

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Srđan J. Sokanović

**MEHANIZMI UKLJUČENI U
REGULACIJU SMANJENE ENDOKRINE
FUNKCIJE LAJDIGOVIH ĆELIJA
TOKOM STARENJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Srđan J. Sokanovic

**THE MECHANISMS INVOLVED IN THE
REGULATION OF IMPAIRED LEYDIG
CELLS ENDOCRINE FUNCTION
DURING AGING**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTORI:

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

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

KOMISIJA:

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

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

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

Datum odbrane.....

SPISAK RADOVA U KOJIMA JE PRIKAZAN DEO REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE

1. Sokanovic SJ, Baburski AZ, Janjic MM, Stojkov NJ, Bjelic MM, Lalošević D, Andric SA, Stojilkovic SS, Kostic TS (2013): The opposing roles of nitric oxide and cGMP in the age-associated decline in the rat testicular steroidogenesis. *Endocrinology*. 154(10):3914-24. doi: 10.1210/en.2013-1307.
2. Sokanovic SJ, Janic MM, Stojkov NJ, Baburski AZ, Bjelic MM, Andric SA, Kostic TS (2014): Age related changes of cAMP and MAPK signaling in Leydig cells of Wistar rats. *Exp. Gerontol*. 58:19-29. doi: 10.1016/j.exger.2014.07.004.

Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr Tatjani Kostić na ukazanom poverenja, razumevanja i celokupnom angažovanju kojim je omogućila realizaciju ove doktorske disertacije.

Puno hvala mojim kolegama i prijateljima, bivšim i sadašnjim članovima LaRES i ENDOS. Puno hvala Marici, Olji i svim zaposlenim na Departmana za biologiju i ekologiju u Novom Sadu.

Hvala Stanku Stojilkoviću za svu pomoć pruženu tokom izrade ove doktorske disertacije.

Hvala dr Jasnić Nebojši za svu pomoć pruženu prilikom realizacije nastavnog dela doktorskih studija kao i za sve savete i sugestije pružene tokom pisanja teze.

Hvala porodici i prijateljima na podršci i razumevanju.

Sokanović Srđan

MEHANIZMI UKLJUČENI U REGULACIJU SMANJENE ENDOKRINE FUNKCIJE LAJDIGOVIH ĆELIJA TOKOM STARENJA

SAŽETAK

Reproduktivno starenje muškaraca razvija se uporedo sa starenjem organizma, a manifestuje se značajnim promenama u funkciji endokrinog sistema i smanjenim fekunditetom. U kontekstu izmenjene funkcionalnosti endokrinog sistema ističe se smanjen nivo testosterona koji zajedno sa brojnim psiho-fizičkim promenama smanjuje kvalitet života jedinke. Konstantno produženje životnog veka i potencijalno neželjena dejstva zamenske terapije androgenima usmeravaju buduća istraživanja ka boljem razumevanju molekularnih osnova muškog hipogonadizma i pospešivanju endogene produkcije androgena u starijem životnom dobu muškaraca. U skladu sa iznetim činjenicama i usmerenjima postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja: 1. Karakterizacija staračkog hipogonadizma kod pacova soja *Wistar* kao modela za istraživanje reproduktivnog starenja; 2. Ispitivanje udela promena cAMP- i cGMP-signalizacije u formiranju starog fenotipa L_c.

Najvažnijim rezultatima ustanovljeno je da starenje *Wistar* pacova prati pojava primarnog hipogonadizma koji je iskazan smanjenom produkcijom testosterona i smanjenim eksprimiranjem steroidogenih gena i proteina od dvanaestog meseca. Zajedno sa smanjenim androgenim kapacitetom poremećena je i cAMP, MAPK i NO-cGMP signalizacija kao i energetska homeostaza u L_c starog fenotipa. Tokom istraživanja ustanovljeno je da smanjen nivo cAMP nije jedini uzročnik smanjenog androgenog kapaciteta, a akutna i hronična inhibicija PDE5 povećava steroidogeni kapacitet i normalizuje energetska homeostazu u L_c starog fenotipa. Takođe je ustanovljeno da cAMP i cGMP različito regulišu energetska homeostazu L_c, pri čemu cGMP normalizuje parametre funkcionalnosti mitohondrija i eksprimiranje regulatora energetske homeostaze.

Ključne reči: Starenje, hipogonadizam, Lajdigove ćelije steroidogeneza, cAMP, MAPK, NO-cGMP, PDE5, energetska homeostaza.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Reproductivna fiziologija

UDK broj: [612.616.3/.31]:612.67(043.3)

THE MECHANISMS INVOLVED IN THE REGULATION OF IMPAIRED LEYDIG CELLS ENDOCRINE FUNCTION DURING AGING

ABSTRACT

Reproductive aging of males develops along with the aging of the organism, and it is manifested by a significant change in the endocrine system and decreased fecundity. The decreased level of testosterone stands out in the context of the changed functionality of the endocrine system which together with numerous psycho-physical changes, reduces the quality of life of the individual. In respect with extended human life and undesirable effects of androgens replacement therapy, further investigations has been dedicated to better understanding of male hypogonadism by the molecular approach as well as endogen testosterone production during the aging. According to the presented facts we defined the two aims of the study: 1. Characterization of the age-related hypogonadism in the male *Wistar* rats as a model for reproductive aging, and 2. Investigation of the impact of a cAMP and a cGMP disturbances in development of aged Leydig cells.

Our results showed appearance of primary hypogonadism during the aging of male *Wistar* rats, including impair testosterone production and impaired expression of steroidogenic genes and proteins from the 12th month of age. Beside that cAMP, MAPK and NO-cGMP signaling has been disturbed in aged Lc as well as energy homeostasis. We also showed that less production of cAMP is not the only cause of aged Lc sub-functionality and that acute and chronic inhibition of the PDE5 showed positive effect at steroidogenesis and energy homeostasis in aged Lc. Further, cAMP and cGMP differently regulated energy homeostasis of aged LC, with positive impact of the cGMP treatment on mitochondrial functionality and energy homeostasis regulators.

Key words: Aging, hypogonadism, Leydig cells, steroidogenesis, cAMP, MAPK, NO-cGMP, PDE5, energy homeostasis

Research area: Biology

Area of special interest: Reproductive physiology

UDC number: [612.616.3/.31]:612.67(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	2
1.1. Endokrina funkcija Lajdigovih ćelija i primarna regulacija cAMP signalizacijom.....	3
1.1.1. LH-cAMP signalni put i biosinteza testosterona.....	3
1.2. Drugi signalni putevi koji regulišu endokrinu funkciju Lajdigovih ćelija	13
1.2.1. NO-cGMP signalni pu u Lajdigovim ćelijama.....	13
1.2.1.1. NO i azot oksid sintaze.....	13
1.2.1.2. Guanilil ciklaze (GUCY) – producenti cGMP	14
1.2.1.3. cGMP – zavisne protein kinase (PRKG)	15
1.2.1.4. cGMP – zavisne protein fosfodiesteraze (PDE)	16
1.2.1.5. NO-cGMP signalizacija i regulacija sinteze testosterona	16
1.2.2. Signalni put mitogenom-aktiviranih protein kinaza u Lajdigovim ćelijama	18
1.2.2.1. ERK1/2 signalizacija i njen uticaj na ekspimiranje StAR i steroidogenezu	20
1.3. Starenje.....	24
1.3.1. Lajdigove ćelije starog fenotipa	24
1.3.2. Promene funkcionalnosti mitohondrija tokom starenje Lajdigovih ćelija	27
1.3.3. Andropauza	28
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
3. MATERIJAL I METODE	33
3.1. Hemikalije	34
3.2. Eksperimentalne životinje	35
3.3. Eksperimentalni modeli.....	36
3.3.1. Model hronične inhibicije PDE5.....	36
3.3.2. Model akutne inhibicije PDE5	37
3.4. Sakupljanje testikularnog intersticijalnog fluida	38
3.5. Priprema primarne testikularne kulture	38
3.6. Ekstrakcija steroida iz tkiva testisa	39
3.7. Izolacija i priprema suspenzije intersticijalnih ćelija	39
3.8. Prečišćavanja Lajdigovih ćelija i priprema primarne kulture Lajdigovih ćelija.....	40
3.9. Određivanje koncentracije cikličnih nukleotida (cAMP i cGMP)	41
3.10. Određivanje koncentracije hormona	41
3.11. Određivanju ukupne količine proteina	42
3.12. Analiza proteina u uzorcima.....	43
3.12.1. Sodijum Dodecil Sulfat PoliAkrilamid Gel elektroforeza (SDS-PAGE), nativna elektroforeza i Western blot	43
3.13. Analiza ekspimiranja gena	43
3.13.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija.....	43
3.13.2. Analiza ekspimiranja gena real time PCR reakcijom	44
3.14. Određivanje koncentracije nitrita u uzorcima	47
3.15. Merenje membranskog potencijala mitohondrija i potrošnje kiseonika.....	48
3.16. Merenje koncentracije ATP.....	49
3.17. Statistička analiza	49
4. REZULTATI	50
4.1. Karakterizacija endokrine funkcije Lajdigovih ćelija starog fenotipa kod <i>Wistar</i> pacova	51

4.1.1. Promene funkcionalnosti gonadotropnih ćelija adenohipofize i Lajdigovih ćelija testisa.....	51
4.1.2. Promene steroidnog kapaciteta Lajdigovih ćelija	52
4.2. Uticaj starenja na ćelijsku signalizaciju koja reguliše sintezu testosterona.....	55
4.2.1. Promene cAMP signalizacije i posledice na steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija.....	55
4.2.2. Promene MAPK signalizacije u Lajdigovim ćelijama.....	60
4.2.2.1. Efekat cAMP na promene ekspimiranja gena MAPK signalnog puta uzrokovane starenjem	62
4.2.3. Promene NO-cGMP-PRKG signalizacije u Lajdigovim ćelijama.....	63
4.2.3.1. Različiti efekat NO i cGMP na produkciju testosterona u Lajdigovim ćelijama starog fenotipa.....	64
4.2.3.2. Efekat inhibicije PDE5 na ekspimiranje gena steroidogene mašinerije u Lajdigovim ćelijama starog fenotipa – <i>ex vivo</i> pristup.....	66
4.2.3.3. Efekat akutne inhibicije PDE5 na steroidogenezu i produkciju testosterona sredovečnih i starih pacova – <i>in vivo</i> pristup	67
4.2.3.4. Efekat hronične inhibicije PDE5 na steroidogenezu i produkciju testosterona starih pacova - <i>in vivo</i> pristup	69
4.2.3.5. Efekat hronične inhibicije PDE5 na NO-cGMP-PRKG signalizaciju u Lajdigovim ćelijama starog fenotipa – <i>in vivo</i> pristup.....	78
4.3. Uticaj starenja na energetska homeostazu Lajdigovih ćelija	79
4.3.1. Efekti hCG/cAMP i cGMP na parametre energetske homeostaze u Lajdigovim ćelijama sredovečnih i starih pacova – <i>ex vivo</i> pristup	79
4.3.2. Efekat akutne inhibicije PDE5 na parametre energetske homeostaze u Lajdigovim ćelijama sredovečnih i starih pacova – <i>in vivo</i> pristup.....	83
4.3.3. Efekat hronične inhibicije PDE5 na parametre energetske homeostaze u Lajdigovim ćelijama sredovečnih i starih pacova – <i>in vivo</i> pristup	86
5. DISKUSIJA	88
5.1. Starenje i promene endokrine funkcije Lajdigovih ćelija <i>Wistar</i> pacova	91
5.2. Starenje i promene ćelijske signalizacije uključene u regulaciju sinteze testosterona	92
5.2.1. Promene u funkcionisanju cAMP signalnog puta uzrokovane starenjem	93
5.2.2. Promene MAPK signalizacije uzrokovane starenjem	94
5.2.3. Promene NO-cGMP-PRKG signalizacije uzrokovane starenjem	96
5.3. Starenje i energetska homeostaza Lajdigovih ćelija.....	99
5.3.1. Uticaj cAMP i cGMP signalizacije na funkcionalnost mitohondrija tokom starenje Lajdigovih ćelija	100
6. ZAKLJUČCI	103
7. LITERATURA	107
8. BIOGRAFIJA.....	131
9. PRILOZI.....	132

PREDGOVOR

Starenje muškaraca prati sporo ali konstantno smanjenje produkcije testosterona koje počinje nakon treće decenije života, a subfiziološke koncentracije testosterona najčešće se javljaju nakon pete decenije života. Nizak nivo testosterona dovodi se u vezu sa brojnim psiho-fizičkim promenama organizma koje podrazumevaju smanjenje libida, erektilnu disfunkciju, izostankom jutarnje erekcije, zamor, smanjenje mišićne mase, povećanje masnih naslaga, osteoporozu, anksioznost, depresiju itd. Kako pomenute promene smanjuju kvalitet života individue i uz sve veći broj osoba starijih od šezdeset godina, poslednje dekade obeležene su intenzivnom upotrebom androgenih anabolika. Potencijalno neželjena dejstva androgenih anabolika i svest o zdravom starenju aktuelizuju ispitivanja *Lc* starog fenotipa i mogućnosti pospešivanja endogene produkcije testosterona. Najveći broj informacija o funkcionalnim promenama *Lc* starog fenotipa dobijen je u istraživanjima sa pacovima soja *Norwegian brown rat* kod koga je sastavni deo starenja pojava primarnog hipogonadizma. Sa druge strane najeveći broj informacija o uzrocima i posledicama izmenjenog nivoa testosterona tokom starenja ljudi dobijen je radom EMAS (*engl.* European Male Aging Study), ASA (*engl.* American Society of Andrology) i srodnih organizacija. Analiziranjem rezultata dobijenih i jednim i drugim tipom istraživanja i uz svest o ograničenosti upotrebe postojećih životinjskih modela i interpretacije rezultata na humanu populaciju neprestano se javlja potreba za korišćenjem novih životinjskih modela i eksperimentalnih pristupa za istraživanje starčkog hipogonadizma. Uz sve iznete činjenice i u cilju boljeg razumevanja molekularnih osnova starčkog hipogonadizma prvi deo ove disertacije posvećen je definisanju *Wistar* pacova kao modelu starčkog hipogonadizma, definisanju profil promena cAMP, MAPK i NO-cGMP signalizacije u *Lc* starog fenotipa i definisanju promena energetske homeostaze u *Lc* starog fenotipa. Drugi deo istraživanja posvećen je ispitivanju uticaja akutne i hronične inhibicije PDE5 na steroidogenezu i energetske homeostazu *Lc* starog fenotipa, kao i nezavisnom uticaju cAMP i cGMP na steroidogeni kapacitet i energetske homeostazu *Lc* starog fenotipa.

1. Uvod

1.1. Endokrina funkcija Lajdigovih ćelija i primarna regulacija cAMP signalizacijom

Testisi čine sastavni deo muškog reproduktivnog i endokrinog sistema čija je osnovna funkcija produkcija androgena i muških polnih ćelija. Sastoje se iz seminifernih tubula u kojima se odvija spermatogeneza i intersticijuma u kome se odvija produkcija androgena. Veličina intersticijuma varira između predstavnika različitih vrsta i zavisi od stepena steroidogene aktivnosti testisa. U njemu se nalaze Lajdigove ćelije (Lć), makrofage, fibroblasti, mioidne ćelije, limfociti, plazma ćelije krvni i limfni sudovi. Lć zauzimaju blizu 50% intersticijumskog prostora i kod adultnih mužjaka pacova njihov broj se kreće oko 30 miliona po testisu (Hardy i sar., 1989; Martin, 2016). Osnovna funkcija Lć je produkcija testosterona (koji se u pojedinim perifernim tkivima prevodi u potentniju formu 5 α -dihidrotestosteron (5 α -DHT)) i manje potentnih androgena androstendiona i dehidroepiandrosterona (DHEA). Od puberteta testosteron produkuju zrele adultne Lć (ALć) koje se karakterišu visokim steroidogenim kapacitetom, okruglim oblikom i krupnim jedrom a nalaze se u segregacijama. Osim zrelih ALć, tokom adultnog perioda u testisima se nalaze stem Lć, progenitorne i nezrele Lć (Chen i sar., 2009).

Drugi najvažniji endokrini produkt Lć je insulinu sličan faktor 3 (*engl.* Insulin-like factor 3, INSL3), koji shodno strukturi spada u subfamiliju relaksina u okviru insulinske superfamilije. Osnovne fiziološke funkcije INSL3 su regulacija spuštanja testisa u skrotume i preživljavanje germinativnih ćelija, kao i maturacija i transporta spermatozoida. Produkcija INSL3 ne zavisi od akutnog dejstva luteinizirajućeg hormona (*engl.* Luteinizing hormone, LH) već od funkcionalnosti Lć, što ga čini pogodnim markerom njihove funkcionalnosti (Bay i Andersson, 2011).

1.1.1. LH-cAMP signalni put i biosinteza testosterona

Sinteza testosterona je složen multienzimski i multikompartmanski proces koji se dešava kao odgovor Lć na vezivanje LH adenohipofize za receptore na njihovoj membrani. Čitav proces može se podeliti u tri faze:

1. povećanu unutarćelijsku produkciju cikličnog adenzin monofosfata (*engl.* Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) i aktivaciju protein kinaze A (cAMP zavisna protein kinaza, *engl.* Protein kinase A. PRKA);
2. transport i unos holesterola u mitohondrije;
3. transformaciju holesterola do testosterona posredstvom steroidogenih enzima u mitohondrijama i endoplazmatskom retikulumu.

Vezivanje LH za receptore (G-protein vezujući receptor, *engl.* G protein-coupled receptor, GPCR) na membrani L α dovodi do povećanja nivoa unutarćelijskog cAMP. Interakcijom hormona sa receptorom dolazi do aktivacije i odvajanja G α s subjediniice proteina, koja aktivira membranski vezanu adenil ciklazu (*engl.* Adenylate cyclase, ADCY) odgovornu za sintezu cAMP od adenzin-trifosfata (*engl.* Adenosine triphosphate, ATP) (Dufau, 1988). Regulacija steroidogeneze omogućena je aktivaciom cAMP zavisne protein kinaze A koja, shodno izoformi, fosforiliše različite proteine i u akutnom i/ili hroničnom maniru podstiče steroidogenezu (Payne i Youngblood, 1995; Stocco, 2006). Akutna regulacija steroidogeneze podrazumeva povećan transport holesterola do unutrašnje mitohondrijske membrane i zahteva angažovanje izoforme PRKA2. Hronična regulacija steroidogeneze podrazumeva regulaciju ekspimiranja translokatornih proteina i proteina steroidogene mašinerije, a u slučaju ekspimiranja steroidogenog akutnog regulatora (*engl.* Steroidogenic acute regulatory protein, StAR) posredovana je izoformom 1 PRKA (Dyson i sar., 2009).

Holesterol je prekursor za biosintezu svih steroidnih hormona. Steroidogene ćelije preuzimaju holesterol od cirkulišućih lipoproteina (*engl.* high-density lipoproteins, HDL i *engl.* low-density lipoproteins, LDL) (Gwyne i Strauss, 1982; Miller, 2013) ili koriste holesterol nastao *de novo* sintezom od acetata u složenom procesu koji se odigrava u endoplazmatskom retikulumu (Mason i Rainey, 1987; Porter i Herman, 2011). Steroidogene ćelije glodara dominantno preuzimaju holesterol od HDL, u interakciji ovih lipoproteina sa receptorom na membrani steroidogenih ćelija (*engl.* Scavenger receptor B1, SR-B1) (Harton i sar., 2002). Za razliku od steroidogenih ćelija glodara, humane steroidogene ćelije holesterol preuzimaju od LDL procesom endocitoze posredovane receptorom (Brown i sar., 1979; Miller, 2013). Nakon preuzimanja holesterola sledi proces njegovog odvajanja od nosača u procesu koji katalizuju specifične lipaze uz učešće transportnih proteina NPC1 i 2 (*engl.* Niemann-Pick disease type C). U steroidogenim

ćelijama glodara odvajanje holesterola od nosača i oslobađanje holesterola vrši hormon senzitivna neutralna lipaza (*engl.* Hormone-sensitive neutral lipase, HSL), dok u humanim ćelijama isti proces katališe lizosomalna kisela lipaza (*engl.* Lysosomal acid lipase, LAL) (Kraemer i Shen, 2002). Nastali slobodni holesterol raspoloživ je za proces steroidogeneze ili se može deponovati u ćelijama u vidu lipidnih kapi (proces zahteva reesterifikaciju holesterola posredstvom acil-koenzim-A-holesterol-acil transferaze, *engl.* Acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase, ACAT (SOAT1)). U slučaju steroidogeneze indukovane pomoću LH/ACTH (Adrenokortikotropni hormon, *engl.* Adrenocorticotropic hormone, ACTH), visok nivo unutarćelijskog cAMP inhibiše aktivnost SOAT1 čineći slobodni holesterol raspoloživim za proces steroidogeneze. U ovakvom scenariju slobodni holesterol kroz hidofilnu citoplazmatsku sredinu do mitohondrija dolazi putem vezikularnog ili nevezikularnog transporta (Miller, 2013). U slučaju nevezikularnog transporta prenos holesterola do mitohondrija vrše StarD proteini - familija proteina strukturno slična StAR proteinu, ali bez signalne mitohondrijske sekvence čime je onemogućena njihova interakcija sa mitohondrijama (Rodriguez-Agudo i sar., 2008). StarD proteini predaju holesterol proteinima lokalizovanim oko spoljašnje mitohondrijske membrane odgovornim za transport holesterola do unutrašnje mitohondrijske membrane (Miller i Auchus, 2011). Osim StarD proteina, u nespecifičan transport lipida i sa malim udelom uključen je i SCP2 protein (*engl.* Sterol carrier protein,) (Gallegos i sar., 2001; Miler i Auchus, 2011).

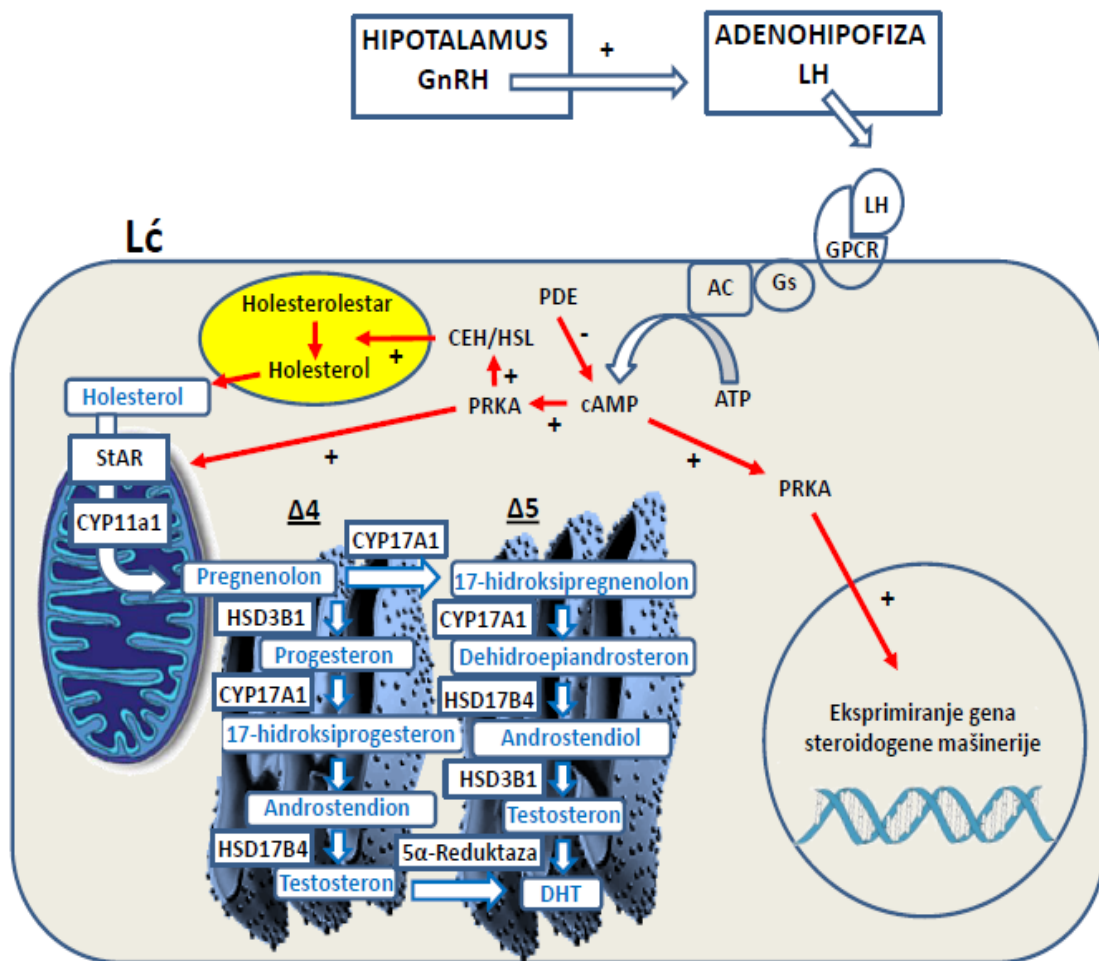
Prenos holesterola do unutrašnje mitohondrijske membrane tj. njegov transport kroz hidofilni intermembranski prostor predstavlja limitirajući korak steroidogeneze i odvija se pomoću kompleksne proteinske mašinerije nazvane transduceozom (Mesmin i Maxfield, 2009). Transduceozom čine proteini locirani u citoplazmi, spoljašnjoj i unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani koji preuzimju holesterol iz citoplazme i obezbeđuju kontakt između spoljašnje i unutrašnje mitohondrijske membrane (Rone i sar., 2009 a,b). Preuzimanje holesterola iz citoplazme vrši StAR koji predstavlja citoplazmatski protein transduceozoma i čijom se fosforilacijom u procesu akutne regulacije steroidogeneze unos holesterola u mitohondrije višestruko povećava (Miller, 2007). Akutna regulacija steroidogeneze tj. fosforilacija prekursorske forme StAR na poziciji Ser 195 omogućena je katalitičkim delovanjem PRKA koja zajedno sa StAR predstavlja citoplazmatski protein transduceozoma (Arkane i sar., 1997). U

steroidogenim tkivima StAR postoji u vidu prekursorske i zrele forme koje se razlikuju u pogledu molekulske mase, funkcionalnosti i lokalizovanosti. Prekursorsku formu predstavlja StAR od 37 kDa koji poseduje signalnu sekvencu za mitohondrije, funkcionalan je na spoljašnjoj mitohondrijskoj membrani i posreduje u procesu akutne regulacije steroidogeneze. Zrelu formu predstavlja neaktivan protein, lokalizovan unutar mitohondrija i čija je molekulska masa 30 kDa (Miller, 2007). Dalji transport holesterola vrši se putem kontakta spoljašnje i unutrašnje mitohondrijske membrane, a koji nastaje u interakciji transduceozomskih proteina lociranim u spoljašnjoj (translokatorni protein, *engl.* Translocator protein, TSPO i voltažnozavisni anjonski kanal, *engl.* Voltage-dependent anion channel, VDAC) i unutrašnjoj (adenin nukleotid translokator, *engl.* Adenine nucleotide translocator, ANT) mitohondrijskoj membrani. Konačno, nakon preuzimanja iz citoplazme otpočinje prevođenje holesterola do testosterona u procesu koji katališu enzimi iz grupe citohrom P450 hem-proteina (*engl.* Cytochrome P450, CYP) i hidrosisteroid dehidrogenaza (*engl.* Hydroxysteroid dehydrogenase, HSD) locirani u mitohondrijama i endoplazmatskom retikulumu (Miller, 2013).

CYP enzimi sadrže jednu hem grupu, građeni su od približno 500 aminokiselina, nalaze se u mitohondrijama i endoplazmatskom retikulumu (Nebert i sar., 2013) i prisutni su kod svih organizama od bakterija do životinja (Nelson i sar., 1996). Za sintezu testosterona najvažniji su: citohrom P450 enzim koji cepa bočni lanac holesterola (*engl.* Cytochrome P450 side chain cleavage enzyme, P450_{sc}, CYP11a1) i 17 α -hidroksilaza/C17-20 liaza (*engl.* Cytochrome P450 17-alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, CYP17A1). HSD enzimi pripadaju tzv. superfamiliji kratkih lanaca alkohol dehidrogenaza reduktaza i učestvuju u reakcijama redukcije i oksidacije steroidnih hormona (Penning, 1997). Za sintezu testosterona najvažnije su 3 β -hidrosisteroid dehidrogenaza (*engl.* 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase, HSD3B) i 17 β -hidrosisteroid dehidrogenaza (*engl.* 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase, HSD17B), a jedna od osnovnih razlika ove dve grupe enzima je ta što su CYP enzimi uvek produkti jednog gena dok kod HSD enzima postoje izoforme koje karakteriše tkivna specifičnost i katalitička aktivnost (dominantna dehidrogenazna ili reduktazna aktivnost) (Payne i Hales, 2004).

U prvoj reakciji steroidogeneze holesterol se pod dejstvom CYP11a1 enzima u dvostepenoj reakciji prevodi do pregnenolona i izokaproaldehida. U prvom koraku vrši

se hidroksilacija holesterola na pozicijama C20 i C22, pri čemu nastaje 20,22R-hidroksiholesterol. U drugom koraku kida se veza između 20-og i 22-og ugljenikovog atoma pri čemu nastaje pregnenolon (prvi C-21 steroid). Za odvijanje reakcije potrebna su tri molekula kiseonika, tri molekula NADPH i učešće mitohondrijskog elektron-transfer sistema (flavoprotein feredoksin reduktaza (*engl.* Ferredoxin-NADP reductase, FdxR) i gvožđe sulfor protein feredoksin, (*engl.* Ferredoxins, Fdx). Nastali pregnenolon se transportuje u endoplazmatski retikulum gde se pod dejstvom HSD3B dehidroksiluje i izomerizuje do progesterona. Progesteron se usled hidroksilazne aktivnosti CYP17A1 enzima prevodi prvo do 17-hidroksiprogesterona, a zatim usled liazne aktivnosti istog enzima do androstendiona (C-19 steroid; Slika 1.1.1.) koji se dejstvom HSD17B redukuje do testosterona.. Opisani nastanak C-19 steroida naziva se $\Delta 4$ put biosinteze androgena i dominantan je kod glodara. Osim njega postoji i $\Delta 5$ put koji je dominantan kod ljudi, a razlikuje se od prethodnog po tome što od pregnenolona dejstvom CYP17A1 enzima nastaje 17-hidroksipregnenolon, a zatim dehidroepiandrosteron (C-19 steroid). Dehidroepiandrosteron se dejstvom HSD17B prevodi do androstendiola koji pod dejstvom HSD3B prelazi u testosteron (Payne i Hales, 2004).



Slika 1.1.1. Uloga LH-cAMP-PRKA signalnog puta regulaciji sinteze testosterona. Tonična sekrecija gonadotropnog oslobađajućeg hormona (*engl.* Gonadotropin releasing hormone, GnRH) hipotalamusa stimuliše sekreciju LH adenohipofize. Vezujući se za receptore na Lc, LH uzrokuje povećanje cAMP i aktivaciju PRKA koja u akutnom i hroničnom maniru stimuliše steroidogenezu. Akutna podrška steroidogeneze podrazumeva aktivaciju proteina odgovornih za razgradnju estara i oslobađanje holesterola (holesterol esteraze, *engl.* Cholesterol esteraze, CHE/ HSL) kao i aktivaciju StAR čime se povećava unos holesterola u mitohondrije. Nakon unošenja u mitohondrije holesterol se transformiše do pregnenolona koji se transportuje u endoplazmatski retikulum i preko niza međuprodukata transformiše do testosterona. Hronična podrška steroidogeneze podrazumeva aktivaciju transkripcionih faktora čime se povećava eksprimiranje gena steroidogene mašinerije.

Osim akutne regulacije i iniciranja steroidogeneze, povećan nivo cAMP uključen je i u hroničnu regulaciju steroidogeneze. Hronična regulacija steroidogeneze putem cAMP podrazumeva njegovo angažovanje u kontroli eksprimiranja gena koji kodiraju proteine odgovorne za aktivaciju cAMP-PRKA signalne kaskade, transport i transformaciju

holesterola do testosterona. U kontekstu pomenute regulacije najviše je istražen uticaj cAMP na eksprimiranje i/ili aktivaciju Orfanskog nuklearnog receptora-steroidogenog faktora 1 (*engl.* Steroidogenic factor 1, SF1, NR5A1) koji stimuliše eksprimiranje *Lhr*, *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b* i *Cyp17*. cAMP stimuliše eksprimiranje *Sf1*/SF1 i povećava njegovu aktivnost. Aktivacija SF1 proteina moguća je njegovom fosforilacijom od strane PRKA ili produkcijom fosfatne kiseline (ligand za SF1, a za čije je nastajanje potrebna aktivacija diacilglicerol kinaze (*engl.* Diacylglycerol, DAG) putem cAMP. Osim opisane regulacije, eksprimiranje i aktivnost SF1 podložni su i modulaciji od strane ERK2 (*engl.* Extracellular signal-regulated kinase 2) čija fosforilacija uzrokuje interakciju SF1 sa dugim kofaktaorima čime se kontroliše eksprimiranje gena steroidogene mašinerije (Payne i Halles, 2004; Schimmer i White., 2010).

Od svih proteina uključenih u sintezu testosterona najbolje je istražena kontrola eksprimiranja *Star* čije se eksprimiranje povećava u slučaju hormonske stimulacije. Transkripcioni faktori odgovorni za eksprimiranje *Star* mogu se podeliti na konstantno prisutne u ćeliji koji se aktiviraju posttranslacionim modifikacijama od kojih je najznačajnija fosforilacija, kao i na transkripcione faktore koji se *de novo* sintetišu. Konstantno prisutni transkripcioni faktori koji učestvuju u bazalnom eksprimiranju StAR su SF1, LRH1 (*engl.* Liver receptor homolog 1, NR5A2), COUP-TFII (*engl.* COUP transcription factor 2, NR2F2), GATA4 (*engl.* GATA binding protein 4.), C/EBP β (*engl.* CCAAT/enhancer-binding protein beta), SP1 (*engl.* Specificity protein 1), CREB/CREM (*engl.* cAMP response element binding protein/cAMP-responsive element modulator), cFOS, cJUN i MEF2 (*engl.* Myocyte enhancer factor 2) dok se LH/cAMP stimulacijom povećava nivo eksprimiranja NUR77 (*engl.* Nerve growth factor IB), cJUN, C/EBP β . LH/cAMP stimuliše steroidogenezu podsticanjem kombinovanja transkripcionih faktora (GATA4 i C/EBP β ; CREB i SF1; SF1 i C/EBP β ; SP1 i SF1; GATA4 i MEF2; DLX5/6 (*engl.* Distal-less homebox 5) i GATA4; cJUN/SF1, GATA4 i EBP β) koji na nivou promotora indukuju transkripciju *Star*, kao i inhibicijom eksprimiranja ARR19 (*engl.* Androgen receptor corepressor of 19kDa) koji suprimira steroidogenezu ometanjem regrutovanja NUR77 i SCRT1 (*engl.* Scratch family transcriptional repressor 1). Osim ARR19, negativni regulatori steroidogeneze su DAX1 (*engl.* Dosage-sensitive sex reversal 1, NR0B1) i SHP (*engl.* Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6, PTPN6). Suprimiranje steroidogeneze u slučaju DAX1 posredovano je njegovim

povezivanjem sa korepresorom NcoR (*engl.* Nuclear receptor co-repressor 1, NCOR1), dok je u slučaju SHP suprimirane steroidogeneze presudan njegov inhibitorski efekat na koaktivatore steroidogenih gena. Takođe je moguće da DAX1 i SHP fizički intereaguju sa SP1, NUR77 i LRH1 i represuju njihovu aktivnost (Tremblay, 2015). Osim pomenutih transkripcionih faktora, suprimiranje steroidogeneze putem smanjenog ekspimiranja *Star* posredovano je i aktivnošću FOXO3 (*engl.* Forkhead box class O, FKHL2, FKHL-like1) transkripcionog faktora. FOXO3 transkripcioni faktor je do puberteta lokalizovan u jedru L α nakon čega se translocira u citosol, a njegova aktivnost je inhibisana prisustvom LH/hCG (Humani horionski gonadotropin, *engl.* Human chorionic gonadotropin, hCG). Prema aktuelnom modelu, LH/hCG posredstvom fosfatidilinositol 3-kinaze (*engl.* Phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) aktivira protein kinazu B (*engl.* Protein kinase B, PRKGB/AKT) koja fosforiliše FOXO3 na pozicijama Ser 24, Thr 32 i Ser 56. Ovako fosforilisane rezidue regrutuju protein 14-3-3 koji zadržava FOXO3 u citoplazmi gde sledi njegova proteozomska degradacija. Takođe se veruje da je ovakav mehanizam u osnovi stimulatornog delovanja faktora rasta na odvijanje steroidogeneze, i u skladu s tim ustanovljeno je da se maksimalan nivo insulini sličnog faktora rasta 1 (*engl.* Insulin-like growth factor 1, IGF1) podudara sa porastom testosterona u pubertetu (Choi i sar., 2015).

S obzirom na višestruku ulogu cAMP u kontroli steroidogeneze bitno je napomenuti da mehanizmi koji smanjuju unutarćelijsku koncentraciju ovog sekundarnog glasnika aktivno suprimiraju proces sinteze testosterona. Među pomenutim mehanizmima ističe se aktivnost fosfodiesteraza (*engl.* Phosphodiesterase, PDE). Do sada je identifikovano 10 familija PDE (PDE1-10) i svaki tip poseduje regulatorni i katalitički domen. Katalitički domen smešten je u okviru C-terminusa i odgovoran je za hidrolizu fosfodiesterarske veze čime se 3', 5'-ciklični nukleotidi prevode u analogne 5' monofosfate (McAllister-Lucas i sar., 1995). PDE4, 7 i 8 hidrolizuju cAMP dok PDE1, 2, 3 i 10 hidrolizuju cAMP i ciklični guanozin-monofosfat (*engl.* Cyclic guanosine monophosphate, cGMP) i oba tipa inhibišu hormonski indukovanu steroidogenezu (Shimizu-Albergine i sar., 2012; Vasta i sar., 2006). Takođe je poznato da adenozin monofosfat (*engl.* Adenosine monophosphate, AMP) nastao razgradnjom cAMP aktivira AMP zavisnu protein kinazu (*engl.* AMP-activated protein kinase, AMPK) koja inhibiše steroidogenezu putem smanjenja

ekspimiranja *Nur77* i *cJUN* (Abdou i sar., 2014) i/ili povećanjem ekspimiranja *Dax1* i *cFos* (Svechinkov i sar., 2009).

1.2. Drugi signalni putevi koji regulišu endokrinu funkciju Lajdigovih ćelija

Pored LH-cAMP kao dominantnog signalnog puta, u produkciji testosterona takođe učestvuje signalizacija posredovana azot oksidom (*engl.* Nitric oxide, NO), cGMP-zavisnom protein kinazom (*engl.* cGMP-dependent protein kinase 1, PRKG1) (Andric i sar., 2007), mitogenom-aktiviranim protein kinazama (*engl.* Mitogen-activated protein kinase, MAPK) (Manna i sar., 2006), fosfolipazom C (*engl.* Phospholipase C, PLC) (Mondillo i sar., 2005), protein kinazom C (*engl.* Protein kinase C, PRKC) (Jo i sar., 2005) itd.

U skladu sa ciljevima istraživanja ove teze, pored cAMP signalizacije posebna pažnja posvećena je uticaju NO-cGMP i MAPK signalizacije na funkcionalnost L α starog fenotipa, te su u nastavku teksta detaljnije opisane komponente ovih signalnih puteva i njihov uticaj na produkciju testosterona.

1.2.1. NO-cGMP signalni put u Lajdigovim ćelijama

1.2.1.1. NO i azot oksid sintaze

NO predstavlja lipofilni molekul gasa, slobodni radikal male molekulske mase sa poluživotom od nekoliko sekundi. Shodno prirodi može da deluje kao intra i inter ćelijski glasnik, a nervna signalizacija, vazodilatacija krvnih sudova, regulacija srčanog rada i baktericidno dejstvo predstavljaju samo neke od procesa regulisanih ovim molekulom (Simon, 2010). NO prevashodno nastaje katalitičkim delovanjem enzima iz familije azot oksid sintaza (*engl.* Nitric oxide synthase, NOS) i u sekundarno zastupljenom procesu redukcije nitrita u uslovima povećane kiselosti sredine najčešće prouzrokovane ishemijom tkiva (Luiking i sar., 2010). Katalitičko delovanje NOS podrazumeva dve uzastopne monooksigenazne reakcije pri kojima se L-arginin prevodi u L-citrulin uz oslobađanje NO (Alderton i sar., 2001). Do sada su identifikovane tri izoforme azot oksid sintaza koje su označene kao neuronska (*engl.* Neuronal NOS, nNOS, NOS1), endotelna (*engl.* Endothelial NOS, eNOS, NOS3) i inducibilna (*engl.* Inducible NOS, iNOS, NOS2), a koje se razlikuju po mestu ekspimiranja i zavisnosti od Ca²⁺-kalmmodulin

(CaM) kompleksa. NOS1 je konstitutivno eksprimirana u nervnim ćelijama, skeletnoj i srčanoj muskulaturi. NOS3 je dominantno eksprimirana u endotelu krvnih sudova, a NOS2 se najviše eksprimira u ćelijama imunskog sistema npr. u makrofagama (Stuehr i sar., 1991). Sve tri izoforme enzima prisutne su u testisima, a u humanim L α ekskluzivno je eksprimirana testis-specifična NOS1 (*engl.* Testis-specific nNOS, TnNOS) (Lee i Cheng, 2008). Takođe, aktivnost neuronske i endotelne izoforme zavisi od Ca²⁺-CAM kompleksa što nije slučaj sa iNOS. U pogledu strukture sve izoforme predstavljaju homodimere izgrađene od redukujućeg i oksidujućeg domena međusobno povezanih polipeptidnom sekvencom od 30 aminokiselina (Alderton i sar., 2001; Brecht i sar., 1990; Brecht i sar., 1991). Redukujući domen sačinjen je od FMN i FAD vezujućih domena i odgovoran je za preuzimanje elektrona sa redukujućih koenzima (NADPH). Oksidujući domen odgovoran je za oksidaciju supstrata uz izdvajanje NO, a sadrži hem i H₄B vezujući domen. Aminokiselinska sekvenca od 30 aminokiselina kojom su povezani FMD region redukujućeg domena i oksidujući domen ujedno predstavlja mesto vezivanja kalmodulina čija je funkcija kontrola prenosa elektrona sa jednog na drugi domen (Garcin i sar., 2004; Simon D, 2010; Wang i sar., 1997).

1.2.1.2. Guanil ciklaze (GUCY) - producenti cGMP

GUCY (*engl.* Guanylate cyclase) predstavljaju familiju enzima zaduženu za produkciju cGMP u prisustvu različitih liganada (NO, peptidni ligandi, Ca²⁺ i adeninski nukleotidi), a prema lokaciji u ćeliji dele se na partikularne (membranski vezane, GUCY2) i solubilne (citoplazmatske, GUCY1). Partikularne guanil ciklaze građene su od vanćelijskog-ligand vezujućeg domena, transmembranskog domena, regulatornog domena, regiona šarke i katalitičkog domena (Lucas i sar., 2000). Do sada je identifikovano 7 izoformi partikularnih guanil ciklaza koje karakteriše tkivno specifično eksprimiranje (GUCY2A: masno tkivo, nadbubrežna žlezda, bubrezi, ileum, placenta (Lowe i sar., 1989), cerebelum, srce, adenohipofiza, timus, jajnici, kohlea, lamina propria (Wilcox i sar., 1991); GUCY1B: placenta (Chang i sar., 1989), srž nadbubrežne žlezde, cerebelum, adenohipofiza, aorta, testisi (Ohyama i sar., 1992), jajnici (Chrisman i sar., 1993), jajovod, uterus, timus (Vollmar i sar., 1996); GUCY2C: intestinalna mukoza (Li i Goy, 1993); GUCY2D: jetra (Laney i sar., 1994); GUCY2E: retina, pinealna žlezda (Yang i

sar., 1995) ; GUCY2F: retina (Yang i sar., 1995); GUCY2G: intestinalni trakt, pluća, bubrezi, skeletni mišići (Schulz i sar., 1998)). Prema ligandu koji ih aktivira ova grupa guanil ciklaza deli se na: receptore natriuretičnih peptida (GUCY2A i B); receptore intestinalnih peptida (homologa enterotoksina, guanilin, uroguanilin, limfoguanilin) (GUCY2C)) i orfanske receptore (GUCY2D, E, F i G) (Lucas i sar., 2000). GUCY1 predstavljaju heterodimere u čiji sastav ulaze A i B subjedinice, a svaka subjedinica sadrži N-terminalni regulatorni domen i C-terminalni katalitički domen. Za katalitičku aktivnost ovih enzima potrebno je prisustvo obe subjedinice, a GUCY1 su eksprimirane u citoplazmi skoro svih sisarskih ćelija (Haretneck i sar., 1990; Kamisaki i sar., 1986). Najzastupljenije jedinice su A3 i B3 i njihovo prisustvo identifikovano je plućima, malom i velikom mozgu, srcu, bubrezima, jetri, skeletnim mišićima, placenti itd. (Lucas i sar., 2000). B2 subjedinica najzastupljenija je u bubrezima i jetri i ima ulogu u lokalizovanju GUCY1 u membrani kao i u regulaciji aktivnosti A3/B3 GUCY1 (Ujii i sar., 1993; Yuen i sar., 1990). A1 i B1 subjedinice lokalizovane su jedino u adultnom mozgu, a za A2_i subjedinicu se pretpostavlja da služi kao negativni regulator aktivnosti A3/B3 GUCY1 (Behrends i sar., 1995; Giuli i sar., 1992). Jedan od stimulatora GUCY1 je i NO koji se vezuje za hem GUCY1 formirajući fero-nitrozil hem (Buechler i sar., 1991). Osim NO, u stimulatoru GUCY1 spada i protoporfirin IX koji predstavlja prekursor hema kao i hematoporfirin čije je vezivanje za GUCY1 dokazano samo u eksperimentalnim uslovima (Ignarro i sar., 1984).

