Oksidativni i antioksidativni status mišića nuhalne regije štakora izloženih kroničnom i akutnom stresu

Vitić, Zorica

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:895148

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Zorica Vitić

OKSIDATIVNI I ANTIOKSIDATIVNI STATUS MIŠIĆA NUHALNE REGIJE ŠTAKORA IZLOŽENIH KRONIČNOM I AKUTNOM STRESU

Diplomski rad

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Diplomski rad
Odjel za biologiju
Diplomski znanstveni studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

OKSIDATIVNI I ANTIOKSIDATIVNI STATUS MIŠIĆA NUHALNE REGIJE ŠTAKORA IZLOŽENIH KRONIČNOM I AKUTNOM STRESU

Zorica Vitić

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Osijek
Mentor: dr. sc. Elizabeta Has-Schön, redoviti profesor
Neposredni voditelj: dr. sc. Rosemary Vuković

Akutni i kronični stres mogu uzrokovati stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva koji pokazuju širok spektar aktivnosti, od utjecaja na fiziološke regulatorne funkcije do sudjelovanja u patogenezi mnogih bolesti. S ciljem istraživanja utjecaja akutnog i kroničnog stresa na oksidativni i antioksidativni odgovor mišića nuhalne regije (*Semispinalis capitis, Splenius capitis, Splenius cervicis*) mužjaka (M), neovarijektomiranih ženki (NE-OV) i ovarijektomiranih ženki (OV), štakori soja Sprague-Dawley podvrgnuti su akutnom i kroničnom protokolu stresa. Kronični stres je uzrokovao pojavu oksidativnog stresa, čiji je pokazatelj povećana razina lipidne peroksidacije (LPO) i smanjen antioksidativni obrambeni mehanizam u mišićima nuhalne regije mužjaka i ženki. Kao pokazatelji antioksidativnog statusa mjereni su omjer reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG), te aktivnost antioksidativnih enzima (katalaza - CAT, glutation-peroksidaza - GPX, glutation-S-transferaza - GST, superoksid-dismutaza - SOD i glutation-reduktaza - GR). Akutni stres nije značajno utjecao na promjene aktivnosti većine antioksidativnih enzima (CAT, GPX, GST, SOD, GR) u mužjaka i ženki, ali je utjecao na smanjenje omjera GSH/GSSG. Ovarijektomija je uzrokovala povećanje LPO, te smanjenje aktivnosti nekih enzima (CAT, GPX). Oksidativni i antioksidativni odgovor na akutni i kronični stres u mišićima nuhalne regije kod mužjaka i ženki je u većini mjerenih pokazatelja sličan, te se razlikuje u odnosu na ovarijektomirane ženke. Kronični stres, za razliku od akutnog, značajno više narušava antioksidativnu zaštitu, te bi kao takav mogao uzrokovati promjenu kontrakcije i mišićni umor, posljedica čega je razvoj kronične boli vrata i glavobolje.

Broj stranica: 63
Broj slika: 10
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 175
Jezik izvornika: Hrvatski
Ključne riječi: akutni stres, antioksidativni enzimi, kronični stres, lipidna peroksidacija, mišići nuhalne regije, oksidativni stres, omjer GSH/GSSH, ovarijektomija

Datum obrane: 31.5.2016.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. *Sandra Stepić*, docent
2. dr. sc. *Elizabeta Has-Schön*, redoviti profesor
3. dr. sc. *Ivna Štolfa*, docent

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Master Thesis
Department of Biology
Graduate Study of Biology

Scientific area: Natural science
Scientific Field: Biology

OXIDATIVE AND ANTIOXIDATIVE STATUS OF NUCHAL MUSCLES IN RATS EXPOSED TO CHRONIC AND ACUTE STRESS

Zorica Vitić

Thesis performed at: Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Osijek
Supervisor: Ph. D. Elizabeta Has-Schön, Full Professor
Assistant in charge: Ph. D. Rosemary Vuković

Acute and chronic stress can induce the production of reactive oxygen species, which exert a multitude of biological effects covering a wide spectrum, that ranges from physiological regulatory functions to damaging alterations participating in the pathogenesis of increasing number of diseases. With the aim of elucidating the impact of acute and chronic stress on oxidative and antioxidative response in nuchal muscles (*Semispinalis capitis*, *Splenius capitis*, *Splenius cervicis*) of male (M), female (NE-OV) and ovariectomized female (OV), Sprague-Dawley rats were exposed to acute and chronic stress protocol. Chronic stress caused oxidative stress, that was determined by the increased lipid peroxidation level (LPO) and decreased antioxidative defense mechanism in nuchal muscles of males and females. As an indicators of antioxidative response, the ratio of reduced and oxidised glutathione (GSH/GSSG), the activity of antioxidative enzymes (catalase - CAT, glutathione-peroxidase - GPX, glutathione-S-transferase - GST, superoxid-dismutase - SOD and glutathione-reductase - GR) were measured. Acute stress did not have significant impact on the most of antioxidative enzyme activities (CAT, GPX, GST, SOD, GR) in males and females, although GSH/GSSG ratio was reduced. Ovariectomy increased LPO and reduced some of antioxidative enzyme activities (CAT, GPX). Oxidative and antioxidative response to acute and chronic stress, in nuchal muscles of males and females, showed similarity in most of the measured parameters, and it differed from the response in ovariectomized females. Unlike acute stress, chronic stress disrupts antioxidative defense signficantly more, thus it can cause changes in muscle contraction and muscle fatigue, which may lead to chronic pain in neck and headache.

Number of pages: 63
Number of figures: 10
Number of tables: 1
Number of references: 175
Original in: Croatian
Key words: acute stress, chronic stress, oxidative stress, rats, ovariectomy, lipid peroxidation, antioxidative enzymes, glutathione ratio, nuchal muscles

Date of thesis defense: 31.5.2016.

Reviewers:

1. Ph. D. *Sandra Stepić*, Assistant Professor
2. Ph. D. *Elizabeta Has-Schön*, Full Professor
3. Ph. D. *Ivna Štolfa*, Assistant Professor

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Elizabeti Has-Schön na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada. Posebno se zahvaljujem dr. sc. Rosemary Vuković, na ugodnoj suradnji i nesebičnoj pomoći tijekom pisanja diplomskog rada.

Veliko hvala mojim prijateljicama Ani i Branki na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Najveće hvala mojoj sestri, mami, tati i dečku na razumijevanju i podršci tijekom cijelog studija.

Od srca veliko hvala dragim prijateljima.

SADRŽAJ:

1. UVOD ... 1
1.1. Akutni i kronični stres ... 1
1.2. Skeletni mišići ... 3
1.2.1. Građa mišića ... 4
1.2.2. Mišićna kontrakcija ... 5
1.2.3. Mišići nuhalne regije (semispinalni i zavojni mišići) ... 6
1.3. Oksidativni stres ... 8
1.3.1. Pokazatelji oksidativnog statusa ... 9
1.3.2. Pokazatelji antioksidativnog statusa ... 10
1.3.3. Oksidativni stres u skeletnim mišićima ... 15
1.3.4. Razlike između spolova ... 16
1.4. Ciljevi ... 18
2. MATERIJALI I METODE ... 19
2.1. Pokusne životinje ... 19
2.2. Ovarijektomija ... 20
2.3. Protokol akutnog stresa ... 20
2.4. Kontrolna skupina ... 21
2.5. Protokol kroničnog stresa ... 21
2.6. Priprema tkivnih ekstrakata ... 22
2.7. Određivanje razine lipidne peroksidacije ... 23
2.8. Određivanje količine ukupnog glutationa, reduciranog i oksidiranog glutationa ... 23
2.9. Određivanje aktivnosti katalaze ... 24
2.10. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze ... 24
2.11. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze ... 24
2.12. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze ... 25
2.13. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze ... 25
2.14. Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina ... 26
2.15. Statistička obrada podataka ... 26
3. REZULTATI ... 27
3.1. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na razinu lipidne peroksidacije ... 27
3.2. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na omjer reduciranog i oksidiranog glutationa ... 29
3.3. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost katalaze ... 31
3.4. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutation-peroksidaze ... 33

3.5. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutation-S-transferaze 35
3.6. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutation-reduktaze 37
3.7. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost superoksid-dismutaze 39
4. RASPRAVA 41
5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI 47
6. LITERATURA 48

1. UVOD

1.1. Akutni i kronični stres

Stanice mogu funkcionirati samo u uskim rasponima temperature, pH, ionske koncentracije, dostupnosti nutrijenata, dok organizmi moraju preživjeti u okolišu gdje ovi i drugi uvjeti variraju iz sata u sat, te kroz duže vremenske periode. Shodno tome, organizmi zahtijevaju mehanizme za održavanje unutrašnje stabilnosti usprkos okolišnim promjenama. Većina tjelesnih funkcija ima cilj održati homeostazu, a nesposobnost održavanja iste vodi do bolesti te često smrti (Blessing, 1997). Održavanje homeostaze često je izazvano različitim stresorima (Chrousos i Gold 1992). Homeostaza je regulirana kompleksnim endokrinim procesima koji uključuju os hipotalamus-hipofiza i simpatički autonomni sustav (Tsigos i Chrousos, 2002; Papadimitriou i Priftis, 2009). Stres se može pojaviti u akutnom ili u kroničnom obliku s različitim posljedicama (Schneiderman i sur., 2005).

Akutni stres je najčešći oblik stresa, a on nastaje kao posljedica svakodnevnih zahtjeva i pritiska okoline. Zbog svoje kratkotrajnosti, akutni stres ne uzrokuje veća oštećenja koja se često povezuju s dugotrajnim stresom. Najčešći simptomi akutnog stresa su: emocionalne poteškoće (bijes, tjeskoba, depresija), mišićni problemi koji podrazumijevaju glavobolje, bolove u vratu i leđima, bolove u čeljusti, općenito mišićna napetost zatim probavne smetnje, te prolazna uzbuđenja koja vode do povećanog krvog tlaka, pulsa, vrtoglavice, bolova u prsima i slično (Miller i sur., 1994). Akutni stres uglavnom izaziva „fight or flight“ odgovor (Ranabir i Reetu, 2011), a stres se definira kao fiziološki odgovor na promjene različitih stresora, kojem je glavni element aktivacija hipotalamus-hipofiza osi. Izlučivanje kortikotropin otpuštajućeg hormona iz hipotalamusa stimulira prednji režanj hipofize putem receptora CRH-R1 i CRH-R2 te dovodi do proizvodnje kortikotropina (ACTH), koji stimulira adrenalnu žlijezdu na lučenje kortikosteroida (Tsigos i Chrousos, 2002). Drugi važan odgovor je simpato-adrenalna aktivacija, koja rezultira otpuštanjem kateholamina (Goldstein, 2003). Glukokortikoidi omogućavaju poveznicu između hipotalamus-hipofiza osi i simpatičkih aktivacija, ponašajući se kao transkripcijski faktori u sintezi epinefrina (Kelner i Pollard, 1985). Odgovor na akutni stres u mladih, zdravih jedinki može biti adaptivan te obično ne predstavlja poteškoće za zdravlje. Kao adaptivni odgovor na akutni stres značajne su

promjene u razinama hormona uključujući kortikotropin otpuštajući hormon, kortizol, kateholamine i tiroidne hormone (Ranabir i Reetu, 2011). Posebno je značajan odgovor glukokortikoida na akutni stres koji je važan za cijelo tijelo i homeostazu te opstanak jedinke. Govoreći o promjenama hormona neposredno poslije stresa, glukokortikoidi imaju složen utjecaj na metabolizam glukoze uzrokujući hiperglikemiju i smanjenje unosa glukoze od strane tkiva, uključujući mišiće. Glukokortikoidi osim što pomažu tijelu u odgovoru na stres pomažu mu da odgovori na promjene okoliša, što označava njihovu važnost za život (Iyomasa i sur., 2015). Postoje brojna istraživanja koja proučavaju učinke akutnog i kroničnog stresa na mozak i učenje. Kirby i sur. (2013) ustanovili su da akutni stres dovodi do kratkoročnog povećanja kortikosterona i ima pozitivan učinak na učenje, tako što uzrokuje otpuštanje faktora rasta fibroblasta, koji za posljedicu ima proliferaciju živčanih stanica. Ukoliko se stres ponavlja pogotovo u starijih ili nezdravih jedinki, dugotrajni učinci u odgovoru na stres mogu dovesti do narušavanja zdravlja (Schneiderman i sur., 2005).

Osim „fight or flight“ odgovora na akutni stres, postoje događaji koji uzrokuju kronični stres, koji tijekom vremena može dovesti do takozvanog „alostatskog opterećenja“ koje može ubrzati razvoj različitih bolesti (McEwen, 2000). Alostatsko opterećenje je cjelokupno stanje organizma koje podrazumijeva medijatore poput norepinefrina i epinefrina koji prolongiraju lipidnu peroksidaciju i oksidativni stres, koji uzrokuje staničnu ili organsku disfunkciju. Alostatsko opterećenje je u skladu s teorijom slobodnih radikala, koja pretpostavlja da su starenje i kronična bolesna stanja posredovana oksidativnim stresom i lipidnom peroksidacijom (Foreman i sur., 2010). Kronični stres predstavlja odgovor na emocionalni pritisak pretrpljen tijekom dužeg vremenskog perioda nad kojim pojedinac nema kontrolu. On uključuje odgovor endokrinog sustava koji rezultira otpuštanjem kortikosteroida. Dok su neposredni učinci stresnih hormona korisni u određenim situacijama, dugoročna izloženost stresu stvara visoke koncentracije tih hormona koje ostaju konstantne. Takvo stanje može dovesti do povišenog krvnog pritiska, te postepeno i do srčanih bolesti, oštećenja mišićnog tkiva, inhibicije rasta i suzbijanja imunološkog sustava (Carlson, 2013). Alostatsko opterećenje uslijed kroničnog stresa u životinjskim modelima, uzrokuje atrofiju neurona u hipokampusu i prefrontalnom korteksu, regijama mozga uključenima u memoriranje, selektivnu pažnju te izvršne funkcije. Ovo stanje također uzrokuje i hipertrofiju neurona u amigdali, području uključenom u razvoj straha i agresije. Važno je naglastiti da sposobnost učenja, pamćenja i donošenja odluka može biti ugrožena kroničnim stresom (McEwen, 2007).

Kronični stres može uzrokovati razvoj kardiovaskularnih poremećaja, pretilosti i dijabetesa što se odražava na koncentraciju kolesterola i glukoze i smanjenu toleranciju glukoze (Middelbeek i Horton, 2007; Steptoe i Kivimäki, 2013). Novija istraživanja pokazuju da patološka tjeskoba i kronični stres mogu uzrokovati neuropsihijatrijske poremećaje, uključujući depresiju i demenciju (Mah i sur., 2016). Nekoliko istraživanja pokazuje da kronični stres djeluje kao imunosupresor, odnosno suzbija sposobnost tijela da inicira brze i učinkovite imunološke reakcije. To se prije svega pripisuje velikoj koncentraciji kortikosteroida proizvedenoj tijekom kroničnog stresa (Salleh, 2008).

Stres, bilo akutni ili kronični, često je proučavan na životinjama kroz različite stresore, primjerice: blagi elektrošokovi (engl. *footshock*), prisilno plivanje, stješnjavanje, hladnoća, socijalni sukob i glasni zvukovi (Fink, 2000). Proučavanjem transkriptoma srži nadbubrežne žlijezde ustanovljene su razlike nakon akutnog i kroničnog stresa, s najvećim promjenama u transkriptima povezanima s faktorima rasta, apoptozom, neurosekrecijom, strukturnim proteinima, citokinima i kemokinima (Beck-Peccoz i Persani, 2006). Važno je naglasiti da su utvrđene i spolne razlike u simpato-adrenalnoj aktivaciji kod štakora prije i poslije stresa izazvanog blagim elektrošokom (engl. *footshock*) (Harlan Laboratories, 2009). Žene su općenito manje podložne kroničnom stresu, sve do perioda menopauze kada počinju gubiti spolne hormone (Kudielka i sur., 1999), dok su muškarci podložniji i osjetljiviji na kronični stres, pokazujući promjene hranidbenih navika, te smanjenje tjelesne težine (Bruder-Nascimento i sur., 2013).

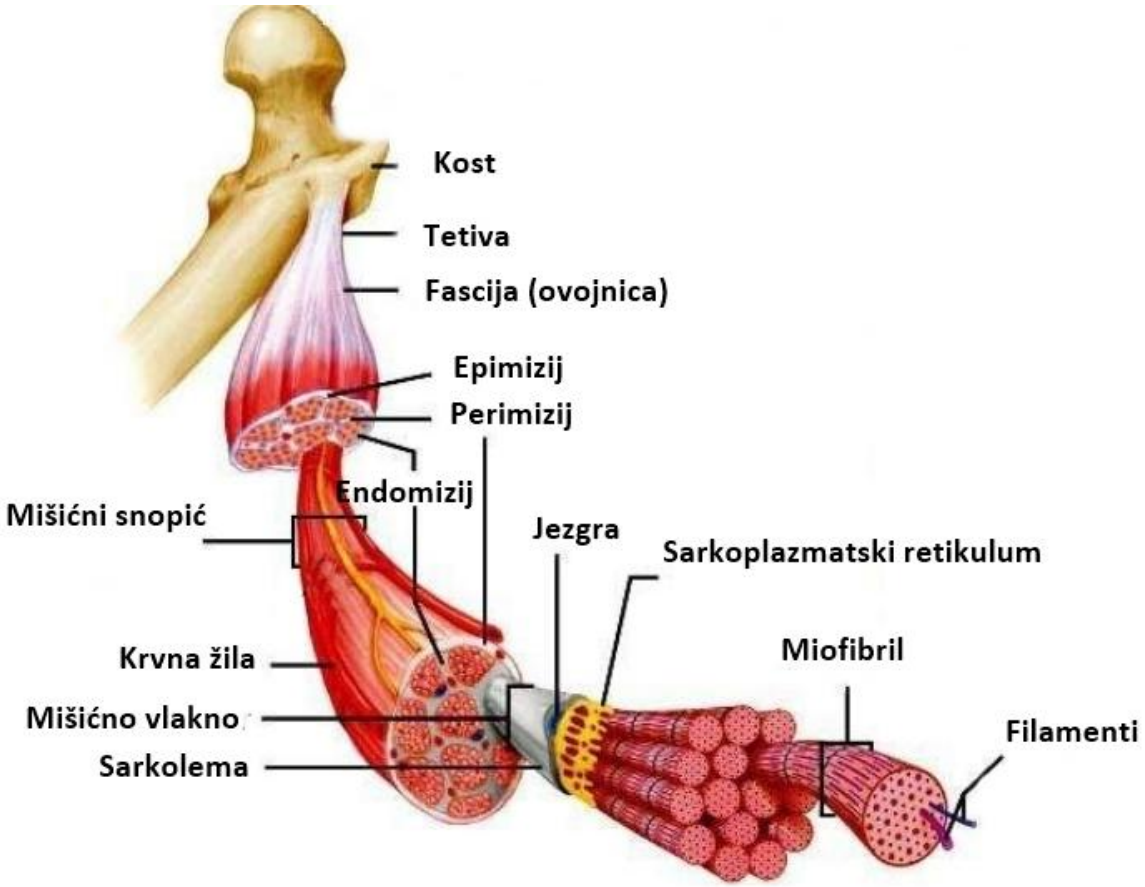
1.2. Skeletni mišići

Skeletni ili poprečno-prugasti mišić (lat. *textus muscularis striatus*) jedna je od najdinamičnijih struktura u ljudskom tijelu. U ljudi, skeletni mišići čine približno 40% ukupne tjelesne težine, te sadrže 50-75% ukupne količine svih proteina u tijelu. Sam mišić uglavnom čini voda, potom proteini i druge supstance uključujući anorganske soli, minerale, masti, ugljikohidrate. Općenito, mišićna masa ovisi o ravnoteži između sinteze proteina i degradacije, a oba procesa ovise o nutritivnom statusu, hormonalnom balansu, fizičkoj aktivnosti te ozljedama i bolestima (Frontera i Ochala 2014). Skeletni mišići doprinose višestrukim tjelesnim funkcijama. Sa mehaničkog stajališta glavna funkcija skeletnih mišića je pretvorba kemijske energije u mehaničku kako bi se stvorila sila i snaga za pokretanje, držanje, održavanje zdravlja i očuvanje funkcionalne neovisnosti. Sa metaboličkog stajališta,

skeletni mišići doprinose energiji bazalnog metabolizma, služeći kao rezervoar za pohranu supstrata poput aminokiselina, ugljikohidrata, proizvodnju topline za održavanje temperature, ali i potrošnju većine metaboličkog kisika i goriva tijekom fizičke aktivnosti (Wolfe, 2006). Posebno je zanimljiva uloga skeletnog mišića, kao spremnika aminokiselina koje koriste druga tkiva i organi, poput mozga, kože i srca za sintezu organo-specifičnih proteina (Felig i sur., 1969; Biolo i sur., 1995). Vrlo je značajno otpuštanje aminokiselina iz mišića koje doprinose održavanju razine glukoze u krvi tijekom stanja gladovanja (Drenick i sur., 1964). U stanju gladovanja aminokiseline u krvi, osim što služe kao prekursori u sintezi proteina, služe i kao prekursori za glukoneogenezu u jetri (Felig, 1973).

