5.1$  years old, well trained, with diving experience of a minimum of three to a maximum of 18 years. During their diving service, participants have all been subjected to regular annual medical check-ups by a specialist. During this study, divers had no signs of any acute or chronic disease. They had valid medical documentation that proves they are able to perform the duties of professional divers. All subjects were non-smokers with normal values of arterial blood pressure, echocardiogram, ECG, EEG, and spirometry, with regular values of fat and sugar in the blood. All divers received an explanation of the study's purposes, risks and benefits and were familiarized with the study's protocol. All gave written consent. The study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac.

### Diving protocol

Testing was performed at the seaside, during a dive training of professional police divers held in May. All divers were dressed in neoprene drysuits and were

equipped with open-circuit scuba diving apparatus. The primary cylinders were 18-liter bottles, filled with compressed air, with an average pressure of 205 bars. The morning medical examination was conducted before the dive and included auscultatory findings from the lungs and measurements of blood pressure and pulse.

After arriving at the location, each diving pair made a dive to the specified depth. Each set of divers launched every five minutes. The specified depth was 30 meters, controlled with either a Suunto and Mares dive computer, and specified duration of the dive was 30 minutes. During the dive, divers were instructed to moderate their loads. The descent was at 10 meters/minute and the ascent was 9 meters/minute, with a three-minute decompression/safety stop at a depth of 3 meters. All 32 divers completed the dive successfully, without any sign of decompression sickness. Average air consumption was 56 liters (L) per minute. Air temperature during the examination was  $23^\circ C$ , and sea temperature was  $15^\circ C$  to  $19^\circ C$ .

### Sample collection protocol

Immediately before and after the dive, blood samples were taken from the divers in order to determine levels of pro-oxidant markers: superoxide anion radical ( $O_2^{\bullet -}$ ),  $H_2O_2$ , nitrites ( $NO_2^-$ ) and TBARS, as well as antioxidant enzymes activity (SOD and CAT). Four weeks prior to blood sampling, the divers were instructed to refrain from any vitamin or antioxidant dietary supplementation. None of the participants reported any eating disorders, had any ongoing or previous (last half-year) injuries, and were not on any medication known to affect oxidative stress. To exclude the influence of different dietary intakes on nitrite level, all participants were on the same dietary protocol for three days before the study and during the study.

### Biochemical assays

Blood samples were taken from antecubital veins into Vacutainer test tubes containing sodium citrate anticoagulant. Blood samples were processed and stored immediately. Blood was centrifuged to separate plasma and red blood cells (RBCs). Biochemical parameters were measured spectrophotometrically.



***Index of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) determination***

The level of lipid peroxidation was determined indirectly via products of lipid peroxidation reaction with thiobarbituric acid (TBA) – thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). This method is based on determination of the level of one of the lipid peroxides (malondialdehyde, or MDA) with thiobarbituric acid [13]. Extract was obtained by combining 400 µl of 28% trichloroacetic acid (TCA) and 800 µl of plasma, and then incubated in a cold-water jacket (-4°C) for 10 minutes. After incubation, the samples were centrifuged at 15,000 RPMs for four minutes to form a supernatant. 800 µl of plasma extract and 200 µl of 1% TBA were combined and incubated in a water jacket at 100°C for 15 minutes. Distilled water was used as a blank probe. Measuring was performed at  $\lambda=530$  nm. The concentration of released TBARS was calculated using the following equation:

$$\text{nmol TBARS/ml plasma} = \Delta A (A_s - A_{bp}) / 1.56 \times 1.25$$

$A_s$  = absorbance of sample;

$A_{bp}$  = absorbance of blank probe;

1.56, 1.25 – correction factors for this assay.

***Nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) determination***

Nitric oxide (•NO) decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. Considering that •NO in reaction with molecular oxygen forms equimolar amount of nitrites (•NO + ½O<sub>2</sub> → NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), we can assert with great certainty that the amount of released nitrites represent the amount of released •NO. The method for detection of the plasma nitrite levels is based on the Griess reaction. Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) was determined as an index of •NO production with Griess reagent (forms purple diazo complex) [14]. Griess reagent was prepared *ex tempore* just before the experiment by mixing equal amounts of stocks: 1% (weight/volume) sulfanilamide dissolved in 5% hydrochloric acid (HCl) and 0.1% (w/v) aqueous solution of N-1-naphthyl-ethylenediamine-dihydrochloride (N-NEDA). Extraction was obtained by combining 100 µl of 3M PCA (perchloric acid), 400 µl of 20 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and 200 µl of plasma, put on ice for 15 minutes, and then centrifuged for 15 minutes at 6000 RPMs. After pouring off the supernatant, 220 µl potassium carbonate (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) was added to

set pH at 7.4. 200 µl of plasma extract (previously described), 250 µl of Griess reagent, and ammonium buffer (pH=9) (containing ammonium chloride – NH<sub>4</sub>Cl – and sodium tetraborate – Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) were then combined in order to stabilize the diazo complex. As a blank probe, an adequate amount of distilled water was used. The concentration of released nitrites was calculated using the calibration curve.

The calibration curve was constructed from extinction samples (which consist of a specific concentration of nitrites after their reaction with the Griess reagent and in the presence of an ammonium buffer). For that purpose, different amounts of 1 mM sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) (3, 6, 12, 24 µl) in 1 ml of distilled water was used. After color stabilization at room temperature (five to 10 minutes), measuring was performed at  $\lambda=550$  nm. The concentration and amount of released nitrites was calculated via determination of a standard factor (F):

$$\text{extinction of blank probe} / \text{concentration of NaNO}_2 \text{ in standard}$$

For each standard (F1-F4), mean was calculated:

$$\text{nmol NO}_2^-/\text{ml extract} = \Delta E (E_s - E_{bp})/F$$

***Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) determination***

Determination of superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) concentration is based on reaction of O<sub>2</sub><sup>-•</sup> with nitroblue tetrazolium (NBT) and forms nitroblue formazan [15]. Maximum absorption for measuring was  $\lambda_{max} = 550$  nm. Assay mixture consisted of 50 mM of Tris-HCl buffer (pH=8.6), 0.1 mM of EDTA, 0.1 mg/ml of gelatin and 0.1 mM of NBT. Before use, the solution needs to be gassed with nitrogen (under pressure) for 60 minutes. 50 µl of plasma and 950 µl of assay mixture were combined. For the blank probe, an adequate volume of distilled water was used. At the beginning of the reaction, extinction of mixture was measured and noted as E1. Mixing was performed (with plastic stick) every 60 seconds, and extinction was noted after mixing until it was stable, which considers two consecutive extinctions of the same approximate size. The last extinction was noted as E2. The same procedure was applied for measuring the blank probe. The concentration of released O<sub>2</sub><sup>-•</sup> was calculated using the following equation:

$$\begin{aligned} \Delta E_s &= E_{2s} - E_{1s} \text{ (for sample)} \\ \Delta E_{bp} &= E_{2bp} - E_{1bp} \text{ (for blank probe)} \\ \Delta E &= \Delta E_s - \Delta E_{bp} \\ \text{nmol } O_2^{\cdot-} / \text{ml plasma} &= \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05 \end{aligned}$$

### Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) determination

Determination of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) concentration is based on oxidation of phenol red using hydrogen peroxide, in reaction catalyzed by the enzyme peroxidase from horseradish (HRPO) [16]. This reaction results in the formation of a compound with the maximum absorption of  $\lambda_{\text{max}} = 610$  nm. The linear dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration absorbance on 610 nm is stable for 1-60 mM of ratio concentration (1-60 nmol/ml). 200 ml of plasma and 800 ml of freshly prepared phenol red solution (PRS) consisting of 140 mM NaCl, 10 mM potassium phosphate buffer (pH=7), 5.5 mM D(+) glucose and 0.28 mM phenol red were combined. After that, 10 ml (1:20) HRPO (made ex tempore) was added. Samples were left at room temperature for 10 minutes, and pH was adjusted to >12 using 1M sodium hydroxide (NaOH). Distilled water was used as a blank probe. The concentration of released H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in venous blood was calculated using a calibration diagram (standard curve) for each assay. For constructing a standard curve (cuv), a standard (stock) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution was used, after checking concentration (for 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, A<sub>230</sub> = 0.810). Then 5, 10 and 20 ml of 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution were combined (instead of plasma) with 200  $\mu$ l of distilled water, 800  $\mu$ l of phenol red solution and 10 ml of (1:20) HRPO. Samples were kept at room temperature for 10 minutes and pH-adjusted >12 by using 1M NaOH (10 ml).

For calculating concentration and volume of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the following formula was used:

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml plasma} = \Delta A / F$$

On the basis of the sample absorbance (A<sub>s</sub>) and comparing it with the blank probe (A<sub>bp</sub>), final absorbance was calculated ( $\Delta A$ ) ( $A = A_s - A_{bp}$ ).

F (factor of absorbance) =  $\Delta A / \text{nmol } H_2O_2 / \text{cuv}$

### Determination of activities of antioxidant enzymes

Hemoglobin determination, necessary for the calculation of activity of endogenous antioxidants, was performed according to the Drabkin method [17].

The determination of superoxide dismutase (SOD) activity is based on the epinephrine method. This method belongs to the "negative" type group of methods, since it monitors the decrease of auto-oxidation speed in an alkaline medium, which is dependent on O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [18]. SOD removes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and thus inhibits auto-oxidation of epinephrine. The speed of epinephrine auto-oxidation is detectable spectrophotometrically via changing the absorbance on 480 nm. The accumulation of epinephrine induces increase of absorbance on 480 nm. The percentage of inhibition was used as a unit for measuring the catalytic activity of this enzyme. The speed of epinephrine auto-oxidation in the absence of SOD represents reference (control), while the speed of epinephrine auto-oxidation in the presence of SOD (i.e., protein in cytosol) represents part of the referent values. In 3.2 ml of a reaction assay containing a 3-ml carbonate buffer (pH = 12) and 0.1 ml of epinephrine solution, 0.01 ml of supernatant was added. Auto-oxidation of epinephrine was monitored for four minutes at  $\lambda = 480$  nm. Reaction was stable at the temperature ratio 26°C to 30°C. Control reaction was simultaneously performed. For calculating SOD activity, the percentage of epinephrine auto-oxidation inhibition in the presence of SOD from the sample vs. the control reaction was used [19]. The amount of SOD was expressed in units of SOD activity per gram of Hb (unit/gHb). This unit was defined as the volume of proteins that induces 50% of epinephrine auto-oxidation speed inhibition in the linear part of the absorption increase. The concentration of SOD activity was calculated using the following equation:

$$\text{SOD-I} = 2(\Delta K - \Delta A) \times R / V \times Hb \times \Delta K$$

$\Delta K$  – change of control reaction absorption per minute

$\Delta A$  – change of sample reaction absorption per minute

V – sample volume (ml)

Hb – amount of hemoglobin (g/100ml lysate)

R – dilution

Determination of catalase activity in the sonificate is based on the method by Beutler [20]. Lysates were diluted with distilled water (1:7 volume/volume) and treated with chloroform-ethanol (0.6 : 1 v/v) to remove hemoglobin [21]. Then 50  $\mu$ L of the catalase buffer, 100  $\mu$ L of the sample, and 1 mL of 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were mixed. The decrease of absorbance was monitored spectrophotometrically at 230 nm, for three minutes.