1.2.1.3. cGMP-zavisne protein kinaze (PRKG)

PRKG predstavljaju proteine koji se aktiviraju pomoću cGMP što vodi transferu γ fosfatne grupe ATP na serinske i treoninske ostatke ciljnog proteina. Fosforilacijom ciljnog proteina reguliše se njegova aktivnost, a primljeni signal prevodi u biološki odgovor (Lucas i sar., 2000). PRKG predstavlja homodimer sačinjen od A ili B subjedinica i za sada su poznata dva tipa PRKG označene kao PRKG1 i 2 sa dve izoforme PRKG1A i PRKG1B (Orstavik i sar., 1996; Tamura i sar., 1996). Uglavnom se u tkivima nalaze obe izoforme sa izuzetkom vaskularnog sistema, bubrega i nadbubrežne žlezde gde je dominantno zastupljena PRKG1A, dok se PRKG1B izoforma sreće u uterusu bez prisustva PRKG1A (Tamura i sar., 1996). PRKG2 predstavlja membranski vezan

homodimer i dominantno je zastupljen u mozgu, intestinumu, plućima, bubrezima i kostima (Jarchau i sar., 1994; Lohmann i sar., 1997; Uhler, 1993). Svi tipovi PRKG imaju N-terminalni regulatorni domen i C-terminalni katalitički domen na kome se nalaze vezna mesta za Mg^{2+} , ATP i ciljni protein (Lincoln i sar., 1995; Lohmann i sar., 1997).

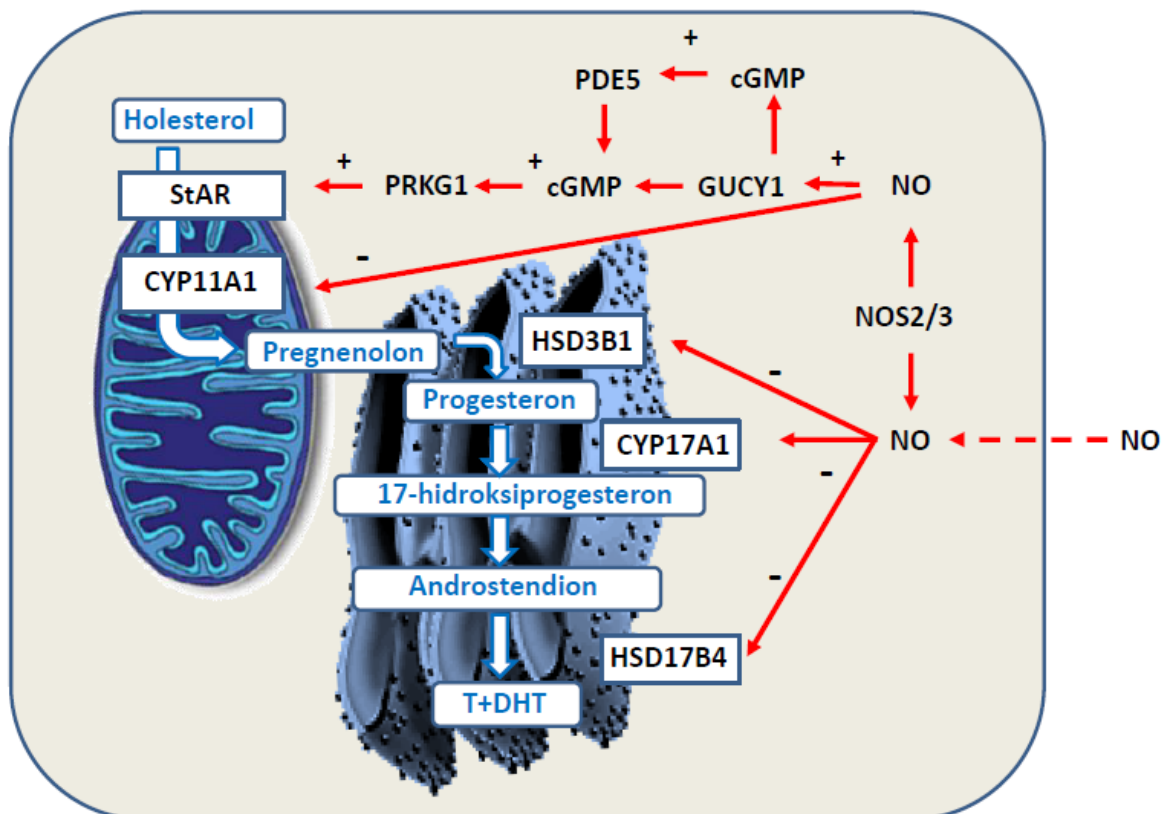
1.2.1.4. cGMP-zavisne fosfodiesteraze (PDE)

Od 10 familija PDE u cGMP specifične spadaju PDE5, 6 i 9 (Lucas i sar., 2000). Takođe je poznato da cGMP reguliše aktivnost PDE putem tri različita mehanizma: povećanjem njihove aktivnosti (PDE5, 6 i 9); modulišući stepen hidrolize cAMP kompeticijom za mesta na katalitičkim domenima (PDE1, 2 i 3) i regulacijom enzimske aktivnosti vezivanjem za alosterna mesta (PDE2, 5, 6 i 10) (Corbin i Francis, 1999). cGMP specifične PDE regulišu brojne fiziološke procese među kojima su rad srca, adrenalna steroidogeneza, erekcija, fototransdukcija itd. (Juilfs i sar., 1999).

1.2.1.5. NO-cGMP signalizacija i regulacija sinteze testosterona

Ćelice poseduju sve funkcionalne elemente NO-cGMP signalnog puta, a za sada je široko prihvaćena hipoteza o bimodalnoj funkciji NO u regulaciji testikularne steroidogeneze. Prema ovoj hipotezi visoke koncentracije NO inhibišu produkciju testosterona dok niže koncentracije NO imaju suprotan efekat (Valenti i sar., 1999). Smanjena produkcija testosterona u uslovima visoke koncentracije NO posledica je inhibicije CYP17 i CYP11 enzima usled vezivanja NO za hem ezima i/ili S-nitrozilacije cisteinskih rezidua enzima (Slika 1.2.1.5.) (Del Punta i sar., 1996; Drewett i sar., 2002; Lee i sar., 2008). Osim inhibicije enzima, s-nitrozilacija remeti aktivnost "Zn-finger" transkripcionih faktora u koje spada i SF1, čime se inhibiše ekspimiranje *Cyp* i *Star* (Sewer i Waterman, 2003; Zhao i sar., 2007). Stimulatorni efekat NO na produkciju testosterona je indirektan i zavisen od stimulacije GUCY1 koja produkuje cGMP i aktivira PRKG1. PRKG1 fosforiliše StAR čime se potencira unos holesterola u mitohondrije i intenzivira produkcija testosterona (Slika 1.2.1.5.). Osim toga, blago povišen nivo NO učestvuje u povećanom ekspimiranju *Star*, a isto tako je poznato da visoke koncentracije testosterona inhibišu ekspimiranje komponenata NO-cGMP signalnog puta (Andric i sar., 2010).

PDE5 predstavlja jednu od komponenata NO-cGMP signalnog puta i bitno je napomenuti da dugotrajna i kratkotrajna primena sildenafilu (specifični inhibitor PDE5-Viagra) kod mužjaka pacova dovodi do povećanog nivoa testosterona u serumu. Dugotrajna primena sildenafilu povećava steroidogeni kapacitet L α praćen povišenim nivoom cAMP i cGMP što dalje obezbeđuje uslove za akutnu i hroničnu podršku steroidogeneze (Andric i sar., 2010). Kratkotrajna primena sildenafilu povećava nivo testosterona 60 i 120 min nakon oralne primene i za ovakav porast koncentracije testosterona odgovorna je akutna podrška steroidogeneze posredovana fosforilacijom StAR od strane PRKG1 (Janjic i sar., 2012). Pozitivan efekat sildenafilu na produkciju testosterona potvrđen je i kliničkom studijom čiji rezultati pokazuju da sildenafilu povećava nivo ukupnog i slobodnog testosterona u uslovima smanjenog nivoa LH što dalje upućuje na testise kao ciljno tkivo za sildenafilu (Spitzer i sar., 2013).

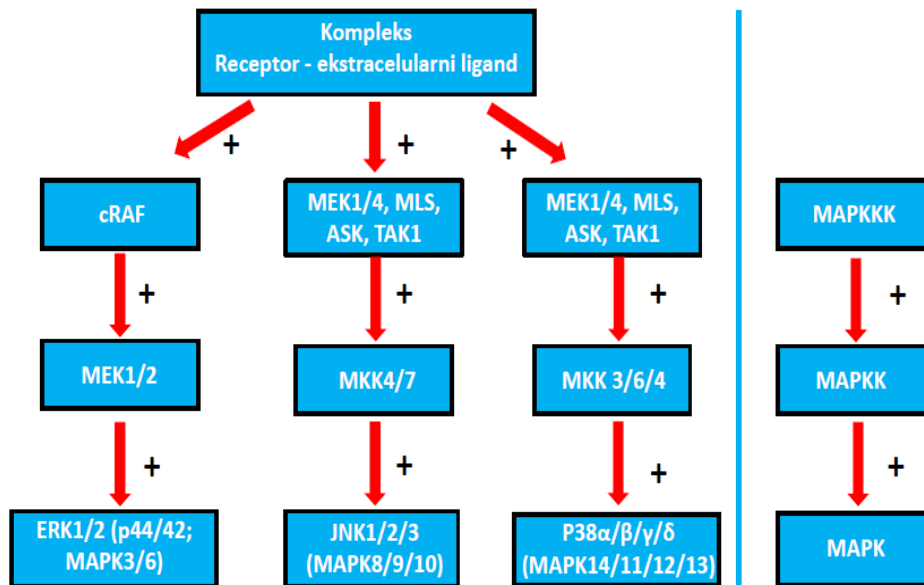


Slika 1.2.1.5. Uloga NO-cGMP-PRKG1 signalnog puta u regulaciji sinteze testosterona. NO u L α nastaje katalitičkim delovanjem NOS ili difunduje u njih iz intersticijuma testisa. Prema bimodalnoj teoriji, pri visokim koncentracijama NO dolazi do njegovog vezivanja za enzime steroidogene mašinerije što

remeti njihovu funkcionalnost i smanjuje produkciju testosterona. Pri nižim koncentracijama, NO stimuliše GUCY1 da produkuje cGMP koji aktivira PRKG1. PRKG1 fosforiliše i aktivira StAR čime se povećava unos holesterola u mitohondrije i stimuliše produkcija testosterona.

1.2.2. Signalni put mitogenom-aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK) u Lajdigovim ćelijama

Signalni put MAP kinaza (*engl.* Mitogen-activated protein kinase) je odgovoran za transdukciju vanćelijskih signala kojima se regulišu proliferacija, diferencijacija i apoptoza ćelija (Morrison, 2012). Vanćelijski signali mogu biti hormoni, faktori rasta, citokini i nerutransmiteri. Uspešna transdukcija signala omogućava se posredstvom tri glavne MAPK familije koje uključuju MAPK (*engl.* Extracellular regulated protein kinase, ERK), C-Jun N-terminal kinase (*engl.* Stress activated protein kinase, JNK/SAPK) i p38 kinaze (Slika 1.2.2.). Mehanizam prenošenja signala podrazumeva kaskadnu aktivaciju najmanje tri grupe proteina počevši od MAP kinaze kinaze kinaze (MAPKKK) preko MAPK kinaze (MAPKK) i konačno MAP kinaze (MAPK) (Slika 1.2.2.). Do sada je poznato najmanje 14 predstavnika MAPKKK (*engl.* Rapidly accelerated fibrosarcoma, Raf, Raf1, ARaf, BRaf), Mos (*engl.* MOS proto-oncogene), (*engl.* Transforming growth factor beta-activated kinase 1, TAK1), MUK (MAP3K12), SPRK (*engl.* Small protein rich protein), MPST (*engl.* Mercaptopyruvate sulfurtransferase), MEKK1, MEKK2, MEKK3, MEKK4, Tpl2, (*engl.* Apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK)), 7 predstavnika MAPKK (MEK1, MEK2, MEK5, MKK3, MKK4, MKK6, MKK7) i 12 predstavnika MAPK (ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, ERK5, p38a, p38b, p38g, p38d, JNK1, JNK2, JNK3) (Zhang i Liu, 2002).



Slika 1.2.2.. Šematski prikaz MAPK signalizacije u ćelijama sisara.

Za aktiviranje ERK signalnog puta primarno je aktiviranje receptora sa aktivnošću tirozin kinaza (*engl.* Tyrosine receptor kinase, TRK) koji zatim aktiviraju RAF kinaze. Aktivacija RAF kinaza je složen proces i zahteva učešće adapternih proteina i izmenjivača guanin nukleotida. Aktivirani RAF fosforiliše i aktivira MEK1/2 koja fosforiliše i aktivira ERK1/2 (Pearson i sar., 2001). ERK1/2 aktivira transkripcione faktore čime pospešuje mitozu, diferencijaciju i rast ćelija (Manna i Stocco, 2011). Takođe je poznato da i aktivacija GPCR-PRKA (Martinelle i sar., 2004) i GPCR-PRKC (Manna i sar., 2006) signalnih sistema može aktivirati ERK1/2.

Do sada su identifikovana tri gena α , β i γ odgovorna za nastanak JNK i 12 izoformi ovog proteina kao posledica alternativnog splajsinga (Hibi i sar., 1993). Aktivacija JNK posredovana je aktivnošću MKK4/7 koja je prethodno aktivirana nekom od MAPKKK (MEK1/4, MLS, ASK i TAK1), a supstrati za aktivirani JNK mogu biti različiti transkripcioni faktori uključujući cJun, Elk1, p53, DPC4 (*engl.* Deletion target in pancreatic carcinoma 4), Sap1a (*engl.* Stress activated protein 1a), NFAT4 (*engl.* Nuclear factor of activated T cells4), ATF2 (*engl.* Activating transcription factor 2) itd (Dan i sar., 2001). Signalizacija posredovana JNK najviše je istraživana u oblasti hematopoetskog sistema, embrionalnog razvoja, ćelijskom preživljavanju kao i slučajevima apoptoze indukovane UV svetlom (Manna i Stocco, 2011). Isti predstavnici MAPKKK uključeni

su i u aktivaciju p38 kinaza za čiju su direktnu aktivnost odgovorni MKK3/6/4, a supstrati za p38 mogu biti HSP27 (*engl.* Heat shock protein 27), fosfolipaze A2 (*engl.* Phospholipases A2, PLA2), MNK1/2 (*engl.* MAP-kinase interacting serine/threonine-protein kinase 1), APKAP2, Myc, MSK1 (*engl.* Nuclear mitogen and stress activated protein kinase 1), Elk1, STAT1 (*engl.* Signal transducer and activator of transcription 1), ATF1 (*engl.* Activating transcription factor 1) itd. (Huang i sar., 2009). Do sada su identifikovane 4 izoforme ove kinaze α , β , γ i δ (Chen i sar., 2001), a njihovu aktivnost stimulišu ćelijski stresori kao što su UV radijacija, toplotni i osmotski stres, proinflamatorni citokini i inhibitori sinteze proteina (Roux i Blenis, 2004).

1.2.2.1. ERK1/2 signalizacija i njen uticaj na ekspimiranje StAR i steroidogenu.

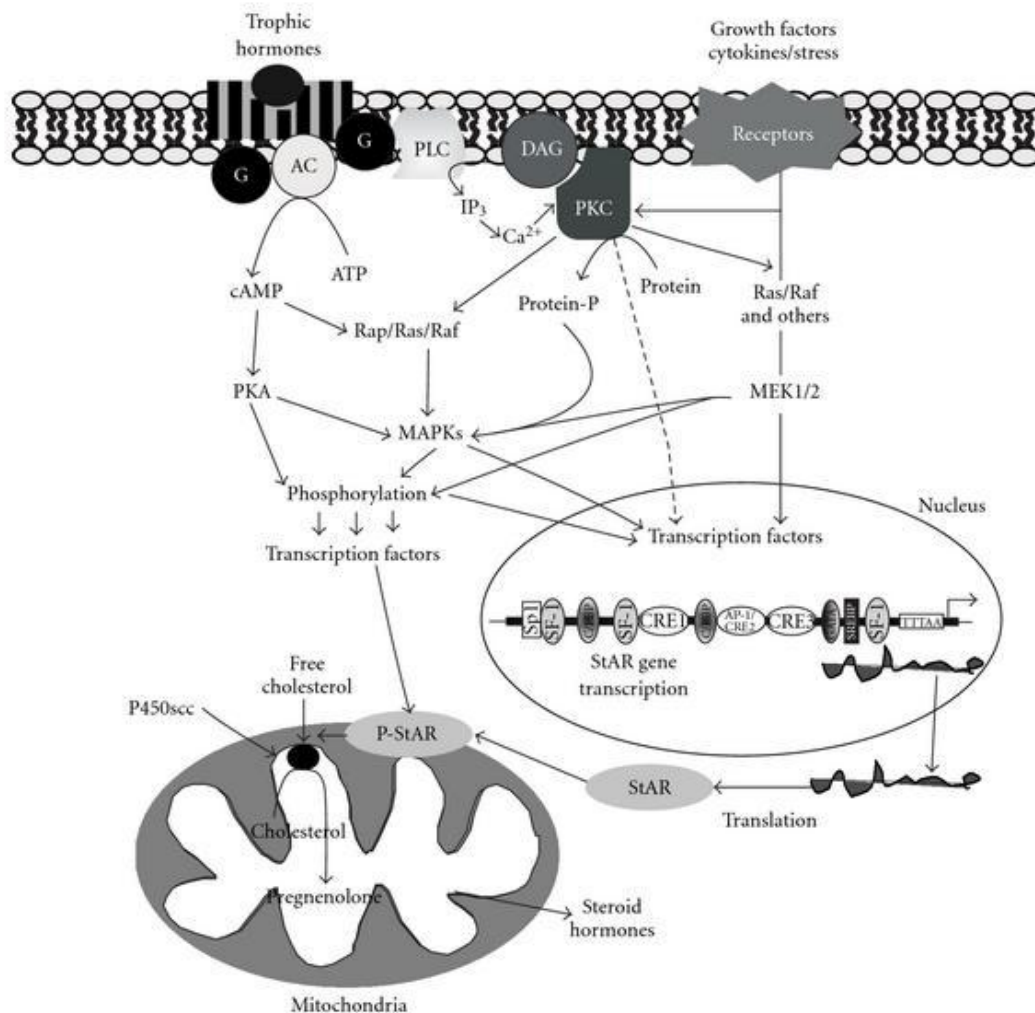
MAPK signalizacija je uključena i u modulisanje steroidogeneze, a od svih kaskada najviše pažnje posvećeno je ulozi ERK1/2 na ekspimiranje StAR i stimulaciju/inhibiciju steroidogeneze. Sa sigurnošću se može reći da StAR predstavlja supstrat za ERK1/2 i da ERK1/2 fosforiliše StAR na poziciji serin 232 kao i to je da ERK1/2 uključen u kontrolu njegovog ekspimiranja (Slika 1.2.2.1.). Po pitanju uticaja ERK1/2 na intenzitet steroidogeneze postojeća literatura navodi oprečna objašnjenja u smislu stimulacije i inhibicije steroidogeneze usled aktivnosti ERK1/2, a isto važi i za ekspimiranje StAR (Karin i Chang, 2001; Manna i sar., 2006; Manna i Stocco, 2007; Martinelle i sar., 2004). Konačnog objašnjenja o ulozi ERK1/2 za sada nema, a postojeća literatura dobijene rezultate opravdava različitošću vrsta i ćelija korišćenih u istraživanjima, kompleksnošću signalne mreže koja kontroliše produkciju steroida kao i korišćenim inhibitorima/aktivatorima ERK1/2. U kontekstu pomenutih modela i kompleksnosti signalne mreže ustanovljeno je da ERK1/2 i PRKC ne mogu istovremeno povećati ekspimiranje *Star*. Takođe je pokazano da inhibicija ERK1/2 utiče na ekspimiranje DAX1 čija aktivnost inhibiše steroidogenezu i da je ovako izazvanu inhibiciju moguće otkloniti aktivatorima PRKC, ali ne i aktivatorima cAMP-PRKA signale kaskade. Osim pomenutih mehanizama, i dvostruko specifična fosfataza (*engl.* Dual specificity phosphatase, DUSP1, MKP1/2) deaktiviranjem ERK1/2 inhibiše steroidogenezu smanjenjem ekspimiranja *Star* (Tremblay, 2015). Uz to, poznato je da aktivnost ERK1/2 ne utiče na ekspresiju CYP11 i HSD3B kao ni na intenzitet steroidogeneze inicirane 22R-

hidroksiholesterolom (ne zahteva prisustvo StAR za transport u mitohondrije; Manna i Stocco, 2011). Osim efekta na eksprimiranje i aktivnost StAR, ERK 1/2 smanjuje eksprimiranje SR-B1 receptora te reguliše dostupnost holesterola L α (Grewal i sar., 2003).

Dvojaka regulacija steroidogeneze primećena je u slučaju signalizacije posredovane p38 kinazom. Intenziviranje steroidogeneze aktivnošću p38 kinaze promovisano je povećanim eksprimiranjem StAR i podsticanjem diferencijacije nezrelih L α . Pomenuti efekti najčešće su izazvani dejstvom interleukina 1 α (*engl.* Interleukin 1 α , IL1 α) koji aktivira p38 kinazu čijom se aktivnošću podstiče dejstvo ribozomalne S6 kinaze (*engl.* Ribosomal S6 kinase, RSK-B kinaza, MSK2) i konačno fosforilišu/aktiviraju transkripcioni faktori CREB i FOS/JUN (Svechinkov i sar., 2003). Osim toga, pokazano je da inhibicija aktivnosti p38 kinaza dovodi do smanjenja eksprimiranja CYP19 enzima i smanjenja produkcije estradiola (Fu i sar., 2005). Sa druge strane, inhibicija steroidogeneze delimično je posledica aktivnosti p38 i ERK1/2 koje dovode do narušavanja membranskog potencijala mitohondrija i smanjenja produkcije testosterona (Svechinkov i sar., 2001). Važno je istaći i to da se aktivnost p38 kinaza vezuje za steroidogenezu narušenu starenjem i sniženu produkciju kortikosterona kao posledicu oksidativnog stresa i nakupljanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (*engl.* Reactive oxygen species, ROS) u adrenalnim ćelijama (Abidi i sar., 2008). Osim p38 kinaze, stres aktivira i JNK/SAPK sistem kinaza čije se dejstvo najčešće manifestuje suprimiranjem steroidogeneze te je aktivnost ovog sistema naročito važna za starenjem narušenu produkciju steroidnih hormona u L α (Li i sar., 1997). Takođe je poznato da i ROS aktivira JNK/SAPK koje smanjuju transaktivaciju NUR77 i stimulišu eksprimiranje cJUN što inhibiše sintezu StAR i CYP17 enzima u L α (Lee i sar., 2009). TNF α takođe inhibiše eksprimiranje StAR i CYP17 angažovanjem JNK/SAPK Sistema u L α (Diemer i sar., 2003).

Osim pomenuta tri sistema MAP kinaza koji kontrolišu različite ćelijske procese uključujući i steroidogenezu, pojedini autori izdvajaju i četvrti sistem tzv. ERK5/BMK1 sistem. Do sada je poznato da je aktivnost ERK5 regulisana faktorima rasta, forbol estrom i ćelijskim stresorima (UV radijacija, sorbitol, vodonik peroksid) (Cavanaugh i sar., 2001). Zna se i da MEK5 aktivira ERK5 koji regulacijom aktivnosti transkripcionih faktora (MAD (*engl.* Max dimerization protein), SAP1 (*engl.* Switch-activating protein

1), cFos, cMyc) ispoljava biološko dejstvo. Iako je poznato da MEK5 aktivira ERK5, mehanizmi odgovorni za aktiviranje MEK5 nisu sasvim objašnjeni. Ustanovljeno je da u aktiviranju MEK5 učestvuju adaptorni proteini, tirozin kinaze (MEKK2/3, TPL2 (*engl.* Tumor progression locus 2), MLTK (*engl.* Mixed lineage triple kinase) i WNK1 (*engl.* With no lysine kinase, serin-treonin kinaza) (Xu i sar., 2004). Uticaj ovog signalnog sistema na steroidogenezu slabo je istražen i eventualno se zna da oreksin A i B aktivira ERK5 čime povećava eksprimiranje StAR. Ovakav rezultat je spekulativan jer je poznato da oreksini posredstvom brojnih kinaza MAPK sistema afektuju eksprimiranje StAR transportera i produkciju steroidnih hormona (Manna i Stocco, 2011).



Slika 1.2.2.1. Angažovanost MAPK signalizacije u eksprimiranju StAR i podsticanju steroidogeneze. MAPK signalizacija u Lc može biti aktivirana vanćelijskim ligandima ili “cross” signalizacijom od GPCR

i PRKA i/ili PRKC. Aktivirana MAPK signalizacija povećanjem ekspimiranja i aktivnosti StAR podstiče steroidogenezu a osim toga, aktivirana MAPK signalizacija može inhibisati steroidogenezu (Preuzeto iz Manna i Stocco, 2011).

1.3. Starenje

Starenje predstavlja univerzalni biološki fenomen čiji uzrok nije definisan i predstavlja jedan od najvećih izazova za biomedicinska istraživanja 21. veka. Smatra se da počinje nakon reproduktivne maturacije i praćeno je postepenim gubitkom homeostatskih mehanizama što vodi nižem fekunditetu, smanjenoj funkcionalnosti tkiva, povećanoj osetljivosti na bolesti i povećanom riziku od umiranja. Najveći izazov aktuelnih istraživanja jeste razdvajanje uzroka starenja ćelija i tkiva od brojnih posledica koje ga prate (Rando i Chang, 2012). Do sada je postavljen veći broj teorija koje se bave uzrocima nastajanja starenja i sve se mogu podeliti u dve grupe: teorije programiranog starenja i teorije zasnovane na ćelijskim oštećenjima i greškama. U teorije programiranog starenja spadaju programirana dugovečnost, endokrina i imunološka teorija, a sve se zasnivaju na „biološkom rasporedu“ koji je posledica vremenski uslovljenog eksprimiranja gena. Teorije zasnovane na oštećenjima i greškama kao uzrok starenja vide nakupljanje grešaka i oštećenja u ćelijama usled interakcija organizama sa okruženjem. Ova grupa teorija pokriva minimalno 5 podteorija uključujući mitohondrijalnu slobodno radikalsku teoriju i teoriju oštećenja somatske DNK (Kunlin, 2010). Slobodno radikalska teorija primenljivija je na ćelije koje ne karakteriše visoka mitotička sposobnost te je osnovni uzrok starenja ovih ćelija nakupljanje ćelijskih oštećenja tokom vremena. Za ćelije koje karakteriše visoka mitotička sposobnost koristi se i termin replikativno starenje, a čest primer ovakvih grešaka je skraćenje telomera kao primarnog uzročnika starenja (Rando i Chang, 2012).

1.3.1. Lajdigove ćelije starog fenotipa

Iako je dobro poznato da se sa starenjem javlja smanjena produkcija i niži nivo testosterona, razlozi smanjene produkcije testosterona nisu u potpunosti rasvetljeni. Sa sigurnošću se može reći da sa starenjem ne dolazi do smanjenja brojnosti L α te je niska produkcija testosterona posledica starenjem indukovanih promena u L α koje dovode do njihove subfunkcionalnosti iskazane neadekvetnim odgovorom na prisustvo LH i smanjenom produkcijom insulinu sličnog proteina 3 (*engl.* Insulin like protein 3, INSL3) (Chen i sar., 1994; Midzak i sar., 2009; Petersen i sar., 2015; Wang i sar., 1993; Zirkin i

sra., 1993). Neadekvatan odgovor $L\acute{c}$ na prisustvo LH uzrokuje smanjenje sinteze testosterona koja je merljiva nakon petnaestog meseca života pacova i prethodi joj blaga subfunkcionalnost oko devetog meseca koja nije praćena značajnim promenama nivoa testosterona u serumu. Prema najširem mišljenju, nizak androgeni kapacitet $L\acute{c}$ posledica je poremećaja u cAMP-posredovanoj signalizaciji čije je glavno obeležje nizak nivo cAMP, smanjeno ekspimiranje *Lhr/LHR* kao i nizak nivo i aktivnost CYP i HSD enzima (Chen i sar., 2002). Pored toga $L\acute{c}$ starog fenotipa karakteriše poremećaj u transportu holesterola do unutrašnje mitohondrijske membrane uzrokovan smanjenim ekspimiranjem StAR i TSPO (Culty i sar., 2002; Luo i sar., 2005).

Prema aktuelnim saznanjima, akutna i hronična inhibicija steroidogeneze izazvana niskim nivoom cAMP posledica je poremećaja u vezivanju LH receptora i αs subjedinice G-proteina, jer do sada nije detektovana starenjem indukovana promena ekspresije *Gai* subjedinice niti smanjena aktivnost ADCY (Chen i sar., 2002; Chen i sar., 2004). Pomenuti poremećaj u povezivanju LHR sa *Gas* subjedinicom nije u potpunosti razjašnjen te se njegova pojava objašnjava dvema hipotezama. Prema prvoj hipotezi, poremećaj je posledica povećane koncentracije ROS i posledične lipidne peroksidacije u membrani $L\acute{c}$. U skladu sa prvom hipotezom dobro je dokumentovana povećana produkcija i sadržaj ROS u starim $L\acute{c}$ (Chen i sar., 2001) kao i povećana količina markera lipidne peroksidacije (Midzak i sar., 2009). Povećan sadržaj ROS dokumentovan je i u drugim sistemima tokom starenja (Beckman i Ames, 1998), a u $L\acute{c}$ starog fenotipa, pored povećane produkcije ROS, smanjena je prisutnost i aktivnost enzima antioksidativne zaštite: superoxid dizmutaze 1 i 2 (*engl.* Superoxide dismutase, SOD 1/2), glutation peroksidaze (*engl.* Glutathione peroxidase, GPx) i glutationa (Cao i sar., 2004; Luo i sar., 2006) kao i povećana aktivnost NOS u regionu mitohondrija, glatkog endoplazmatskog retikuluma i jedra (Ruffoli i sar., 2001). Protivnici pomenute hipoteze ističu da membrana predstavlja kompleksan sistem sa mogućnošću kompartmanizacije pojedinih delova, te bi se kompartmanizacijom receptora i proteina mogao sprečiti pomenuti poremećaj (Smith i sar., 2006). Prema drugoj hipotezi, nevezivanje receptora i αs subjedinice G proteina predstavlja posledicu desenzitizacije receptora usled dugotrajne stimulacije sa LH (Cooke i sar., 1992). U saglasnosti sa drugom hipotezom je činjenica da vezivanje LH za receptore na $L\acute{c}$ povećava produkciju ROS i indukuje ekspimiranje jedarnog faktora respiracije 2 (*engl.* Nuclear respiratory factor 2, *Nrf2/NRF2*-glavni regulator ekspresije

enzima antioksidativne zaštite; Beattie i sar., 2013). U prilog ovkavom stavu idu rezultati ispitivanja prema kojim dugotrajna supresija steroidogeneze u L \acute{c} starog fenotipa konačno dovodi njihov steroidogeni kapacitet na nivo adultne kontrole (Zirkin i sar., 2000).

Dalje, poremećena redox sredina L \acute{c} indukuje promenu signalizacije uključujući signalizaciju posredovanu PRKC, p38 i ciklooksigenazom 2 (*engl.* Cyclooxygenase 2, COX2). S tim u vezi, poznato je da starenje inukuje povećanje nivoa PRKC u L \acute{c} (Chen i sar., 2004) i da redox stanje ćelije reguliše njenu aktivnost (Gopalakrishna and Jaken, 2000). Aktivna PRKC može da ometa prenos signala sa GPCR na ADCY što je pokazano i u L \acute{c} (Cooke i sar., 1992; Inoue i Rebois, 1989). Oksidativni stres može da aktivira p38 što dovodi do smanjenja produkcije steroida u adrenalnim ćelijama (Abidi i sar., 2008). Kako starenje prati povećano eksprimiranje COX2, moguće je da i njegova povećana aktivnost dovodi do smanjenja eksprimiranja StAR i LH što uzrokuje smanjenje produkcije testosterona (Cooke i sar., 1992; Inoue i Rebois, 1989; Wang i sar., 2005). Osim pomenutih promena ističu se i promene koje indirektno smanjuju produkciju testosterona, a među njima su povećana lipofuzija (Wang i sar., 2012) kao i smanjena autofagna aktivnost ćelija (Liao i sar., 1993). Sa starenjem takođe opada i nivo HSD11B2 koja smanjuje inhibitorno dejstvo glukokortikoida (Koeva i sar., 2009). Osim navedenih promena, dokumentovan je porast količine citokina u testisima starih životinja (Jung i sar., 2004) te s tim u vezi i inhibitorno dejstvo citokina na eksprimiranje steroidogenih enzima (Diemer i sar., 2003) kao i njihov pozitivan uticaj na eksprimiranje NOS2-producenta velike količine NO (Ruffoli i sar., 2001). Iako je ovakav sled događaja logičan, on je u velikoj meri spekulativan jer za sada nije poznato da li i u kojoj meri L \acute{c} odgovaraju na prisustvo citokina (Midzak i sar., 2009). Starenjem indukovana subfunktionalnost L \acute{c} dovodi se i u vezu sa povećanjem nivoa kolagena u intersticijumu testisa starih životinja (Ichihara i sar., 1993; Mendis-Handagama i Gelber, 1995), te sa tim u vezi i povećanim eksprimiranjem *Hsp47* (*engl.* Het shock protein 47, gen uključen u regulaciju sinteze različitih tipova kolagena) (Syntin i sar., 2001). Starenjem indukovana subfunktionalnost L \acute{c} može biti uslovljena i faktorima van samih L \acute{c} kao što su promena frekvencije pulseva oslobađanja LH, produkcija osteokalcina iz kostiju, IGF1 iz jetre, zatim tiroksinom, insulinom, vodonik peroksidom i NO iz makrofaga itd. (Teerds i Keiher, 2015).

Lc starog fenotipa takođe karakteriše dilatacija endoplazmatskog retikuluma, uvećanje mitohondrija, prisustvo lipidnih kapi i akumuliranje lipofuscina (Wang i sar., 2012).

1.3.2. Promene funkcionalnosti mitohondrija tokom starenja Lajdigovih ćelija

Kao što je rečeno, u pokušaju da se objasni razlog zbog koga organizmi stare predložen je veći broj teorija, a mitohondrijska slobodno radikalaska teorija već nekoliko dekada zauzima centralno mesto među njima. Prema ovoj teoriji ROS predstavljaju nepoželjne, toksične produkte aerobnog metabolizma, koji zbog svoje velike reaktivnosti izazivaju oštećenja drugih makromolekula. Teorija se zasniva na nekoliko zapažanja koja podrazumevaju da se produkcija ROS povećava tokom starenja usled smanjenja funkcije respiratornog lanca mitohondrija, smanjenja aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i akumulacije mutacija na mtDNK (Bartić i Larsson, 2013). U skladu s tim, poznato je da ROS nastaje na I i III kompleksu respiratornog lanca i dobro je dokumentovano da se sa starenjem smanjuje funkcionalnost I i IV kompleksa respiratornog lanca u jetri, mozgu, srcu i bubrezima, dok se aktivnost II, III i V kompleksa tokom starenja ne menja (Brtić i Larsson, 2013; Liu Y i sar., 2002; Manczak i sar., 2005). Povećanje količine ROS dovodi se u vezu sa (prolaznim) povećanjem membranskog potencijala mitohondrija, mada najveći broj literaturnih navoda starenje dovodi u vezu sa gubitkom polarizovanosti membrane mitohondrija i smanjenom sintezom ATP (Banki i sar., 1999; Cottrel i Turnbull, 2000; Li sar., 1999; Majima i sar., 1998; Ozawa, 1997). U skladu s tim primećeno je da produkcija ATP opada za oko 8% tokom jedne životne dekade i da starenje indukuje povećanu potrošnju kiseonika praćenu neproporcionalnom sintezom ATP. Niska produkcija ATP u uslovima povećane potrošnje kiseonika oslikava stanje insulinske rezistencije uslovljene niskom produkcijom insulina/IGF1 (McCully i sar., 1993; Puche i sar., 2008; Short i sar., 2005; Taylor i sar., 1997). Takođe treba istaći i to da ROS ne predstavljaju isključivo nepoželjne produkte mitohondrijskog metabolizma već i važne regulatore ćelijske signalizacije, ćelijske smrti i deobe. Uz to, ustanovljeno je da povećan nivo ROS pozitivno utiče na dužinu života pojedinih vrsta crva, muva i miševa (Hakimi i sar., 2011; Rea i sar., 2007). Važna karakteristika starenja jeste poremećena mitofuzija usled smanjenog ekspimiranja Mitofuzina 2 (*engl.* Mitofusin 2,

Mfn2/MFN2) kao i smanjena mitofagija što doprinosi akumuliranju mutacija na mtDNK (Cavallini i sar., 2007; Crane i sar., 2010; Cuervo i sar., 2005; Wohlgemuth i sar., 2010). Aberacije u mitohondrijskoj biogenezi koje nastaju sa starenjem dovode se u vezu sa poremećenom retrogradnom signalizacijom u koju su uključeni jedarni geni i faktori zavisni od mitohondrijskog metabolizma (ATP, NO, Ca²⁺, ROS, NAD⁺/NADH) (Selman i sar., 2009).

Pored funkcionalnih promena, mitohondrije starog fenotipa pokazuju morfološke promene iskazane uvećanjem mitohondrija, gubitkom kristi, nakupljanjem vakuola i kristalnih inkluzija (Frenzel i Feimann, 1984) kao i smanjenom brojnošću u hepatocitima čoveka i miša (Herbener, 1976; Stocco i Hutson, 1978).

1.3.3. Andropauza

LOH (*engl.* Late onset hypogonadism)/andropauza predstavlja klinički i biohemijski sindrom koji se javlja u starijem životnom dobu muškarca a praćen je niskim nivoom testosterona u serumu i simptomima androgenske deficijencije (Klotz, 2014; Lunenfeld i sar., 2015; Wang i sar., 2008).

Starenje muškaraca prati sporo ali konstantno smanjenje produkcije testosterona počevši od treće decenije života. U početku smanjena produkcija testosterona ima godišnju stopu od svega 0.5-2% da bi oko pete decenije života smanjenje produkcije bilo daleko značajnije sa mogućnošću dostizanja subfizioloških koncentracija testosterona. Subfiziološke koncentracije testosterona mogu biti posledica primarnog ili sekundarnog hipogonadizma, a isto tako usled očuvanog zdravstvenog stanja jedinke moguće je da pomenuto smanjenje koncentracije testosterona u potpunosti izostane. Iako je zbog velikih individualnih variranja i brojnih metodoloških ograničenja teško precizno definisati subfiziološke koncentracije testosterona, prema literaturnim navodima niskim koncentracijama testosterona smatraju se vrednosti koncentracija niže od 8-11.5 nmol/l, dobijene nakon uzimanja uzorka u jutarnjim časovim (između 7 i 11 h) dva dana uzastopno. Ukoliko se vrednosti koncentracija testosterona kreću oko najnižih fizioloških vrednosti tada se za preciznu dijagnostiku hipogonadizma koristi nivo slobodnog testosterona za čiju se donju granicu uzima vrednost koncentracije testosterona od

približno 225 pmol/l. Kako su u LOH prisutni i primarni (hipergonadotropni) i sekundrani (hipogonadotropni) hipogonadizam, marker njihovog razlikovanja predstavlja nivo LH za čiju se donju granicu uzima vrednost od oko 9 U/L. Osim pomenutog primarnog i sekundranog hipogonadizma, u procesu starenja muškarca moguće je detektovati prisustvo fizioloških koncentracija testosterona praćenih povećanim nivoom LH. Ovakvo stanje oraganizma naziva se prelazni hipogonadizam i pretpostavlja se da nagoveštava nastajanje primarnog hipogonadizma individue (Basaria, 2014; Klotz, 2014; Paduch i sar., 2013; Tajer i sar., 2010; Wang i sar., 2008).

Bitno obeležje reproduktivnog starenja jeste nejedanka stopa smanjenja sve tri frakcije testosterona u cirkulaciji. Naime, smatra se da biodostupan testosteron opada stopom od 2-3% godišnje, dok ukupni testosteron opada stopom od 1.6%. Pomenuti fenomen posledica je starenjem indukovano porasta nivoa glavnog proteinskog transportera testosterona u cirkulaciji-SHBG (*engl.* sex hormone binding globulin, SHBG) čija stopa rasta na godišnjem nivou iznosi 1.2% (Zaidi i sar., 2012).

Osim smanjene sinteze testosterona, reproduktivno starenje prate i brojne druge promene (simptomi) u oragnizmu koje se najjednostavnije mogu podeliti u seksualne i neseksualne. U seksualne promene spadaju smanjen libido, erektilna disfunkcija i smanjena učestalost jutarnje erekcije. Neseksualne promene podrazumevaju sve ostale psiho-fizičke promene oragnizma uključujući zamor, smanjenje mišićne mase, povećanje masnih naslaga, osteoporoza, osteopenija, smanjenje koncentracije, depresija, anksioznost, nedostatak vitamina D, prisustvo metaboličkog sindroma itd. (Araujo i Wittert, 2011; Klotz, 2014). S obzirom da samo seksualne promene koreliraju sa subfiziološkim koncentracijama testosterona, smatra se da je muškarac u stanju andropauze samo ako ima smanjen nivo testosterona uz prisustvo seksualnih simptoma. Samo na osnovu pojedinačno prisutnog hipogonadizma ili seksualnih simptoma ne može se konstatovati stanje andropauze, a svi ostali simptomi mogu da potvrde ili ukažu na mogućnost njenog nastanka, ali se ne mogu koristiti kao marker njene prisutnosti (Lunenfeld i sar., 2015; Wang i sar., 2008). Sa druge strane, kombinacija seksualnih simptoma i subfizioloških koncentracija testosterona predstavlja veoma krut kriterijum za dijagnostiku andropauze i neretko ne odgovara zahtevima dobre kliničke prakse. Stoga se ukazala potreba za definisanjem pouzdanih biomarkera koji bi preciznije definisali stanje andropauze, a celokupan proces učinili neinvazivnim i ekonomičnim. Obećavajući

molekularni markeri andropauze mogli bi biti pripadnici grupe mikroRNK (miRs) – preciznije miR-125a-5p, miR-361-5p i miR-133a-3p. Osim zadovoljavajuće stabilnosti u serumu i primeni u dijagnostici kancera, mišićnih i neurodegenerativnih oboljenja, pomenuti miRs pokazuju niži nivo ekspresije kod osoba sa dijagnostikovanim LOH. Osim toga, nivo miR-361-5p korelira sa vrednostima ukupnog i slobodnog testosterona dok nivo miR-133a-3p negativno korelira sa AMS (*engl. Ageing males' symptoms, AMS*) (Chen i sar., 2016).

S obzirom na stalan trend povećanja brojnosti pripadnika starijeg dela populacije (prema procenama do 2050. godine izjednačiće se broj osoba starijih od šezdest i mlađih od petnaest godina) i potencijalno negativne efekte zamenske terapije testosteronom, pospešivanje endogene produkcije testosterona tokom starenja predstavlja izazov budućih istraživanja. U kontekstu pomenute problematike i u trendu zdravog starenja na važnosti dobijaju istraživanja Lc starog fenotipa, menadžment telesne mase i dobrih životnih navika (Beattie i sar., 2015; Huhtaniemi, 2014; Wang i sar., 2008).

2. Ciljevi istraživanja

Sve intenzivniji porast broja pripadnika starijeg dela populacije, smanjen kvalitet života uzrokovan niskim nivoom testosterona kao i potencijalno neželjeni efekti zamenske terapije androgenima nameću istraživanja koja će definisati mogućnost pospešivanja endogene produkcije androgena i korišćenja novih životinjskih modela za potrebe istraživanja reproduktivnog starenja. Shodno svemu navedenom, ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su sledeći:

- Okarakterisati starački hipogonadizam kod pacova soja *Wistar* kao modela za istraživanje reproduktivnog starenja. Preciznije:
 - Definirati endokrine promene gonadne osovine, androgenog kapaciteta L α i markera funkcionalnosti L α tokom starenja.
 - Definirati obrazac promena ekspimiranja i funkcionalnosti komponenata LH-cAMP, NO-cGMP i MAPK signalnih puteva u L α *Wistar* pacova različitih starosnih kategorija.
 - Ispitati funkcionalnost mitohondrija u L α tokom starenja *Wistar* pacova, iskazanu stepenom produkcije ATP i potrošnje kiseonika, promenom polarizovanosti mitohondrijskih membrana i ekspimirajućim profilom gena odgovornih za kontrolu funkcionisanja mitohondrija i ćelijsku redoks regulaciju.