1.2.1. Građa mišića

Građa skeletnih mišića zasniva se na organizaciji mišićnih vlakana povezanih vezivnim tkivom (Frontera i Ochala, 2014). Veličina mišića određena je uglavnom brojem i veličinom pojedinačnih mišićnih vlakana, iako infiltracija masti i vezivnog tkiva također utječu na veličinu samog mišića (Javan i sur., 2013; Fortin i sur., 2014). Složena građa mišića omogućava učinkovit prijenos energije koju stvaraju miofibrili na čitav mišić odnosno strukturu koja se pokreće. Mišići su odijeljeni jedni od drugih te od ostalog tkiva vezivno-tkivnim ovojnicama ili fascijama. Izvana cijeli mišić obavija debela vezivno-tkivna ovojnica zvana epimizij. Mišići su građeni od mišićnih snopova, koji su sačinjeni od mišićnih vlakana. Svaki snop obavijen je ovojnicom koja se naziva perimizij, kroz koji prolaze krvne žile i živci (Cooper, 2000). Tanki omotač vezivnog tkiva koji obavija svako pojedinačno mišićno vlakno (promjera 100 μm) zasebno naziva se endomizij, te leži iznad sarkoleme, stanične membrane mišićnog vlakna (Frontera i Ochala, 2014). U sklopu sarkoleme nalazi se kompleks različitih proteina koji je fizički spojen sa unutrašnjim miofilamentima (Slika 1). Odsutnost ili disfunkcija jednog od proteina toga kompleksa može rezultirati ozbiljnim oštećenjima sarkoleme, mišićnom slabosti ili atrofijom (Thomas, 2013).



Slika 1. Građa mišića (preuzeto i modificirano prema Shier i sur., 2009).

1.2.2. Mišićna kontrakcija

Većina citoplazme mišića (sarkoplazme) mišića sastoji se od miofibrila koji predstavljaju cilindrične snopove sačinjene od 2 filamenta: debelog filamenta miozina (promjera 15 nm) i tankog filamenta aktina (promjera 7 nm) (Cooper, 2000). Miofibrile okružuje splet finih endomembranskih cisterni odnosno sarkoplazmatski retikulum u kojem su pohranjeni ioni kalcija neophodni za mišićnu kontrakciju. Svaki miofibril organiziran je kao lanac kontraktilnih jedinica zvanih sarkomere. Unutar svake sarkomere izmjenjuju se tamne pruge (anizotropne pruge, A) sa svijetlim prugama (izotropnim prugama, I). Ove pruge upućuju na prisutnost ili odsutnost miozinskih filamenata. I-pruge sadrže tanke aktinske filamente, dok A-pruge sadrže debele, miozinske filamente. Miozinski i aktinski filamenti preklapaju se u perifernim područjima A-pruga, gdje središnja regija (zvana H zona) sadrži samo miozin. Aktinski filamenti su spojeni na Z ploče, a miozinski filamenti su usidreni na M linije u

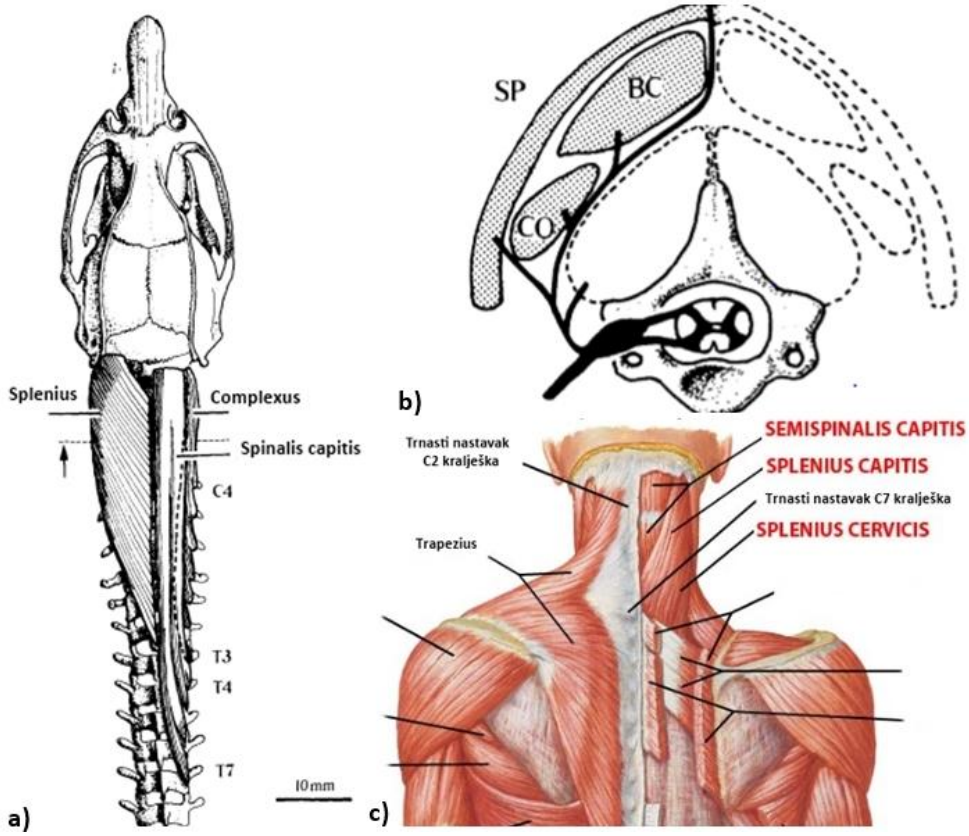
sredini sarkomere. Dva dodatna proteina titin i nebulin također doprinose strukturi i stabilnosti sarkomere (Cooper, 2000). Osnovu za razumijevanje mišićne kontrakcije predložili su 1954. god Huxley i sur. Tijekom mišićne kontrakcije svaka sarkomera se skraćuje, što privlači Z ploče jednu prema drugoj (Cooper, 2000). Ioni kalcija otpušteni iz sarkoplazmatske mrežice uzrokuju promjenu konformacije miozina. Tako se ručice miozina vežu za aktinske filamente i vuku ih prema središtu sarkomere, što predstavlja molekularnu osnovu samog procesa. Osim toga, miozinski filamenti imaju enzimsku ulogu i sudjeluju u cijepanju (hidrolizi) ATP-a čime se osigurava energija potrebna za mišićnu kontrakciju. Dakle, tijekom mišićne kontrakcije, aktin klizi preko miozina, zbog čega se I-pruga (aktinsko područje u sarkomeri) skraćuje, a H-pruga (miozinsko područje u sarkomeri) gotovo potpuno iščezava (Guyton i Hall, 2003).

1.2.3. Mišići nuhalne regije (semispinalni i zavojni mišići)

Semispinalni mišić glave (lat. *semispinalis capitis* ili *complexus*), zavojni mišić glave (lat. *splenius capitis*) i zavojni mišić vrata (lat. *splenius cervicis*) čine mišiće nuhalne regije, te uz *trapezius, longissimus capitis* čine glavne stražnje vratne mišiće (Slika 2). Primarna funkcija mišića vrata je podržavanje i micanje glave (Keros i sur., 1999; Nelson i Kokkonen, 2011). Semispinalni mišić glave je parni mišić koji spada u skupinu poprečno spinalnih mišića, a uz njega se nalaze i semispinalni vratni (lat. *semispinalis cervicis*) i semispinalni torakalni mišić (lat. *semispinalis thoracis*). Semispinalni mišić glave smješten je na gornjoj, stražnjoj strani vrata, duboko uz zavojni mišić te medijalno u odnosu na *m. longissimus cervicis* i *m. longissimus capitis*. Uzdiže se iznad niza tetiva od vrhova poprečnih nastavaka gornjih šest ili sedam torakalnih (T1-T6 ili T7) i sedmog vratnog kralješka (C7), te iz artikularnih nastavaka 3 cervikalna kralješka iznad. Tetive, udružujući se, tvore široki mišić koji polazi prema gore, te je umetnut između superiorne i inferiorne nuhalne linije zatiljne kosti. Srednji dio mišića se najčešće naziva *Spinalis capitis* ili *Biventer cervicis*. Semispinalni mišić glave omogućava ekstenziju i rotaciju glave (Gray, 1918).

Zavojni mišić glave je parni mišić a uzdiže se iz donje polovice nuhalnih ligamenata, od trnastog nastavka sedmog vratnog kralješka, te trnastih nastavaka gornja tri od četiri prsna ili torakalna kralješka. On leži duboko uz prsnoključnosisasti mišić (lat. *musculus sternocleidomastoideus*), te duboko uz trapez (lat. *musculus trapezius*) u svojem donjem dijelu, te je jedan od mišića koji tvore posteriorni trokut, odnosno lateralnu cervikalnu regiju. Primarna funkcija mu je ekstenzija, ali može omogućiti i lateralnu fleksiju i rotaciju vratne

kralježnice (Gray, 1918). Zavojni mišić vrata je parni mišić vrata i leđa. Polazi iz uskog tetivnog područja iz trnastih nastavaka od T3-T6, te se umeće u poprečne nastavke gornja dva ili tri vratna kralješka (Gray, 1918). Omogućava ipsilateralnu rotaciju i fleksiju, te ekstenziju glave i vrata (Floyd i Thompson, 2011). Semispinalni mišić glave povezan je sa simptomima koji uzrokuju bol u stražnjem dijelu vrata i glave. Aktivnosti koje uzrokuju bol u semispinalnom mišiću su udarac u potiljak, povreda kralježnice zbog naglog pokreta glave, te podignutost ramena prilikom stresa. Kada se govori o bolovima u glavi, te ograničenim kretnjama vrata, jedan od glavnih uzroka je upravo zavojni mišić vrata. Razlozi bolova mogu biti razni, a najpoznatiji su direktna trauma primjerice tijekom automobilske nesreće, pretrpljeni stres zbog nepravilne posture odnosno stava (Simons i sur., 1999).



Slika 2. a) Vratni dorzalni mišići štakora. Zavojni mišić (*m. splenius*), te (*m. spinalis capitis*), mišić koji predstavlja srednji dio semispinalnog mišića glave (*m. semispinalis capitis*) ili (*m. complexus*) (preuzeto i modificirano prema Callister i sur., 1987); b) Poprečni presjek kroz vrat štakora, na razini C2 kralješka. Prikazan je prostorni odnos dubokih vratnih mišića CO- (*m. complexus*) ili (*m. semispinalis capitis),* BC- (*m .biventer cervicis),* SP- (*m. splenius*) i dorzalnog ogranka spinalnog živca (preuzeto i modificirano prema Callister i sur., 1987); c) Mišići nuhalne regije čovjeka (preuzeto i modificirano prema Netter, 2014).

1.3. Oksidativni stres

Oksidativni stres predstavlja paradoks u metabolizmu, jer kisik koji predstavlja esenciju za većinu životnih procesa, istodobno je i visoko reaktivna molekula, koja šteti organizmima stvaranjem reaktivnih spojeva (Davies, 1995). Oksidativni stres definira se kao poremećaj u ravnoteži između stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i antioksidativne obrane (Betteridge, 2000). ROS su visoko nestabilni metaboliti kisika, zbog nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci. Oni mogu uključivati superoksidni anionski radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal ($HO^{\bullet}$) i neradikalne molekule poput vodikovog peroksida (H_2O_2) (Fridowich, 1998). ROS su poznati nusproizvodi mnogih oksidativnih biokemijskih i fizioloških procesa, te su također uključeni u brojne fiziološke i patofiziološke procese. Proizvodnja ROS-a događa se tijekom oksidativne fosforilacije i uključuje peroksomalne oksidaze, citokrom P450 i NAD(P)H oksidaze (NOX). Mitohondriji troše oko 90% ukupne količine kisika kako bi stvorili ATP u procesu oksidativne fosforilacije, a 1-2% ukupne količine kisikovih molekula pretvara se u superoksidne anione (Cadenas i Davies, 2000). *In vivo* produkcija ROS-a može biti inducirana brojnim vanjskim stimulusima poput radijacije, infekcije patogenima, izloženosti ksenobioticima i UV zračenju (Kregel i Zhang, 2007). Pri niskim koncentracijama, ROS mogu biti korisni u procesima intracelularne signalizacije i obrane protiv mikroorganizama, dok pri većim koncentracijama uzrokuju oštećenje stanica i njihovih sastavnica, te na taj način igraju veliku ulogu u patogenezi različitih bolesti (Dröge, 2002). Ravnoteža između stvaranja i neutralizacije ROS-a posredovana je antioksidativnim sustavom obrane, koji uključuje brojne enzime poput superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GPX), glutation-reduktaze (GR), glutation-S-transferaze (GST) te brojne ne-enzimske molekule (Poli i Parola, 1997), primjerice endogeno sintetizirane molekule poput glutationa (GSH), mokraćne kiseline, bilirubina, te molekule prisutne u hrani poput askorbinske kiseline, vitamina E (Powers i Jackson, 2008), karotenoida (Johnson, 2002). Neuravnoteženost između stvaranja i učinkovitog uklanjanja ROS-a vodi do oštećenja koje rezultira lipidnom peroksidacijom, te oštećenjem tkiva (Poli i Parola, 1997). Važno je istaknuti i oksidativna oštećenja proteina koja mogu uzrokovati fragmentaciju aminokiselinskih ostataka i stvaranje protein-protein poprečnih veza, što dovodi do narušavanja strukture. Oštećeni proteini utječu na unutarstaničnu signalizaciju te djeluju kao doprinoseći faktori različitim poremećajima i bolestima. Ukoliko proteolitički mehanizmi odgovorni za proteinsku degradaciju ne funkcioniraju primjereno, promijenjeni proteini akumuliraju se u stanicama te mogu doprinijeti razvoju patoloških stanja. Karbonilne grupe

proteina (CO) stvaraju se u bočnim lancima proteina tijekom oksidacije, a visoke razine CO promatrane su u različitim bolestima, poput Alzhaimerove, dijabetesa, sepsi i kroničnog zatajenja bubrega (Dalle-Donne i sur., 2003). ROS oštećuju DNA i uzrokuju promjene DNA baza. Ukoliko baze ostanu nesparene, modifikacije baza vode do genetičkih nedostataka. Budući da je gvanin posebno podložan oksidaciji, 8-hidroksi-2' deoksigvanozin je tradicionalno korišten kao biomarker oksidativnog oštećenja DNA (Tsuboi i sur., 1998). Oksidativna oštećenja uključena su u uzrokovanje kardiovaskularnih bolesti, neuronalnih degeneracija i raka, a imaju utjecaj i u procesima starenja (Rahal i sur., 2014).

1.3.1. Pokazatelji oksidativnog statusa

Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija (LPO) je složena lančana reakcija oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acid*, PUFA) potaknuta ROS-om (Štefan i sur., 2007). Osim toga, lipidi mogu biti oksigenirani enzimima poput lipoksigenaza, ciklooksigenaza i citokroma P450. Glikolipidi, fosfolipidi i kolesterol su dobro poznati ciljevi štetnih i potencijalno letalnih peroksidativnih modifikacija. Kao odgovor na membransku LPO, stanice mogu promovirati opstanak ili inducirati staničnu smrt. Pri fiziološkim ili niskim razinama LPO, stanice stimuliraju svoje održavanje i opstanak kroz uzastopni antioksidativni obrambeni mehanizam ili aktivacijom signalnih puteva koji povećavaju sintezu antioksidansa, što rezultira adaptivnim odgovorom na stres. Nasuprot tome, pod srednjim ili visokim razinama LPO, obujam oksidativnih oštećenja premašuje kapacitet popravka, te stanice induciraju apoptozu ili nekrozom programiranu staničnu smrt. Oba procesa vode do molekularnih staničnih oštećenja koja mogu pogodovati razvoju različitih patoloških stanja (Ayala i sur., 2014). Slobodni radikali koji mogu oksidirati PUFA-u jesu hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$), perhidroksil radikal ($HO_2^{\bullet}$), alkoksi radikal ($RO^{\bullet}$), te peroksi radikal ($RO_2^{\bullet}$), a $O_2^{\bullet -}$ je nedovoljno reaktivan za eliminaciju vodika (Štefan i sur., 2007).

Sveukupni proces LPO sastoji se od 3 koraka: inicijacije, propagacije i terminacije. Tijekom inicijacijskog koraka, prooksidansi poput hidroksilnih radikala izdvajaju vodik metilenske skupine te tako iz PUFA-e nastaju slobodni lipidni radikali ($L^{\bullet}$). U propagacijskoj fazi, $L^{\bullet}$ brzo reagiraju s kisikom kako bi stvorili lipidne peroksilne radikale ($LOO^{\bullet}$) koji izdvajaju vodik iz druge lipidne molekule i stvaraju novi $L^{\bullet}$ i lipidni hidroperoksid (LOOH) (Yin i sur., 2011). Tijekom propagacije LOOH u prisutnosti željeza disocira do alkoksilnog ($LO^{\bullet}$) i peroksilnog ($LOO^{\bullet}$) radikala koji dovode do reinicijalizacije peroksidacije (Štefan i sur., 2007). U

terminacijskoj reakciji, antioksidansi poput vitamina E doniraju vodikov atom drugim $LOO^{\bullet}$ i formiraju odgovarajući vitamin E radikal koji reagira sa drugim $LOO^{\bullet}$ formirajući neradikalni produkt. Nakon što je inicirana LPO nastavlja se propagacija lančanih reakcija sve do formiranja terminacijskih produkata (Yin i sur., 2011).

LPO stvara široki izbor oksidativnih produkata. Primarni produkti LPO su LOOH, dok se kao sekundarni produkti LPO stvaraju različiti aldehidi, a najproučavaniji su malonildialdehid (MDA), propanal, heksanal i 4-hidroksinonenal (4-HNE) (Ayala i sur., 2014). MDA je mutageni produkt LPO, dok je 4-HNE najtoksičniji. MDA ima široku upotrebu kao biomarker LPO omega-3 i omega-6 masnih kiselina zbog jednostavne reakcije sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA), dok se 4-HNE proizvodi u relativno velikim količinama te se ponaša kao sekudarni glasnik slobodnih radikala (Ayala i sur., 2014). Još jedna toksična skupina spojeva produkata LPO su izoprostani, a stvaraju se oksidacijom fosfolipida. Izoprostani su izomeri prostaglandina s kojima imaju popriličnu sličnost, no razlikuju se, između ostaloga, po tomu što izoprostani nastaju lokalno u membranama te su mnogo složeniji sustav (Štefan i sur., 2007).

1.3.2. Pokazatelji antioksidativnog statusa

Glutation

Glutation je tripeptid (γ-glutamil-cisteinil-glicin, GSH) s višestrukim funkcijama u živim organizmima (Sies, 1999). Kao nositelj aktivirane tiolne skupine u obliku cisteinskih ostataka, ponaša se kao antioksidans, bilo da sudjeluje u direktnoj interakciji s ROS-om i elektrofilima ili djelujući kao kofaktor u brojnim enzimima (Cooper i sur., 2011). Donirajući elektron GSH postaje reaktivan, ali reakcijom s drugim GSH tvori oksidirani oblik, glutation-disulfid (GSSG). GSSG se pretvara u reducirani oblik uz pomoć enzima glutation reduktaze (GR), koristeći NADPH kao donor elektrona. Omjer GSH i GSSG koristi se kao marker oksidativnog stresa (Zitka i sur., 2012). Pri normalnim uvjetima u stanicama sisavaca, omjer GSH i GSSG je zastupljen u rasponu koncetracije 1-10 mM. U stanici koja miruje molarni omjer GSH/GSSH iznosi 100:1, dok pri različitm oblicima oksidativnog stresa omjer iznosi najčešće 10:1 pa čak i 1:1 (Chai i sur., 1994). Sinteza GSH se odvija u dvije ATP-ovisne reakcije pri čemu ključno regulatorno mjesto predstavlja stvaranje visoko stabilne γ-glutamilne veze (Lushchak, 2012). Osim funkcije antioksidansa, GSH ima funkciju u detoksikaciji ksenobiotika, redoks signalizaciji, regulaciji γ-glutamilnog ciklusa (gdje služi kao izvor cisteina), te u regulaciji staničnog rasta i apoptoze. Eukariotske stanice sadrže tri

glavna rezervoara GSH. Većina staničnog GSH nalazi se u citosolu 80-85%, 10-15% u mitohondriju, te mali postotak u endoplazmatskom retikulumu (Lu, 2013).