**Table 1. Values of oxidative stress parameters before and after the dive**

parameter (mean ± SD)	before dive	after dive	before vs. after dive
TBARS (µmol/ml plasma)	4.27 ± 3.46	5.66 ± 3.08	**
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml plasma)	10.10 ± 4.27	21.45 ± 9.99	**
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml plasma)	8.25 ± 4.99	14.40 ± 11.48	p>0.05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml plasma)	4.46 ± 2.93	5.51 ± 3.56	p>0.05
CAT (U/g Hb x 10 <sup>3</sup> )	5.21 ± 2.38	6.39 ± 3.25	p>0.05
SOD (U/g Hb x 10 <sup>3</sup> )	1416.26 ± 334.15	1275.91 ± 378.51	p>0.05

\*\* statistical significance at the level of  $p < 0.01$ .

The CAT activity was expressed in unit/mg protein, and this unit was defined as the amount of reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µM per minute). For calculation, the following equation was used:

$$CAT = \Delta A \times R / 0.71 \times Low \times V$$

ΔA – change of absorbance per minute

R – dilution

V – sample of volume (ml)

Low – amount of protein (mg/ml by sonification)

### Statistical analysis

The statistical analysis was performed using SPSS 19.0 for Windows. The results are expressed as means ± standard deviation of the mean (SD). Data distribution was checked with the Shapiro-Wilk test and depending on its results, the appropriate parametric or non-parametric test was used. The differences between the values of means from two related samples (before and after the dive) were assessed by Wilcoxon's test, while the difference between two unrelated samples (characteristics of exercises protocol) was assessed by t-test. The alpha level for significance was set to  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### TBARS values

The values of TBARS were statistically increased after diving compared to the baseline conditions (before diving), ( $p < 0.01$ ) (Table 1).

### NO<sub>2</sub><sup>-</sup> values

The values of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> were also significantly increased after diving compared to the baseline conditions (before diving), ( $p < 0.01$ ) (Table 1).

### O<sub>2</sub><sup>-</sup> values

The values of O<sub>2</sub><sup>-</sup> were not statistically changed after diving. ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> values

The values of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were not significantly changed after diving (Table 1).

### Values of antioxidative enzymes, CAT and SOD

The values of both antioxidative enzymes, CAT and SOD, were not statistically changed after diving compared with before diving ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

## DISCUSSION

Scuba diving differs from other physical activities due to different environmental conditions such as increased ambient pressure, increased resistance to movement, the elevated partial pressure of oxygen, added weight and drag of diving equipment, cold water temperatures and higher breathing resistance [4]. Intensified physical activity, hyperoxia and exposure to cold temperatures during scuba diving can lead to the increased production of free radicals [12].

In that sense, the present study was aimed to determine the redox state of professional police scuba divers during immersion at a depth of 30 meters for a duration of 30 minutes. All estimated parameters were measured before and immediately after the diving session. In the case of pro-oxidative markers, our results showed that values of TBARS and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> were statistically increased after diving compared to baseline conditions (before diving), while values of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remained unchanged (Table 1). However, it is important to emphasize the short half-life of these parameters (except

TBARS) which could affect interpretation of results and comparison with findings of other investigations. Unfortunately, there are lack of studies dealing with this topic.

Most of these studies were performed by Sureda and his group. During one investigation, nine male divers performed a dive to a depth of 50 meters for a total time of 35 minutes. Blood samples were obtained at rest, after the dive, and three hours after the dive session [5]. Among other markers, they measured nitrites and found increased protein nitrotyrosine levels after diving and during recovery [5]. Further, neutrophil nitrite values (as indicative of inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity) progressively increased after diving and recovery [5]. Compared with our study, their methodology for assessment of nitrite metabolism was more complex and thus more precise: namely, nitrotyrosine levels were measured by using high-performance liquid chromatography (HPLC) while neutrophil activity (for nitrite production) through an MTT assay. Although methodologies were different, findings of both studies support the hypothesis that scuba diving induces nitrosative damage with elevation of nitrite levels.