- Ispitati udeo promena cAMP- i cGMP-signalizacije u formiranju starog fenotipa Lajdigovih ćelija. Preciznije:
 - Definirati ulogu cGMP specifične PDE5 na androgeni kapacitet i funkciju L α starog fenotipa *ex vivo* i *in vivo* pristupom.
 - Ustanoviti efekte cAMP i cGMP na funkcionalnost mitohondrija u L α tokom starenja *Wistar* pacova *in vivo* i *ex vivo* pristupom.

3. Materijal i metode

Svi ogledi urađeni su u laboratoriji za reproduktivnu endokrinologiju i signaling (LaRES) na Prirodno-matematičkom fakultetu, Departmanu za biologiju i ekologiju, Univerziteta u Novom Sadu.

3.1. Hemikalije

Anti-testosteron-11-BSA serum No. 250 i anti-progesteron-11-BSA serum No. 337 dobijeni su ljubaznošću Gordon D. Niswender (Colorado State University, Fort Collins, CO). [1,2,6,7-³H(N)]testosteron i [1,2,6,7-³H(N)]progesteron nabavljeni su od New England Nuclear (Brisel, Belgija). Dekstran T-70 kupljen je od Pharmacia (Uppsala, Švedska). Aktivni ugalj – Norit A kupljen je od Serva (Heidelberg, Nemačka). Radioimunoesej (Radioimmunoassay RIA) kit za detekciju luteinizirajućeg hormona pacova je kupljen od ALPCO Diagnostics (www.alpco.com). Hemikalije za SDS-PAGE elektroforezu, akrilamid/bis-akrilamid, N,N,N',N'-tetrametilen-diamin (TEMED), amonijum persulfat i Commassie boja za proteine (CBB) kupljene su od Sigma-Aldrich, dok je pufer za pripremu uzoraka za SDS elektroforezu (loading pufer) kupljen od Quality biological inc. (Gaithersburg, MD, USA). Supstrat za detekciju Western blot analizom SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate, SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate i SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate kupljeni su od PIERCE (Rockford, USA). Antitelo za StAR protein dobijeno je ljubaznošću prof. Douglas Stocco, a antitelo za detekciju HSD3B dobijeno je ljubaznošću prof. Ian Masson. Antitela za ADCY5/6, ADCY9, Gas, ACTINB i INSL3 kupljena su od Santa Cruz Biotechnology (Haidelberg Germany). Antitelo za ADCY10 kupljeno je od kompanije Sigma (St. Louis, MO), anti-PRKAC i PKAR kupljeni su od BD Transduction Laboratories (NJ, USA), anti-P38, anti-pP38, anti-ERK1/2 anti-pERK1/2 kupljeni su od Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) dok su anti-JNK i anti-pJNK nabavljeni od Bio Lab New England (Ipswich, MA, USA). Antitelo za β -1 subjedinicu sGC kupljeno je od Cayman Chemical (MI, USA), a anti-PRKG1 antitelo kupljeno je od Caliochem (Darmstadt, Germany). Anti-mišje, anti-zečje, anti-kozje i anti-kokošje sekundarno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena kupljeno je od Kirkegaard & Pery Labs (Gaithersburg, MD). β -aktin detekcioni kit nabavljen je od Oncogene Research Products (San Diego CA, USA). Medijum 199 koji sadrži Earle-ovu so i L-glutamin (M199), medijum DMEM-F12, HEPES, penicilin/streptomycin, etilendiamintetra-acetatna

kiselina (EDTA), fosforna kiselina, naftil-etilendiamin i sulfanilamid, perkol, goveđi albumin iz seruma (Bovine serum albumin-BSA, frakcija V), kolagenaza (Collagenase, Type IA, iz *Clostridium histolyticum*), L-arginin, aminoguanidin, holesterol, 22(R)-hidroksiholesterol, pregnenolon, progesteron, Δ 4-androstendion, rastvor tripan plavog (Trypan Blue 0.4 %), specifični inhibitor PDE5, β -glicerofosfat, tergitol (Niaproof 4, tip 4), ditiotritol (DTT), leupeptin, aprotinin, inhibitor AC10 KH-7 kupljeni su od Sigma Chemical Company (St. Louise, MO, USA). TMRE (tetrametilrodamin etilestar) je kupljen od kompanije Fluka (www.fluka.com). NaNO₂ i 3,3'-(hidroksinitrozo-hidrazino)bis-1-propanamin (DPTA) su nabavljeni od Alexis Biochemicals (San Diego, CA), a cGMP EIA kit i cAMP EIA kit od Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). Permeabilni cGMP/cAMP analog, 8-Br-cGMP/cAMP nabavljeni su od RBI, (Natic, MA, USA). Humani horionski gonadotropin (hCG-Pregnyl 3000 IU/mg) nabavljen je od Organon, Inc (USA). Tablete Sildenafil citrata (Viagra) kupljene su od Pfizer Inc. Rneasy kit za izolaciju ukupne RNK kupljen je od kompanije Qiagen (www.qiagen.com), dok su Superscript III kit za pripremu cDNK nabavljeni od Invitrogen-a (www.invitrogen.com). TaqMan Low Density Rat PDE Panel i Power SYBR Green PCR Master Mix su kupljeni od Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com), dok su prajmeri za real-time quantitative PCR (RQ-PCR) nabavljeni od Integrated DNA Technologies (www.dnatechnologies.com). ATP Bioluminescence Assay CLS II kit kupljen je od kompanije Roche (www.roche-applied-science.com). Ostale supstance bile su analitičke čistoće.

3.2. Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su izvedeni na mužjacima pacova soja *Wistar*, starosti od tri do dvadeset četiri meseca zavisno od ciljeva istraživanja i dizajna eksperimenata. Životinje su uzgajane u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju (br.16), Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, pri standardnim laboratorijskim uslovima kontrolisanog osvetljenja (12h svetlo/12h mrak, pri čemu se svetlo palilo u 7h) i kontrolisane temperature od $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Hranjene su standardnom paletiziranom laboratorijskom hranom za pacove (Veterinarski zavod, Subotica), a vodu su uzimale po potrebi.

Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Univerziteta u Novom Sadu (br. I-2011-02, III-2011-04) i izvedeni su u skladu sa uputstvom o gajenju, čuvanju i upotrebi laboratorijskih životinja Nacionalnih instituta za zdravlje u SAD (*National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*; NIH Publications No. 80 23, revised 1996, 7th edition).

3.3. Eksperimentalni modeli

3.3.1. Model hronične inhibicije PDE5

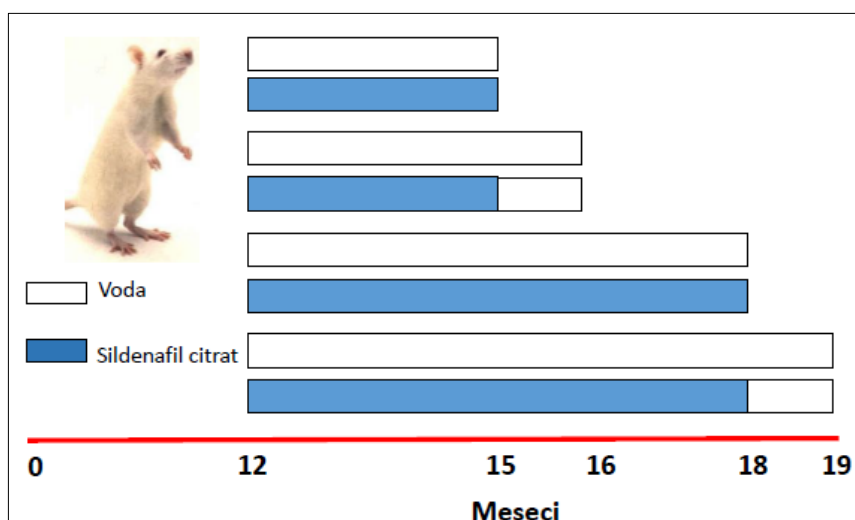
In vivo ogledi su izvedeni na mužjacima pacova starosti od tri do devetnaest meseci. Eksperimentalne životinje su svakodnevno u prepodnevnom časovima pojene s rastvorom sildenafil citrata (viagre; 0.125mg/50µl/100g telesne mase) ili vodom (50µl/100g telesne mase).

U prvoj seriji oglada životinje stare dvanaest meseci podeljene su dve grupe, kontrolnu i eksperimentalnu (Slika 3.3.1.). Eksperimentalna grupa je podeljena na četiri grupe: prva grupa životinja je svakodnevno pila sildenafil u toku tri meseca, druga grupa je takođe svakodnevno tretirana sildenafilom u toku tri meseca a nakon toga još jedan mesec sa vodom, treća grupa je svakodnevno pila sildenafil u toku šest meseci, a četvrta grupa je šest meseci pila sildenafil a nakon toga još jedan mesec vodu. Kontrolna grupa životinja je takođe podeljena u četiri grupe. Sve četiri kontrolne grupe životinja su svakodnevno pojene s vodom (na isti način kao i eksperimentalne s rastvorom sildenafil). Prva kontrolna grupa je pila vodu tri meseca, druga četiri, treća šest a četvrta sedam meseci.

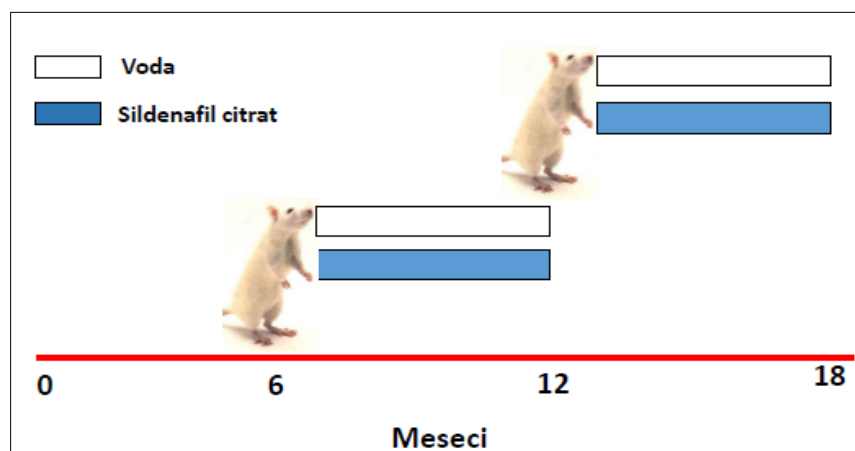
U drugoj seriji oglada eksperimentalne i kontrolne grupe činili su mužjaci pacova starosti šest i dvanaest meseci. Eksperimentalne grupe su narednih šest meseci svakodnevno u prepodnevnom časovima pojene rastvorom sildenafil citrata, dok su kontrolne grupe šest meseci svakodnevno pojene vodom (Slika 3.3.1.1.).

Obe serije oglada su osim eksperimentalnih i kontrolnih grupa odgovarajuće starosti, sadržale i grupu adultnih mužjaka (tri meseca stari pacovi). Na kraju tretmana životinje su žrtvovane dekapitovanjem uz sakupljanje krvi za dobijanje krvnog seruma i izolaciju testisa. Krvni serum korišćen je za određivanje nivoa hormona i nitrita, a testisi su

dekapsulirani i korišćeni za sakupljanje testikularnog intersticijalnog fluida (TIF), ekstrakciju steroida i izolaciju L \acute{c} .



Slika 3.3.1. Šema hronične inhibicije PDE5 (prva serija oglada)



Slika 3.3.1.1. Šema hronične inhibicije PDE5 (druga serija oglada)

3.3.2. Model akutne inhibicije PDE5

U prvoj seriji oglada životinje starosti tri i dvanaest meseci su podeljene na kontrolnu i eksperimentalnu grupu. Eksperimentalna grupa pojena je rastvorom sildenafil citrata (0.125mg/50 μ l/100g telesne mase), a kontrolna vodom (50 μ l). Pojenje životinja vršeno je u prepodnevnim časovima 2h pre žrtvovanja. U drugoj seriji oglada tretman je

sproveden na isti način kao u prvoj seriji, ali su kontrolna i eksperimentalna grupa formirane od životinja starosti četrnaest i osamnaest meseci uz grupu netretiranih adultnih mužjaka pacova. Na kraju tretmana životinje su žrtvovane dekapitovanjem uz sakupljanje krvi radi dobijanja krvnog seruma i izolaciju testisa. Krvni serum korišćen je za određivanje nivoa hormona i nitrita, a testisi su dekapulirani i korišćeni za sakupljanje TIF, ekstrakciju steroida, pripremu primarne testikularne kulture i pripremu primarne kulture L_c.

3.4. Sakupljanje testikularnog intersticijalnog fluida

Izdvajanje TIF vršeno je odmah nakon dekapitovanja životinja i izolacije testisa. Izolovani testisi su dekapulirani i odstranjen im je glavni krvni sud, nakon čega su stavljeni na mrežice (Mesh No. 100, Sigma) koje su postavljane na falkone u ledu. Testisi su postavljani pojedinačno na mrežice i centrifugirani (7min/100xg/RT) tako da se TIF sakupljao u falkon, a tkivo testisa ostalo na mrežici. Nakon centrifugiranja određivana je zapremina izolovanog TIF, a tkivo korišćeno za pripremu hemitestisa ili za izolaciju intersticijalnih ćelija. Sakupljeni TIF čuvan je na -80°C do merenja cikličnih nukleotida i/ili hormona.

3.5. Priprema primarne testikularne kulture

Nakon žrtvovanja životinja, testisi su izolovani i pripremljeni za sakupljanje i merenje testikularnog intersticijalnog fluida. Nakon centrifugiranja testisi su podeljeni na dve polovine (hemitestisi) i svaki hemitestis stavljan je u bočice sa 1.9ml 0.1%-BSA-M199 medijuma koji je sadržao samostalno ili u kombinaciji hCG (0.5ng/ml, 50 ng/ml) i donor NO (DPTA, 1μM). Medijum sa hemitestisima je aeriran, a hemitestisi su inkubirani u „shaker“ vodenom kupatilu na 34°C/30min pri brzini od 120ciklusa/min. Nakon inkubacije, sadržaj bočica podeljen je u dve epruvete koje su zatim centrifugirane 5min/1100xg. Po završenom centrifugiranju odvajan je supernatant od tkiva testisa. Supernatant je čuvan na -20°C, a talog tkiva na -80°C.

3.6. Ekstrakcija steroida iz tkiva testisa

Ekstrakcija steroida iz tkiva testisa vršena je radi određivanja koncentracije testosterona. Pre ekstrakcije svaki uzorak je izmeren i homogenizovan pomoću 1 X PBS (W:V=1:5), nakon čega su jednake zapremine svakog uzorka prenošene u nove kolekcione tubice. Dalje je na homogenat dodavan etar u odnosu 1:3, a smeša homogenata i etra je vorteksirana i zamrzavana u suvom ledu. Na suvom ledu zamrzava se samo homogenat tkiva, ali ne i etar u kome ostaju steroidi. Etar sa steroidima prenošen je u nove kolekcione tubice i uparavan. Proces ekstrakcije ponavljan je 3x. Na kraju, suvi talog je resuspendovan u puferu za RIA analizu.

3.7. Izolacija i priprema suspenzije intersticijalnih ćelija

Izolacija intersticijalnih ćelija je vršena po proceduri opisanoj od strane Ankawe i sar. (Ankawe i sar., 1985), uz manje modifikacije. Nakon žrtvovanja testisi su dekapulirani i uklanjan je glavni krvni sud, nakon čega su oba testisa jedne životinje stavljeni u falkon sa 3ml rastvora kolagenaze (0.25mg kolagenaze/ml 1.5%-BSA-M199, 20mM HEPES). Kako bi se razgradilo vezivno tkivo i oslobodile intersticijalne ćelije, testisi su inkubirani u rastvoru kolagenaze u vodenom kupatilu 15min na 34°C pri brzini od 120ciklusa/min. Po isteku inkubacije aktivnost kolagenaze zaustavljena je dodavanjem 40ml hladnog 0.5%-BSA-M199 medijuma, a u cilju odvajanja seminifernih tubula sadržaj falkona je filtriran kroz najlonske mrežice (Mesh No 100, Sigma). Profiltrirane intersticijalne ćelije centrifugirane su 5min/160xg nakon čega je supernatant odlišan a talog ćelija resuspendovan u DMEM/F12 medijumu (8ml medijuma/životinji). Ovako dobijena suspenzija predstavljala je suspenziju intersticijalnih ćelija ili grubu suspenziju L_c, koja je osim 15-18% L_c sadržala i druge tipove ćelija među kojima su najbrojnije makrofage (14-20%), ali i ćelije endotela, fibroblaste, peritubularne ćelije, germinativne ćelije, eritrocite, limfocite i ćelije vezivnog tkiva (Klinefelter i sar., 1987; Niemi i sar., 1986). Ukupan broj živih intersticijalnih ćelija u suspenziji određivan je „Trypan Blue” testom u Neubauer-ovoj komori (50μl suspenzije intersticijalnih ćelija i 50μl 0.4% rastvora trypan blue). Žive ćelije su brojane u Neubauer-ovoj komori. Vijabilnost ćelija je bila preko 95%.

3.8. Prečišćavanje Lajdigovih ćelija i priprema primarne kulture Lajdigovih ćelija

Prečišćavanje L_c ćelija predstavlja proces odvajanja L_c ćelija od ostalih ćelija intersticijuma testisa. Izdvajanje L_c ćelija vršeno je nanošenjem suspenzije intersticijalnih ćelija na kolone perkolnih gradijenata različite gustine, pri čemu su se tokom centrifugiranja ćelije raspoređivale shodno svojoj specifičnoj gustini. Kolone perkolnih gradijenata formirane su naslojavanjem rastvora perkola različite gustine i to po 2ml svakog rastvora počevši od rastvora najveće gustine (Tabela 3.8.). Na formirane kolone nanošeno je 4ml (35-40 x 10⁶ ćelija) suspenzije intersticijalnih ćelija nako čega je usledilo njihovo centrifugiranje 28min/1100xg. Izdvajanje L_c ćelija uočeno je u slojevima između 1.065/1.080 i 1.045/1.065 perkolnog gradijenta. L_c ćelije su sakupljane, ispirane od perkola dodatkom 0.1%-BSA-M199 medijuma i centrifugiranjem 5min/200xg. Nakon centrifugiranja supernatant je odlivan a ćelije resuspendovane u DMEM/F12 medijumu (5ml medijuma/životinji), potom im je određena brojnost i vijabilnost po istoj proceduri kao u slučaju intersticijalnih ćelija. Procenat L_c ćelija prisutnih u kulturi dodatno je određivan ispitivanjem aktivnosti HSD3B enzima (Payne i sar., 1980). Pripremljena suspenzija sadržala je 97.8 ± 1.3% L_c vijabilnosti preko 90%.

U zavisnosti od dizajna i potreba eksperimenata, L_c su sađene u različitom broju na odgovarajuće ploče za ćelijsku kulturu i ostavljane u inkubator (5% CO₂/34°C/3h) kako bi uspostavile normalnu metaboličku aktivnost i zalepile se za dno ploče. Nakon 3-6h, medijum za sađenje ćelija zamenjivan je medijumom za *ex vivo* tretmane - dizajniranim u skladu sa ciljevima istraživanja. Nakon svakog tretmana inkubacioni medijum je pokupljen i čuvan na -20°C, a ćelije ispirane hladnim PBS i čuvane na -80°C. Sakupljeni medijum korišćen je za merenje koncentracije nitrita i hormona, a ćelije su služile kao izvor RNA, proteina, cikličnih nukleotida itd.

Tabela 3.8. Sastav perkolnih gradijenata različitih gustina

SPECIFIČNA GUSTINA (g/ml)	3%BSA-10xDMEM/F12 (ml)	PERKOL (ml)	DESTILOVANA VODA (ml)
1.045	2	6.031	11.969
1.065	2	9.108	8.892
1.080	2	11.415	6.582

3.9. Odredjivanje koncentracije cikličnih nukleotida (cAMP i cGMP)

Koncentracija cAMP i cGMP određivana je upotrebom cAMP/cGMP EIA kompleta po uputstvu proizvođača (www.caymanchem.com). Koncentracija cikličnih nukleotida određivana je očitavanjem apsorbance tačaka standardne inhibicione krive i uzoraka na talasnoj dužini od 412nm. S obzirom da se radi o kompetitivnoj ELISA metodi u kojoj antigen obeležen enzimom i antigen iz uzorka kompetiraju za ista vezna mesta antitela, intenzitet apsorbance obrnuto je proporcionalan koncentraciji antigena (cikličnih nukleotida) u uzorku. Standardna inhibiciona kriva formirana je serijom razblaženja standarda cAMP/cGMP i bila je raspona 0.078-10pmol/ml za cAMP tj. 0.023-3pmol/ml u slučaju cGMP. Tipična IC_{50} vrednost cAMP EIA kompleta bila je 0.46pmol/ml, a granica detekcije 0.1pmol/ml (pri 80% B/B₀) za acetilovane uzorke. Vrednost IC_{50} za cGMP EIA komplet iznosila je 0.46pmol/ml, dok je granica detekcije bila 0.1pmol/ml (pri 80% B/B₀), za acetilovane uzorke. Koncentracija cikličnih nukleotida određivana je u sadržaju L_c i TIF. Prilikom merenja unutarćelijske koncentracije cikličnih nukleotida iz L_c su ekstrahovani ciklični nukleotidi pomoću apsolutnog alkohola. Nakon uparavanja, sadržaj je resuspendovan u EIA rastvaraču. S obzirom da je vezivanje antigena za antitelo 10 puta veće u slučaju acetilovanog antigena, svi uzorci i tačke standardne krive acetilovani su prema preporuci proizvođača. Procedura se izvodila u dva koraka. U prvom koraku 0.5ml uzorka/standard mešano je sa 100 μ l KOH i 25 μ l acetat anhidrida. U drugom koraku na izmešanu smešu je dodavano 25 μ l KOH, a acetilovani uzorci su do korišćenja čuvani na 4°C.

3.10. Određivanje koncentracije hormona

Nivo hormona testosterona, LH i progesterona meren je radioimunološkom analizom. Koncentracija testosterona i progesterona određivana je očitavanjem scintilacionog signala standardne inhibicione krive i uzoraka na scintilacionim brojaču (Liquid Scintillation counter Wallac 1410, Pharmacia, Finland). Kako se metoda bazira na kompeticiji između radioaktivnog antigena i antigena iz uzorka za vezna mesta na antitelu, intenzitet scintilacije obrnuto je proporcionalan koncentraciji hormona u uzorku. Standardna inhibiciona kriva formirana je serijom razblaženja standarda testosterona/progesterona i imala je opseg od 0.00625 do 0.8ng/100 μ l, a zavisno od hormona korišćeno je specifično antitelo. Antiserum specifičan za određeni hormon

razblaživan je tako da je maksimalno vezivanje obeleženog antigena u odsustvu neobebeženog 30-50%. Radioaktivnost obeleženog antigena je podešavana na 4500 otkucaja/min/100 μ l, a odvajanje slobodnog od vezanog liganda vršeno je rastvorom aktivnog uglja (0.25mg aktivnog uglja se rastvara u 1l rastvarača). Prilikom određivanja koncentracije testosterona korišćen je anti-testosteron-11-BSA serum No. 250 (Niswender (Colorado State University, Fort Collins, CO), preciznost analize bila je 6pg/epruveti, a koeficijent varijacije u okviru jedne analize 5-8%. Izmerene koncentracije testosterona predstavljale su sumu testosterona i dihidrotestosterona (DHT), zbog visoke (100%) unakrsne reaktivnosti antiseruma. Razdvajanje T od DHT nije vršeno jer je poznato da je koncentracija T oko 20 puta veća od koncentracije DHT u serumu odraslih mužjaka pacova (Punjabi i sar., 1983). Za potrebe merenja koncentracije progesterona u uzorcima korišćen je anti-progesteron-11-BSA serum No. 337 Niswender (Colorado State University, Fort Collins, CO). Preciznost analize za progesteron bila je 6pg/epruveti a koeficijent varijacije u okviru jedne analize 6-8%.

Određivanje koncentracije LH u serumu vršeno je prema uputstvu proizvođača (www.alpco.com). Preciznost analize bila je 1ng/ml, koeficijent varijacije u okviru jedne analize 4.2%, a minimalna detektovana koncentracija iznosila je 0.14ng/ml.

3.11. Određivanje ukupne količine proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određivana je fotometrijski Bradfordovom metodom (Bradford, 1976). Ukratko, Bradfordov reagens u prisustvu proteina menja boju iz tamno crvene u stabilnu plavu čiji je intenzitet direktno proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku. Koncentracija proteina određivana je merenjem apsorbance uzoraka i tačaka standardne krive korišćenjem parametara linearne regresije. Standardna kriva formirana je serijom razblaženja standarda BSA u rasponu od 0.4 do 3 μ g, a apsorbance je očitavana na 594nm. Prilikom određivanja koncentracije proteina 50 μ l uzorka/standarda mešano je sa 200 μ l profiltriranog Bradfordovog reagensa nakon čega su uzorci međusobno koncentracijski ujednačeni.

Oslobađanje proteina iz ćelijskog sadržaja ili tkiva vršeno je njihovim liziranjem u prisustvu pufera za liziranje. Pufer za liziranje sadržao je sve komponente neophodne za efikasno oslobađanje proteina iz biološkog materijala kao i inhibitore proteaza i fosfataza

(HEPES (20mM), EDTA (10mM), MgCl₂ (2.5mM), DTT (1mM), β-glicerofosfat (40mM), NP40 (1%), leupeptin (2μM), aprotinin (1μM), AEBSF (0.5mM), komercijalni komplet inhibitora fosfataza (www.roche-applied-science.com)).

3.12. Analiza proteina u uzorcima

3.12.1. Sodijum Dodecil Sulfat PoliAkrilamid Gel Elektroforeza (SDS-PAGE), nativna elektroforeza i Western blot

Nakon određivanja koncentracije i međusobnog ujednačavanja, proteini su razdvajani jednodimenzionalnom SDS-PAGE (denaturišućom) ili nativnom elektroforezom u kontinuiranom puferском sistemu. Denaturišuće i nativne elektroforeze vršene su u Mini-PROTEAN 3 Cell aparaturi prema uputstvu proizvođača (www.bio-rad.com).

Nakon elektroforetskog razdvajanja proteina vršen je njihov prenos na PVDF (polyvinylidene difluorid, Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) membranu, metodom mokrog transfera (elektroblotting) po uputstvu proizvođača (www.bio-rad.com). Imunodetekcija željenih proteina vršena je pomoću specifičnih monoklonskih i poliklonskih antitela. Vizuelizacija signala izvršena je upotrebom supstrata za detekciju reakcije luminolom (Pierce, Rockford, IL). Reaktivne trake su detektovane sistemom povećane hemiluminiscencije uz upotrebu rendgenskih filmova ili My ECTL aparata (Thermo Scientific, USA) koji detektuje signal sa membrane. Detekcija odgovarajuće proteinske frakcije vršena je na osnovu proteinskih markera poznatih molekulskih masa u rasponu 4-250kDa (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen). Imunoreaktivne trake analizirane su kao dvodimenzione slike u programu Image J (version 1.32, National Institutes of Health).

3.13. Analiza eksprimiranja gena

3.13.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija

Ukupna RNK izolovana je iz preparata primarne kulture L_c ili testikularnog tkiva, pomoću RNeasy mini kompleta (RNeasy mini kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača (www.qiagen.com). Nakon izolacije koncentracija i čistoća RNK određivana je spektrofotometrijski na aparatu Nanodrop (Thermo scientific,

(www.lifetechnologies.com)). Čistoća izolovane RNK određivana je merenjem i odnosom apsorbanci na talasnim dužinama od 260nm i 280nm, a odnos apsorbanci kretao se u vrednostima od 1.8 do 2 što je RNK činilo pogodnom za dalju analizu eksprimiranja gena. U cilju uklanjanja zaostale genomske DNK rađen je DNK-za tretman prema uputstvu proizvođača (www.invitrogen.com). Tokom procedure 1µg RNK tretiran je sa 1µl IU DNaze, a tretman je sproveden nad celokupnom izolovanom RNK. Nakon DNK-ze tretmana procesom reverzne transkripcije RNK je prevođena u cDNK Superscript III kompletom prema uputstvu proizvođača (www.invitrogen.com). Sintetisana cDNK čuvana je na -20°C i korišćena za RQ-PCR analizu.

3.13.2. Analiza eksprimiranja gena real time PCR reakcijom

Analiza eksprimiranja gena real time PCR reakcijom vršena je SYBR Green i TaqMan tehnologijom. TaqMan tehnologijom tj. upotrebom TaqMan Low Density Rat Phosphodiesterase Panel Assay, analiziran je eksprimirajući profil gena za fosodiesteraze. U esej je stavljano 100ng cDNA i upotrebom aparata ABI Prism 7900HT Fast Real-Time (Applied Biosystems) vršena je real-time PCR reakcija pri standardnim uslovima (50 °C/2min, 95 °C/10min; i 40 ciklusa, od kojih je svaki bio pri 95 °C/15sec, a potom 60 °C/1min). Kinetika eksprimiranja praćena je upotrebom programa ABI Prism 7900HT SDS i RQ Manager Software, a kao interna kontrola korišćen je eksprimirajući profil *Actb*. SYBR Green tehnologija korišćena je za potrebe analize eksprimirajućih profila svih ostalih gena, pri čemu je za odigravanje PCR reakcije i praćenje kinetike eksprimiranja korišćena ista metodologija kao i u slučaju TaqMan tehnologije. Prilikom izvođenja metode, 5µl razblažene cDNK mešano je sa miksom koji je sadržao Power SYBR Green PCR Master Mix i 500nM forward (F) i reverse (R) prajmere, a kao endogena kontrola korišćen je *Actb* i *Gapdh*.

Prajmeri korišćeni u radu dizajnirani su pomoću programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) i sekvenci gena (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez).

Tabela 3.13.2. Sekvence prajmera korišćenih za RQ-PCR anлізу

GEN	PRISTUPNI KOD U BANCI GENA	SEKVENCA PRAJMERA
<i>Adcy10</i>	NM_021684	F: 5'-CCAGGCATCGTGACCTGCGA-3' R: 5'-ACTGGTCCGGGATCCGCAAC-3'
<i>Adcy3</i>	NM_130779	F: 5'-GCATCGAAACCTACCTCATCA-3' R: 5'-TGGGCTCCTTGGTCTCA ATAA -3'
<i>Adcy5</i>	NM_022600	F: 5'-AACCAGGTGAACGCATGTCA-3' R: 5'-CTCTGGGAAGTTGCAGTTGGA-3'
<i>Adcy6</i>	NM_012821	F: 5'-CTGCCTCAGCCTGCTTATGTG-3' R: 5'-GGAGTCCTGGCGGAAGCT-3'
<i>Adcy7</i>	NM_053396	F: 5'-TTCCGTGCGTGTAACCCGCT-3' R: 5'-GCCTTCTGCCTCCGTCCGTT-3'
<i>Adcy9</i>	NM_001106980	F: 5'-TCACCAAGCTGTACGCCCGG-3' R: 5'-GGGCTGTCAACACGTCCCGA-3'
<i>Actb</i>	NM_031144.2	F: 5'-CCTAAGGCCAACCGTGAAAA-3' R: 5'-GCCTGGATGGCTACGTACATG-3'
<i>Bmg2</i>	NM_012512.2	F: 5'-GCGTGGGAGGAGCATCAGGG-3' R: 5'-CTCATCACCACCCCGGGGACT-3'
<i>Cox4/1</i>	NM_017202	F: 5'-CGCTGAGATGAACAAGGGCACC-3' R: 5'-TCCCAGATCAGCACAAGCGCA-3'
<i>Cox4/2</i>	NM_053472	F: 5'-CACAGCCCAGGAAGTGCTGCTA-3' R: 5'-TGTGCAGTAAGGCTCATCCGGC-3'
<i>Creb</i>	NM_031017.1	F: 5'-CCAACCCCGATTTACCAAAC-3' R: 5'-CCATTGTTAGCCAGCTGTATTGC-3'
<i>Cyp11a1</i>	NM_017286.2	F: 5'-GCAGCGACTCTCTTCTCCTGCC-3' R: 5'-GCCATCACCTCTTGGTTTAGGACAATT-3'
<i>Cyp17</i>	NM_012753	F: 5'-GCCACGGGCGACAGAA-3' R: 5'-GCCTTTGTTGGGAAAAATCG-3'
<i>Cyp19</i>	NM_017085	F: 5'-TCCTCCTGATTCGGAATTGTG-3' R: 5'-GGCCCGATTCCCAGACA-3'
<i>Cytc</i>	NM_012839	F: 5'-GCAAGCATAAGACTGGACCAA-3' R: 5'-TTGTTGGCATCTGTGTAAGAGAATC-3'
<i>Dax-1</i>	NM_053317	F: 5'-GCCGAGGGCCCCCTGGTGGGAC-3' R: 5'-GATCTGGAAGCAAGGCAAGT-3'
<i>Dusp1</i>	NM_053769.3	F: 5'-CTGCTTTGATCAACGTCTCG-3' R: 5'-AAGCTGAAGTTGGGGGAGAT-3'
<i>Erk1 (Mapk3)</i>	NM_017347.2	F: 5'-TCCCTCTCAAGCTGCCACAT-3' R: 5'-ACATCCAATCACCCACACACA-3'
<i>Erk2 (Mapk1)</i>	NM_053842.1	F: 5'-GTTCTGCACCGTGACCTCAAG-3' R: 5'-GCAAGGCCAAAGTCACAGATC-3'
<i>Erk3 (Mapk6)</i>	NM_031622.2	F: 5'-CATTTGAACTGGCATGTGTTT-3' R: 5'-CCTGCACTGCATTGTTTGC-3'
<i>Hif1a</i>	NM_024359.1	F: 5'-CCTTCGAATGCCAGATCACA-3' R: 5'-TTTAAACGACACTACAGCAATGCA-3'

<i>Gapdh</i>	NM_017008	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'
<i>Gata4</i>	NM_144730	F: 5'-GATGGGACAGGACACTACCTATGC-3' R: 5'-GGCGCTGAGGCTTGATGA-3'
<i>Gucy1b1</i>	AB098025	F: 5'-AAGAGGCCTGTACCTGAGTGACA-3' R: 5'-GTTTGTACTCCTCCCGGAACTG-3'
<i>Hsd17b4</i>	NM_024392	F: 5'-CCTTTGGCTTTGCCATGAGA-3' R: 5'-CAATCCATCCTGCTCCAACCT-3'
<i>Hsd3b1/2</i>	NM_001007 719.3	F: 5'-GACAGGAGCAGGAGGGTTTGTGG-3' R: 5'-CTCCTTCTAACATTGTCACCTTGGCCT-3'
<i>Insl3</i>	NM_053680 .1	F: 5'-CGCCAAGCTCTGTGGTCA-3' R: 5'-CTGAGAAGCCTGGTGAGGA-3'
<i>Lhr</i>	NM_012978	F: 5'-CGGGCTGGAGTCCATTCA-3' R: 5'-TTCTTTGGAGGGCAGTGTTTTTC-3'
<i>Map2k1</i>	NM_031643 .4	F: 5'-ATGGTGGGTCCTTGGATCAA-3' R: 5'-CACAGCGATGCTGACTTTTCC-3'
<i>Map2k2</i>	NM_133283 .1	F: 5'-AGAACTGGGTGCAGGCAATG-3' R: 5'-TCAGCTTTCTGGCCATGATG-3'
<i>Mapk11</i> (p38b)	NM_001109 532.2	F: 5'-GGGCGCTGACCTGAATAACA-3' R: 5'-GCAGCAGCTGGTAGACAAGGA-3'
<i>Mapk12</i> (p38g)	NM_021746 .1	F: 5'-GGATGTGTTCACTCCCGATGA-3' R: 5'-CCAGGTCAGTGCCCATGAAT-3'
<i>Mapk13</i> (p38d)	NM_019231 .2	F: 5'-CTGGTCTGTTGGCTGCATCA-3' R: 5'-TCAGCTGGTCCAGGTAGTCCTT-3'
<i>Mapk14</i> (p38a)	NM_031020 .2	F: 5'-GCTGTGACCTGCTGGAAAA-3' R: 5'-TAGGCATGCGCAAGAGCTT-3'
<i>Mt-Nd1</i>	/	F: 5'-GAGCCCTACGAGCCGTTGCC-3' R: 5'-GCGAATGGTCCTGCGGCGTA-3'
<i>Nampt</i>	NM_177928 .3	F: 5'-GCAGAAGCCGAGTTCAACATC-3' R: 5'-CTTGTGTTGGGTGGGTATTGTTT-3'
<i>Nos1</i>	NM_052799	F: 5'-CCAATGTTCAAAAAACGAGTCT-3' R: 5'-TCGGCTGGACTTAGGGCTTT-3'
<i>Nos2</i>	NM_012611	F: 5'-TGCTAATGCGGAAGGTCATG-3' R: 5'-GCTTCCGACTTTCCTGTCTCA-3'
<i>Nos3</i>	NM_021838	F: 5'-CACAAGAGTTACAAAATCCGATTCA-3' R: 5'-TCTGTGTTACTGGATTCCCTTCCTTT-3'
<i>Nrf1</i>	NM_001100 708	F: 5'-GACCATCCAGACGACGCAAGCA-3' R: 5'-ATGGGCGGCAGCTTCACTGTT-3'
<i>Nrf2</i>	NM_001108 841	F: 5'-AGCGGAACTGAACCGCTTGGT-3' R: 5'-GTGACTGGCTGAGCAATCCCGT-3'
<i>Nur77 (Nr4a1)</i>	NM_024388	F: 5'-GGCATGGTGAAGGAAGTTGT -3' R: 5'-GATTGGTAGGGGAGGCATCT -3'
<i>Pde4a</i>	NM_013101 .3	F: 5'-CGGGAGCGTGGAATGG-3' R: 5'-GATGAAGCCCACATGAGACTTC-3'

<i>Pde4b</i>	NM_017031 .2	F: 5'-AGGCCTGCACAAAACAAA-3' R: 5'-CCTTGCATTCTGGCTCCAAA-3'
<i>Pde5</i>	NM_133584	F: 5'-GCTGGATGGCTGCAGGAA-3' R: 5'-CCCCATTAAGGAGCGTCTTCT-3'
<i>Ppargc1a</i>	NM_031347	F: 5'-AGCCGTAGGCCAGGTATGACA-3' R: 5'-TGCTTGGCCCTTTCAGACTCCC-3'
<i>Ppargc1b</i>	NM_176075	F: 5'-ACCTTCCGGTGTTCGGAGCATG-3' R: 5'-GTGGAAGGAGGGCTCATTGCGT-3'
<i>Prkaca</i>	NM_001100 922.1	F: 5'-TCAGTGAGCCCCACGCCCGTT-3' R: 5'-TCTCGGGCTTCAGGTCCCGG-3'
<i>Prkacb</i>	NM_001077 645	F: 5'-GGGTCATGGGGAACACGGCG-3' R: 5'-CCAGCATTACTCGGGGGAGGGT-3'
<i>Prkar1a</i>	NM_013181	F: 5'-TGTGCTGCAGCGTCCGGTCAG-3' R: 5'-AGTGGCAGCCCGAGGACGAT-3'
<i>Prkar2a</i>	NM_019264	F: 5'-GCCCCGACCTCGTCGACTTCG-3' R: 5'-TCCTGCGCGTGAAAGGTCGT-3'
<i>Prkg1</i>	NM_001105 731	F: 5'-CCCACGGACACAAGCAATTT-3' R: 5'-CCCAGCCTGAGTTGTCATCA-3'
<i>Scrab1</i>	NM_031541	F: 5'-GAAGGCATCCCCACTTATCG-3' R: 5'-CGGACCCGTTGGCAA-3'
<i>Sf-1 (Nr5a1)</i>	NM_001191 099	F: 5'-CCGCGGGCATGGACTA-3' R: 5'-TTGTCACCACACACTGGACACA-3'
<i>Sirt1</i>	XM_006223 877.1	F: 5'-GGCCTCAAAGTACCTGGGATT-3' R: 5'-AGATCAAAAAGCTGCTGCTCAGA-3'
<i>Star</i>	NM_031558	F: 5'-AGCCAGCAGGAGAATGGAGAT-3' R: 5'-CACCTCCAGTCGGAACACCTT-3'
<i>Tspo</i>	NM_012515	F: 5'-TTGGTGCCCGGCAGAT-3' R: 5'-TTGCCACCCCACTGACAAG-3'

3.14. Određivanje koncentracije nitrita u uzorcima

Koncentracija nitrita u uzorcima određivana je Grisovom metodom (Green i sar., 1982), uz manje modifikacije. Ukratko, u reakciji nitrita i Grisovog reagensa nastaje ljubičasti-azo kompleks čiji je intenzitet boje direktno proporcionalan koncentraciji nitrita u uzorku. Koncentracija nitrita određivana je merenjem apsorbanace uzoraka i tačaka standardne krive uz korišćenje parametara linearne regresije. Standardna kriva formirana je serijom razblaženja rastvora NaNO₂ u rasponu od 0.195 do 100μM, a zavisno od uzoraka kao slepa proba korišćena je destilovana voda ili medijum za gajenje ćelija. Prilikom određivanja koncentracije nitrita, uzorak/standard i Grisov reagens mešani su u odnosu 1:1, nakon čega je smeša inkubirana 10min/RT u mraku, a apsorbanaca očitavana na talasnoj dužini od 546nm.

Koncentracija nitrita određivana je u serumu eksperimentalnih životinja i inkubacionom medijumu L_c i testikularnog tkiva, a korišćena je kao pokazatelj nivoa NO u uzorcima. U oba slučaja uzorci su razblaživani tako da se apsorbancija čitala blizu središnje tačke krive, a u slučaju seruma bilo je potrebno ukoniti serumske proteine. Uklanjanje proteina iz seruma izvršeno je dodavanjem ZnSO₄ (400μl seruma + 24mg ZnSO₄), mešanjem i centrifugiranjem smeše (10min/16000xg/4° C). Nakon centrifugiranja proteini su taloženi, a supernatant korišćen za merenje koncentracije nitrita (Ghasemi i sar., 2007).

3.15. Merenje membranskog potencijala mitohondrija i potrošnje kiseonika

Membranski potencijal mitohondrija meren je pomoću TMRE (tetrametilrodamin-etil-estar) boje. TMRE boja je narandžasto-crvena fluorescentna boja, pozitivnog naelektrisanja i hidrofobne strukture, što joj obezbeđuje lak prolaz kroz ćelijske membrane i nakupljanje u mitohondrijskom matriksu. Kretanje boje prema negativnom polu membrane i slabo zadržavanje na plazmalemi i membranama ćelijskih organela čini TMRE boju pogodnom za praćenje promena membranskog potencijala mitohondrija. Step en fluorescencije TMRE boje direktno je proporcionalan naelektrisanju membrana mitohondrija tj. opada sa depolarizacijom i raste sa hiperpolarizacijom unutrašnje mitohondrijske membrane.

Prečišćene L_c sađene su u crne mikrotitar ploče sa 96 bunarića (10⁵ ćelija/bunaru) i stavljan e u inkubator (5% CO₂/34°C/2h,) kako bi se oporavile od procesa prečišćavanja i pričvrst ile se za dno ploče. Nakon isteka inkubacionog perioda medijum za sađenje ćelija zamenjivan je medijumom sa TMRE bojom (100nM TMRE boje u 0.1%-BSA-M199 medijumu) i ćelije su sa bojom inkubirane 20min. Po isteku inkubacije medijum sa bojom je zamenjen 0.1%-BSA-M199 medijumom, a fluorescenca je očitavana na fluorimetru (Fluorescan, Ascent FL, Thermo Lab systems; Waltham, MA) sa maksimumom ekscitacije na 550nm i maksimumom emisije na 590nm.

Potrošnja kiseonika od strane L_c je merena u zatvorenoj komori sa suspenzijom ćelija od 15x10⁶/3ml na temperaturi od 34°C koja je sadržala Klarkovu elektrodu za merenje nivoa kiseonika. Elektroda je bila povezana sa YSI modelom 5300 monitora (YSI, Yellow

Springs, OH). Izračunavanje potrošnje kiseonika i formiranje krive je rađeno korišćenjem Digital Multimeter VC 820 (Conrad Electronic) i softvera Digiscope za Windows (version 2.06).

3.16. Merenje koncentracije ATP

Koncentracija ATP je određivana upotrebom ATP Bioluminescence Assay CLS II kompleta, prema uputstvu proizvođača (www.roche-applied-science.com). Ukratko, u reakciji ATP i luciferaze emituje se luminiscentni signal čiji je intenzitet direktno proporcionalan količini ATP u uzorku. Koncentracija ATP u uzorku je određivana očitavanjem luminiscencije uzorka i tačaka standardne krive (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} i 10^{-11} M). Prilikom određivanja nivoa ATP, 50 μ l standarda/uzorka mešano je sa 50 μ l luciferaze koncentracije mg/ml, a luminiscenca je očitavana na aparatu Fluoroscan Ascent FL proizvođača ThermoLabsystems (www.labsystems.fi). Svi uzorci mereni su u duplikatu u jednom eseju, a kao slepa proba korišćena je destilovana voda.