Prema dosadašnjim provedenim istraživanjima, GSH ima fundamentalnu ulogu u detoksikaciji završnih produkata LPO, poput MDA i 4-HNE, kao i mnogih toksičnih nusprodukata normalnog staničnog metabolizma (Zhu i sur., 2009; Siems i sur., 2010). Osim za produkte LPO, GSH je zadužen i za druge endogene toksikante, primjerice metilglioksal (2-oksopropanal), koji nastaje i enzimski i ne-enzimski tijekom glikolize (Inagi i sur., 2010). Metilglioksal se uklanja glioksilazama kojima je GSH kofaktor (Kalapos, 1999). U normalnim uvjetima, redoks status GSH relativno je konstantan, no vrlo je osjetljiv na brojne stresne čimbenike (Jozefczak, 2012).

U istraživanju sistemske adaptacije na akutni stres u srčanom tkivu štakora koje su proveli Honchar i Mankovska (2007), GSH i sustav enzima koji uključuje GSH (GR, GPX, GST) igraju značajnu ulogu u adaptaciji na utjecaje ekstremnih faktora poput hipoksije, što se ostvaraje kroz unutarstanični redoks potencijal. Poznato je da iscrpno vježbanje izaziva veliki oksidativni stres, te dovodi do povećane LPO. Iz tog razloga promatran je odgovor GSH u takvim uvjetima, te je ustanovljeno da neposredno nakon vježbanja dolazi do porasta GSSG odnosno smanjenja GSH u krvi (Kerksick i Willoughby, 2005) što je indikator borbe protiv oksidativnog stresa, a potvrđeno je u još mnogim istraživanjima.

Katalaza

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je enzim pronađen u gotovo svim živim organizmima izloženim kisiku, koji katalizira razlaganje vodikovog peroksida na vodu i kisik (Chelikani i sur., 2004), što prikazuje sljedeća jednadžba:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

CAT je jedan od izrazito moćnih enzima, a samo jedna molekula CAT može pretvoriti milijun molekula vodikovog peroksida u vodu i kisik. CAT je tetramerni protein veličine 244 kDa, koji se sastoji od četiri identične podjedinice koje sadržavaju 527 aminokiselinskih ostataka, jednu hem skupinu (Fe (III) protoporfirin IX) i usko vezanu molekulu NADPH. Proučavanjem uloge NADPH utvrđeno je da NADPH sprječava formiranje inaktivnog oblika CAT željezo (IV) okso-protoporfirina IX, te da štiti CAT od inaktivacije vodikovim peroksidom (Kodydková i sur., 2014).

U usporedbi s peroksidazama, CAT ima znatno manji afinitet za H_2O_2 jer je za učinkovito odvijanje reakcija potrebno simultano vezanje dvije molekule H_2O_2 u aktivno mjesto enzima (Sies, 1985). CAT je primarno intracelularni enzim, a najveće koncentracije kod sisavaca pronađene su u eritrocitima i jetri, te povremeno u bubrezima (Deisseroth i Dounce, 1970). U jetri je CAT pretežno smješten u peroksisomima (Quan i sur., 1986).

Glutation-peroksidaza

Glutation-peroksidaza (GPX, EC 1.11.9.) je zajedničko ime za veliku obitelj različitih izoenzima koji imaju širok spektar supstrata te djeluju kao antioksidativni enzimi (Brigelius-Flohé i Maiorino, 2013). GPX katalizira redukciju vodika LOOH pomoću GSH:

$$2GSH + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + GSSG$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

GPX pripadaju obitelji filogenetski povezanih enzima. GPX 1-4 sisavaca su selenoproteini sa selencisteinom u katalitičkom centru, a GPX6 je selenoprotein koji se nalazi samo kod ljudi. Prema filogeniji, GPX obitelj sastoji se od 3 evolucijske skupine koje su se razvile iz pretka koji je sadržavao Cys: GPX1/GPX2, GPX3/GPX5/GPX6 i GPX4/GPX7/GPX8 (Brigelius-Flohé i Maiorino, 2013). Selenocistein u katalitičkom centru osigurava brzu reakciju s hidroksiperoksidima i brzu redukciju pomoću GSH. Različiti izoenzimi GPX-a imaju antioksidativnu funkciju u različitim staničnim odjeljcima. GPX1 je sveprisutan u citosolu i mitohondrijima, GPX2 je prisutan u crijevnom epitelu, GPX3 se nalazi u plazmi (sva tri funkcioniraju u vodenom mediju) dok GPX4 štiti membrane od oksidativnih reakcija. GPX5, koji sadrži cistein umjesto selenocisteina, nalazi se u epididimisu (Ghyselinck i Dufaure, 1990). GPX6 je karakterističan samo za ljude (Kryukov i sur., 2003), te se eksprimira u olfaktornom epitelu (Dear i sur., 1991), dok su GPX7 i GPX8 cisteinske peroksidaze koje pokazuju nisku peroksidaznu aktivnost (Herbette i sur., 2007).

Katalitički centar GPX-a prvotno je opisan kao trijada sastavljena od selenocisteina ili Cys i Gln i Trp (Epp i sur., 1983), no daljnjim istraživanjima utvrđeno je da je riječi o tetradi, s dodanim Asn (Tosatto i sur., 2008). GPX1, 2, 3, 5 i 6 su homotetrameri koji pokazuju specifičnost za topljive hidroksiperokside, dok su GPX4, 7 i 8 monomeri koji potencijalno omogućavaju reakcije s kompleksnijim LOOH, što je dokazano samo za GPX4 (Takebe i sur., 2002).

Glutation-S-transferaza

GSH-S-transferaze/GSH-transferaze (GST, EC 2.5.1.18) su obitelj koja pripada Fazi II detoksikacijskih enzima, koji imaju ulogu u zaštiti staničnih makromolekula od napada reaktivnih elektrofila. GST kataliziraju konjugaciju GSH sa širokim spektrom endogenih i egzogenih elektrofila, ksenobiotika. GST obitelj sačinjavaju tri superobitelji: citosolna, mitohondrijska i mikrosomalna, poznatija kao MAPEG proteini (*Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*). Citosolni GST je u ljudi podijeljene u 6 različitih klasa koje dijele 30% sličnosti slijeda, a označavaju se grčkim slovima alfa (α), mi (μ), omega (Ω), pi (π), teta (Θ), zeta (ζ) (Townsend i Tew, 2003).

Citosolne GST sisavaca su dimeri, u kojima obje podjedinice pripadaju istoj klasi GST iako nisu nužno identične. Svaka podjedinica dimernog enzima ima aktivno mjesto sastavljeno od dvije funkcionalne regije: hidrofilno G mjesto, koje veže fiziološki supstrat GSH, te susjedno H mjesto koje omogućava hidrofobnom okolišu vezanje strukturno različitih elektrofilnih supstrata, monomeri su približne veličine 25 kD (Eaton i Bammler, 1999).

Iako je najbolje poznat po svojoj sposobnosti konjugacije ksenobiotika i GSH te detoksikaciji staničnog okoliša, GST je sposoban vezati nesupstratne ligande koji su važni u staničnoj signalizaciji. Nekoliko izozima GST-a iz različitih klasa pokazalo je sposobnost inhibicije kinaza uključenih u signalizirajući put MAPK (engl. *Mitogen-activated protein kinases*), koji regulira proliferaciju stanica i smrt, sprječavajući na taj način kinaze u obavljanju svoje uloge i signalizirajućoj kaskadi (Laborde, 2010).

Glutation-reduktaza

Glutation-reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) je supstratno specifični enzim koji je član piridin-nukleotid-disulfid-oksidoreduktaza, obitelji flavoenzima. GR katalizira redukciju GSSG u GSH koristeći NADPH kao reducens (Ithayaraja, 2011), što prikazuje sljedeća jednadžba:

$$\mathrm{GSSG} + \mathrm{NADPH} + \mathrm{H}^{+} \xrightarrow{\text{glutation-reduktaza}} 2\ \mathrm{GSH} + \mathrm{NADP}^{+}$$

GR je homodimer (100-120 kDa), koji se sastoji od dvije podjedinice organizirane u obliku konformacije leptira s flavin adenin dinukleotid prostetičkom skupinom (FAD), a dvije katalitičke podjedinice tvore pojedinačnu funkcionalnu jedinicu (Nuray i Berivan, 2007).

GR je sklon akumuliranju u staničnim dijelovima visokog elektronskog fluksa, gdje nastaju ROS. U prokariota može se nalaziti u periplazmatskom prostoru povezanom s unutrašnjom

membranom okrenutoj citoplazmi (Couto i sur., 2015). U eukariota GR se pronalazi u citoplazmi i unutar organela uključujući jezgru i mitohondrije (Outten i sur., 2004; Couto i sur., 2015). Oksidoreduktazna aktivnost također je pronađena u endoplazmatskom retikulumu (Chakravarthi i sur., 2006) i lizosomima (Chiang i Maric, 2011). Iako je GR sisavaca prisutan i u citosolu i u mitohondrijima, ove izoforme se biokemijski ne razlikuju što upućuje na to da su obje kodirane jednim genom (George i Francke, 1976).

Superoksid-dismutaza

Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) je enzim koji katalizira dismutaciju superoksida u kisik i vodikov peroksid. Dismutacija superoksida SOD-om prikazana je sljedećim reakcijama:

$$M^{(n+1)+}\text{-SOD} + O_2^{\bullet -} \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$$

$$M^{n+}\text{-SOD} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2$$

SOD su proteini koji kao kofaktor sadrže bakar, cink, mangan, željezo ili nikal (Abreu i Cabelli, 2010). Poznato je pet različitih izoformi enzima SOD-a od kojih su tri strukturno karakterizirana. U sisavaca su prisutna tri oblika superoksid-dismutaze. SOD1 ili Cu, Zn-SOD smješten je u citoplazmi, SOD2 ili Mn-SOD nalazi se u mitohondrijima, dok je SOD3 ili EC-SOD (sadrži bakar i cink) smješten u izvanstaničnom prostoru (Zelko i sur., 2002). SOD1 je dimer sastavljen od dvije podjedinice, ukupne mase 32 kDa, dok su SOD2 i SOD3 tetrameri ukupne mase 96 kDa i 120 kDa (Powers i Jackson, 2008).

U skeletnom mišiću, 15-35% ukupne aktivnosti SOD-a nalazi se u mitohondriju, a ostatak od 65-85% u citosolu. U skeletnom mišiću štakora, SOD aktivnost je najveća u oksidativnim mišićima koji sadrži visok udio vlakana tipa I i IIa u usporedbi sa mišićima sa nižim mitohondrijskim volumenom (npr. IIx ili IIb) (Powers i Jackson, 2008).

Istraživanjem utjecaja akutnog stresa na aktivnost SOD-a, kao enzima prve linije obrane, ustanovljeno je kako akutni stres izazvan vježbanjem dovodi do povećanja sinteze mRNA izvanstaničnog SOD-a dok citoplazmatski i mitohondrijski ostaju nepromijenjeni (Hitomi i sur., 2008). U istraživanju adaptacije mišića gornjeg dišnog sustava na vježbe kronične izdržljivosti, došlo je do povećanja aktivnosti SOD-a, u sternohioidnom i digastričnom mišiću (Vincent i sur., 2002).

1.3.3. Oksidativni stres u skeletnim mišićima

Skeletni mišić je visoko specijalizirano tkivo s odličnom plastičnošću u odgovoru na vanjski podražaj poput vježbanja i treninga. Ponavljajuće mišićne kontrakcije tijekom treninga izdržljivosti vode do različitih fenotipskih i fizioloških odgovora. Ti odgovori uključuju aktivaciju mitohondrijske biogeneze, transformaciju tipa mišićnih vlakana i angiogenezu, odnosno razvoj novih krvnih žila. Svi ovi odgovori zajedno povećavaju kapacitet aerobnog metabolizma mišića i otpornost na umor. Visoka mišićna aktivacija uključuje snažno povećanje proizvodnje ROS-a (Steinbacher i Eckl., 2015). Poznato je nekoliko proizvođača ROS-a u mišićnim stanicama koji su aktivirani različitim stimulusima. Među njima su mitohondriji, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), NOX, fosfolipaza A2 (PLA 2), ksantin-oksidaza (XO) i lipoksigenaze (Steinbacher i Eckl, 2015).

Dugi niz godina, mitohondriji su smatrani glavnim izvorom staničnog ROS-a sa stopom proizvodnje $O_2^{\bullet -}$ od 1-4% ukupne mitohondrijske potrošnje kisika (Powers i Jackson, 2008; Brand, 2010). Neka istraživanja ukazuju da je produkcija ROS-a u mitohondriju manja, te da iznosi oko 0.15% (St-Pierre i sur., 2002). Smatra se da ROS u mitohondriju nastaje curenjem elektrona respiratornog lanca iz unutrašnje membrane mitohondrija u kontrahirajućoj mišićnoj stanici. Pronađeno je deset različitih mjesta nastajanja $O_2^{\bullet -}$ i H_2O_2 u mitohondrijima sisavaca (Perevoshchikova i sur., 2013; Hey-Mogensen i sur., 2014). $O_2^{\bullet -}$ uglavnom nastaje iz kompleksa I (NADH-dehidrogenaze) i kompleksa III (koenzim Q i citokrom C oksido-reduktaze) elektron transportnog lanca. Novija istraživanja ukazuju na važnost kompleksa II (sukcinat-dehidrogenaze) kao glavnog izvora $O_2^{\bullet -}$ (Perevoshchikova i sur., 2013). U novijim istraživanjima pokazano je i da članovi NOX obitelji doprinose proizvodnji $O_2^{\bullet -}$ u citosolu skeletnih mišića, tijekom mirovanja i tijekom kontrakcije u većoj mjeri nego mitohondriji (Xia i sur., 2003; Shkryl i sur., 2009).

U mišiću koji nije zahvaćen umorom, unutarstanični ROS čini se nužan za stvaranje mišićne sile, a suplementacija niskim razinama ROS-a čak i povećava stvaranje sile (Smith i Reid, 2006). Ovisno o koncentraciji, trajanju izloženosti te stanju utreniranosti jedinke, ROS mogu imati i koristan i štetan učinak (Steinbacher i Eckl., 2015). Snažno povećanje ROS-a nakon napornog vježbanja, starenja ili bolesti (npr. kroničnog zatajenja srca, raka) može uzrokovati kontraktilnu disfunkciju i mišićnu atrofiju, što dovodi do mišićne slabosti i umora. (Reid, 2008; Liou i Storz, 2010). Iako točan mehanizam djelovanja ROS-a na kontraktilnu disfunkciju nije u potpunosti razjašnjen, važno je naglasiti da ROS mogu uzrokovati promjene

u kontraktilnim proteinima. U tom pogledu, pokazano je da je H_2O_2 sposoban modificirati S1 fragment miozinske glavice, što ograničava miozin-aktin dinamiku u prisutnosti ATP-a (Prochniewicz i sur., 2008). Osim utjecaja na kontraktilnu kinetiku, ROS su sposobni modulirati signalizirajuće puteve, poput kalcija, proteinskih kinaza i fosfataza, serin/treonin kinaza i fosfolipaza (Jackson i sur., 2002), što vodi do promjena u genskoj ekspresiji, staničnoj funkciji, metabolizmu i staničnom oštećenju. U istraživanju Alessija i Goldfarba (1988) ustanovljeno je da je povećano stvaranje ROS-a uzrokovano akutnim vježbanjem, uzrokovalo povećanje LPO, u jetri i brzim skeletnim mišićima sjedilačke grupe, dok grupa trenirana na izdržljivost nije pokazala povećanje razine LPO nakon vježbe. Osim što mišićna aktivnost povećava staranje ROS-a ona dovodi i do aktivacije antioksidativnog obrambenog sustava. Ovisno o stopi potrošnje kisika, stanice konstitutivno eksprimiraju različite količine antioksidativnih enzima i ne-enzimskih molekula. Razina antioksidativnih enzima može znatno varirati ovisno o tipu mišićnih vlakana. Mišićna vlakna u ljudi dijele se na 2 glavna tipa, a to su: sporo okidajuća (TIP I) mišićna vlakna i brzo okidajuća (TIP II) mišićna vlakna. Vlakna tipa II se dijele na tip IIA koji označava „brzo okidajuća oksidativna glikolitička vlakna“ i tip IIB (po novijem nazvana IIX) koji označava „brza glikolitička vlakna“. Vlakna tipa I karakterizirana su niskom proizvodnjom sile, snage i brzine te imaju osobinu visoke izdržljivosti, dok su vlakna IIX karakterizirana visokom proizvodnjom sile, snage, brzine i niske izdržljivosti, a vlakna IIA se po karakteristikama nalaze između ova 2 tipa. Kod štakora podjela obuhvaća vakna tipa I, IIA, IIB, IIX, s time da neki znanstvenici posljednji tip nazivaju i IID (Astrand i Rodah, 2003). Mišićna vlakna tipa I posjeduju veću aktivnost antioksidativnih enzima od mišićnih vlakana tipa IIA i IIB (Powers i Jacskon 2008). Ono što se može izdvojiti iz pojedinih istraživanja je da pojedinačno vježbanje može voditi do ograničenog adaptivnog odgovora, dok regularno vježbanje, čini se, postepeno povećava razinu adaptacije, tako što ponavljano aktivira antioksidativne gene i proteine. Povećana razina ROS-a važan je stimulus za mišićne stanice da se adaptiraju na kronično vježbanje. Poboljšana sposobnost smanjenja ROS-a može omogućiti bolju zaštitu od ROS-a stvorenih prilikom svakog sljedećeg vježbanja odnosno izlaganja stresu, te isto tako umanjiti proces starenja i promovirati zdravlje sa povećanim funkcionalnim sposobnostima (Radák i sur., 2013).

1.3.4. Razlike između spolova

Pretpostavlja se da su oksidativni procesi i antoksidativna zaštita spolno povezani (Ehrenbrink i sur, 2006; Marotti i sur, 2010). Takve spolne razlike posljedica su gonadotrponih hormona,

primarno estrogena. Estradiol i njegovi derivati su snažni endogeni antioksidansi koji reduciraju LPO razine u jetri (Hamden i sur., 2007) i mozgu (Vedder i sur., 1999). Ženke mnogih vrsta sisavaca žive duže od mužjaka. Borrás i sur. (2003) dokazali su da je proizvodnja oksidanasa u mitohondriju kod mužjaka mnogo veća nego kod ženki, te da ženke imaju veću ekspresiju antioksidanasa od mužjaka, što se pokazalo kod antioksidativnih enzima GPX i SOD. Tijekom menopauze dolazi do deficita estrogena, što dovodi do oksidativnog stresa u različitim tkivima i razvoju brojnih simptoma i patologija koje karakteriziraju menopauzu. Oksidativni stres je povezan s povećanim rizikom od osteoporoze i kardiovaskularnih bolesti, te većom učestalosti vazomotoričkih smetnji (Doshi i Agarwal, 2013). Žene u menopauzi imaju povećan ukupni kolesterol, LDL i lipoproteine u usporedbi sa pre-menopauzalnim ženama koje nemaju gubitke estrogena (Abbey i sur., 1999). Budući da su estrogeni važni u kontroliranju unosa hrane, potrošnje energije i regulacije inzulinske sekrecije, njihov nedostatak može doprinijeti razvoju pretilosti i dijabetesa (Ropero i sur., 2008; Vogel i sur., 2013). Žene nakon menopauze imaju povećanu osjetljivost na inzulin što je direktno povezano sa indeksom tjelesne mase, a za liječenje inzulinske osjetljivosti koristi se hormonska nadomjesna terapija (Catalano i sur., 2008).