Having in mind the fact that ROS have extremely short half-lives, they are difficult to measure directly. Instead, what can be measured are several products of the damage produced by oxidative stress, such as TBARS [22]. TBARS assay values are usually reported in malondialdehyde (MDA) equivalents, a compound that results from the decomposition of polyunsaturated fatty acid lipid peroxides. The TBARS assay is a well-recognized, established method for quantifying these lipid peroxides, although it has been criticized for its reactivity toward compounds other than MDA [22].

Another study from the previously mentioned investigation group has shown a rise in MDA levels after the dive [9]. The dive was performed again at a depth of 50 meters for a total time of 35 minutes, while the values of MDA were measured by using the HPLC method. In the present study, the index of lipid peroxidation (measured as TBARS) was also significantly increased after immersion (Table 1). It is well known that HPLC often provides the advantages of higher specificity and higher sensitivity when compared to other available methods [23], such as spectrophotometric assays, which have been used in this study.

Nevertheless, it is obvious that in both cases diving induces an increase in levels of markers describing the destruction of lipid membranes, which is associated with and may be consequence of enhanced nitrite production (nitrosative stress) [6,24].

As previously mentioned, in our study diving did not affect  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  values (Table 1). Still, these results should be considered with caution, having in mind that assays for these ROS generated in biological systems is a difficult task because of the high reactivity and short half-life of  $O_2^{\cdot-}$  [25,26]. Unchanged values of  $O_2^{\cdot-}$  may be associated with an increased release of  $NO_2$ , taking into consideration that these two molecules strongly interact in situations of  $O_2^{\cdot-}$  overproduction, which leads to decreased bioavailability of NO [27]. In the case of  $H_2O_2$ , Ferrer and co-authors [12] examined the effects of a single scuba diving episode, at a depth of 40 meters for 25 minutes, on lymphocyte  $H_2O_2$  production and showed an increased level of this ROS [12]. However, they used an MTT assay for measuring this marker. With respect to this fact, it is clear that this methodology provides more relevant data about the  $H_2O_2$  concentration, and that our results may not with certainty serve for estimation of oxidative damages by this ROS.

On the other hand, it could also be expected that during a dive, the functioning of the antioxidative enzymatic system may be changed. Thus, we investigated the activity of two major antioxidative enzymes, CAT and SOD, in order to create the most complete picture of the divers' redox state. SOD catalyzes dismutation of the  $O_2^{\cdot-}$  to  $H_2O_2$  and thus can serve for better interpretation of results regarding  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  [28]. Our results have shown that, compared to control conditions, SOD remained unchanged after the dive (Table 1). A recent study investigated the effects of a long-term dive (living in an underwater habitat for the duration of 12 days) on SOD and found decreased activity of this enzyme at the end of dive and seven days after the dive [29]. The SOD was measured spectrophotometrically, similar to our study. However, this investigation had other protocols (prolonged time of dive and habitat located 19 meters below the ocean surface), which could provide an explanation for differences in results when compared to the present study. Based on the findings of our study and others, it seems that during a long period

of diving, the antioxidant capacity can be exhausted, thus allowing the occurrence of oxidative stress.

On the other hand, CAT decomposes  $H_2O_2$  to  $H_2O$  and  $O_2$  [30]. Similar to SOD there were no changes in activity of this enzyme after the dive (Table 1). Unchanged activity of both antioxidative enzymes (SOD and CAT) could confirm  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  dynamics in our investigation. Taking into account that the present study involved professional divers, we can assume that, due to frequent dives, their antioxidant systems had adjusted already, and thus new immersions did not lead to significant changes in these markers. Sureda and his group have carried out another investigation with a similar design [31]. Namely, divers were immersed at a depth of 40 meters for a total time of 25 minutes; blood samples were obtained after overnight fasting before beginning the dive session, immediately after diving and three hours after the

dive session. They found a rise in CAT activity immediately after diving, with a return to basal values after recovery.