Uzorci su pripremljeni prema uputstvu proizvođača (www.roche-applied-science.com). Nakon stimulacije, suspenzija L \acute{c} ($2-3 \times 10^6$ Lc/400 μ l) je centrifugirana (5min/1200xg/RT), supernatant odlivan a talog resuspendovan u destilovanoj vodi uz dodatak ključalog rastvora Tris-EDTA (v:v=1:9). Resuspendovan talog je zatim inkubiran 2min/100 $^{\circ}$ C, centrifugiran 1min/900xg/RT a dobijeni supernatant korišćen za merenje koncentracije ATP.

3.17. Statistička analiza

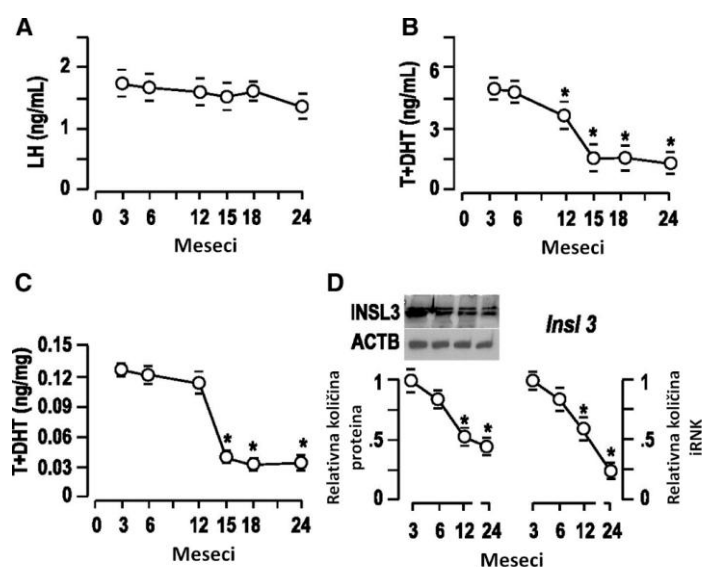
Za *in vivo* eksperimente rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM iz tri do pet nezavisnih eksperimenata (4-8 pacova/grupi/eksperimentu). Za *ex vivo* merenja rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM iz tri do pet nezavisnih eksperimenata. Rezultati svakog eksperimenta analizirani su Mann-Whitney neparametarskim testom i one-way ANOVA, i Student-Newman-Keuls testom. Za sve statističke analize kao kriterijum statističke značajnosti razlika uzeta je granica verovatnoće $p < 0.05$.

4. Rezultati

4.1. Karakterizacija endokrine funkcije Lajdigovih ćelija starog fenotipa kod *Wistar* pacova

4.1.1. Promene funkcionalnosti gonadotropnih ćelija adenohipofize i Lajdigovih ćelija testisa

Funkcionalni status gonadotropnih ćelija i L α ustanovljen je merenjem nivoa LH i androgena (T+DHT) u serumu životinja starosti tri, šest, dvanaest, petnaest, osamnaest i dvadeset četiri meseca, kao i merenjem nivoa T+DHT i INSL3 u sadržaju L α pomenutih starosnih dobi. Dobijenim rezultatima ustanovljeno je da nivo LH ostaje nepromenjen tokom života mužjaka pacova (Slika 4.1.1.A) ukazujući na očuvanu funkcionalnost gonadotropnih ćelija u svim životnim dobima jedinke. Poređenjem nivoa T+DHT u serumu adultnih mužjaka i mužjaka drugih starosnih kategorija ustanovljeno je da koncentracija T+DHT u serumu progresivno opada tokom života dostižući smanjenje od 21.7% u dvanaestom mesecu koje se nastavlja i dostiže 48.2% u dvadeset četvrtom mesecu života pacova (Slika 4.1.1.B). Smanjen nivo T+DHT u serumu parćen je smanjenim nivoom T+DHT u sadržaju L α , (64.6% u ćelijama petnaestomesečnih u odnosu na tromesečne; Slika 4.1.1.C) kao i smanjenim eksprimiranjem *Insl3* (Slika 4.1.1.D-desni panel) i nivoom INSL3 (marker funkcionalnosti L α) od dvanaestog meseca života jedinke (Slika 4.1.1.D-levi panel).

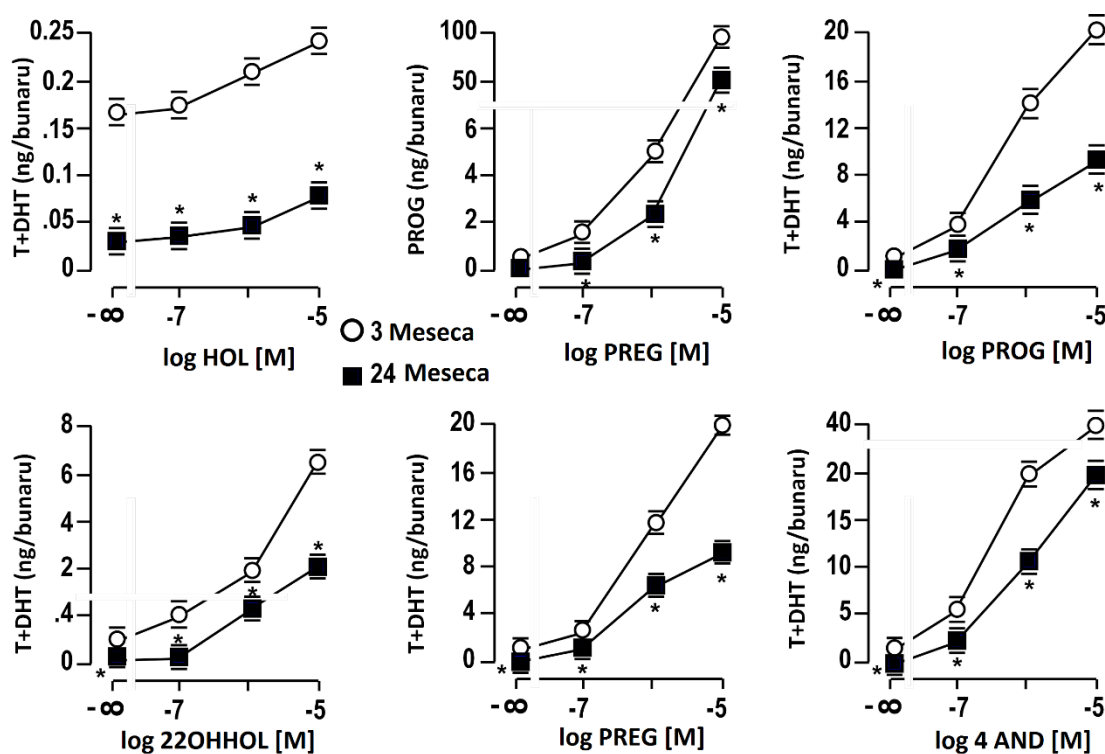


Slika 4.1.1. Nivoi LH, T+DHT i INSL3 tokom starenja mužjaka *Wistar* pacova. Pacovi (6-8/grupi) starosti tri, šest, dvanaest, petnaest, osamnaest i dvadeset četiri meseca su žrtvovani uz sakupljanje seruma za određivanje nivoa LH (A) i T+DHT (B) RIA metodom. L α korišćene su za određivanje nivoa unutarćelijskog T+DHT (C) kao i za izolaciju

proteina i ukupne RNK radi analize profila ekspimiranja *Insl3/INSL3* primenom RQ-PCR u prisustvu specifičnih prajmera (D-levi panel) i Western blot metode (D-desni panel). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i drugih starosnih dobi.

4.1.2. Promene steroidnog kapaciteta Lajdigovih ćelija

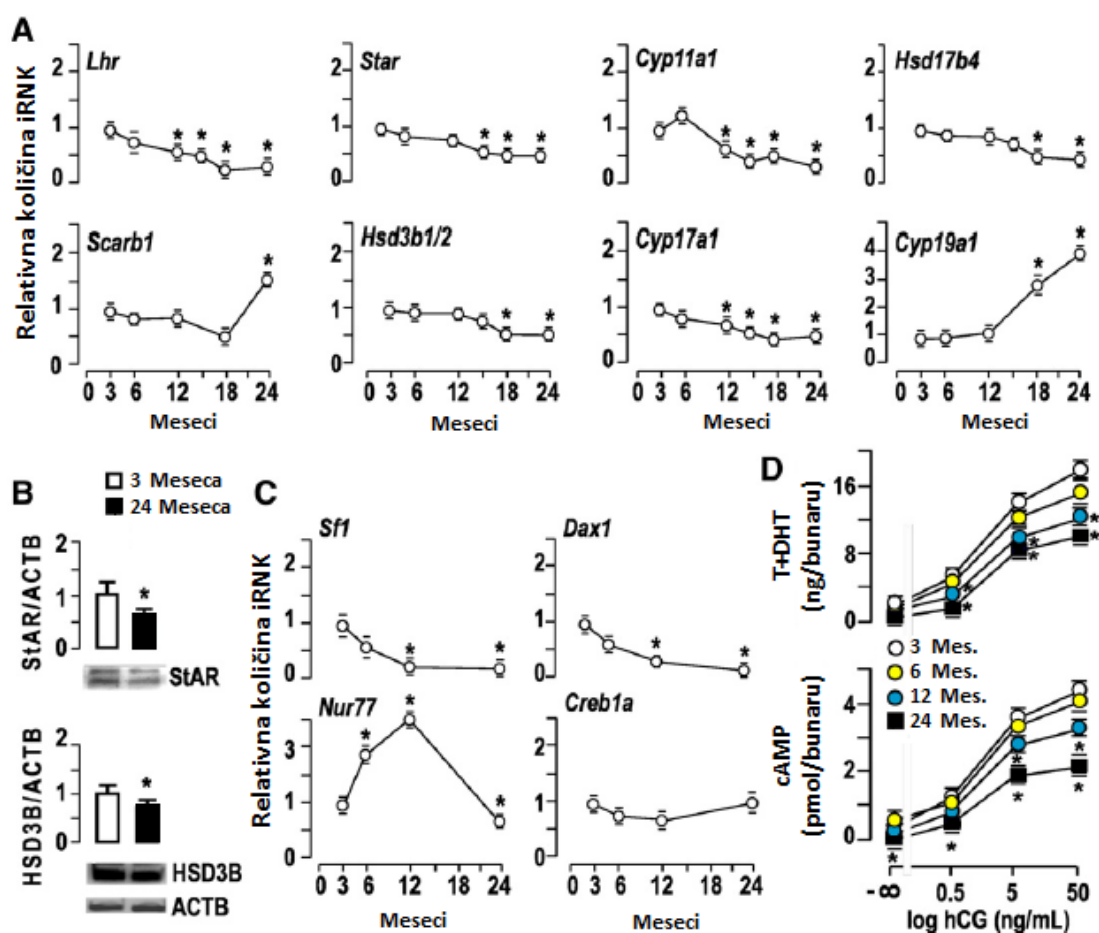
Nizak steroidogeni kapacitet L α dvadesetčetvoromesečnih (starih) pacova potvrđen je smanjenom sposobnošću starih L α da u dozno-zavisnom maniru konvertuju steroidogene supstrate holesterol (HOL), 22-hidroksiholesterol (22OHHOL), pregnenolon (PREG) i Δ^4 -androstendion (AND) u T+DHT i progesteron (Slika 4.1.2.).



Slika 4.1.2. Steroidogeni kapacitet L α izolovanih iz tromesečnih (adultnih) i dvadesetčetvoromesečnih (starih) mužjaka *Wistar* pacova. Izolovane L α posadene su (2×10^5 /bunaru) i ostavljene da se inkubiraju 2h/34 °C/5%CO $_2$, nakon čega su stimulisane steroidogenim supstratima (holesterol, 22OH-holesterol, pregnenolon, progesteron i Δ^4 -androstendion) u naredna 2h/34 °C/5%CO $_2$. Nakon završene stimulacije inkubacioni medijum je sakupljen u cilju određivanja nivoa T+DHT i progesterona RIA metodom. Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i dvadesetčetvoromesečnih životinja.

Poređenje nivoa ekspimiranja gena povezanih sa steroidogenezom od trećeg do dvadeset četvrtog meseca života, u odnosu na treći mesec je pokazalo značajno smanjenje ekspimiranja *Lhr*, *Cyp11a1*, i *Cyp17a1* u dvanaestom mesecu, *Star* u petnaestom mesecu, *Hsd3b1/2* i *Hsd17b4* u osamnaestom mesecu, kada je detektovano i povećanje ekspimiranja *Cyp19a1* (Slika 4.1.2.1.A). Profil ekspimiranja *Scrab1a* nije bitno odstupao od tromesečnih kontrola sve do dvadeset četvrtog meseca života kada je detektovano značajno povećanje ekspimiranja (Slika 4.1.2.1.A). Analiza ekspimiranja gena za transkripcionie faktore uključene u regulaciju steroidogeneze je pokazala značajno smanjenje ekspimiranja *Sfl* i *Dax1* u dvanaestom mesecu, dok se ekspimirajući profil *Creb1a* nije menjao tokom života pacova (Slika 4.1.2.1.C). *Nur77* je pokazao bifazni profil ekspimiranja sa značajnim porastom između šestog i dvanaestog meseca, nakon čega je detektovano postepeno smanjenje koje je dostiglo statističku značajnost u dvadeset četvrtom mesecu (Slika 4.1.2.1.C). Uz promene u ekspimiranju gena, detektovano je i značajno smanjenje nivoa StAR i HSD3B u dvadeset četvrtom mesecu starosti pacova (Slika 4.1.2.1.B).

Analiza steroidogenog kapaciteta L α poreklom od životinja starih tri, šest, dvanaest i dvadeset četiri meseca u prisustvu rastućih koncentracija hCG je pokazala značajno smanjen steroidogeni kapacitet L α u dvanaestom i dvadeset četvrtom mesecu. Ovo smanjenje se manifestovalo smanjenom bazalnom produkcijom T+DHT kao i smanjenom sintezom T+DHT kao odgovor na submaksimalne i maksimalne koncentracije hCG (Slika 4.1.2.1.D-gornji panel). Istovremeno, u uzorcima sa smanjenom produkcijom T+DHT detektovan je smanjen nivo unutarćelijskog cAMP (Slika 4.1.2.1.D-donji panel).



Slika 4.1.2.1. Starenjem izazvane promene elemenata steroidogene mašinerije u Lc Wistar pacova. Ukupna RNK i proteini izolovani su iz Lc (2×10^6) i pripremljeni za RQ-PCR i Western blot analizu. A,C RQ-PCR analiza ekspresiranja gena *Lhr*, *Cyp11a1*, i *Cyp17a1*, *Star*, *Hsd17b4*, *Hsd3b1/2*, *Scarb1*, *Cyp19a1*, *Sfl*, *Dax1*, *Nur77*, *Creb1a* vršena je u prisustvu specifičnih 500nM prajmera. B, imunoreaktivni bendovi u Western blot analizi dobijeni su upotrebom specifičnog primarnog antitela za StAR i HSD3B i odgovarajućeg sekundarnog antitela. Stimulacija Lc (2×10^6) vršena je rastućim koncentracijama hCG u trajanju od 2h. Po isteku inkubacionog perioda sakupljen je medijum za određivanje nivoa T+DHT (D-gornji panel), a ćelije su lizirane apsolutnim etanolom radi merenja nivoa cAMP ELISA testom (D-donji panel). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi.

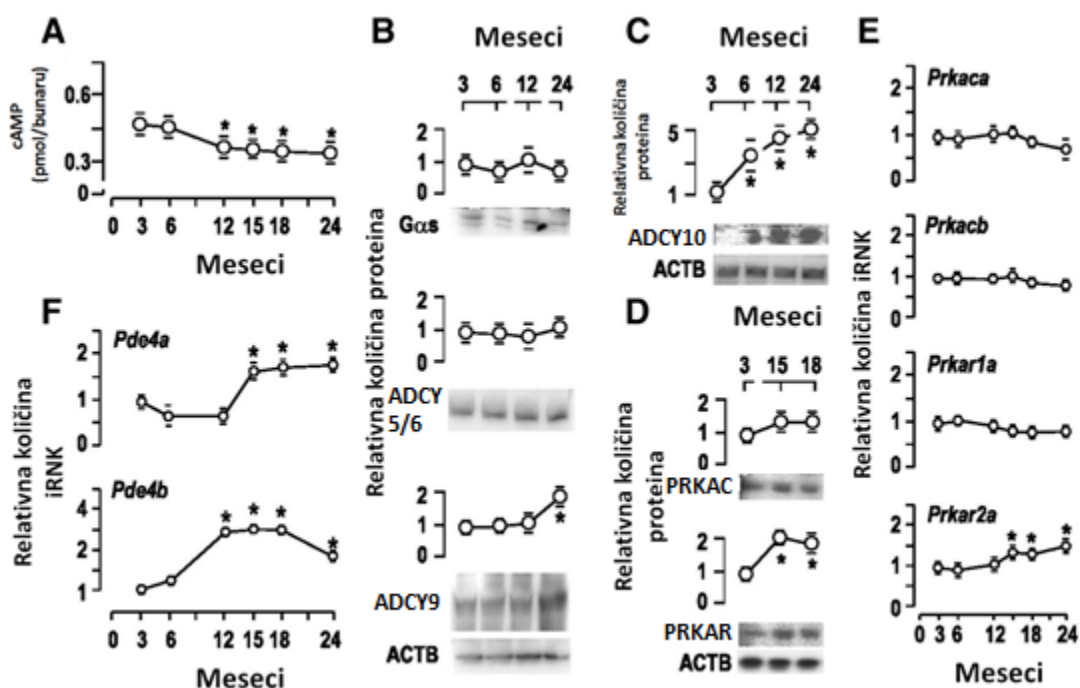
4.2. Uticaj starenja na ćelijsku signalizaciju koja reguliše sintezu testosterona

4.2.1. Promene cAMP signalizacije i posledice na steroidogenu funkciju Lajdigovih ćelija

Kako tokom života pacova L \acute{c} proizvode manje T+DHT i slabije odgovaraju na prisustvo hCG ispitan je i uticaj starenja na nivo cAMP, kao i uticaj starenja na profil ekspresiranja gena i nivo proteina odgovornih za sintezu i razgradnju cAMP. Osim toga, ispitan je i uticaj starenja na profil ekspresiranja i nivo proteina katalitičkih i regulatornih subjedinica PRKA čime se dobio uvid u sposobnost L \acute{c} da odgovore na prisustvo cAMP. U saglasnosti sa postavljenim ciljevima ustanovljeno je da se produkcija cAMP značajno smanjuje od dvanaestog meseca života pacova (Slika 4.2.1.A) i da je praćana značajno povišenim ekspresiranjem *Pde4b* od dvanaestog meseca (Slika 4.2.1.F-donji panel) i *Pde4a* od petnaestog meseca (Slika 4.2.1.F-gornji panel) života pacova. Istovremeno nije detektovana promena Gas subjedinica G proteina (Slika 4.2.1.B-gornji panel) i ADCY5/6 (Slika 4.2.1.B-srednji panel, Tabela 4.2.1.). Nivo ADCY9 se značajno povećao u L \acute{c} životinja starih dvadeset četiri meseca (Slika 4.2.1.B-donji panel). Nasuprot relativnoj stabilnosti ekspresije ADCY vezanih za ćelijsku membranu, solubilna ADCY10 je bila povećana u L \acute{c} dobijenim od pacova starih šest do dvadeset četiri meseca (Slika 4.2.1.C). Merenjem nivoa proteina i definisanjem ekspimirajućeg profila gena ustanovljeno je da katalitička subjedinica PRKA ne menja nivo proteina niti stepen ekspresiranja gena tokom života pacova (Slika 4.2.1.D-gornji panel; 4.2.1.E-gornji panel). U slučaju regulatorne subjedine detektovan je povišen nivo proteina (Slika 4.2.1.D-donji panel) i povećan stepen ekspresiranja *Prkar2a* (Slika 4.2.1.E-donji panel) od petnaestog meseca života pacova, dok se ekspimirajući profil *Prkar1a* nije menjao tokom starenja pacova (Slika 4.2.1.E-srednji panel).

Tabela 4.2.1. Starenjem izazvane promene ekspimiranja *Adcy* u Lc. Rezultati predstavljaju relativan stepen ekspimiranja gena u odnosu na tromesečne kontrole čiji je nivo ekspimiranja označen sa 1 i predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM triplikata iz tri nezavisna ogleada. Podaci u zagradi predstavljaju Ct vrednost svakog gena, *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i dvadesetčetvoromesečnih životinja.

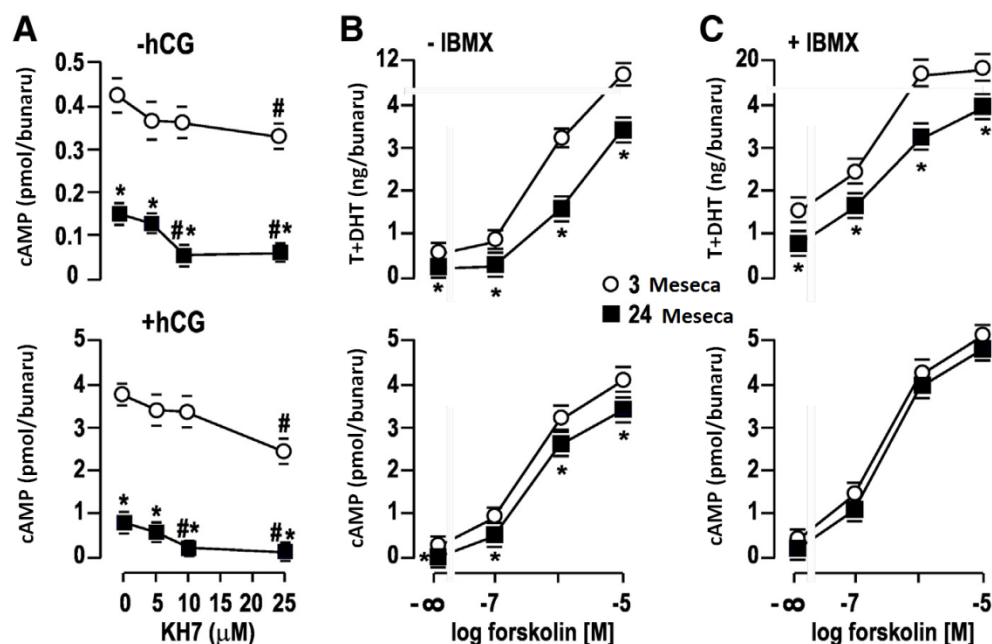
Gen	Tri meseca	Dvadeset četiri meseca
<i>Adcy3</i>	1 \pm 0.01 (26.46 \pm 0.3)	0.99 \pm 0.005 (26.48 \pm 0.1)
<i>Adcy5</i>	1 \pm 0.006 (27.72 \pm 0.2)	1.34 \pm 0.02 (27.29 \pm 0.4)
<i>Adcy6</i>	1 \pm 0.02 (27.88 \pm 0.5)	1.28 \pm 0.01 (27.44 \pm 0.2)
<i>Adcy7</i>	1 \pm 0.004 (26.82 \pm 0.1)	1.36 \pm 0.007 (26.38 \pm 0.1)
<i>Adcy9</i>	1 \pm 0.02 (25.92 \pm 0.5)	1.51 \pm 0.03 (25.33 \pm 0.5)*
<i>Adcy10</i>	1 \pm 0.003 (32.15 \pm 0.09)	3.15 \pm 0.008 (30.49 \pm 0.07)*
<i>Gapdh</i>	(20.22 \pm 0.04)	(19.89 \pm 0.03)



Slika 4.2.1. Starenjem izazvane promene ekspimiranja komponenata cAMP signalnog puta. A, Lc (2×10^5) izolovane iz pacova različite starosne dobi lizirane su u apsolutnom etanolu radi merenja nivoa cAMP u ćelijskom sadržaju ELISA testom. Ostatak ćelija (2×10^6) poslužio je za izolovanje totalne RNK za potrebe RQ-PCR analize ekspimiranja gena *Pde4a* (F-gornji panel), *Pde4b* (F-donji panel), *Prkaca*, *Prkacb*, *Prkar1a* i *Prkar2a* (E), kao i za analizu proteina *Gas*, *ADCY5/6*, *ADCY9* (B), *ADCY10* (C) *PKAC* (D-gornji panel) i *PKAR* (D-donji panel) Western blot metodom uz upotrebu *ACTB* kao endogene kontrole. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi.

S obzirom da je detektovano povećano eksprimiranje ADCY10/*Adcy10* ispitano je uključivanje ovog enzima u formiranje nivoa cAMP u L \acute{c} dvadesetčetvoromesečnih pacova. U tu svrhu L \acute{c} tromesečnih i dvadesetčetvoromesečnih pacova su *ex vivo* tretirane sa inhibitorom ADCY10 (KH7) i sa hCG pojedinačno i u kombinaciji, nakon čega je određen nivo cAMP u L \acute{c} . Dobijenim rezultatima ustanovljeno je da KH7 u dozno-zavisnom maniru snižava nivo cAMP kod L \acute{c} dvadesetčetvoromesečnih životinja, a kod tromesečnih samo u slučaju najveće ispitivane koncentracije (25 μ M) (Slika 4.2.1.1.A-gornji panel). Isti profil promene konstatovan je i u slučaju stimulacije L \acute{c} sa kombinacijom KH7 i hCG uz merljive veće apsolutne vrednosti unutarćelijskog cAMP (Slika 4.2.1.1.A-gornji panel). Dobijeni rezultati ukazuju na uključenost ADCY10 u održavanje nivoa cAMP tokom starenja L \acute{c} .

Da bi ispitali udeo fosfodiesteraza u smanjenju nivoa cAMP tokom starenja, L \acute{c} poreklom od tromesečnih i dvadesetčetvoromesečnih životinja su tretirane sa IBMX (neselektivni inhibitor fosfodiesteraza) u prisustvu/odsustvu rastućih koncentracija forskolina (stimulator membranskih ADCY). Kao što je očekivano, forskolin dozno-zavisno stimuliše produkciju unutarćelijskog cAMP i T+DHT uz značajno niži nivo oba parametra u slučaju L \acute{c} dvadesetčetvoromesečnih pacova (Slika 4.2.1.1.B). Dodavanje IBMX u inkubacioni medijum je dovelo do povećanja unutarćelijskog nivoa cAMP i porasta produkcije T+DHT u bazalnim uslovima kao i usled stimulacije forskolinom L \acute{c} mladih i starih životinja (Slika 4.2.1.1.C-donji panel). Međutim, inhibicija fosfodiesteraza sa IBMX je sprečila smanjenje nivoa cAMP u L \acute{c} starih pacova, ali je produkcija T+DHT ostala smanjena (Slika 4.2.1.1.C-gornji panel). Dobijeni rezultati sugerišu na značajno angažovanje cAMP-specifičnih fosfodiesteraza u smanjenju nivoa cAMP u L \acute{c} starih životinja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa povišenom transkripcijom *Pde4a* i *Pde4b* u starim L \acute{c} (Slika 4.2.1.F). Takođe, smanjena produkcija T+DHT u uslovima inhibisanih fosfodiesteraza kod starih L \acute{c} ukazuje na uplitanje i drugih faktora koji doprinose smanjenom androgenom kapacitetu L \acute{c} .

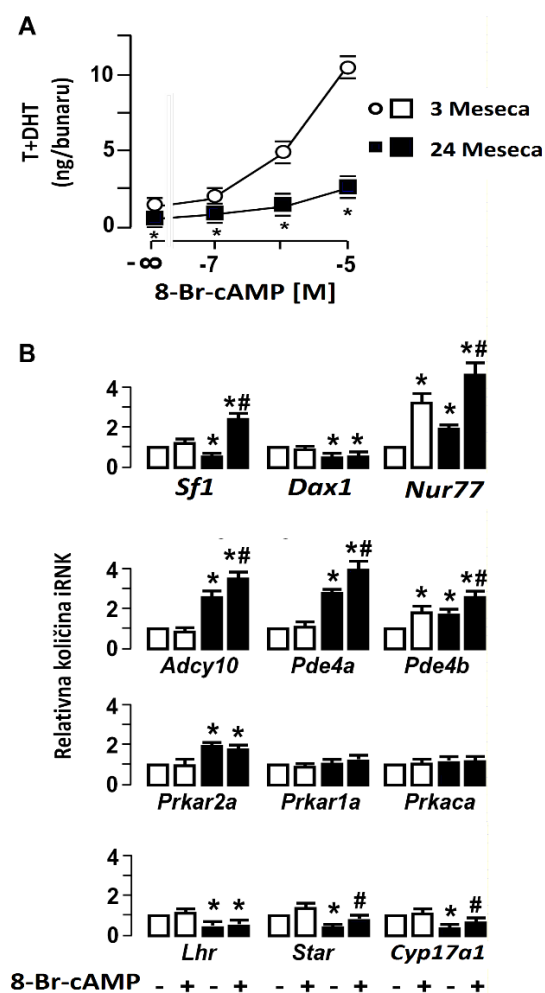


Slika 4.2.1.1. Uloga ADCY10 i fosfodiesteraza u održavanju homeostaze Lc starih pacova. Izolovane i posadene Lc (0.5×10^6) tromesečnih i dvadesetčetvoromesečnih pacova stimulirane su sa rastućim koncentracijama KH7 (inhibitor ADCY10) samostalno i u prisustvu submaksimalnih doza hCG (0.5ng/ml) u toku 1h. Nakon sprovedenog tretmana merena je produkcija cAMP u inkubacionom medijumu ELISA testom (A). Čelije (0.2×10^6) istih uzrasnih kategorija stimulirane su rastućim koncentracijama forskolina tokom 2h (direktni stimulator membranskih ADCY) nakon čega je merena produkcija T+DHT u medijumu (B-gornji panel) i nivo cAMP u ćelijskom sadržaju (B-donji panel). Stimulacija forskolinom vršena je i u prisustvu neselektivnog inhibitora fosfodiesteraza, nakon čega je određen nivo T+DHT u inkubacionom medijumu (C-gornji panel) i cAMP u ćelijskom sadržaju (C-donji panel). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i dvadesetčetvoromesečnih pacova. #- statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih ćelijau okviru iste starosne dobi.

S obzirom na dominantnu ulogu cAMP u inicijaciji sinteze testosterona kao i njegovu smanjenu produkciju tokom starenja Lc, cilj naredne etape istraživanja bilo je utvrđivanje efekta cAMP na ekspimiranje gena steroidogene mašinerije, komponenata cAMP-PRKA signalnog puta i transkripcionih faktora regulatora steroidogeneze. Lc tromesečnih i dvadesetčetvoromesečnih pacova stimulirane su rastućim koncentracijama 8-BR-cAMP (permeabilni analog cAMP) tokom 2h, nakon čega je praćena produkcija T+DHT i analizirano ekspimiranje gena od interesa.

Dobijeni rezultati su pokazali dozno-zavisnu stimulaciju produkcije T+DHT koja je bila značajno manja kod Lc poreklom od dvadesetčetvoromesečnih pacova (Slika 4.2.1.2.A). 8-Brc-AMP je povećao transkripciju steroidogenih regulatora *Sfl* i *Nur77* u starim Lc,

bez efekta na transkripciju *Dax1* (Slik 4.2.1.2.-gornji panel). Takođe, 8-Br-cAMP je dodatno povećao nivo eksprimiranja *Adcy10*, *Pde4a* i *Pde4b* u starim ćelijama bez efekta na profil eksprimiranja *Prkar2a*, *Prkar1a* i *Prkaca* (Slika 4.2.1.2.-srednji paneli). Starenjem inhibisana transkripcija steroidogenih gena, *Star* i *Cyp17a1*, je nakon tretmana sa 8-Br-cAMP vraćena na nivo koji je detektovan u Lc adultnih životinja (Slika 4.2.1.2.-donji panel). Nemogućnost analoga cAMP da normalizuje transkripciju gena odgovornih za iniciranje i kontrolu steroidogeneze potvrđuje da nizak nivo cAMP tokom starenja nije jedini uzročnik smanjene androgene funkcije Lc.



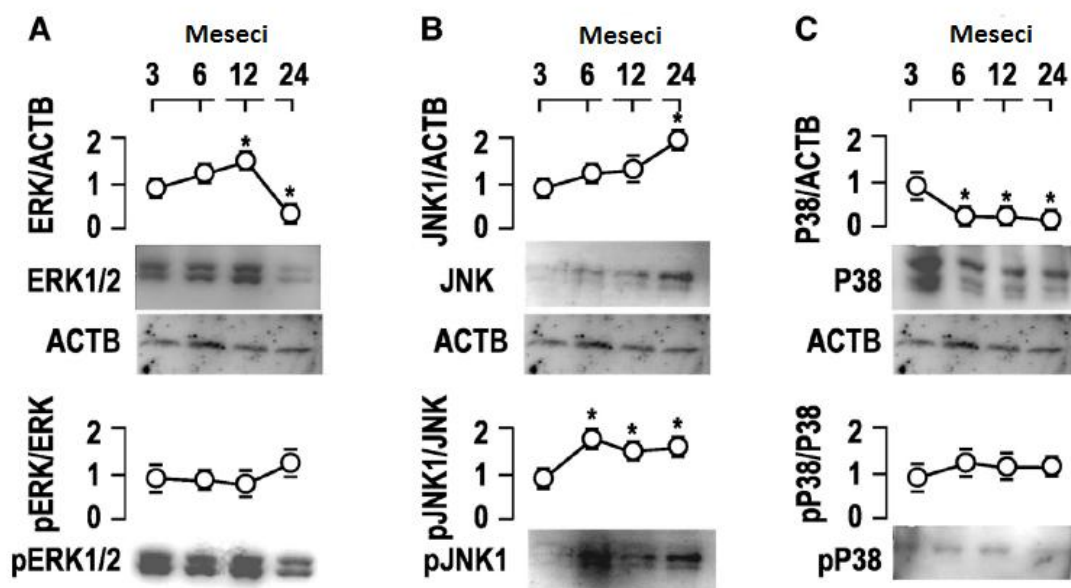
Slika 4.2.1.2. Ex vivo efekat 8-Br-cAMP na produkciju T+DHT i eksprimiranje gena steroidogene mašinerije, cAMP-PRKA signalne kaskade i transkripcionih faktra-regulatora steroidogeneze. Lc tromesečnih i dvadesetčetvoromesečnih pacova izolovane su i zasadene (0.2×10^6) nakon čega su stimulisane rastućim koncentracijama 8-Br-cAMP tokom 2h. Po završenoj stimulaciji određen je nivo T+DHT u inkubacionom medijumu (A) RIA metodom. Ćelije stimulisane 8-Br-cAMP ($10^{-5}M$) korišćene su za izolovanje RNK i analizu eksprimiranja gena steroidogene mašinerije (B-donji panel), komponenata cAMP/PRKA signalne kaskade (B-srednji panel) i transkripcionih faktora (B-gornji panel). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta, a u slučaju analize eksprimiranja gena vršena je normalizacija na odgovarajuću endogenu kontrolu (*Gapdh*). *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i dvadesetčetvoromesečnih pacova. #-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih ćelija i u okviru iste starosne dobi.

4.2.2. Promene MAPK signalizacije u Lajdigovim ćelijama

S obzirom da MAPK signalizacija, genomskim i negenomskim efektima, reguliše proces steroidogeneze, a uzimajući u obzir rezultate koji upućuju na postojanje drugih faktora koji pored cAMP doprinose smanjenoj androgenoj sposobnosti L α starog fenotipa, cilj naredene etape istraživanja bio je ispitivanje uticaja starenja na ekspimiranje komponenata ERK1/2, P38 i JNK signalizacije u L α . Rezultati sprovedenih ispitivanja pokazali su porast ekspimiranja *Erk1 (Mapk3)* do petnaestog meseca i značajno niži nivo ekspimiranja u dvadeset četvrtom mesecu života pacova (Tabela 4.2.2., Slika 4.2.2.). Transkripcioni profil *Erk2 (Mapk1)* nije se manjao sve do dvadeset četvrtog meseca kada je detektovano statistički značajno smanjenje njegovog ekspimiranja (Tabela 4.2.2.). *cRaf*, *Erk3 (Mapk6)*, i *Map2k2* nisu menjali profil ekspimiranja tokom celokupnog života jedinke, a *Mapk2k1* je pokazao značajno povišen nivo ekspimiranja u dvadeset četvrtom mesecu (Tabela 4.2.2.). Ekspimirajući profil familije P38 kinaza pokazao je da nivo ekspimiranja *Mapk11 (P38b)* opada između šestog i dvadeset četvrtog meseca života dok se nivo ekspimiranja ostalih komponenata (*Mapk12 (P38g)*, *Mapk13 (P38d)* i *Mapk14 (P38a)*) nije menjao tokom života pacova (Tabela 4.2.2., Slika 4.2.2.). U slučaju JNK signalne kaskade detektovan je povećan nivo ekspimiranja MAPK8 (JNK1) u dvadeset četvrtom mesecu (Slika 4.2.2.) dok se profil *Mapk9 (Jnk2)* nije menjao tokom života pacova (Tabela 4.2.2.). Takođe je ustanovljeno da se transkripcija *Dusp1* značajno povećava od petnaestog do dvadeset četvrtog meseca života pacova (Tabela 4.2.2.). Uz to, ustanovljeno je da tokom starenja ne dolazi do promene odnosa pERK/ERK niti pP38/P38, ali je ustanovljen povećan odnos pJNK/JNK sugerišući na povećanu aktivnost JNK proteina tokom starenja L α (Slika 4.2.2.).

Tabela 4.2.2. Starenjem izazvane promene ekspimiranja MAPK gena u Lć. Rezultati predstavljaju relativan stepen ekspimiranja gena u odnosu na tromesečne kontrole čiji je nivo ekspimiranja označen sa 1 i predstavljaju srednje grupne vrednosti ± SEM triplikata iz tri nezavisna ogleđa. Podaci u zagradi predstavljaju Ct vrednost svakog gena, *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi.

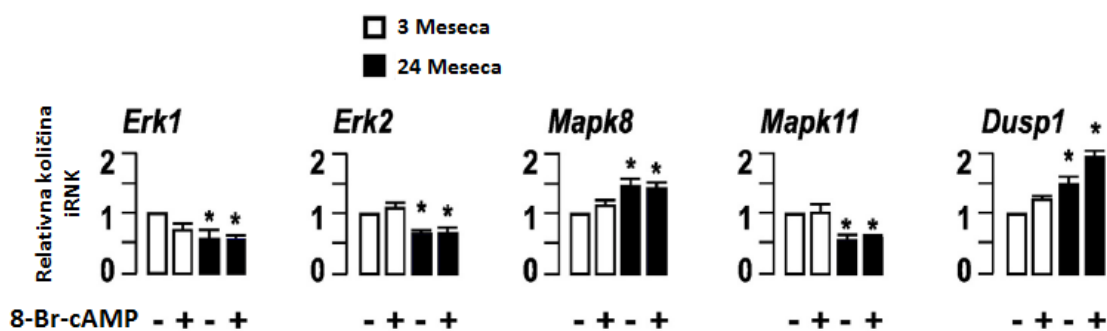
Gen	Tri meseca	Petnaest meseci	Osamnaest meseci	Dvadeset četiri meseca
<i>cRaf</i>	1 ± 0.01 (27.54 ± 0.2)	1 ± 0.02 (27.86 ± 0.3)	1 ± 0.02 (27.51 ± 0.3)	1 ± 0.02 (27.53 ± 0.3)
<i>Map2k1</i>	1 ± 0.01 (25.07 ± 0.3)	1.23 ± 0.02 (24.77 ± 0.4)	1.22 ± 0.01 (24.78 ± 0.2)	1.64 ± 0.005* (24.36 ± 0.07)
<i>Map2k2</i>	1 ± 0.01 (28.43 ± 0.3)	0.99 ± 0.01 (28.45 ± 0.3)	0.89 ± 0.01 (28.60 ± 0.3)	0.79 ± 0.01 (28.77 ± 0.4)
<i>Erk1</i> (<i>Mapk3</i>)	1 ± 0.009 (28.9 ± 0.3)	1.62 ± 0.03* (28.21 ± 0.5)	1.09 ± 0.003 (28.78 ± 0.08)	0.63 ± 0.008* (29.57 ± 0.3)
<i>Erk2</i> (<i>Mapk1</i>)	1 ± 0.008 (26.31 ± 0.2)	0.96 ± 0.009 (26.37 ± 0.2)	0.85 ± 0.002 (26.55 ± 0.05)	0.59 ± 0.009* (26.85 ± 0.3)
<i>Erk3</i> (<i>Mapk6</i>)	1 ± 0.01 (25.79 ± 0.3)	1.36 ± 0.007 (25.34 ± 0.1)	1.07 ± 0.02 (25.69 ± 0.4)	1.48 ± 0.008 (25.22 ± 0.1)
<i>Mapk8</i> (<i>Jnk1</i>)	1 ± 0.004 (28.71 ± 0.1)	1.04 ± 0.008 (28.65 ± 0.2)	1.1 ± 0.01 (28.57 ± 0.3)	1.48 ± 0.02 (28.14 ± 0.4)
<i>Mapk9</i> (<i>Jnk2</i>)	1 ± 0.008 (27.52 ± 0.2)	0.97 ± 0.007 (27.56 ± 0.2)	0.83 ± 0.006 (27.79 ± 0.2)	1.28 ± 0.006 (27.16 ± 0.1)
<i>Mapk11</i> (<i>p38b</i>)	1 ± 0.01 (33.04 ± 0.3)	0.68 ± 0.005* (33.59 ± 0.2)	0.58 ± 0.004* (33.82 ± 0.2)	0.47 ± 0.008* (34.13 ± 0.5)
<i>Mapk12</i> (<i>p38g</i>)	1 ± 0.004 (29.76 ± 0.1)	1.19 ± 0.006 (29.51 ± 0.1)	0.75 ± 0.008 (30.17 ± 0.3)	1.33 ± 0.004 (29.34 ± 0.08)
<i>Mapk13</i> (<i>p38d</i>)	1 ± 0.006 (27.82 ± 0.2)	1.11 ± 0.002 (27.67 ± 0.05)	0.92 ± 0.01 (27.94 ± 0.3)	0.88 ± 0.007 (28.00 ± 0.2)
<i>Mapk14</i> (<i>p38a</i>)	1 ± 0.007 (27.65 ± 0.2)	1.05 ± 0.01 (27.58 ± 0.3)	0.77 ± 0.006 (28.02 ± 0.2)	1.38 ± 0.01 (27.18 ± 0.2)
<i>Dusp1</i>	1 ± 0.005 (24.62 ± 0.1)	1.59 ± 0.004 (23.95 ± 0.07)*	1.79 ± 0.01* (23.78 ± 0.1)	2.91 ± 0.05* (23.08 ± 0.4)
<i>Gapdh</i>	(21.34 ± 0.2)	(21.73 ± 0.01)	(21.48 ± 0.05)	(21.65 ± 0.1)



Slika 4.2.2. Starenjem izazvane promene eksprimiranja elemenata MAPK signalnog puta u Lc. Lc su izolovane iz pacova starosti tri, šest, dvanaest i dvadeset četiri meseca zatim su lizirane i proteini su pripremljeni za Western blot analizu. Western blot analiza vršena je u prisustvu specifičnih anitela za ERK i pERK (A), JNK i pJNK(B), P38 i pP38 (C). Kao endogena kontrola korišćen je ACTB, na koji su normalizovani proteini od interesa, a aktivnost proteina je procenjena na osnovu odnosa fosforilisane i nefosforilisane forme. Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna eksperimenta. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi.

4.2.2.1. Efekat cAMP na promene eksprimiranja gena MAPK signalnog puta uzrokovane starenjem

Lc tromesečnih i dvadesetčetvoromesečnih pacova su stimulisane 8-Br-cAMP (10^{-5} M) u toku 2h. Nakon završene inkubacije ćelije su lizirane i RQ-PCR analizom je procenjena promena eksprimiranja *Erk1*, *Erk2*, *Mapk8*, *Mapk11* i *Dusp1* u starim Lc u odnosu na adultne Lc. Rezultati su pokazali izostanak efekta cAMP na eksprimiranje gena MAPK signalnog puta (Slika 4.2.2.1).