Što se tiče muških spolnih hormona utvrđeno je da se testosteron aktivira tijekom odgovora na stres u štakora i ljudi te se povećava više u muškaraca nego u žena. Visoka razina testosterona stvara oksidaciju u testikularnom tkivu štakora i zeca, te u ljudskoj placenti. Mnoga istraživanja ističu da testosteron ima i svojstva antioksidansa primjerice u ljudskoj prostati, te živčanom sustavu štakora, što ukazuje da je uloga testosterona kao prooksidansa spolno i tkivno specifična (Alonso-Alvarez, 2007).

Ovarijektomija u štakora često je korišten animalni model za osvještavanje utjecaja estrogenske insuficijencije i metaboličkih posljedica, primjerice osteoporoze, a poznato je da se ekstragonadalna aromatizacija kao i sinteza estrogena u adrenalnom korteksu nastavlja odvijati i nakon ovarijektomije (Zhao i sur., 2005).

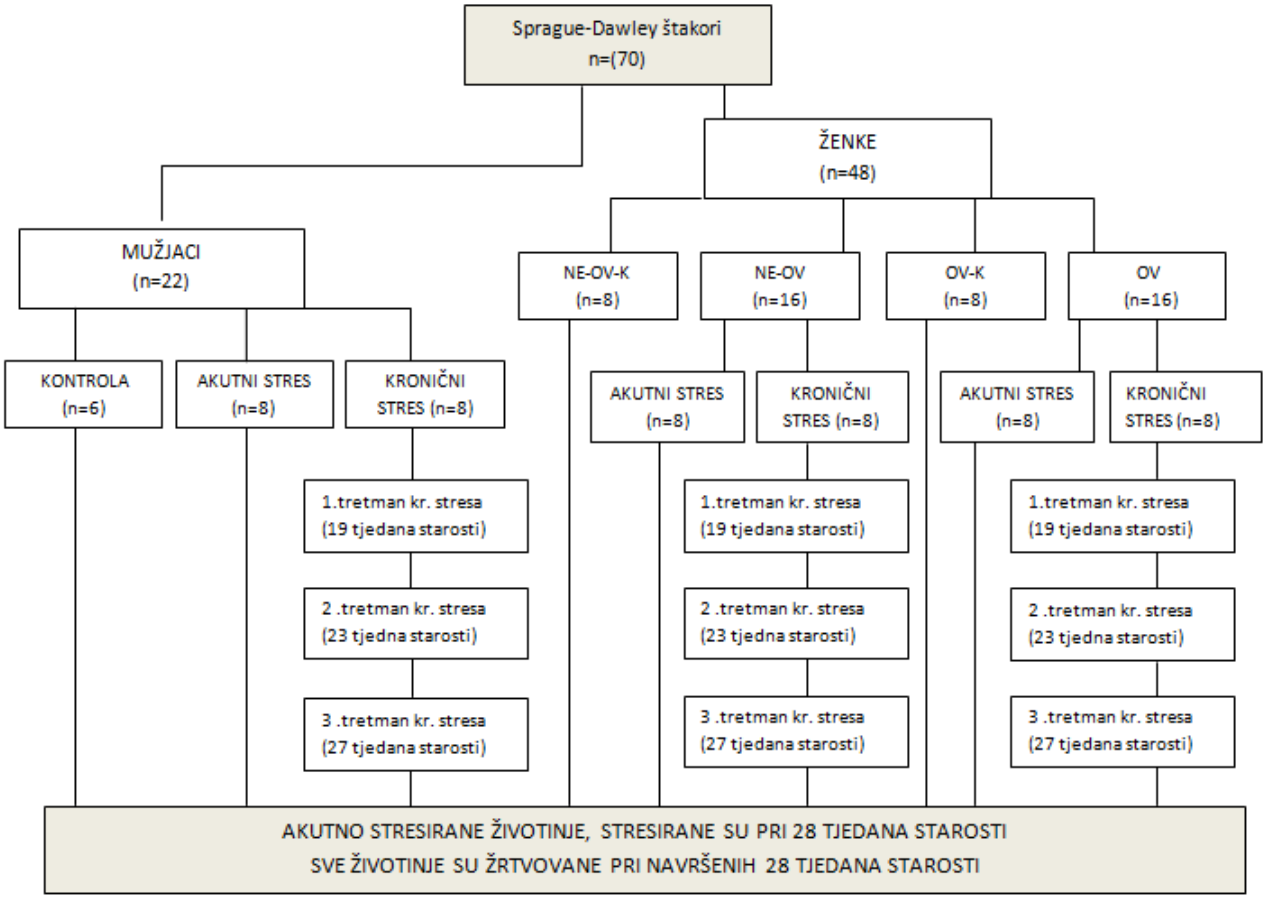
1.4. Ciljevi

1. Odrediti utjecaj akutnog stresa na oksidativni i antioksidativni odgovor mišića nuhalne regije (*Semispinalis capitis, Splenius capitis et cervicis*) štakora.
2. Odrediti utjecaj kroničnog stresa na oksidativni i antioksidativni odgovor mišića nuhalne regije (*Semispinalis capitis, Splenius capitis et cervicis*) štakora.
3. Odrediti utjecaj ovarijektomije na oksidativni i antioksidativni odgovor mišića nuhalne regije (*Semispinalis capitis, Splenius capitis et cervicis*) štakora izloženih akutnom i kroničnom stresu.
4. Odrediti postoje li razlike u oksidativnom i antioksidativnom odgovoru mišića nuhalne regije (*Semispinalis capitis, Splenius capitis et cervicis*) štakora na akutni i kronični stres između mužjaka, neovarijektomiranih i ovarijektomiranih ženki.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Pokusne životinje

Životinje su uzgajane u vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku u sklopu istraživanja, koje je odobreno od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku. Tijekom eksperimenta životinjama je rukovano prema Hrvatskom zakonu za zaštitu životinja. Istraživanje je uključivalo 70 štakora Sprague-Dawley soja starosti 4 mjeseca, 22 mužjaka i 48 ženki (Slika 3). Životinje su bile podijeljene na mužjake (M), neovarijektomirane ženke (NE-OV) i ovarijektomirane ženke (OV) koje su podvrgnute akutnom stresu (AS), dok je kontrolna skupina podvrgnuta lažnom stresu (K). Svaka skupina životinja sastojala se od 8 životinja (osim muške kontrolne skupine koja se sastojala od 6 životinja), te je bila uključena u protokol pri starosti od 16 tjedana. Stres tretmani započeli su pri starosti životinja od 19 tjedana. Životinje su bile smještene u standardne kaveze pri sobnoj temperaturi. Standardna laboratorijska hrana i voda bili su dostupni *ad libitum* (neograničeno), osim tijekom 24 sata prije obavljanja testa na glukoznu toleranciju (GTT) kada je hrana izostavljena skupinama KS. Prije glavnog istraživanja, provedena su dva pilot istraživanja koja su pokazala kako je stres uzrokovan operativnim zahvatom beznačajan, ukoliko se ovarijektomija primijeni 4 tjedna prije nego što se životinje podvrgnu stres protokolu. Takvo saznanje omogućilo je da se ne koristi lažno operirana skupina (*sham*) te da se reducira ukupni broj životinja.



Slika 3. Shema tijeka eksperimenta.

2.2. Ovarijektomija

Ženke štakora (*n*=24) ovarijektomirane su za vrijeme 12. tjedna starosti prema protokolu Harlan Laboratorija (2009). Životinje su anestezirane izofluranom i smještene na operacijski stol u ventralnoj poziciji. S dorzalnog lumbalnog područja uklonjene su dlačice te je rez napravljen na pola puta između kaudalnog kraja prsnog koša i baze repa. Drugi rez napravljen je bilateralno kroz mišić, nakon čega su jajnici i dio jajovoda ekstrahirani i uklonjeni s pojedinačnim rezom. Preostalo tkivo smješteno je nazad u peritonealnu šupljinu, a koža je zašivena. Životinje su, postoperativno, opskrbljene hranom i vodom *ad libitum*, te su pozorno praćene tijekom 72 sata.

2.3. Protokol akutnog stresa

Skupinom štakora koje su podvrgnute akutnom stresu (AS-M, AS-NE-OV, AS-OV) dnevno je rukovano sve dok životinje nisu navršile 28 tjedana starosti. Životinjama je rukovano

prilikom čišćenja kaveza ili hranjenja, te su životinje bile priviknute na takve obrasce ponašanja. Praksa je pokazala da je to vrlo dobar način za ukroćivanje životinja, te da u pravilu ne izaziva stres. Skupine štakora M (n=8), OV (n=8) i NE-OV (n=8) podvrgnute su akutnom stresu, jedan sat stješnjavanjem u metalne cijevi pri +4 ºC. Ovaj tip stresa je odabran iz razloga što uzrokuje snažan odgovor u štakora (Glavin i sur., 1994). Neposredno nakon izlaganja akutnom stresu štakori su žrtvovani te su sakupljeni uzorci. Uzorak mišića lijeve nuhalne regije (*m. semispinalis i m. splenius et cervicis*) smrznut je u tekućem dušiku, te pohranjen na -80 ºC.

2.4. Kontrolna skupina

Kontrolne skupine životinja (M-K, NE-OV-K, OV-K) podvrgnute su lažnom stresu (*sham*). Lažni stres uključivao je isti okoliš i rukovanje kao skupine životinja podvrgnute akutnom i kroničnom stresu, ali sa izostavljenim stresorima. Ovaj protokol uključivao je *sham* verziju sljedećih stresora: upaljeno svjetlo preko noći, 60 min rotacije kaveza, gladovanje preko noći (18:00-09:00), 60 min stješnjavanja u metalne cijevi pri +4 ºC, 3 minute prisilnog plivanja, upaljeno svjetlo preko noći sa neuobičajenim zvukovima (alarm mobitela koji je postavljen u nepravilnim intervalima). Protokol je izveden na sljedeći način: kada su npr. skupine KS izložene stresu stješnjavanja u metalne cijevi (60 minuta pri +4ºC), skupine K su smještene u isti okoliš, ali pri sobnoj temperaturi i s metalnim cijevima širom otvorenim; kada su skupine KS podvrgnute prisilnom plivanju u hladnoj vodi 3 min, skupine K su na 3 min smještene u identične prazne kontejnere. Protokol je ponavljan 3 puta tijekom desetodnevnog lažnog stresa sve dok životinje nisu navršile 28 tjedana starosti kada su žrtvovane te je prikupljeno tkivo. Uzorak mišića lijeve nuhalne regije (*m. semispinalis i m. splenius et cervicis*) smrznut je u tekućem dušiku, te pohranjen na -80 ºC.

2.5. Protokol kroničnog stresa

Nakon navršenih 16 tjedana starosti, sve životinje su premještene iz vivarija u životinjski eksperimentalni laboratorij. Dvadeset četiri jedinke (8 mužjaka, 8 ovarijektomiranih ženki, i 8 neovarijektomiranih ženki) nakon navršenih 19 tjedana starosti, podvrgnute su kroničnom stresu (Tablica1). Tretmani stresa ponavljani su tri puta tijekom desetodnevog izlaganja stresu. Tijekom prvog tretmana stresa, provedena su tri testa GTT. Stresori u drugom i trećem tretmanu su ravnomjerno provedeni istim redoslijedom u isto doba dana. Između tretmana

stresa postojao je period od 18 dana, a čitav protokol završen je kada su životinje navršile 28 tjedana starosti. Jedan od stresora uključivao je izloženost mačjem mirisu, te je uzrokovao direktni i vrlo snažni stres štakora (nakostriješenost). Mačka je prethodno pregledana od strane veterinara te deklarirana kao zdrava jedinka, koja može pristupiti protokolu. Štakori su žrtvovani nakon 28 tjedana starosti, te su uzorkovana adekvatna tkiva. Uzorak mišića lijeve nuhalne regije (*m. semispinalis i m. splenius et cervicis*) smrznut je u tekućem dušiku, te pohranjen na -80 ºC.

Tablica 1. Protokol stresiranja

1. Tretman stresa		**2. i 3. Tretman stresa**
Dan	**Stresori**	
1.	Gladovanje preko noći (14-18 sati)	Gladovanje preko noći (14-18 sati)
2.	GTT test (mjerenje osnovice)	60 min stješnjavanja u metalne cijevi i gladovanje pri +4 ºC
3.	60 min stješnjavanja u metalne cijevi i gladovanje pri +4 ºC	Upaljeno svjetlo preko noći
4.	GTT test (referenca akutnog stresa)	60 minuta rotacije kaveza
5.	Upaljeno svjetlo preko noći	3 minute prisilnog plivanja
6.	60 minuta rotacije kaveza	Upaljeno svjetlo preko noći sa neuobičajenim zvukovima
7.	3 min prisilnog plivanja	Izloženost mačjem mirisu i gladovanje
8.	Upaljeno svjetlo preko noći s neuobičajenim zvukovima	60 min stješnjavanja u metalne cijevi i gladovanje pri +4 ºC.
9.	Izloženost mačjem mirisu i gladovanje	3 min prisiljenog plivanja
10.	GTT test (referenca kroničnog stresa)	GTT test (produžena referenca kroničnog stresa)

2.6. Priprema tkivnih ekstrakata

Uzorci smrznutog mišića usitnjeni su u tarioniku s tučkom pomoću tekućeg dušika, te je potom prah usitnjenog tkiva alikvotiran u epruvete od 2 ml i homogeniziran u adekvatnoj otopini koristeći Ultra turrax T10 homogenizator (1300 rpm; IKA, Königswinter, Njemačka). Za određivanje razine LPO, tkivo je homogenizirano u ledeno hladnoj 1.15% otopini KCl-a

(1:20, w/v). Za određivanje količine GSH i GSSG, tkivo je homogenizirano (1:10, w/v) u 5% sulfosalicilnoj kiselini (SSA), potom su uzorci držani na ledu te centrifugirani pri 20 000 g, 15 min i 4 °C. Za određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima, mišićno tkivo homogenizirano je u 100 mM fosfatnom puferu (pH 7.0) koji je sadržavao 1 mM EDTA. Homogenat je nakon toga držan na ledu 10 min, a zatim centrifugiran 15 min pri 20 000 g, na 4 ºC. Količina GSH i GSSG te razina LPO određeni su u danima neposredno nakon pripreme tkivnih homogenata, dok su proteinski ekstrakti za određivanje aktivnosti enzima pohranjeni u plastične epruvete na -80 °C. Mjerenje apsorbancije produkata LPO i proteina rađena su na UV-Vis spektrofotometru Lambda 2, opremljenim s UV Winlab softverskim paketom (Perkin Elmer, Wiesbaden, Njemačka), dok je enzimska kinetika rađena na UV-Vis spektrofotometru Lambda 25 (Perkin Elmer For the Better, Waltham, Massachusetts, SAD), opremljenim softverskim paketom UV WinLab 6.0.

2.7. Određivanje razine lipidne peroksidacije

Razina LPO u homogenatima mišićnog tkiva određena je mjerenjem reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS), prema metodi koju su opisali Okhawa i sur. (1979). Ova metoda zasniva se na stvaranju crvenog pigmenta, koji nastaje reakcijom raspadnih produkata LPO, poput MDA, s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri optimumu pH 3.5. Ukratko, 20%-tni tkivni homogenat pomiješan je s natrij-dodecil-sulfatom (SDS), acetatnim puferom (pH 3.5) i vodenom otopinom TBA. Nakon inkubacije na 95 °C tijekom 60 min, stvoreni crveni pigment ekstrahiran je pomoću smjese n-butanola i piridina (15:1) te je mjeren pri apsorbanciji od 532 nm. Količina MDA izračunata je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama pripremljenog s 1,1,3,3-tetrametoksipropanom kao standardom. Rezultati su izraženi u nmol po miligramu svježe tvari (nmol × $mg^{-1}{}_{sv.tv.}$).

2.8. Određivanje količine ukupnog glutationa, reduciranog i oksidiranog glutationa

Sadržaj ukupnog glutationa (tGSH=GSH+GSSG) određen je kinetičkom metodom u kojoj GSH uzrokuje kontiuniranu redukciju 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoične kiseline (DTNB) pri čemu nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2- nitrobenzoična kiselina (TNB), dok se nastali GSSG reciklira pomoću GR i NADPH (Akerboom i Sies, 1981; Nair i sur., 1991). Porast apsorbancije, do kojeg dolazi uslijed nastanka TNB, mjeri se na 412 nm. Reakcijski koktel sastoji se od 100 mM natrij-fosfatnog pufera (pH 7.0) + 1 mM EDTA, otopine GR (6 U ×

mL^{-1}). U kivetu za mjerenje je dodano 750 µL reakcijskog koktela, 50 µL uzorka i 250 µL NADPH (0.16 mg × mL^{-1}), koji je dodan neposredno prije početka mjerenja. Za mjerenje GSSG u alikvote uzorka dodano je 2 µL vinilpiridina i 6 µL trietanolamina. Uzorci su potom stajali sat vremena te je sadržaj oksidiranog glutationa određen kinetičkom metodom kao i tGSH. Rezultati su izraženi kao omjer GSH/GSSG.

2.9. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT određena je spektrofotometrijski koristeći H_2O_2 kao supstrat, metodom po Aebiju (1984). Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti CAT sastojala se od 50 mM natrij-fosfatnog pufera (pH=7.0) i 10 mM H_2O_2. Reakcija započinje dodavanjem 50 µl proteinskog ekstrakta u 1450 µL reakcijske smjese. Pad apsorbancije uslijed razgradnje H_2O_2 praćen je svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm u UV-kiveti. Jedna jedinica aktivnosti definirana je kao količina razgrađenog H_2O_2 u µmol po minuti po miligramu proteina. Aktivnost CAT računata je koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent (ε= 0.04 mM × cm^{-1}) i izražena kao U × mg^{-1} proteina.

2.10. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze

Aktivnost GPX mjerena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Wendel (1980) koristeći H_2O_2 kao supstrat. Prema ovoj metodi, aktivnost GPX određuje se indirektno, mjereći stopu oksidacije NADPH u $NADP^+$ koja je praćena smanjenem apsorbancije pri 340 nm. Reakcijska smjesa sastojala se od pufera (50 mM natrij fosfatni pufer (pH= 7.0), 0.4 mM EDTA, 1 mM NaN), 0.12 mM NADPH, 3.2 U GR, 1 mM GR i 0.0007% (w/w) H_2O_2 u ukupnom volumenu od 1.55 mL. Enzimska aktivnost mjerena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 340 nm, tijekom 5 minuta svakih 30 sekundi. Jedna jedinica GPX katalizira oksidaciju 1 µmol-a GSH u GSSG pomoću H_2O_2 u jednoj minuti pri pH 7.0 i 25 ºC. Aktivnost GPX izračunata je koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent za NADPH (ε= 6.220 mM × cm^{-1}) a izražena je kao U × g^{-1} proteina.

2.11. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze

Aktivnost GST određena je spektrofotometrijskim praćenjem nastanka produkta konjugacije 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) i GSH, što je popraćeno povećanjem apsorbancije pri

340 nm (Habig i sur., 1974; Simons i Vander Jagt, 1977). U UV-kivetu s 1350 µL natrij-fosfatnog pufera (pH 6.5) koji je sadržavao 1 mM EDTA, dodano je 50 µL 75 mM otopine GSH te 50 µL 30 mM otopine CDNB. Enzimska reakcija započinje dodavanjem 50 µL proteinskog ekstrakta. Porast apsorbancije, do kojeg dolazi uslijed stvaranja G-SDNB konjugata, mjeren je svakih 30 sekundi tijekom 5 minuta pri valnoj duljini od 340 nm. 1 U GST konjugira 1 µmol 1-kloro-2,4 dinotrobenzena s GSH po minuti pri pH 6.5 i 25 ºC. GST aktivnost računata je koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent glutation-1-kloro-2,4-dinitrobenzen konjugata (ε=9.6 mM × cm^{-1}) i izražena kao U × g^{-1} proteina.

2.12. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze

Aktivnost GR u proteinskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Dolphin i sur. (1989). Metoda se temelji na mjerenju potrošnje NADPH tijekom redukcije GSSG uz prisutnost GR-a. U UV-kivetu dodano je 400 µL 100 mM natrij-fosfatnog pufera (pH 7.5) koji je sadržavao 1 mM otopinu EDTA, 500 µL 2 mM otopine GSSG, 50 µL proteinskog ekstrakta te 50 µL 2 mM otopine NADPH. Smanjenje apsorbancije, uslijed oksidacije NADPH, praćeno je pri valnoj duljini od 340 nm svakih 10 sekundi tijekom 2 minute. Jedna jedinica enzima reducira 1 µmol GSSG po minuti pri pH 7.5 i 25 ºC. GR aktivnost računata je koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent za NADPH pri 340 nm (ε=6.22 mM × cm^{-1}) i izražena kao U × g^{-1} proteina.