Our results indicate that dives up to 30 meters cause only initial damage of the membrane lipids, while production of harmful ROS, such as  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  remains relatively unaffected. In addition, antioxidative-protecting enzymes (CAT and SOD) remained unchanged. Based on this, it seems that dives with these characteristics (30 meters for a total time of 30 minutes) only slightly disturbs redox homeostasis, without serious intermolecular changes that can lead to prominent oxidative stress and finally reduce the physical performance and recovery of professional scuba divers.

#### Conflict of interest

The authors report no conflict of interest with this submission. ■

---

#### REFERENCES

1. Eftedal I, Ljubkovic M, Flatberg A, Jørgensen A, Brubakk AO, Dujic Z. Acute and potentially persistent effects of scuba diving on the blood transcriptome of experienced divers. *Physiol Genomics* 2013; 45:965-972.
2. Perovic A, Unic A, Dumic J. Recreational scuba diving: negative or positive effects of oxidative and cardiovascular stress? *Biochem Med* 2014; 24:235-247.
3. Lin YC. Applied physiology of diving. *Sports Med* 1988; 5:41-56.
4. Doubt TJ. Cardiovascular and thermal responses to SCUBA diving. *Med Sci Sports Exerc* 1996; 28:581-586.
5. Sureda A, Batle JM, Capó X, Martorell M, Córdova A, Tur JA, Pons A. Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils. *Physiol Genomics* 2014; 46:647-654.
6. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49:3-8.
7. Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 1999; 29:49-55.
8. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int* 2014; 2014: article ID 761264.
9. Sureda A, Batle JM, Ferrer MD, Mestre-Alfaro A, Tur JA, Pons A. Scuba diving activates vascular antioxidant system. *Int J Sports Med* 2012; 33:531-536.
10. Obad A, Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Modun D, Boban M et al. Successive deep dives impair endothelial function and enhance oxidative stress in man. *Clin Physiol Funct Imaging* 2010; 30:432-438.
11. Vince RV, McNaughton LR, Taylor L, Midgley AW, Laden G, Madden LA. Release of VCAM-1 associated endothelial microparticles following simulated SCUBA dives. *Eur J Appl Physiol* 2009; 105:507-513.
12. Ferrer MD, Sureda A, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Radic Res* 2007; 41:274-281.
13. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-358.
14. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.
15. Auclair C, Voisin E. Nitrobluetetrazolium reduction. In: Greenwald RA, ed. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton; CRP Press 1985; 123-132.

16. Pick E, Keisari Y. A simple colometric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161-170.
17. Drabkin D, Austin H. Spectrophotometric studies II. Preparations from washed blood cells: nitric oxide, hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem* 1935;112:51-65.
18. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
19. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244(22):6049-6055.
20. Beutler E. Catalase. In: Butler E, ed. *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton; 1982:105-106.
21. Tsuchihashi M. Zur Kenntnis der blutkatalase. *Biochem Zeits* 1923; (140): 65-72.
22. Pryor WA. The antioxidant nutrients and disease prevention--what do we know and what do we need to find out? *Am J Clin Nutr* 1991; 53:391S-393S.
23. Winnik WM, Kitchin KT. Measurement of oxidative stress parameters using liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS). *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233:100-106.
24. Grattagliano I, Calamita G, Cocco T, Wang DQ, Portincasa P. Pathogenic role of oxidative and nitrosative stress in primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20:5746-5759.
25. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 2007;43: 477-503.
26. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15: 786-801.
27. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262:10098-10103.
28. González RR, Puchades MJ, García RR, Saez G, Tormos MC, Miguel A. Effect of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Nefrol* 2006;26: 218-225.
29. Zwart SR, Kala G, Smith SM. Body iron stores and oxidative damage in humans increased during and after a 10- to 12-day undersea dive. *J Nutr.* 2009; 139:90-95.
30. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:192-208.
31. Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc* 2009; 4:1271-1276.