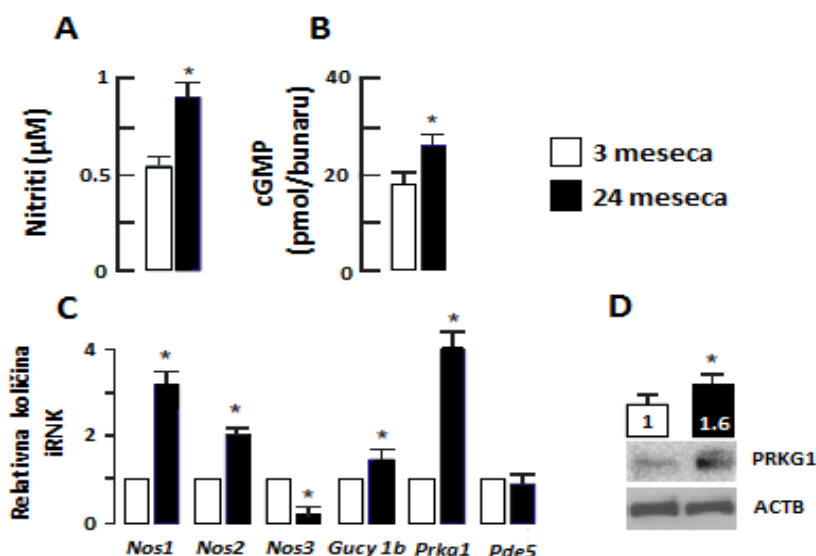
Slika 4.2.2.1. Efekat cAMP na promene eksprimiranja gena MAPK signalnog puta indukovane starenjem. L6 tromesečnih i dvadesetčetvoromesečnih pacova su zasađene i stimulisane 8-Br-cAMP (10^{-5} M) u trajanju od 2h. Nakon stimulacije ćelije su lizirane i izolovana je RNK koja je poslužila za analizu eksprimiranja gena *Erk1*, *Erk2*, *Mapk8*, *Mapk11* i *Dusp1* RQ-PCR metodom uz upotrebu 500nM specifičnih prajmera i analiza je vršena u triplikatu za svaki pojedinačni gen. Rezultati su normalizovani na *Gapdh* (endogena kontrola) i predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna ogleđa. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i dvadesetčetvoromesečnih pacova.

4.2.3. Promene NO-cGMP-PRKG signalizacije u Lajdigovim ćelijama

Smanjena funkcija L6 i postojanje faktora koji osim promene cAMP doprinose njenom nastajanju nametnulo je pitanje angažovanosti NO-cGMP-PRKG signalizacije u L6 starih pacova. Ovaj signalni put odabran je za dalja ispitivanja jer je uključen u regulaciju steroidogeneze (Valenti i sar., 1999), a prema široko prihvaćenoj hipotezi povećana produkcija ROS i reaktivnih vrsta azota (*engl.* Reactive nitric species, RNS) tokom starenja mogu biti povezane sa smanjenom produkcijom T+DHT (Chen i Zirkin, 1999). Uz to, NO reguliše cirkulaciju čiji poremećaji aktivno utiču na patogenezu promena strukture i funkcije testisa (Panigua i sar., 1987).

Angažovanje NO-cGMP-PRKG signalizacije u obrazovanju L6 starog fenotipa je analizirano merenjem produkcije NO, određivanjem nivoa cGMP i analizom eksprimiranja elemenata ovog signalnog puta u L6 dvadesetčetvoromesečnih i tromesečnih pacova. Dobijeni rezultati su pokazali da tokom starenja dolazi do povećane produkcije nitrita (stabilan produkt oksidacije NO) (Slika 4.2.3.A), koja je praćena povećanjem nivoa unutarćelijskog cGMP (Slika 4.2.3.B). U L6 starih životinja detektovano je povećanje transkripcije *Nos1*, *Nos2*, *Gucy1b* i *Prkg1*, smanjenje transkripcije *Nos3* dok je nivo transkripcije *Pde5* ostao neizmenjen u odnosu na L6

adultnih životinja (Slika 4.2.3.C). Povećano ekspimiranje *Prkg1* praćeno je povećanim nivoom proteina (Slika 4.2.3.D).



Slika 4.2.3. Efekat starenja na NO-cGMP-PRKG signalizaciju u L6 Wistar pacova. L6 izolovane iz dvadesetčetvoromesečnih i tromesečnih pacova su zasađene (0.2×10^6) i inkubirane tokom 2h. Nakon inkubacije, kultivacioni medijum je sakupljen za određivanje nitrita (stabilan produkt NO) Grisovom metodom (A), a ćelije su lizirane radi merenje nivoa cGMP u ćelijskom sadržaju (B) ELISA testom kao i za analizu ekspimiranja gena RQ-PCR metodom i proteina komponenata NO-cGMP-PRKG signalnog puta Western blot metodom (C i D). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna ogleđa, vrednosti ekspimiranja gena i zastupljenosti proteina su normalizovane na vrednosti odgovarajuće endogene kontrole. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i dvadesetčetvoromesečnih pacova.

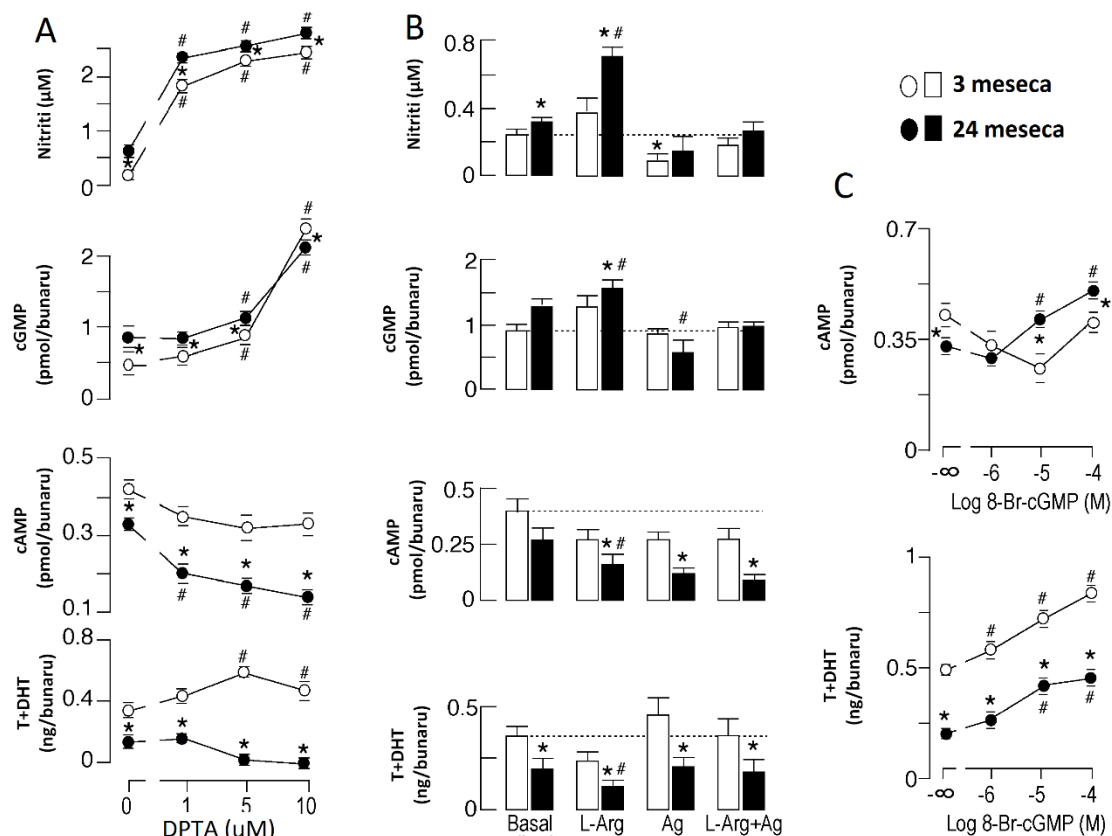
5.2.3.1. Različit efekat NO i cGMP na produkciju testosterona u Lajdigovim ćelijama starog fenotipa

Poznato je da NO i cGMP u određenim koncentracijama imaju suprotan efekat na steroidogenezu (Andric i sar., 2007; Drewett i sar., 2002). Da bi definisali efekte ovih signalnih molekula na steroidogenezu u L6 starog fenotipa, ćelije poreklom od adultnih i starih životinja su inkubirane u prisustvu rastućih koncentracija DPTA (donor NO) i 8-Br-cGMP (permeabilni analog cGMP), kao i u prisustvu L-arginina (supstrata za NOS) i aminoguanidina (inhibitora NOS). Dobijeni rezultati su pokazali da DPTA u koncentracijama od 0-10µM dozno-zavisno stimuliše produkciju nitrita i cGMP, ali je porast nivoa oba signalna molekula bio veći kod L6 starih pacova (Slika 4.2.3.1.A). Takođe, tretman sa DPTA je dozno-zavisno smanjio nivo cAMP u L6 poreklom od starih

životinja dok na L \acute{c} adultnih životinja nije imao efekta (Slika 4.2.3.1.A). U pogledu nivoa produkovanog T+DHT, registrovana je disocijacija efekata: DPTA je (u okviru ispitivanih doza) dozno-zavisno stimulisao produkciju T+DHT u L \acute{c} adultnih životinja dok je inhibisao produkciju T+DHT u L \acute{c} poreklom od starih životinja (Slika 4.2.3.1.A). Tretiranje L \acute{c} L-argininom imalo je gotovo iste efekte kao i inkubacija sa DPTA. Naime, tretman L-argininom doveo je do povećane produkcije nitrita i cGMP u L \acute{c} starih pacova uz značajno smanjenje nivoa cAMP i T+DHT (Slika 4.2.3.1.B). Primena aminoguanidina (inhibitor NOS) uklonila je efekte izazvane stimulacijom NOS i dodatno smanjila produkciju nitrita u L \acute{c} adultnih pacova (Slika 4.2.3.1.B).

Sa druge strane, tretman L \acute{c} sa 8-Br-cGMP je dozno-zavisno stimulisao produkciju T+DHT u L \acute{c} obe starosne kategorije iako je stimulatorni efekat bio veći u L \acute{c} adultnih životinja (Slika 4.2.3.1.C-donji panel). Tretman sa 8-Br-cGMP nije značajno uticao na nivo cAMP u L \acute{c} adulta dok je povećao nivo cAMP u L \acute{c} starih životinja (Slika 4.2.3.1.C-gornji panel).

Dobijeni rezultati sugerišu da je NO-cGMP-PRKG put angažovaniji u L \acute{c} starih pacova, i da je povećan nivo cGMP u starim L \acute{c} posledica povećane produkcije NO. Takođe je ustanovljeno da se stimulatorni efekat cGMP na produkciju T+DHT zadržava tokom starenja, ali i to da NO zavisna produkcija cGMP i samostalna primena cGMP ostvaruju različite efekte na produkciju T+DHT tokom starenja.

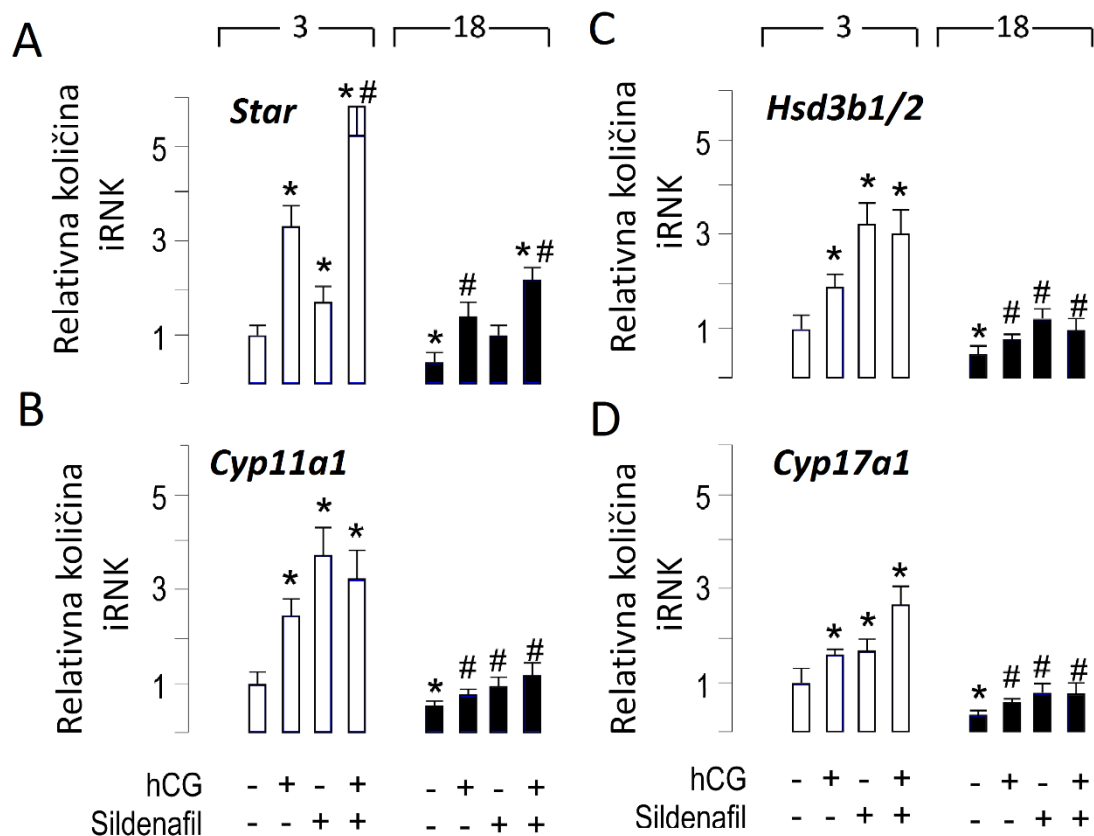


Slika 4.2.3.1. Zavisnost steroidogeneze od aktivnosti NO-cGMP-PRKG signalizacije – *ex vivo*. Lé tromesečnih i dvadesetčetvoromesečnih pacova (0.2×10^6) tretirane su rastućim koncentracijama DPTA (A), L-argininom ($100 \mu\text{M}$) i aminoguandidinom (5mM) samostalno i u kombinaciji (B) kao i rastućim koncentracijama 8-Br-cGMP (C) u trajanju od 2h. Nakon sprovedenih tretmana sakupljen je medijum za merenje nivoa T+DHT (A, B, C) RIA metodom i nitrita (A,B) Grisovom metodom a ćelije su lizirane za određivanje nivoa cAMP i cGMP ELISA testom (A, B, C). *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i dvadesetčetvoromesečnih pacova. #- statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih ćelija i u okviru iste starosne dobi.

5.2.3.2. Efekat inhibicije PDE5 na eksprimiranje gena steroidogene mašinerije u Lajdigovim ćelijama starog fenotipa- *ex vivo* pristup

U cilju povećanja nivoa cGMP Lé tromesečnih i osamnaestomesečnih pacova tretirane su rastvorom sildenafil/viagra (inhibitor PDE5, 5mM), u prisustvu/odsustvu submaksimalnih koncentracija hCG. Dobijenim rezultatima ustanovljeno je da pojedinačna primena hCG, kao i kombinacija hCG i sildenafil, dovodi do značajnog povećanja eksprimiranja *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1/2* i *Cyp17a1* uz značajno niži nivo eksprimiranja u Lé starog fenotipa (Slika 4.2.3.2). Samostalna primena sildenafil

pokazala je iste efekte, ali bez efekta na ekspimiranje *Star* u Lc starog fenotipa (Slika 4.2.3.2.A).

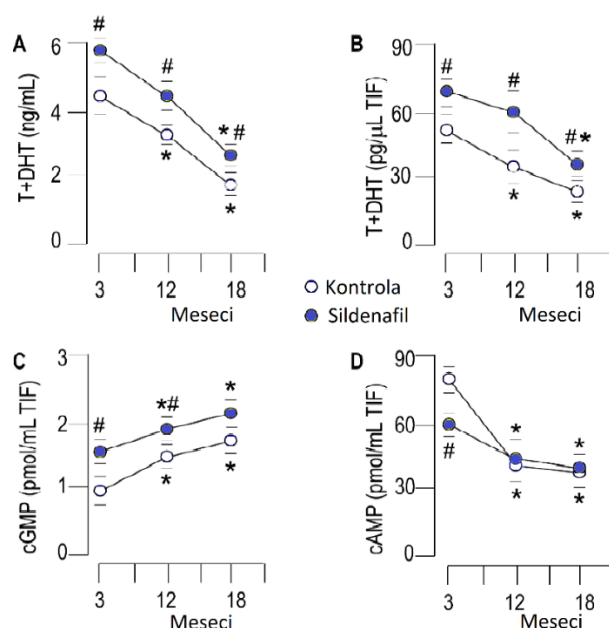


Slika 4.2.3.2. Efekat inhibicije PDE5 na ekspimiranje *Star* i gena steroidogene mašinerije – *ex vivo*. Lc tromesečnih i osmanaestomesečnih pacova su izolovane, zasađene (3×10^6), prestimulisane rastvorom sildenafil (5mM; 15min/34 °C/5%CO₂) i stimulisane rastvorom hCG (5ng/ml; 6h/34 °C/5%CO₂). Iz ćelija je izolovana RNK koja je korišćena za analizu ekspimiranja gena RQ-PCR metodom u prisustvu 500nM prajmera specifičnih za *Star* (A), *Cyp11a1* (B), *Hsd3b1/2* (C) i *Cyp17* (D) uz upotrebu *Actb* kao endogene kontrole. Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna ogleđa, *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i dvadesetčetvoromesečnih pacova. #-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih ćelija u okviru iste starosne dobi

4.2.3.3. Efekat akutne inhibicije PDE5 na steroidogenezu i produkciju testosterona srednjovečnih i starih pacova - *in vivo* pristup

Kako je *ex vivo* inhibicija PDE5 pokazala stimulatorni efekat na ekspimiranje gena odgovornih za sintezu T+DHT, pacovi stari tri, dvanaest i osamnaest meseci su pojeni rastvorom sildenafil (1.25mg/kg) dva časa pre žrtvovanja. Primena sildenafil dovela je

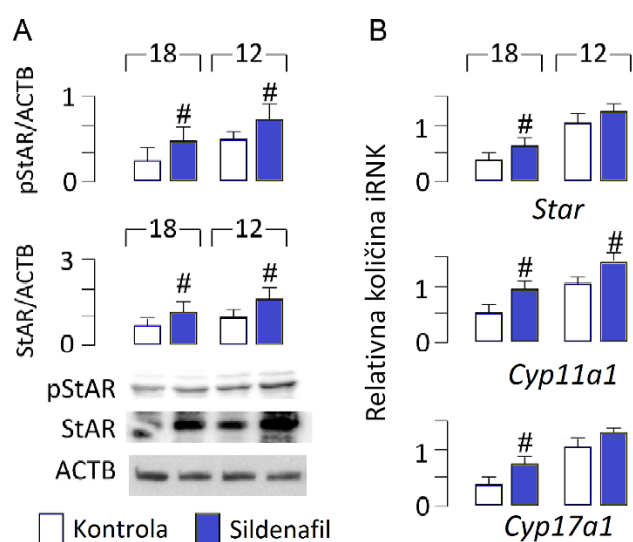
do značajnog povećanja nivoa T+DHT u serumu i u TIF u svim starosnim kategorijama (Slika 4.2.3.3.A,B). Nivo cGMP u TIF progresivno se povećavao sa starenjem, a tretman je dodatno povećao nivo cGMP kod tromesečnih i dvanaestomesečnih životinja bez efekta na osamnaestomesečne životinje (Slika 4.2.3.3.C). Nivo cAMP u TIF progresivno je opadao od dvanaestog do osamnaestog meseca. Primena sildenafilila značajno je snizila nivo cGMP kod tromesečnih pacova bez značajnog efekta na ostale starosne kategorije (Slika 4.2.3.3.D).



Slika 4.2.3.3. Efekat *in vivo* akutne inhibicije PDE5 na produkciju T+DHT i cikličnih nukleotida u Lé tromesečnih, dvanaestomesečnih i osamnaestomesečnih Wistar pacova. Tromesečni, dvanaestomesečni i osamnaestomesečni mužjaci pacova pojeni su rastvorom sildenafilila/viagra (1.25mg/kg) 2h pre žrtvovanja. Nakon žrtvovanja izmeren je nivo T+DHT u serumu (A) i TIF (B) RIA metodom. Ostatak TIF iskorišćen je za određivanje nivoa cGMP (C) i cAMP (D) ELISA metodom. Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna oglada. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između adultnih životinja i ostalih starosnih dobi. #- statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih životinja u okviru iste starosne dobi.

Kako je tretman sa sildenafilom povećao serumski T+DHT u svim starosnim kategorijama, usledila je analiza ekspimiranja pojedinih elemenata steroidogene mašinerije. Tretman sa sildenafilom je značajno povećao nivo StAR kao i nivo pStAR u ćelijama dvanaestomesečnih i osamnaestomesečnih pacova (Slika 4.2.3.3.1.A), ali bez promene u transkripciji gena u dvanaestom mesecu i porastom u osamnaestom mesecu života pacova (Slika 4.2.3.3.1.B-gornji panel). Ovakav nalaz sugerije da porast cGMP

(Slika 4.2.3.3.1.C), nastao usled inhibicije PDE5, stimuliše posttranslacijsku modifikaciju StAR, a time i njegovo procesovanje u aktivnu formu u L \acute{c} dvanaestomesečnih i osamnaestomesečnih životinja kao i *de novo* sintezu proteina u L \acute{c} starih životinja. Tretman je takođe značajno stimulisao transkripciju *Cyp11a1* u obe starosne kategorije (Slika 4.2.3.3.1.B-srednji panel), dok je u slučaju *Cyp17a1* tretman bio efikasan samo kod osamnaestomesečnih životinja (Slika 4.2.3.3.1.B-donji panel). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim *ex vivo* pristupom.

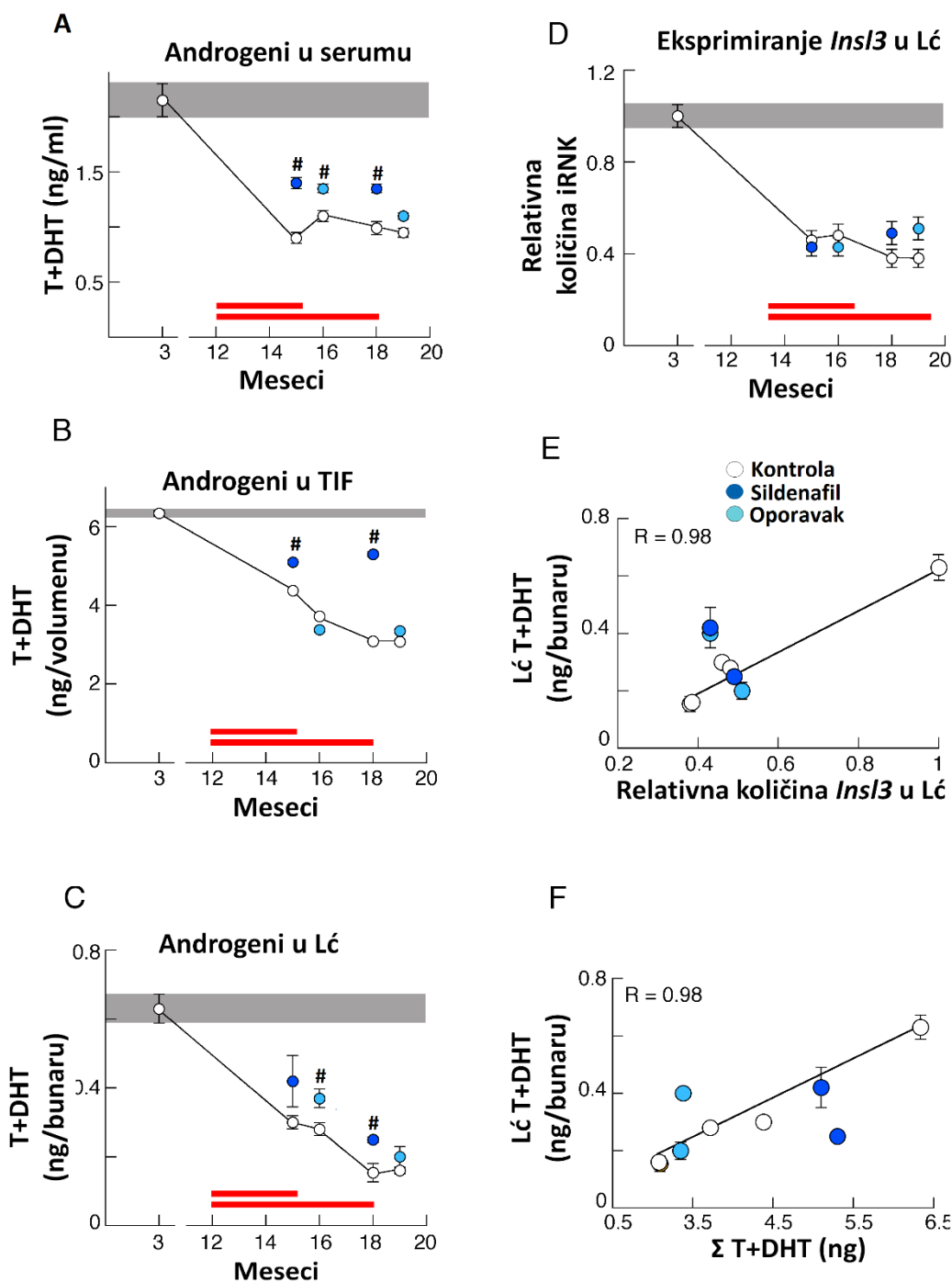


Slika 4.2.3.3.1. Efekat *in vivo* akutne inhibicije PDE5 na nivo i aktivnost StAR i transkripciju steroidogenih gena. Dvanaestomesečni i osamnaestomesečni mužjaci *Wistar* pacova pojeni su rastvorom sildenafilu (1.25mg/kg) 2h pre žrtvovanja. Izolovane i zasađene L \acute{c} (3×10^6) su lizirane u cilju izolovanja proteina i RNK. Nivo StAR i pStAR određen je Western blot metodom uz normalizaciju na nivo ACTB (endogena kontrola) (A). Step en eksprimiranja *Star*, *Cyp11a1* i *Cyp17a1* ustanovljen je RQ-PCR metodom u prisustvu 500nM specifičnih prajmera i uz normalizaciju na endogenu kontrolu-*Actb* (B). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz dva nezavisna oglada. #-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih životinja u okviru iste starosne dobi.

4.2.3.4. Efekat hronične inhibicije PDE5 na steroidogenezu i produkciju testosterona starih pacova - *in vivo* pristup

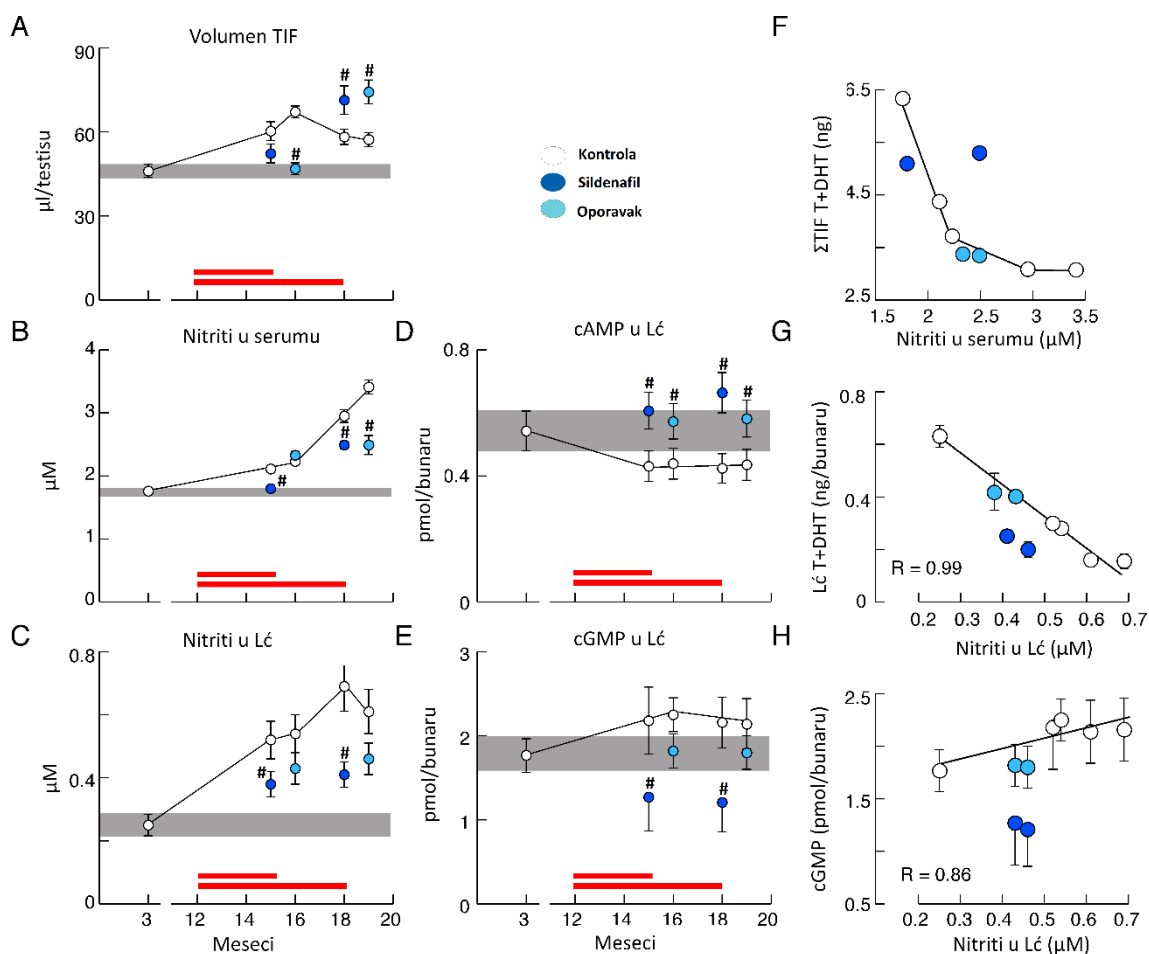
S obzirom da *ex vivo* kao i *in vivo* akutna inhibicija PDE5 stimuliše steroidogenezu u L \acute{c} mladih i starih životinja, postavilo se pitanje efekata hronične inhibicije PDE5 na androgenu funkciju L \acute{c} i eventualnog odlaganja procesa starenja. Zbog toga su mužjaci pacova stari dvanaest meseci svakodnevno pili rastvor sildenafilu (1.25mg/kg) u trajanju od tri i šest meseci. Kako bi ispitali održivost eventualnih efekata tretmana formirane su

i grupe koje su tretirane na isti način ali su žrtvovane mesec dana nakon završetka terapije sildenafilom. Osim pomenutih grupa, u tretman su uključeni i mužjaci pacova stari tri meseca (intaktna kontrola). Dobijeni rezultati potvrdili su hipofunkciju L \acute{c} tokom starenja iskazanu manjim nivoom T+DHT u serumu (Slika 4.2.3.4.A), TIF (Slika 4.2.3.4.B), sadržaju L \acute{c} (Slika 4.2.3.4.C) i manjim stepenom eksprimiranja *Insl3* (Slika 4.2.3.4.D). Pozitivna korelacija između eksprimirajućeg profila *Insl3* i T+DHT u L \acute{c} potvrdila je upotrebu *Insl3* kao markera funkcionalnosti L \acute{c} (slika 4.2.3.4.E), a pozitivna korelacija između nivoa T+DHT u L \acute{c} i TIF potvrdila je manji androgeni kapacitet L \acute{c} tokom starenja (Slika 4.2.3.4.F). Takođe je ustanovljeno da starenje uzrokuje progresivno povećanje zapremine TIF (Slika 4.2.3.4.1. A) i progresivno povećanje nivoa nitrita u serumu starih životinja (Slika 4.2.3.4.1.B). Potvrđeni su i rezultati povećane produkcije NO (nitrita) od strane starih L \acute{c} (Slika 4.2.3.4.1.C) kao i smanjen nivo cAMP (Slika 4.2.3.4.1.D) i povećan nivo cGMP (Slika 4.2.3.4.1.E). Negativne korelacije između nivoa nitrita u serumu i T+DHT u TIF (Slika 4.2.3.4.1.F) kao i između nivoa nitrita i T+DHT u L \acute{c} (Slika 4.2.3.4.1.G) potvrđuju hipotezu da povećan nivo NO inhibiše produkciju T+DHT. Pozitivnom korelacijom između produkcije NO i nivoa cGMP u L \acute{c} (Slika 4.2.3.4.1.H), potvrđeno je da NO promoviše povećanu produkciju cGMP tokom starenja L \acute{c} i sugeriše na različite efekte NO i cGMP na steroidogenezu u L \acute{c} .



Slika 4.2.3.4. Efekat hronične inhibicije PDE5 na produkciju T+DHT i ekspimiranje *InsI3* u Lc. Mužjaci pacova (4-5/grupi) starosti dvanaest meseci svakodnevno su pojeni rastvorom sildenafil/viagra (1.25 mg/kg) tokom tri i šest meseci. Osim eksperimentalne grupe, u ogledu su uključeni i mužjaci koji su na isti način tretirani uz dodatnih mesec dana tretmana destilovanom vodom (oporavak) i tromesečne intaktne kontrole. Nakon tretmana određen je nivo T+DHT u serumu (A), TIF (B) i Lc (C) RIA metodom i izolovana je RNK radi analize ekspimirajućeg profila *InsI3* (D) RQ-PCR metodom. E, korelaciona veza između T+DHT i ekspimiranja *InsI3* u Lc, korelaciona veza između nivoa T+DHT u kultivacionom medijumu i TIF (F). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti ± SEM iz tri nezavisna ogleda. #-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih životinja iste starosne dobi. Sivi stubići predstavljaju SEM intaktne kontrole. R-koeficijent korelacije.

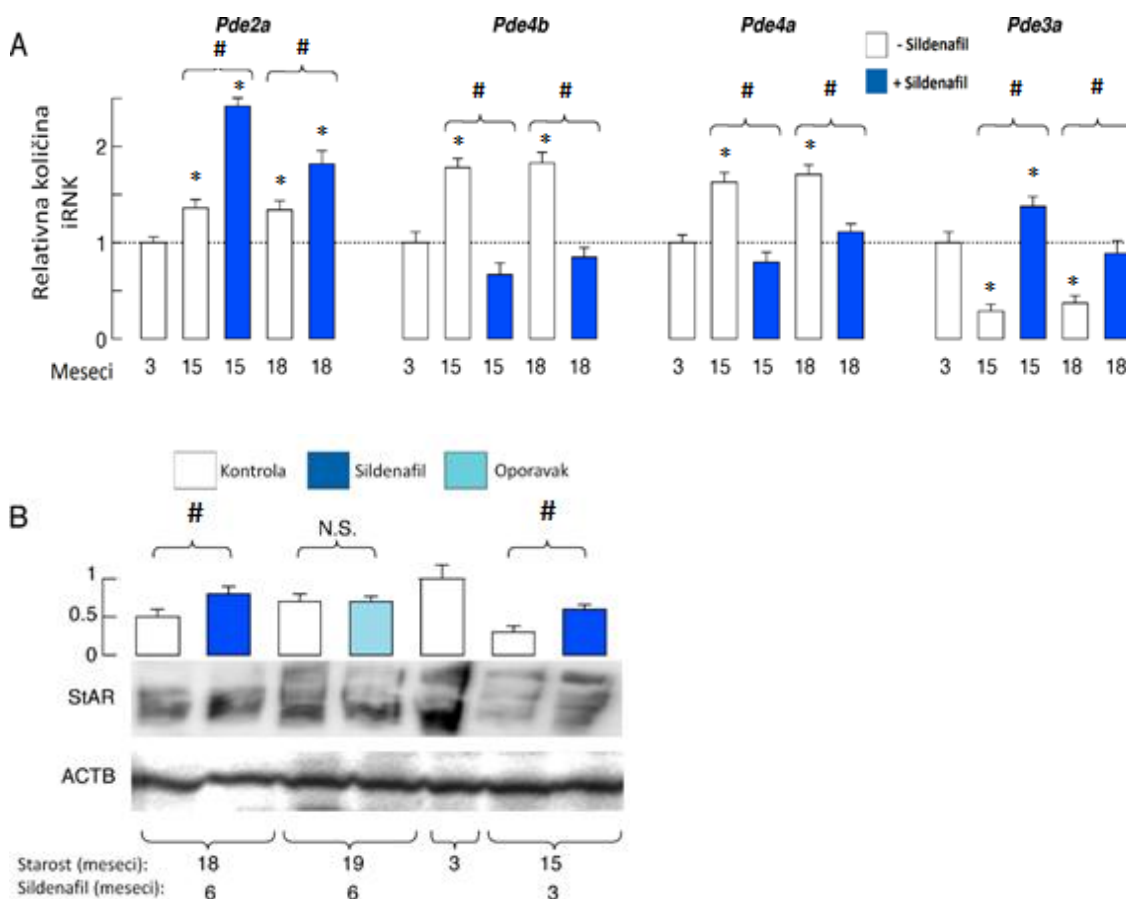
Tromesečni i šestomesečni tretman sildenafilom doveo je do značajnog povećanja nivoa T+DHT u serumu (Slika 4.2.3.4.A), TIF (Slika 4.2.3.4.B) i L_c (Slika 4.2.3.4.C) kao i do smanjenja akumulacije nitrita u serumu (Slika 4.2.3.4.1.B) i inkubacionom medijumu L_c (Slika 4.2.3.4.1.C). Primenom tretmana statistički značajno se povećao nivo cAMP (Slika 4.2.3.4.1.D) i značajno snizio nivo cGMP (Slika 4.2.3.4.1.E). Takođe je ustanovljeno da tretman nije promenio starenjem uzrokovan profil ekspimiranja *Ins13* (Slika 4.2.3.4.D), sugerišući da se u proces starenja uključuju i drugi faktori. S obzirom da je najveći broj ispitivanih parametara ostao stabilan i mesec dana nakon tretmana (Slika 4.2.3.4., 4.2.4.3.1.) verovatno je da hronična primena sildenafilu odlaže nastajanje hipofunkcionalnih L_c kod starih životinja.



Slika 4.2.3.4.1 Efekat hronične inhibicije PDE5 na signalizaciju Lc. Mužjaci pacova (4-5/grupi) starosti dvanaest meseci svakodnevno su pojeni rastvorom sildenafil/viagra (1.25mg/kg) tokom tri i šest meseci. Osim eksperimentalne grupe, u oglede su uključeni i mužjaci koji su na isti način tretirani uz dodatnih mesec dana tretmana destilovanom vodom (oporavak) i tromesečne intaktne kontrole. Nakon sprovedenog tretmana određen je volumen TIF (A), nivo nitrita u serumu (B) i inkubacionom medijumu Lc (C) Grisovom metodom kao i nivo cAMP (D) i cGMP (E) u sadržaju Lc ELISA testom. Na osnovu dobijenih parametara određena je korelaciona veza između nivoa nitrita u serumu i T+DHT u TIF (F), nitrita i T+DHT u Lc kao i nitrita i nivoa cGMP u Lc. Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti ± SEM iz tri nezavisna oglede. #-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih životinja iste starosne dobi. Sivi stubići predstavljaju SEM intaktne kontrole. R-koeficijent korelacije.

Kako je hronična inhibicija PDE5 povećala nivo cAMP i produkciju T+DHT u Lc starog fenotipa, ispitan je efekat hronične inhibicije PDE5 na ekspimiranje fosfodiesteraza, gena steroidogene mašinerije i transkripcionih faktora koji regulišu steroidogenezu. Rezultati su pokazali da tromesečna i šestomesečna inhibicija PDE5 smanjuje nivo ekspimiranja cAMP-specifičnih fosfodiesteraza *Pde4a*, *Pde4b* i povećava nivo ekspimiranja dvojno-specifičnih fosfodiesteraza, *Pde2a* i *Pde3a* (Slika 4.2.3.4.2.A, Tabela 4.2.3.4.). Tretman nije imao efekta na smanjenje transkripcije *Pde1a*, *Pde6a* i

Pde8b usled starenja kao ni na povećanje transkripcije *Pde1c*, sem u slučaju šestomesečnog tretmana kada nije detektovana razlika između osamnaestomesečnih i adultnih životinja (Tabela 4.2.3.4.). Efekat tretmana izostao je i u slučaju *Pde1b*, *Pde4d*, *Pde5a*, *Pde6d*, *Pde7a*, *Pde7b*, *Pde8a*, *Pde9a*, *Pde10a* čiji se profil ekspimiranja nije menjao tokom starenja pacova (Tabela 4.2.3.4.). Nakon šestomesečnog tretmana nije detektovana razlika u ekspimiranju *Star/StAR*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1/2* i *Hsd17b4* u odnosu na tromesečnu kontrolu (Slika 4.2.3.4.2.B, Tabela 4.2.3.4.1.). Tromesečni i šestomesečni tretman je sprečio smanjenje ekspresije *Sfl*, ali bez efekta na promene u transkripciji *Dax1* i *Nur77* izazvane starenjem (Tabela 4.2.3.4.2.). Sprovedeni tretman nije imao uticaja na ekspimiranje *Creb1* i *Gata4* čiji se profil nije menjao tokom života pacova (Tabela 4.2.3.4.2.).



Slika 4.2.3.4.2. Efekat hronične inhibicije PDE5 na ekspimirajući profil fosfodiesteraza i *Star/StAR*. Mužjaci pacova (4-5/grupi) starosti dvanaest meseci svakodnevno su pojeni rastvorom sildenafil/viagra (1.25mg/kg) tokom tri i šest meseci. Osim eksperimentalne grupe, u ogledu su uključeni i mužjaci koji su na isti način tretirani uz dodatnih mesec dana tratmana destilovanom vodom (oporavak) i tromesečne intaktne kontrole. Nakon sprovedenog tretmana, iz

Lć (5x10⁶) izolovana je RNK radi definisanja uticaja tretmana na eksprimirajući profil *Pde2a*, *Pde4a*, *Pde4b* i *Pde3a* (A) RQ-PCR metodom, a uticaj tretmana na nivo StAR definisan je Western blot metodom (B). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti ± SEM iz tri nezavisna oglada uz normalizaciju na adekvatnu endogenu kontrolu. *-statistički značajne promene na nivou p<0.05 između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi. #-statistički značajne promene na nivou p<0.05 između tretiranih i netretiranih životinja iste starosne dobi.

Tabela 4.2.3.4. Efekat hronične inhibicije PDE5 na promene eksprimiranja fosfodiesteraza uzrokovane starenjem. Mužjaci pacova (4-5/grupi) starosti dvanaest meseci svakodnevno su pojeni rastvorom sildenafil/viagra (1.25mg/kg) tokom tri i šest meseci. Osim eksperimentalne grupe, u ogledu su uključene i tromesečne intaktne kontrole. Rezultati predstavljaju relativan stepen eksprimiranja gena u odnosu na tromesečne kontrole čiji je nivo eksprimiranja označen sa 1 i predstavljaju srednje grupne vrednosti ± SEM triplikata iz tri nezavisna oglada. Podaci u zagradi predstavljaju Ct vrednost svakog gena, *-statistički značajne promene na nivou p<0.05 između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi #-statistički značajne promene na nivou p<0.05 između tretiranih i netretiranih grupa u okviru iste starosne dobi.