2.13. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze

Aktivnost SOD u proteinskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Flohé i Otting (1971). Aktivnost je mjerena kao stupanj inhibicije redukcije citokroma C superoksidnim radikalom, a stopa redukcije praćena je na 550 nm. Jedna jedinica SOD-a inhibira stopu redukcije citokroma C za 50% u povezanom sustavu pomoću ksantin-oksidaze (XOD) i ksantina. Reakcijska smjesa sastoji se od reakcijskog koktela, u kojem je 0.05 mM otopina citokroma C priređena u 50 mM natrij fosfatnom (pH 7.8) koji je sadržavao 0.1 mM EDTA (pH 7.8), pomiješan sa 1 mM otopinom ksantina (u NaOH), te otopinom ksantin oksidaze 0.1 U/ml. U kivetu je dodano 1450 µL reakcijskog koktela, 25 µL proteinskog ekstrakta, a 25 µL ksantin oksidaze dodano je neposredno prije mjerenja. Porast apsorbancije praćen je na 550 nm tijekom 3 min, svakih 30 sek. Aktivnost je računata koristeći postotak inhibicije citokroma C i izražena kao U × mg^{-1} proteina.

2.14. Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina

Ukupna koncentracija topljivih proteina u proteinskim ekstraktima određena je metodom po Bradfordu (1976), koristeći albumin goveđeg seruma kao standard.

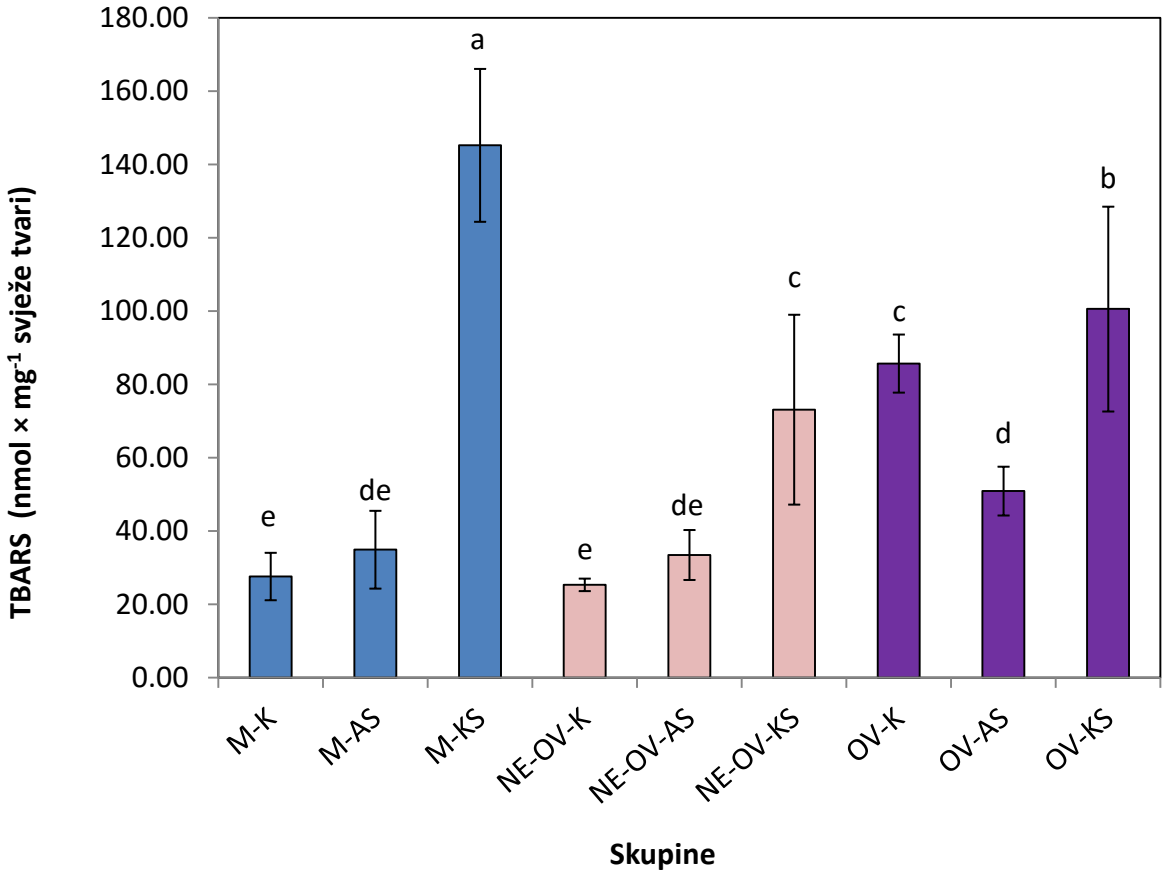
2.15. Statistička obrada podataka

Podaci dobiveni u ovom radu su obrađeni u statističkom programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Razlike između srednjih vrijednosti kontrole i skupina akutnog i kroničnog stresa uspoređene su pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (one-way ANOVA). *Post hoc* testiranje pomoću Duncan testa provedeno je kako bi odredili koje se skupine međusobno razlikuju. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5%.

3. REZULTATI

3.1. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na razinu lipidne peroksidacije

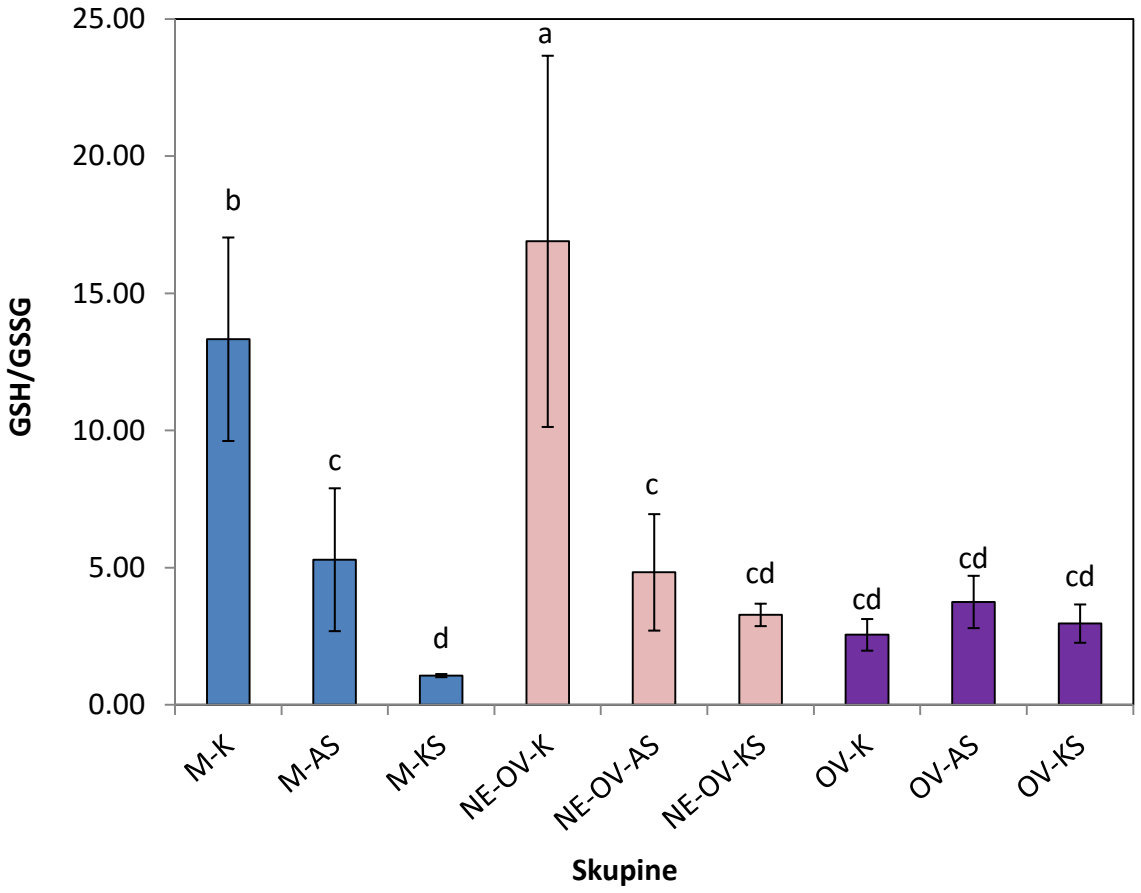
Razina LPO praćena je mjerenjem TBARS-a (Slika 4). Akutni stres nije značajno utjecao na razinu LPO kod skupine M-AC, dok je kronični stres uzrokovao statistički značajan porast TBARS-a od 425.53% u odnosu na kontrolnu skupinu M-K. U ženki (NE-OV-AS) akutni stres nije značajno utjecao na količinu TBARS-a, ali je kronični uzrokovao porast od 118.27% u odnosu na kontrolnu skupinu NE-OV-K. Kod ovarijektomiranih ženki (OV-AS) akutni stres izazvao je pad količine TBARS-a za 40.58% u odnosu na OV-K, dok je kronični stres izazvao statistički značajan porast od 17.34% kod skupine OV-KS u odnosu na OV-K. Razina LPO između M-AS, NE-OV-AS i OV-AS nije se značajno razlikovala, dok je kronični stres uzrokovao značajno povećanje količine TBARS u mužjaka M-KS, u odnosu na NE-OV-KS i OV-KS. Ovarijektomija je uzrokovala povećanje TBARS u kontrolnoj skupini OV-K u odnosu na ostale kontrolne skupine, M-K i NE-OV-K.



Slika 4. Količina TBARS-a u mišićima nuhalne regije štakora (mužjaka – plavi stupići, neovarijektomiranih ženki – ružičasti stupići i ovarijektomiranih ženki – ljubičasti stupići) pod utjecajem akutnog i kroničnog stresa. M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izloženih akutnom stresu: M-KS: skupina mužjaka izloženih kroničnom stresu; NE-OV-K: kontrolna skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-AS: skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-KS: skupina ženki izloženih kroničnom stresu; OV-K: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-AS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-KS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.2. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na omjer reduciranog i oksidiranog glutationa

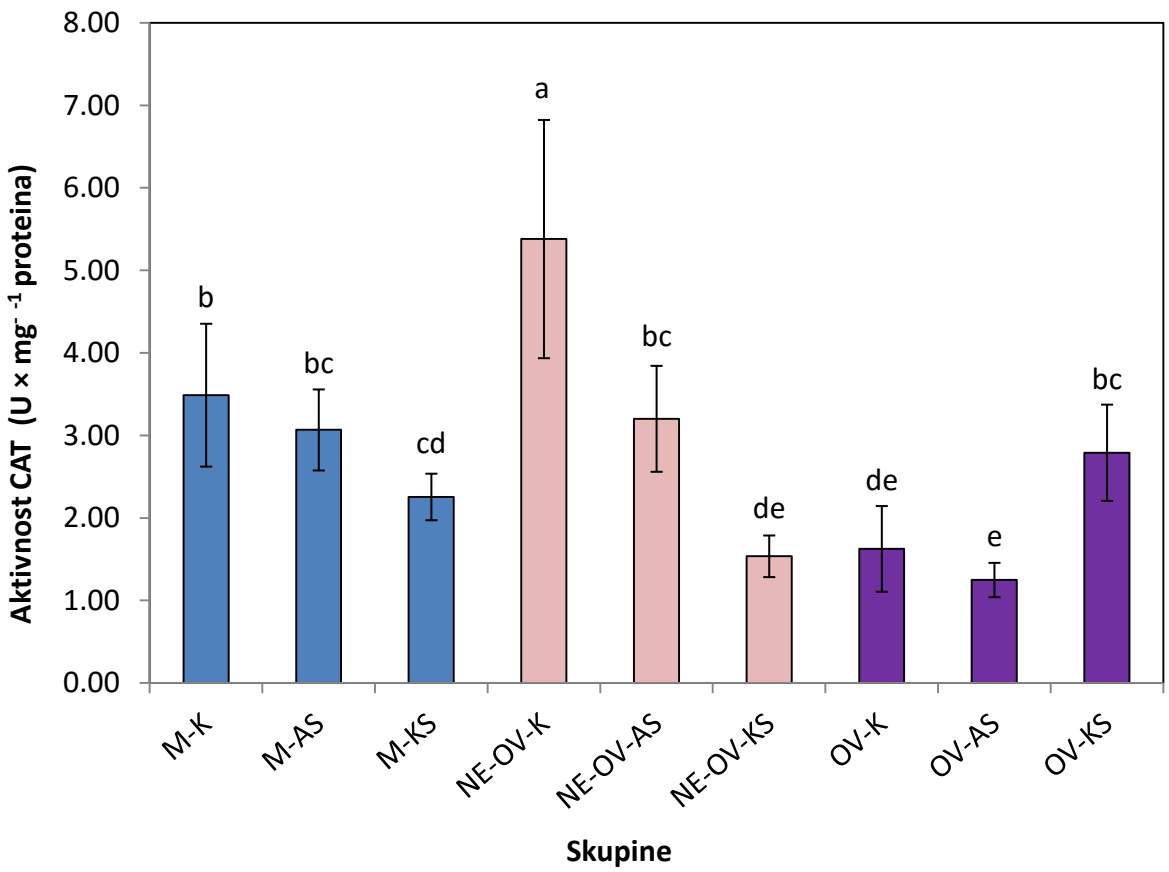
Akutni i kronični stres u mužjaka (M-AS i M-KS) znatno utječu na omjer GSH i GSSG kao pokazatelja antioksidativnog statusa. U skupini mužjaka M-AS došlo je do statistički značajnog smanjenja GSH/GSSG za 60.29% u odnosu na kontrolu M-K, a kod skupine mužjaka M-KS došlo je do smanjenja od 91.98% u odnosu na skupinu M-K. U ženki (NE-OV-AS) je izlaganje akutnom stresu rezultiralo smanjenjem GSH/GSSG za 71.40%, dok je izlaganje kroničnom stresu kod skupine NE-OV-KS uzrokovalo smanjenje GSH/GSSG za 80.58% u odnosu na kontrolnu skupinu NE-OV-K. Kod ovarijektomirane skupine ženki nije bilo statistički značajne razlike između skupina OV-AS, OV-KS i OV-K. Između akutnih skupina M-AS, NE-OV-AS i OV-AS također nije bilo značajne razlike, kao niti između kroničnih skupina M-KS, NE-OV-KS i OV-KS. Ovarijektomija je uzrokovala smanjenje GSH/GSSG u kontrolnoj skupini OV-K u odnosu na ostale kontrolne skupine, M-K i NE-OV-K.



Slika 5. Omjer GSH i GSSG u mišićima nuhalne regije štakora (mužjaka – plavi stupići, neovarijektomiranih ženki – ružičasti stupići i ovarijektomiranih ženki – ljubičasti stupići) pod utjecajem akutnog i kroničnog stresa. M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izloženih akutnom stresu: M-KS: skupina mužjaka izloženih kroničnom stresu; NE-OV-K: kontrolna skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-AS: skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-KS: skupina ženki izloženih kroničnom stresu; OV-K: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-AS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-KS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.3. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost katalaze

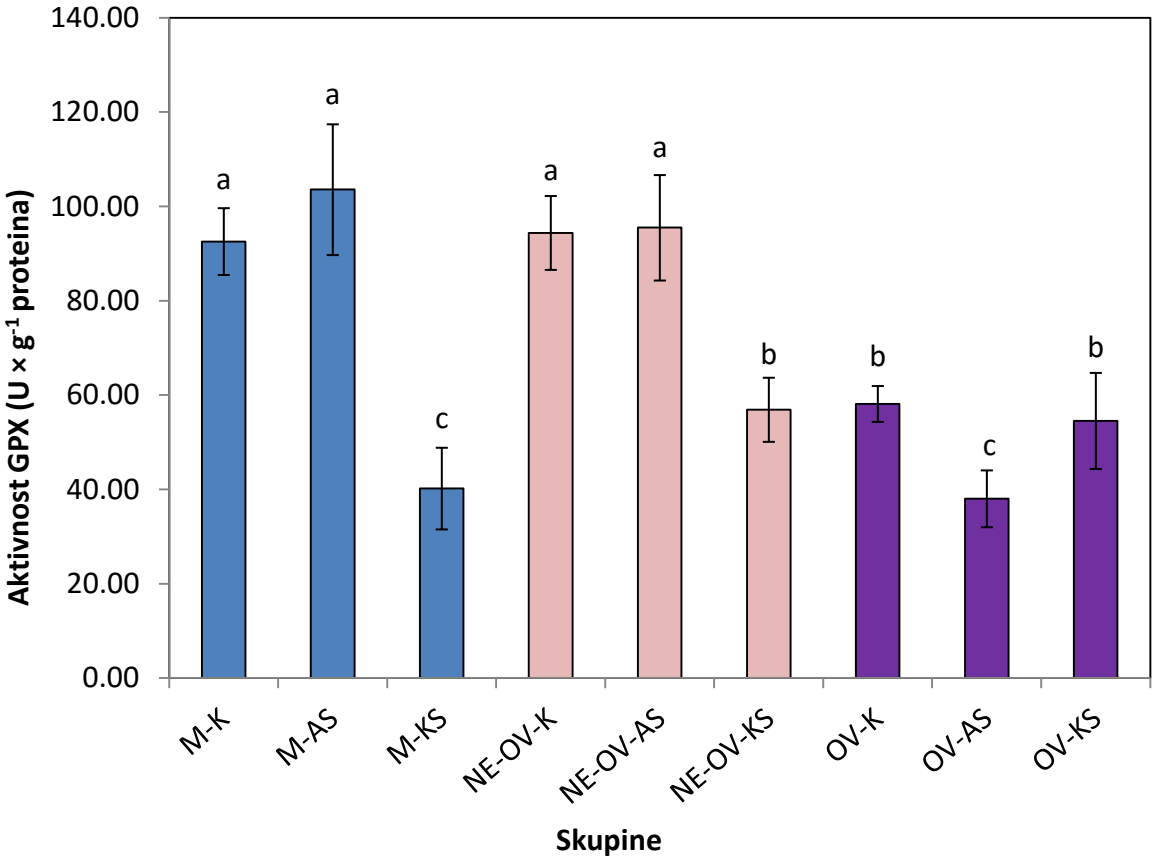
Kronični stres u skupini M-KS utjecao je na smanjenje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu skupinu M-K za 35.35%, dok akutni stres nije značajno utjecao na aktivnost CAT u skupini M-AS u odnosu na skupinu M-K. Kod ženki (NE-OV-AS) akutni stres uzrokovao je smanjenje aktivnosti CAT za 40.49% u odnosu na kontrolu NE-OV-K, dok je kronični stres u skupini NE-OV-KS izazvao smanjenje za 71.44% u odnosu na NE-OV-K. Kod ovarijektomiranih ženki podvrgnutim kroničnom stresu (OV-KS) došlo je do povećanja aktivnosti za 41.73% u odnosu na kontrolnu skupinu OV-K, dok akutni stres nije značajno utjecao na aktivnost CAT. Statistički značajna razlika nije utvrđena između mužjaka i ženki podvrgnutih akutnom stresu (M-AS, NE-OV-AS), kao niti između mužjaka i ženki podvrgnutih kroničnom stresu (M-KS, NE-OV-KS), te između skupine M-KS mužjaka i skupine OV-KS. Ovarijektomija je uzrokovala značajno smanjenje aktivnosti CAT u kontrolnoj skupini OV-K u odnosu na ostale kontrolne skupine, M-K i NE-OV-K. Jednako tako, ovarijektomija je uzrokovala značajno smanjenje aktivnosti CAT kod skupine OV-AS u odnosu na M-AS i NE-OV-AS.



Slika 6. Aktivnost CAT u mišićima nuhalne regije štakora (mužjaka – plavi stupići, neovarijektomiranih ženki – ružičasti stupići i ovarijektomiranih ženki – ljubičasti stupići) pod utjecajem akutnog i kroničnog stresa. M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izloženih akutnom stresu: M-KS: skupina mužjaka izloženih kroničnom stresu; NE-OV-K: kontrolna skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-AS: skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-KS: skupina ženki izloženih kroničnom stresu; OV-K: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-AS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-KS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.4. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutation-peroksidaze

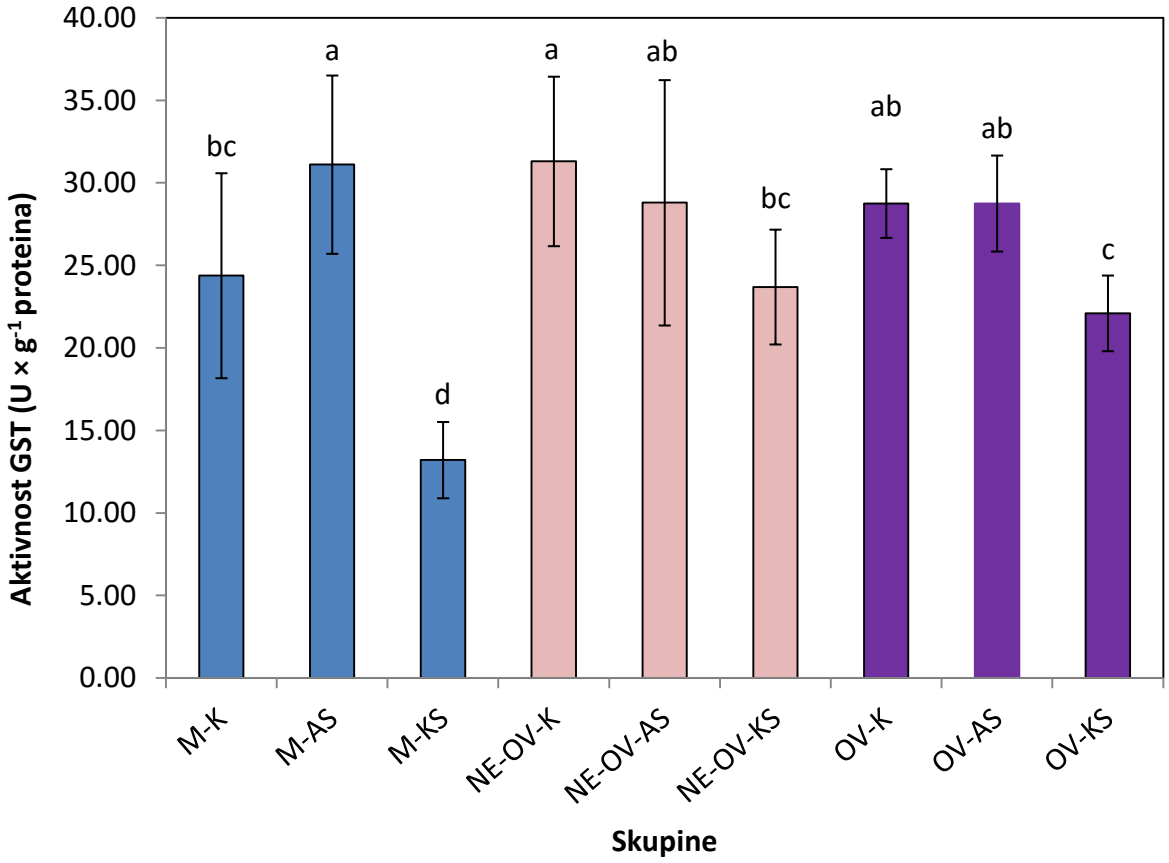
Kronični stres znatno je reducirao aktivnost GPX u skupini mužjaka (M-KS u odnosu na odgovarajuću kontrolu). Aktivnost GPX skupine M-KS manja je za 56.58% u odnosu na skupinu M-K. Akutni stres nije značajno utjecao na aktivnost GPX kod skupine M-AS u odnosu na kontrolu M-K. Kod ženki je također zamijećeno smanjenje aktivnosti GPX kod skupine NE-OV-KS uslijed kroničnog stresa za 39.72% u odnosu na kontrolnu skupinu (NE-OV-K), dok akutni stres nije utjecao značajno na aktivnost GPX kod skupine NE-OV-AS u odnosu na kontrolu. U ovarijektomiranih ženki (OV-AS) akutni stres uzrokovao je smanjenje aktivnosti GPX od 34.59% u odnosu na skupinu OV-K, dok kronični stres nije uzrokovao statistički značajne promjene. Između akutne skupine mužjaka i ženki (M-AS i NE-OV-AS), te NE-OV-KS i OV-KS nije bilo značajne razlike. Ovarijektomija je uzrokovala značajno smanjenje aktivnosti GPX u kontrolnoj skupini OV-K u odnosu na ostale kontrolne skupine, M-K i NE-OV-K. Jednako tako, ovarijektomija je uzrokovala značajno smanjenje aktivnosti GPX kod skupine OV-AS u odnosu na M-AS i NE-OV-AS.



Slika 7. Aktivnost GPX u mišićima nuhalne regije štakora (mužjaka – plavi stupići, neovarijektomiranih ženki – ružičasti stupići i ovarijektomiranih ženki – ljubičasti stupići) pod utjecajem akutnog i kroničnog stresa. M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izloženih akutnom stresu: M-KS: skupina mužjaka izloženih kroničnom stresu; NE-OV-K: kontrolna skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-AS: skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-KS: skupina ženki izloženih kroničnom stresu; OV-K: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-AS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-KS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.5. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutation-S-transferaze

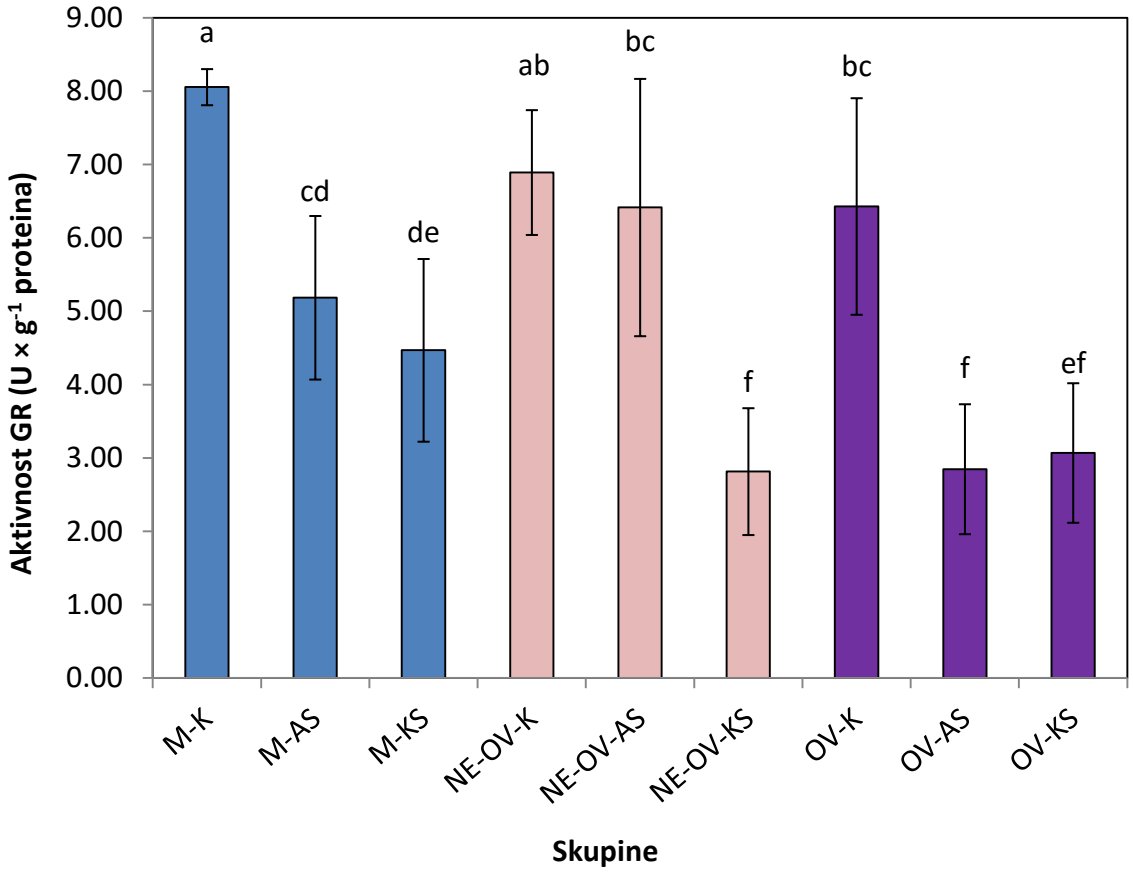
Akutni stres u skupini mužjaka (M-AS) izazvao je povećanje aktivnosti GST za 21.63% u odnosu na kontrolnu skupinu M-K, dok je kronični stres uzrokovao smanjenje aktivnosti GST u skupini M-KS za 45.83% u odnosu na kontrolu M-K. U ženki (NE-OV-AS) akutni stres nije značajno utjecao na aktivnost GST, dok je kronični stres u skupini NE-OV-KS uzrokovao smanjenje aktivnosti za 24.32% u odnosu na kontrolu NE-OV-K. U ovarijektomiranih ženki (OV-AS) akutni stres također nije značajno utjecao na aktivnost GST, a kronični je stres uzrokovao smanjenje aktivnosti u skupini OV-KS za 23.14%. Statistički značajna razlika u aktivnosti GST-a nije utvrđena između skupina M-AS, NE-OV-AS i OV-AS, te između skupina NE-OV-KS i OV-KS, dok je kod skupine M-KS kronični stres značajno smanjio aktivnost GST-a u odnosu na ženke (NE-OV-KS i OV-KS). Ovarijektomija nije uzrokovala značajno smanjenje aktivnosti GST u kontrolnoj skupini OV-K u odnosu na ostale kontrolne skupine, M-K i NE-OV-K.



Slika 8. Aktivnost GST u mišićima nuhalne regije štakora (mužjaka – plavi stupići, neovarijektomiranih ženki – ružičasti stupići i ovarijektomiranih ženki – ljubičasti stupići) pod utjecajem akutnog i kroničnog stresa. M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izloženih akutnom stresu: M-KS: skupina mužjaka izloženih kroničnom stresu; NE-OV-K: kontrolna skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-AS: skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-KS: skupina ženki izloženih kroničnom stresu; OV-K: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-AS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-KS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.6. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutation-reduktaze

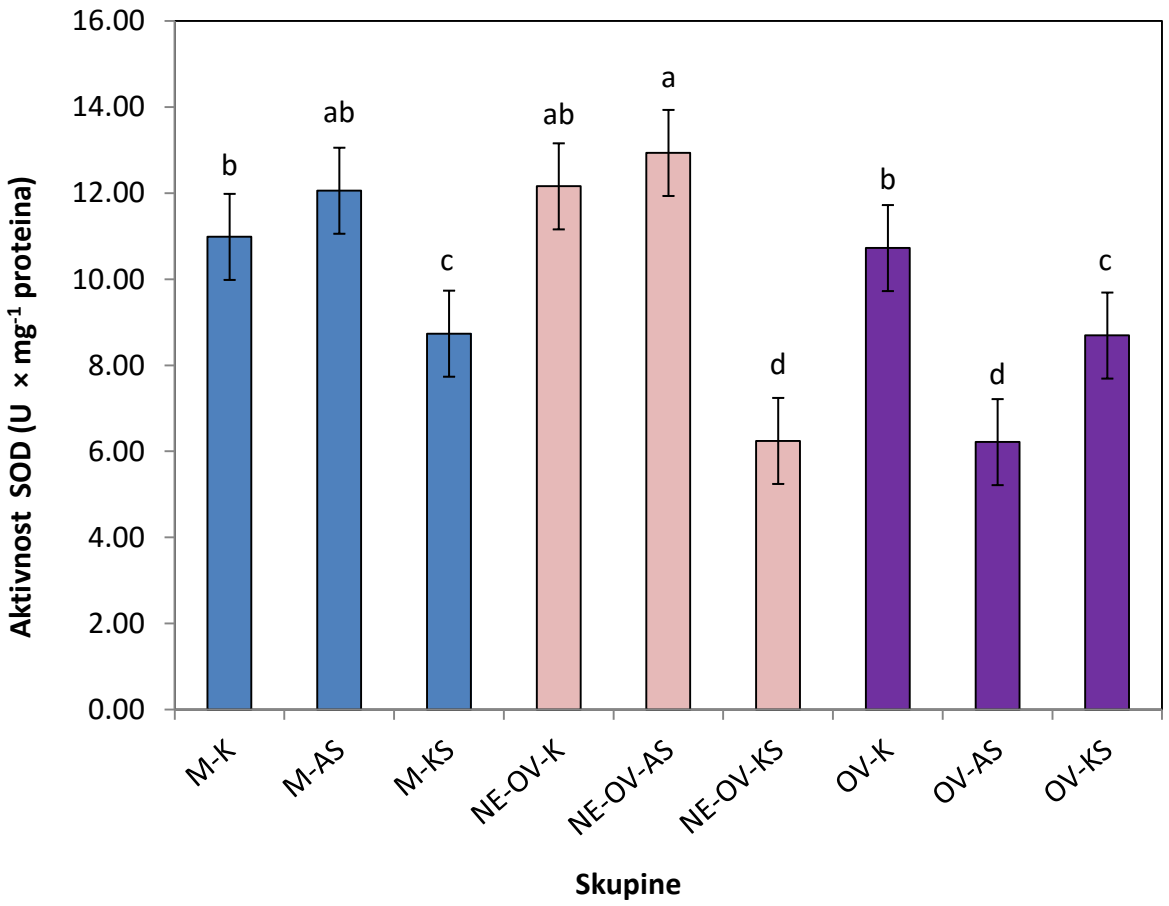
Akutni i kronični stres u skupinama mužjaka (M-AS i M-KS) izazvali su smanjenje aktivnosti GR-a. Akutni stres smanjio je aktivnost GR-a za 35.64%, u skupini M-AS dok je kod skupine M-KS smanjenje još značajnije te iznosi 44.53% u odnosu na kontrolu M-K. U ženki (NE-OV-KS) je kronični stres značajno utjecao na aktivnost GR-a smanjivši je za 59.15% u odnosu na kontrolu NE-OV-K, dok akutni stres nije značajno utjecao na aktivnost GR-a kod NE-OV-AS u odnosu na kontrolu NE-OV-K. U ovarijektomiranih ženki (OV-AS i OV-KS) i akutni i kronični stres uzrokovali su značajno smanjenje aktivnosti GR-a. Kod skupine OV-AS aktivnost je manja za 55.71%, a kod skupine OV-KS za 52.27% u odnosu na kontrolnu skupinu OV-K. Između skupina M-AS i NE-OV-AS nije bilo značajne razlike, kao ni između skupine M-KS i OV-KS. Ovarijektomija nije uzrokovala promjene u aktivnosti GR-a skupini OV-K u odnosu na skupinu NE-OV-K, ali je smanjila aktivnosti GR-a kod akutno tretiranih štakora, u odnosu na akutno tretirane ženke.



Slika 9. Aktivnost GR u mišićima nuhalne regije štakora (mužjaka – plavi stupići, neovarijektomiranih ženki – ružičasti stupići i ovarijektomiranih ženki – ljubičasti stupići) pod utjecajem akutnog i kroničnog stresa. M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izloženih akutnom stresu: M-KS: skupina mužjaka izloženih kroničnom stresu; NE-OV-K: kontrolna skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-AS: skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-KS: skupina ženki izloženih kroničnom stresu; OV-K: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-AS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-KS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.7. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost superoksid-dismutaze

U mužjaka izloženih akutnom stresu (M-AS) nije došlo do značajne promjene aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu M-K, dok je kod mužjaka izloženih kroničnom stresu (M-KS) zabilježen pad aktivnosti od 20.47% u odnosu na kontrolu. Kod ženki također nije bilo značajne razlike između NE-OV-AS i skupine NE-OV-K, dok je kod skupine NE-OV-AS zabilježen znatan pad aktivnosti SOD-a za 48.65%. U ovarijektomiranih ženki (OV-AS) akutni stres izazivao je pad aktivnosti od 42.05%, a kronični stres kod skupine OV-KS pad od 18.96% u odnosu na skupinu OV-K. Između skupina M-AS i NE-OV-AS te skupina M-KS i OV-KS i nije bilo značajne razlike. Ovarijektomija nije uzrokovala promjene u aktivnosti SOD-a skupini OV-K u odnosu na ostale kontrolne skupine, M-K i NE-OV-K, ali je smanjila aktivnosti SOD-a kod akutno tretiranih štakora, u odnosu na akutno tretirane mužjake i ženke.



Slika 10. Aktivnost SOD u mišićima nuhalne regije štakora (mužjaka – plavi stupići, neovarijektomiranih ženki – ružičasti stupići i ovarijektomiranih ženki – ljubičasti stupići) pod utjecajem akutnog i kroničnog stresa. M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izloženih akutnom stresu: M-KS: skupina mužjaka izloženih kroničnom stresu; NE-OV-K: kontrolna skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-AS: skupina ženki izloženih akutnom stresu; NE-OV-KS: skupina ženki izloženih kroničnom stresu; OV-K: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-AS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih akutnom stresu; OV-KS: skupina ovarijektomiranih ženki izloženih kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

4. RASPRAVA

Oksidativni stres označava poremećaj u ravnoteži između stvaranja ROS-a i antioksidativne obrane (Betteridge, 2000). ROS se održavaju pri optimalnim razinama uz pomoć antioksidativnog obrambenog sustava, koji uključuju široki spektar antioksidativnih enzima (Djordjevic i sur., 2010). Ukoliko je održavanje ravnoteže između proizvodnje oksidanasa i njihovog uklanjanja narušeno, jedna od posljedica je LPO, odnosno direktno oštećenje lipida (Ayala i sur., 2014). Jedno od glavnih mjesta proizvodnje ROS-a su mitohondriji, a tkiva koja ujedno sadrže najviše mitohondrija su mozak i mišići (Hütter i sur., 2007). Uloga oksidativnog stresa na mišićnu homeostazu je prilično složena. Visoke razine slobodnih radikala oštećuju stanične dijelove, dok niske do umjerene razine slobodnih radikala igraju višestruke regulatorne uloge, poput kontrole genske ekspresije, regulacije staničnih signalizirajućih puteva i modulacije proizvodnje sile u skeletnom mišiću (Reid, 2001). Poznato je da intenzivno vježbanje dovodi do značajnog porasta proizvodnje ROS-a, što može utjecati negativno na kontrakciju mišića i rezultirati umorom mišića (Barclay i Hansel, 1991). Osim vježbanja i drugi čimbenici mogu utjecati na proizvodnju ROS-a u skeletnom mišiću. Starenje povećava opterećenje oksidansima kojima su prije svega izloženi mišići. Mišićne ozljede, tijekom reperfuzije ili istezanja, također rezultiraju povećanim oksidativnim stresom koji može dovesti do gubitka funkcije samog mišića. Mišići mogu osjetiti povećani oksidativni stres tijekom upalnih procesa, primjerice hipertiroidne miopatije, sepse, maligne hipertermije ili srčanog zastoja (Reid, 2001). Produkti LPO, dobar su pokazatelj pretrpljenog oštećenja. U istraživanju Ingrama i sur. (2012) ustanovljeno je da je LPO u skeletnim mišićima odnosno produkt LPO, 4-HNE, povišen u pacijenata s dijabetesom tipa 2, što upućuje na to da bi LPO mogla biti uključena u razvoj inzulinske otpornosti.