Gen	Kontrola tri meseca	Kontrola petnaest meseci	Sildenafil petnaest meseci	Kontrola osamnaest meseci	Sildenafil osamnaest meseci
<i>Pde1a</i>	1 ± 0.02 (29.95 ± 0.60)	0.30 ± 0.02* (31.69 ± 0.63)	0.41 ± 0.05* (31.24 ± 1.60)	0.52 ± 0.05* (30.89 ± 1.50)	0.59 ± 0.05* (30.71 ± 1.50)
<i>Pde1b</i>	1 ± 0.03 (33.13 ± 0.99)	1.3 ± 0.03 (32.75 ± 0.98)	1.3 ± 0.04 (32.75 ± 1.31)	0.92 ± 0.05 (33.25 ± 1.66)	1.15 ± 0.04 (32.93 ± 1.3)
<i>Pde1c</i>	1 ± 0.02 (32.13 ± 0.64)	1.52 ± 0.04* (31.53 ± 1.26)	1.63 ± 0.04* (31.43 ± 1.26)	1.48 ± 0.05* (31.56 ± 1.58)	1.35 ± 0.03 (31.70 ± 0.95)
<i>Pde2a</i>	1 ± 0.06 (32.54 ± 1.90)	1.36 ± 0.04 (32.09 ± 1.28)	2.42 ± 0.03*# (31.27 ± 0.94)	1.34 ± 0.05 (32.12 ± 1.61)	1.82 ± 0.05*# (31.68 ± 1.58)
<i>Pde3a</i>	1 ± 0.05 (32.54 ± 1.63)	0.29 ± 0.05* (34.33 ± 1.72)	1.38 ± 0.04# (32.07 ± 1.28)	0.37 ± 0.03* (33.97 ± 1.02)	0.89 ± 0.02# (32.71 ± 0.65)
<i>Pde3b</i>	1 ± 0.02 (31.32 ± 0.63)	1.25 ± 0.04 (30.99 ± 1.24)	1.24 ± 0.06 (31.01 ± 1.86)	1.27 ± 0.06 (30.96 ± 1.86)	1.34 ± 0.06 (30.90 ± 1.80)
<i>Pde4a</i>	1 ± 0.03 (31.54 ± 0.95)	1.63 ± 0.03* (30.84 ± 0.93)	0.80 ± 0.04# (31.86 ± 1.27)	1.71 ± 0.05* (30.77 ± 1.54)	1.11 ± 0.4# (31.39 ± 1.26)
<i>Pde4b</i>	1 ± 0.02 (27.84 ± 0.56)	1.78 ± 0.02* (27.01 ± 0.54)	0.67 ± 0.03# (28.42 ± 0.85)	1.83 ± 0.07* (26.97 ± 1.89)	0.85 ± 0.06# (28.07 ± 1.68)
<i>Pde4d</i>	1 ± 0.04 (32.50 ± 1.30)	1.25 ± 0.04 (32.18 ± 1.30)	1.32 ± 0.05 (32.10 ± 1.61)	0.78 ± 0.05 (32.86 ± 1.60)	1.00 ± 0.03 (32.50 ± 0.98)
<i>Pde5a</i>	1 ± 0.06 (32.13 ± 1.92)	1.31 ± 0.05 (31.74 ± 1.59)	1.61 ± 0.05 (31.44 ± 1.57)	1.39 ± 0.04 (31.65 ± 1.27)	1.15 ± 0.05 (31.93 ± 1.60)
<i>Pde6a</i>	1 ± 0.05 (33.13 ± 1.66)	0.42 ± 0.03* (34.38 ± 1.03)	0.36 ± 0.03* (34.60 ± 1.04)	0.51 ± 0.04* (34.10 ± 1.36)	0.32 ± 0.02* (34.77 ± 0.70)

<i>Pde6d</i>	1 ± 0.04 (30.94 ± 1.24)	0.79 ± 0.03 (31.28 ± 0.94)	0.76 ± 0.03 (31.34 ± 0.94)	0.86 ± 0.05 (31.16 ± 1.56)	0.99 ± 0.04 (30.95 ± 1.24)
<i>Pde7a</i>	1 ± 0.06 (29.88 ± 1.79)	1.16 ± 0.06 (29.67 ± 1.78)	1.57 ± 0.05 (29.23 ± 1.46)	1.04 ± 0.06 (29.82 ± 1.79)	0.98 ± 0.04 (29.91 ± 1.20)
<i>Pde7b</i>	1 ± 0.03 (32.50 ± 0.98)	1.03 ± 0.03 (32.46 ± 0.97)	0.87 ± 0.04 (32.70 ± 1.31)	0.94 ± 0.02 (32.58 ± 0.65)	0.86 ± 0.05 (32.72 ± 1.64)
<i>Pde8a</i>	1 ± 0.06 (29.73 ± 1.78)	0.87 ± 0.06 (29.93 ± 1.80)	1.07 ± 0.05 (29.63 ± 1.48)	1.05 ± 0.03 (29.66 ± 0.89)	1.18 ± 0.04 (29.49 ± 1.20)
<i>Pde8b</i>	1 ± 0.05 (31.80 ± 1.59)	0.42 ± 0.04* (33.05 ± 1.32)	0.29 ± 0.05* (33.59 ± 1.68)	0.48 ± 0.03* (32.86 ± 0.99)	0.59 ± 0.06* (32.56 ± 1.95)
<i>Pde9a</i>	1 ± 0.04 (33.13 ± 1.33)	1.19 ± 0.06 (32.88 ± 1.97)	1.49 ± 0.05 (32.55 ± 1.63)	1.09 ± 0.04 (33.01 ± 1.32)	1.47 ± 0.01 (32.57 ± 0.33)
<i>Pde10a</i>	1 ± 0.02 (30.94 ± 0.62)	0.82 ± 0.03 (31.23 ± 0.94)	0.85 ± 0.04 (31.17 ± 1.25)	1.04 ± 0.06 (30.88 ± 1.85)	0.94 ± 0.05 (31.03 ± 1.55)

Tabela 4.2.3.4.1. Efekat hronične inhibicije PDE5 na promene ekspimiranja gena steroidogene mašinerije indukovane starenjem. Mužjaci pacova (4-5/grupi) starosti dvanaest meseci svakodnevno su pojeni rastvorom sildenafil/viagra (1.25mg/kg) tokom tri i šest meseci. Osim eksperimentalne grupe, u ogledu su uključene i tromesečne intaktne kontrole. Rezultati predstavljaju relativan stepen ekspimiranja gena u odnosu na tromesečne kontrole čiji je nivo ekspimiranja označen sa 1 i predstavljaju srednje grupne vrednosti ± SEM triplikata iz tri nezavisna ogleda. Podaci u zagradi predstavljaju Ct vrednost svakog gena, *-statistički značajne promene na nivou p<0.05 između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi. #-statistički značajne promene na nivou p<0.05 između tretiranih i netretiranih grupa u okviru iste starosne dobi.

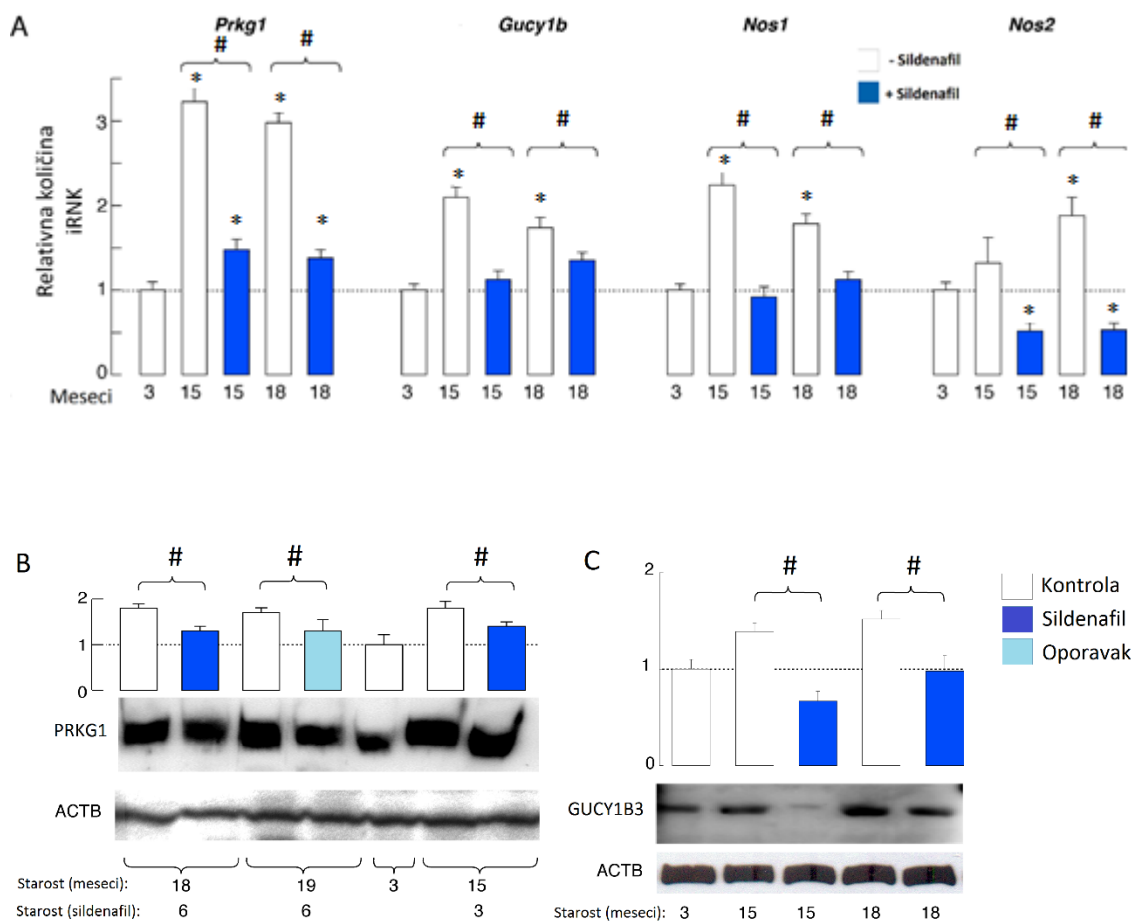
Gen	Kontrola Tri meseca	Kontrola Petnaest meseci	Sildenafil Petnaest meseci	Kontrola Osamnaest meseci	Sildenafil Osamnaest meseci
<i>Star</i>	1 ± 0.02 (20.36 ± 0.41)	0.31 ± 0.08* (22.05 ± 1.80)	0.47 ± 0.08* (21.45 ± 1.70)	0.27 ± 0.08# (22.25 ± 1.80)	0.75 ± 0.09# (20.77 ± 1.90)
<i>Cyp11a1</i>	1 ± 0.06 (21.60 ± 1.30)	0.14 ± 0.06* (24.37 ± 1.50)	0.23 ± 0.07#* (23.55 ± 1.65)	0.54 ± 0.07* (22.82 ± 1.60)	0.72 ± 0.04# (22.40 ± 0.90)
<i>Hsd3b1</i>	1 ± 0.06 (22.27 ± 1.34)	0.96 ± 0.05 (22.33 ± 1.11)	0.80 ± 0.03 (22.59 ± 0.68)	0.57 ± 0.03* (23.08 ± 0.69)	1.23 ± 0.04# (21.97 ± 0.87)
<i>Cyp17a1</i>	1 ± 0.06 (22.95 ± 1.38)	0.45 ± 0.06* (24.10 ± 1.45)	0.39 ± 0.03* (24.31 ± 0.73)	0.31 ± 0.04* (24.64 ± 0.98)	0.68 ± 0.06# (23.50 ± 1.41)
<i>Hsd17b4</i>	1 ± 0.07 (23.18 ± 1.62)	0.52 ± 0.06* (24.13 ± 1.45)	0.60 ± 0.04* (23.92 ± 0.96)	0.51 ± 0.02* (24.15 ± 0.50)	1.06 ± 0.07# (23.10 ± 1.62)

Tabela 4.2.3.4.2. Efekat hronične inhibicije PDE5 na promene ekspimiranja gena transkripcionih faktora-regulatora steroidogeneze indukovane starenjem. Mužjaci pacova (4-5/grupi) starosti dvanaets meseci svakodnevno su pojeni rastvorom sildenafil/viagra (1.25mg/kg) tokom tri i šest meseci. Osim eksperimentalne grupe, u oglede su uključene i tromesečne intaktne kontrole. Rezultati predstavljaju relativan stepen ekspimiranja gena u odnosu na tromesečne kontrole čiji je nivo ekspimiranja označen sa 1 i predstavljaju srednje grupne vrednosti ± SEM triplikata iz tri nezavisna ogleada. Podaci u zagradi predstavljaju Ct vrednost svakog gena, *-statistički značajne promene na nivou p<0.05. između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi. #-statistički značajne promene na nivou p<0.05 između tretiranih i netretiranih grupa u okviru iste starosne dobi.

Gen	Kontrola 3 meseca	Kontrola 15 meseci	Sildenafil 15 meseci	Kontrola 18 meseci	Sildenafil 18 meseci
<i>Creb1</i>	1 ± 0.03 (27.63 ± 0.83)	0.95 ± 0.04 (27.71 ± 1.11)	1.11 ± 0.05 (27.48 ± 1.37)	1.02 ± 0.04 (27.61 ± 1.10)	1.19 ± 0.03 (27.38 ± 0.82)
<i>Gata4</i>	1 ± 0.02 (27.54 ± 0.55)	1.12 ± 0.04 (27.38 ± 1.09)	1.08 ± 0.02 (27.43 ± 0.55)	1.07 ± 0.05 (27.44 ± 1.37)	1.20 ± 0.02 (27.28 ± 0.55)
<i>Dax1 (Nr0b1)</i>	1 ± 0.06 (27.13 ± 1.63)	0.58 ± 0.06* (27.91 ± 1.67)	0.42 ± 0.05* (28.38 ± 1.42)	0.61 ± 0.02* (27.84 ± 0.56)	0.59 ± 0.04 (27.90 ± 1.12)
<i>Nur77 (Nr4a1)</i>	1 ± 0.07 (27.30 ± 1.91)	3.33 ± 0.06* (25.56 ± 1.53)	3.58 ± 0.07 (25.45 ± 1.78)	3.42 ± 0.03* (25.52 ± 0.77)	3.54 ± 0.04 (25.47 ± 1.02)
<i>Sfl (Nr5a1)</i>	1 ± 0.05 (24.86 ± 1.2)	0.34 ± 0.04* (26.42 ± 1.06)	0.95 ± 0.03# (24.93 ± 0.75)	0.33 ± 0.03* (26.46 ± 0.79)	0.86 ± 0.05# (25.08 ± 1.25)

4.2.3.5. Efekat hronične inhibicije PDE5 na NO-cGMP-PRKG signalizaciju u Lajdigovim ćelijama starog fenotipa – *in vivo* pristup

S obzirom na činjenicu da smanjena produkcija T+DHT korelira sa povećanom produkcijom NO tokom starenja i uz pozitivan efekat tretmana na produkciju T+DHT, ispitan je i efekat tretmana na ekspimiranje gena NO-cGMP-PRKG signalnog puta. Dobijenim rezultatima ustanovljeno je da tromesečni i šestomesečni tretman smanjuje starenjem stimulisanu transkripciju *Nos1*, *Nos2*, *Gucy1b3* i *Prkg1* bez efekata na *Nos3*, i da je tretman takođe smanjio i starenjem povećan nivo PRKG1 i GUCY1B3 (Slika 4.2.3.5.A,B,C).



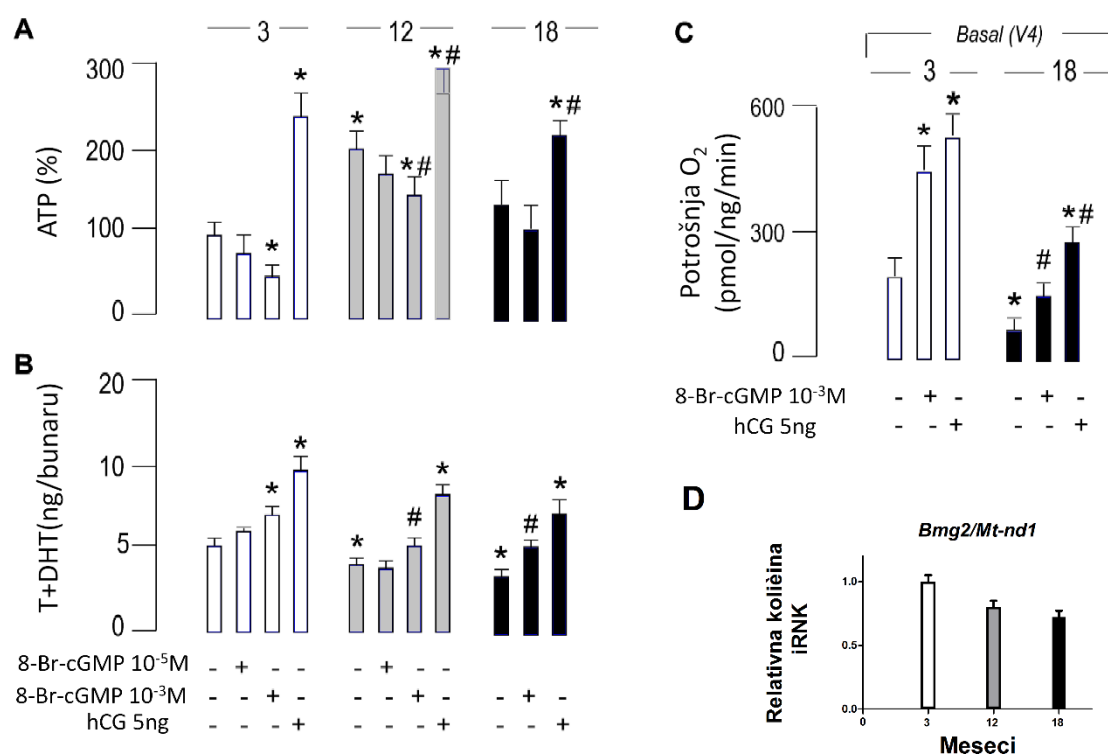
Slika 4.2.3.5. Efekat hronične inhibicije PDE5 na ekspimirajući profil komponenata NO-cGMP-PRKG signalnog puta. Mužjaci pacova (4-5/grupi) starosti dvanaest meseci svakodnevno su pojeni rastvorom sildenafil/viagra (1.25mg/kg) tokom tri i šest meseci. Osim eksperimentalne grupe, u ogledu su uključeni i mužjaci koji su na isti način tretirani uz dodatnih mesec dana tretmana destilovanom vodom (oporavak) i tromesečne intaktne kontrole. Nakon sprovedenog tretmana, iz Lc (5x10⁶) izolovana je RNK radi definisanja uticaja tretmana na

ekspimirajući profil *Prkg1*, *Gucy1b3*, *Nos1* i *Nos2* (A) RQ-PCR metodom, a uticaj tretmana na nivo PRKG1 i GUCY1B3 definisan je Western blot metodom (B). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna ogleđa uz normalizaciju na adekvatnu endogenu kontrolu. *- statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i drugih starosnih dobi #-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih životinja iste starosne dobi.

4.3. Uticaj starenja na energetske homeostazu Lajdigovih ćelija

4.3.1. Efekti hCG/cAMP i cGMP na parametre energetske homeostaze u Lajdigovim ćelijama sredovečnih i starih pacova – *ex vivo* pristup

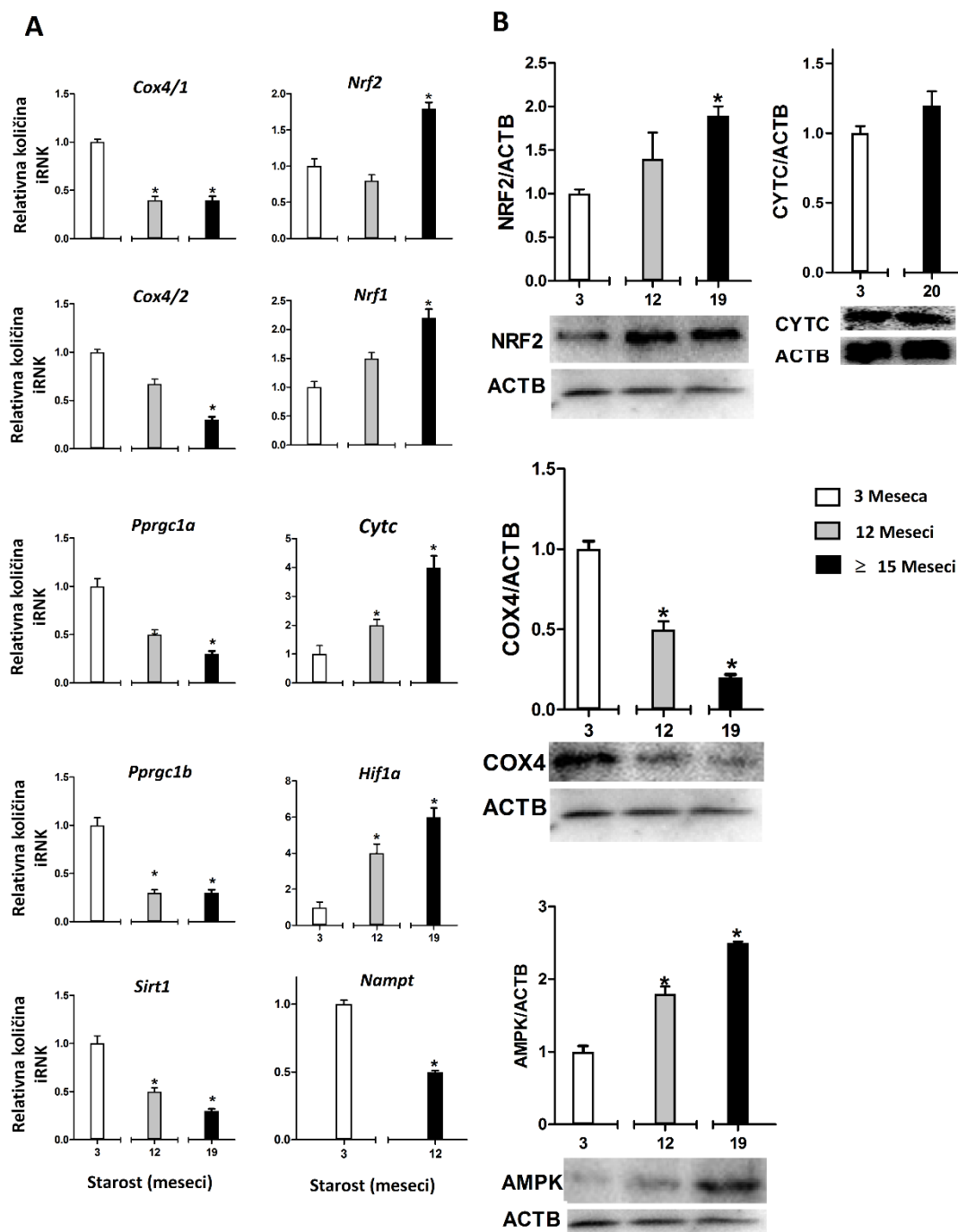
S obzirom na ekskluzivnu ulogu mitohondrija u sintezi steroidnih hormona, od interesa je bilo ispitati promene funkcionalnosti mitohondrija tokom starenja jedinke, njihov uticaj na produkciju T+DHT, kao i eventualni uticaj signalizacije posredovane cAMP i cGMP na detektovane promene. Kao indirektni parametri mitohondrijske aktivnosti korišćeni su nivo ATP, stepen potrošnje kiseonika u L_c , promena potencijala mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi$) kao i stepen ekspimiranja gena važnih za funkciju mitohondrija. Rezultati su pokazali izmenjenu funkciju mitohondrija iskazanu povećanim nivoom ATP u dvanaestom mesecu (Slika 4.3.1.A) i smanjenom potrošnjom kiseonika u osamnaestom mesecu života (Slika 4.3.1.C) koje je pratila smanjena produkcija T+DHT od dvanaestog meseca (Slika 4.3.1.B). Signalizacija posredovana hCG/cAMP izazvala je dodatno povećanje produkcije ATP (Slika 4.3.1.A), potrošnje kiseonika (Slika 4.3.1.C) i nivoa T+DHT (Slika 4.3.1.B) u svim starosnim dobima uz manje vrednosti parametara dvanaestomesečnih i osamnaestomesečnih pacova u odnosu na tromesečne kontrole. Signalizacija posredovana cGMP ($10^{-3}M$) dovela je do smanjenja nivoa ATP, povećanja potrošnje kiseonika i povećanja produkcije T+DHT u svim starosnim kategorijama (Slika 4.3.1.A,B,C). Primena 8-Br-cGMP u dozi od $10^{-5}M$ nije imala efekta na ispitivane parametre mitohondrijske funkcionalnosti (Slika 4.3.1.A,B). Analizom odnosa ekspimiranja jedarnih i mitohondrijskih gena ustanovljeno je da starenje ne menja značajno nivo ekspimiranja mitohondrijskog genoma (Slika 4.3.1.D) iako se uočava trend ka nižim vrednostima.



Slika 4.3.1. Efekat *ex vivo* inhibicije PDE5 na produkciju T+DHT, ATP i stepen potrošnje kiseonika u Lc tromesečnih, dvanaestomesečnih i osamnaestomesečnih Wistar pacova. A, Lc (2×10^6) tromesečnih, dvanaestomesečnih i osamnaestomesečnih mužjaka su izolovane i tretirane sa 8-Br-cGMP (10^{-5} i 10^{-3} M) i rastvorom hCG (5ng/ml) tokom 1h u vodenom kupatilu uz konstantno mešanje ($34^\circ\text{C}/80$ ciklusa/min). Nakon tretmana, ćelijska suspenzija je centrifugirana ($1200 \times g/5$ min) i određen je nivo T+DHT u inkubacionom medijumu/supernatantu RIA metodom (B). Ćelijski talog je resuspendovan i liziran i pripremljen za određivanje nivoa ATP detektovanjem stepena luminiscencije (A). Lc adultnih i starih mužjaka (15×10^6) posađene su i tretirane sa 8-Br-cGMP (10^{-3} M) i rastvorom hCG (5ng/ml) $1\text{h}/34^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ nakon čega je ćelijska suspenzija upotrebljena za određivanje stepena potrošnje kiseonika Klarkovom elektrodom (C). Izolovane Lc (2×10^6) upotrebljene su i za RQ-PCR analizu ekspimiranja *bmg2* i *Mt-nd1* (D). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna ogleđa. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ u odnosu na tromesečne kontrole. #- statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih ćelija u okviru iste starosne dobi.

Paralelno sa parametrima mitohondrijske funkcionalnosti praćen je profil ekspimiranja gena i nivo proteina odgovornih za ekspimiranje komponenata elektron transportnog lanca (Citohrom c oksidaza subjedinica 4/1/2 (*engl.* Cytochrome c oxidase subunit 4, *Cox4/1*, *Cox4/2*)), Citohrom c (*engl.* Cytochrome c, *Cytc*); kontrolu mitohondrijske biogeneze (*engl.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, *Ppargc1a*) (LeBleu i sar., 2014); kontrolu oksidativnog/neoksidativnog metabolizma glukoze i kontrolu energetske iskorišćenosti (*engl.* Peroxisome proliferator-activated

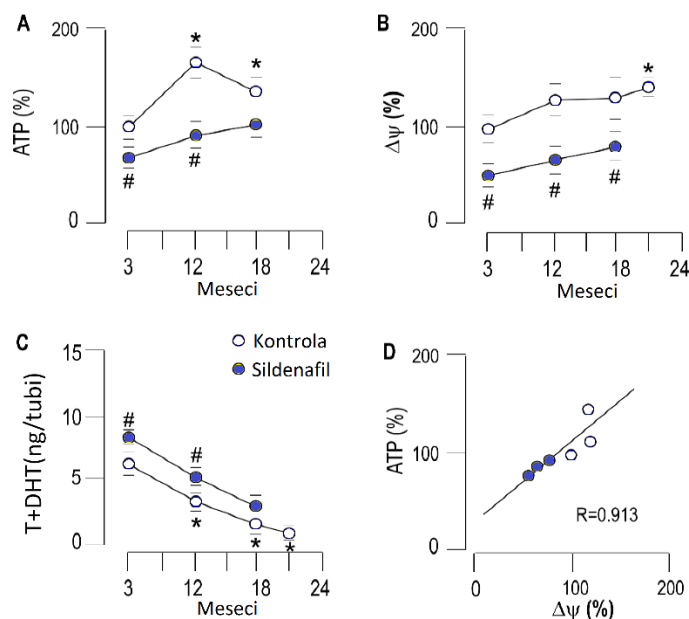
receptor gamma coactivator 1-beta, *Pprgc1b*) (Park i sar., 2006); epigenetsku kontrolu ekspresije povezanu sa energetskim potrebama ćelije i detekcijom citosolnog NAD⁺/NADH odnosa (*engl.* Sirtuin 1, *Sirt1*) (Anderson i Prolla, 2009); kontrolu sinteze NAD (*engl.* Nicotinamide phosphoribosyltransferase, *Nampt*) (Imai, 2009); kontrolu antioksidativne zaštite (*Nrf2*) (Nguyen, 2009); kontrolu ekspimiranja gena odgovornih za regulaciju funkcije mitohondrija (*Nrf1*) (Yoboue i Devin, 2012); kontrolu ćelijskog odgovora na hipoksiju (*engl.* Hipoxia inducible factor 1-alpha, *Hif1a*) (Lin, 2004). Dobijenim rezultatima ustanovljeno je da se sa starenjem progresivno smanjuje nivo ekspimiranja *Cox4/1*, *Cox4/2*, *Pprgc1a*, *Pprgc1b*, *Sirt1* i *Nampt*, a povećava nivo *Nrf2*, *Nrf1*, *Cytc* i *Hif1a* (Slika 4.3.1.1.A). Analizom nivoa proteina ustanovljeno je da starenje uzrokuje značajan porast količine NRF2, AMPK (senzor energetske homeostaze, (Anderson i Prolla, 2009) kao i porast nivoa CYTC, ali bez statističke značajnosti (Slika 4.3.1.1.B). Starenje je dovelo do smanjenja nivoa COX4 (Slika 4.3.1.1.B).



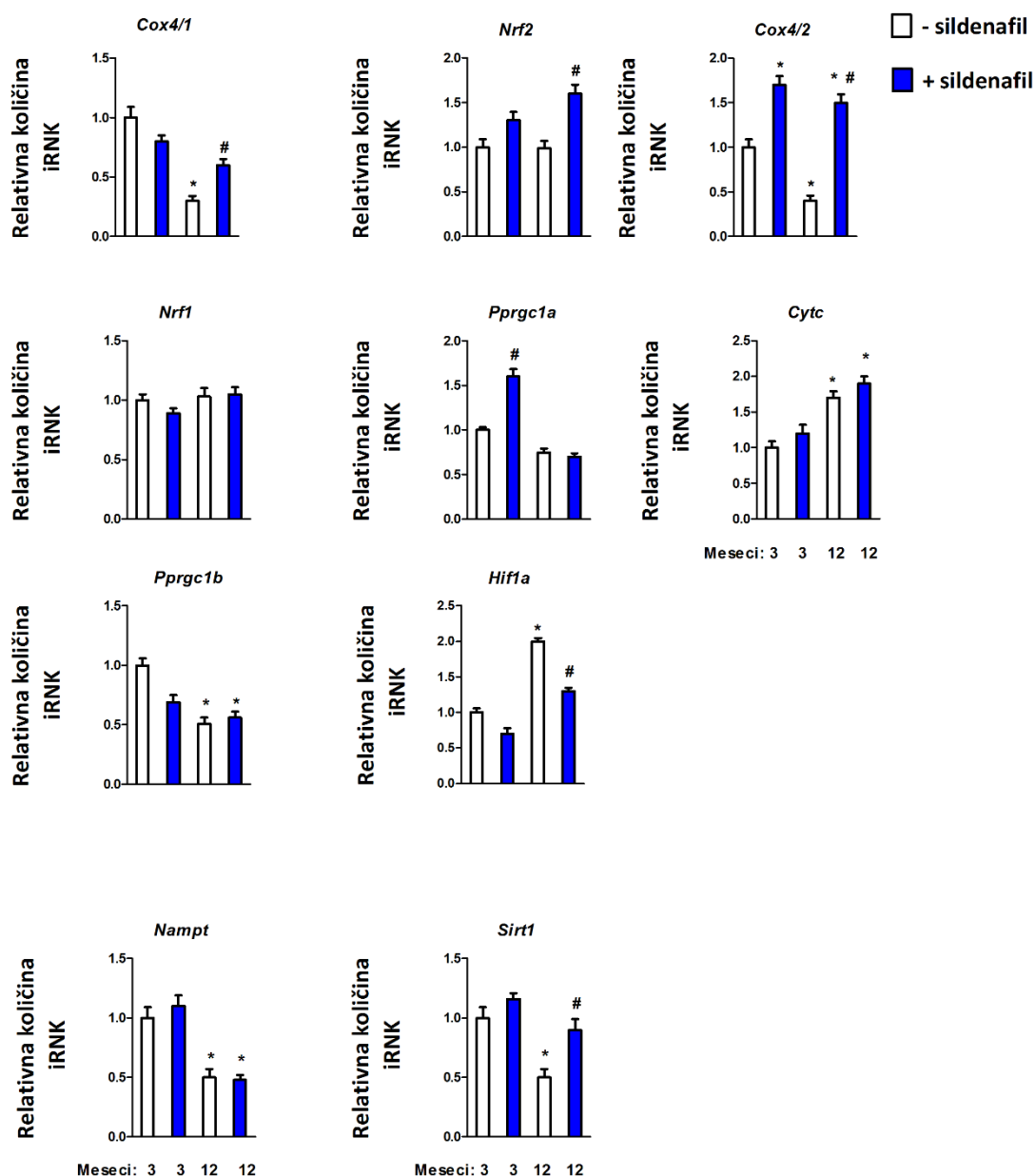
Slika 4.3.1.1. Starenjem uzrokovane promene eksprimiranja gena – regulatora energetske homeostaze. L_c (3×10^6) izolovane iz tromesečnih, dvanaestomesečnih i petnaestomesečnih ili starijih pacova korišćene su kao izvor RNK i proteina radi analiziranja eksprimiranja gena (A) RQ-PCR metodom u prisustvu 500nM specifičnih prajmera. Nivo proteina određen je Western blot metodom (B) upotrebom specifičnih primarnih i odgovarajućih sekundarnih antitela. Predstavljeni rezultati normalizovani su na nivo endogene kontrole *Actb*/ACTB i predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna ogleda. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi.

4.3.2. Efekat akutne inhibicije PDE5 na parametre energetske homeostaze u Lajdigovim ćelijama srednjovečnih i starih pacova – *in vivo* pristup

Kako je *ex vivo* primena cGMP imala pozitivan efekat na produkciju T+DHT ispitano je i *in vivo* delovanje ovog sekundarnog glasnika na iste parametre. U cilju povećanja endogenog nivoa cGMP, mužjaci pacova starosti tri, dvanaest i osamnaest meseci pojeni su rastvorom sildenafil (1.25mg/kg) 2h pre žrtvovanja. Dobijeni rezultati su potvrdili povećanu produkciju ATP u L α životinja starih dvanaest i osamnaest meseci (Slika 4.3.2.A). Takođe, u istim ćelijama je detektovano povećanje Ψ koje je dostiglo statističku značajnost u osamnaestom mesecu (Slika 4.3.2.B). Hronološki izmenjena funkcionalnost mitohndrija potvrđena je i visokoim stepenom korelacije između produkcije ATP i Ψ (Slika 4.3.2.D). Akutna primena sildenafil snizila je nivo ATP u slučaju tromesečnih i dvanaestomesečnih životinja i smanjila Ψ u svim ispitivanim starosnim grupama (Slika 4.3.2.A,B). Tretman je takođe izazvao statistički značajno povećanje produkcije T+DHT kod tromesečnih i dvanaestomesečnih životinja, dok u slučaju osamnaestomesečnih životinja detektovan porast nije bio statistički značajan (Slika 4.3.2.C). Osim uticaja na parametre energetske homeostaze, u ćelijama dvanaestomesečnih životinja tretman je stimulisao eksprimiranje *Cox4/1*, *Cox4/2*, *Sirt1* u odnosu na netretiranu kontrolu i doveo nivo eksprimiranja *Hif1a* na nivo adulta. U ćelijama tromesečnih životinja tretman je značajno povećao eksprimiranje *Pprgc1a* i *Cox4/2* (Slika 4.3.2.1).



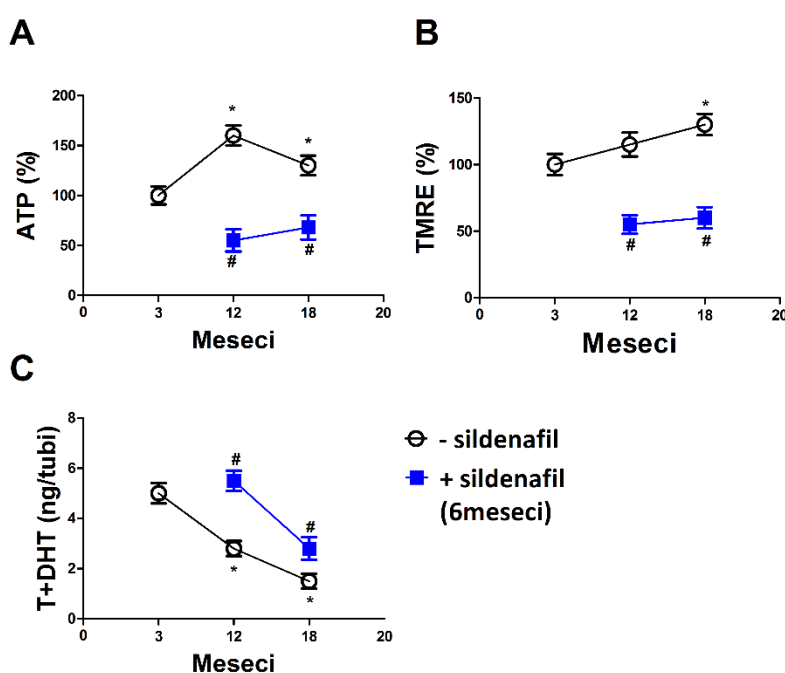
Slika 4.3.2. Efekat akutne *in vivo* inhibicije PDE5 na energetske homeostazu L \acute{c} i produkciju T+DHT tokom starenja pacova. Tromesečni, dvanaestomesečni i osamnaestomesečni mužjaci *Wistar* pacova pojeni su rastvorom sildenafilila (1.25mg/kg) 2h pre žrtvovanja. Nivo ATP u ćelijskom sadržaju (2×10^6 L \acute{c}) je određen luminometrijskim merenjem (A) i u istim uzorcima određena je produkcija T+DHT (C) RIA metodom. Ostatak L \acute{c} (0.2×10^6 /bunaru) upotrebljen je za fluorimetrijsko određivanje promene polarizovanosti mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi$) (B). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna oglada. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između adultnih životinja i ostalih starosnih dobi. #-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih životinja u okviru iste starosne dobi. R-koeficijent korelacije.



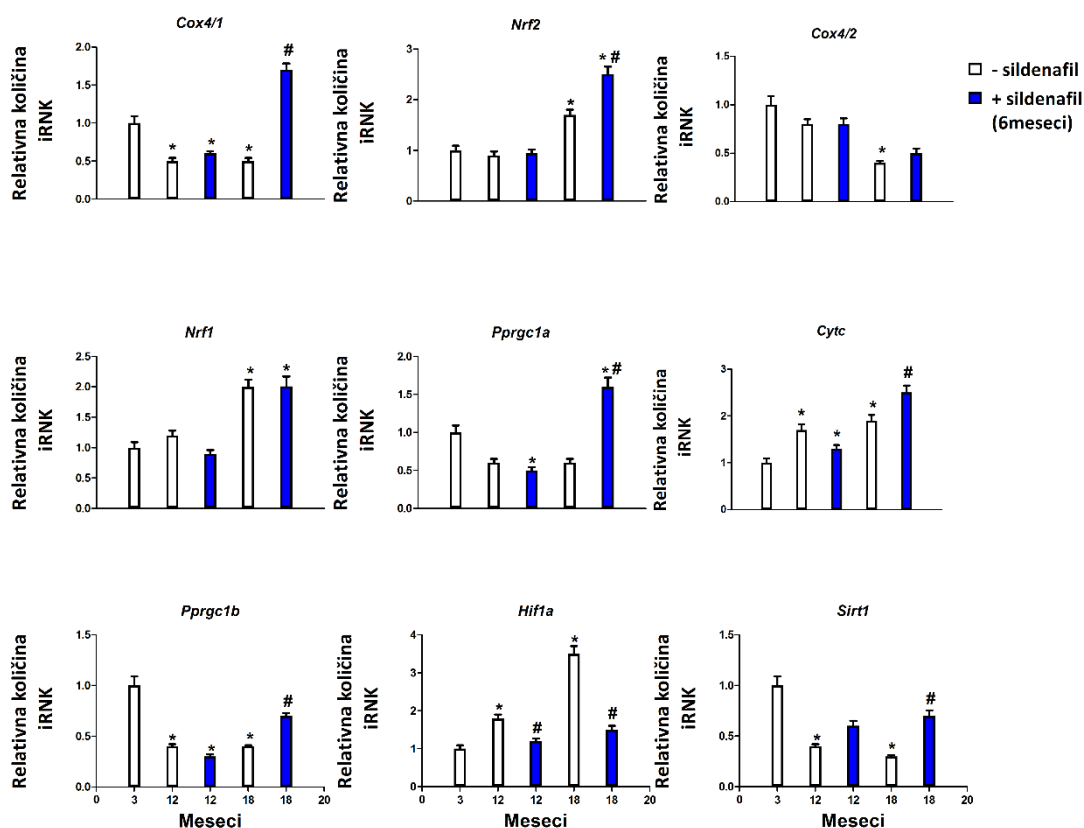
Slika 4.3.2.1. Efekat akutne inhibicije PDE5 na profil ekspimiranja gena – kontrolora energetske homeostaze u L \acute{c} adultnih i sredovečnih pacova Tromesečni i dvanaestomesečni mužjaci *Wistar* pacova pojeni su rastvorom sildenafilu (1.25mg/kg) 2h pre žrtvovanja a izolovane L \acute{c} (3×10^6) korišćene su kao izvor RNK. Uticaj tretmana na profil ekspimiranja gena ustanovljen je RQ-PCR metodom u prisustvu 500nM specifičnih prajmera. Predstavljeni rezultati normalizovani su na nivo endogene kontrole *Actb* i predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna ogleđa. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi. #-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih životinja u okviru iste starosne dobi.

4.3.3. Efekat hronične inhibicije PDE5 na parametre energetske homeostaze u Lajdigovim ćelijama srednjovečnih i starih pacova – *in vivo* pristup

U skladu sa pozitivnim dejstvom dugotrajne primene sildenafilu na produkciju T+DHT i sposobnost akutne primene sildenafilu da normalizuje parametre mitohondrijske funkcionalnosti izmenjene usled starenja, cilj naredne etape istraživanja bio je ispitati hroničan efekat sildenafilu na parametre mitohondrijske funkcionalnosti i androgeni kapacitet Lc. U skladu sa tim, šestomesečni i dvanaestomesečni mužjaci pacova svakodnevno su pojeni rastvorom sildenafilu (1.25mg/kg) tokom šest meseci. Dugoročna inhibicija PDE5 izazvala je smanjenu produkciju ATP (Slika 4.3.3.A), smanjenje Ψ (Slika 4.3.3.B) i povećanu produkciju T+DHT (Slika 4.3.3.C) u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu životinja. Tretman je takođe ublažio smanjenje eksprimiranja *Cox4/1*, *Pprgc1a*, *Pprgc1b*, *Nrf2*, *Cytc* i *Sirt1* i značajno smanjio eksprimiranje *Hif1a* u Lc dvanaestomesečnih i osamnaestomesečnih pacova (Slika 4.3.3.1.)



Slika 4.3.3. Efekat hronične inhibicije PDE5 na energetske homeostazu i androgeni kapacitet Lc. Šestomesečni i dvanaestomesečni mužjaci pacova pojeni su rastvorom sildenafilu (1.25mg/kg) svakodnevno tokom šest meseci. Nivo ATP u ćelijskom sadržaju (2×10^6 Lc) je određen luminometrijskim merenjem (A) i u istim uzorcima određena je produkcija T+DHT (C) RIA metodom. Ostatak Lc (0.2×10^6 bunaru) upotrebljen je za fluorimetrijsko određivanje promene polarizovanosti mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi$) (B). Rezultati predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna oglada. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između adultnih životinja i ostalih starosnih dobi. #-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih životinja u okviru iste starosne dobi.



Slika 4.3.3.1. Efekat hronične inhibicije PDE5 na profil ekspimiranja gena - kontrolora energetske homeostaze funkcije u *Lc*. Šestomesečni i dvanaestomesečni mužjaci pacova pojeni su rastvorom sildenafil (1.25mg/kg) svakodnevno tokom šest meseci nakon čega su izolovane *Lc* (3×10^6) korišćene kao izvor RNK. Uticaj tretmana na profil ekspimiranja gena ustanovljen je RQ-PCR metodom u prisustvu 500nM specifičnih prajmera. Predstavljani rezultati normalizovani su na nivo endogene kontrole *Actb* i predstavljaju srednje grupne vrednosti \pm SEM iz tri nezavisna ogleđa. *-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tromesečnih kontrola i ostalih starosnih dobi. #-statistički značajne promene na nivou $p < 0.05$ između tretiranih i netretiranih životinja u okviru iste starosne dobi.

Kako je hroničan tretman sildenafilom povećao produkciju T+DHT u dvanaestom i osamnaestom mesecu starosti uz normalizaciju parametara mitohondrijske aktivnosti i ekspimiranje gena odgovornih za funkcionisanje mitohondrija i redoks regulaciju ćelijske homeostaze, pretpostavlja se da je pozitivno dejstvo sildenafil na produkciju T+DHT posredovano njegovim pospešivanjem funkcije mitohondrija u *Lc*.

5. Diskusija

Starenje muškaraca prati sporo ali konstantno smanjenje produkcije T+DHT koje oko pete decenije života može dostići subfiziološke koncentracije usled poremećaja funkcionalnosti testisa (primarni hipogonadizam) ili hipotalamusa i adenohipofize (sekundarni hipogonadizam) (Basaria, 2014; Klotz, 2014; Tajar i sar., 2010; Paduch i sar., 2013; Wang i sar., 2008). Subfiziološke koncentracije T+DHT u kombinaciji sa smanjenim libidom, erektilnom disfunkcijom i izostankom jutarnje erekcije predstavljaju klinički i biohemijski sindrom označen kao LOH (*engl.* Late onset hypogonadism) ili andropauza (Klotz, 2014; Lunenfeld i sar., 2015; Wang i sar., 2008). Osim seksualnih simptoma koji najviše koreliraju sa smanjenim nivoom T+DHT, tokom starenja se javlja čitav niz psiho-fizičkih promena uključujući zamor, smanjenje mišićne mase, povećanje masnih naslaga, osteoporoza, anksioznost, depresiju itd. (Araujo, 2011; Klotz, 2014; Lunenfeld i sar., 2015; Wang i sar., 2008). Od kada je definisan kao sindrom pa do danas, LOH se u literaturi najčešće označava kao kontraverzno stanje (Busnelli i sar., 2017), čemu najverovatnije doprinose problemi dijagnostikovanja LOH, mogućnost njegovog izostanka kod zdravih starih muškaraca i činjenica da veliki broj naučnika ističe da nivo T+DHT tokom starijeg životnog perioda oslikava zdravstveno stanje individue. Preciznije govoreći, još uvek ne postoji jasno mišljenje da li je nizak nivo T+DHT nakon pete decenije života uzrok ili posledica starenja, jer se zna da je smanjeno nivo T+DHT uzrokovan primarnim hipogonadizmom veoma redak i da se znatno češće javlja kao posledica nefunkcionisanja hipotalamusa, adenohipofize i u slučaju hroničnih poremećaja uključujući gojaznost, dijabetes, hipertenziju, inflamatorni artritis itd. (Busnelli i sar., 2017; Huhtaniemi, 2014).