Kronični stres je uzrokovao povećanje količine TBARS-a u mišićima nuhalne regije mužjaka, ženki i ovarijektomiranih ženki štakora (Slika 4). Povećane količine TBARS-a, odnosno razine LPO posljedica su prevelikog stvaranja slobodnih radikala i nedovoljne aktivnosti antioksidativnog sustava obrane, što je vidljivo i iz rezultata mjerenja GSH i aktivnosti antioksidativnih enzima (Slika 5-10). Jedan od stresora uključenih u kronično izazivanje stresa bilo je i prisilno plivanje, koje se u istraživanju Nayanatara i sur. (2005) pokazalo kao čimbenik koji povećava razinu LPO u jetri, hipotalamusu, nadbubrežnim žlijezdama i različitim dijelovima mozga u mužjaka. Povećanje razine LPO u ženki i ovarijektomiranih

ženki pokazuje sličnost s rezultatima istraživanja koja su proveli Brkić i sur. (2010), u kojima je ispitivana LPO u žena dobi 15-45 godina, sa sindromom kroničnog umora, gdje je također došlo do značajnog povećanja LPO. Najznačajnije povećanje razine LPO zabilježeno je u mužjaka (M-KS), gdje je došlo do značajnog povećanja od 425% u odnosu na kontrolnu skupinu. Marotti i sur. (2010) su ustanovili da je u mozgu miševa znatno veća razina LPO u kronično stresiranih mužjaka, te znatno manje aktivnosti nekih enzima, što upućuje na veću osjetljivost mužjaka u odnosu na ženke. Potencijalni razlozi mogu ležati u spolnom dimorfizmu prilikom aktivacije hipotalamus-hipofiza, utjecaju spolnih hormona, te indukciji LPO putem NO sustava koja je veća u mužjaka nego u ženki (Marotti i sur., 2010). Poznato je da mitohondriji sadrže estrogenske receptore, a sami estrogeni mogu kontrolirati kalcijem inducirano curenje citokroma C iz srčanih mitohondrija, što ukazuje na zaštitnu funkciju estrogena (Morkuniene i sur., 2002). Estrogeni također, reguliraju sintezu antioksidativnih enzima poput GPX-a i SOD-a (Borrás i sur., 2003), što ukazuje na činjenicu da su žene u boljem položaju u borbi protiv oksidativnog stresa u odnosu na muškarace, sve do perioda menopauze kada počinju gubiti estrogene. Većina istraživanja kroničnih stanja, bolesti i poremećaja su pokazala kako u tim stanjima dolazi do povećanja LPO (Chauhan i sur, 2004; Dachanidze i sur, 2013). U kontrolnoj skupini OV-K, količina TBARS-a bila je značajno veća u odnosu na ostale kontrolne skupine (M-K i NE-OV-K), što upućuje na to da je sama ovarijektomija uzrokovala povećanje LPO. Istraživanjem utjecaja ovarijektomije i estrogena na ishemijsko reperfuzijske ozljede mišića, pokazalo se da je sadržaj TBARS-a znatno veći u ovarijektomiranoj skupini s placebo tretmanom, dok je kod ovarijektomiranih ženki tretiranih estrogenom LPO bila znatno manja nego u kontrolnoj skupini, što upućuje na antioksidativna svojstva estrogena (Stupka i Tiidus, 2001).

Za razliku od kroničnog stresa, akutni stres nije značajno utjecao na razinu LPO, osim u skupini ovarijektomiranih ženki gdje je čak došlo do smanjenja količine TBARS-a, što bi moglo upućivati na adaptacijske mehanizme. U istraživanju Kovacs-a i sur. (1996), akutni stres također nije uzrokovao značajne promjene LPO u mišićnom tkivu srca i želuca. Nasuprot tome Bachur i sur. (2005) su prilikom istraživanja utjecaja akutne fizičke aktivnosti na skeletne mišiće mužjaka miševa ustanovili da dolazi do značajnog povećanja MDA, indikatora LPO u skupinama s dužim trajanjem i intenzitetom vježbi.

Kao ne-enzimski pokazatelj oksidativnog statusa mišićnog tkiva mjeren je omjer GSH/GSSG (Slika 5). To je jedan od najčešćih markera stanične redoks ravnoteže. Ova analiza korisna je, jer povećano stvaranje oksidansa rezultira smanjenjem omjera GSH/GSSG (Halliwell i

Gutteridge, 2007). U našem istraživanju, i akutni i kronični stres su značajno smanjili omjer GSH/GSSG i kod mužjaka i kod ženki štakora (M-AS, M-KS, NE-OV-AS, NE-OV-KS). Međutim, omjer GSH/GSSG nije bio smanjen kod ovarijetomiranih ženki (OV-AS i OV-KS) u odnosu na kontrolnu skupinu, iako je omjer GSH/GSSG bio jako nizak (<5) te se nije značajno razlikovao od omjera GSH/GSSG u kronično i akutno stresiranim skupinama mužjaka i ženki (M-AS, NE-OV-AS, M-KS, NE-OV-KS). Ovarijektomija je uzrokovala smanjenje GSH/GSSG u kontrolnoj skupini OV-K u odnosu na ostale kontrolne skupine (M-K i NE-OV-K), Stoga, nepostojanje razlika u omjeru GSH/GSSG između ovarijektomiranih skupina moglo bi se pripisati i nedovoljnoj osjetljivošću eseja za određivanje sadržaja GSH. Utjecaj ovarijektomije na omjer GSH/GSSG u našem istraživanju je u skladu s podacima koje su dobili Rodrigues i sur. (2013), koji su istraživali utjecaj ovarijektomije i treninga otpornosti na jetru štakora, gdje je došlo do značajnog smanjenja GSH/GSSH omjera u ovarijektomiranih ženki. Najveće smanjenje omjera GSH/GSSH zabilježeno je kod kroničnog stresa mužjaka i ženki (M-KS i NE-OV-KS), što je u skladu s očekivanim, obzirom da je funkcija GSH suprostavljati se povećanoj LPO, koja je i bila najveća u upravo tim skupinama.

Proučavajući aktivnosti antioksidativnih enzima uočili smo pad aktivnosti većine antioksidativnih enzima uz poneke izuzetke, o kojima ćemo raspraviti, što je u skladu sa povećanim vrijednostima LPO. Prilikom istraživanja koncentracije i aktivnosti antioksidativnih enzima, ne smije se zanemariti ni činjenica, da razine koncentracija enzima često ovise i o tipu mišićnih vlakana, npr. nisko oksidativna ili visoko oksidativna vlakna (Powers i Jackson 2008).

Kronični je stres uzrokovao smanjenje aktivnosti CAT u mišićima mužjaka i ženki štakora (M-KS, NE-OV-KS), dok je kod ovarijektomiranih ženki uzrokovao povećanje aktivnosti CAT (Slika 6). Sama ovarijektomija je uzrokovala značajno smanjenje aktivnosti CAT u kontrolnoj skupini OV-K u odnosu na ostale kontrolne skupine, M-K i NE-OV-K. U istraživanju Monteiroa i sur. (2005), koji su proučavali utjecaj ovarijektomije na promjene u hipokampusu, ustanovljeno je da je ovarijektomija utjecala na porast aktivnosti CAT, dok su aktivnosti SOD-a i GPX-a ostali nepromijenjeni, što se može objasniti enzimskom adaptacijom na povećano stvaranje slobodnih radikala. Akutni stres nije uzrokovao značajne promjena u aktivnosti CAT, osim u skupini NE-OV-AS gdje je došlo do pada aktivnosti CAT. Količine CAT najveće su u visoko oksidativnim mišićnim vlaknima, a najniže u vlaknima s niskim oksidativnim kapacitetom (Powers i sur., 1994). Istraživanjem utjecaja kronične fizičke aktivnosti na aktivnost CAT zabilježeni su dosta kontradiktorni rezultati kao što su:

povećanje aktivnosti (Vincent i sur., 2000), smanjenje aktivnosti CAT (Laughlin i sur., 1990: Leeuwenburgh i sur., 1994), bez promjene aktivnosti (Powers i sur., 1994). Dvosmislenost rezultata može biti posljedica različitih faktora, pa i samog eseja mjerenja aktivnosti katalaze. Primjerice, eseji za mjerenje aktivnosti najčešće podrazumijevaju dodatak supstrata (npr. H_2O_2), a degradacija H_2O_2 mjeri se spektrofotometrijski. V_{max} katalaze povećava se kao funkcija ovisna o koncentraciji H_2O_2 prisutnog u mediju. Neodgovarajuće standardiziranje uvjeta testa može pridonijeti velikim varijacijama CAT aktivnosti između različitih istraživanja (Powers i Jackson, 2008).

Kronični stres znatno je reducirao aktivnosti GPX-a i SOD-a, i kod mužjaka i kod ženki (M-KS i NE-OV-KS), dok kod akutno stresiranih mužjaka i ženki nije došlo do promjene aktivnosti GPX-a i SOD-a u odnosu odgovarajuće kontrole (Slika 7 i 10). Za razliku od mužjaka i ženki koji pokazuju sličan odgovor u aktivnostima ovih enzima na kronični i akutni stres, ovarijektomirane ženke sasvim drugačije reagiraju na navedene stresove. Kronični stres kod ovarijektomiranih ženki nije uzrokovao promjene u aktivnosti GPX-a (ali je smanjio aktivnost SOD-a), dok je akutni stres smanjio aktivnosti ova dva navedena enzima, u odnosu na kontrolu OV-K. Osim toga, sama ovarijektomija je uzrokovala značajno smanjenje aktivnosti GPX-a u kontrolnoj skupini OV-K u odnosu na ostale kontrolne skupine mužjaka i ženki. SOD aktivnost u skeletnim mišićim nije konstantna i može biti modificirana različitim obrascima aktivnosti. Iako prema nekim istraživanjima kronični stres izdržljivosti ne dovodi do povećanja aktivnosti SOD-a u mišiću (Lambertucci i sur., 2007), većina istraživanja su pokazala kako trening izdržljivosti promovira povećanje aktivnosti SOD-a u treniranim mišićima (Lawler i sur., 2006). Prilikom komentiranja i uspoređivanja različitih rezultata istraživanja, uključujući i naše, treba uzeti u obzir razlike u provođenju treninga izdržljivosti, te razlike u tipovima mišićnih vlakana proučavanih mišića. Identično kao i kod SOD-a, prisutnost GPX-a ovisi o tipu mišićnih vlakana, a najveće aktivnosti sadržavaju visoko oksidativna vlakna tipa I (Powers i sur., 1994). Mnoga istraživanja potvrđuju da trening izdržljivosti povećava aktivnost GPX-a (Lambertucci i sur., 2007), pogotovo u dužim intervalima. Ako na trening izdržljivosti gledamo kao na kronični stres, naši rezultati nisu u skladu s ovima, već su naši rezultati posljedica kombinacije različitih stresora, a ne samo prisilnog plivanja koji je tipični test izdržljivosti. Zanimljiva je pojava da je akutni stres, u našem istraživanju, izazvao veći pad aktivnosti GPX-a i SOD-a u odnosu na kronični stres u ovarijektomiranih ženki, što se može protumačiti na način da češće izlaganje stresorima dovodi do adaptacije. Proučavanjem utjecaja ovarijektomije na mišiće mjehura otkriveno je

da dolazi do povećanja aktivnosti SOD-a, dok je tretman estradiolom uzrokovao znatno smanjenje SOD-a. Ovi podaci ukazuju da ovarijektomija inducira proizvodnju ROS-a što je vidljivo kroz povećanje aktivnosti SOD-a, dok estradiol ukazuje na zaštitnički, antioksidativan učinak jer snižava razine SOD-a (Onal i sur., 2007).

Kronični stres izazvao je pad aktivnosti GST-a u svim skupinama (M-KS, NE-OV-KS i OV-KS), dok je akutni stres izazvao porast aktivnosti samo kod mužjaka (M-AS), a na ostale skupine nije značajno utjecao (Slika 8). U istraživanju utjecaja kroničnog stresa stješnjavanjem, na ekspresiju gena GST u hipokampusu, ustanovljeno je da dolazi do značajnog pada ekspresije gena GST i još mnogih drugih gena (Ejchel-Cohen i sur., 2006). Hambali i sur. (1995) istraživali su utjecaj ovarijektomije i nadomjestka spolnih hormona u hepatokarcinogenezi, te su utvrdili da kontrolne skupine (bez kancerogena) podvrgnute ovarijektomiji imaju znatno veće razine GST-a i GR-a, a skupine tretirane kancerogena niže, te da estrogen ili progesteron vraćaju vrijednosti na razine intaktnih ženki. Istraživanjem utjecaja farmakološke inhbicije GST-a, ustanovljeno je da inhibicija GST-a dovodi do povećane aktivacije MAP kinaza, što za posljedicu ima povećanu apoptozu u srčanim mišićnim stanicama, induciranu stresom. Sama inaktivacija GST-a može dovesti do oksidativnog oštećenja nestresiranih stanica zbog spriječene eliminacije toksičnog sadržaja (Röth i sur., 2011).

Aktivnost GR-a smanjila se pod utjecajem kroničnog stresa, dok je akutni stres također utjecao na smanjenje aktivnosti GR-a, osim u skupini ženki NE-OV-AS gdje nije bilo promjene (Slika 9). Kako je uloga GR redukcija GSSG u GSH oblik, a uzimajući u obzir prilično smanjenje razine omjera GSH/GSSH, što ukazuje na povećani stres i povećano stvaranje GSSG, jasno je da je aktivnost GR niža. U istraživanju utjecaja kroničnog stresa, u obliku društvene izolacije, na antioksidativni status jetre, također je zamijećeno smanjenje aktivnosti GR-a. Smanjena aktivnost GR-a može biti direktna posljedica smanjene glukoze u krvi budući da glukoza pokreće metabolizam i utječe na proizvodnju supstrata GR-a, primjerice NADPH i GSH (Djordjevic i sur), te je stoga mjerenje glukoze u krvi koristan parametar. Istraživanjem promjene aktivnosti GR-a pod utjecajem kroničnog stresa ustanovljeno je da dolazi do smanjenja aktivnosti u mišićnom tkivu sternohioidnog mišića (Williams i sur., 2015), dok je istraživanjem akutnog stresa na distrofičnim mišićima miševa utvrđeno da je unatoč sniženom ukupnom glutationu aktivnost GR-a povišena, što ukazuje na pokušaj kompenziranja uslijed povećanog oksidativnog stresa kroz povećanu indukciju sinteze antioksidativnih enzima (Dudley i sur., 2006).

Značajno povećanje LPO, smanjenje omjera GSH/GSSG, te smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima (CAT, GPX, SOD, GST, GR) prilikom kroničnog stresa, te smanjenje aktivnosti enzima u nekih skupina tijekom akutnog stresa, ukazuje na narušavanje antioksidativnog statusa, što za posljedicu ima smanjenu otpornost na oksidativni stres koji se reflektira u obliku oksidativnih oštećenja mišićnog tkiva i druge posljedice. LPO vodi ka disfunkciji, oštećenju i brojnim patološkim stanjima, a produkti LPO uzrokuju promjene u staničnoj signalizaciji, oštećenju proteina i DNA, citotoksičnosti. Povećano stvaranje lipidnih peroksida i aldehida zapaženo je u Alzhaimerovoj bolesti, aterosklerozi, iskemijskoj-reperfuziji, srčanom zastoju, raku i drugim imunobiološkim poremećajima (Ramana i sur., 2013), stoga je neizostavno naglasiti ulogu antioksidativnog sustava. Ovo istraživanje pridonijelo je pojašnjenju utjecaja akutnog i kroničnog stresa na oksidativni i antioksidativni status mišića nuhalne regije koji su jedni od glavnih ekstenzora i rotatora glave i vrata. Ukoliko uzmemo u obzir način na koji su u našem eksperimentu stresirani štakori, primjerice stješnjavanje u metalne cijevi, neizostavno je da je došlo do povećanog stresa upravo u tim mišićima. Vratni mišići imaju veliku ulogu u normalnoj stabilnosti i mobilnosti kralježnice, a slabost i atrofija upravo tih mišića može biti jedan od glavnih okidača boli glave. U istraživanju Rezasoltani i sur. (2012) utvrđeno je da višesatno sjedenje, odnosno rad u uredu, što odgovara kroničnom stresu, utječe na atrofiju semispinalnog mišića glave, te da dovodi do samog skraćenja mišića u atrofijom zahvaćenim područjima, što je povezano s kroničnom boli u vratu. U pacijenata s bolovima u vratu, semispinalni vratni mišić pokazuje smanjenje aktivacije i manje definiranu aktivaciju, što je popraćeno s povećanom aktivnosti semispinalnog mišića glave (Schomacher i sur., 2012). Govoreći o glavoboljama, cervikogene glavobolje predstavljaju dugotrajne, kronične glavobolje koje se javljaju povremeno, a različite su jakosti i trajanja. One sačinjavaju 15-20% od svih ukupnih glavobolja (Haldeman i Dagenais, 2001), a jedni od mišića koji se smatraju potencijalnim uzročnicima su upravo mišići nuhalne regije. Osim toga, izrazito stresna stanja poput sepsi, uznapredovalog raka, traumatskih ozljeda, zahtijevaju znatno veće koncentracije aminokiselina iz mišića, što ukazuje na veliku važnost mišića u odgovoru na stresna stanja i održanju zdravlja (Biolo i sur., 2002). Odgovor antioksidativnog sustava je često spolno specifičan, no ovo je istraživanje pokazalo kako su mišići nuhalne regije i mužjaka i neovarijektomiranih ženki pokazivali vrlo sličan oksidativni i antioksidativni odgovor.

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI

1. Kronični stres je uzrokovao pojavu oksidativnog stresa u mišićima nuhalne regije mužjaka, ženki i ovarijektomiranih ženki štakora. Oksidativni stres je u ovom radu karakteriziran povećanjem LPO u mišićima i smanjenjem antioksidativnog obrambenog mehanizma, koji obuhvaća smanjenje omjera GSH/GSSG i aktivnosti većine antioksidativnih enzima.

2. Akutni stres u pravilu nije uzrokovao pojavu oksidativnog stresa kod mužjaka i ženki, osim što je smanjio omjer GSH/GSSG, dok s druge strane nije značajno utjecao na promjene aktivnosti većine antioksidativnih enzima (CAT, GPX, GST, SOD, GR).

3. Oksidativni i antioksidativni odgovor na kronični i akutni stres, u mišićima nuhalne regije kod mužjaka i ženki, je u većini mjerenih pokazatelja dosta sličan, dok se kod ovarijektomiranih ženki razlikuje u odnosu na mužjake i ženke.

4. Ovarijektomija, odnosno manjak estrogena u mišićima nuhalne regije ženki, uzrokuje pojavu oksidativnog stresa, odnosno povećanje LPO i smanjenje omjera GSH/GSSG i aktivnosti nekih antioksidativnih enzima (CAT i GPX).

5. Kronični stres značajno više u odnosu na akutni stres narušava antioksidativnu zaštitu, što rezultira povećanom LPO koja za posljedicu može imati oštećenje tkiva, te razvoj različitih bolesti. Oksidativni stres može utjecati na kontrakciju mišića, gubitak mišićne funkcije, slabljenje mišića, mišićnu atrofiju, što u slučaju mišića nuhalne regije može utjecati na razvoj kronične boli u vratu i glavobolje.

6. LITERATURA

Abbey M, Owen A, Suzakawa M, Roach P, Nestel PJ. 1999. Effects of menopause and hormone replacement therapy on plasma lipids, lipoproteins and LDL-receptor activity. *Maturitas*. 33:259-269.

Abreu IA, Cabelli DE. 2010. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta.* 1804:263-274.

Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*. 105:121-126.

Akerboom TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*. 77:373-382.

Alessio HM, Goldfarb AH. 1988. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: Adaptive response to training. *J Appl Physiol*. 64:1333-1336.

Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Faivre B, Chastel O, Sorci G. 2007. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proc R Soc B*. 274:819-825.

Astrand PO, Rodah K. 2003. Textboox of work physiology: physiological bases of exercise. 4th ed. McGraw-Hill, Singapore, 656 pp.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 34 pp.

Bachur JA, Britto Garcia S, Vannucchi H, Jordao AA, Garcia Chiarello P, Zucolotoa S. 2007. Anti-oxidative systems in rat skeletal muscle after acute physical exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.* 32:190-196

Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, Lowe DA. 2010. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS One*. 13:5.

Barclay JK, Hansel M. 1991. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can J Physiol Pharmacol*. 69:279-284.

Beck-Peccoz P, Persani L. 2006. Premature ovarian failure. *Orphanet J Rare Dis*. 1:9.

Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*. 49:3-8.

Biolo G, Flemming RYD, Maggi SP, Nguyen TT, Herndon DN, Wolfe RR. 2002. Inverse regulation of protein turnover and amino acid transport in skeletal muscle of hypercatabolic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 87:3378-84.

Biolo G, Zhang XJ, Wolfe RR. 1995. Role of membrane transport in interorgan amino acid flow between muscle and small intestine. *Metabolism*. 44:719-724.

Blessing WW. 1997. The lower brainstem and bodily homeostasis. Oxford University press, New York, 575 pp.

Borrás C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J. 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med*. 34:546-552.

Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-254.

Brand MD. 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*. 45:466-472.

Brigelius-Flohé R, Maiorino M. 2013. Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830:3289-3303.

Brkić S, Tomić S, Marić D, Novakov Mikić A, Turkulov V. 2010. Lipid peroxidation is elevated in female patients with chronic fatigue syndrome. *Med Sci Monit*. 16:628-632.

Bruder-Nascimento T, Campos DHS, Alves C, Thomaz S, Cicogna AC, Cordellini S. 2013. Effects of chronic stress and high-fat diet on metabolic and nutritional parameters in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 57:642-649.

Cadenas E, Davies KJ. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 29:222-30.

Callister RJ, Brichta AM, Peterson EH. 1987. Quantitative analysis of cervical musculature in rats: histochemical composition and motor pool organization II. Deep dorsal muscles. *J Comp Neurol.* 255:369-385.

Carlson N. 2013. Physiology of Behavior. 11th ed. Pearson, Boston, 602-606 pp.

Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB, Thomas JA. 1994. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys*. 310:273-281.

Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ. 2006. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep*. 7:271-275.

Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I. 2004. Oxidative stress in autism: increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin-the antioxidant proteins. *Life Sci*. 75:2539-2549.

Chelikani P, Fita I, Loewen PC. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*. 61:192-208.

Chiang HS, Maric M. 2011. Lysosomal thiol reductase negatively regulates autophagy by altering glutathione synthesis and oxidation. *Free Radical Biol Med*. 51:688-699.

Chrousos GP, Gold PW. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 267:1244-52.

Cooper AJL, Pinto JT, Callery PS. 2011. Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 7:891-910.

Cooper GM. 2000. The Cell: A Molecular Approach. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer, 668 pp.

Couto N, Schooling SR, Dutcher JR, Barber J. 2015. Proteome profiles of outer membrane vesicles and extracellular matrix of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Proteome Res*. 14:4207-4222.

Dachanidze N, Burjanadze G, Kuchukashvili Z, Menabde K, Koshoridze N. 2013. Lipid Peroxidation and Antioxidant System Activity Changes of Rat Blood and Cardiac Muscle Cells Under Chronic Stress. *Int J Biochem Bio*. 1:16-21.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 329:23-38.

Davies KJ. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*. 61:1-31.

Dear TN, Campbell K, Rabbitts TH. 1991. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry*. 30:10376-10382.

Deisseroth A, Dounce AL. 1970. Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev*. 50:319-375.

Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Niciforovic A, Radojcic MB. 2010. Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats. *Physiol Res*. 59:729-736.

Dolphin D, Poulson R, Avramović O. 1989. Glutathione: Chemical, biochemical, and medical aspects. John Wiley & Sons Inc, 105:121-126.

Doshi SB, Agarwal A. 2013. The role of oxidative stress in menopause. *J Midlife Health*. 4: 140-146.

Drenick EJ, Swendseid ME, Bland WH, Tuttle SG. 1964. Prolonged starvation as treatment for severe obesity. *J Appl Microbiol*. 87:100-105.

Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physol Rev*. 82:47-95.

Dudley RWR, Khairallah M, Mohammed S, Lands L, Des Rosiers C, Petrof BJ. 2006. Dynamic responses of the glutathione system to acute oxidative stress in dystrophic mouse (mdx) muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 291:704-710.

Eaton DL, Bammler TK. 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci*. 49:56-64.

Ehrenbrink G, Hakenhaar FS, Salomon TB, Petrucci AP, Sandri MR, Benfato MS. 2006. Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. *Exp Gerontol*. 41:368-371.

Ejchel-Cohen TF, Wood GE, Wang JF, Barlow K, Nobrega JN, McEwen SB, Young TL. 2006. Chronic restraint stress decreases the expression of glutathione S-transferase pi2 in the mouse hippocampus. *Brain Res*. 1090:156-62.

Epp O, Ladenstein R, Wendel A. 1983. The refined structure of the selenoenzyme glutathione. *Eur J Biochem.* 133:51-69.

Felig P, Owen OE, Wahren J. 1969. Amino acid metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest*. 48:584-94.

Felig P. 1973. The glucose-alanine cycle. *Metabolism*. 22: 179-188.

Fink G. 2000. Encyclopedia of Stress, Three-Volume Set. 1st ed. Academic Press, 2328 pp.

Flohé L, Otting F. 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*. 105:93-104.

Floyd RT, Thompson C. 2011. Manual of Structural Kinesiology. 18th ed. McGraw-Hill, 416 pp.

Foreman MD, Milisen K, Fulmer TT. 2010. Critical Care Nursing of Older Adults: Best Practices. 3rd ed. Springer Publishing Paperback, New York, 632 pp.

Fortin M, Videman T, Gibbons LE, Battie MC. 2014. Paraspinal muscle morphology and composition: a 15-yr longitudinal magnetic resonance imaging study. *Med Sci Sports Exerc* 46:893-890.

Fridowich I. 1998. Oxygen toxicity: Explanation. *J Exp Biol*. 201:1203-1209.

Frontera WR, Ochala J. 2014. Skeletal Muscle: a brief review of structure and function. *Calci Tissue Int.* 96:183-195.

George DL, Francke U. 1976. Gene dose effect: regional mapping of human glutathione reductase on chromosome 8. *Cytogenet Cell Genet*. 17:282-286.

Ghyselinck NB, Dufaure JP. 1990. A mouse cDNA sequence for epididymal androgen regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res*. 18:7144.

Glavin GB, Paré WP, Sandbak T, Bakke HK, Murison R. 1994. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev*. 18:223-249.

Goldstein DS. 2003. Catecholamines and stress. *Endocr Regul*. 37:69-80.

Gray H. 1918. Anatomy of the human body. Lewis WH (ed). 20th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1396 pp.

Guyton AC, Hall JE. 2003. Medicinska fiziologija. Taradi SK, Andreis I (eds). Deseto izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 1064 pp.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 249:7130-7139.

Haldeman S, Dagenais S. 2001. Cervicogenic headaches: a critical review. *Spine J*. 1:31-46.

Halliwell B, Gutteridge J. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, 704 pp.

Hambali Z, Ngah WZ, Wahid SA, Kadir KA. 1995. Effect of ovariectomy and sex hormone replacement on glutathione and glutathione-related enzymes in rat hepatocarcinogenesis. *Pathology*. 27:30-35.

Hamden K, Carreau S, Ellouz F, Masmoudi H, Feki A. 2007. Protective effect of 17beta-estradiol on oxidative stress and liver dysfunction in aged male rats. *J Physiol Biochem*. 63:195-201.

Harlan Laboratories. 2009. Ovariectomy protocol. 1:1-1.

Hellsten Y, Apple FS, Sjodin B. 1996. Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 81:1484-1487.

Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J*. 274:2163-2180.

Hey-Mogensen M, Goncalves RL, Orr AL, Brand MD. 2014. Production of superoxide/H_2O_2 by dihydroorotate dehydrogenase in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 72:149-155.

Hitomi Y, Watanabe S, Kizaki T, Sakurai T, Takemasa T, Haga S, Ookawara T, Suzuki K, Ohno H. 2008. Acute exercise increases expression of extracellular superoxide dismutase in skeletal muscle and the aorta. *Redox Rep*. 13:213-216.

Honchar OO, Mankovska IM. 2007. Glutathione system adaptation to acute stress in the heart of rats during different regimes of hypoxia training. *Ukr Biokhim Zh*. 79:79-85.

Hütter E, Skovbro M, Lener B, Prats C, Rabøl R, Dela F, Jansen-Dürr P. 2007. Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell*. 6:245-256.

Inagi R, Kumagai T, Fujita T, Nangaku M. 2010. The role of glyoxalase system in renal hypoxia. *Adv Exp Med Biol*. 662:49-55.

Ingram KH, Hill H, Moellering DR, Hill BG, Lara-Castro C, Newcomer B, Brandon LJ, Ingalls CP, Penumetcha M, Rupp JC, Garvey WT. 2012. Skeletal muscle lipid peroxidation and insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 97:1182-1186.

Ithayaraja CM. 2011. Metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 9:104-115.

Iyomasa MM, Fernandes FS, Iyomasa DM, Pereira YCL, Restrepo Fernández RA, Calzzani RA, Crivelaro Nascimento G, Ramos Andrade Leite-Panissi C, Mardegan Issa JP. 2015. Metabolic Changes in Masseter Muscle of Rats Submitted to Acute Stress Associated with Exodontia. Franco R (ed). *PLoS One*. 10(6).

Jackson MJ, Papa S, Bolaños J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM, Flier J, Griffiths HR, Heales S, Holst B, Lorusso M, Lund E, Øivind Moskaug J, Moser U, Di Paola M, Polidori MC, Signorile A, Stahl W, Viña-Ribes J, Astley SB. 2002. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol Aspects Med*. 23:209-285.

Javan R, Horvath JJ, Case LE, Austin S, Corderi J, Dubrovsky A, Kishnani PS, Bashir MR 2013. Generating color-coded anatomic muscle maps for correlation of quantitative magnetic

resonance imaging analysis with clinical examination in neuromuscular disorders. *Muscle Nerve*. 48:293-295.

Ji LL. 1995. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev*. 23:135-166.

Johnson EJ. 2002. The role of carotenoids in human health. *Nutr Clin Care*. 5:56-65.

Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. 2012. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int J Mol Sci*. 3:3145-3175.

Kalapos MP. 1999. Methylglyoxal in living organisms-chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett*. 110:145-175.

Kelner KL, Pollard HB. 1985. Glucocorticoid receptors and regulation of phenylethanolamine-N-methyltransferase activity in cultured chromaffin cells. *J Neurosci*. 8:2161-2168.

Kerksick C, Willoughby D. 2005. The antioxidant role of glutathione and N-Acetyl-Cysteine supplements and exercise-Induced Oxidative Stress. *J Int Soc Sports Nutr*. 2:38

Keros P, Pećina M, Ivančić-Košuta M. 1999. Temelji anatomije čovjeka. Naklada Ljevak, Zagreb, 196 pp.

Kharode YP, Sharp MC, Bodine PV. 2008. Utility of the ovariectomized rat as a model for human osteoporosis in drug discovery. *Methods Mol Biol*. 455:111-24.

Kirby ED, Muroy SE, Sun WG, Covarrubias D, Leong MJ, Barchas LA, Kaufer D. 2013. Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2. *Elife*. 16:2.

Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A. 2014. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha).* 60:153-67.

Kovács P, Juránek I, Stankovicová T, Svec P. 1996. Lipid peroxidation during acute stress. *Pharmazie*. 51:51-53.

Kregel KC, Zhang HJ. 2007. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292:18-36.

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 300:1439-1443.

Kudielka BM, Schmidt-Reinwald AK, Hellhammer DH, Kirschbaum C. 1999. Psychological and endocrine responses to psychosocial stress and dexamethasone/corticotropin-releasing hormone in healthy postmenopausal women and young controls: The impact of age and a two-week estradiol treatment. *Neuroendocrinology*. 70:422-30.

Laborde E. 2010. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ*. 17:1373-80.

Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, Curi R, Pithon-Curi TC. 2007. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev*. 128:267-275.

Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ. 1990. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, exercise training. *J Appl Physiol*. 68:2337-2343.

Lawler JM, Kwak HB, Song W, Parker JL. 2006. Exercise training reverses downregulation of HSP70 and antioxidant enzymes in porcine skeletal muscle after chronic coronary artery occlusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 291:1756-1763.

Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, Ji LL. 1994. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 267:439-445.

Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M, Ji LL. 1997. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol*. 272:363-369.

Liou GY, Storz P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 44:479-496.

Lu SC. 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica et biophysica acta*. 5:3143-3153.

Lushchak VI. 2012. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J Amino Acids*, 26 pp.

Mah L, Szabuniewicz C, Fiocco A. 2016. Can anxiety damage the brain*? Curr Opin Psychiatry*. 29:56-63.

Marotti T, Sobočanec S, Mačak-Šafranko Ž, Šarić A, Kušić B, Balog T. 2010. Sensitivity to oxidative stress: sex matters. *Med Sci.* 35:59-68.

McEwen BS. 2000. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*. 22:108-124

McEwen BS. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 87:873-904.

Middelbeek RJ, Horton ES. 2007. The role of glucose as an independent cardiovascular risk factor. *Curr Diab Rep*. 7:43-49.

Miller LH, Dell Smith A, Rothstein L. 1994. The Stress Solution: An action Plan to Manage the Stress in Your Life. Pocket Books, 448 pp.

Monteiro SC, Matté C, Delwing D, Wyse AT. 2005. Ovariectomy increases Na+, K+-ATPase, acetylcholinesterase and catalase in rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol*. 236:9-16.

Morkuniene R, Jekabsone A, Borutaite V. 2002. Estrogens prevent calcium-induced release of cytochrome c from heart mitochondria. *FEBS Letters*. 521:53-56.

Nair S, Singh SV, Krishan A. 1991. Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry*. 12:336-342.

Nayanatara AK, Nagaraja HS, Anupama BK. 2005. The effect of repeated swimming stress on organ weights and lipid peroxidation in rats. *TJPS.* 18:3-9.

Nelson AG, Kokkonen J. 2011. Anatomija istezanja. Data status, Beograd. 1-2 pp.

Netter FH. 2010. Atlas of human anatomy. 5th ed. Saunders, 624 pp.

Nuray U, Berivan T. 2007. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem*. 303:45-51.

Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95:351-358.

Onal B, Levin RM, Kogan BA, Guven A, Leggett RE, Mannikarottu AS. 2007. Novel alterations in superoxide dismutase and catalase activities in the female rabbit bladder subjected to hormonal manipulations. *Int Urol Nephrol*. 39:1049-1054.

Outten CE, Culotta VC. 2004. Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GLR1 gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase. *J Biol Chem*. 279:7785-7791.

Papadimitriou A, Priftis KN. 2009. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*. 16:265-271.

Perevoshchikova IV, Quinlan CL, Orr AL, Gerencser AA, Brand MD. 2013. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 61:298-309.

Poli G, Parola M. 1997. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med*. 22:287-305.

Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, Dudley G. 1994. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 266:375-380.

Powers SK, Jackson M. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 88:1243-1276.

Prochniewicz E, Spakowicz D, Thomas DD. 2008. Changes in actin structural transitions associated with oxidative inhibition of muscle contraction. *Biochemistry*. 47:11811-11817.

Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Gravel R. 1986. Isolation and characterization of human catalase gene. *Nucleic Acids Res*. 14:5321-5335.

Radák Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. 2013. Oxygen consumption and usage during physical exercise: The balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal*. 18:1208-1246.

Rahal A, Kumar A, Singh, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. 2014. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *Biomed Res Int*, 19 pp.

Ramana KV, Srivastava S, Singhal S. 2013. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev*, 3 pp.

Ranabir S, Reetu K. 2011. Stress and hormones. *Indian J Endocrinol Metab*. 15:18-22.

Reid MB. 2001. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*. 90:724-730.

Reid MB. 2008. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med*. 44:169-179.

Retana-Márqueza S, Bonilla-Jaimea H, Vázquez-Palaciosa G, Martínez-Garcíab R, Velázquez-Moctezumaa J. 2003. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm Behav*. 44:327-337.

Rezasoltani A, Ahmadipoor A, Khademi-Kalantari K, Javanshir K. 2012. The sign of unilateral neck semispinalis capitis muscle atrophy in patients with chronic non-specific neck pain. *J Back Musculoskelet Rehabil*. 25:67-72.

Rodrigues MFC, Stotzer US, Domingos MM, Deminice R, Shiguemoto GE, Tomaz LM, Frade de Sousa NM, Ferreira FC, Leite RDL, Selistre-de-Araújo HS, Jordão-Júnior AA, Baldissera V, Andrade Perez SE. 2013. Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in the rat liver. *Clinics.* 68:1247-1254.

Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. 2008. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids*. 73:874-879.

Röth E, Marczin N, Balatonyi B, Ghosh S, Kovács V, Alotti N, Borsiczky B, Gasz B. 2011. Effect of a glutathione S-transferase inhibitor on oxidative stress and ischemia-reperfusion-induced apoptotic signalling of cultured cardiomyocytes. *Exp Clin Cardiol*. 16:92-96.

Salleh MR. 2008. Life Event, Stress and Illness. *Malays J Med Sci*. 15:9-18.

Schneiderman N, Ironson G, Siegel SD. 2005. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annu Rev Clin Psychol*. 1:607-628.

Schomacher J, Petzke F, Falla D. 2012. Localised resistance selectively activates the semispinalis cervicis muscle in patients with neck pain. *Epub*. 17:544-548.

Shier D, Butler J, Lewis R. 2009. Hole's Human Anatomy and Physiology. 12th ed. McGraw-Hill, 1010 pp.

Shkryl VM, Martins AS, Ullrich ND, Nowycky MC, Niggli E, Shirokova N. 2009. Reciprocal amplification of ROS and Ca^{2}+ signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch*. 458:915-928.

Siems W, Crifo C, Capuozzo E, Uchida K, Grune T, Salerno C. 2010. Metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal in human polymorphonuclearleukocytes. *Arch Biochem Biophys*. 503:248-252.

Sies H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, (ed). Oxidative Stress. Academic Press, London, 1-8 pp.

Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 27:916-921.

Simons DG, Travell JG, Simons LS. 1999. Myofascial Pain and Dysfunction The Trigger Point Manual, Upper Half of Body. Lippincott Williams & Wilkins, 1038 pp.

Simons PC, Vander Jagt DL. 1977. Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal Biochem*. 82:334-341.

Smith MA, Reid MB. 2006. Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. *Respir Physiol Neurobiol*. 151:229-241.

Steinbacher P, Eckl P. 2015. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. Breitenbach M, (ed). *Biomolecules*. 5:356-377.

Steptoe A, Kivimäki M. 2013. Stress and cardiovascular disease: an update on current knowledge. *Annu Rev Public Health*. 34:337-354.

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Epub*. 277:44784-44790.

Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. 2007. Lipidna peroksida cija uzroci i posljedice. *Medicina.* 43:84-93.

Stupka N, Tiidus P. 2001. Effects of ovariectomy and estrogen on ischemia-reperfusion injury in hindlimbs of female rats. *J Appl Physiol*. 91:1828-1835.

Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K. 2002. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem*. 277:41254-41258.

Thomas GD. 2013. Functional muscle ischemia in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Front Physiol*. 4:1-6.

Tosatto SC, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, Flohe L, Ursini F, Maiorino M. 2008. The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxid Redox Signal*. 10:1515-1526.

Townsend DM, Tew KD. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 22:7369-7375.

Tsigos C, Chrousos GP. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*. 53:865-871.

Tsuboi H, Kouda K, Takeuchi H, Takigawa M, Masamoto Y, Takeuchi M, Ochi H. 1998. 8-hydroxydeoxyguanosine in urine as an index of oxidative damage to DNA in the evaluation of atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 13:1033-1035.

Vedder H, Anthes N, Stumm G, Würz C, Behl C, Krieg JC. 1999. Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. *J Neurochem*. 72:2531-2538.

Vincent HK, Powers SK, Stewart DJ, Demirel HA, Shanely RA, Naito H. 2000. Short-term exercise training improves diaphragm antioxidant capacity and endurance. *Eur J Appl Physiol*. 81:67-74.

Vincent HK, Shanely RA, Stewart DJ, Demirel HA, Hamilton KL, Ray AD, Michlin C, Farkas GA, Powers SK. 2002. Adaptation of upper airway muscles to chronic endurance exercise. *Am J Respir Crit Care Med.* 166:287-293.

Vogel H, Mirhashemi F, Liehl B, Taugner F, Kluth O, Kluge R, Joost HG, Schürmann A. 2013. Estrogen deficiency aggravates insulin resistance and induces β-cell loss and diabetes in female New Zealand obese mice. *Horm Metab Res*. 45:430-435.

Wang W, Ballatori N. 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev*. 50:335-355.

Wendel A. 1980. Glutathione peroxidase. In: Jakoby WB, (ed) Enzymatic basis of detoxication. Academic Press, New York. 11:333-353.

Williams R, Lemaire P, Lewis P, McDonald FB, Lucking E, Hogan S, Sheehan D, Healy V, O'Halloran KD. 2015. Chronic intermittent hypoxia increases rat sternohyoid muscle NADPH oxidase expression with attendant modest oxidative stress. *Front Physiol*. 6:15

Wolfe RR. 2006. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* 84:475-482.

Xia R, Webb JA, Gnall LL, Cutler K, Abramson JJ. 2003. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide. *Am J Physiol Cell Physiol*. 285:215-221.

Yin H, Xu L, Porter NA. 2011. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*. 111:5944-5972.

Zelko I, Mariani TJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 33:37-349.

Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B. 2005. Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 3:6.

Zhu X, Gallogly MM, Mieyal JJ, Anderson VE, Sayre LM. 2009. Covalent cross-linking of glutathione and carnosine to proteins by 4-oxo-2-nonenal. *Chem Res Toxicol.* 22:1050-1059.

Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Vojtech A, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlager T, Kizek R. 2012. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett*. 4:1247-1253.