U skladu sa problemima koji prate dijagnostiku LOH, upitna je i njeno terapija. Prema odobrenju FDA (*engl.* Food and drug administration), zamenska terapija testosteronom (*engl.* Testosterone replacement therapy, TRT) prepisuje se u slučajevima hipogonadizma prouzrokovanih poremećajima rada testisa, adenohipofize ili mozga (Busnelli i sar., 2017). Sa druge strane, poslednje dekade obeležila je intenzivna upotreba testosterona za tretiranje LOH, a preparati upotrebljavani u te svrhe označeni su sa „Low-T drugs“ (*engl.* Low testosterone drugs) (Kloner i sar., 2016). U kontekstu povećane primene TRT zanimljivo je istaći da je američka farmaceutska industrija tokom 2002. zaradila 324 miliona \$, u 2012. 2 milijarde \$ i pretpostavlja se da će u 2020. taj broj iznositi oko 6.5 milijardi \$ (Busnelli i sar., 2017). Povećanoj upotrebi T+DHT svakako doprinose direktne

i indirektne farmaceutske kampanje kao i uticaj T+DHT na ljudsko ponašanje i njegovo označavanje kao „socijalni hormon“. U tom kontekstu veoma je rasprostranjeno mišljenje da upotreba T+DHT može poboljšati performanse starijih muškaraca tokom stalne profesionalne i lične kompeticije sa mlađim muškarcima (Busnelli i sar., 2017). Nasuprot povećanoj primeni TRT, dostupna literatura navodi da je koristan efekat TRT potvrđen samo u slučaju povećanja mišićne mase, a da je spekulativan po pitanju seksualnih performansi, promena ponašanja, kognitivnih osobina i celokupne fizičke aktivnosti. Osim spekulativnog benefita, upotreba T+DHT dovodi se u vezu sa pojavom akni, ginekomastije, edema, kardiovaskularnih poremećaja, uvećanja prostate itd. Uz to, prema strogom kriterijumu, LOH je prisutan kod malog broja ispitanika od kojih bi većina imala korist od smanjenja telesne mase i promene životnih navika, a najmanji procenat ispitanika trebalo bi da prima TRT (Busnelli i sar., 2017).

Eksperimentalni modeli korišćeni pri istraživanju staračkog hipogonadizma podrazumevaju prevashodno upotrebu pacova kao model organizma i različite *ex vivo* pristupe. U skladu sa problemima interpretacije dobijenih rezultata na humanu populaciju i brojne indirektno zaključke, ističe se potreba stalnog unapređivanja *in vivo* modela za dalja ispitivanja ovog kompleksnog fenomena (Beattie i sar., 2015; Huhtaniemi, 2014; Wang i sar., 2008). U skladu sa tim, prvi cilj ove doktorske disertacije bio je defenisanje *Wistar* pacova kao modela za dalja istraživanja staračkog hipogonadizma, te su sve *in vivo* procedure rađene na pomenutom soju, a sve *ex vivo* procedure vršene su na primarnoj kulturi L_c i/ili primarnoj testikularnoj kulturi.

5.1. Starenje i promene endokrine funkcije Lajdigovih ćelija *Wistar* pacova

Hronološki posmatrano, endokrine promene hipotalamo-hipofizno-gonadne osovine *Wistar* pacova manifestuju se smanjenjem nivoa T+DHT u serumu za 21.7% u dvanaestom mesecu i 48.2% nakon petnaestog meseca uz nepromenjen nivo LH. Niži nivo T+DHT u serumu praćen je i manjim nivoom T+DHT u L α od petnaestog meseca i smanjenim eksprimiranjem *Ins13/INSL3* od dvanaestog meseca života pacova. Prikazani rezultati u saglasnosti su sa literaturnim navodima prema kojima smanjenu produkciju T+DHT prati nepromenjen ili blago povišen nivo LH (Araujo i Wittert, 2011; Chen i sar., 2002) upućujući na smanjenu funkcionalnost L α tokom starenja pacova. Dodatna potvrda subfunkcionalnosti L α je i nizak nivo INSL3 koji zajedno sa T+DHT predstavlja glavni endokrini produkt L α i marker njihove funkcionalnosti tj. subfunkcionalnosti (Bay i Andersson, 2011; Colon i sar., 2007). Izneti rezultati jasno govore o prisustvu primarnog hipogonadizma tokom starenja *Wistar* pacova i svedoče da faktori mimo nivoa LH uzrokuju subfunkcionalnost L α , što je i naknadno potvrđeno njihovim smanjenim steroidogenim kapacitetom i neadekvatnim odgovorom na hCG (analog LH). Nizak steroidogeni kapacitet L α dvadesetčetvoromesečnih pacova ocenjen je smanjenom produkcijom T+DHT i PROG tokom stimulacije steroidogenim supstratima-prekursorima u sintezi testosterona. Detektovan niži androgeni kapacitet u saglasnosti je sa literaturnim navodima dobijenim na *Brown Norway* soju pacova (Chen i sar., 2009; Luo i sar., 1996) i verovatno je posledica smanjenog eksprimiranja i aktivnosti enzima odgovornih za transport holesterola i sintezu T+DHT (Chen i sar., 2002). Paralelno sa opisanim istraživanjima izvršena je i provera sposobnosti L α da odgovore na prisustvo hCG putem produkcije T+DHT i cAMP. Dobijeni rezultati pokazuju da se tokom života pacova odgovor L α na hCG/LH konstantno smanjuje, i da je u slučaju submaksimalnih koncentracija gonadotropina smanjen odgovor L α prisutan od šestog meseca, a u slučaju maksimalnih koncentracija od dvanaestog meseca života pacova. Neadekvatan odgovor L α na stimulaciju hCG mogao bi se objasniti smanjenim eksprimiranjem *Lhr* što je u saglasnosti sa manjim brojem LHR u dubokoj starosti pacova (Chen i sar., 2002).

5.2. Starenje i promene ćelijske signalizacije uključene u regulaciju sinteze testosterona

Za objašnjenje niske produkcije cAMP tokom starenja L α postavljene su dve hipoteze. Prema prvoj hipotezi, niska produkcija cAMP reprezentovala bi smanjenu aktivnost membranskih ADCY i/ili smanjenu interakciju između LHR (G-protein kuplovani receptor) i membranskih ADCY, a prema drugoj hipotezi, nizak nivo cAMP bio bi posledica njegove intenzivne razgradnje od strane fosfodiesteraza. Kako bi se proverila prva hipoteza analiziran je profil ekspimiranja i nivo ADCY kao i nivo G α s subjediniice receptora. Rezultati su pokazali da tokom života pacova ne dolazi do promena u ekspimiranju *Adcy* gena niti nivoa G α s subjediniice, a čak je sa starenjem detektovano povećano ekspimiranje *Adcy10* koje je potvrđeno i povišenim nivoom proteina. Izostanak smanjenog ekspimiranja *Adcy* i konstantan nivo G α s subjediniice tokom života pacova u saglasnosti je sa literaturnim navodima (Chen i sar., 2002; Chen i sar., 2004) te bi se prva hipoteza mogla smatrati neosnovanom. U skladu sa drugom hipotezom je povećano ekspimiranje *Pde4a* i *Pde4b* koje pozitivno korelira sa smanjenom produkcijom T+DHT od dvanaestog meseca života pacova. Precizniji uvid u vezu između povećanog ekspimiranja *Pde* i smanjenog nivoa cAMP, dobijen je ispitivanjima tokom kojih su L α tromesečnih i dvadesetčetvoromesečnih pacova tretirane forskolinom, samostalno i u prisustvu IBMX. Upotrebom forskolina kao direktnog stimulatora membranskih ADCY „zaobilazi“ se aktivacija ADCY putem receptora, dok je IBMX korišćen kao neselektivni inhibitor PDE uključujući PDE1 sa IC₅₀ pri koncentraciji od 4 μ M i PDE 2/3/4/5/6/7/10/11 sa IC₅₀ pri koncentracijama od 2 do 100 μ M (Beavo, 1995). Dobijenim rezultatima ustanovljeno je da samostalno primenjen forskolin dozno-zavisno povećava nivo cAMP i T+DHT, ali uz značajno niže vrednosti oba parametra u slučaju dvadesetčetvoromesečnih pacova. Kombinacija forskolina i IBMX dovela je do dozno-zavisnog povećanja količine cAMP i T+DHT u obe ispitivane grupe, ali bez značajnih razlika između grupa. Dobijeni rezultati opravdavaju hipotezu o ulozi PDE tj. PDE4A i PDE4B u starenjem promovisanom smanjenju nivoa cAMP i u skladu su sa ranijim nalazima (Andric i sar., 2010) prema kojima L α ekspimiraju više izoformi PDE (*Pde4a*, *Pde4b*, *Pde4d*, *Pde7a*, *Pde7b*, *Pde8a* i *Pde8b*) od kojih većina učestvuje u kontroli LHR-cAMP signalizacije.

S obzirom na ulogu cAMP u genomskoj (hroničnoj) kontroli steroidogeneze, opravdano je pretpostaviti da smanjenje njegovog nivoa u L \acute{c} izaziva promene eksprimiranja gena odgovornih za transport holesterola i sintezu T+DHT. Izneta pretpostavka u saglasnosti je sa detektovanim smanjenim eksprimiranjem *Cyp11a1* i *Cyp17a1* od dvanaestog meseca, *Star* od petnaestog meseca i *Hsd17b4* od osamnaestog meseca. Predstavljeni rezultati ukazuju na to da su *Cyp11a1* i *Cyp17a1* najosetljiviji na promene izazvane starenjem, a u celosti odgovaraju promenama eksprimiranja pomenutih gena kod *Brown Norway* pacova (Chen i sar., 2009; Luo i sar., 1996). Kako je cAMP genomski kontrola steroidogeneze posredovana većim brojem transkripcionih faktora, uključujući CRE/CREB (Payne i Youngblood, 1995), SF1, GATA, NUR77 i DAX1 (Lavoie i King, 2009), usledila je ocena njihovog eksprimirajućeg profila. Najvažniji rezultati pokazali su da od dvanaestog meseca starosti opada eksprimiranje *Sfl* i *Dax1* i da se eksprimirajući profil *Creb1a* i *Gata4* nije menjao tokom života pacova. Kako se smanjenje eksprimiranja *Cyp11a1* i *Cyp17a1* poklapa sa smanjenim eksprimiranjem transkripcionih faktora (SF1 i DAX1) i smanjenom produkcijom cAMP, i našim rezultatima potvrđena je zavisnost eksprimiranja steroidogenih gena od statusa cAMP i SF1 (Lavoie i King, 2009). Za sada nije poznat uzrok raličitog eksprimiranja transkripcionih faktora tokom starenja, a svakako je moguće da različito kombinovanje stimulatora i represora tokom starenja progresivno inhibiše eksprimiranje steroidogenih gena.

5.2.1. Promene u funkcionisanju cAMP signalnog puta uzrokovane starenjem

S obzirom da cAMP signalni put predominantno koordiniše steroidogenezu, od interesa je bilo ispitati postoje li i kakav je manir promena njegovih komponenata tokom starenja pacova. Nepromenjen nivo eksprimiranja detektovan je u slučaju *Gas* subjedinice i *Adcy3/5/6/7*, dok je porast eksprimiranja zapažen u slučaju *Pde4a/b* i *Adcy9/10*. Povećano eksprimiranje ADCY10 moglo bi se objasniti njenom ulogom metaboličkog senzora (Chang and Oude-Elferink, 2014) što bi dalje sugerisalo na postojanje veze između metaboličkih promena i cAMP signalizacije u L \acute{c} starog fenotipa, kao i na postepene promene metabolizma L \acute{c} od adultnog perioda. Uz to, *ex vivo* pristupom ustanovljeno je da ADCY10 učestvuje u održavanju ukupnog nivoa cAMP u L \acute{c} , a shodno činjenici da se radi o citoplazmatskom proteinu spekulativna je i kompartmanizacija cAMP. U kontekstu

pomenutih promena tokom starenja se ističe i povećano ekspimiranje *Prkar2a*/PRKAR2A koja takođe učestvuje u pozicioniranju PRKA (Wong i Scot, 2004). Stoga bi se i povećan nivo ove subjedinice mogao tumačiti u svetlu kompartmanizacije cAMP/PRKA signalizacije tokom starenja L_c.

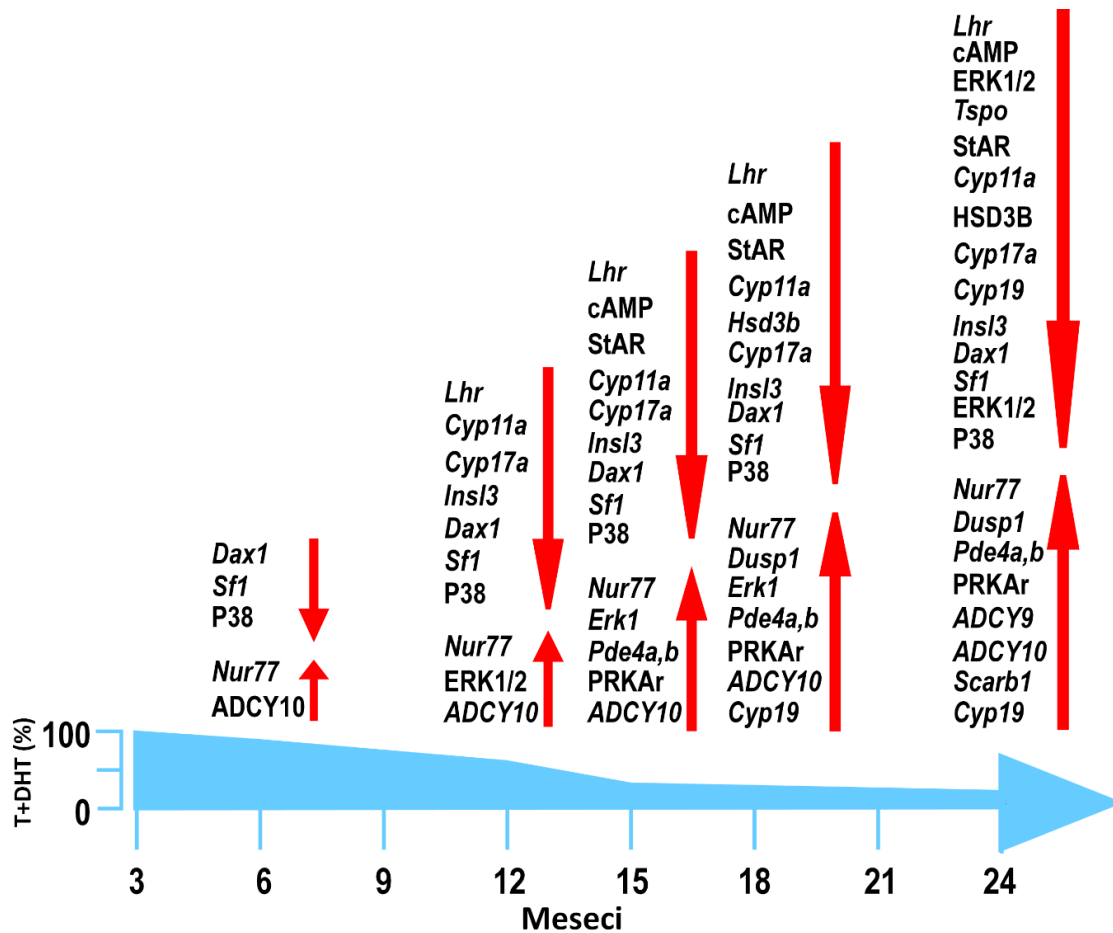
Poznato je da transkripcija steroidogenih gena zavisi od cAMP (Dufau, 1998; Haider 2004), pa je stoga proverena i mogućnost da analog cAMP normalizuje starenjem uzrokovane promene u ekspimiranju gena regulatora steroidogeneze i komponenata cAMP signalne kaskade. Dobijenim rezultatima ustanovljeno je da tretman povećava nivo ekspimiranja *Sfl* i *Nur77* iznad nivoa adultne kontrole, dok je nivo ekspimiranja *Cyp11a1*, *Cyp17a1* i *Star* povećan ali bez dostizanja nivoa detektovanog kod adultnih životinja. Povećano ekspimiranje steroidogenih gena moglo bi se objasniti direktnim delovanjem CRE/CREB sistema ili indirektno stimulacijom transkripcije *Sfl* i/ili *Nur77* jer je poznato da SF1 stimuliše transkripciju *Star* (Hiroi i sar., 2004), *Cyp11a1* (Moroshashi i sar., 1992) i *Cyp17a1* (Dammer i sar., 2007), a aktiviranje LH-cAMP kaskade intenzivira transkripciju *Nur77* (Martin i Trembley, 2010). Kako tretman nije uspeo da normalizuje nivo ekspimiranja ostalih gena (*Adcy10*, *Pde4a/b*, *Prkar2a*, *Prkaca*) i dovede nivo T+DHT na nivo adultne kontrole očigledno je da postoje faktori koji osim smanjenog nivoa cAMP doprinose subfunkcionalnosti L_c tokom starenja. U saglasnosti sa iznetim zaključkom, dalja ispitivanja usmerena su u pravcu istraživanja veze između MAPK i NO-cGMP-PRKG signalizacije i subfunkcionalnosti L_c koja nastaje sa starenjem.

5.2.2. Promene MAPK signalizacije uzrokovane starenjem

Prema široko prihvaćenoj hipotezi, starenje je posledica oksidativnih oštećenja usled povećane produkcije oksidativnih radikala (Beattie i sar. 2013; Chen i sar., 2009) i promena koje nastaju kao posledica stresom aktivirane signalizacije, uključujući aktivaciju P38 i JNK (Droge, 2002). Pomenuta hipoteza primenljiva je i na L_c jer osim oksido-redukcionih procesa elektron transportnog lanca, ROS nastaje i tokom katalitičkog delovanja CYP enzima (Hanukoglu, 2006), a P38 i JNK/c-JUN signalizacija učestvuje u kontroli ekspimiranja steroidogenih gena (Lee i sar., 2009; Svehinkov i sar., 2003; Yu i sar., 2005; Zheng i sar., 2014). S obzirom na to da starenje prati povećan nivo

ROS (Beattie i sar. 2013; Chen i sar., 2009) i suprimirana steroidogeneza sa niskim ekspresiranjem *Star* i *Cyp17* (Chen i Zirkin, 1999; Peltola i sar., 1996) pretpostavlja se da povećana produkcija ROS aktivira JNK i inhibiše ekspresiranje komponenata steroidogene mašinerije. U skladu sa pretpostavkom, naši rezultati su pokazali povećan nivo fosforilisan/aktivirane JNK1 od šestog meseca dok je povećan nivo JNK1 detektovan u dvadeset četvrtom mesecu života pacova. U svetlu literaturnih navoda verovatno je da povećana aktivnost JNK1 utiče na suprimiranu steroidogenezu reproduktivnog starenja. Osim JNK sistema, ROS aktivira i P38 proteinsku familiju (Manna i Stocco, 2011) koja takođe učestvuje u kontroli ekspresiranja *Star* i *Hsd3b* (Svechinkov i sar., 2003; Yu i sar., 2005; Zheng i sar., 2014). Prema našim rezultatima, ekspresiranje *p38/P38B* je redukovano od šestog meseca, što dalje ukazuje na njenu uključenost u suprimiranje steroidogeneze tokom starenja. Zavisnost inhibicije P38 i suprimirane steroidogeneze pokazana je i u drugim sistemima (Abidi i sar., 2008), a potencijalni razlog suprimiranja steroidogeneze mogao bi biti izostanak dejstva DAX1 (Yu i sar., 2005). Posledice nefunkcionisanja DAX1 faktora poznate su u vidu smanjenja veličine testisa, smanjene spermatogeneze, smanjene funkcionalnosti Sertolijevih ćelija (Sć) i Lć i neplodnosti (Jeffs i sar., 2001; Meeks i sar., 2003; Yu i sar., 1998), dakle stanjima sličnim reproduktivnom starenju.

Uz JNK i P38, i ERK1/2 sistem je uključen u kontrolu steroidogeneze, kontrolom ekspresiranja i aktivacije *Star/StAR* (Manna i Stocco, 2011; Manna i sar., 2007; Manna i sar., 2006; Brion i sar., 2011; Gyles i sar., 2001; Poderoso i sar., 2008). Našim rezultatima pokazan je bifazni profil ekspresiranja *Erk1/2* sa porastom u dvanaestom i smanjenjem u dvadeset četvrtom mesecu što prati profil ekspresiranja *Nur77*. S obzirom da *Nur77* kontroliše steroidogenezu (Kovalovsky i sar., 2002; Wingate i Arthur, 2006) i transkripciju *Star* (Martin i Trembley, 2010) moguće je da ERK1/2-NUR77 sistem obezbeđuje stabilan nivo ekspresiranja *Star* u sredovečnom periodu života pacova i uzrokuje njegovo smanjenje u dubokoj starosti.



Slika 5.2.2. Starenjem uzrokovane promene nivoa T+DHT, cAMP i MAPK signalizacije u Lc Wistar pacova

5.2.3. Promene NO-cGMP-PRKG signalizacije uzrokovane starenjem

Kako tretiranje Lc analogom cAMP nije imalo efekta na promene komponentata MAPK signalnog puta uzrokovane starenjem, pristupilo se ispitivanju uloge NO-cGMP-PRKG signalne kaskade u smanjenoj funkcionalnosti Lc starog fenotipa. Prema našim rezultatima, starenje Lc prati povećana produkcija NO i cGMP kao i povećano ekspimiranje *Nos1*, *Nos2*, *Gucy1b/GUCY1B*, *Prkg1/PRKG1* bez promena u ekspimiranju *Pde5*. Povećana produkcija NO verovatno je posledica povećanog ekspimiranja *Nos1/2* što je u saglasnosti sa detektovanom povećanom aktivnosti NOS tokom starenja Lc (Ruffoli i sar., 2001). Povećano ekspimiranje *Gucy1b/GUCY1B* i *Prkg1/PRKG1* moglo bi se dovesti u vezu sa hipoksijom (Jernigan i sar., 2003) koja nastaje u testisima starih životinja kao posledica promena krvnih sudova (Hatakeyama i

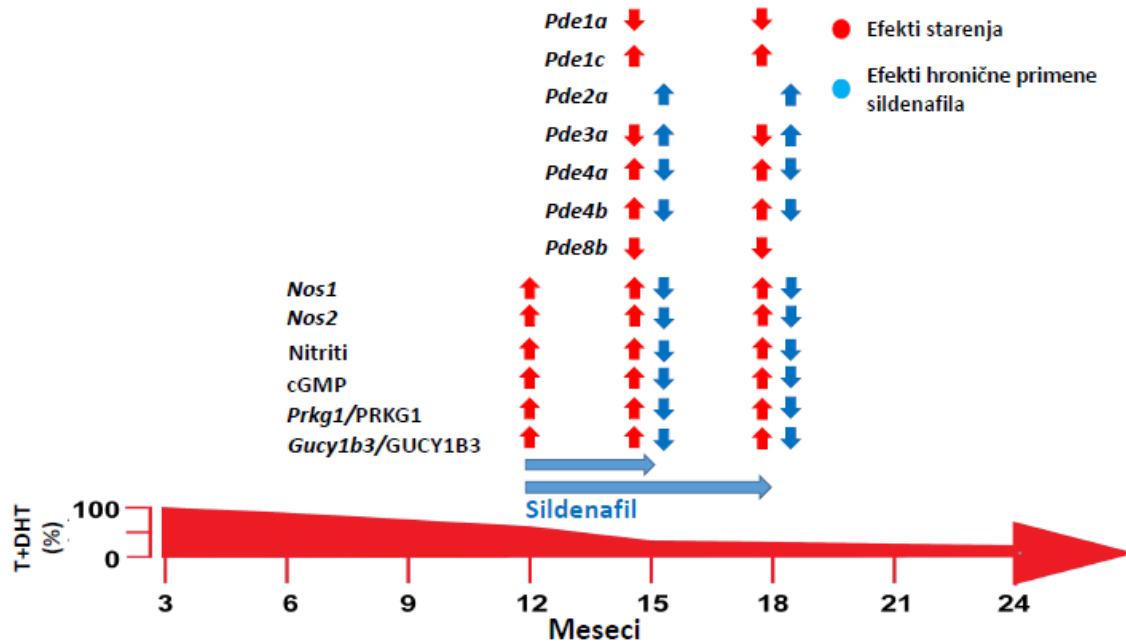
sar., 1966; Holstein i sar., 1988; Regadera i sar., 1985; Sweeney i sar., 1991; Takizawa i Hatakeyama, 1978) i povećane produkcije ROS (Lysiak i sar., 2009). Poznato je da NO suprimira steroidogenezu (Chen i sar., 2009; Weissman i sar., 2005) i ispoljava negativan efekat na druge ćelije testisa (Hikim i sar., 2005) što je potvrđeno i našim rezultatima prema kojima visoke doze NO inhibišu produkciju T+DHT *ex vivo*, a smanjenje produkcije T+DHT obrnuto korelira sa nivoom nitrita i cGMP *in vivo*. Inhibitorno dejstvo NO na proces steroidogeneze posledica je njegovog vezivanja za hem grupu CYP enzima (Del Punta i sar., 1996; Drewett i sar., 2002) i nezavisno je od cGMP (Andric i sar., 2007). U skladu s tim stimulacija L α starog fenotipa analogom cGMP povećala je produkciju T+DHT, a stimulacije donorem NO i supstratima za NOS su smanjile produkciju T+DHT (*ex vivo*). Predstavljenim rezultatima potvrđena je dualna modulacija L α starog fenotipa NO u smislu pozitivnog dejstva putem cGMP i negativnog dejstva zavisnog od NO, što odgovara postojećoj literaturi (Valenti i sar., 1999).

Shodno pozitivnom dejstvu cGMP, naredne etape istraživanja sprovedene su u cilju povećanja nivoa cGMP nezavisno od NO, te je vršena *ex vivo* i *in vivo* (akutna i hronična) inhibicija PDE5 primenom sildenafilu koji predstavlja specifični inhibitor PDE5 (Corbin i Francis, 1999). Sprovedeni *in vivo* tretmani ublažili su smanjenje T+DHT u serumu, TIF i L α uz povećano ekspimiranje gena steroidogene mašinerije i povećanje nivoa StAR i pStAR. Hronična primena sildenafilu dovela je do povećanja nivoa cAMP i povećanja ekspimiranja *Sfl*, smanjenja produkcije NO i normalizovanja ekspimiranja komponenata NO-cGMP-PRKG signalne kaskade. Povišen nivo cAMP mogao bi biti posledica smanjenog ekspimiranja cAMP specifičnih fosfodiesteraza, ali i posledica inhibicije PDE3A i PDE3B usled povećanja nivoa cGMP (Liu i Maurice, 1998; Rienhardt i sar., 1995). Iako nema podataka o direktnom uticaju NO-cGMP-PRKG kaskade na ekspimiranje SF1, poznato je da nitrozilacija SF1 faktora inhibiše njegovu aktivnost i inhibiše ekspimiranje *Star* i *Cyp11/17* (Sewer i Waterman, 2003; Zhao i sar., 2007). Stoga je opravdano pretpostaviti da smanjena produkcija NO nakon tretmana sildenafilom povećava aktivnost SF1. Povišen nivo cAMP u kombinaciji sa povećanim ekspimiranjem *Sfl* mogao bi prouzrokovati povećano ekspimiranje komponenata steroidogene mašinerije, uključujući ekspimiranje StAR. Povećan nivo pStAR u saglasnosti je sa literaturnim navodima (Janjic i sar., 2012) i mogao bi biti direktna

posledica aktivnosti PRKG1 (Andric i sar., 2007) ili aktivnosti drugih signalnih kaskada uključujući ERK1/2 (Zaragosa i sar., 2002).

Kako sildenafil menja mikrocirkulaciju u testisima i povećava oksigenaciju tkiva (Morelli i sar., 2011; Vignozzi i sar., 2006; Vignozzi i sar., 2008), detektovani pozitivni efekti i povećana zapremina TIF mogli bi biti i posledica indirektnog delovanja sildenafil. U skladu sa tim poznat je pozitivan uticaj vaskularizacije testisa na produkciju T+DHT (Damber i sar., 1978) kao i pozitivna veza između dostupnosti kiseonika i steroidogeneze u testisima (Quinn i Payne, 1984). Takođe je poznato da hipoksija povećava nivo GUCY i PRKG1 (Jernigan i sar., 2003), a da smanjuje nivo CYP11 i CYP17 (Mayers i sar., 2005). S tim u vezi, moguće je da sildenafil povećanjem vaskularizacije testisa smanjuje stepen hipoksije te smanjuje ekspimiranje komponenata NO-cGMP-PRKG1 signalne kaskade i nivo cGMP, a da povećanjem ekspimiranja CYP enzima doprinosi povećanoj produkciji T+DHT.

Povećana produkcija T+DHT nakon primene sildenafil u saglasnosti je i sa kliničkim istraživanjima (Spitzer i sar., 2013) prema kojima korisnici sildenafil imaju povećan nivo serumskog T+DHT i smanjen nivo LH, pomenuta studija i rezultati ove teze upućuju na testis kao ciljni organ za sildenafil. Ipak, i pored pozitivnog dejstva, primena sildenafil nije promenila profil ekspimiranja *Ins13* što ukazuje da starenjem indukovana subfunkcionalnost Lé nije isključivo posledica statusa NO-cGMP-PRKG signalnog puta.



Slika 5.2.3. Starenjem uzrokovane promene nivoa T+DHT i NO-cGMP signalizacije u Lc Wistar pacova. Efekti hronične inhibicije PDE5 na eksprimiranje komponenata NO-cGMP signalnog puta.

5.3. Starenje i energetska homeostaza Lajdigovih ćelija

Dobijenim rezultatima ustanovljeno je da starenje Lc prati izmenjena funkcionalnost mitohondrija koja se manifestuje smanjenom potrošnjom kiseonika, hiperpolarizacijom unutrašnje mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi$) i povećanom produkcijom ATP. Smanjena potrošnja kiseonika tokom starenja prisutna je i u drugim sistemima (Greco i sar., 2003) i verovatno je posledica smanjene dostupnosti kiseonika u testisima (Dominguez i sar., 2011) usled različitih promena njihovih krvnih sudova (Hatakeyama i sar., 1966; Holstein i sar., 1988; Regadera i sar., 1985; Sweeney i sar., 1991; Takizawa i Hatakeyama, 1978). Prisustvo hipoksije u testisima manifestuje se brojnim morfo-funkcionalnim promenama (Farias i sar., 2005; Liao i sar., 2010; Saxena, 1995), uključujući smanjenu brojnost Lc (Gosney, 1984) i smanjenu produkciju T+DHT (Farias i sar., 2008; Benso i sar., 2007) što je potvrđeno i našim rezultatima. Detektovana hiperpolarizacija mitohondrijske membrane mogla bi biti posledica povećanog nivoa ROS tokom starenja Lc (Chen i sar., 2001). Osim toga, pokazana je i pozitivna korelacija između hiperpolarizacije mitohondrijskih kristi i produkcije ROS (Banki i sar., 1999; Li i sar., 1999). Na prisustvo hipoksije i povećanu produkciju ROS ukazuje i povećano eksprimiranje *Hif1a* i

Nfr2/NRF2 tokom starenja, jer se zna da hipoksija povećava ekspimiranje *Hif1a* (Collins i sar., 2012; Ziello i sar., 2007) što indukuje ekspimiranje *Nfr2* odgovornog za kontrolu ekspimiranja enzima antioksidativne zaštite (Nguyen i sar., 2009). Uz to, hipoksično okruženje nastaje i u uslovima povećanog nivoa ROS što vodi stabilizaciji HIF1a (Lysiak i sar., 2009) u L \acute{c} . U kontekstu rezultata ove teze i povećane produkcije NO uzrokovane starenjem, naročito se ističe njegova uključenost u hiperpolarizaciju mitohondrijskih kristi Jurkat ćelija (Beltran i sar., 2002) i NO-zavisnu inhibiciju mitohondrijske biogeneze (Navarro i Boveris, 2007) što je u skladu sa smanjenim ekspimiranjem *Ppargc1a*, *Ppargc1b* i *Sirt1* tokom starenja L \acute{c} . S obzirom da su predstavljeni rezultati dobijeni upotrebom primarne kulture L \acute{c} , detektovana povećana produkcija ATP mogla bi biti posledica hiperpolarizacije unutrašnje mitohondrijske membrane i blago povećanog nivoa CYTC (Midzak i sar., 2011). Povećanje ekspimiranja *Cytc*/CYTC moglo bi se dovesti u vezu sa povećanom produkcijom ROS koja aktivira AMPK (Jäger i sar., 2007; Yoboue i sar., 2012;) i pojačava ekspimiranje *Nrf1* (Sulisman i sar., 2003; Yu i Yang, 2010) odgovornog za kontrolu ekspimiranja CYTC (Biswas i Chan, 2009; Schultz i sar., 2010). Izmenjenoj redoks regulaciji L \acute{c} sigurno doprinosi i smanjenje ekspimiranja *Nampt* koji predstavlja senzor NAD $^{+}$ /NADH odnosa (Romacho i sar., 2013), kao i smanjeno ekspimiranje COX4/1 i *Cox4/2* što je takođe u saglasnosti sa literaturnim navodima (Petrosillo i sar., 2013).

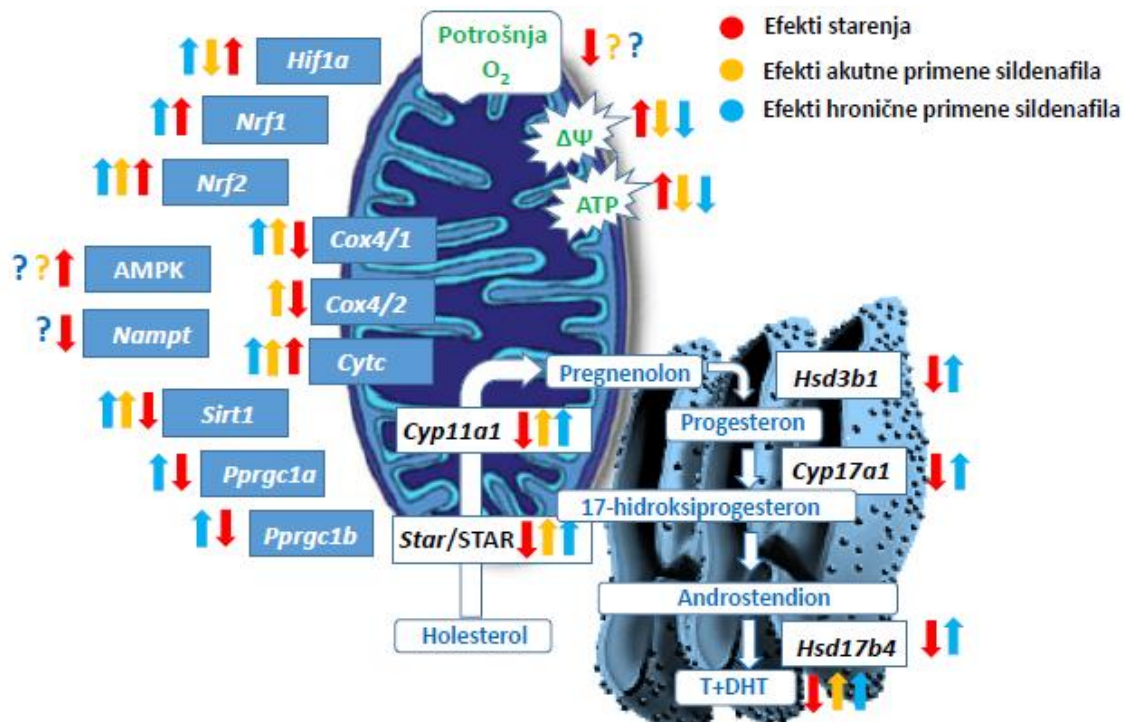
5.3.1. Uticaj cAMP i cGMP signalizacije na funkcionalnost mitohonrija tokom starenja Lajdigovih ćelija

Kako bi se ustanovio nezavistan uticaj cAMP i cGMP na parametre mitohondrijske funkcionalnosti, L \acute{c} tromesečnih, dvanaestomesečnih i osmanaestomesečnih životinja tretirane su sa hCG i cGMP (*ex vivo*). *Ex vivo* primena hCG dovela je do povećanja produkcije T+DHT i povećanja potencijala unutrašnje mitohondrijske membrane što je najverovatnije posledica povećanja nivoa cAMP i njegovog direktnog delovanja (Allen., 2006). Povećan nivo cAMP mogao bi aktivirati CREB koji pojačava mitohondrijsku respiraciju (Herzig i sar., 2000) čime bi se mogao objasniti povećan nivo ATP. *Ex vivo* primena cGMP izazvala je povećanje produkcije T+DHT što je u saglasnosti sa ranijim rezultatima LaRES (Andric i sar., 2007) kao i predstavljenim rezultatima ove teze i

najverovatnije je posledica aktivacije StAR od strane PRKG1. Smanjenje produkcije ATP tokom primene cGMP moglo bi biti posledica inhibitornog delovanja cGMP na aktivnost mitohondrija (Brown 2001), a povećana potrošnja kiseonika mogla bi biti rezultat izmenjenog metabolizma L α i npr. povećane oksidacije glukoze (Recchia i sar., 1999; Young i sar., 1997; Young i sar., 1998).

U skladu sa *ex vivo* delovanjem analoga cGMP usledila je ocena mitohondrijske funkcionalnosti nakon akutnog i hroničnog tretiranja pacova rastvorom sildenafilu. *In vivo* primena sildenafilu (akutna i hronična) normalizovala je parametre mitohondrijske aktivnosti i povećala produkciju T+DHT u L α starih pacova. Povećana produkcija T+DHT mogla bi biti posledica direktnog dejstva sildenafilu na L α ili indirektnog dejstva na vaskularni sistem i povećanu oksigenaciju testisa. Pozitivno dejstvo tretmana na parametre mitohondrijske funkcionalnosti moglo bi se razmatrati u kontekstu pozitivnog dejstva sildenafilu na redoks regulaciju L α i nekih markera mitohondrijske biogeneze. Prema našim rezultatima, akutna i hronična primena sildenafilu značajno smanjuje ekspimiranje *Hif1 α* , što je verovatno posledica povećane oksigenacije tkiva i u skladu je s literaturnim navodima (Volkan i sar., 2015). Takođe je poznato da sildenafil ima antioksidativno dejstvo (Inan i sar., 2015, Zahran i sar., 2015) i da povećava ekspimiranje komponenta elektron transportnog lanca (Whitaker i sar., 2013) što je u skladu sa povećanim ekspimiranjem *Nrf2*, *Cox4/1*, *Cox4/2* i *Cytc* nakon akutnog i hroničnog tretmana sildenafilom. Uz to, sildenafil stimuliše mitohondrijsku biogenezu (Whitaker i sar., 2013) što je u skladu sa povećanim ekspimiranjem *Pprgc1a*, *Pprgc1b*, *Sirt1*, *Nrf1* nakon tretmana sildenafilom.

Sumarno posmatrano verovatno je da sildenafil povećava oksigenisanost tkiva i doprinosi uspostavljanju redoks homeostaze L α pozitivnim delovanjem na neke markere mitohondrijske biogeneze i aktiviranjem mehanizama oksidativne zaštite čime pospešuje njihovu steroidogenu funkciju.



Slika 5.3.1 Uticaj starenja na eksprimiranje komponenata steroidogene mašinerije, regulatora energetske homeostaze i parametre energetske homeostaze. Efekti akutne i hronične inhibicije PDE5 na eksprimiranje komponenata steroidogene mašinerije, regulatora energetske homeostaze i parametre energetske homeostaze.

6. Zaključci

Shodno postavljenim ciljevima istraživanja i na osnovu predstavljenih rezultata doneti su sledeći zaključci:

1. Starenje *Wistar* pacova karakteriše se razvojem primarnog hipogonadizma, izmenjenom signalizacijom i energetsom homeostazom u Lajdigovim ćelijama.

- Primarni hipogonadizam kod *Wistar* pacova konstatovan je na osnovu smanjenog nivoa T+DHT u serumu počevši od dvanaestog meseca starosti, nepromenjenog nivoa LH i smanjenog eksprimiranja *Insl3/INSL3* u Lć. Od dvanaestog meseca smanjeno je eksprimiranje *Cyp* enzima (*Cyp11a1*, *Cyp17a1*), a kasnije i eksprimiranje ostalih komponenata steroidogene mašinerije (*Star/StAR*, *Hsd3b1/2/HSD3B*, *Hsd17b4*) kao i eksprimiranje regulatora steroidogeneze (*Sf1*, *Dax1*, *Nur77*).
- Prve promene u cAMP i MAPK signalizaciji javljaju se u u šestom mesecu starosti (povećanje eksprimiranja ADCY10 i aktivacije JNK). Kasnije tokom života dolazi do smanjenja eksprimiranja *Lhr*, smanjenja nivoa cAMP i povećanja eksprimiranja ADCY9, *Pde4a*, *Pde4b*, *Prkar2a* i PRKAR. Promene MAPK signalizacije karakteriše bimodalno eksprimiranje *Erk1/ERK1* (povećanje do dvanaestog i smanjenje od dvanaestog meseca), smanjeno eksprimiranje *Erk2*, *Mapk11 (P38b)*, P38 i povećano eksprimiranje *Mapk2k1*, *Dusp1* i JNK1.
- Starenje Lć prati povećana aktivnost NO-cGMP signalizacije iskazane povećanom produkcijom NO i povećanim nivoom cGMP; povećanim eksprimiranjem *Nos1*, *Nos2*, *Gucy1b*, *Prkg1/PRKG1*.
- Sa starenjem Lć dolazi do promena u energetske homeostazi Lć iskazanih povećanom produkcijom ATP, smanjenom potrošnjom kiseonika i povećanom polarizovanošću unutrašnje mitohondrijske membrane. Detektovane promene u skladu su sa izmenjenim eksprimiranjem gena (smanjenje eksprimiranja *Cox4/1*, *Cox4/2*, *Pprgc1a*, *Pprgc1b*, *Sirt1* i *Nampt*; povećanje eksprimiranja *Nrf2*, *Nrf1*, *Cytc* i *Hif1a*) i proteina (povećanje nivoa

NRF2, AMPK; smanjenje nivoa COX4) odgovornih za funkcionisanje mitohondrija i energetske homeostazu L α .

2. Nizak nivo cAMP nije jedini uzročnik smanjene funkcionalnosti Lajdigovih ćelija tokom starenja; cAMP i cGMP različito regulišu energetske homeostazu Lajdigovih ćelija tokom starenja; Visok nivo cGMP dvojakom regulišu steroidogenezu u Lajdigovim ćelijama starog fenotipa. Inhibicija PDE5 pozitivno utiče na energetske homeostazu Lajdigovih ćelija starog fenotipa.

- *Ex vivo* stimulacija L α starog fenotipa sa cAMP nije povećala nivo T+DHT na nivo produkcije detektovanog kod adultne kontrole. Tretman nije normalizovao sve promene ekspimiranja komponenata cAMP i MAPK signalnog puta, upućujući na postojanje drugih faktora koji osim niskog nivoa cAMP doprinose subfunkcionalnosti L α starog fenotipa.
- Akutna inhibicija PDE5 sildenafilom (*in vivo*) dovodi do povećanja nivoa T+DHT u serumu i TIF sredovečnih i starih pacova. Povećana produkcija T+DHT u skaldu je sa povećanim ekspimiranjem i aktivacijom StAR kao i povećanim ekspimiranjem *Cyp* enzima u L α sredovečnih i starih pacova (*ex vivo*). Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da inhibicija PDE5 povećava nivo cGMP koji povećava aktivaciju StAR i ekspimiranje gena steroidogene mašinerije čime povećava produkciju T+DHT.
- Hronična inhibicija PDE5 (*in vivo*) povećava produkciju T+DHT u serumu, TIF i L α starih pacova, a smanjuje nivo NO u serumu i inkubacionom medijumu L α i nivo cGMP u L α . Predstavljeni rezultati u saglasnosti su sa rezultatima *ex vivo* ispitivanja i ukazuju da povećan nivo cGMP zavisano od NO inhibiše steroidogenezu, dok povećan nivo uzrokovan inhibicijom PDE5 stimuliše steroidogenezu. Kako je tretman povećao nivo cAMP i smanjio nivo cAMP specifičnih PDE, moguće je da je povećana produkcija T+DHT posredovana i pozitivnim dejstvom tretmana na cAMP signalizaciju u L α .

- cAMP signalni put uzrokuje povećanje nivoa ATP i potrošnje kiseonika, dok cGMP izaziva smanjenje (normalizovanje) produkcije ATP i povećava potrošnju kiseonika (*ex vivo*).

- Akutna i hronična inhibicija (*in vivo*) PDE5 izazvala je smanjenje nivoa ATP i polarizovanosti mitohondrijske membrane u L ϵ sredovečnih i starih pacova. Akutni tretman je doveo i do povećanja ekspimiranja *Cox4/1*, *Cox4/2*, *Cytc*, *Sirt1* i smanjenog ekspimiranja *Hif1a* u L ϵ dvanaestomesečnih pacova. Hronični tretman je ublažio smanjenje ekspimiranja *Cox4/1*, *Pprgc1a*, *Pprgc1b*, *Nrf2*, *Cytc* i *Sirt1* i značajno smanjio ekspimiranje *Hif1a* u L ϵ dvanaestomesečnih i osamnaestomesečnih pacova

7. Literatura

- Abdou HS, Bergeron F, Tremblay JJ** (2014): A cell-autonomous molecular cascade initiated by AMP-activated protein kinase represses steroidogenesis. *Mol Cell Biol.* 34:4257-4271.
- Abidi P, Zhang H, Zaidi M, Shen WJ, Leers-Sucheta S, Cortez Y, Han J, Azhar S** (2008): Oxidative stress induced inhibition of adrenal steroidogenesis requires participation of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Endocrinol.* 198(1):193-207.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowels RG** (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357:593-615.
- Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, Hales KH, Hales DB** (2006): Energized, polarized and actively respiring mitochondria are required for acute Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology.* 147(8):3924-3935.
- Ankawe OO, Murphy PR, Moger WH** (1985): Characterization of β -adrenergic binding sites on rodent Leydig cells. *Biol Reprod.* 33:815–826.
- Anderson R, Prolla T** (2009): PGC-1 α in aging and anti-aging interventions. *Biochim Biophys Acta.* 1790(10):1059-1066.
- Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS** (2007): Protein kinase G mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *AM J Physiol Endocrinol Metab.* 293(5): E1399-E1408.
- Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS** (2010): Sildenafil treatment in vivo stimulates Leydig cell steroidogenesis via the cAMP/cGMP signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299(4):E544-E550.
- Araujo AB, Wittert GA** (2011): Endocrinology of the aging male. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 25(2): 303-319.
- Arkane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Strauss 3rd JF** (1997): Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem.* 272:32656-32662.
- Banki K, Hutter E, Gonchoroff NJ, Perl A** (1999): Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspase in Fas signaling. *J Immunol.* 162:1466-1479.

- Bartic A, Larsson NG** (2013): The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest.* 123(3):951-957.
- Basaria S** (2014): Male Hypogonadism. *Lancet.* 383: 1250-1263.
- Bay K, Andersson AM** (2011): Human testicular insulin-like factor 3: in relation to development, reproductive hormones and andrological disorders. *Int J Androl.* 34(2):97-109.
- Beattie MC, Chen H, Fan J, Papadopoulos V, Miller P, Zirkin BR** (2013): Aging and luteinizing hormone effects on reactive oxygen species production and DNA damage in rat Leydig cells. *Biol Reprod.* 88(4):101-107.
- Beattie MC, Adekola L, Papadopoulos V, Chen H, Zirkin BR** (2015): Leydig cells aging and hipogonadism. *Exp Gerontol.* 68:87-91.
- Beavo JA** (1995): Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 75(4):725-748.
- Beckman KB, Ames BN** (1998): Mitochondrial aging: open questions. *Ann NY Acad Sci.* 854:118-127.
- Behrends S, Harteneck C, Schultz G, Koesling D** (1995): A variant of $\alpha 2$ subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclase and functions as a dominant negative protein. *J Biol Chem.* 270:21109-21113.
- Beltran B, Quintero M, Garcia-Yaragoza E, O'Connor E, Esplugues JV, Moncada S** (2002): Inhibition of mitochondrial respiration by endogenous nitric oxide: a critical step in Fas signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(13):8892-8897.
- Benso A, Broglio F, Aimaretti G, Lucatello B, Lanfranco F, Ghigo E, Grotti S** (2007): Endocrine and metabolic responses to extreme altitude and physical exercise in climbers. *Europ J Endocrinol.* 157(6):733-740.
- Biswas M, Chan YJ** (2009): Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244(1):16-20.
- Bradford MM** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248–254.
- Bredt DS, Snyder SH** (1990): Isolation of nitric-oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 87:682-685.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991): Cloned and expressed nitric-oxide synthase structurally resembles cytochrome-P-450 reductase. *Nature*. 351:714-718.

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

Brown GC (2001): Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1504(2001):46-57.

Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL (1979): Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Rec Prog Horm Res*. 35:215-257.

Buechler WA, Nakane M i Murad F (1991): Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun*. 174:351-357.

Busnelli A, Somigliana E, Vercellini P (2017): Forever Young – Testosterone replacement therapy: a blockbuster drug despite flabby evidence and broken promises. *Hum Reprod*. 32(4):719-724.

Cao L, Leers-Sucheta S, Azhar S (2004): Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defence systems in testicular rat Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 88:61-67.

Cavallini G, Donati A, Taddei M, Bergamini E (2007): Evidence for selective mitochondrial autophagy and failure in aging. *Autophagy*. 3:26-27.

Cavanaugh JE, Ham J, Hetman M, Poser S, Yan C, Xia Z (2001): Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurophins, neuronal activity, and cAMP in neurons. *J Neurosci*. 21(2):434-443.

Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV (1989): Differential activation by atrial and brain natriuretic peptide of two different receptor guanylate cyclases. *Nature (London)*. 341:68-72.

Chang JC, Oude-Elferic PR (2014): Role of the bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase in PH sensing and metabolic regulation. *Front Physiol*. 10:5-425.

Chen H, Cangello, Benson S, Folmer J, Zhu H, Trush MA, Zirkin BR (2001): Age related increase in mitochondrial superoxide generation in the testosterone producing

cells of Brown Norway rat testes: relationship to reduced steroidogenic function? *Exp Gerontol.* 36:1361-1373.

Chen H, Hardy MP, Huhtaniemi I, Zirkin BR (1994): Age-related decreased Leydig cells testosterone production in the Brown Norway rat. *J Androl.* 15:551-557.

Chen H, Zirkin BR (1999): Long-term suppression of Leydig cell steroidogenesis prevents Leydig cell aging. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 96(26):14877-14881.

Chen Z, Gibson F, Robinson F (2001): MAP kinases. *Chem Rev.* 101(8):2449-2476.

Chen H, Hardy MP, Zirkin BR (2002): Age-related decreases in Leydig cells testosterone production are not restored by exposure to LH in vitro. *Endocrinology.* 143:1637-1642.

Chen H, Liu J, Luo L, Zirkin BR (2004): Dibutyryl cyclic adenosine monophosphate restores the ability of aged Leydig cells to produce testosterone at the high levels characteristic of young cells. *Endocrinology.* 145(10): 4441-4446.

Chen H, Ge RS, Zirkin BR (2009): Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol.* 306(1-2):9-16.

Chen Y, Wang J, Zhao K, Shang X, Wu H, Qing X, Fang F, Zhang Y, Shang J, Li H, Zhang H, Guan H, Zhou Y, Gu Y, Wu W, Xiong C (2016): The plasma miR-125a, miR-361 and miR-133a are promising novel biomarkers for late onset hypogonadism. *Sci Rep.* 6:23531.

Choi YS, Song JE, Kong BS, Hong JW, Novelli S, Lee EJ (2015): The role of Foxo3 in Leydig cells. *Yonsei Med J.* 56(6):1590-1596.

Chrisman TD, Schulz S, Potter LR, Garbers DL (1993): Seminal plasma factors that cause large elevations in cellular cyclic Gmp are C-type natriuretic peptides. *J Biol Chem.* 268:3698-3703.

Collins Y, Chouchani TE, James MA, Menger EK, Cocheme MH, Murphy PM (2012): Mitochondrial redox signaling at a glance. *J Cell Sci.* 125:801-806.

Colon E, Zaman F, Aleson M, Larsson O, Carlsson-Skwirut C, Svehinkov KV, Soder O (2007): Insulin-like growth factor-I is an important antiapoptotic factor for rat Leydig cells during postnatal development. *Endocrinology.* 148(1):128-139.

Cooke BA, Choi MC, Dirami G, Lopez-Ruiz MP, West AP (1992): Control of steroidogenesis in Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 43:445-449.

- Corbin JD, Francis SH** (1999): Cyclic Gmp phosphodiesterase-5: Target of sildenafil. *J Biol Chem.* 274:13729-13732.
- Cottrell DA i Turnbull DM** (2000): Mitochondria and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 3:473-478.
- Crane JD, Devries MC, Safdar A, Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA** (2010): The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J Gerontol A Bio Sci Med Sci.* 65:119-128.
- Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Droge W, French M, Terman A** (2005): Autophagy and aging the importance of maintaining „clean“ cells. *Autophagy.* 1:131-140.
- Culty M, Luo L, Yao ZH, Chen H, Papadopoulos V, Zirkin BR** (2002): Cholesterol transport, periferal benzodazepine receptor, and steroidogenesis in aging Leydig cells. *J Androl.* 23:439-447.
- Damber JE, Janson PO** (1978): Testicular blood flow and concentration in spermatic venus blood of anesthetized rats. *J Reprod Fertil.* 52(2):265-269.
- Dammer EB, Leon A, Sewer MB** (2007): Coregulator exchange and sphingosine-sensitive cooperativity of steroidogenic factor-1, general control nonderepressed 5, p54, and p160 coactivator regulate cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent cytochrome P450c17 transcription rate. *Mol Endocrinol.* 21(2):415-438.
- Dan I, Watanabe W, Kusumi A** (2001): The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol.* 11(5):220-230.
- Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP** (1996): Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology.* 137:5337-5343.
- Diemer T, Allen JA, Hales HK, Hales HD** (2003): Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (STAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology.* 144(7): 2882-2891.
- Dominguez JM 2nd, Davis RT 3rd, McCullough DJ, Stabley JN, Behnke BJ** (2011): Aging and exercise training reduce testes microvascular Po₂ and alter vasoconstrictor responsiveness in testicular arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol.* 301(3):R801-R810.
- Drewett JG, Adams-Hays RL, Ho By, Hegge DJ** (2002): Nitric oxide potently inhibits the rate-limiting enzymatic steps i steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 194:39-50.

- Droge W** (2002): Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol.* 37(12):1333-1345.
- Dufau ML** (1988): Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Annu Rev Physiol.* 50:483-508.
- Dufau ML** (1998): The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol.* 60:461-496.
- Dyson MT, Kowalewski MP, Mana PR, Stocco DM** (2009): The differential regulation of steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis by type I and type II PKA in MA-10 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 300:94-103.
- Farias JG, Bustos-Obreg E, Orellana R, Bucarey JL, Quiroz E, Reyes JG** (2005): Effect of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermid oxidative metabolism. *Andrologia.* 37(1):47-52.
- Farias JG, Bustos-Obreg E, Tapia PJ** (2008): Time course of endocrine changes in hypophysis-gonad axis induced by hypobaric hypoxia in male rats. *J Reprod Dev.* 54(1):18-21.
- Frenzel H, Feimann J** (1984): Age-dependent structural changes in the myocardium of rats. A quantitative light-and electron microscopic study on the right and left chamber wall. *Mech Ageing Dev.* 27:29-41.
- Fu Q, Yu C, Han S, Yang W, Jin Z, Hu Y, Liu YX** (2005): Activation of the p38 MAPK pathway by folliclestimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. *J Endocrinol.* 186(1):85-96.
- Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, Starodub O, Petrescu AD, Huang H, McIntosh AL, Martin GG, Chao H, Kier AB, Schroeder F** (2001): Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. *Prog Lipid Res.* 40:498-563.
- Garcin ED, Bruns CM, Lloyd SJ, Hosfield DJ, Tiso M, Gachhui R, Stuehr DJ, Tainer JA, Grtzoff ED** (2004): Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 279:37918-37927.
- Ghasemi A, Hedyati M, Biabani H** (2007): Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by Griess assay. *J Med Sci Res.* 2:29-32.

- Giuli G, Scholl, Bulle F, Guellaen G** (1992): Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain. *FEBS Lett.* 304:83-88.
- Gopalakrishna R, Jaken S** (2000): Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 28:1349-1361.
- Gosney JR** (1984): Effect of hypobaric hypoxia on the Leydig cell population of the testis of the rat. *J Endocrinol.* 103:59-62.
- Greco M, Villani G, Mazzucchelli F, Bresolin N, Papa S, Attardi G** (2003): Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. *FASEB J.* 10,1096/fj.02-1009fje.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR** (1982): Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126:131-138.
- Grewal T, Diego de M, Kirchhoff MF, Tebar F, Heeren J, Rinninger F, Enrich C** (2003): High density lipoprotein-induced signaling of the MAPK pathway involves scavenger receptor type BI-mediated activation of Ras. *J Biol Chem.* 278(19):16478-16489.
- Gwyne JT, Straus 3rd JF** (1982): The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev.* 3:299-329.
- Gyles SI, Burns CJ, Whitehouse BJ, Sugden D, Marsh PJ, Persaud SJ, Jones PM** (2001): ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. *J Biol Chem.* 276(37):34888-34895.
- Haider SG** (2004): Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol.* 233:181-241.
- Hakimi S, Lapointe J, Wen Y** (2011): Taking a good look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21(10):569-576.
- Hanukoglu I** (2006): Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 system in steroidogenic cells. *Drug Metab Rev.* 38(1-2):171-196.
- Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL** (1989): Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rats. *Endocrinology.* 124:762-770.

- Haretneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G, Bohme E** (1990): Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.* 272:221-223.
- Harton JD, Goldstein JL, Brown MS** (2002): SREBPs: activators of the complete program cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 109:1125-1131.
- Hatakeyama S, Sengoku R, Takayama S** (1966): Histological and submicroscopic studies on arteriolar hyalinosis of the human testis. *Bull Tokyo Med Dent Univ.* 13:511-530.
- Herbener GA** (1976): A morphometric study of age-dependent changes in mitochondrial populations of mouse liver and heart. *J Gerontol.* 31(1):8-12.
- Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC** (2000): Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem.* 275(17):13134-13141.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M** (1993): Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7(11):2135-3148.
- Hikim AP, Vera Y, Vernet D, Castanares M, Diaz-Romero M, Ferrini M, Swerdloff RS, Gonzales-Cadavid NF, Wang C** (2005): Involvement of nitric oxide-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in germ cell apoptosis in male Brown-Norway rats. *J Gerontol Series A Biol Sci Med Sci.* 60(6):702-708.
- Hiroi H, Christenson LK, Chang L, Sammel MD, Berger SL, Strauss III JF** (2004): Temporal and spatial changes in transcription factor binding and histone modifications at the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) locus associated with StAR transcription. *Mol Endocrinol.* 18(4):791-806.
- Holstein AF, Roosen-Runge EC, Schirren C** (1988): Spermiogenesis in aging testis. *Berlin; Grosse Verlag.* 195-238.
- Huang G, Shi Z, Chi H** (2009): Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine.* 48(3):161-169.
- Huhtaniemi I** (2014): Late-onset hypogonadism: current concepts and controversies of pathogenesis, diagnosis and treatment. *Asian J Androl.* 16: 192-202.

- Ichihara I, Kawamura H, Pelliniemi LJ** (1993): Ultrastructure and morphometry of testicular Leydig cells and the interstitial components correlated with testosterone in aging rats. *Cell Tissue Res.* 271(2):241-255.
- Ignarro LJ, Ballot B, Wood KS** (1984): Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. *J Biol Chem.* 259:6201-6207.
- Imai S** (2009): Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): A link between NAD biology, metabolism, and diseases. *Curr Pharm Des.* 15(1):20-28.
- Inan M, Uz YH, Kizilay G, Topcu-Tarladacalisir Y, Sapmaz-Metin M, Akpolat M, Aydogdu N** (2013): Protective effect of sildenafil on liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion. *J Pediatr Surg.* 48:1707-1715.
- Inoue Y, Rebois RV** (1989): Protein kinase C can desensitize the gonadotropin-responsive adenylate cyclase in Leydig tumor cells. But hCG-induced desensitization does not involve protein kinase C activation *J Biol Chem.* 264:8504-8508.
- Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman MB** (2007): AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:12017-12022.
- Janjic MM, Stojkov NJ, Andric SA, Kostic TS** (2012): Anabolic-androgenic steroids induce apoptosis and NOS2 (nitric-oxide synthase 2) in adult rat Leydig cells following in vivo exposure. *Reprod Toxicol.* 34:686-693.
- Jarchau T, Hausler C, Markert T, Pohler D, Vanderkerckhove J, De Jonge HR, Lohmann SM i Walter U** (1994): Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 9426-9430.
- Jeffs B, Meeks JJ, Ito M, Martinson FA, Matzuk MM, Jameson JL, Russell LD,** (2001): Blockage of the rete testis and efferent ductules by ectopic Sertoli and Leydig cells causes infertility in Dax1-deficient male mice. *Endocrinology.* 142:4486-4495.
- Jernigan NL, Walker BR, Resta TC** (2003): Pulmonary PKG-1 is upregulated following chronic hypoxia. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 285:L634-L642.
- Jo Y, King SR, Khan SA, Stocco DM** (2005): Involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent kinase in steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid biosynthesis in Leydig cells. *Biol Reprod.* 73:244-255.

Juilfs DM, Soderling S, Burns F, Beavo JA (1999): Cyclic Gmp as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 135:67-104.

Jung J, Park GT, Kim KH, Woo JH, An JM, Kim KC, Chung HY, Bae YS, Park JW, Kang SS, Lee YS (2004): Differential expression of transforming growth factor-beta in the interstitial tissue of testis during aging. *J Cell Biochem.* 92:92-98.

Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno T, Chang BY, Waldman SA, Murad F (1986): Soluble guanylate cyclase from rat lung exist as a heterodimer. *J Biol Chem.* 261:7236-7241.

Karin M, Chang L (2001): Mamalian MAP kinase signaling cascade. *Nature.* 410(6824): 37-40.

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

Kloner RA, Carson C, Dobs A, Kopecky S, Mohler ER (2016): Testosterone and cardiovascular disease. *J AM Coll Cardiol.* 67(5):545-557.

Klotz J (2014): Andropause – lessons from the European Male Aging Study. *Ann Endocrinol.* 75:128-131.

Koeva Y, Bakalska M, Atanassova N, Georieva K, Davidoff M (2009): Age-related changes in the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat Leydig cells. *Folia Histochemi Citobiol.* 47(2):281-287.

Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Artz E (2002): Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol. Endocrinol.* 16:1638-1651.

Kraemer FB, Shen WJ (2002): Hormone sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol ester hydrolysis. *J Lipid Res.* 43:1585-15945.

Kunlin J (2010): Modern biological theories of aging. *Aging Dis.* 1(2):72-74.

Laney DWJ, Bezerra JA, Kosiba JL, Degen SJ, Cohen MB (1994): Upregulation of Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver. *Am J Physiol.* 266:G899-G906.

- Lavoie HA, King SR** (2009): Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11a1 and HSD3B. *Exp Biol Med. (Maywood)*. 234(8):880-907.
- LeBleu VS, O'connell JT, Gonzales Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, de Cavalho FM, Damascena A, Domingos Chinen LT, Rocha RM, Asara JM, Kalluri R** (2014): PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 16(10):992-1003.
- Lee CM, Kim BY, Li L, Morgan ET** (2008): Nitric oxide-dependent proteosomal degradation of cytochrome P450 2B proteins. *J Biol Chem*. 283:889-898.
- Lee N, Cheng YC** (2008): Nitric oxide and cyclic nucleotides. *Oxid Med Cell Long*. 11:25-32.
- Lee SY, Gong EY, Hong CY, Kim KH, Han JS, Ryu JC, Chae HZ, Yun CH, Lee K** (2009): ROS inhibit the expression of testicular steroidogenic enzymes genes via the suppression of Nur77 transactivation. *Free Radic Biol Med*. 47(11): 1591-1600.
- Li FP, Dietz R, Harsdorf R** (1999): p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis by Bcl-2. *EMBO J*. 6027-6036.
- Li X, Hales KH, Watanabe G, Lee RJ, Pestell RG, Hales DB** (1997): The effect of tumor necrosis factor- α and cAMP on induction of AP-1 activity in MA-10 tumor Leydig cells. *Endocrine*. 6(3):317-324.
- Liao W, Cai J, Chen J, Liu F, Jiang G, Gao Y** (2010): Hypobaric hypoxia causes deleterious effects on spermatogenesis in rats. *Reproduction*. 139(6):1031-1038.
- Li Z, Goy MF** (1993): Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in rat colon: In situ localization of Gea, GCC, and guanylin mRNA. *Am J Physiol*. 265:G394-G402.
- Liao C, Reaven E, Azhar S** (1993): Age-related decline in steroidogenic capacity of isolated rat Leydig cells. a defect in cholesterol mobilization and processing. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 46:39-47.
- Lin C, McGough R, Aswad B, Block JA, Terek R** (2004): Hypoxia induces HIF-1 α and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *J Orthop Res*. 22(6):1175-1181.
- Lincoln TM, Komalavilas P, Boerth NJ, MacMillan-Crow LA, Cornwell TL** (1995): cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Adv Pharmacol*. 34:305-322.

- Liu H, Maurice DH** (1998): Expression of cyclic GMP-inhibited phosphodiesterases 3A and 3B (PDE3A and PDE3B) in rat tissue: Differential subcellular localization and regulated expression by cyclic AMP. *Br J Pharmacol.* 125:1501-1510.
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D** (2002): Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 80:780-787.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR** (1997): Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinase. *Trends Biochem Sci.* 22:307-312.
- Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, Goeddel DV** (1989): Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J.* 8:1377-1384.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA** (2000): Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* 52: 375-413.
- Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE** (2010): Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 13 (1):97-104.
- Lunenfeld B, Mskhalaya G, Zitzman M, Arver S, Kalinchenko S, Tishova Y, Morgentaler A** (2015): Recommendations on the diagnosis, treatment and monitoring of hypogonadism in men. *Aging Male.* 18(1): 5-15.
- Luo L, Chen H, Zirkin BR** (1996): Are Leydig cell steroidogenic enzymes differentially regulated with aging? *J Androl.* 17(5):509-515.
- Luo L, Chen H, Zirkin BR** (2005): Temporal relationship among testosterone production, steroidogenic acute regulatory protein (StAR), and P450 side-chain cleavage enzymes (P450scc) during Leydig cells aging. *J Androl.* 26(1):25-31.
- Luo L, Chen H, Trush MA, Show MD, Anway MD, Zirkin BR** (2006): Aging and the Brown Norway rat Leydig cells antioxidant defence system. *J Androl.* 27:240-247.
- Lysiak JJ, Kirby JL, Trembaly JJ, Woodson RI, Reardon MA, Palmer LA, Turner TT** (2009): Hypoxia-inducible factor-1 α is constitutively expressed in murine Leydig cells and regulates 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promoter activity. *Andrology.* 30(2):146-156.

- Majima HJ, Oberley TD, Furukowa K, Mattson MP, Yen HC, Szweda LI, Clair DK** (1998): Prevention of mitochondrial injury by manganese superoxide dismutase reveals a primary mechanism for alkaline-induced cell death. *J Biol Chem.* 273:8217-8224.
- Manna PR, Chandrala S, King SR** (2006): Molecular mechanisms of insulin-like growth factor-I mediated regulation of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig cells. *Mol Endocrinol.* 20(2):362-378.
- Manna PR, Stocco DM** (2007): Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling. *J Endocrinol.* 193(1):53-56.
- Manna PR, Stocco DM** (2011): The role of specific mitogen-activated protein kinase signaling cascade in the regulation of steroidogenesis. (Article *J Signal Transduct.* 821615, 13 pages).
- Manczak M, Jung Y, Park BS, Partovi D, Reddy PH** (2005): Time-course of mitochondrial gene expression in mice brain : implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *J Neurochem.* 92(3): 494-504.
- Martin LJ, Tremblay JJ** (2010): Nuclear receptors in Leydig cell gene expression and function. *Biol Reprod.* 83(1):3-14.
- Martin LJ** (2016): Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation. *Mol Reprod Dev.* 83:470-487.
- Martinelle N, Holst M, Soder O, Svechnikov K** (2004): Extracellular signal-regulated kinases are involved in the acute activation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells by human chronic gonadotropin. *Endocrinology.* 154(10): 4629-4634.
- Mason MS, Rainey WE** (1987): Steroidogenesis in the human fetal: a role for cholesterol synthesized *de novo*. *J Clin Endocrinol Metab.* 64:140-147.
- Mayers DA, Hyatt KH, Mlynarczyk M, Bird IM, Ducsay CA** (2005): Long-term hypoxia represses the expression of key genes regulating biosynthesis in the near-term ovine fetus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 289:R1707-1714.
- McAllister-Lucas LM, Haik TL, Colbran JL, Sonnenburg WK, Seger D, Turko IV, Beavo JA, Francis SH, Corbin JD** (1995): An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 270:30671-30679.

- McCully KK, Fielding RA, Evans JS, Leigh JR, Posner JD** (1993): Relationship between in vivo measurements of metabolism in young and old human calf muscles. *J Appl Physiol.* 75:813-819.
- Meeks JJ, Russell TA, Jeefs B, Huhtanimi I, Weiss J, Jameson JI** (2003): Leydig cell specific expression of DAX1 improves fertility of the Dax1-deficient mouse. *Biol Reprod.* 69(1): 1154-1160.
- Mendis-Handagama SM, Gelber SJ** (1995): Signs of aging are apparent in the testis interstitium of Sprague Dawley rats at 6 months of age. *Tissue Cell.* 27(6):689-699.
- Mesmin B, Maxfield FR** (2009): Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 1791:636-645.
- Midzak A, Rone M, Aghazadeh Y, Culty M, Papadopoulos V** (2011): Mitochondrial protein import and genesis of steroidogenic mitochondria. *Mol Cell Endocrinol.* 336:70-79.
- Midzak AS, Chen H, Paoadopoulos V, Zirkin BR** (2009): Leydig cell aging and the mechanisms of reduce testosterone synthesis. *Mol Cell Endocrinol.* 299(1): 23-31.
- Miller WL** (2007): Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta.* 1771:663-676.
- Miller WL, Auchus RJ** (2011): The molecular biology, biochemistry and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 32(1):81-151.
- Miller WL** (2013): Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol.* 379:62-73.
- Mondillo C, Patrignani Z, Reche C, Rivera E, Pignataro O** (2005): Dual role of histamine in modulation of Leydig cell steroidogenesis via HRH1 and HRH2 receptor subtypes. *Biol Reprod.* 73(5):899-907.
- Morelli A, Sarchielli E, Comeglio P, Filippi S, Mancina R, Gacci M, Vignozzi L, Carini M, Vannelli GB, Maggi M** (2011): Phosphodiesterase type 5 expression in human and rat lower urinary tract tissues and the effect of tadalafil on prostate gland oxygenation in spontaneously hypertensive rats. *J Sex Med.* 8(10):2746-2760.
- Moroshashi K, Holand S, Inomota Y, Handa H, Omura T** (1992): A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J Biol Chem.* 267(25):17913-17919.

- Morrison DB** (2012): MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a011254.
- Navarro A, Boveris A** (2007): The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(2):C670-686.
- Nebert DW, Wikvall K, Miller WL** (2013): Human cytochrome P450 in health and disease. *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci.* 368(1612):20120431.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyerisen R, Waxman D, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsulus IC, Nebert DW** (1996): P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 6:1-42.
- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB** (2009): The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal Biol Chem.* 284(20):13291-13295.
- Niemi M, Sharpe RM., Brown WRA** (1986): Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tissue Res.* 243:337-344.
- Ohyama Y, Miyamoto K, Saito Y, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H** (1992): Cloning and characterisation of two forms of C-type natriuretic peptide receptor in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 183:743-749.
- Orstavik S, Solberg R, Tasken K, Nordahl M, Altherr MR, Hansson V, Jahnsen T, Sandberg M** (1996): Molecular cloning, cDNA structure, and chromosomal localization of the human type II cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 220: 759-765.
- Ozawa T** (1997): Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev.* 77:425-464.
- Paduch DA, Branigan RE, Fuchs EF, Kim ED, Marmar JL, Sandlow JI** (2013): The laboratory diagnosis of testosterone deficiency. American Urology Association, Inc. <http://www.auanet.org/guidelines/testosterone-deficiency>.
- Panigua R, Nistal M, Amat P, Rodriguez MC, Martin A** (1987): Seminiferous tubule involution in elderly men. *Biol Reprod.* 36(4):939-947.
- Park KS, Shin HD, Park BL, Cheong HS, Cho MY, Lee HK, Lee JY, Lee JK, Kim T, Park CS, Hant BG, Kimm K, Oh B** (2006): Putative association of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 γ (*PPARGC1B*) polymorphism with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 23:635-642.

- Payne AH, Downing JR, Wong KL** (1980): Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells. *Endocrinology*. 106:1424–1429.
- Payne AH, Youngblood GL** (1995): Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod*. 52:217-225.
- Payne AH, Hales DB** (2004): Overview of steroidogenesis enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*. 25(6):947-970.
- Pearson G, Robinson F, Gibson TB** (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 22(2):153-181.
- Peltola V, Huhtaniemi I, Metsa-Ketela T, Ahotupa M** (1996): Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology* 137(1):105-112.
- Penning TM** (1997): Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev*. 18:281-305.
- Petersen PM, Seieroe K, Pakkenberg B** (2015): The total number of Leydig and Sertoli cells in the testes of men across various age group – stereological study. *J Anat*. 226:175-179.
- Petrosillo G, Benedictis V, Ruggiero MF, Paradies G** (2013): Decline in cytochrome c oxidase activity in rat-brain mitochondrial with aging. Role of peroxidized cardiolipin and beneficial effect of melatonin. *J Bioenerg Biomembr*. 45:431-440.
- Poderoso S, Converso DP, Maloberti P, Duarte A, Neuman I, Galli S, Cornejo Maciel F, Paz C, Carreras MC, Poderoso JJ, Podesta EJ** (2008): A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of key regulatory protein in steroid biosynthesis. *Plos One*. 3(1): e1443.
- Porter FD, Herman GE** (2011): Malformation syndromes caused of cholesterol synthesis. *J Lipid Res*. 52:6-34.
- Puche JE, Garcia-Fernandez M, Muntane J, Rioja J, Gonzales-Baron S, Cortazer IM** (2008): Low doses of Insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology*. 149(5):2620-2627.
- Punjabi U, Deslypere JP, Verdonck L, Vermeulen A** (1983): Androgen and precursor levels in serum and testes of adult rats under basal conditions and after hCG stimulation. *J Steroid Biochem*. 19(4):1481-1490.

- Quinn PG, Payne AH** (1984): Oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in cultured Leydig cells. Role in steroidogenic desensitization. *J Biol Chem.* 259(7):4130-4135.
- Rando TA, Chang HY** (2012): Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: Resetting the aging clock. *Cell.* 148(1-2):46-57.
- Rea SL, Ventura N, Johnson TE** (2007): Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Biol.* 5(10):259.
- Recchia FA, McConnell PI, Loke KE, Xu X, Ochoa M, Hintze TH** (1999): Nitric oxide controls cardiac substrate utilization in the conscious dog. *Cardiovasc Res.* 44(2):325-332.
- Regadera J, Nistal M, Paniagua R** (1985): Testis, epididymis, and spermic cord in elderly men. Correlation of angiographic and histologic studies with systemic arteriosclerosis. *Arch Pathol Lab Med.* 109:663-667.
- Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC** (1995): Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest.* 1528-1538.
- Rodriguez-Agudo D, Ren S, Wong E, Marques D, Redford K, Gil G, Hylemon PB, Pandak WM** (2008): Intracellular cholesterol transporter StarD4 binds free cholesterol and increases cholesteryl ester formation. *J Lipid Res.* 49:1409-1419.
- Romacho T, Sanchez-Ferrer CF, Peiro C** (2013): Visfatin/Nampt: an adipokine with cardiovascular impact. *Mediators Inflamm.* Article ID 946427, 15 pages.
- Rone MB, Fan J, Papadopoulos V** (2009a): Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta.* 1791:646-658.
- Rone MB, Liu J, Ye X, Veenstra TD, Young JC, Papadopoulos V** (2009b): Targeting and insertion of the cholesterol-binding translocator protein into the outer mitochondrial membrane. *Biochemistry.* 48:6909-6920.
- Roux PP, Blenis J** (2004): ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(2):320-344.
- Ruffoli R, Giambelluca FG, Soldani P, Grasso L, Gasperi M, Giannessi F** (2001): Ultrastructural localization of the NADPH-diaphorase activity in the Leydig cells of aging mice. *Anat Embryol (Berl).* 203:383-391.

- Saxena DK** (1995): Effect of hypobaric hypoxia by intermittent altitude exposure on semen characteristic and testicular morphology of rhesus monkeys. *Int J Biometereol.* 38:137-140.
- Schimmer BP, White PC** (2010): Minireview: Steroidogenic factor 1: Its roles in differentiation, development, and disease. *Mol Endocrinol.* 24(7):1322-1337.
- Schultz AM, Abdel-Mageed BA, Mondal D** (2010): The Nrf1 and Nrf2 balance in oxidative stress regulation and androgen signaling in prostate cancer cells. *Cancers.* 2:1354-1378.
- Schulz S, Wedel BJ, Matthews A, Garbers DL** (1998): The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor. *J Biol Chem.* 273:1032-1037.
- Selman C, Tullet JM, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AL, Claret M, Al-Qassab H, Carmignani D, Ramadani F, Woods A, Robinson IC, Schuster E, Batterham RL, Kozma SC, Thomas G, Carling D, Okkenhaug K, Thornton JM, Patridge L, Gems D, Withers DJ** (2009): Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science.* 326(5949):140.
- Sewer MB, Waterman MR** (2003): ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Micros Res Tech.* 61:300-307.
- Shimizu-Albergine M, Tsai LC, Patrucco E, Beavo JA** (2012): cAMP-specific phosphodiesterase 8A and 8B, essential regulators of Leydig cell steroidogenesis. *Mol Pharmacol.* 81:556-566.
- Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Raghavakaimal CSS, Nair KS** (2005): Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:5618-5623.
- Simon D** (2010): NO synthase: Structure and mechanisms. *Nitric Oxide.* 23:1-11.
- Smith SM, Lei Y, Liu J, Cahill ME, Hagen GM, Barise BG, Roess DA** (2006): Luteinising hormone receptors translocate to plasma membrane microdomains after binding of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* 147:1789-1795.
- Spitzer M, Bhasin S, Travison TG, Davda MN, Stroh H, Basaria S** (2013): Sildenafil increases serum testosterone levels by a direct action on the testes. *Andrology.* 1:913-918.
- Stocco DM, Hutson JC** (1978): Quantitation of mitochondrial DNA and protein in the liver of Fischer 344 rats during aging. *J Gerontol.* 33(6):802-809.

- Stocco DM, XingJia Wang, Joungah Jo, Manna PR** (2006): Multiple signaling regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: More complicated than we thought. *Mol Endocrinol.* 19(11):2647-2659.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF** (1991): Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric-oxide synthase – an FAD-containing and FAM-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:7773-7777.
- Sulisman HB, Carraway MS, Welty-Wolf KE, Whorton AR, Pintadosi CA** (2003): Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1. *J Biol Chem.* 278(42):41510-41518.
- Svechnikov K, Sultana T, Soder O** (2001): Age-dependent stimulation of Leydig cells steroidogenesis by interleukin-1 isoforms. *Mol Cell Endocrinol.* 182(2): 193-201.
- Svechnikov K, Stocco DM, Soder O** (2003): Interleukin-1 α stimulates steroidogenic acute regulatory protein expression via p38 MAP kinase in immature rat Leydig cells. *J Mol Endocrinol.* 30(1): 59-67.
- Svechnikov K, Spatafora C, Svechnikova I, Tringali C, Soder O** (2009): Effect of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells in vitro. *J Appl Toxicol.* 29:673-680.
- Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C, Gore RW** (1991): Microvascular pressure distribution in the hamster testis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 260:H1581-H1589.
- Syntin P, Chen H, Zirkin BR, Robbair B** (2001): Gene expression in Brown Norway rat Leydig cells: effect of age and of age-related germ cell loss. *Endocrinology.* 142:5277-5285.
- Tajer A, Forti G, O'Neil W, Lee DM, Silman AJ, Finn JD, Bartfai G, Boonen S, Casanueva FF, Giwercman A, Han TS, Kula K, Labrie F, Lean MEJ, Pendleton N, Punab M, Vanderschueren D, Huhtaniemi LT, Wu FCW and the EMAS Group** (2010): Characteristic of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: evidence from the European Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(4): 1810-1818.
- Takizawa T, Hatakeyama S** (1978): Age-associated changes in microvasculature of human adult testis. *Acta Pathol Jpn.* 28:541-554.

- Tamura N, Itoh H, Ogawa Y, Nakagawa O, Harada M, Chun TH, Suga S, Yoshimasa T, Nakao K** (1996): cDNA cloning and gene expression of human type I α cGMP-dependent protein kinase. *Hypertension*. 27:552-557.
- Taylor DJ, Kempt GJ, Thompson CH, Radda GK** (1997): Ageing: effect on oxidative function of skeletal muscle in vivo. *Mol Cell Biochem*. 174:321-324.
- Teerds KJ, Keijer J** (2015): Reduced fetal androgen exposure compromises Leydig cell function in adulthood. *Asian J Androl*. 17(2):219-220.
- Tremblay JJ** (2015): Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids*. 103:3-10.
- Uhler MD** (1993): Cloning and expression of a novel cyclic Gmp-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem*. 268:13586-13591.
- Ujii K, Drewett JG, Yuen PS, Star RA** (1993): Differential expression of mRNA for guanylate cyclase-linked endothelium-derived relaxing factor receptor subunits in rat kidney. *J Clin Invest*. 91:730-734.
- Valenti S, Cuttica CM, Fazzuoli L, Giordano G, Giusti M** (1999): Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified Leydig cells cultured *in vitro*. *Int J Androl*. 22:4527-4534.
- Vasta V, Shimizu-Albergine M, Beavo JA** (2006): Modulation of Leydig cell function by cyclic nucleotide phosphodiesterase 8A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:19925-19930.
- Vignozzi L, Filippi S, Morelli A, Ambrosini S, Luconi M, Vannelli, Donati S, Crescioli C, Zhang XH, Mirone V, Forti G, Maggi M** (2006): Effect of chronic tadalafil administration on penile hypoxia induced by cavernous neurotomy in the rat. *J Sex Med*. 3(3):419-431.
- Vignozzi L, Morelli A, Filippi S, Vannelli GB, Mungai S, Marini M, Boddi V, Forti G, Maggi M** (2008): Effect of sildenafil administration on penile hypoxia induced by cavernous neurotomy in the rat. *Int J Impot Res*. 20(1):60-67.
- Volkan A, Volkan Y, Serchat C, Ebru T, Sahin I, Gonul S, Saut C, Hasan S** (2015): The effect of sildenafil and n-acetylcysteine on ischemia and reperfusion injury in gastrocnemius muscle and femoral artery endothelium. *Vascular*. 23(1):21-30.
- Vollmar AM, Schmidt KN, Schulz R** (1996): Natriuretic peptide receptors on rat tymocytes: Inhibition of proliferation by atrial natriuretic peptide. *Endocrinology*. 137:1706-1713.

- Wang C, Leung A, Sinha Hikim AP** (1993): Reproductive aging in the male Brown-Norway rat: a model for human. *Endocrinology*. 133:2773-2781.
- Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren WJ, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B, Morales A, Morley JE, Schulman C, Thompson IM, Weidner W, Wu FCW** (2008): Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. *Eur J Endocrinol*. 159:507-514.
- Wang FF, Wang Q, Chen Y, Lin Q, Gao HB, Zhang P** (2012): Chronic stress induces ageing-associated degeneration in rat Leydig cells. *Asian J Androl*. 14:643-648.
- Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BSS, Kim JJP** (1997): Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci*. 94:8411-8416.
- Wang X, Shen CL, Dyson MT, Eimerl S, Orly J, Hutson JC, Stocco DM** (2005): Cyclooxygenase-2 regulation of the age-related decline in testosterone biosynthesis. *Endocrinology*. 146(10):4202-4208.
- Weissman BA, Niu E, Ge R, Sottas CM, Holmes M, Hutson JC, Hardy MP** (2005): Paracrine modulation of androgen synthesis in rat Leydig cells by nitric oxide. *J Androl*. 26(3):369-378.
- Whitaker RM, Wills LP, Stallons J, Schnellman RG** (2013): cGMP-selective phosphodiesterase inhibitors stimulate mitochondrial biogenesis and promote recovery from acute kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 347:626-634.
- Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG** (1991): Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissue. *Mol Cell Biol*. 11:3454-3462.
- Wingate AD, Arthur JS** (2006): Post-translational control of Nur77. *Biochem Soc Trans*. 34(6):1107-1109.
- Wohlgemuth SE, Seo AY, Marzetti E, Lees HA, Leeuwenburgh C** (2010): Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effect of calorie restriction and life-long exercise. *Exp Gerontol*. 45:138-148.
- Wong W, Scott JD** (2004): AKAP signaling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(12):959-970.
- Xu BE, Stippec S, Lenertz L** (2004): WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 279(9):7826-7831.

- Yang RB, Foster DC, Garbers DL, Fulle HJ** (1995): Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl Sci USA*. 92:602-606.
- Yen TC, Chen YS, King KL, Yen SH, Wei YH** (1989): Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. *Biochem Biophys Res Commun*. 165(3):944-1003.
- Yoboue ED, Augier E, Galinier A, Blancard C, Pinson B, Casteilla L, Rigoulet M, Devin A** (2012): cAMP-induced mitochondrial compartment biogenesis: role of glutathione redox state. *J Biol Chem*. 287(18):14569-14578.
- Yoboue ED, Devin A** (2012): Reactive oxygen species-mediated control of mitochondrial biogenesis. *Int J Cell Biol. Article*. ID 403870, 8 pages.
- Young ME, Leighton B** (1998) Evidence for altered sensitivity of the NO/cGMP signaling cascade in insulin-resistant skeletal muscle. *Biochem J*. 329:73-79.
- Young ME, Radda GK, Leighton B** (1997): NO stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vivo. *Biochem J*. 322:223-228.
- Young ME, Leighton B** (1998): Fuel oxidation in skeletal muscle is increased by NO/cGMP-evidence for involvement of cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*. 424:79-83.
- Yu FQ, Han CS, Yang W, Jin X, Hu ZY, Liu YX** (2005): Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. *J Endocrinol*. 186(1):85-96.
- Yu L, Yang SJ** (2010): AMP-activated protein kinase mediates activity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha and nuclear respiratory factor 1 expression in rat visual cortical neurons. *Neuroscience*. 169(1):23-38.
- Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson JL** (1998): Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet*. 20(4):353-357.
- Yuen PS, Potter LR, Garbers DL** (1990): A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry*. 29:10872-10878.
- Zahran MH, Hussein AM, Barakati N, Awadalla A, Khater S, Harrazi A, Shokeir AA** (2015): Sildenafil and inhibits proinflammatory cytokine genes in rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *Int Urol Nephrol*. 47:1907-1915.
- Zaidi SK, Shen WY, Azhar S** (2012): Impact of aging on steroid hormone biosynthesis and secretion. *Open Long Sci*. 6: 1-30.

Zaragosa C, Soria E, Lopez E, Browning D, Balbin M, Otin CLO, Lamas S (2002): Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 62(4):927-935.

Zhang W, Liu HT (2002): MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 12(1):9-18.

Zhao H, Li Z, Cooney AJ, Lan ZJ (2007): Orphan nuclear receptor function in the ovary. *Front Biosci.* 12:3398-3405.

Zheng D, Zhao Y, Shen Y, Chang X, Ju S, Guo L (2014): Orexin A-mediated stimulation of 3 β HSD expression and testosterone production through MAPK signaling pathways in primary rat Leydig cells. *J Endocrinol Invest.* 37(3):285-292.

Ziello EJ, Jovin SI, Huanga Y (2007): Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med.* 80(2):51-60.

Zirkin BR, Santulli R, Strandberg JD, Wright WW, Ewing LL (1993): Testicular steroidogenesis in the aging Brown Norway rat. *J Androl.* 14:119-124.

Zirkin BR, Chen H (2000): Regulation of Leydig cells steroidogenic function during aging. *Biol Reprod.* 63:977-981.

8. Biografija



Sokanović Srdjan rođen je 24.07.1986. godine u Novom Sadu, osnovnu školu završio je u Beočinu i Gimnaziju u Novom Sadu. 2005. godine upisao je osnovne studije Biologije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog. 2010. godine završio je osnovne studije sa prosečnom ocenom 9.54/10.00 i iste godine upisao doktorske akademske studije biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Animalna i humana fiziologija. Od 2011. do 2012. godine bio je stipendista Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije u grupi za Reproductivnu endokrinologiju i signaling, od 2012. do 2014. godine angažovan je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije u grupi za Reproductivnu endokrinologiju i signaling. 2014. godine izabran je u zvanje Asistenta za užu nauču oblast Fiziologija životinja na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, a 2017. godine reizabran u isto zvanje. U zvanju Asistenta zadužen je za izvođenje praktične nastave iz predmeta: Fiziologija životinja, Uporedna fiziologija životinja, Osnovi molekularne i ćelijske imunologije, Reproductivna fiziologija i Reproductivna endokrinologija. Učestvovao je na po jednom republičkom, pokrajinskom i projektu bilateralne saradnje, kao prvi autor i pod mentorstvom prof. Tatjane Kostić objavio je dva rada kategorije M21, pet radova kategorije M34 i jedan rad kategorije M64. U koautorstvu je objavio osam radova kategorije M21, osam radova kategorije M34 i pet radova M64.

9. Prilozi

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Срђан Ј. Сокановић _____

број уписа _____ Б3055/2010 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Механизми укључени у регулацију смањене ендокрине функције Лајдигових ћелија током старења”.

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

Потпис докторанта

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**Име и презиме аутора Срђан Ј. СокановићБрој уписа Б3055/2010Студијски програм БиологијаНаслов рада Механизми укључени у регулацију смањене ендокрине
функције Лајдигових ћелија током старењаМентор проф. др Татјана Костић и проф. др Небојша Јаснић

Потписани _____

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

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

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

Потпис докторанта

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Механизми укључени у регулацију смањене ендокрине функције
Лајдигових ћелија током старења

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанта

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.